



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 968**

51 Int. Cl.:  
**B01D 11/04** (2006.01)  
**C12P 13/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03727226 .7**  
86 Fecha de presentación : **02.05.2003**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1499411**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

54 Título: **Separación integrada de sustancias orgánicas a partir de una mezcla acuosa de bioproceso.**

30 Prioridad: **06.05.2002 DE 102 20 235**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2008**

73 Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es: **Rüffer, Nicole;**  
**Wandrey, Christian y**  
**Takors, Ralf**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

**ES 2 292 968 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Separación integrada de sustancias orgánicas a partir de una mezcla acuosa de bioproceso.

5 El presente invento se refiere a un procedimiento para la separación integrada a partir de un biorreactor de una o varias sustancias orgánicas presentes en una mezcla acuosa de bioproceso, que contiene por lo menos un grupo nitrogenado cargado positivamente y/o por lo menos un grupo nitrogenado que se puede cargar positivamente, en cuyo procedimiento se lleva a cabo una extracción reactiva, en por lo menos una etapa, con un agente de extracción. Como mezcla de bioproceso se entiende, en el marco de esta solicitud de patente, cualquier mezcla de proceso en la que se desarrolla una reacción biocatalítica, p.ej. una fermentación con ayuda de una biomasa o un proceso químico/enzimático, con ayuda de enzimas disueltas, o fijadas a soportes o vehículos. Los mencionados procesos pueden transcurrir de una manera ya sea aerobia o anaerobia y se pueden realizar como procesos discontinuos (en inglés batch) o (semi)continuos.

15 Las técnicas para la separación de compuestos orgánicos a partir de soluciones acuosas (o respectivamente mezclas de procesos) son conocidas en gran número. Entre ellas se cuentan por ejemplo la separación a través de resinas intercambiadoras de iones, procedimientos de cromatografía, adsorción, filtración, evaporación, ósmosis inversa, electrodiálisis, etc. Una integración de tales procesos de separación en bioprocesos, tales como procedimientos de fermentación, se ha manifestado hasta ahora como especialmente difícil.

20 En particular, la obtención de aminoácidos ha aumentado en interés desde el punto de vista económico en los últimos años, sobre todo prestando atención a la industria de los alimentos y de las bebidas. La separación de los aminoácidos deseados a partir de mezclas de bioprocesos se efectúa p.ej. sobre todo a través de intercambiadores de iones o por ejemplo mediante una extracción reactiva. Estos procedimientos se encontraban sin embargo hasta hace poco tiempo, en el caso de la purificación, en particular, de caldos de cultivo, con sus límites. Resultaba desventajosa en el caso de un tratamiento de líquidos de cultivo a través de intercambiadores de iones, p.ej., la necesidad de un extenso tratamiento previo de la mezcla que se había de purificar.

25 Es conocido además que, en el caso de la producción por fermentación de L-fenilalanina según el procedimiento Fed-Batch (alimentado discontinuamente) se inhibe la formación de productos a partir de una concentración de L-fenilalanina de aproximadamente 30 g/l. Con el fin de impedir esta inhibición, es necesario separar la L-fenilalanina durante el proceso. Un procedimiento de este tipo se puede designar también como la denominada "obtención *in situ* de un producto" (conocida también en inglés como "*in situ* Product Recovery" o "ISPR"). La aplicación de una ISPR se describe p.ej. en las publicaciones de M. Gerigk y colaboradores, Bioprocess Biosyst. Eng. **25** (2002) 43 - 52, y de D. Maass y colaboradores, Bioprocess Biosyst. Eng. (en imprenta).

30 En el documento de solicitud de patente internacional WO/66253 se describe un procedimiento para la separación por extracción reactiva integrada de sustancias orgánicas nitrogenadas presentes en una mezcla acuosa de bioproceso, empleándose determinados agentes de extracción, que contienen compuestos orgánicos por lo menos parcialmente de cadena más larga y al menos un intercambiador líquido de cationes como vehículo reactivo, y realizándose la extracción en aparatos de de puesta en contacto (contactores) de fibras huecas a través de por lo menos una membrana porosa, que puede ser mojada ya sea por la mezcla acuosa o por el agente de extracción. La función de la membrana es en este caso hacer posible un procedimiento de extracción exento de dispersión, de manera tal que solo tenga lugar un intercambio de materia entre las sustancias orgánicas nitrogenadas mediante difusión (como máximo en el marco de la solubilidad de la fase orgánica y del vehículo) a través de la superficie límite de fases, estabilizada por la membrana. Al mismo tiempo, debería evitarse en tal caso en principio la incorporación de la fase de la fase orgánica en la mezcla acuosa de bioproceso, puesto que esto podría conducir a una reducción de la actividad del biocatalizador (y/o del microorganismo). En el caso de un sistema de extracción con membranas no tiene lugar en principio ninguna mezcladura de las dos fases (fase orgánica de extracción y mezcla acuosa de bioproceso).

35 En el caso de la elección de los sistemas de vehículos reactivos según el documento WO/66253, se plantean a pesar de todo unas exigencias muy altas en cuanto a la biocompatibilidad de los componentes. Se utilizaba preferentemente el sistema de sustancias biocompatibles con queroseno como disolvente y ácido di-2-etil-hexil-fosfórico (D2EHPA) como agente de extracción (vehículo). El vehículo D2EHPA era regenerado en tal caso, en una segunda etapa de extracción, con ácido sulfúrico como agente de extracción. La L-fenilalanina se aumentaba de concentración en el ácido sulfúrico. Esto limita las posibilidades de la elección del sistema, en general, a combinaciones de queroseno y de D2EHPA o respectivamente con ésteres de ácido di-nonil-naftaleno-sulfónico (DNNSE).

40 La manipulación del sistema de extracción apoyado en membranas, se ha manifestado sin embargo, en la práctica ya a la escala piloto (experimental), como costosa. Un aumento de la escala (en inglés scale-up) en el caso de la utilización de contactores de fibras huecas es realizable sólo de una manera condicionada, lo cual p.ej. es debido a la fuerte dependencia con respecto de la presión. Tan pronto como aparecen fluctuaciones de la presión, las fases se pueden volver con facilidad inestables, lo cual puede conducir a una ruptura de las fases y a la formación de emulsiones, teniendo que terminarse el proceso. Puesto que, además, la porosidad de las membranas siempre determina la máxima superficie de intercambio, el transporte de sustancia y el rendimiento de extracción están bastante limitados en el caso de una extracción reactiva apoyada en membranas.

## ES 2 292 968 T3

Es por lo tanto una misión del presente invento poner a disposición un procedimiento para la separación integrada a partir de un biorreactor de una o varias sustancias orgánicas presentes en una mezcla acuosa de bioproceso, que contiene por lo menos un grupo nitrogenado cargado positivamente y/o por lo menos un grupo nitrogenado que se puede cargar positivamente, en cuyo procedimiento se lleva a cabo una extracción reactiva, en por lo menos una etapa, con un agente de extracción, que ya no presente las desventajas arriba mencionadas.

El problema planteado por esta misión se resuelve mediante el recurso de que

- a. se saca desde el biorreactor continuamente una mezcla acuosa de bioproceso, y
- b. se conduce a una centrífuga del tipo líquido-líquido con un agente de extracción, que contiene compuestos orgánicos por lo menos parcialmente de cadena más larga y al menos un intercambiador líquido de cationes,
- c. se extrae mediante el agente de extracción, obteniéndose una fase orgánica que contiene la sustancia que se ha de extraer desde la mezcla de bioproceso, y
- d. el material retenido acuoso resultante se devuelve al biorreactor.

La Figura 1 muestra una representación esquemática de una centrífuga del tipo líquido-líquido. Una fase ligera (orgánica) y una fase pesada (acuosa) se introducen por separado en la centrífuga y se mezclan intensamente con ayuda de un rotor en una zona de mezclado, después de lo cual se realiza una separación entre la fase ligera y la fase pesada en una zona de separación. Las fases ligera y pesada se sacan por separado, es decir que la fase pesada fluye junto a la pared del rotor a través del disco de dique exterior (que tiene un tamaño dependiente del sistema); la fase ligera sale fluyendo por el interior a través de un dique fijo. Centrífugas del tipo líquido-líquido, son unos discos metálicos - en general desplazables o que se pueden escoger con el tamaño del orificio central - que tienen un orificio en el centro, por medio de cuyo tamaño se puede regular la salida de la fase pesada.

En la Figura 1 son:

- 1 por una parte, la entrada de la mezcla de bioproceso y, por otra parte, la del agente de extracción
- 2 una zona de mezclado y respectivamente una zona de extracción
- 3 una zona de separación
- 4 la salida de la fase pesada a través del disco de dique exterior (7)
- 5 la salida de la fase ligera a través de un dique fijo (8)
- 6 un cilindro rotatorio
- 7 un disco de dique exterior
- 8 un dique fijo
- 9 un árbol de accionamiento.

Las desventajas, arriba mencionadas, del estado de la técnica se solventan en el caso de la realización conforme al invento del procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, realizándose que las reivindicaciones subordinadas 2 a 21 mejoran adicionalmente el procedimiento. Se ha puesto de manifiesto que, en el caso del procedimiento conforme al invento, se consigue tanto un rendimiento esencialmente más alto (transporte mejorado de sustancia) como también una manipulación mejorada del proceso. Además, se ha mostrado que los resultados conseguidos en una magnitud limitada se pueden transferir de una manera sencilla a una mayor escala, p.ej. a un plano de 300 l. Se prefieren sin embargo solamente los disolventes que, al agitar con una fase acuosa en un matraz con sistema de agitación, no forman emulsiones fuertes (concentradas) de ningún tipo, puesto que en caso contrario se perjudicaría el efecto de la(s) centrífuga(s) del tipo líquido-líquido.

En el sentido de este invento, con la expresión "por lo menos una centrífuga del tipo líquido-líquido" se entiende que para el tratamiento ulterior de la mezcla de bioproceso no se han de utilizar necesariamente otras centrífugas del tipo líquido-líquido. Así, p.ej. la primera etapa de extracción (la extracción de ida) se puede realizar en dos (o incluso más) centrífugas del tipo líquido-líquido, conectadas en paralelo. Esto se puede realizar de una manera continua o semicontinua. También, como se señala en esta memoria descriptiva se puede realizar la extracción de retorno con una o varias centrífuga(s) del tipo líquido-líquido. Así, se podría conectar posteriormente una segunda centrífuga del tipo líquido-líquido (u otras centrífugas del tipo líquido-líquido en paralelo) (para la extracción de retorno), tan pronto como - después de un período de tiempo determinado - en la primera centrífuga de líquido-líquido se haya ajustado un buen grado de carga de la fase orgánica. La extracción de retorno se puede llevar a cabo, sin embargo, también con otras técnicas, p.ej. apoyadas en membranas, como en el documento WO/66253.

## ES 2 292 968 T3

Conforme al invento, al realizar la extracción de ida, el material de extracción (es decir la mezcla de bioproceso, p.ej. un caldo de fermentación, o respectivamente el agente de extracción, p.ej. D2EHPA en queroseno) se introduce en la centrífuga (1) (véase la Figura 1). Junto al lado exterior del rotor tiene lugar la mezclado de las dos fases, es decir la extracción (2). En el espacio interior, las fases son separadas en el campo centrífugo (3) + (6). La fase pesada abandona la centrífuga por el exterior (4), y la fase ligera lo hace por el interior (5). La separación óptima de las dos fases se puede garantizar p.ej. por medio del tamaño del (de los) disco(s) de dique (7) + (8) escogido(s).

También mediante una modificación del caudal volumétrico se puede hacer variar el período de tiempo de permanencia en la centrífuga, es decir el período de tiempo de contacto de las fases. Además, mediante una modificación del número de revoluciones, se influye sobre la superficie límite de fases, así como también la intensidad del campo centrífugo puede modificar la separación de las fases acuosas y orgánicas. El proceso conforme al invento se puede regular de una manera sencilla por variación del número de revoluciones y/o de los caudales volumétricos. Ambos factores son parámetros sencillos de optimización, que se pueden escoger libremente.

Además de esto, se pueden realizar también modificaciones, condicionadas por el tipo constructivo, en las centrífugas, los rotores, etc., "cizalladura" o de "alta cizalladura" (del inglés "Low-Shear" o "High-Shear"). También, de modo condicionado por el tipo constructivo, se pueden emplear otros separadores, tales como p.ej. separadores de platos, con unos platos que giran en sentidos opuestos entre ellos, o con platos estáticos.

En una forma de realización preferida del invento, la mezcla de bioproceso, conducida a la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b., se puede hacer exenta de células antes de que sea conducida dentro de esta centrífuga. En otra forma preferida de realización del invento, la mezcla de bioproceso, conducida a la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b., se puede hacer además exenta de proteínas. En tal caso resulta una solución de bioproceso exenta de células y exenta de biocatalizador. Como mezcla acuosa de bioproceso se prefiere una mezcla de fermentación. Las fermentaciones, dependiendo del tipo de la reacción, pueden transcurrir de una manera aerobia o anaerobia y se pueden realizar como un proceso discontinuo, semi-continuo o continuo.

El principio conforme al invento de la centrifugación del tipo líquido-líquido puede ser aplicado tanto en el caso de la extracción de ida (a partir del medio presente en el biorreactor) como también en el caso de la extracción de retorno, siendo recogidas las sustancias que se han de obtener, de nuevo en una fase acuosa, preferiblemente en una forma aumentada de concentración.

En particular, se utiliza un procedimiento, en el que, detrás de la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b., se dispone una etapa de extracción adicional, donde la sustancia extraída de la primera etapa de reacción, se extrae de retorno en una fase acuosa. Se prefiere que la etapa adicional de extracción tenga lugar también en una centrífuga del tipo líquido-líquido.

En el caso de la extracción de retorno en una centrífuga del tipo líquido-líquido, la fase orgánica cargada en la extracción de ida (agente de extracción, p.ej. D2EHPA en queroseno, con sustancias extraídas recogidas en él), por una parte, y la fase acuosa llevada a un bajo pH, p.ej. con ácido sulfúrico, por otra parte, se introducen en una centrífuga del tipo líquido-líquido para la extracción de retorno. Como ilustración se hará referencia aquí de nuevo a la Figura 1. La introducción de la fase orgánica y de la fase acuosa se realizan en (1). Junto al lado exterior del rotor tiene lugar de nuevo la mezclado de las dos fases, es decir la extracción de retorno (2). También en el caso de la extracción de retorno, las fases son separadas, a causa de la fuerza centrífuga, en el espacio interior (3) + (6), después de lo cual la fase pesada abandona la centrífuga por el exterior (4), y la fase ligera lo hace por el interior (5). La separación óptima de las dos fases se garantiza también en el caso de la extracción de retorno p.ej. a través del tamaño del (o de los) disco(s) de dique (7) + (8) escogidos. La extracción de retorno - tal como ya se ha mencionado más arriba - se puede llevar a cabo sin embargo también con otras técnicas.

En el proceso conforme al invento, el rendimiento de extracción en la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b. corresponde preferiblemente por lo menos al caudal de producción en el bioproceso. Por el rendimiento de extracción en una etapa de extracción (o incluso en un proceso completo, cuando se señala el proceso total de la separación como un proceso de extracción), se entiende la separación por extracción de un componente por hora en la etapa de extracción (o en el proceso total) - a partir de la mezcla de bioproceso -. La cantidad sacada en total se puede indicar en moles. Por el caudal de producción se entiende la cantidad (en moles) producida biocatalíticamente por hora en el bioproceso de aquel componente que se puede sacar en la etapa de extracción (o en todo el proceso) por extracción a partir de la mezcla de bioproceso.

Como agente de extracción para la extracción integrada de sustancias orgánicas, que contienen por lo menos un grupo nitrogenado cargado positivamente o por lo menos un grupo nitrogenado que se puede cargar positivamente, a partir de una mezcla de bioproceso, se emplean preferiblemente los mismos agentes de extracción que en el documento WO/66253. Esto quiere decir que, para la extracción en la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b., se emplea preferiblemente un agente de extracción, que contiene compuestos orgánicos por lo menos parcialmente de cadena más larga y al menos un intercambiador líquido de cationes. Los compuestos orgánicos por lo menos parcialmente de cadena más larga tienen, en el procedimiento conforme al invento, la función de un disolvente. El intercambiador líquido de cationes tiene la función de un vehículo.

## ES 2 292 968 T3

Como compuestos orgánicos de cadena más larga se emplean preferiblemente aquellos compuestos que son miscibles con agua sólo con dificultades o se pueden disolver en agua sólo con dificultades, y que son líquidos a unas temperaturas comprendidas entre 10 y 60°C, preferiblemente entre 20 y 40°C. Se pueden concebir en este caso compuestos orgánicos ramificados, no ramificados, saturados, insaturados o parcialmente aromáticos. Ejemplos de compuestos orgánicos de cadena más larga, utilizables conforme al invento, son alcanos, alquenos o ésteres de ácidos grasos, o mezclas de varios de estos compuestos. En particular, se emplean en este caso, como compuestos orgánicos de cadena más larga, alcanos, alquenos o ésteres de ácidos grasos con 6 a 20 átomos de C, preferiblemente con 12 a 18 átomos de C.

Como alcanos se pueden emplear, por ejemplo, hexano, ciclohexano, decano, etil-decano, dodecano o mezclas de ellos. Se prefiere especialmente el queroseno. Como alquenos se pueden emplear p.ej. hexeno, noneno, deceno, dodeceno o mezclas de ellos. Como ésteres de ácidos grasos se pueden emplear en particular estearatos de alquilo con grupos alquilo que tienen más de 2 átomos de C. Ejemplos de ésteres de ácidos grasos son estearato de etilo, estearato de butilo, estearato de isopropilo, palmitato de etilo o linoleato de butilo. Se prefiere especialmente el empleo de queroseno o estearato de butilo. Dos o más de los compuestos orgánicos mencionados pueden pasar a emplearse también en forma de mezclas.

Como intercambiadores líquidos de cationes se emplean en particular ésteres a base de ácidos inorgánicos y de radicales orgánicos, que preferiblemente están ramificados. Entre los ácidos inorgánicos se cuentan preferiblemente ácido fosfórico, ácido fosforoso, ácido sulfúrico y ácido sulfuroso. Más específicamente, se emplean como intercambiadores líquidos de cationes, preferiblemente, ésteres de ácido fosfórico, de ácido fosforoso, de ácido sulfúrico o de ácido sulfuroso. Son muy especialmente preferidos los ésteres de ácido fosfórico. Los radicales orgánicos, utilizados conforme al invento, son preferiblemente grupos alquilo o alqueno ramificados y/o sin ramificar con por lo menos 4 átomos de C, preferiblemente con 4 a 20 átomos de C. Entre los preferidos intercambiadores líquidos de cationes se cuentan el éster di-2-etil-hexílico de ácido fosfórico, el éster mono-2-etil-hexílico de ácido fosfórico, el éster dinonílico de ácido naftaleno-sulfónico o mezclas de ellos. Se prefieren en sumo grado como intercambiadores líquidos de cationes el éster di-2-etil-hexílico de ácido fosfórico, el éster mono-2-etil-hexílico de ácido fosfórico, el éster dinonílico de ácido naftaleno-sulfónico o mezclas de ellos. Se prefiere en sumo grado conforme al invento la mezcla del éster di-2-etil-hexílico de ácido fosfórico y del éster mono-2-etil-hexílico de ácido fosfórico.

En la centrifuga del tipo líquido-líquido de la etapa b., la cantidad de intercambiador líquido de cationes, referida a la cantidad de compuestos orgánicos de cadena más larga, es en general de 2 a 25% en peso, de manera preferida de 5 a 20% en peso, de manera especialmente preferida de 8 a 15% en peso.

Entre las sustancias extraíbles se cuentan por ejemplo L-aminoácidos, pero también se pueden separar conforme al invento, en un procedimiento integrado, D-aminoácidos. Fundamentalmente, se pueden extraer aminoácidos tanto naturales como también no naturales. Se pueden concebir todas las formas D y L de aminoácidos esenciales. Ejemplos de aminoácidos extraíbles son L-fenilalanina, D-fenilalanina, L-triptófano, D-triptófano, L-tirosina, D-tirosina, D-p-hidroxi-fenilglicina, D-fenilglicina, di-hidroxi-fenilalanina. También se pueden separar  $\beta$ -aminoácidos aromáticos, tales como p.ej.  $\beta$ -fenilalanina o  $\beta$ -tirosina. Además, con el procedimiento conforme al invento se pueden extraer lactamas. Entre ellas se cuentan, entre otras, también  $\beta$ -lactamas, p.ej. caprolactama.

Además, se pueden extraer conforme al invento también péptidos, pero en particular di- u oligo-péptidos. Entre ellos se cuenta, por ejemplo, la L-aspartil-L-fenilalanina como molécula precursora para la preparación de aspartama. Se pueden extraer también aminoalcoholes, p.ej. el 1S,2R-cis(-)-amino-indanol y los (amino)ciclitoles. La extracción conforme al invento se puede aplicar además para la obtención de aminas o amidas.

La mezcla de bioproceso contiene preferiblemente sustancias orgánicas seleccionadas entre el conjunto formado por aminoácidos y/o lactamas alifáticos/as y/o aromáticos/as, sus sales, derivados o di- u oligo-péptidos o mezclas de estos compuestos, que se extraen conforme al invento a partir de la mezcla de bioproceso.

El agente de extracción puede contener conforme al invento, junto a los compuestos mencionados, también otras sustancias. Entre ellas se cuentan también agentes de extracción conocidos según el estado de la técnica.

El procedimiento conforme al invento para la separación integrada a partir de un biorreactor de una o varias sustancias orgánicas presentes en una mezcla acuosa de bioproceso, que contienen por lo menos un grupo nitrogenado cargado positivamente o por lo menos un grupo nitrogenado que se puede cargar positivamente, en cuyo procedimiento una extracción reactiva se lleva a cabo, en por lo menos una etapa, con un agente de extracción, se realiza preferiblemente de una manera continua. En esta preferida forma continua de realización

(a) una mezcla acuosa de bioproceso se saca de manera continua desde el biorreactor y

(b) se conduce con un agente de extracción, que contiene compuestos orgánicos por lo menos parcialmente de cadena más larga y por lo menos un intercambiador líquido de cationes, a una centrifuga del tipo líquido-líquido, y

(c) allí se extrae mediante el agente de extracción, obteniéndose una fase orgánica, que contiene la sustancia que se ha de extraer a partir de la mezcla de bioproceso, y

## ES 2 292 968 T3

(d) el material retenido acuoso resultante se devuelve al biorreactor.

En la etapa (a), en vez de la mezcla acuosa de bioproceso, se puede utilizar, desde luego, también cualquier otra mezcla de reacción que resulte en un (bio)-reactor, en el que están contenidas sustancias orgánicas con por lo menos un grupo nitrogenado cargado positivamente o con por lo menos un grupo nitrogenado que se puede cargar positivamente. Ejemplos de tales sustancias ya se han señalado más arriba.

Un sector de empleo muy preferido del procedimiento conforme al invento es la extracción a partir de soluciones de fermentación, aguas residuales y/o mezclas acuosas de procesos químicos de síntesis y/o de degradación. En particular, el procedimiento conforme al invento se puede integrar en procesos de fermentación. Los procesos de fermentación pueden transcurrir de una manera aerobia o anaerobia y se pueden realizar como procesos discontinuos, semi-continuos o continuos.

Las sustancias orgánicas se extraen de retorno en tal caso, conforme al invento, preferiblemente a partir del agente de extracción en una fase acuosa. En particular, para esto, en una etapa (e) adicional del procedimiento, la fase orgánica procedente de (c) se pone en contacto en un circuito cerrado con una fase acuosa de un aceptor y se extrae de retorno.

Como fase acuosa de un aceptor entran en cuestión generalmente, para la descarga de los vehículos, todos los donantes de protones apropiados, p.ej.  $H^+$  procedente de ácido sulfúrico. En la etapa (e), en vez de ácido sulfúrico, se puede utilizar evidentemente cualquier otro ácido fuerte. Ejemplos de ellos son además sulfato de amonio, ácido clorhídrico y ácido fosfórico.

Preferiblemente, el contacto con la fase acuosa de aceptor procedente de e., tiene lugar en una centrífuga del tipo líquido-líquido, y la fase orgánica empobrecida, que se ha obtenido en tal caso, se devuelve de manera continua o semi-continua a la centrífuga de la etapa (b). Todavía con más preferencia, la mezcla acuosa de bioproceso en la etapa (a) se hace exenta de células en una etapa [a1] adicional, a través de una derivación (en inglés bypass) con un módulo de ultrafiltración (valor de separación, aproximadamente 500 kDa) mediando devolución del material celular al biorreactor, y se obtiene un material perneado exento de células, que es conducido a la etapa (b).

En un proceso [a2] preferido adicional, el material perneado exento de células se hace exento de proteínas, a través de un casete de membrana, en la región de los nanómetros (valor de separación aproximadamente desde 10 kDa hasta 50 kDa), mediando devolución al biorreactor de la parte del material perneado exento de células, que contiene proteínas, siendo conducido el material perneado exento de células y exento de proteínas, que se ha obtenido, junto con el agente de extracción, a la etapa (b) en la primera centrífuga del tipo líquido-líquido.

Los mejores rendimientos del proceso conforme al invento se obtienen, cuando en las etapas (d) y (e) se lleva a cabo una devolución total del material acuoso retenido al biorreactor. En conjunto, tiene lugar entonces una devolución total del material retenido acuoso al biorreactor.

Una ventaja especial del procedimiento conforme al invento consiste en que la extracción de retorno se efectúa mediando simultáneo aumento de la concentración de las sustancias orgánicas. De un modo preferido en sumo grado, el procedimiento conforme al invento se lleva a cabo de una manera continua y simultánea con respecto a una reacción que transcurre en el biorreactor, realizándose que el rendimiento de extracción del proceso total es igual por lo menos al caudal de producción en el biorreactor. Se extrae preferiblemente a partir de soluciones de fermentación.

El procedimiento conforme al invento para una separación integrada de sustancias a partir de una mezcla de bioproceso, se puede utilizar sin embargo en principio también para una separación integrada de sustancias procedentes de otros procesos, que son distintos de los procesos biocatalíticos. En ese caso se habla, en vez de un biorreactor (o reactor de fermentación o fermentador), mejor de un recipiente, en el que transcurre una reacción a partir de la cual se quisiera separar de manera continua una sustancia. Por lo general, un recipiente de este tipo se designa sin embargo, en la mayor parte de los casos, como biorreactor.

En comparación con el trabajo con contactores de fibras huecas, la manipulación y el aumento de la escala se simplifican en el caso de la utilización de centrífugas del tipo líquido-líquido. Después de la puesta en marcha, el sistema funciona de una manera estable, incluso aunque provisionalmente no tenga lugar ninguna introducción de una fase ligera o pesada. Por consiguiente, no constituye ningún problema una inestabilidad de fases como consecuencia de diferencias de presiones. La superficie límite de fases, y por consiguiente la transferencia de sustancia, se aumentan asimismo en este sistema.

Tal utilización integrada de centrífugas del tipo líquido-líquido, en un proceso de fermentación durante la fermentación, es nueva. Ciertamente, las centrífugas del tipo líquido-líquido ya son conocidas desde hace mucho tiempo y se pueden comprar comercialmente, p.ej. de la firma CINC Deutschland GmbH, Brakel, Alemania. La CINC Deutschland es una sociedad filial de Costner Industries Nevada Corporation, EE.UU.

Se ha de señalar que Likidis y Schügerl (Biotech. & Bioeng., volumen 30, páginas 1032-1040, 1987; documento de solicitud de patente alemana DE-A 3729338) ya han empleado ciertamente con éxito centrífugas del tipo líquido-líquido en el caso del tratamiento de mezclas de bioproceso después de la terminación de la fermentación, en particular para la obtención de penicilina, pero en tales casos siempre se empleaban agentes tóxicos de extracción y los bioca-

## ES 2 292 968 T3

talizadores utilizados no entraban nunca en contacto con los agentes de extracción utilizados durante la extracción. Además, las sustancias extraídas por Likidis y Schügerl siempre eran separadas desde el medio por reacción con un grupo carboxilo. En las mencionadas publicaciones no hay ningún indicio de que se pudieran utilizar centrifugas del tipo líquido-líquido, también en un modo de procedimiento integrado, en el caso de procesos de fermentación. Las extracciones a través de diferentes membranas líquidas (membranas en forma de emulsión líquida) se describen en el caso de la cita de Thien, M.P y colaboradores (Biotechnol Bioeng. 1998, 32: 604-615), pero no se pueden emplear en condiciones con un alto esfuerzo de cizalladura (en inglés "shear-stress"); tal como en el caso de la utilización de centrifugas.

Se ha comprobado, de modo sorprendente, que en el procedimiento conforme al invento para la extracción reactiva integrada en procesos de fermentación mediando utilización de por lo menos una centrifuga del tipo líquido-líquido, son posibles muy altos rendimientos de sustancias extraídas. Así, se ha manifestado como posible obtener en la fase de aceptor L-fenilalanina en unas concentraciones situadas en la región hasta de aproximadamente 80 g/l, y probablemente se hacen posibles incluso todavía concentraciones más altas.

En principio, el actual invento hace posible también trabajar con unas cantidades de vehículo menores que las que eran usuales anteriormente en el estado de la técnica.

A continuación, se explica con mayor detalle, con ayuda de la Figura 2, la aplicación del procedimiento conforme al invento a la vista de un proceso de fermentación integrada, p.ej. para la producción de L-fenilalanina.

La Figura 2 muestra un biorreactor (3), en el que se efectúa una producción por fermentación de L-fenilalanina. A este biorreactor (fermentador) está conectada una derivación con un módulo de ultrafiltración (UF I, 500 kDa) (5), a través del cual se bombea el caldo de fermentación durante el proceso, con el fin de obtener un material permeado exento de células. El material permeado exento de células se bombea en este caso a un recipiente de reserva. Desde allí, el material permeado exento de células se transporta en circuito a través de una segunda unidad de ultrafiltración (UF II; 10 kDa) (6) con el fin de separar las proteínas presentes en el material permeado. El material permeado exento de células y de proteínas, obtenido de esta manera, se bombea a una primera centrifuga del tipo líquido-líquido (1) para la extracción de la L-fenilalanina con el agente de extracción, p.ej. D2EHPA en queroseno. Después de una extracción y de una separación de fases, el material refinado se devuelve al fermentador. La fase orgánica (p.ej. D2EHPA en queroseno) se conduce en circuito (4), y en la segunda centrifuga del tipo líquido-líquido (2) tiene lugar la extracción de retorno p.ej. con ácido sulfúrico. En este caso, la L-fenilalanina se aumenta de concentración en la fase acuosa. El agente de extracción y/o el donante de protones se pueden introducir a través de (7) (o respectivamente el agente de extracción cargado, con la sustancia extraída aumentada de concentración, se retira para la obtención de la sustancia).

En la Figura 2, formulado de una manera distinta, son:

- 1 una primera centrifuga del tipo líquido-líquido con introducción de la mezcla de bioproceso, exenta de células y de proteínas, y del agente de extracción, o respectivamente con retirada de la mezcla empobrecida de bioproceso, y del agente de extracción cargado,
- 2 una segunda centrifuga del tipo líquido-líquido con introducción del agente de extracción cargado y adición dosificada del donante de protones procedente de (7), o respectivamente con retirada del agente de extracción que se ha de cargar adicionalmente hacia (1), o respectivamente del agente de extracción cargado para la obtención de la sustancia aumentada de concentración,
- 3 un biorreactor,
- 4 un circuito de la fase orgánica,
- 5 un módulo de ultrafiltración (UF I; valor de separación aproximadamente 500 kDa);
- 6 una unidad de ultrafiltración (UF II; 10 kDa; en la región de los nanómetros, valor de separación aproximadamente 10 kDa),
- 7 introducción y retirada del agente de extracción y/o del donante de protones,
- M dispositivo de accionamiento.

El invento se explica ahora, con ayuda de un Ejemplo y de algunos Ejemplos de comparación, de una manera más detallada.

En el presente invento se trabajó en este caso en una instalación de acuerdo con la Figura 2, con un biorreactor que tiene un volumen de fermentación de 10 l (tanda, en inglés batch), y con un volumen de derivación de aproximadamente 1,2 l. El módulo de ultrafiltración I (de Schleicher und Schüll GmbH, Dassel, Alemania; un módulo de filtración

## ES 2 292 968 T3

de fibras huecas) tenía un valor de separación de 500 kDa. El módulo de ultrafiltración II (asimismo de Schleicher und Schüll GmbH, Dassel, Alemania) tenía un valor de separación de 10 kDa, y se componía de cinco módulos de casetes. Como agente de extracción para la extracción de ida se utilizaba D2EHPA (de Merck) en queroseno (de Fluka).

### 5 Ejemplo I

#### *Preparación mediante fermentación de L-fenilalanina*

10 En el biorreactor (fermentador) se llevó a cabo una fermentación con extracción integrada. La fermentación se inició según el procedimiento discontinuo. Durante la fase de crecimiento de las células (una cepa de *E. coli* auxótrofa para tirosina, que produce L-fenilalanina), se indujo, después de aproximadamente 6 horas, la producción, y se comenzó la alimentación de amoníaco, glucosa y tirosina. La fase de crecimiento se terminó después de aproximadamente 14 horas en total mediante limitación de la cantidad de tirosina de las *E. coli*. Después de aproximadamente 22 horas en total, estaban presentes en el medio aproximadamente 15 g/l de L-fenilalanina, es decir una importante concentración  
15 de L-fenilalanina, junto con un buen caudal de formación. En este momento se comenzó el proceso para la obtención del material permeado exento de células y de proteínas, y a continuación se comenzó la extracción.

Los parámetros de extracción, utilizados para el proceso de fermentación Fed-Batch y para la extracción reactiva integrada, de las centrífugas del tipo líquido-líquido, eran los siguientes:

20 Primera centrífuga del tipo líquido-líquido:

- fase pesada: caldo de fermentación con L-fenilalanina, caudal volumétrico: 2,4 l/h
- 25 - fase ligera: solución al 10% de D2EHPA en queroseno, caudal volumétrico: 3,36 l/h.

Segunda centrífuga del tipo líquido-líquido:

- 30 - fase pesada: ácido sulfúrico 1 M, caudal volumétrico: 1,5 l/h
- fase ligera: solución al 10% de D2EHPA en queroseno, caudal volumétrico: 3,36 l/h.

35 La extracción se efectuó durante aproximadamente 18 horas, es decir hasta la hora 40 del proceso, donde se interrumpió el proceso. El sistema de extracción se manifestó como estable al introducir el medio exento de proteínas. No se pudo comprobar ningún efecto negativo de la extracción, por ejemplo mediante la incorporación de queroseno o de D2EHPA, sobre el proceso de fermentación.

40 La concentración de L-fenilalanina en el biorreactor aumentó en este Ejemplo I hasta que se hubo iniciado la extracción reactiva, y permaneció constante ulteriormente, durante la extracción integrada, en aproximadamente 12-15 g/l. La concentración de L-fenilalanina a la salida de la primera centrífuga después de la extracción, estaba situada siempre en aproximadamente 7 g/l. El contenido de L-fenilalanina en el ácido sulfúrico aumentaba, entre las horas 22 y 40, casi de manera lineal desde cero hasta aproximadamente 59 g/l, es decir después de una duración de la extracción de 18 horas. Se pudo conseguir por lo tanto un fuerte aumento de la concentración de L-fenilalanina.

45 La concentración de L-fenilalanina, conseguida teóricamente en este Ejemplo, se puede calcular sumando las concentraciones de L-fenilalanina en el biorreactor y en el ácido sulfúrico acuoso, referidas al volumen real de fermentación. De esta manera, en este Ejemplo se hubiera alcanzado una concentración teórica final de L-fenilalanina de 52 g/l.

50

#### Ejemplo comparativo A

55 En el caso de una fermentación, realizada de una manera comparativa como en el Ejemplo I, con unas condiciones de fermentación por lo demás iguales (cantidad y actividad de las células de *E. coli*, etc.), pero sin ninguna extracción integrada, es decir se utilizó solamente un biorreactor y no se utilizó ningún equipo de extracción, la concentración final teórica de L-fenilalanina estaba situada en 31 g/l.

#### 60 Ejemplo comparativo B

En el caso de otra fermentación adicional realizada de una manera comparativa, con unas condiciones de fermentación por lo demás iguales (cantidad y actividad de las células de *E. coli*, etc.), pero con una extracción integrada a través de contactores de fibras huecas con membranas de acuerdo con el documento WO/66253, la concentración final  
65 teórica de L-fenilalanina estaba situada en aproximadamente 30 g/l.

En el caso del procedimiento integrado conforme al invento, con centrífugas del tipo líquido-líquido, se pudo conseguir por lo tanto una concentración final de L-fenilalanina muchísimo más alta que en los Ejemplos comparativos.

## ES 2 292 968 T3

En el caso del procedimiento integrado conforme al invento, con centrifugas del tipo líquido-líquido, se ha manifestado además como posible conservar la producción de L-fenilalanina a lo largo de un período de tiempo más largo, con una duración de la fermentación de por lo menos 50 horas, sin que aparezca ninguna inhibición en el biorreactor.

5 El caudal de producción de L-fenilalanina está situado, hasta el final del período de 50 horas, claramente por encima de 0,03 g/(g\*h). Por el contrario, el caudal comparable de formación de producto, en el caso de una fermentación clásica sin separación integrada de L-fenilalanina a través de centrifugas del tipo líquido-líquido, disminuye hasta cero con una duración del proceso de 36 horas, y en el caso de una fermentación clásica con separación integrada de L-fenilalanina por medio de una extracción apoyada en membranas según el documento WO/66253, disminuye hasta  
10 0,02 g/(g\*h) con una duración del proceso de 36 horas.

En el Ejemplo I de acuerdo con el proceso conforme al invento, de la separación integrada de productos a través de centrifugas del tipo líquido-líquido, el caudal de formación de productos aumentó con la duración de la fermentación, y alcanzó un máximo poco después del comienzo de la extracción de la L-fenilalanina. Aproximadamente  
15 al mismo tiempo, también el caudal de extracción alcanzó un máximo. El caudal de extracción permaneció, en el transcurso ulterior hasta la desconexión de la extracción, en un nivel comprendido entre 1,1 g/(l\*h) y 1,7 g/(l\*h). La formación volumétrica de producto se comportó de una manera comparable y disminuyó sólo ligeramente después de haber desconectado la fermentación. De una manera sorprendente, mediante los caudales de producción y de extracción aproximadamente de igual magnitud, se reprimió ampliamente una fuerte acumulación de L-fenilalanina en el  
20 biorreactor. En lo esencial, la concentración de L-fenilalanina en el biorreactor permaneció constante en el intervalo de 12 a 15 g/l.

El rendimiento integral de producto y sustrato en el Ejemplo I se calculó como de 24% al final de la fermentación. Esto quiere decir que se encontró una mejoría en un 6,5% en comparación con una fermentación sin extracción reactiva con centrifugas del tipo líquido-líquido (con un rendimiento de 17,5%). En el caso de una extracción reactiva apoyada en membranas, se encontró por el contrario solamente una mejoría en un 5% en comparación con una fermentación sin extracción reactiva apoyada en membranas, con un rendimiento de 15,3%.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la separación integrada a partir de un biorreactor de una o varias sustancias orgánicas presentes en una mezcla acuosa de bioproceso, que contiene por lo menos un grupo nitrogenado cargado positivamente y/o por lo menos un grupo nitrogenado que se puede cargar positivamente, en cuyo procedimiento se lleva a cabo una extracción reactiva, en por lo menos una etapa, con un agente de extracción, realizándose que
- 10 a. se saca desde el biorreactor continuamente una mezcla acuosa de bioproceso, y
- 15 b. se conduce a una centrífuga del tipo líquido-líquido con un agente de extracción que contiene compuestos orgánicos por lo menos parcialmente de cadena más larga y al menos un intercambiador líquido de cationes,
- c. se extrae mediante el agente de extracción, obteniéndose una fase orgánica que contiene la sustancia que se ha de extraer desde la mezcla de bioproceso, y
- d. el material retenido acuoso resultante se devuelve al biorreactor.
- 20 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mezcla del bioproceso, conducida a la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b., se hace exenta de células antes de que se le conduzca a la centrífuga.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la mezcla del bioproceso, conducida a la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b., se hace además también exenta de proteínas.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la mezcla acuosa del bioproceso es una mezcla de fermentación.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que detrás de la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b. está conectada una etapa de extracción adicional, en la que la sustancia extraída de la primera etapa de extracción es extraída de retorno en una fase acuosa.
- 30 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la etapa de extracción adicional tiene lugar también en una centrífuga del tipo líquido-líquido.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el rendimiento de extracción en la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b. corresponde por lo menos al caudal de producción en el bioproceso.
- 40 8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que como compuestos orgánicos de cadena más larga en la etapa b., se emplean alcanos, alquenos o ésteres de ácidos grasos con 6 a 20 átomos de C, preferiblemente con 12 a 18 átomos de C.
- 45 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que en la centrífuga del tipo líquido-líquido en la etapa b., como intercambiadores de líquidos están contenidos ésteres a base de ácidos inorgánicos y de radicales orgánicos, que preferiblemente están ramificados.
- 50 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que como intercambiadores líquidos de cationes se emplean ésteres de ácido fosfórico, ácido fosforoso, ácido sulfúrico o ácido sulfuroso.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 10, en el que en la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b., como intercambiadores líquidos de cationes están contenidos el éster di-2-etil-hexílico de ácido fosfórico, el éster mono-2-etil-hexílico de ácido fosfórico, el éster di-nonílico de ácido naftaleno-sulfónico o mezclas de ellos.
- 55 12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 11, en el que en la centrífuga del tipo líquido-líquido de la etapa b., referido a la cantidad de compuestos orgánicos de cadena más larga, está contenido de 2 a 25% en peso, de manera preferida de 5 a 20% en peso, de manera especialmente preferida de 8 a 15% en peso, de intercambiadores líquidos de cationes.
- 60 13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que se extraen sustancias orgánicas seleccionadas entre el conjunto formado por aminoácidos y/o lactamas alifáticas/as y/o aromáticas/as, sus sales, derivados o di- u oligo-péptidos, o mezclas de estos compuestos.
- 65 14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que en una etapa adicional del procedimiento
- e. la fase orgánica, procedente de c., se pone en contacto en un circuito cerrado con una fase acuosa de aceptor y se extrae de retorno.

## ES 2 292 968 T3

15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el contacto con la fase acuosa de aceptor procedente de e., se realiza en una centrifuga del tipo líquido-líquido, y en el que la fase orgánica empobrecida, que se obtiene en tal caso, se devuelve de una manera continua o semi-continua a la centrifuga de la etapa b.

5 16. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la mezcla del bioproceso en la etapa a., se hace exenta de células en una etapa ulterior

10 a1) a través de una derivación con un módulo de ultrafiltración (valor de separación aproximadamente 500 kDa) mediando devolución del material celular al biorreactor, y se obtiene un material permeado exento de células, que es conducido a la etapa b.

17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el material permeado exento de células se hace exento de proteínas en un proceso adicional

15 a2) a través de un casete de membrana en la región de los nanómetros (valor de separación aproximadamente 10 kDa hasta 50 kDa) se hace exenta de proteínas, mediando devolución al biorreactor de la parte que contiene proteínas del material permeado exento de células, siendo conducido el material permeado exento de células y exento de proteínas, que se ha obtenido, junto con el agente de extracción, a la etapa b., en la primera centrifuga del tipo líquido-líquido.

20 18. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 17, en el que en las etapas (d) y (e) se lleva a cabo una devolución total del material acuoso retenido al biorreactor.

25 19. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 18, en el que la extracción de retorno se efectúa mediando simultáneo aumento de la concentración de las sustancias orgánicas.

30 20. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la extracción se efectúa de una manera continua y simultánea con una reacción que transcurre en el biorreactor, siendo el rendimiento de extracción igual por lo menos al caudal de producción en el biorreactor.

35 21. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20, en el que se extrae a partir de soluciones de fermentación.

40

45

50

55

60

65

70

Figura 1

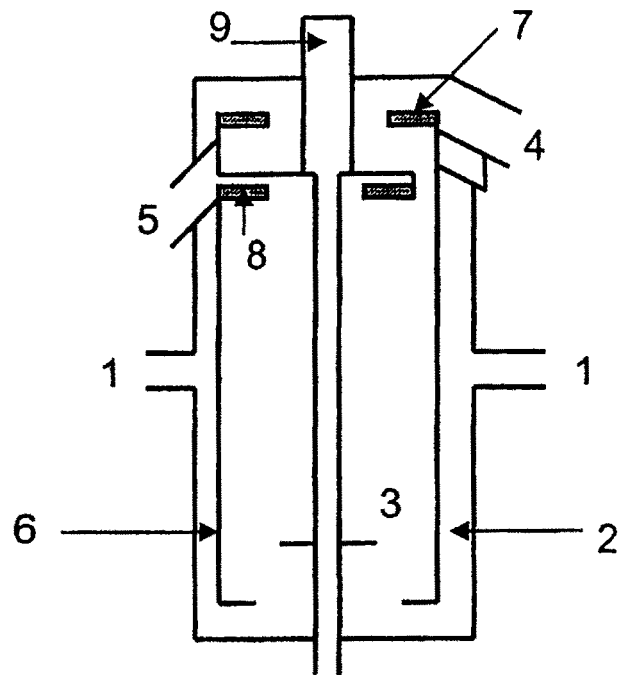


Figura 2

