



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104203903 B

(45)授权公告日 2016.09.28

(21)申请号 201380016046.6

(22)申请日 2013.02.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104203903 A

(43)申请公布日 2014.12.10

(30)优先权数据
10-2012-0125739 2012.11.07 KR
61/595,527 2012.02.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.09.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2013/000945 2013.02.06

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/119034 EN 2013.08.15

(73)专利权人 CJ第一制糖株式会社
地址 韩国,首尔
专利权人 汉阳大学校产学协力团

(72)发明人 李钟昊 姜升勋 俞裁宪 金庚熙
文星蓉 南熙根 朴赞勋

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民 陆惠中

(51)Int.Cl.

C07C 227/40(2006.01)

B01D 15/08(2006.01)

C07C 7/12(2006.01)

(56)对比文件

CN 101732890 A,2010.06.16,

CN 1806882 A,2006.07.26,

CN 101168512 A,2008.04.30,

US 2008/0149565 A1,2008.06.26,

CN 101948399 A,2011.01.19,

EP 1106602 A1,2001.06.13,

Sungyong Mun.Strategy of rearranging the port locations in a three-zone simulated moving bed chromatography for binary separation with linear isotherms.《Journal of Chromatography A》.2012,第1230卷100-109.

审查员 李虎强

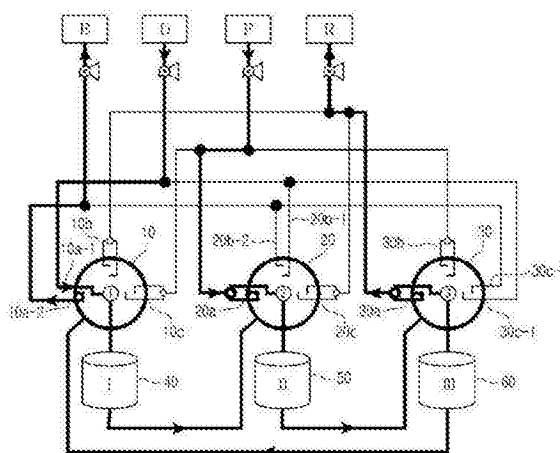
权利要求书2页 说明书13页 附图13页

(54)发明名称

缬氨酸的连续分离装置和用其连续分离缬氨酸的方法

(57)摘要

本发明涉及从含有如亮氨酸、异亮氨酸等氨基酸的混合物中连续分离缬氨酸的装置和通过使用该装置连续分离缬氨酸的方法,并且本发明能够以高纯度和高产率从含有如亮氨酸、异亮氨酸等氨基酸的混合物中连续地分离出缬氨酸。



1. 缬氨酸的连续分离装置,其包括:

脱附剂口(D);

进料口(F);

提余液口(R);

提取液口(E);

第一旋转阀(10)、第二旋转阀(20)、和第三旋转阀(30),每一个均选择性地连接到上述端口(D)、(F)、(R)、和(E);和

第一色谱区(40)、第二色谱区(50)、和第三色谱区(60),每一个均配备有所述旋转阀(10)、(20)、和(30),

其中所述旋转阀(10)、(20)、和(30)互相连接,

其中所述旋转阀(10)、(20)、和(30)分别配备有第一连接口(10a、10b、10c)、第二连接口(20a、20b、20c)和第三连接口(30a、30b、30c),和

其中随着所述旋转阀(10)、(20)、和(30)的旋转,所述第一连接口(10a、10b、10c)、第二连接口(20a、20b、20c)和第三连接口(30a、30b、30c)中任一种是打开的,并且随后选择性地连接到各端口(D)、(F)、(R)、和(E)上的旋转阀(10)、(20)、和(30)的任一个被改变,

其中所述旋转阀(10)、(20)、和(30)在短时间后随着旋转被连续改变,从而在第一、第二和第三位置之间旋转,

第一连接口(10a、20a、30a)在所述第一位置处被打开,

第二连接口(10b、20b、30b)在所述第二位置处被打开,以及

第三连接口(10c、20c、30c)在所述第三位置处被打开,并且

其中,在所述第一位置处,通过第一旋转阀(10)的第一连接口(10a),所述脱附剂口(D)与第一色谱区(40)流体连通,

通过第二旋转阀(20)的第二连接口(20a),所述进料口(F)与第二色谱区(50)流体连通,

通过第三旋转阀(30)的第三连接口(30a),所述第二色谱区(50)与所述提余液口(R)流体连通,并且

通过第一旋转阀(10)的第一连接口(10a),所述提取液口(E)与第三色谱区(60)流体连通,并且

其中所述短时间是待分离混合物分离的缬氨酸流入所述第三旋转阀(30)而剩余物没有流入所述第三旋转阀(30)的时间。

2. 根据权利要求1所述的缬氨酸的连续分离装置,其中:

在所述短时间之后,所述旋转阀(10)、(20)、和(30)旋转,并且

随着所述旋转阀(10)、(20)、和(30)的旋转,与所述端口(D)、(F)、(R)、和(E)相连的旋转阀(10)、(20)、和(30)被改变。

3. 根据权利要求1所述的缬氨酸的连续分离装置,其中:

每个所述色谱区使用由不溶性聚苯乙烯二乙烯基苯聚合物材料组成的树脂作为吸附剂。

4. 通过使用权要求1限定的缬氨酸的连续分离装置连续分离缬氨酸的方法,包括:使脱附剂流入脱附剂口,

使含缬氨酸的混合物流入进料口,和
从提余液口回收缬氨酸。

5. 根据权利要求4所述的连续分离缬氨酸的方法,其中所述脱附剂为水。

6. 根据权利要求4所述的连续分离缬氨酸的方法,其中所述方法使用由不溶性聚苯乙烯二乙烯基苯聚合物材料组成的树脂作为吸附剂。

7. 根据权利要求4所述的连续分离缬氨酸的方法,其中所述装置包括旋转阀(10)、(20)、和(30),所述旋转阀(10)、(20)、和(30)在短时间后旋转,

其中随着所述旋转阀(10)、(20)、和(30)的旋转,连接到所述端口(D)、(F)、(R)、和(E)的所述旋转阀(10)、(20)、和(30)被改变,并且

其中所述旋转阀(10)、(20)、和(30)在所述短时间后随着旋转被连续改变,从而在第一、第二和第三位置之间旋转,

第一接口(10a、20a、30a)在所述第一位置处被打开,

第二接口(10b、20b、30b)在所述第二位置处被打开,并且

第三接口(10c、20c、30c)在所述第三位置处被打开。

8. 根据权利要求7所述的连续分离缬氨酸的方法,其中:

在所述第一位置处通过所述进料口(F)流入的待分离混合物随着通过所述第二色谱区(50)分离为缬氨酸和剩余物,

由所述第一位置分离的缬氨酸流入所述第三旋转阀(30),然后通过所述提余液口(R)流出,和

由所述第一位置分离的剩余物流入所述第一旋转阀(10),然后通过所述提取液口(E)流出。

9. 根据权利要求8所述的连续分离缬氨酸的方法,其中:

当所述旋转阀(10)、(20)、和(30)从所述第一位置旋转到所述第二位置时,通过所述进料口(F)流入的所述待分离混合物随着通过所述第三色谱区(60)被分离为缬氨酸和所述剩余物,

在所述第二位置处分离的缬氨酸流入所述第一旋转阀(10),然后通过所述提余液口(R)流出,和

由所述第二位置分离的所述剩余物连同在所述第一位置期间分离的所述剩余物一起流入所述第二旋转阀(20),然后通过提取液口(E)流出。

10. 根据权利要求7所述的连续分离缬氨酸的方法,其中:

通过连续旋转,所述旋转阀(10)、(20)、和(30)在第一、第二和第三位置被交替地改变,并且

在所述第一、第二和第三位置处与所述端口(D)、(F)、(R)、和(E)连接的旋转阀互不相同。

11. 根据权利要求10所述的连续分离缬氨酸的方法,其中:

通过所述进料口(F)流入的待分离混合物被分离为缬氨酸和剩余物,和

所述旋转阀(10)、(20)、和(30)改变其位置的旋转间隔是缬氨酸从所述旋转阀中的任一移动到另一个旋转阀而剩余物没有移动的时间。

缬氨酸的连续分离装置和用其连续分离缬氨酸的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及缬氨酸的连续分离装置和用其连续分离缬氨酸的方法,并更具体地涉及从含有如亮氨酸、异亮氨酸等氨基酸的混合物中连续分离缬氨酸的装置,和用其连续分离缬氨酸的方法。

背景技术

[0002] 缬氨酸是具有式 $\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOH}$ 的L-氨基酸,并在药品和化妆品中作为主要原料之一使用。其也是用于动物饲料的重要成分之一。为此,商业市场中聚焦于缬氨酸应用的关注与日俱增。

[0003] 缬氨酸的生产通常是通过棒状杆菌(*Corynebacterium*)的发酵过程实现的。在这方面,注意的问题是杂质也同缬氨酸一起在发酵过程中获得。这些杂质包括盐、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等,并且所有这些杂质都需要从缬氨酸中分离出来。

[0004] 在现有技术中使用的缬氨酸的分离方法包括离子排阻色谱法(日本专利公开号:1987-1255453)、使用沉淀剂的结晶法(日本专利公开号1996-333312、日本专利公开号1998-237030、和美国专利号6,072,083),化学反应法(美国专利号4,263,450)及类似的方法。然而,在分离方法中,离子排阻色谱法存在缺点,在于诸如亮氨酸和异亮氨酸的氨基酸的分离非常困难,产生大量废水,和额外需要诸如结晶等后处理过程。而且,由于使用沉淀剂的结晶法需要除去沉淀剂的过程,其存在的缺点在于过程变得复杂和额外需要纯化后处理过程。此外,由于化学反应法需要浓缩和水解过程,其存在的缺点在于过程复杂并且使用大量溶剂,因此在后处理过程中需要很多实验室以将其回收,并且其在纯化过程中的成本相应增加。

[0005] 同时,色谱分离法是以脱附剂为基础的分离方法,并且被广泛用于多种生物产品的分离和纯化的方法,并且根据应用被大致分为分批色谱法和连续模拟移动床(SMB)色谱法。SMB法最初是在1961年由美国UOP建立,用于石油化工产品的分离,并且已报道其性能和分离效率远优于批处理法。由于SMB法的优越性,其已经扩展到高附加值产品如糖料、手性化合物、生物产品、药物等的分离和纯化,以及石油化工产品的分离和纯化。

[0006] 大多数常规SMB法(四区-SMB)由具有四个区域(柱)和四个端口的结构组成,如图1所示,并且每种待分离混合物和溶剂(脱附剂)流入四个端口中的待分离混合物的端口(进料)和脱附口(脱附剂)。另外,具有弱吸附能力和强吸附能力的物质被分离,然后通过提余液口(提余液)和提取液口(提取液)获得。为了使相应于待分离混合物和溶剂的输入和上述两种组分的回收的过程连续进行,四个端口以恒定的切换速率沿着溶剂流动的方向移动。

[0007] 然而,四区SMB法需要至少4个柱。通常,由于各柱的阀和脱附剂都很昂贵,如果可能的话优选最小化柱的数量。

[0008] 为此,如图2所示的具有三个色谱区的SMB法(三区SMB)已被引进,。由于其使用三个区,柱的最小数量可以从四个减少到三个。此外,以相对于有四个色谱区的常规SMB结构在结构方面相同的方式布置四个端口的的位置。

[0009] 然而,上述三区SMB法中具有弱吸附能力并且因此移动快速的低亲和力组分如缬氨酸,通过如图2所示的提余液口回收,但是,由于如图2中不存在提余液的富集区,所以过度稀释是不可避免的。即,由于回收的缬氨酸的浓度低于待分离混合物中的缬氨酸浓度,所以发生副作用,其在于SMB分离过程后续的后处理过程的操作成本增加。因此,需要应用在新系统中建立的三区SMB法,因为其能够克服副作用。

[0010] 因此,在考虑到上述问题的研究中,本发明人已经确定,通过应用模拟移动床色谱法的装置,缬氨酸能被连续并且有效地从含有如亮氨酸,异亮氨酸等氨基酸的混合物中分离出来,从而完成本发明。

发明内容

[0011] 技术问题

[0012] 本发明的目的是提供从含有如亮氨酸、异亮氨酸等氨基酸的混合物中连续分离缬氨酸的装置,和用其连续分离缬氨酸的方法。

[0013] 问题解决方案

[0014] 为了解决上述问题,本发明中用于分离缬氨酸的装置包括脱附剂口(D)、进料口(F)、提余液口(R)、提取液口(E)、三个旋转阀(10、20、30)和与三个旋转阀(10、20、30)中的每一个相连的三个色谱区(40、50、60),如图4a-4c所示。

[0015] 三个旋转阀(10、20、30)分别配有三个连接口(10、10b、10c)(20a、20b、20c)(30a、30b、30c),并且随着旋转阀(10、20、30)的旋转,各旋转阀(10、20、30)仅任意一个连接口被打开,并与脱附剂口(D)、进料口(F)、提余液口(R)和提取液口(E)流体连通。

[0016] 即,与脱附剂口(D)、进料口(F)、提余液口(R)和提取液口(E)连接的流动通道分别具有三个分支,因此,这些分支均与三个旋转阀(10、20、30)连接,然后随着任一连接口的打开连接于特定旋转阀。

[0017] 下文说明具体操作方式。

[0018] 图3是在本发明中使用的具有三个色谱区的模拟移动床法(三区SMB)的结构示意图。由图3可见,由于端口的布置顺序分别是脱附剂口、进料口、提余液口和提取液口,所以可以这种方式操作富集区以防止提余液浓度的稀释。由此,其具有如下优势:可以防止提余液浓度的下降,这是常规三区SMB的问题。另外,由于其具有这样的结构:其中脱附剂口和进料口通过一个柱连接,存在可以减少溶剂使用量的优势。

[0019] 进一步,本发明提供这样的装置:其中如图4所公开的方法的操作是连续的。图4a描述了处于第一位置的装置,图4b描述了处于第二位置的装置,并且图4c描述了处于第三位置的装置。在第一、第二和第三位置之间连续地旋转。即,根据本发明所述的装置具有这样的操作方式:其中时序由第一位置、第二位置、第三位置,然后再回到第一位置组成。

[0020] 某个位置的的设置通过旋转阀(10、20、30)的旋转来完成。即,打开旋转阀(10、20、30)的第一连接口(10a、20a、30a),从而将其设置到第一位置,通过转动旋转阀(10、20、30)打开第二连接口(10b、20b、30b),从而将其设置到第二位置,通过再次转动旋转阀(10、20、30)打开第三连接口(10c、20c、30c),并将其设置到第三位置。如果再次转动旋转阀(10、20、30),则它们再次被设置到第一位置。

[0021] 同时,在下文中,分别关联于入口(10a-1、20b-1、30c-1)和出口(10a-2、20b-2、

30c-2)显示一些连接口(10a、20b、30c),并以理解为目的进行说明。

[0022] 在第一位置处,如图4a所示,仅旋转阀(10、20、30)的第一连接口(10a、20a、30a)是被打开,并且第二连接口(10b、20b、30b)和第三连接口(10c、20c、30c)被关闭。

[0023] 在第一位置处,脱附剂口(D)与第一旋转阀(10)连接,进料口(F)与第二旋转阀(20)连接,提余液口(R)与第三旋转阀(30)连接,并且提取液口(E)与第一旋转阀(10)连接。

[0024] 因此,流自脱附剂口(D)的脱附剂通过第一旋转阀(10)和第一色谱区(40),然后流入第二旋转阀(20)。

[0025] 流自进料口(F)的待分离混合物和通过第一色谱区(40)的脱附剂一起流向第二旋转阀(20),然后通过第二色谱区(50)。

[0026] 本发明中待分离的混合物包含缬氨酸,还包含盐、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等作为其中的杂质。在通过第二个色谱区(50)之后,通过流速的差异来实现待分离混合物的组分的分离。缬氨酸是比其它杂质吸附能力弱的低亲和力组分,因而移动较快。因此,待分离的混合物随后被分离为缬氨酸和其它物质,并且它们在具有时间差异的情况下各自流入第三旋转阀(30)。

[0027] 意图分离的缬氨酸经由提余液口(R)流出,而其它物质通过经过第三色谱区(60)然后第一旋转阀(10)流出至提取液口(E)。

[0028] 在设置时间(即,旋转阀的旋转时间间隔)过去之后,转动旋转阀(10、20、30),然后改变到第二位置,如图4b所示。设置时间的标准在下文描述。

[0029] 在图4b所示的第二位置处,仅旋转阀(10、20、30)的第二连接口(10b、20b、30b)被打开,并且第一连接口(10a、20a、30a)和第三连接口(10c、20c、30c)被关闭。

[0030] 与第一位置相比,连接到端口(D、F、R、E)的旋转阀(10、20、30)在第二位置处相继逐一移动。

[0031] 即,在第二位置处,脱附剂口(D)与第二旋转阀(20)连接,进料口(F)与第三旋转阀连接(30),提余液口(R)与第一旋转阀(40)连接,并且提取液口(E)与第二(20)旋转阀连接。

[0032] 因此,在通过第二旋转阀(20)和第二色谱区(50)之后,从脱附剂口(D)流入的脱附剂流入到第三旋转阀(30)。

[0033] 从进料口(F)流入的待分离混合物与通过第二色谱区(50)的脱附剂一起流入到第三旋转阀(30),并通过第三色谱区(60)。

[0034] 然而,在这种情况下,已经从如图4a所示的第一位置流入的待分离混合物的剩余物由于流速的差异还没有流入到第三旋转阀(30)。为了将此完成,控制上述旋转时间间隔。

[0035] 因此,在第二位置处流入第三旋转阀(30)的待分离混合物通过第三色谱区(60),然后因流速的差异完成待分离混合物的分离,然后分离为缬氨酸和其他物质,其中意图分离的缬氨酸经由第一旋转阀(10)和提余液口(R)流出,而组合剩余物和在第一位置处被分离而还没有流入第三旋转阀(30)的其它物质,然后更有效地通过第二旋转阀(20),然后流入提取液口(E)。

[0036] 在预定的时间段过去之后,转动旋转阀(10、20、30)并改变到第三位置,如图4c所示。

[0037] 在图4c所示的第三位置处,仅旋转阀(10、20、30)的第三连接口(10c、20c、30c)被打开,并且第一连接口(10a、20a、30a)和第二连接口(10b、20b、30b)被关闭。

[0038] 与第二位置相比,连接到端口(D、F、R、E)的旋转阀(10、20、30)在第三位置处相继逐一移动。

[0039] 与第一和第二位置的说明相同,待分离的混合物从进料口(F)流入,然后与通过第三色谱区(60)的脱附剂一起流入第一旋转阀(10),然后通过第一色谱区(40),其中,由于在这种情况下,待分离混合物的剩余物在如图4b所示的第二位置处流入,并且由于流速的差异还没有流入第二旋转阀(20),其在通过第三旋转阀之后也被组合在一起并流入提取液口(E)。

[0040] 在通过第二旋转阀(20)之后,待分离混合物中意图分离的缬氨酸被分离到提余液口(R)。

[0041] 在预定时间段之后,转动旋转阀(10、20、30)并改变到如图4a所示的第一位置,并且此过程连续重复。

[0042] 多孔聚合物树脂可被用作在本发明第一、第二和第三色谱区中使用的吸附剂,并且优选地,可使用由不溶性聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合物材料组成的树脂。由于上述树脂有大表面积、独特的孔径和体积分布,其可被优选应用于各种物质的纯化,特别是药物化合物的纯化中。Amberchrom CG161(Rohm&haas)或Chromalite PCG系列(Purolite)等可用作具体实例。上述商购的树脂的粒径为10-300 μm ,表面积为700-900 m^2/g ,孔径大小为100-200 Å,孔径和体积分布为0.7-1.5 ml/g ,以及均匀度系数小于2。

[0043] 待分离混合物是含有与缬氨酸一起被包含在支链氨基酸中的缬氨酸、异亮氨酸或亮氨酸的混合物,并且优选地可以是微生物发酵获得的缬氨酸发酵液。本发明的具体实施例使用其中人为混合纯化的缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的混合物和通过微生物发酵获得的缬氨酸发酵液。这是因为存在罕见的情况,其中在微生物的发酵中只产生缬氨酸。在大多数情况下,异亮氨酸和亮氨酸会一起额外产生。

[0044] 通过根据本发明所述的连续分离装置,由于待分离的混合物中意图分离的缬氨酸经由提余液口(R)流出,并且剩余物通过旋转阀(10、20、30)的旋转以及流速差异被更有效地分离并经由提取液口(E)流出,从而连续分离缬氨酸。

[0045] 此外,通过对本发明的缬氨酸连续分离装置的控制,可通过调节脱附剂口(D)、进料口(F)和提余液口(R)的流速,也可通过调节旋转阀的旋转速率(切换时间)对其控制。可考虑柱的固有参数(吸附系数、传质系数、孔隙度、物质环境等),调节每个端口的流速。

[0046] 另外,本发明提供缬氨酸的连续分离方法,其特征在于其包括如下步骤:通过使用缬氨酸的连续分离装置的缬氨酸连续分离方法,利用脱附剂口使脱附剂流入,使含缬氨酸的混合物流入进料口,和从提余液口回收缬氨酸。脱附剂优选是水。此外,其特征在于通过此方法回收的缬氨酸的纯度为90%到99%。

[0047] 根据本发明的一个实施例,通过使用根据本发明所述的缬氨酸连续分离装置分离含缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的待分离混合物的结果是,回收的缬氨酸的产率为约98%或更多,纯度为约98%或更多,因此,证明了缬氨酸可从混合物中被有效地分离出来。

[0048] 发明的有利效果

[0049] 通过应用模拟移动床色谱法的装置,本发明可以从含有如亮氨酸、异亮氨酸等氨基酸的混合物中连续地分离缬氨酸,同时具有高纯度和高产率。

[0050] 附图简述

- [0051] 图1描述了具有常规四个色谱区的模拟移动床(四区SMB)色谱法的示意图。
- [0052] 图2是具有常规三个色谱区的模拟移动床(三区SMB)色谱法的示意图。
- [0053] 图3是在本发明中使用的具有三个色谱区(三区SMB)的模拟移动床色谱法的示意图,并该方法在区别于常规三区SMB的端口配置方式的基础上建立。
- [0054] 图4显示了在本发明中使用的三区SMB法的装置的模拟图。图4a、4b和4c分别显示了根据旋转阀的旋转的每个区的连接。
- [0055] 图5显示了选择吸附剂的脉冲测试结果。其中,(a)代表Amberchrom CG161C的结果,(b)代表Amberlite CG71C的结果,(c)代表DIAION SK1B的结果,和(d)代表Amberlite XAD-7HP的结果。
- [0056] 图6显示了对Amberchrom CG161C吸附剂的分步前置测试(stepwise frontal test)的结果。其中,(a)代表异亮氨酸的结果,(b)代表亮氨酸的结果,和(c)代表缬氨酸的结果。
- [0057] 图7显示了Amberchrom CG161C吸附剂的吸附平衡数据(q vs. C)。其中,(a)代表缬氨酸的数据,(b)代表亮氨酸的数据,和(c)代表异亮氨酸的数据。
- [0058] 图8显示了混合物的前置测试结果和模拟结果之间的比较。其中,(a)代表亮氨酸的结果比较,(b)代表异亮氨酸的结果比较,和(c)代表缬氨酸的结果比较。
- [0059] 图9显示了通过SMB脱附剂口排出的流出液的HPLC浓度分析结果。其中,(a)代表提余液浓度分析结果,和(b)代表提取液浓度分析结果。
- [0060] 图10显示了从SMB测试获得的样品的HPLC原始数据色谱图。其中,(a)代表待分离混合物的色谱图,(b)代表提余液的色谱图,和(c)代表提取液的色谱图,
- [0061] 图11显示了柱特征(60.5步),作为SMB测试结果。其中黑线代表缬氨酸的模拟结果,灰线代表异亮氨酸的模拟结果,黑色虚线代表亮氨酸的模拟结果,圆形代表缬氨酸的测试结果,正方形代表异亮氨酸的测试结果,和菱形表示亮氨酸的测试结果。
- [0062] 图12显示了经由提余液口排出的流出液的HPLC浓度分析结果,作为基于Chromalite PCG-600吸附剂进行的SMB测试结果。
- [0063] 图13显示了经由提取液口排出的流出液的HPLC浓度分析结果,作为基于Chromalite PCG-600吸附剂进行的SMB测试结果。
- [0064] 图14显示了柱特征(44.5步),作为基于Chromalite PCG-600吸附剂进行的SMB测试结果。其中,黑线表示缬氨酸的模拟结果,灰线表示亮氨酸的模拟结果,圆形表示缬氨酸的测试结果,和三角形表示亮氨酸的测试结果。

具体实施方式

[0065] 在下文中,意在通过实施例详细的说明本发明的结构与作用,但是这些实施例仅用于示例对本发明的描述,而本发明的范围和构思不意图被这些实施例所限制。

[0066] 方法:对缬氨酸纯化的色谱技术应用的研究

[0067] 1)基于模型的设计方法

[0068] 对于建立新型分离系统的连续过程最初考虑两个问题。第一个是建立所需成本和时间的最小化。第二个是提供最佳输出生产力和最佳分离效率的条件——通过保持所要建立的过程的最佳状态。为了满足上述两个条件,应在具体模型的基础上精确地把握吸附和

物质传递现象,并且获得其各种相关参数。在此具体模型和参数的基础上的过程设计方法被称为“基于模型的设计方法”。而且,本发明已经根据此方法建立在进行缬氨酸的连续分离中的SMB法。

[0069] 2)计算机模拟

[0070] 基于模型的设计方法的关键阶段之一是计算机模拟。这指的是借由数值分析法通过解决柱中每个组分的吸附和物质传递现象的具体模型方程来获得解决方案的程序。该数值分析法通过使用计算机进行,因为其需要大量的计算。

[0071] 在模拟中会用到多种柱模型方程,并且考虑到准确度和效率,其中集中传质模型(Kang,S.H.等,Process Biochem.,2010,45,1468-1476)被确定为本发明的模拟模型。在集中传质模型基础上的计算机模拟被用于SBM法分离效率的评估以及每种氨基酸组分的基本参数的测量和评估。此外,此模型方程被用于SMB优化计算机工具的制备。

[0072] 3)SMB优化工具

[0073] 在电脑模拟之后应用的基于模型的设计方法的另一个关键作用是通过SMB优化计算机工具产生的。此工具用于获得所要建立的SMB法的最佳操作条件。制备此优化工具的首要问题是优化算法。通常,已知在随机理论基础上的基因算法在复合形式的过程优化如SMB(Lee,K.B.et al.,AIChE J.,2008,54,2852-2871)中是最有效的。

[0074] 而且,本发明已经在缬氨酸连续分离优化的基因算法的基础上建立了SMB优化计算机程序。该基因算法本身已在过渡期间(interim)被建立了多次,并且NSGA-II-JG算法被用作基本算法,其可以说是在本发明优化工具的制备阶段中最新的基因算法。

[0075] 制备SMB优化软件的方法通过使用在Microsoft Excel软件中安装的可视基本应用程序(VBA)语言来编码优化算法,并能够进行具体模拟方程的计算和NSGA-II-JG算法在其中同时进行。

[0076] 实验准备

[0077] 1)材料

[0078] 在组成待分离混合物的三种氨基酸组分中,缬氨酸和亮氨酸购自Fluka,并且异亮氨酸购自Sigma。用于溶解氨基酸的水是三重蒸馏去离子水(DDW),并通过Milli-Q系统(Millipore)获得。在实验中使用的吸附剂是Amberchrom CG161C(Rohm&haas)、Amberlite CG71C(Sigma Aldrich)、DIAION SK1B(Mitsubishi Chemical)、Amberlite XAD-7HP(Sigma Aldrich)。在HPLC浓度分析中使用的甲醇购自Burdick&JacksonCo.(Muskegon,MI)。

[0079] 在吸附剂选择实验和每种材料的基本参数测量实验中使用的Omnifit玻璃柱购自Biochemical FluidicsCo.(Boonton,NJ),并且在前者实验中使用长度为11.6cm并且直径为1.5cm的柱,在后者实验中使用长度为21.7cm并且直径为2.5cm的柱。

[0080] 2)设备

[0081] 单柱实验设备

[0082] 在吸附剂选择实验中使用Young-Lin SP930D泵和Young-Lin UV730D检测器。通过Autochro-3000软件完成这两种设备的控制和数据处理。用于将氨基酸脉冲注入各自用吸附剂填充的柱的注射器是Rheodyne7725i注射器,并且注射体积为100 μ l。

[0083] 在完成吸附剂选择之后进行的每种氨基酸的基本数据的测量实验中,使用FPLC P-920泵、Waters486UV检测器和Amersham FPLC收集器(Frac-900)。通过Unicorn5.1软件完

成每个具体设备的控制和数据收集。

[0084] -用于连续分离缬氨酸的三区SMB装置

[0085] 自组装并使用如图4所示的装置。完成的SMB实验装置的脱附剂的流速和待分离混合物的流速通过使用Young-Lin SP930D泵控制,并且提余液流速由Ismatec MCP-CPF ISM919泵控制。为了产生四个端口周期性移动的效果,使用ST Valco旋转阀(VICI, Houston, TX)。该ST阀的模拟图显示在图4a-4c中。通过Labview8.0软件自动地控制实验中使用的Valco旋转阀。

[0086] -HPLC浓度分析装置(分析器)

[0087] 为了测量通过SMB实验收集的物质的浓度,使用HPLC浓度分析器。Waters Symmetry C-18柱(250×4.6mm ID,粒径5μm)用作分析柱。通过使用Waters Millennium软件处理与HPLC浓度分析相关的所有数据的收集。通过使用Waters515HPLC泵控制流动相的流速。通过使用Rheodyne9725i注射器将浓度分析样品注入到分析柱中,并且注射体积为20μl。通过使用Waters996PDA检测器进行样品的检测。

[0088] 从缬氨酸的前置实验获得的样品的浓度分析中,使用Young-Lin SP930D泵和Young-Lin UV730D检测器。由Autochro-3000软件进行Young-Lin泵和检测器的控制 and 数据处理。通过使用Rheodyne7725i注射器将从实验中获得的样品注入到分析柱中,并且注射体积为20μl。

[0089] 实施例1:选择适合分离缬氨酸的脱附剂

[0090] 1)实验方法

[0091] 通过一系列脉冲测试的方式,通过使用有可能将亮氨酸和异亮氨酸从缬氨酸中分离的四种常见吸附剂,如Amberchrom CG161C(Rohm&haas)、Amberlite CG71C(Sigma Aldrich)、DIAION SK1B(Mitsubishi Chemical)、Amberlite XAD-7HP(Sigma Aldrich),进行选择最适合的吸附剂的实验。

[0092] 脉冲测试实验的条件如下:三种氨基酸的各·浓度均为2g/L,并且注射体积为100μl。流动相的流速为2ml/min。

[0093] 2)实验结果

[0094] 结果显示在图5中。如图5所示,可以确定在除Amberchrom CG161C吸附剂以外的其它吸附剂的情况下,缬氨酸的选择性分离是困难的。从上述结果确定,Amberchrom CG161C吸附剂最适于建立用于分离缬氨酸的SMB法。

[0095] 实施例2:Amberchrom CG161C柱的孔隙率的测量

[0096] 1)实验方法

[0097] 测量在实施例1中选择的Amberchrom CG161C吸附剂的孔隙率。首先,进行用吸附剂填充柱然后测定颗粒间孔隙率(e_b)的实验。虽然其以与实施例1相同的方式进行,但是在本例中,与实施例1不同,适于测量颗粒间孔隙率的示踪分子代替待分离物质被注射到柱中。使用的示踪分子是蓝色葡聚糖,并且注射浓度为1g/L,流速为4ml/min,并且注射体积为500μl。

[0098] 2)实验结果

[0099] 根据实验结果,柱的颗粒间孔隙率的值为0.391。颗粒内孔隙率——其为在参考文献中报道使用的重要信息之一——的数值为0.737(Nam,H.G.等,Process Biochem.,2011,

46,2044-2053)。

[0100] 实施例3:在Amberchrom CG161C上缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的基本参数的测定

[0101] -吸附系数的测定

[0102] 1)实验方法

[0103] 为了测定与为分离对象混合物的每个组份相对应的缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的基本参数,进行多重前置测试。该多重前置测试是为了获得每种待分离物质的吸附平衡数据和为了限定吸附模型方程和基于获得的数据确定相关吸附参数而进行的实验。

[0104] 具体地,多重前置测试使用两个泵,并且其中一个泵用DDW填充,另一个泵用缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸溶液填充。然后,将缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸溶液连续地注入到柱中,直到在柱中吸附剂相和流动相之间达到平衡。在平衡状态中,由于吸附剂颗粒与颗粒之间的所有浓度以及吸附剂内部的浓度保持类似于缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸溶液的注射浓度,所以可以直接通过建立简单的质量平衡方程来研究吸附剂上的吸附剂浓度。在柱内部的浓度达到平衡状态之后,通过与前阶段相比增加分离对象混合物溶液的比例,使新的平衡状态维持。再次,通过建立此平衡状态的质量平衡方程,计算吸附剂上的吸附浓度。当进行多重前置测试时,每种氨基酸组分的步长时间被设置为从脉冲测试结果获得的保留时间的2-3倍。

[0105] 而且,每种氨基酸的多重前置测试以共计五步进行,并且步长时间被设置为缬氨酸40min,亮氨酸70min,和异亮氨酸70min。此外,所有样品的浓度为5g/L,并且流速恒定保持在4ml/min。在UV检测器处、在205nm和218nm的波中进行亮氨酸和异亮氨酸实验。另一方面,在缬氨酸的情况下,采用直接HPLC分析方式(该方式逐一取样柱流出物,然后通过使用HPLC装置分析其浓度),其非亮氨酸和异亮氨酸实验中采用的在线监测方式。HPLC分析条件是10%的甲醇水溶液用作流动相,注射体积为20 μ l,并且流速为0.5ml/min。在分析之前,通过使用标准品溶液确定自校准曲线。结果显示在图6中,在这些结果的基础上计算吸附平衡数据,并且计算结果显示在图7中。

[0106] 2)实验结果

[0107] 如图7所示,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸全部都表示在Amberchrom CG161C上线性吸附相关性。因此,通过线性吸附方程建模每种氨基酸组分,并且从中确定线性吸附系数。确定的吸附系数的值显示在如下表1中。

[0108] -传质系数的确定

[0109] 1)实验方法

[0110] 传质系数——与吸附系数一起,可被称为另一重要基本参数,按如下方法确定。

[0111] 首先,通过利用Chung&Wen相关性(Chung,S.F.et al.,AIChE J.,1968,14,857-866)和Wilson&Geankopolis相关性(Wilson,E.J.等,Ind.Eng.Chem.Fundam.,1966,5,9-14)分别预测轴向分散系数和膜传质系数,并且通过利用Wilke&Chang相关性(Wilke,C.R.等,AIChE J.,1955,1,264-270)计算出分子扩散系数。而且,确定颗粒内扩散系数,同时基于集总传质模型使前置实验数据和模拟结果相互拟合。

[0112] 2)实验结果

[0113] 以上确定的分子扩散系数和颗粒内扩散系数的数值显示在下面的表1中:

[0114] [表1]

[0115]

	线性吸附系数	颗粒内扩散系数 (cm^2/min)	分子扩散系数 (cm^2/min)
亮氨酸	5.527	5.40×10^{-5}	5.40×10^{-4}
异亮氨酸	4.361	3.00×10^{-4}	4.35×10^{-4}
缬氨酸	0.926	3.00×10^{-4}	5.10×10^{-4}

[0116] 为了确定以上确定的吸附和传质系数的值的适宜性,比较模型模拟结果和前置实验结果,取代该值,如图6所示。

[0117] 如图6所示,可以确定模拟结果和实验数据吻合良好。因此,如上确定的基本参数的数值可充分用于SMB法的优化,如稍后进行。

[0118] 实施例4:通过混合物的前置实验研究基本参数

[0119] 1)实验方法

[0120] 为了研究在实施例3中确定的基本参数值,进行混合物的前置实验。在此实验中,与实施例3中不同,通过使用包含全部三种氨基酸的混合物溶液作为待分离混合物进行前置实验。

[0121] 而且,基于类似于实施例3中确定的基本参数值的条件和混合物前置实验条件,进行模型模拟。此外,将获得的模拟结果与混合物的前置实验数据进行比较,其结果显示在图8中。

[0122] 2)实验结果

[0123] 如图8所示,可以确定实验数据与模拟结果吻合良好。这意味着实施例3中确定的基本参数值可以很好地说明在处于混合物中的状态下以及在处于单独组分的状态下柱中每种氨基酸的表现。此外,这意味着在各氨基酸之间的相互作用很少存在。

[0124] 实施例5:缬氨酸的连续分离过程的优化

[0125] 优化过程中的焦点问题是最大化缬氨酸的生产力,同时确保分离目标缬氨酸的高纯度和高产率。其中根据下列方程定义缬氨酸的产率:

[0126] 缬氨酸的生产力 = $Q_{\text{raf}} \cdot C_{\text{ref, 缬氨酸}}$

[0127] (其中, Q_{raf} 是提余液口中的流速和, $C_{\text{ref, 缬氨酸}}$ 意为提余液口中的缬氨酸浓度。)

[0128] 缬氨酸的生产力作为目标函数被建立,并且缬氨酸的纯度和产率作为约束条件被建立,来进行优化过程。具体的优化过程概述如下:

[0129] $\text{Max } J = \text{生产力}[Q_{\text{进料}}, Q_{\text{raf}}, t_{\text{sw}}]$

[0130] 以缬氨酸纯度 = 98% 为准

[0131] 缬氨酸产率 = 98%

[0132] 固定变量 $Q_{\text{des}} = 5 \text{ mL/min}$

[0133] 每个组分的 $C_{\text{进料}} = 5 \text{ g/L}$

[0134] $L_c = 21.7 \text{ cm}$, $d_c = 2.5 \text{ cm}$

[0135] (其中, $Q_{\text{进料}}$ 和 Q_{des} 独立地指代待分离混合物的流速和脱附剂的流速,并且 t_{sw} 指代切换时间。)

[0136] 为了根据该方程优化应用本发明的三区SMB装置的缬氨酸分离方法,自编码基于

NSGA-II-JG算法的优化计算机程序,并且计算机程序与Aspen模拟器连接以优化相关方法。结果显示在下文表2中。

[0137] [表2]

[0138]

进口和出口流速 (mL/min)	$Q_{\text{进料}}$	2.42
	Q_{raf}	2.71
	Q_{ext}	4.71
	Q_{des}	5.00
区流速 (mL/min)	Q_1	5.00
	Q_2	7.42
	Q_3	4.71
切换时间(min)		21.33
缬氨酸纯度 (%)		98.0
缬氨酸产率 (%)		98.1

[0139] 实施例6:SMB实验

[0140] 通过利用以上获得的数据,通过根据本发明的缬氨酸连续分离装置分离缬氨酸,并如下测量其产率和纯度:

[0141] 1)实验方法

[0142] 如图4所示,通过利用从上述实施例5中获得的优化条件进行SMB实验。Amberchrom CG161C用作柱。

[0143] 首先,在实验开始之前连接柱。此时,脱附剂(水)的流速保持在2ml/min,并停止其它泵的运行。连接每个阀和柱,此时要小心,使得没有空气进到柱内。在完成所有的柱连接后,使脱附剂的流速增加到目标值。由于SMB实验的开始是注入待分离混合物溶液之时,待分离混合物的泵与Labview8.0软件的操作同时运行。阀的切换和切换时间由Labview8.0同时控制。

[0144] SMB实验进展,直到其充分达到循环稳定状态。确定在第25步之后达到了该稳定状态。因此,SMB实验进展直到第60步,这是远超过稳定状态的值。贯穿SMB实验,在每一步,通过使用HPLC装置分析从每个输出端口洗脱的溶液的浓度。而且,为了确定柱特征,在最后一步采集相关样品。出于此目的,当SMB实验达到60.5步时,停止所有驱动泵。此外,收集通过打开连接到阀的柱下部而从柱流出的溶液,并分析该溶液的浓度。HPLC分析条件是:10%的甲醇水溶液用作流动相,注射体积为20 μ l,并且流速为0.5ml/min。在分析前,通过使用标准品溶液确定自校准曲线。结果显示在图9中。在图10中,(a)为提余液浓度的分析结果,(b)为提取液浓度的分析结果。

[0145] 2)实验结果

[0146] 如图9a所示,可以确定提余液溶液中的大多数组分为缬氨酸。亮氨酸和异亮氨酸——属于杂质——很少存在。这意味着维持的缬氨酸纯度很高。而且,如图9b所示,根据提取液浓度的分析结果,大多数组分为亮氨酸和异亮氨酸,并且缬氨酸的检测量为可忽略的数量。这意味着缬氨酸经由输出端口的损失被最小化。

[0147] 另外,随着SMB实验的进展同时进行相关SMB过程的计算机模拟,并且将结果与提

余液和提取液的HPLC浓度分析数据直接比较。如图9所示。可以看出模拟结果和SBM实验数据的相关性良好。

[0148] 为了对通过上述SMB实验分离的缬氨酸的最终纯度和产率进行定量测量,以相同的比例混合在最后6步期间得到的流出物溶液,然后进行该溶液的HPLC浓度分析。基于分析后的浓度数据,计算出缬氨酸的纯度和产率,结果显示在下面的表3中。

[0149] [表3]

[0150]

	实验	模拟
产率(%)	98.25	98.01
纯度(%)	97.50	98.03

[0151] 根据表3和图9的结果,可以确定本发明的使用Amberchrom CG161C的SMB法在确保缬氨酸的连续分离和始终保持高纯度和高产率的方面是具有优越性的。作为其实验证据数据,HPLC浓度分析的原始色谱图(HPLC原始数据)显示在图10中。

[0152] 首先,在关于待分离混合物溶液的HPLC原始数据(图.10a)中,三种氨基酸组分全部都显示大峰。在关于属于缬氨酸的生产口的提余液口流出物的HPLC原始数据(图10b)中,仅缬氨酸组分清晰地显示出大峰,而异亮氨酸的峰显示出很小的峰,并且进一步亮氨酸的峰很少被发现。在提取液口流出物的HPLC原始数据(图10c)中——其被建立以获得仅对应于杂质的数据,缬氨酸组分的峰是可忽略的,而其余两种氨基酸组分显示出大峰。通过这该系列HPLC原始数据,再一次可以确定,如本发明进行的用于缬氨酸连续分离的SBM实验被成功地进行。

[0153] 除上述提余液和提取液的浓度图之外,柱特征数据也是重要的SMB实验数据。因此,在最后的切换时段——即在第60.5步——的中点标志期间,采集确定柱特征数据所需的样品。在分析样品浓度之后,结果显示在图12中。由图11可见,可以确定柱特征数据也与模拟结果相关良好。这揭示了柱特征证明SMB实验顺利进行。即,可以说,实验证明的事实是,SMB柱中的每种氨基酸的溶质曲线的分布使得其完全有利于高纯度和高产率。

[0154] 因此,根据上述所有SMB实验数据(输出端口处的浓度图、柱特征)可以看出,本发明的使用Amberchrom CG161C的SMB法充分地适用于工业规模上的缬氨酸的连续分离过程

[0155] 上述SMB法基于Amberchrom CG161C吸附剂得到优化,而且得到实验验证。除了此脱附剂之外,还进行了基于Chromalite PCG-600的SMB法,以进行优化,其中验证了对缬氨酸分离的影响,并也进行了这方面的实验。由此确定,Chromalite PCG-600吸附剂在施用于SMB法后也充分地适用于缬氨酸的连续分离。

[0156] 实施例7:在实际发酵混合物中的实验

[0157] 根据类似于之前实验的方法,通过使用实际发酵混合物进行实验。

[0158] 为了测量实际发酵混合物中缬氨酸和亮氨酸组分的基本参数(吸附和传质系数),进行混合物前置实验,其中将发酵混合物溶液注射到用Chromalite PCG600C树脂填充的单柱中,同时随时间测量柱流出物的浓度

[0159] 通过使用由实验和逆推法获得的浓度特征数据来确定缬氨酸和亮氨酸的基本参数,并且结果在表4中给出。

[0160] [表4]

[0161]

	线性等温线参数	颗粒内扩散系数 (cm^2/min)	分子扩散系数 (cm^2/min)
缬氨酸	0.6065	1.20×10^{-5}	5.10×10^{-4}
亮氨酸	3.925	1.75×10^{-5}	5.40×10^{-4}

[0162] 在上表4给出的基本参数的基础上,从实际发酵混合物中连续地分离出缬氨酸和亮氨酸的PCG600C-SMB法被优化设计。此SMB法还基于本发明新颖的端口布置顺序,并且柱配置采用三区结构,如图3所示。

[0163] PCG600C-SMB法的优化程序中聚焦的问题是缬氨酸生产力的最大化,同时确保缬氨酸的高产率和亮氨酸的高去除效率。为了实现此优化目的,缬氨酸的生产力作为目标函数被建立,并且缬氨酸的产率和亮氨酸的去除率作为进行优化程序的约束条件被建立。具体的优化程序概述如下。 Q_{des} 是在可以增加缬氨酸的纯度和产率的范围内被控制的值。

[0164] $\text{Max } J = \text{生产力}[Q_{\text{进料}}, Q_{\text{raf}}, t_{\text{sw}}]$

[0165] 以缬氨酸纯度=97%为准

[0166] 亮氨酸去除效率=90%

[0167] 固定变量 $Q_{\text{des}} = 6 \text{ mL/min}$

[0168] $L_c = 21.7 \text{ cm}, d_c = 2.5 \text{ cm}$

[0169] 柱配置=1-1-2

[0170] (其中, $Q_{\text{进料}}$ 和 Q_{des} 分别指代待分离混合物的流速和脱附剂的流速,并且 t_{sw} 指代切换时间。)

[0171] 为了根据上述方程进行PCG600C-SMB法的优化,自编码基于NSGA-II-JG算法的优化计算机程序,并且将计算机程序与Aspen模拟器连接,以获得相关过程的优化。该优化结果在表5中给出。

[0172] [表5]

[0173]

入口和出口流速 (mL/min)	$Q_{\text{进料}}$	3.27
	Q_{raf}	3.93
	Q_{ext}	5.34
	Q_{des}	6.00
区流速 (mL/min)	Q_1	6.00
	Q_2	9.27
	Q_3	5.34
切换时间 (min)		17.85

[0174] 为了实验验证表5的优化结果,自组装PCG600C-SMB工艺装置。组装的工艺装置的模拟图在图4中给出。

[0175] 通过应用表2的优化结果和图4的工艺装置,进行分离缬氨酸的SMB实验,其中实际发酵混合物为对象。此实验中使用的实际发酵混合物中缬氨酸和亮氨酸的浓度分别为

71.8g/L和0.742g/L。

[0176] 分离缬氨酸的SMB实验结果显示在图12-14中,其中实际发酵混合物为对象。如在图12中的提余液流出物历史结果所示,缬氨酸的高浓度回收符合模拟预期水平完成,并且亮氨酸的流出物浓度水平低到足以被认为是可忽略的量。如图13的提取液流出物历史结果所示,可以确定亮氨酸符合模拟预期水平被去除。而且,可以确定缬氨酸经由提取液口的损失被最小化。这些实验结果意味着通过PCG600C-SMB法进行的缬氨酸和亮氨酸的连续分离可充分确保缬氨酸的高产率和亮氨酸的高去除率。

[0177] 在图12和13的流出物历史结果之外,图14的柱特征结果也全面显示缬氨酸和亮氨酸的连续分离被成功地进行。如图14所示,可以确定每个柱中的缬氨酸和亮氨酸的浓度分布是非常有利于确保缬氨酸的高产率回收和亮氨酸的高去除率。基于这些结果,实际发酵混合物中99.7%的缬氨酸可以经由提余液口被回收,同时98.0%的亮氨酸可以经由提取液口被去除。

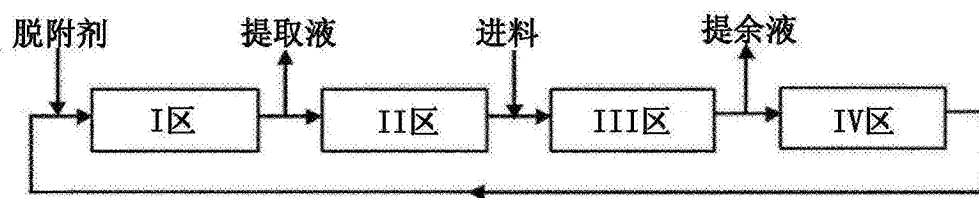


图1

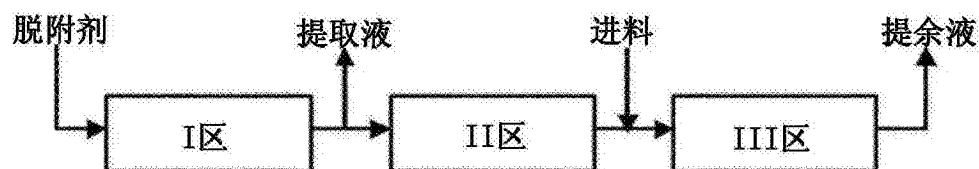


图2

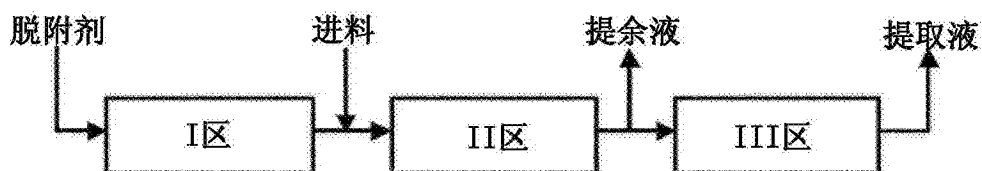


图3

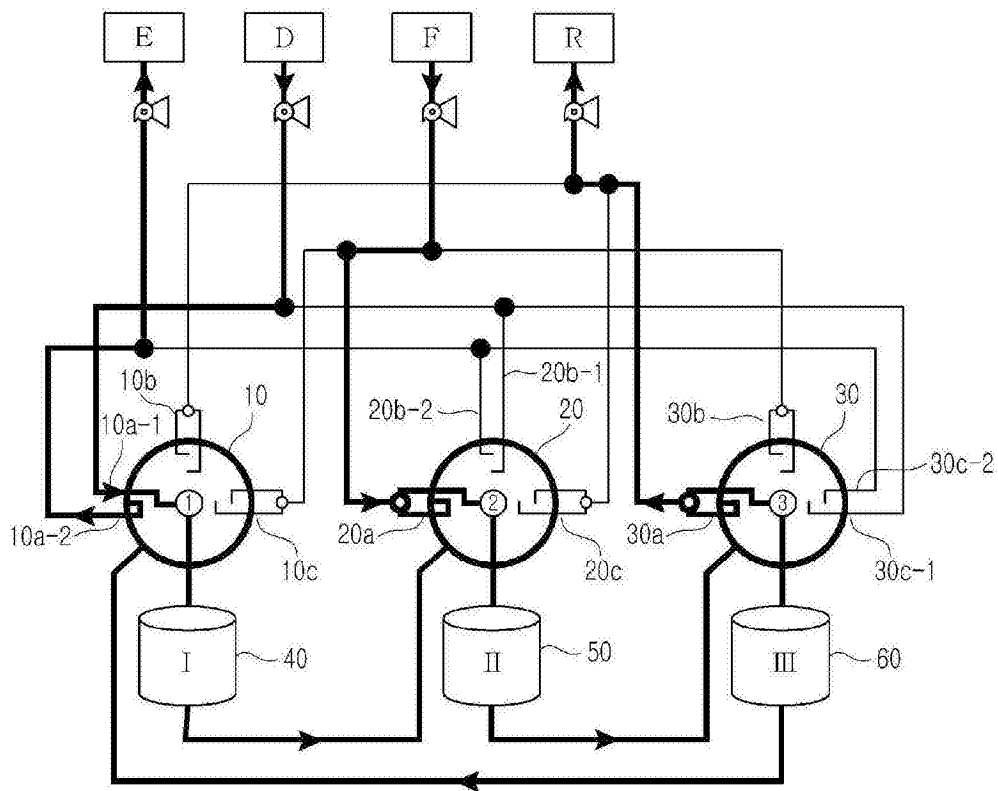


图4a

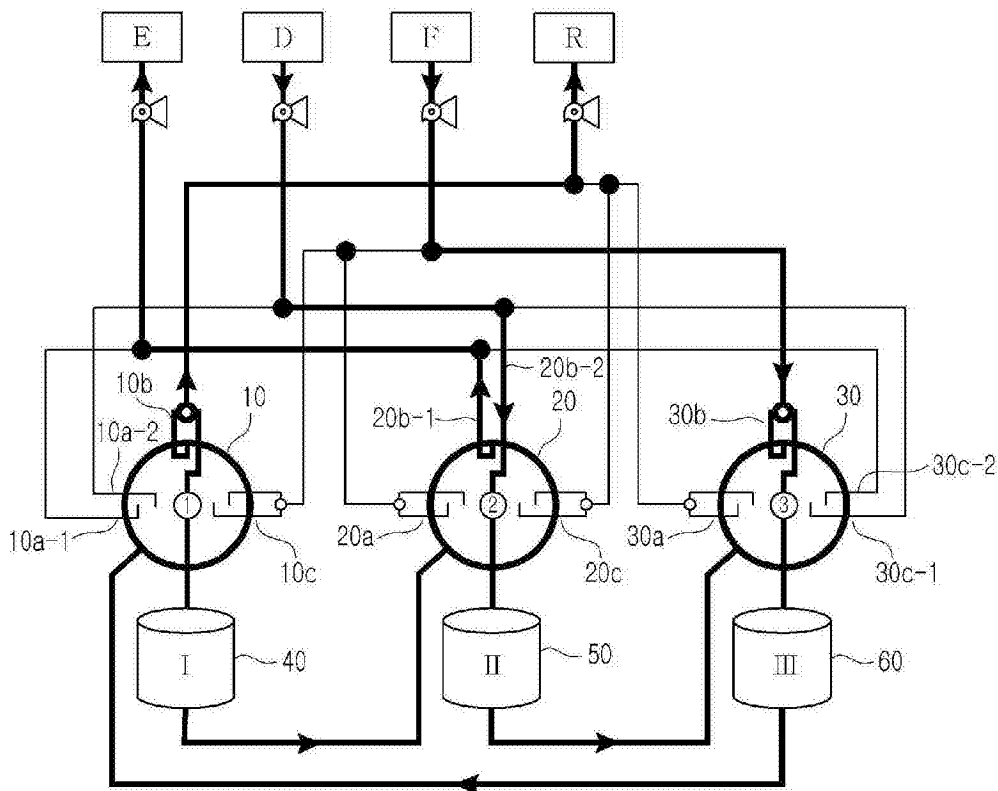


图4b

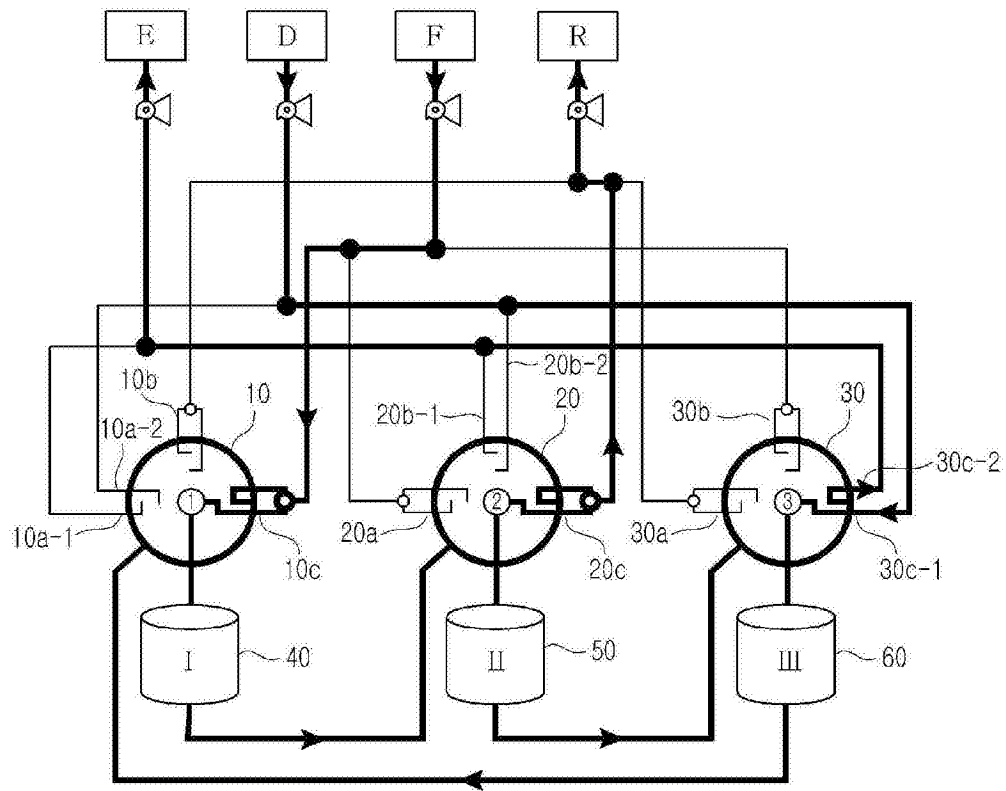


图4c

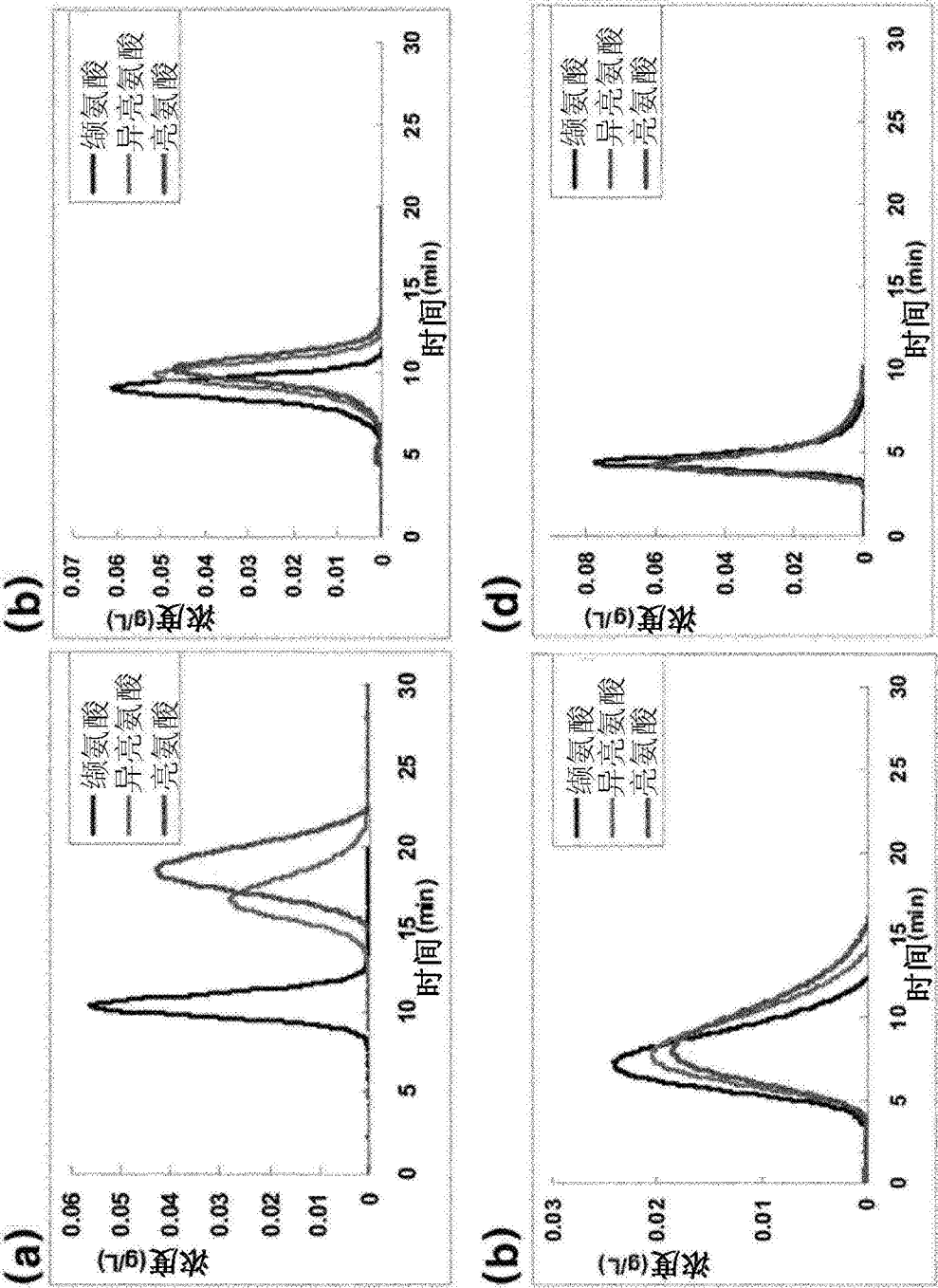


图5

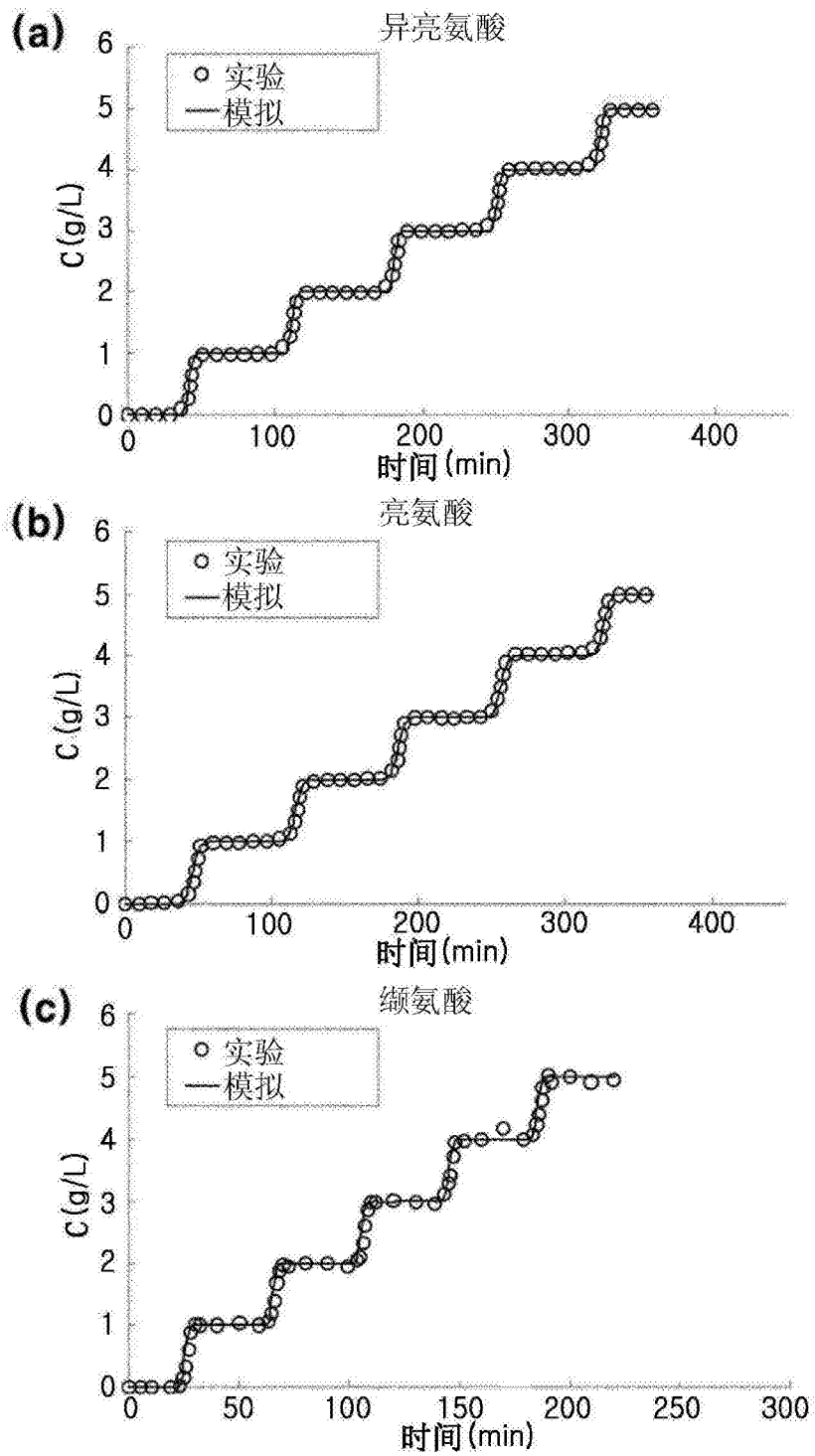


图6

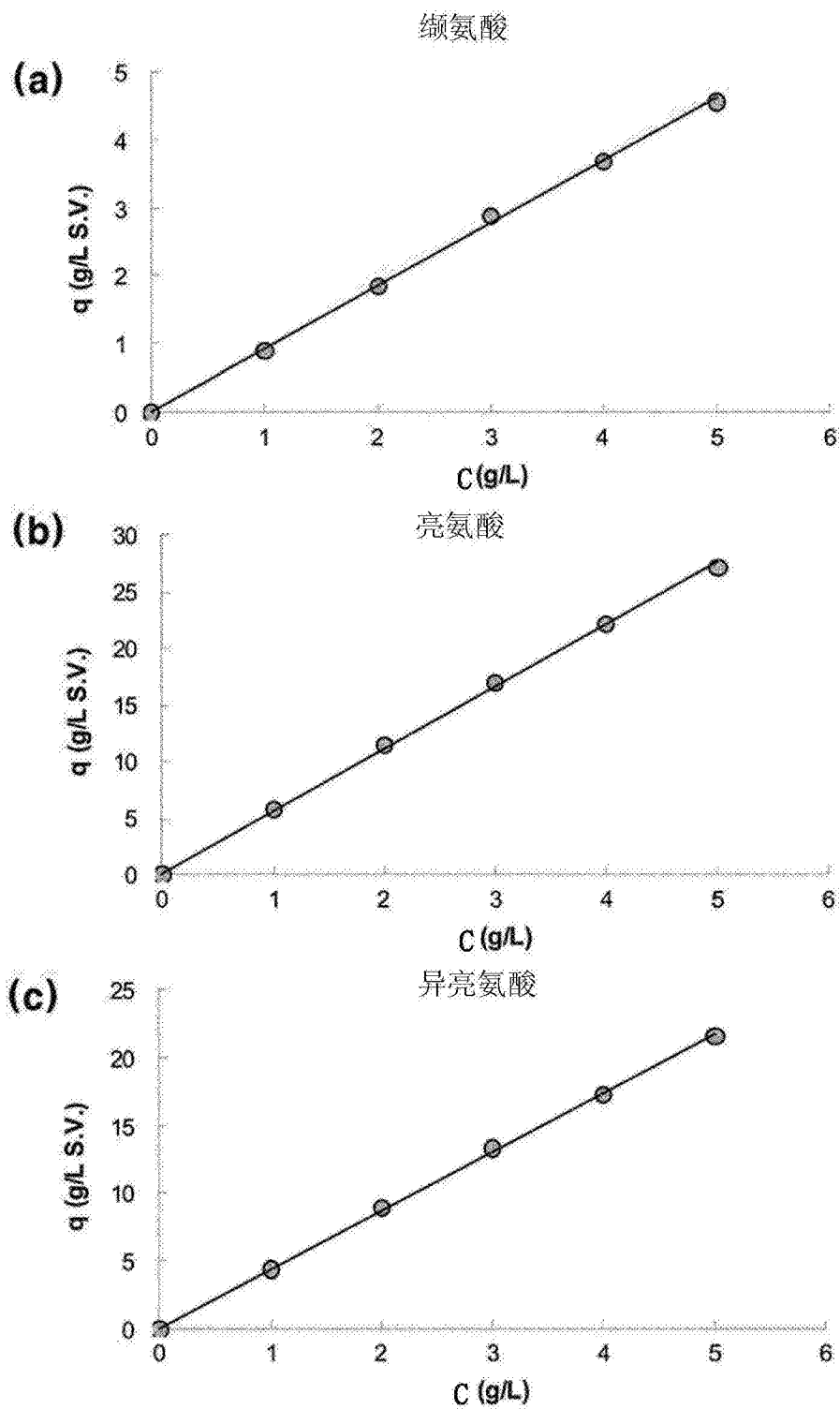


图7

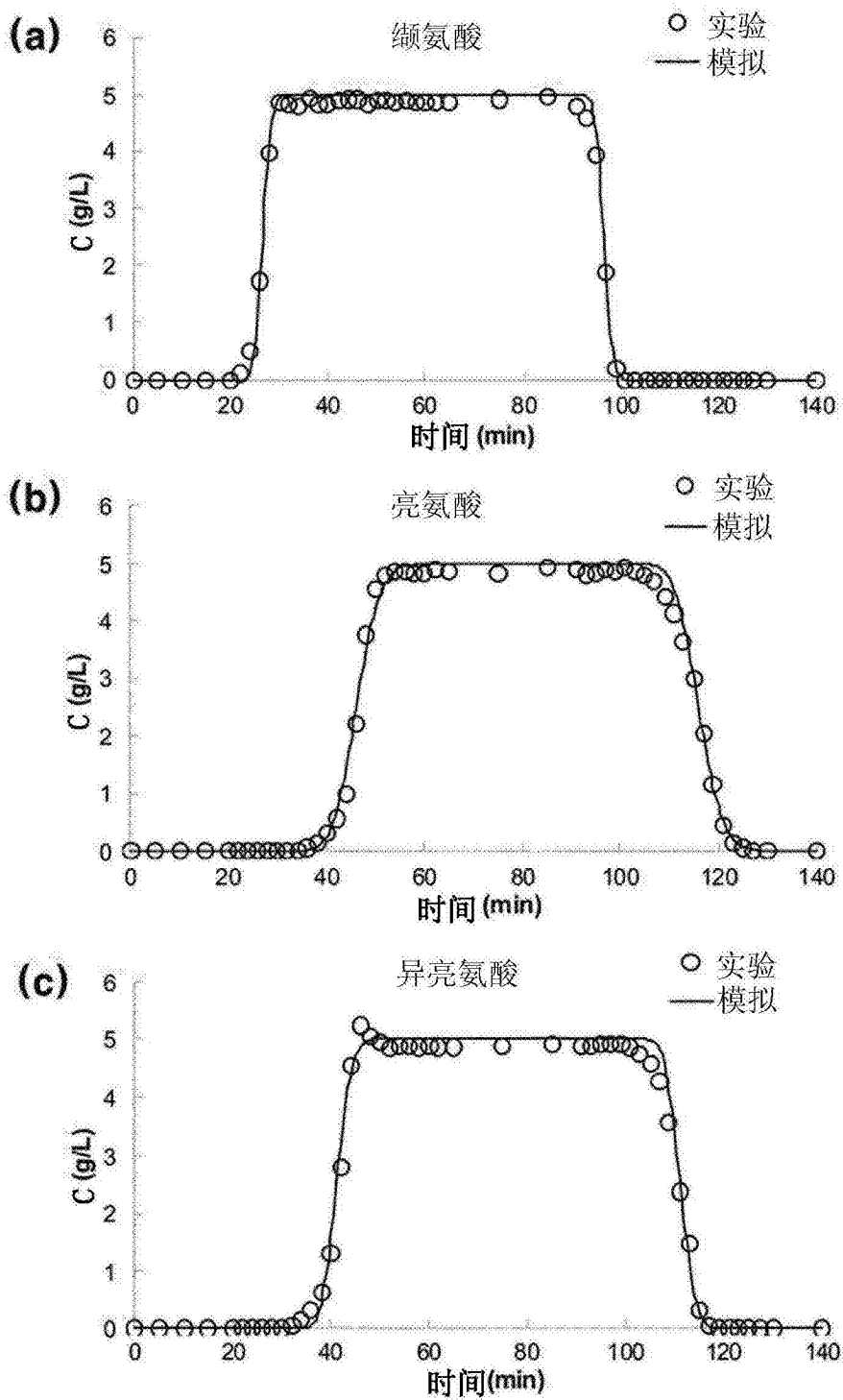


图8

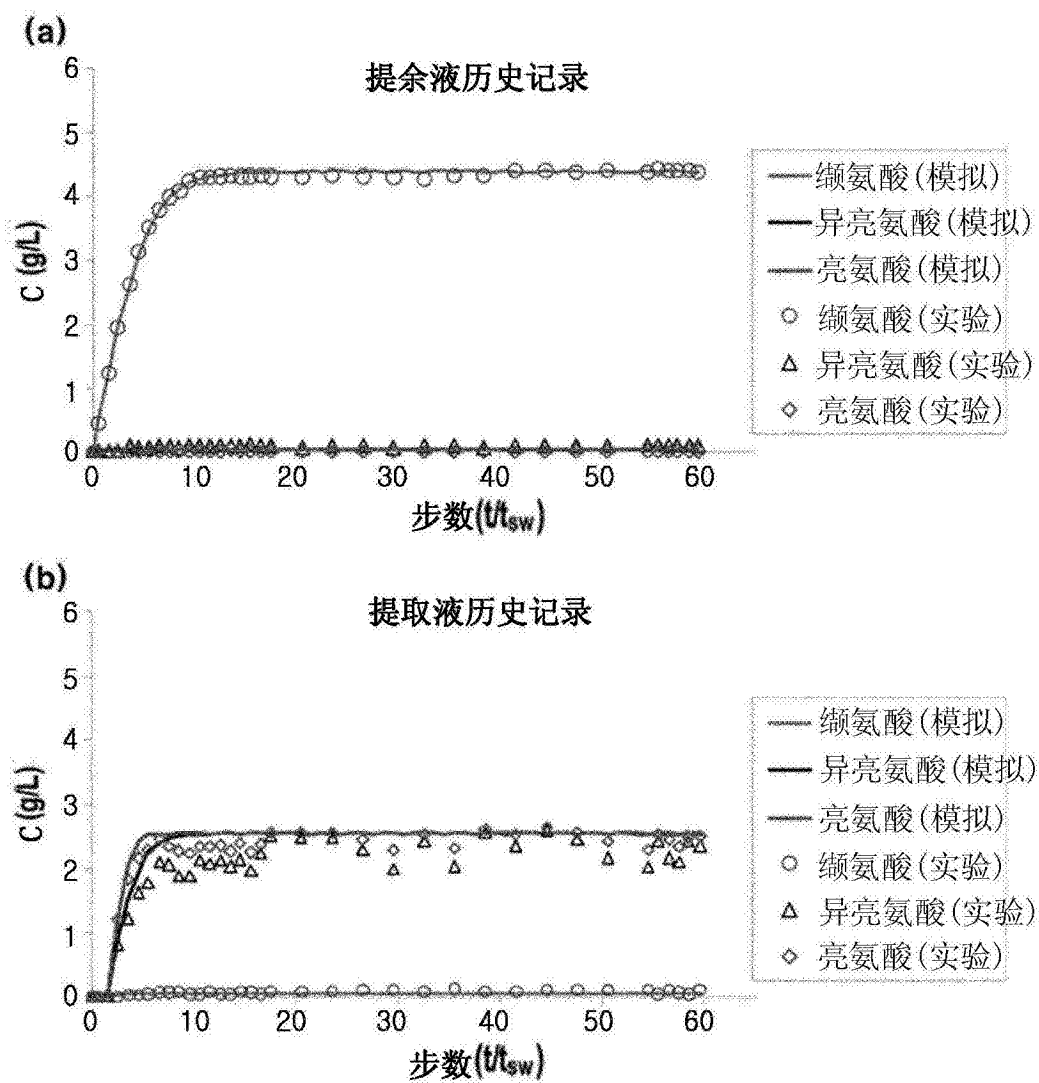


图9

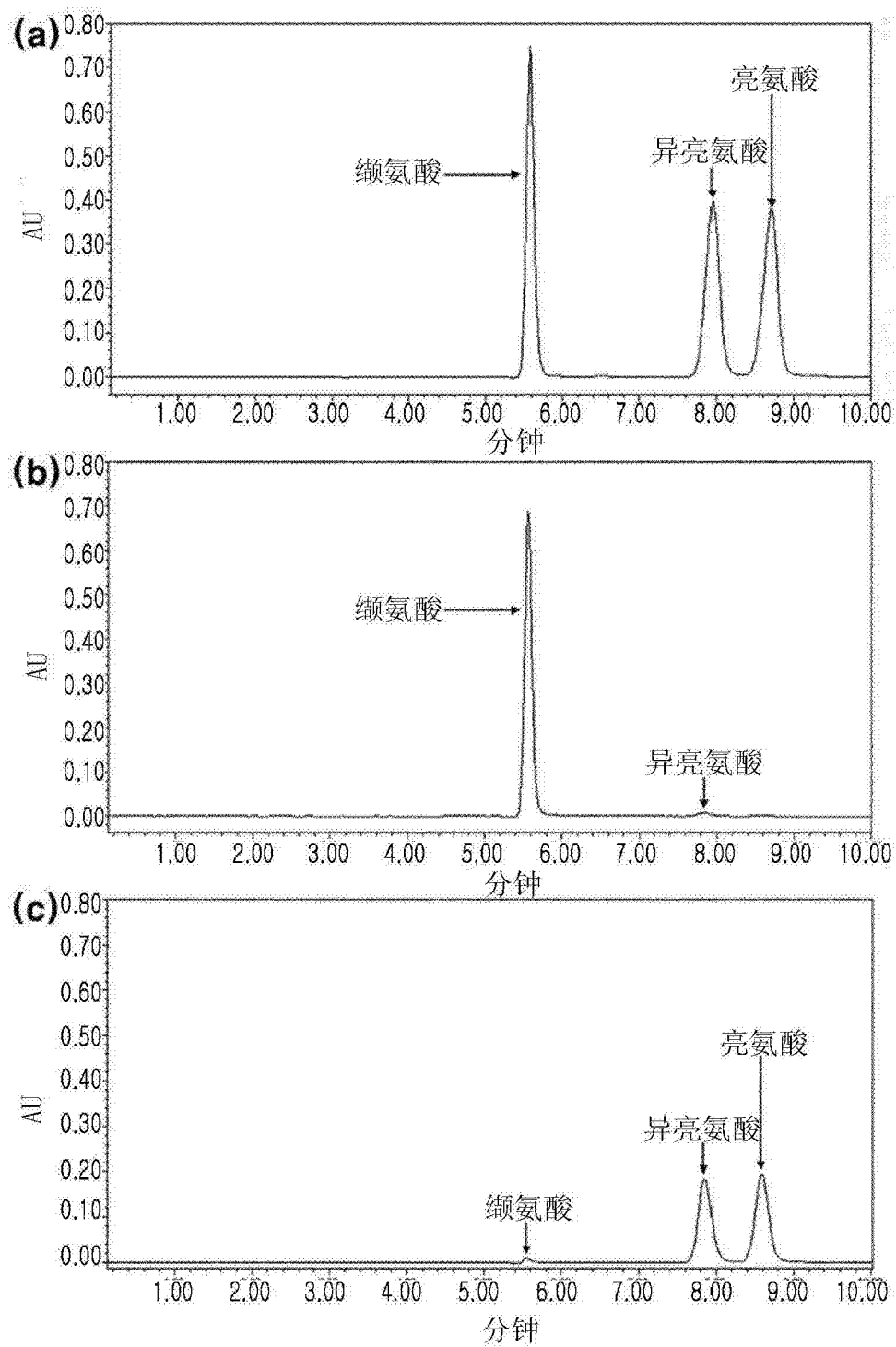


图10

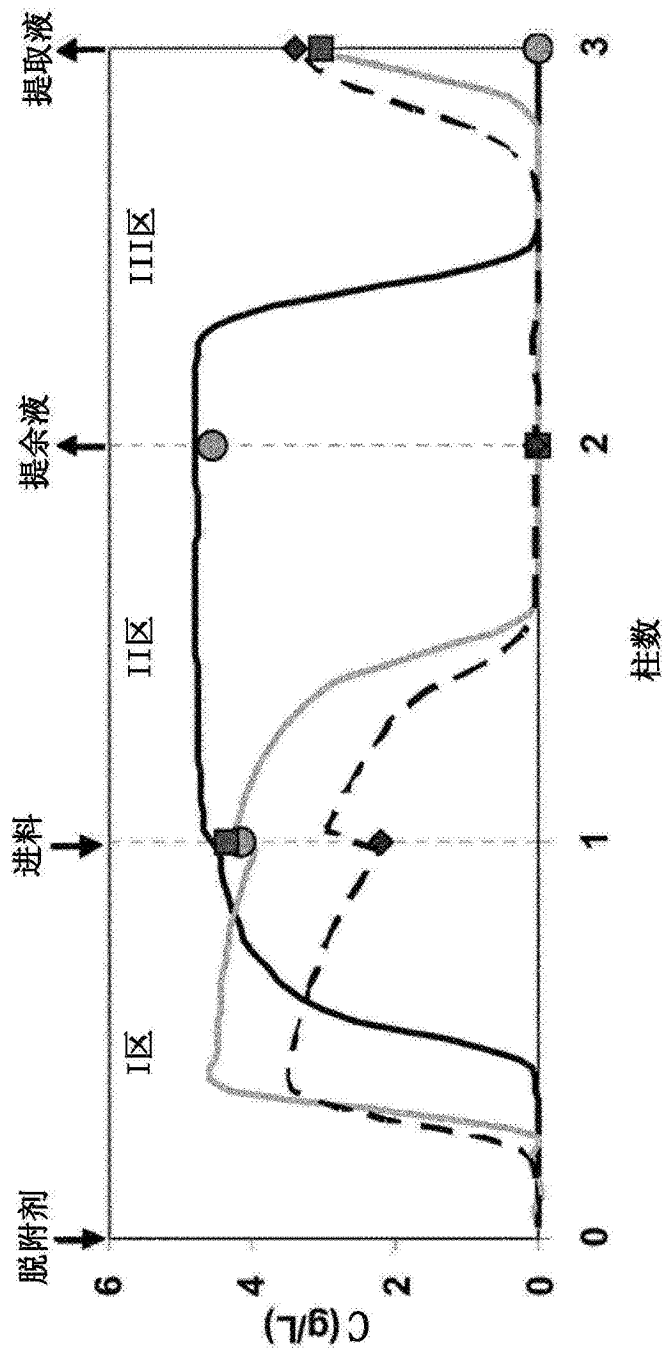


图11

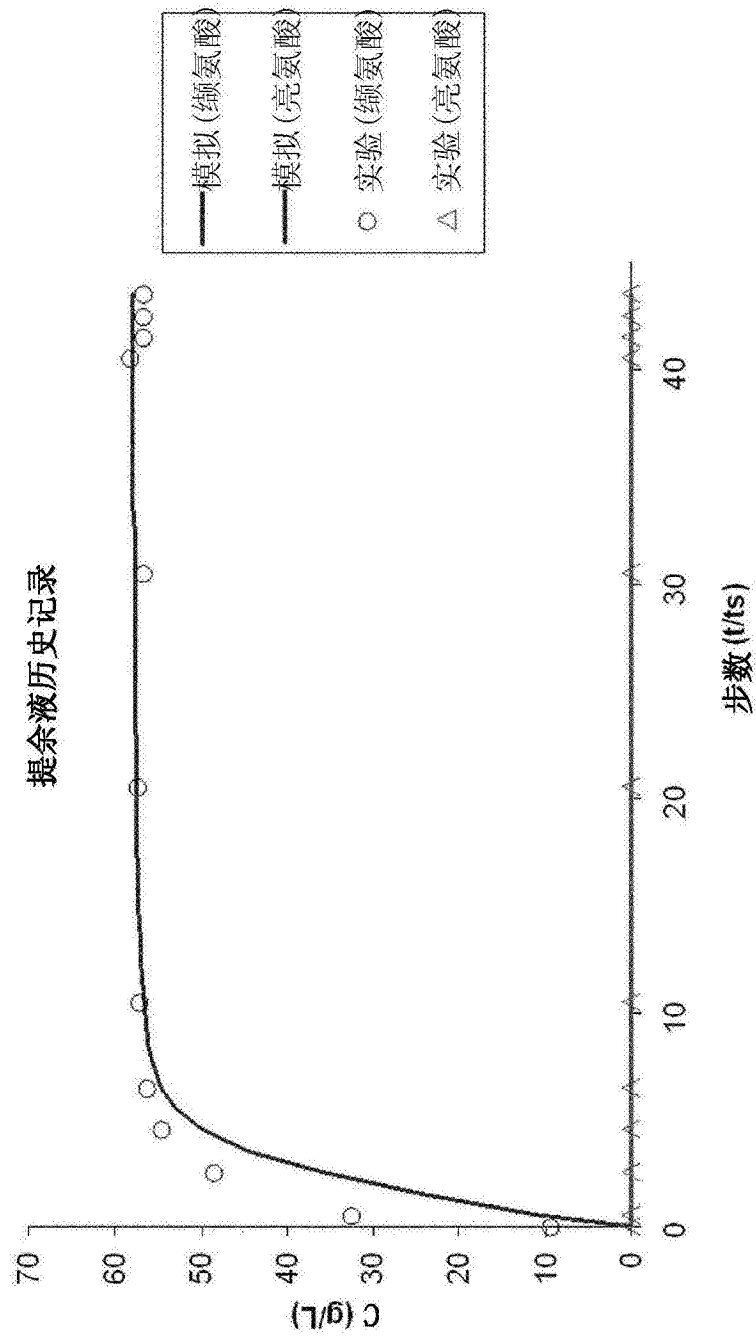


图12

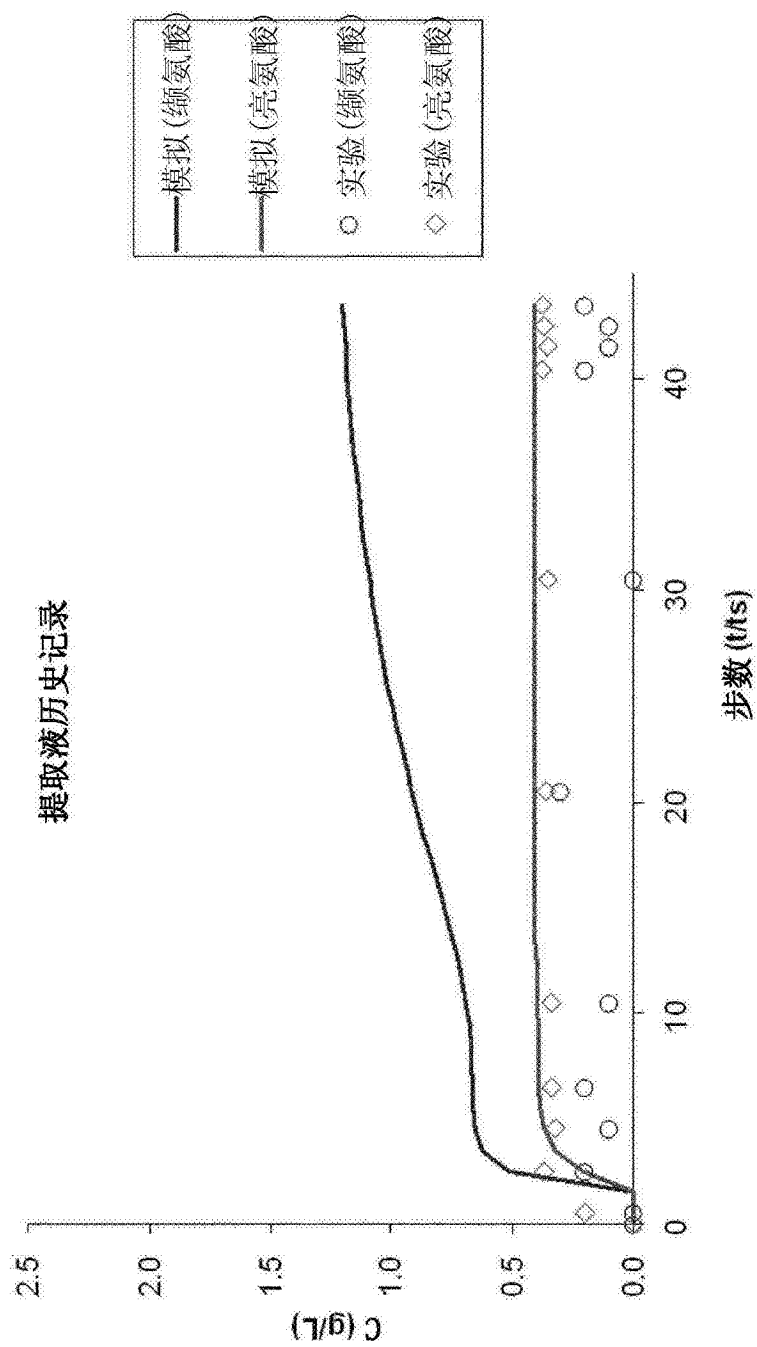


图13

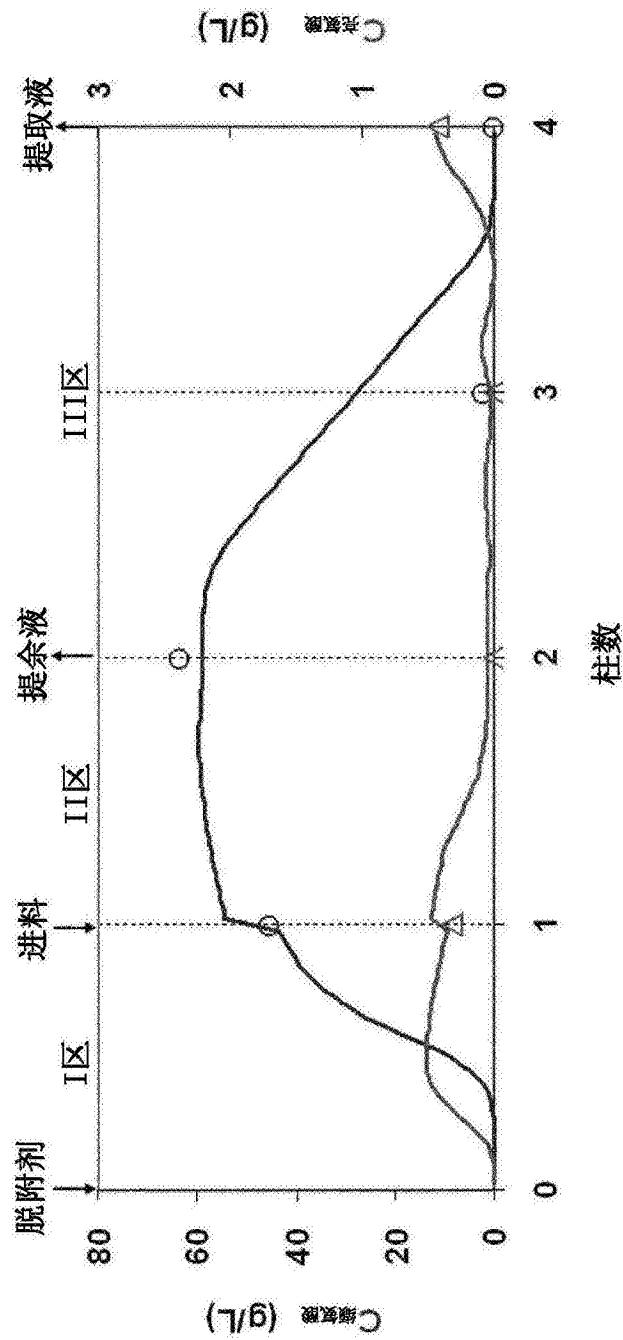


图14