(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 554 813**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **84 16944**

(51) Int Cl⁴ : C 07 D 209/20.

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) Date de dépôt : 7 novembre 1984.

(30) Priorité : JP, 10 novembre 1983, n° 211593/83.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 20 du 17 mai 1985.

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

(71) Demandeur(s) : *Société dite : AJINOMOTO CO., INC.* — JP.

(72) Inventeur(s) : Tetsuya Kaneko, Toshio Kitahara et Toyokazu Kaneko.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.

(54) Procédé pour la récupération de tryptophane optiquement actif.

(57) L'invention concerne la récupération de tryptophane optiquement actif.

Selon l'invention, on filtre une solution de tryptophane optiquement actif contenant des impuretés à travers une membrane semi-perméable; ensuite, on soumet le filtrat à neutralisation pour le cristalliser après addition d'un alcool inférieur ou d'une cétone, à une température de cristallisation supérieure au point de transition du tryptophane optiquement actif, depuis le domaine alcalin; et ensuite, on sépare les cristaux précipités des impuretés.

Applications : obtention de L-tryptophane de haute qualité utile comme supplément alimentaire.

FR 2 554 813 - A1

La présente invention concerne un procédé pour la récupération de tryptophane optiquement actif comprenant un traitement par une membrane semi-perméable et une recristallisation en combinaison, dans la récupération du tryptophane optiquement actif à partir d'une solution de tryptophane optiquement actif contenant des impuretés, à savoir un liquide de fermentation ou un mélange de réaction enzymatique et des liquides obtenus dans leurs étapes intermédiaires, en vue de séparer les impuretés concomitantes qu'ils contiennent pour effectuer plus efficacement la purification.

Le L-tryptophane est l'un des aminoacides essentiels et il est intéressant comme source de composant nutritif pour l'homme et les animaux domestiques. On souhaite donc que le L-tryptophane pour ces utilisations soit de haute qualité.

Pour produire le tryptophane, on a utilisé un procédé de synthèse chimique, un procédé par fermentation, un procédé enzymatique, etc.. Le procédé de synthèse chimique nécessite la résolution optique d'une forme racémique. Dans le procédé par fermentation et le procédé enzymatique, on peut produire directement le tryptophane optiquement actif, mais le bouillon ainsi obtenu contient simultanément de grandes quantités de sous-produits et de pigments, de sorte que les étapes et les opérations pour récupérer le tryptophane sont extrêmement compliquées.

Jusqu'à présent, on utilise par exemple pour séparer ces impuretés un procédé qui consiste à adsorber le tryptophane sur une résine échangeuse d'anions, à l'éluer, à adsorber encore le tryptophane sur une résine échangeuse de cations, à l'éluer et ensuite à le recristalliser (demande de brevet japonais non examinée publiée 11061/78), un procédé qui consiste à mettre en contact une solution de cristaux bruts de tryptophane avec une résine non ionique pour y adsorber les impuretés, puis à effectuer un traitement de filtration en utilisant une membrane d'ultrafiltration et ensuite une recristallisation (demande de brevet japonais non examinée publiée 895/83), etc..

Cependant, le tryptophane présente par nature une forte adsorption moléculaire sur les résines en raison d'une affinité particulière résultant de sa structure moléculaire. En conséquence,

le tryptophane a tendance à être adsorbé sur les résines et à être désorbé simultanément avec les impuretés telles que matières colorantes, etc.. En vue de séparer ces impuretés, les étapes et les opérations utilisant des résines deviennent compliquées, ou bien s'accompagnent de pertes importantes telles que la perte du résidu après élution, etc.. En outre, de grandes quantités d'eau, d'acides, d'alcalis, de solvants organiques, etc. sont utilisées dans les étapes pour utiliser des résines, de sorte que les coûts en matières premières secondaires, en traitement de liquides résiduaires et en énergie augmentent. En outre, le tryptophane optiquement actif tend à provoquer une altération dans une forme cristalline due à l'adsorption d'impuretés, comme une formation de couleur, etc. et tend également à former des cristaux agglomérés, contenant donc une grande quantité d'impuretés dans les interstices des cristaux. Pour ces raisons, on ne connaît pas de procédé pour obtenir avec un rendement élevé un tryptophane optiquement actif de haute qualité sans utiliser de résines.

A la suite de recherches sur un procédé pour récupérer le tryptophane optiquement actif à l'exclusion de toute étape utilisant des résines telles que des résines échangeuses d'ions, la demanderesse a découvert selon l'invention que l'on peut récupérer du tryptophane optiquement actif de haute qualité et avec un rendement extrêmement élevé dans la récupération du tryptophane optiquement actif à partir d'un liquide de fermentation ou d'un mélange de réaction enzymatique qui contient de grandes quantités d'impuretés et de liquides obtenus dans les étapes intermédiaires de ceux-ci, en effectuant d'abord une filtration utilisant une membrane semi-perméable, et ensuite en neutralisant le filtrat depuis le domaine alcalin dans des conditions alcalines, en présence d'un alcool inférieur ou d'une cétone, tout en ajoutant un acide pour le faire cristalliser.

Autrement dit, on filtre un liquide de fermentation ou un mélange de réaction enzymatique et les liquides obtenus dans les étapes intermédiaires de ceux-ci, en utilisant une membrane semi-perméable. Le filtrat est concentré si nécessaire et on ajoute préalablement au filtrat un alcool inférieur ou une cétone. En outre,

la solution est neutralisée pour la cristallisation par réduction du pH depuis le domaine alcalin tout en ajoutant progressivement un acide tel que H_2SO_4, HCl, acide acétique, etc. dans un milieu alcalin maintenu par utilisation de NaOH, NH_4OH, etc.. A mesure que l'on ajoute l'acide, la cristallisation initiale et la croissance des cristaux de tryptophane se produisent progressivement, de sorte que l'on obtient des cristaux α brillants sous forme de grosses plaques ou paillettes hexagonales.

On suppose que la raison en est la présence de l'alcool inférieur ou de la cétone qui exercerait une action inhibitrice contre la cristallisation initiale et la croissance de cristaux α dues aux impuretés dans le déroulement de la cristallisation initiale et de la croissance des cristaux de tryptophane par neutralisation pour la cristallisation depuis le domaine alcalin.

Au contraire, dans le cas où l'on neutralise une solution aqueuse de tryptophane depuis un domaine acide, les microcristaux α ou β s'agglomèrent et sont contaminés par des impuretés telles que des matières colorantes, etc..

Par exemple, lorsque l'on concentre ou on neutralise de manière classique pour la cristallisation le filtrat obtenu par filtration à travers une membrane semi-perméable, les cristaux de tryptophane s'agglomèrent en particules composées de microcristaux colorés en brun et contenant de grandes quantités d'impuretés ; lorsque l'on dissout dans l'eau les cristaux ainsi obtenus, elle devient trouble par suite des impuretés.

Par contre, les cristaux de tryptophane obtenus en effectuant la séparation centrifuge sans utiliser de membrane semi-perméable, en concentrant le surnageant en conditions alcalines et en neutralisant le concentrat pour la cristallisation en présence d'un alcool inférieur ou d'une cétone ont une pureté élevée et une coloration et une turbidité minimales par rapport au cas dans lequel la cristallisation est effectuée de manière classique à partir de la même solution (demande de brevet japonais 149752/82).

Dans le cas où l'on utilise la filtration à travers une membrane semi-perméable en combinaison avec la neutralisation pour la cristallisation depuis le domaine alcalin en présence d'un

alcool inférieur ou d'une cétone, on observe que les propriétés dans la cristallisation sont encore nettement améliorées. Autrement dit, la capacité de croissance des cristaux est améliorée et la sursaturation est éliminée régulièrement, de sorte que la contamination des microcristaux induite par une trop forte sursaturation est réduite et l'on peut obtenir de gros cristaux épais sous forme de plaques hexagonales ayant une granulation uniforme. En conséquence, le degré de cristallisation est amélioré, en particulier parce que la capacité de séparation des cristaux extrêmement améliorée est améliorée. Pour cette raison, la pureté des cristaux de tryptophane est extrêmement bonne et les substances provoquant la coloration et le trouble peuvent facilement rester sélectivement dans la liqueur mère.

On pense que ce phénomène est un effet synergique obtenu par filtration à travers une membrane semi-perméable en combinaison avec la cristallisation du tryptophane dans laquelle le filtrat est neutralisé pour la cristallisation depuis un domaine alcalin en présence d'un alcool inférieur ou d'une cétone. Les impuretés dérivées des liquides de fermentation, etc. contiennent de grandes quantités de protéines dissoutes, de pigments, de produits secondaires, de produits de décomposition, etc.. On pense que, parmi ces impuretés, les substances inhibant la cristallisation seraient séparées par la membrane semi-perméable, assurant une croissance stable des cristaux α dans l'étape subséquente de neutralisation pour la cristallisation sans formation de microcristaux due à une trop forte sursaturation ou sans cristallisation de cristaux β, etc. et il en résulterait un effet accentué.

Le terme "liquide de fermentation" ou "mélange de réaction enzymatique" indique dans la présente invention un bouillon de L-tryptophane obtenu par fermentation en utilisant un micro-organisme ou bien un mélange de réaction de L- et D-tryptophane obtenu par réaction en utilisant une enzyme ou un micro-organisme. Le terme "liquides obtenus dans des étapes intermédiaires" désigne des solutions contenant du tryptophane obtenues dans les étapes jusqu'à ce que le tryptophane optiquement actif soit séparé et obtenu à partir du liquide de fermentation ou du mélange de réaction

enzymatique. Des exemples de ces liquides comprennent les solutions exemptes de bactéries, les solutions après filtration, les liqueurs mères de cristaux bruts, les solutions de cristaux bruts, les solutions après traitement par des résines échangeuses d'ions, etc..

La membrane semi-perméable peut être en n'importe quelle substance pour membranes semi-perméables ordinaires utilisées dans l'ultrafiltration et dans la filtration osmotique inverse. Des exemples de membranes semi-perméables comprennent des membranes du type polyamide, du type polyacrylonitrile, du type acétate de cellulose, du type polysulfone et du type polybenzimidazole, etc.. Comme formes de membrane, on peut citer une membrane tubulaire, une membrane plate, une membrane en spirale, une membrane en filaments creux, etc.. Comme poids moléculaire pour le fractionnement, un poids moléculaire d'environ 500 à 100 000 peut être suffisant et une fonction de fractionnement ayant une gamme de 500 à 20 000 est particulièrement efficace.

Diverses conditions de mise en oeuvre de la filtration avec une membrane semi-perméable peuvent varier dans une gamme spécifiée dépendant chaque fois de la membrane à utiliser. On notera en particulier que la filtration est effectuée de préférence à des températures inférieures à 60°C jusqu'à la température ambiante environ, parce que la coloration de la solution traitée tend à être plus intense lorsque la filtration est effectuée à des températures élevées pendant une longue durée. En outre, dans le cas où il reste une grande quantité de tryptophane dans le liquide résiduel après la filtration, le rendement diminue ; dans ce cas, le liquide résiduel concentré après la filtration est dilué par l'eau, puis on répète la filtration.

Le dispositif pour concentrer le filtrat n'est pas particulièrement limité. Par exemple, on peut utiliser la concentration par chauffage sous pression réduite, la concentration par congélation, la concentration par osmose inverse ou une combinaison de ces techniques. Dans ce cas, on peut faire varier le pH dans une gamme convenable pour chaque technique de concentration. Dans le cas où un obstacle se produit par suite de la cristallisation du tryptophane au voisinage du point isoélectrique (pH 5,9), le filtrat est converti en une solution acide ou alcaline, puis concentré.

Comme alcalis pour produire une solution alcaline de tryptophane, on peut utiliser l'un quelconque parmi NaOH, KOH, LiOH, NH_4OH, etc. et la teneur peut être suffisante si l'alcali dissout le tryptophane.

Les alcools inférieurs qui doivent être ajoutés préalablement aux liquides bruts à cristalliser sont ceux ayant 1 à 4 atomes de carbone, par exemple i-propanol, n-propanol, éthanol, n-butanol, méthanol, etc.. On peut mentionner comme cétones l'acétone et les analogues. Lorsque l'on incorpore ces alcools inférieurs ou cétones en quantité de 5 % en volume ou plus, on peut obtenir un effet marqué, mais une quantité d'environ 10 à 30 % est pratique.

Le tryptophane optiquement actif est ordinairement sous la forme de cristaux α ou de cristaux β. Les cristaux α ont la forme de plaques ou paillettes, tandis que les cristaux β ont la forme de microcristaux aciculaires. En conséquence, la cristallisation des cristaux α donne une meilleure capacité de séparation et une quantité minimale de liqueur mère incluse, de sorte que l'on peut obtenir des cristaux de haute qualité. Le tryptophane prend la forme de cristaux α à des températures supérieures à une certaine température (point de transition) et de cristaux β à des températures inférieures à celle-ci. Le point de transition du tryptophane est d'environ 60°C (système aqueux), mais varie selon le système de cristallisation. Un point de transition précis dans un certain système de cristallisation peut facilement être déterminé en examinant par observation au microscope, par analyse de diffraction des rayons X (diagramme de poudres) etc. des cristaux qui sont obtenus lorsque l'on soumet à la cristallisation ordinaire chaque liquide pour la cristallisation. Lorsque l'on ajoute au système un solvant organique, le point de transition est abaissé, de sorte que les cristaux α peuvent être obtenus de manière stable à des températures plus basses par rapport au système aqueux et la pureté et le degré de récupération des cristaux peuvent être améliorés.

La température de cristallisation est supérieure au point de transition tel que défini ci-dessus. Dans le cas où la gamme de températures est dans une gamme supérieure au point de transition, cependant, la neutralisation pour la cristallisation

suivie d'un traitement de concentration et/ou d'un traitement de refroidissement peut être effectuée en vue du degré de cristallisation. En outre, on peut également utiliser des germes cristallins, bien entendu. De plus, les cristaux β peuvent ne pas toujours cristalliser immédiatement après la cristallisation des cristaux α, bien que les liquides bruts pour la cristallisation contenant les cristaux α soient refroidis à des températures un peu plus basses que le point de transition ; dans ce cas, en conséquence, le refroidissement est arrêté avant la formation des cristaux β et les liquides sont soumis à une séparation solide-liquide, ce qui augmente un peu le degré de cristallisation. La présente invention comprend également un tel mode de mise en oeuvre.

Pour séparer les cristaux cristallisés, il n'y a pas de condition particulière, mais les procédés connus s'appliquent.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

Exemple comparatif 1

On ajoute HCl à 35 % jusqu'à pH 3 à un liquide de fermentation contenant du L-tryptophane (demande de brevet japonais non examinée publiée 92796/81), puis on centrifuge. A 10 l d'une solution exempte de bactéries, on ajoute une solution de NaOH à 30 % jusqu'à pH 12,5 et ensuite on concentre. Par addition d'acide acétique à 1 600 g du concentré (teneur en tryptophane 10,6 %), on effectue la neutralisation pour la cristallisation à 45°C pendant 2 h jusqu'à pH 5,9. On refroidit le système à 25°C, puis on centrifuge. On pulvérise 500 ml d'eau sur les cristaux résultants pour laver les cristaux. On sèche les cristaux à 70°C sous pression réduite pour obtenir 148 g de cristaux de L-tryptophane. Pureté : 90,6 %, rendement : 79,2 %, état de la solution (transmission) : 10 % et après filtration sur une membrane "Millipore" de 0,3 μ : 43 % (conditions de mesure de la transmission : C=1, eau, 430 nm).

Exemple comparatif 2

A 1 l d'une solution exempte de bactéries obtenue à l'exemple comparatif 1, on ajoute une solution de NaOH à 30 % jusqu'à pH 12,5 et ensuite on concentre. A 133 g du concentré (teneur en tryptophane : 12,7 %), on ajoute 30 ml d'alcool isopro-

pylique. Ensuite, on neutralise pour effectuer la cristallisation à 45°C pendant 2 h jusqu'à pH 5,9 en ajoutant HCl à 35 %. On refroidit le système à 25°C, puis on centrifuge. On pulvérise une faible quantité d'eau sur les cristaux résultants pour les laver. On sèche les cristaux à 70°C sous pression réduite pour obtenir 15,6 g de cristaux de L-tryptophane. Pureté : 93,4 %, rendement : 86,3 %, transmission : 31 % ; après filtration sur une membrane Millipore de 0,3 μ, transmission : 74 % (mesurée dans les mêmes conditions qu'à l'exemple comparatif 1.

Exemple comparatif 3

On filtre 10 l d'une solution exempte de bactéries obtenue à l'exemple comparatif 1 à 35°C sous une pression de 200 kPa (2 kg/cm^2) en utilisant un module d'ultrafiltration "ACL-1010" (poids moléculaire de fractionnement 13000) fabriqué par Asahi Chemical Industry Co., Ltd.. Lorsque l'on a obtenu environ 9 l du filtrat, on dilue le liquide résiduel en ajoutant environ 6 l d'eau et on filtre le liquide ainsi dilué pour obtenir un total de 15,7 l de filtrat.

A 2 l du filtrat, on ajoute une solution de NaOH à 30 % jusqu'à pH 12,5 et on concentre. Par addition d'acide acétique à 202 g du concentré (teneur en tryptophane 10,4 %), on neutralise pour la cristallisation à 45°C pendant 2 h jusqu'à pH 5,9. On refroidit le système à 25°C, puis on centrifuge. On pulvérise une faible quantité d'eau sur les cristaux résultants pour les laver. On sèche les cristaux à 70°C sous pression réduite pour obtenir 18,1 g de cristaux de L-tryptophane. Pureté : 93,7 %, rendement : 80,8 %, transmission : 34 % ; après filtration sur Millipore de 0,3 μ, transmission : 62 % (mesurée dans les mêmes conditions qu'à l'exemple comparatif 1).

Exemple 1

A 2 l d'un filtrat obtenu par ultrafiltration à l'exemple comparatif 3, on ajoute une solution de NaOH à 30 % jusqu'à pH 12,5, puis on concentre. A 155 g du concentré (teneur en tryptophane : 13,2 %), on ajoute 40 ml d'alcool isopropylique. Ensuite, on neutralise pour la cristallisation à 45°C pendant 2 h jusqu'à pH 5,9 par addition de HCl à 35 %. On refroidit le système à 25°C,

puis on centrifuge. On pulvérise une faible quantité d'eau sur les cristaux résultants pour les laver. On sèche les cristaux à 70°C sous pression réduite pour obtenir 19,2 g de cristaux de L-tryptophane. Pureté : 98,7 %, rendement : 92,6 %, transmission : 86 % (mesurée dans les mêmes conditions qu'à l'exemple comparatif 1).

Exemple comparatif 4

Dans 4,5 l d'eau, on dissout 50 g de cristaux bruts de L-tryptophane obtenu à l'exemple comparatif 1. On filtre la solution à 35°C sous une pression de 2 MPa (20 kg/cm^2) en utilisant un module tubulaire d'osmose inverse PBIL, TL-215 (RO Minitester, modèle N-III) fabriqué par Teijin Limited. Lorsque l'on a obtenu environ 4 l de filtrat, on ajoute 2,5 l d'eau au liquide résiduel après filtration pour le diluer et on filtre le liquide ainsi dilué pour obtenir un total de 6,4 l de filtrat.

A 3 l de filtrat, on ajoute une solution de NaOH à 30 % jusqu'à pH 12,5, puis on concentre. Par addition d'acide acétique à 186 g (teneur en tryptophane 11,0 %) du concentré, on neutralise pour la cristallisation à 45°C pendant 2 h jusqu'à pH 5,9. On refroidit le système à 25°C, puis on centrifuge. On pulvérise une faible quantité d'eau sur les cristaux résultants pour les laver. On sèche les cristaux à 70°C sous pression réduite pour obtenir 17,2 g de cristaux de L-tryptophane. Pureté : 98,4 %, rendement : 82,8 %, transmission : 62 % ; après filtration sur Millipore de 0,3 μ, transmission 71 % (mesurée dans les mêmes conditions qu'à l'exemple comparatif 1).

Exemple 2

A 3 l d'un filtrat d'osmose inverse obtenu à l'exemple comparatif 4, on ajoute une solution de NaOH à 30 % jusqu'à pH 12,5, puis on concentre. A 166 g du concentré (teneur en tryptophane : 12,4 %), on ajoute de l'alcool isopropylique. Ensuite, on neutralise pour la cristallisation à 45°C pendant 2 h par addition de HCl à 35 % au mélange jusqu'à pH 9,5. On refroidit le système à 25°C puis on centrifuge. On pulvérise une faible quantité d'eau sur les cristaux résultants pour les laver. On sèche les cristaux à 70°C sous pression réduite pour obtenir 18,6 g de cristaux de L-tryptophane. Pureté : 99,3 %, rendement : 88,5 %, transmission :

97 % (mesurée dans les mêmes conditions qu'à l'exemple comparatif 1).

Il est entendu que l'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation préférés décrits ci-dessus à titre illustratif et que l'homme de l'art peut y apporter diverses modifications et divers changements sans toutefois s'écarter du cadre et de l'esprit de l'invention.

REVENDICATION

Procédé pour la récupération de tryptophane optiquement actif caractérisé en ce que l'on filtre une solution de tryptophane optiquement actif contenant des impuretés à travers une membrane semi-perméable ; ensuite, on soumet le filtrat à neutralisation pour le cristalliser après addition d'un alcool inférieur ou d'une cétone, à une température de cristallisation supérieure au point de transition du tryptophane optiquement actif, depuis le domaine alcalin ; et ensuite, on sépare les cristaux précipités des impuretés.