



⑫^A **Terinzagelegging** ⑪ **8304496**

Nederland

⑲ NL

- ⑤⁴ **Werkwijze voor het isoleren van L-aminozuren.**
- ⑤¹ Int.Cl.: C12P 13/04.
- ⑦¹ Aanvrager: Mitsui Toatsu Chemicals, Incorporated te Tokio, Japan.
- ⑦⁴ Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

- ②¹ Aanvraag Nr. 8304496.
- ②² Ingediend 30 december 1983.
- ③² --
- ③³ --
- ③¹ --
- ⑥² --

- ④³ Ter inzage gelegd 16 juli 1985.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Werkwijze voor het isoleren van L-aminozuren.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het op doelmatige wijze isoleren van een L-aminozuur uit een reactiemengsel, dat bij de produktie van het L-aminozuur onder toepassing van een micro-organisme is verkregen.

- 5 Tot dusver zijn veel werkwijzen beschreven voor het isoleren van een L-aminozuur met behulp van een ionenuitwisselingshars uit een onder toepassing van een micro-organisme geproduceerd L-aminozuur bevattend reactiemengsel. Bekend zijn bijvoorbeeld de afscheiding van basische
10 aminozuren met behulp van kationenuitwisselingsharsen van het carbon-
zuurtype (Amerikaans octrooischrift 2.549.378), de afscheiding van zure
aminozuren met behulp van zwak basische anionenuitwisselingsharsen
(D.T. Eaglis en H.A. Fiess: Ind. Eng. Chem., deel 36, 604, 1944;
R.K. Cannan, J. Biol. Chem., deel 152, 401, 1944), en de afscheiding
van aminozuren onder toepassing van sterk zure kationenuitwisselings-
15 harsen (H-type) of sterk basische anionenuitwisselingsharsen (OH-type)
(S.M. Partridge en R.C. Blimley, Biochem. J., deel 51, 628, 1952).

- Voor het op industriële schaal isoleren van reactieprodukten met behulp van ionenuitwisselingsharsen is in de Japanse octrooipublikatie
5050/1964 een werkwijze beschreven, waarbij een polymeer uitvlokmiddel
20 van het polyamide-type wordt toegevoegd aan een een saccharide en een
aminozuur bevattende oplossing voor het uitvlokken en precipiteren van
verontreinigingen, en waarbij met behulp van een ionenuitwisselingshars
wordt gezuiverd; en in de Japanse octrooipublikatie 21105/1973 wordt
een werkwijze beschreven voor het terugwinnen van een oplossing van ge-
25 mengde aminozuren, waaronder L-tryptofaan, met behulp van een ionenuit-
wisselingshars van het sulfonzuurtype met een mate van verknoping,
voorgesteld door een DVB-gehalte, van niet meer dan 6%.

- Deze methoden volgens de stand van de techniek blijken echter niet bevredigend te zijn voor de industriële produktie van aminozuren omdat
30 voor de zuivering met behulp van ionenuitwisselingsharsen bij deze
werkwijzen een verwijdering van de gebruikte micro-organismen uit de
reactiemengsels vereist is, bijvoorbeeld door centrifugale afscheiding,
uitvlokken en precipitatie door toevoeging van polymere uitvlokmidde-
len, filtratie met behulp van een ultrafiltratiemembraan enz., en de
35 verwijdering van de micro-organismen vergt veel inspanning.

De uitvinding heeft ten doel een werkwijze te verschaffen voor het op doelmatige wijze winnen van een L-aminozuur uit een onder toepassing van een micro-organisme geproduceerd L-aminozuur bevattend reactiemeng-

sel.

Dit doel wordt volgens de uitvinding bereikt, door het L-aminozuur bevattende reactiemengsel direct te behandelen met een sterk zure kationenuitwisselingshars van het H-type. Volgens de werkwijze van de uitvinding is het mogelijk de verwijdering van het bij de omzetting gebruikte micro-organisme en het isoleren van het gevormde L-aminozuur gelijktijdig uit te voeren.

Het basisprincipe van de onderhavige uitvinding is, dat wanneer een L-aminozuur en een micro-organisme bevattend reactiemengsel door een laag van een sterk zure kationenuitwisselingshars van het H-type wordt geleid teneinde het L-aminozuur aan de harslaag te adsorberen en het te isoleren en te zuiveren, het in het reactiemengsel opgeloste of gesuspendeerde micro-organisme wordt uitgevlokt bij aanraking met de ionenuitwisselingshars en gemakkelijk kan worden verwijderd door de hars met water te wassen. Het uitvlokken van het micro-organisme treedt waarschijnlijk op omdat, wanneer het in water opgeloste of gesuspendeerde micro-organisme in aanraking komt met de sterk zure kationenuitwisselingshars van het H-type, dit wordt gemodificeerd door de sulfonzuurgroep aan de ionenuitwisselingsgroep.

De werkwijze volgens de uitvinding is toepasbaar voor een reactiemengsel, dat een micro-organisme en een L-aminozuur bevat (dat in deze beschrijving soms eenvoudigweg wordt aangeduid als "aminozuur-reactiemengsel"), verkregen bij de produktie van het L-aminozuur onder toepassing van het micro-organisme.

Tot voorbeelden van dergelijke aminozuur-reactiemengsels behoren een L-tryptofaan bevattend reactiemengsel, geproduceerd uit DL-serine en indool bij aanwezigheid van Escherichia coli en/of Pseudomonas putida; een L-tryptofaan bevattend reactiemengsel, geproduceerd uit L-serine en indool bij aanwezigheid van Escherichia coli; een L-tryptofaan bevattend reactiemengsel, geproduceerd bij aanwezigheid van Bacillus subtilis onder toepassing van antranilzuur als een precursor; een L-tryptofaan bevattend reactiemengsel, geproduceerd uit indool, pyrodruivezuur en ammoniak bij aanwezigheid van Aerobacter aerogenes; een L-tryptofaan bevattend reactiemengsel, geproduceerd uit indool, serine en glucose onder toepassing van een bacterie van de genus Aerobacterium; een L-serine bevattend reactiemengsel, geproduceerd in een glycine bevattend kweekmedium, dat methanol als een koolstofbron bevat, onder toepassing van een methanol verbruikend micro-organisme van de genus Aeromonas, Aerobacter of Pseudomonas; en een L-serine bevattend reactiemengsel, geproduceerd in een glycine bevattend kweekme-

8304496

dium bij aanwezigheid van een micro-organisme van de genus Nocardia. De bovenstaande voorbeelden dienen alleen ter illustratie en de werkwijze volgens de uitvinding kan in het algemeen worden toegepast voor de zuivering van alle onder toepassing van micro-organismen verkregen L-aminozuur bevattende reactiemengsels.

Illustratieve voorbeelden van de bij de werkwijze volgens de uitvinding gebruikte sterk zure kationenuitwisselingsharsen van het H-type zijn Lewatit sp-120 (een handelsnaam voor een produkt van Bayer AG), Lewatit sc-102 (een handelsnaam voor een produkt van Bayer AG), Diaion pk-208 (een handelsnaam voor een produkt van Mitsubishi Chemical Co., Ltd.), Diaion sk-102 (een handelsnaam voor een produkt van Mitsubishi Chemical Co., Ltd.) en Amberlite XE-100 (een handelsnaam voor een produkt van Rohm & Haas Co.).

Het aminozuur-reactiemengsel, als zodanig of indien het aminozuur als kristallen in water precipiteert na verdunnen ervan met water tot dat de kristallen bij kamertemperatuur oplossen, wordt vanuit het ene eind ervan door een laag van een kationenuitwisselingshars van het sulfonzuurtype, dat tot een H-vorm is geregenereerd, geleid, waarbij het aminozuur aan de ionenuitwisselingshars adsorbeert. Het micro-organisme in het reactiemengsel wordt gemodificeerd door aanraking met de ionenuitwisselingsharslaag en hecht in de uitgevlokte toestand aan de ionenuitwisselingshars. Vervolgens wordt later met een vastgestelde stromingssnelheid vanuit het andere eind van de harslaag door de ionenuitwisselingsharslaag geleid (deze werkwijze wordt "terugwassen" genoemd) om het uitgevlokte micro-organisme uit de ionenuitwisselingsharslaag te verwijderen.

De adsorptie van het aminozuur, het uitvlokken van het micro-organisme en het verwijderen van het uitgevlokte micro-organisme in de ionenuitwisselingsharslaag worden gewoonlijk uitgevoerd in een met de ionenuitwisselingshars gevulde kolom. Er treden echter geen problemen op wanneer een werkwijze wordt toegepast, waarbij na adsorptie van het aminozuur aan de ionenuitwisselingshars de ionenuitwisselingshars in een reactievat wordt gebracht en daarin wordt gewassen met water.

Wanneer een met een ionenuitwisselingshars gevulde kolom wordt gebruikt, laat men het aminozuur-reactiemengsel met een vastgestelde stromingssnelheid aan de bovenzijde in de met hars gevulde kolom stromen teneinde het aminozuur aan de ionenuitwisselingshars te adsorberen. Hierbij wordt bijna de gehele hoeveelheid van het in het aminozuur-reactiemengsel aanwezige micro-organisme gemodificeerd en uitgevlokt in de met hars gevulde kolom en door de hars fysisch gebonden. Een deel

8304496

van het micro-organisme stroomt aan de onderzijde van de met hars gevulde kolom samen met de afgevoerde vloeistof weg.

Wanneer na de boven beschreven werkwijze water vanuit de onderzijde van de kolom met een vastgestelde stromingssnelheid door de met
5 ionenuitwisselingshars gevulde kolom wordt geleid teneinde het terugwassen uit te voeren, komt het aan de hars hechtende uitgevlokke micro-organisme vrij en stroomt het weg aan de bovenzijde van de kolom en kan zo op doelmatige wijze worden verwijderd.

Het micro-organisme in het L-aminozuur-reactiemengsel, dat in de
10 ionenuitwisselingsharslaag wordt gebracht, kan nagenoeg volledig worden verwijderd, omdat bij de adsorptie van het L-aminozuur aan het ionenuitwisselingshars een deel van het micro-organisme samen met de afgevoerde vloeistof wordt verwijderd en bij het terugwassen het grootste deel van het micro-organisme in de vorm van een uitgevlokke massa uit
15 de harslaag wordt verwijderd.

De ionenuitwisselingshars met het daaraan geadsorbeerde L-aminozuur wordt vervolgens gewoonlijk met water bevattende ammoniak behandeld om het L-aminozuur te elueren. Door concentreren en kristalliseren van het geëlueerde materiaal kan het gewenste L-aminozuur gemakkelijk
20 worden geïsoleerd.

Het verkregen L-aminozuur bezit een grote zuiverheid dankzij het effect van de zuivering met behulp van de ionenuitwisselingshars.

Door behandeling van een L-aminozuur-reactiemengsel, dat een micro-organisme bevat, met een sterk zure kationenuitwisselingshars van
25 het H-type is het volgens de werkwijze van de uitvinding mogelijk tegelijkertijd het L-aminozuur te isoleren en het micro-organisme, dat volgens de in de industrie gebruikelijke methoden zeer moeilijk te verwijderen is, te verwijderen. Derhalve is de werkwijze volgens de uitvinding van grote industriële betekenis als een methode voor het zuiveren
30 van produkten, die zijn verkregen door omzettingen, waarbij micro-organismen worden toegepast.

In de volgende voorbeelden wordt de uitvinding nader toegelicht.

Voorbeeld I

Escherichia coli bevattende cellen werden bij een pH van 7 en een
35 temperatuur van 30°C onder roeren en aereren bij aanwezigheid van monokaliumfosfaat, dikaliumfosfaat, ammoniumsulfaat, calciumchloride, ijzersulfaat, gistextract, polypepton en andere vereiste materialen onder toevoeging van glucose en indool gekweekt. De uiteindelijke concentratie van de cellen was 30-35 g/liter.

40 Op dezelfde wijze als in het vorenstaande is aangegeven werden

8304496

Pseudomonas putida bevattende cellen in hetzelfde kweekmilieu als boven, behalve dat dit geen indool bevatte, gekweekt.

In beide gevallen werden de gekweekte cellen onder toepassing van een gebruikelijke zeer snel werkende centrifugale afscheider van de
5 cultuurvloeistof afgescheiden en verkregen als een crème-achtige koek met een watergehalte van 75-85 gew.%.

Een water bevattende oplossing, bestaande uit 77,3 g DL-serine, 10,5 g ammoniumsulfaat en 486 g water werd in een reactor gebracht en de pH ervan werd met 29 gew.procents ammonia ingesteld op 8,5. Vervol-
10 gens werden 51,2 g van de op de boven beschreven wijze verkregen crème-achtige koek van Escherichia coli cellen en 23,2 g van de op boven beschreven wijze verkregen crème-achtige koek van Pseudomonas putida cellen toegevoegd en het mengsel werd goed geroerd. Verder werden 392 g van een 78,4 g indool bevattende oplossing in tolueen toegevoegd en
15 werd gedurende 40 uren bij 35°C omgezet.

De hoeveelheid van het in de reactiemassa gevormde L-tryptofaan werd geanalyseerd door vloeistofchromatografie en bleek 129,8 g te zijn (opbrengst 95,0%, betrokken op indool).

Het reactiemengsel werd gedestilleerd om tolueen te verwijderen.
20 Vervolgens werd het reactiemengsel met water verdund, zodat de L-tryptofaankristallen volledig oplosten tot een concentratie van 1,0 gew.%.

Anderzijds werden 4,86 liter Lewatit sp-120 (een sterk zure kationenuitwisselingshars), met waterstofchloride tot een H-vorm gerege-
neerd, in een kolom gebracht. De bovengenoemde L-tryptofaanoplossing
25 (125 g) werd vanuit de bovenzijde met een vastgestelde stromingssnelheid door de kolom geleid, waarbij L-tryptofaan aan de ionenuitwisselingshars werd geadsorbeerd.

Vervolgens werd de kolom teruggewassen met 24,9 g water teneinde de losse uitgevlokte massa van de microbiële cellen uit te wassen.
30 Daarna werd L-tryptofaan uit de harskolom geëluëerd onder toepassing van ammonia in een hoeveelheid, die overeenkwam met tweemaal de uitwisselingscapaciteit van de ionenuitwisselingshars. Het geëluëerde materiaal werd tot 100°C verhit teneinde ammoniak te verwijderen en terug te winnen. Het residu werd afgekoeld tot kamertemperatuur. De gepreci-
35 piteerde L-tryptofaankristallen werden afgescheiden door filtratie en gedroogd. L-tryptofaan met een zuiverheid van 99,8% werd verkregen in een hoeveelheid van 1,0 g.

De celbalans door de behandeling met de ionenuitwisselingshars was zodanig, dat 3% van de cellen aanwezig waren in de afgevoerde vloeistof, die bij de adsorptie van L-tryptofaan door de kolom was geleid,
40

8304496

en 97% van de cellen was aanwezig in de afgevoerde stroom bij het terugwassen (de celbalans werd bepaald uit het gewicht van de cellen, die waren geconcentreerd tot droog materiaal was verkregen en de koolstofbalans, verkregen door elementair analyse).

5 Voorbeeld II

L-tryptofaan werd geproduceerd uit L-serine en indool in water onder toepassing van een crème-achtige koek van Escherichia coli cellen, die op dezelfde wijze als in voorbeeld I waren gekweekt. Teneinde een vermindering van de activiteit van het enzym door indool te voorkomen
10 werd de omzetting uitgevoerd door indool geleidelijk toe te voegen, terwijl de concentratie ervan continu werd geanalyseerd, zodat de indoolconcentratie in water bij 200 dpm of lager werd gehouden. De opbrengst aan geproduceerd L-tryptofaan was 100%, betrokken op indool en 85%, betrokken op L-serine. De uiteindelijke concentratie van geaccumuleerd L-tryptofaan was 120 g/liter. Het L-tryptofaan bevattende reactiemengsel werd door centrifugeren ontwaterd, waarbij een crème-achtige koek van reactiemateriaal werd verkregen, die L-tryptofaan en de micro-
15 biële cellen bevatte.

Deze crème-achtige koek werd behandeld met Lewatit sc-102 (H-vorm)
20 als een ionenuitwisselingshars onder toepassing van dezelfde werkwijze als in voorbeeld I, waarbij de cellen werden verwijderd en L-tryptofaan werd geïsoleerd.

De hoeveelheid van het geïsoleerde L-tryptofaan was 1,1 g en de zuiverheid ervan was 99,9%. De cellen in het L-tryptofaan bevattende
25 reactiemengsel werden bij de adsorptie aan de ionenuitwisselingshars in een hoeveelheid van 2,5% verwijderd en bij het terugwassen van de ionenuitwisselingshars bevattende kolom in een hoeveelheid van 97,5% verwijderd.

CONCLUSIE

Werkwijze voor het isoleren van een L-aminozuur uit een L-amino-
zuur en een micro-organisme bevattend reactiemengsel, dat wordt verkre-
gen bij de produktie van het L-aminozuur onder toepassing van het mi-
5 cro-organisme, met het kenmerk, dat men het reactiemengsel behandelt
met een sterk zure kationenuitwisselingshars van het H-type terwijl het
L-aminozuur in opgeloste toestand wordt gehouden.

++++++

8304496