

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

2 633 931

(21) N° d'enregistrement national :

89 09206

(51) Int Cl^s : C 08 G 69/08; C 07 K 3/28; C 12 P 21/00.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 7 juillet 1989.

(71) Demandeur(s) : Société dite : CHISSO CORPORATION.
— JP.

(30) Priorité : JP. 8 juillet 1988, n° 63-168826 et 30 septembre 1988, n° 63-244251.

(72) Inventeur(s) : Masakazu Hatakeyama ; Yasuhiro Kurokawa ; Masahiro Fujii.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 2 du 12 janvier 1990.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux appartenus :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Lavoix.

(54) Procédé pour la production de ϵ -polylysine libre.

(57) L'invention concerne un procédé pour la production de ϵ -polylysine libre.

Le procédé consiste à faire passer une solution de ϵ -polylysine, de préférence obtenue en cultivant des microorganismes ayant la faculté de produire de la ϵ -polylysine, à travers une résine échangeuse d'anions basique ou une résine échangeuse de cations acide, et à traiter la solution recueillie par une opération choisie entre la précipitation dans un solvant organique, la lyophilisation et le séchage par atomisation, pour obtenir la ϵ -polylysine libre.

Applications notamment dans les secteurs des produits chimiques pour l'agriculture, additifs alimentaires, produits pharmaceutiques, etc.

FR 2 633 931 - A1

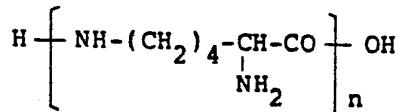
D

La présente invention concerne un procédé pour la production de ϵ -polylysine libre.

On sait déjà que de la ϵ -polylysine libre est obtenue, par exemple, en cultivant Streptomyces albulus sous-espèce lysinopolymerus N° 346 comme décrit dans la demande de brevet japonais mise à l'inspection publique sous le N° 53-72896/1978.

Comme représenté par la formule suivante, la substance ci-dessus est un polymère de L-lysine et un composé de haut poids moléculaire dans lequel les groupes amino de la position ϵ de la L-lysine forment des liaisons peptidiques avec des groupes carboxyle adjacents de L-lysine sur sa chaîne droite.

15 .



Etant donné que la substance est un polymère de la L-lysine qui est un acide aminé essentiel, elle est utilisable en toute sûreté et constitue une matière aux propriétés particulières du fait qu'elle comporte de nombreux groupes amino. La mise à profit de ces propriétés a fait progresser son application aux articles de toilette, cosmétiques, compléments d'alimentation, produits chimiques pour l'agriculture, additifs alimentaires, matériaux pour l'électronique, etc.

Un procédé classique de production de ϵ -polylysine s'exécute comme suit : après avoir séparé les microorganismes d'un bouillon de culture de ϵ -polylysine, le pH du bouillon de culture est ajusté à 8,5 par addition d'une solution alcaline, la solution mélangée est amenée à passer à travers une résine échan-

geuse de cations faiblement acide et la ϵ -polylysine est adsorbée sur la résine. La résine est lavée à l'eau, et la ϵ -polylysine est séparée de la résine par élution avec de l'acide chlorhydrique 0,1N.

05 L'éluat recueilli est concentré et décoloré par du charbon actif, puis la ϵ -polylysine est précipitée par addition d'un solvant tel que le méthanol, l'acétone, etc. La ϵ -polylysine préparée à partir du bouillon de culture par le procédé ci-dessus est le chlorhydrate de ϵ -polylysine.

Cependant, il est également nécessaire de fournir de la ϵ -polylysine libre aux secteurs de la pharmacie, des additifs alimentaires, des produits chimiques pour l'agriculture, etc.

15 Il n'a pas été connu jusqu'à présent de procédé pour produire de la ϵ -polylysine libre à partir d'un bouillon de culture de ϵ -polylysine, d'un sel acide de ϵ -polylysine (par exemple le sulfate, le chlorhydrate, le nitrate ou le phosphate) 20 ou d'une solution de celui-ci. Un but de la présente invention est de produire en un rendement élevé cette ϵ -polylysine libre à l'échelle industrielle.

En outre, lorsque la ϵ -polylysine est séparée par élution d'une résine échangeuse de cations dans le procédé classique susmentionné, l'élution doit être conduite avec une solution aqueuse acide. Il en résulte que la ϵ -polylysine est obtenue sous forme d'un sel acide par précipitation par un solvant, lyophilisation ou séchage par atomisation. Le sel 30 acide de ϵ -polylysine ne pose pas de problèmes lorsqu'il est utilisé sous forme d'une solution aqueuse. Cependant, à cause de sa piètre solubilité dans un solvant organique, le sel acide ne peut être utilisé sous forme de préparations alcooliques pour la conservation de produits alimentaires par dissolution 35

dans l'alcool éthylique. Pour augmenter la solubilité dans l'alcool éthylique, la ϵ -polylysine doit être sous forme de ϵ -polylysine libre.

Le but de la présente invention est de surmonter ces problèmes en utilisant une résine échangeuse d'anions basique ou une résine échangeuse de cations acide et de fournir un procédé pour produire la ϵ -polylysine libre avec un rendement élevé à l'échelle industrielle.

La présente invention fournit un procédé pour la production de ϵ -polylysine libre, qui consiste à faire passer une solution de ϵ -polylysine, de préférence une solution d'un sel acide de ϵ -polylysine ou une solution obtenue en séparant les micro-organismes d'un bouillon de culture de ϵ -polylysine, à travers une résine échangeuse d'anions basique, et à traiter la solution recueillie par une opération choisie entre la précipitation dans un solvant organique, la lyophilisation et le séchage par atomisation, pour obtenir la ϵ -polylysine libre.

De plus, la présente invention fournit un procédé pour la production de ϵ -polylysine libre, qui consiste à faire passer une solution de ϵ -polylysine à travers une résine échangeuse de cations acide pour adsorber la ϵ -polylysine sur la résine, à séparer la ϵ -polylysine de la résine par élution avec une solution alcaline, à enlever l'excès de matière alcaline de la solution au moyen d'une membrane d'ultrafiltration et à traiter la solution par une opération choisie entre la précipitation dans un solvant organique, la lyophilisation et le séchage par atomisation, pour obtenir la ϵ -polylysine libre.

La solution de sel acide de ϵ -polylysine qui est utilisée dans la présente invention est de préférence un bouillon de culture de ϵ -polylysine

purifié ayant été traité par une résine échangeuse de cations, une membrane d'ultrafiltration ou autre. Des sels acides tels que le sulfate, le chlorhydrate, le nitrate, le phosphate, etc., peuvent être donnés en exemple. En outre, le bouillon de culture de ϵ -polylysine peut être utilisé tel quel.

On peut utiliser une résine échangeuse d'anions faiblement ou fortement basique, mais une résine échangeuse d'anions fortement basique est préférée.

On peut utiliser une résine échangeuse de cations faiblement ou fortement acide, mais une résine échangeuse de cations faiblement acide est préférée.

La solution alcaline est une solution qui contient un cation qui peut être échangé contre la ϵ -polylysine ainsi qu'un groupe hydroxyle provenant d'hydroxyde de sodium, hydroxyde de potassium, hydroxyde de calcium, hydroxyde d'ammonium, etc.

On peut utiliser une membrane d'ultrafiltration qui laisse passer une solution alcaline et ne laisse pas passer la ϵ -polylysine, et il s'agit de préférence d'une membrane ayant un poids moléculaire de seuil d'environ 1000.

Dans le procédé pour préparer la ϵ -polylysine libre consistant à utiliser une quantité de la résine échangeuse d'anions basique capable d'échanger une quantité d'anions équivalent ou supérieur avec la ϵ -polylysine d'une solution de ϵ -polylysine telle qu'une solution acide de ϵ -polylysine ou un bouillon de culture de ϵ -polylysine, les anions sont échangés par réaction avec la résine sous forme de colonne ou sous forme de lots séparés. La ϵ -polylysine libre produite est précipitée dans un solvant organique, lyophilisée ou séchée par atomisation.

Dans le procédé pour préparer la ϵ -polylysine libre consistant à utiliser une quantité de la résine échangeuse de cations acide capable d'échanger une quantité de cations équivalent ou supérieur contre la ϵ -polylysine, une solution de ϵ -polylysine est mise à réagir avec la résine sous forme de colonne ou sous forme de lots séparés, et la ϵ -polylysine est adsorbée sur la résine. Ensuite, la ϵ -polylysine est séparée de la résine par élution avec une solution alcaline, et la solution éluée est traitée par une membrane d'ultrafiltration pour enlever l'excès de matière alcaline. La ϵ -polylysine est ensuite obtenue par précipitation dans un solvant organique, lyophilisation ou séchage par atomisation.

L'intérêt de l'invention réside en ce qu'une ϵ -polylysine libre peut être produite industriellement et avec un haut rendement par un procédé simple et peu coûteux et être fournie aux secteurs des additifs alimentaires, des produits chimiques pour l'agriculture, de la pharmacie, etc.

Les exemples non limitatifs suivants illustrent plus particulièrement la présente invention, mais sans en préciser les applications pratiques.

25

EXAMPLE 1

On place dans une colonne un litre de résine échangeuse d'anions Amberlite[®] IRA-402 (type OH⁻) humide et l'on fait passer à travers la colonne 1000 ml d'une solution de chlorhydrate de ϵ -polylysine à 5 % à un débit de VS (vitesse spatiale) = 0,2. Ensuite, on fait passer 1000 ml d'eau distillée au même débit à travers la colonne. On recueille et lyophilise les 2000 ml de liquide ayant passé et l'on obtient 35,0 g de ϵ -polylysine libre. La teneur en chlore du produit est inférieure à 0,1 %.

EXEMPLE 2

On cultive Streptomyces albulus pendant 96 heures dans un petit fermenteur à cuve, on filtre le bouillon et l'on obtient 2,0 litres de filtrat. La 05 concentration en ϵ -polylysine du filtrat est de 8,07 g/l.

On ajuste 1,0 litre du filtrat à pH 8,5 et on le filtre. On fait passer le filtrat à un débit de VS = 1 à travers une colonne contenant 200 ml de 10 résine échangeuse de cations faiblement acide Amberlite R IRC-50 (type H $^+$) et la ϵ -polylysine est adsorbée sur la résine échangeuse de cations. On lave la résine avec 800 ml d'une solution d'acide acétique 0,2N, puis avec 800 ml d'eau distillée (dans 15 chaque cas à un débit de VS = 2). Ensuite, on fait passer 1000 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1N à travers la résine échangeuse de cations à un débit de VS = 1, et la ϵ -polylysine est séparée par élution. Le volume de solution éluée avec la solution 20 extraite est de 1000 ml. La teneur en ϵ -polylysine de la solution est de 6,06 g/l et le rendement en ϵ -polylysine est de 75 %.

On dialyse les 1000 ml de solution éluée au moyen d'une membrane d'ultrafiltration ayant un 25 poids moléculaire de seuil de 1000, fabriquée par Fuji Filter Industry Company, Japon (nom commercial : Filtron NOVA 1K, surface : 700 cm 2). Les conditions d'ultrafiltration sont telles qu'indiquées ci-dessous :

30 Débit de circulation : 700 ml/min ;
Pression d'entrée : 98,1 kPa ;
Pression de sortie : 58,8 kPa.

Dans l'opération d'ultrafiltration, on concentre 1,0 litre de solution éluée venant de la résine 35 échangeuse de cations jusqu'à un volume de 400 ml,

on mélange 600 ml d'eau distillée à la solution concentrée, puis on dialyse la solution mélangée au moyen d'une membrane d'ultrafiltration jusqu'à l'obtention de 400 ml de solution concentrée. On répète 05 la dialyse trois fois et l'on obtient 400 ml de solution concentrée. La concentration en ϵ -polylysine de la solution obtenue est de 14,1 g/l et le rendement en ϵ -polylysine est de 93 %.

On fait passer les 400 ml de solution concentrée à travers 200 ml de résine échangeuse d'anions basique Amberlite[®] IRA-402 (type OH⁻) à un débit de VS = 0,2, et l'on fait passer 500 ml d'eau distillée à travers la résine. Le volume de la solution recueillie est de 900 ml. La concentration en ϵ -polylysine 15 de la solution recueillie est de 5,99 g/l et le rendement en ϵ -polylysine est de 95,6 %.

On lyophilise la solution obtenue. Le poids du produit lyophilisé est de 5,60 g, sa couleur est blanche et sa pureté est de 96,0 %. La teneur en chlore du produit est inférieur à 0,1 %.

EXEMPLE 3

On cultive Streptomyces albulus pendant 96 heures dans un petit fermenteur à cuve, on filtre le 25 bouillon et l'on obtient 2,0 litres de filtrat. La concentration en ϵ -polylysine du filtrat est de 8,07 g/l.

On dialyse 1000 ml du filtrat au moyen d'une membrane d'ultrafiltration ayant un poids moléculaire 30 de seuil de 3000, fabriquée par Fuji Filter Industry Company (nom commercial : Filtron NOVA 3K, surface : 700 cm²). Les conditions d'ultrafiltration sont les mêmes que celles employées dans l'Exemple 1 avec la membrane d'ultrafiltration à poids moléculaire de 35 seuil de 1000. On obtient 1,8 litre de liquide dialysé

ayant traversé la membrane d'ultrafiltration à poids moléculaire de seuil de 3000. La concentration en ϵ -polylysine du liquide obtenu est de 4,17 g/l et le rendement en ϵ -polylysine est de 93 %.

05 On dialyse le volume de 1,8 litre de liquide obtenu au moyen d'une membrane d'ultrafiltration ayant un poids moléculaire de seuil de 1000, fabriquée par Fuji Filter Industry Company (non commercial : Filtron NOVA 1K, surface : 700 cm²). Les 10 conditions d'ultrafiltration sont les mêmes que celles employées dans l'Exemple 2 avec la membrane d'ultrafiltration à poids moléculaire de seuil de 1000. On concentre jusqu'à 250 ml ce volume de 1,8 litre de liquide dialysé qui avait traversé la membrane d'ultrafiltration à poids moléculaire de seuil de 3000. La concentration en ϵ -polylysine de la solution concentrée est de 26,88 g/l et le rendement 15 en ϵ -polylysine est de 93 %.

20 On fait passer les 250 ml de solution concentrée à travers 200 ml de résine échangeuse d'anions basique Amberlite ^(R) IRA-402 (type OH⁻) à un débit de VS = 0,2, et l'on fait passer 500 ml d'eau distillée à travers la résine. Le volume de la solution recueillie est de 700 ml. La concentration en ϵ -polylysine 25 de la solution recueillie est de 8,56 g/l et le rendement en ϵ -polylysine est de 95,6 %.

On lyophilise la solution obtenue. Le poids du produit lyophilisé est de 6,70 g, sa couleur est blanche et sa pureté est de 96,0 %.

30

EXEMPLE 4

On place dans une colonne un litre de résine échangeuse de cations faiblement acide Amberlite ^(R) IRC-50 (type NH₄⁺) humide et l'on fait passer 1000 ml 35 d'une solution de chlorhydrate de ϵ -polylysine à 5 %

(contenant 40 g/l de ϵ -polylysine libre) à pH 8,5 à un débit de VS = 1 pour adsorber la ϵ -polylysine sur la résine. On fait passer 3000 ml d'eau distillée à travers la colonne au même débit pour laver
05 la colonne. Après avoir lavé la colonne, on fait passer à travers la résine échangeuse de cations 3000 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1N à un débit de VS = 1, et la ϵ -polylysine est séparée par élution. Le volume de solution éluée avec
10 la solution extraite est de 3000 ml. La teneur en ϵ -polylysine de la solution est de 10,39 g/l et le rendement en ϵ -polylysine est de 77,9 %.

On dialyse les 3000 ml de solution éluée au moyen d'une membrane d'ultrafiltration ayant un
15 poids moléculaire de seuil de 1000, fabriquée par Fuji Industry Company, Japon (nom commercial : Filtron NOVA 1K, surface : 700 cm²). Les conditions d'ultrafiltration sont données ci-dessous :

Débit de circulation : 700 ml/min ;
20 Pression d'entrée : 98,1 kPa ;
Pression de sortie : 58,8 kPa.

Dans l'opération d'ultrafiltration, on concentre 3000 ml de solution éluée venant de la résine échangeuse de cations jusqu'à un volume de
25 1500 ml, on mélange 1500 ml d'eau distillée à la solution concentrée, puis on dialyse la solution mélangée au moyen d'une membrane d'ultrafiltration pour obtenir 1500 ml de solution concentrée. On répète la dialyse trois fois et l'on obtient 1500
30 ml de solution concentrée. La concentration en ϵ -polylysine de la solution obtenue est de 19,3 g/l et le rendement en ϵ -polylysine est de 93 %.

On lyophilise les 1500 ml de solution concentrée et l'on obtient 28,9 g de ϵ -polylysine libre. La teneur en sodium du produit est inférieu-

re à 0,1 %.

EXEMPLE 5

On cultive Streptomycetes albulus pendant 96 heures dans un petit fermenteur à cuve, on filtre le bouillon et l'on obtient 2,0 litres de filtrat. La concentration en ϵ -polylysine du filtrat est de 8,07 g/l.

On ajuste les 1000 ml du filtrat à pH 8,5 et on le filtre. On fait passer le filtrat à travers une colonne contenant 200 ml de résine échangeuse de cations faiblement acide Amberlite[®] IRC-50 (type NH_4^+) à un débit de VS = 1, et la ϵ -polylysine est adsorbée sur la résine échangeuse de cations. On lave la résine avec 800 ml d'eau distillée (VS = 2). Après le lavage, on fait passer 1000 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1N à travers la résine échangeuse de cations à VS = 1, et la ϵ -polylysine est séparée par élution. Le volume de solution éluée avec la solution extraite est de 1000 ml. La teneur en ϵ -polylysine de la solution est de 6,06 g/l et le rendement en ϵ -polylysine est de 75 %.

On dialyse les 1000 ml de solution éluée au moyen d'une membrane d'ultrafiltration ayant un poids moléculaire de seuil de 1000, fabriquée par Fuji Industry Company, Japon (nom commercial : Filtron NOVA 1K, surface : 700 cm²). Les conditions d'ultrafiltration sont les mêmes que celles employées à l'Exemple 4.

Dans l'opération d'ultrafiltration, on concentre 1,0 litre de solution éluée venant de la résine échangeuse de cations jusqu'à un volume de 400 ml, on mélange 600 ml d'eau distillée à la solution concentrée, puis on dialyse la solution mélangée au moyen d'une membrane d'ultrafiltration pour obtenir 400 ml de solution concentrée. On répète la dialyse

11

cinq fois et l'on obtient 400 ml de solution concentrée. La concentration en ϵ -polylysine de la solution obtenue est de 14,1 g/l et le rendement en ϵ -polylysine est de 93 %.

05 On lyophilise les 400 ml de solution obtenue. Le poids du produit lyophilisé est de 5,60 g, sa couleur est blanche et sa pureté est de 99,0 %. La teneur en sodium du produit est inférieure à 0,1 %.

10

EXEMPLE 6

On prépare 400 ml d'une solution concentrée par le même mode opératoire qu'à l'Exemple 5. On ajoute 6,0 g de dextrine aux 400 ml de solution concentrée et l'on sèche le mélange par atomisation. 15 Le poids de la poudre obtenue est de 11,0 g, la couleur de la poudre est blanche et sa teneur en ϵ -polylysine est de 45 % en poids.

20

EXEMPLE 7

On prépare 400 ml d'une solution concentrée par le même mode opératoire qu'à l'Exemple 5. On ajoute 1600 ml d'acétone à la solution et il se forme un précipité. On recueille le précipité par centrifugation et le sèche sous vide. Le poids de 25 la poudre obtenue est de 4,76 g, sa couleur est blanche et sa pureté est de 98,3 %.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la production de ϵ -polylysine libre, caractérisé en ce qu'il consiste à faire passer une solution de ϵ -polylysine à travers une résine échangeuse d'anions basique, à recueillir la solution ayant passé et à traiter la solution recueillie par une opération choisie entre la précipitation dans un solvant organique, la lyophilisation et le séchage par atomisation, pour obtenir la ϵ -polylysine libre.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on utilise une ϵ -polylysine obtenue en cultivant des microorganismes ayant la faculté de produire de la ϵ -polylysine.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisée en ce que les microorganismes ayant la faculté de produire de la ϵ -polylysine sont de l'espèce Streptomyces albulus.
4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution de ϵ -polylysine est une solution obtenue en enlevant les microorganismes d'un bouillon de culture de ϵ -polylysine, ou une solution d'un sel acide de ϵ -polylysine.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la solution de sel acide de ϵ -polylysine est une solution obtenue en séparant la ϵ -polylysine d'une résine échangeuse de cations par élution avec une solution acide après avoir adsorbé sur la résine échangeuse de cations le filtrat du bouillon de culture obtenu en cultivant des microorganismes ayant la faculté de produire de la ϵ -polylysine.
6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution de ϵ -polylysine est une solution obtenue en traitant au moyen d'une membrane d'ultrafiltration ayant un poids moléculaire de seuil

de 1000 ou moins une solution obtenue en séparant les microorganismes d'un bouillon de culture obtenu en cultivant des microorganismes ayant la faculté de produire de la ϵ -polylysine, et en recueillant les fractions qui ne passent pas à travers la membrane d'ultrafiltration.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution de ϵ -polylysine est une solution obtenue en traitant au moyen d'une membrane d'ultrafiltration ayant un poids moléculaire de seuil d'au moins 3000 une solution obtenue en séparant les microorganismes d'un bouillon de culture obtenu en cultivant des microorganismes ayant la faculté de produire de la ϵ -polylysine, puis en traitant la solution ayant traversé, contenant la ϵ -polylysine, au moyen d'une membrane d'ultrafiltration ayant un poids moléculaire de seuil de 1000 ou moins, et en recueillant les fractions qui ne passent pas à travers la membrane d'ultrafiltration.

8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la résine échangeuse d'anions basique est Amberlite IRA-402.

9. Procédé pour la production de ϵ -polylysine libre, caractérisé en ce qu'il consiste à faire passer une solution de ϵ -polylysine à travers une résine échangeuse de cations acide pour adsorber la ϵ -polylysine sur la résine, à séparer la ϵ -polylysine de la résine par élution avec une solution alcaline, à enlever l'excès de matière alcaline de la solution au moyen d'une membrane d'ultrafiltration et à traiter la solution par une opération choisie entre la précipitation dans un solvant organique, la lyophilisation et le séchage par atomisation, pour obtenir la ϵ -polylysine libre.

35 10. Procédé selon la revendication 9,

caractérisé en ce que l'on utilise une ϵ -polylysine obtenue en cultivant des microorganismes ayant la faculté de produire de la ϵ -polylysine.

05 11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la résine échangeuse de cations acide est Amberlite IRC-50.

10 12. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les microorganismes ayant la faculté de produire de la ϵ -polylysine sont de l'espèce Streptomyces albulus.

13. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la solution de ϵ -polylysine est un bouillon de culture de ϵ -polylysine ou une solution d'un sel acide de ϵ -polylysine.