

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 109/84

㉔ Anmeldungsdatum: 10.01.1984

㉔ Patent erteilt: 27.02.1987

④⑤ Patentschrift  
veröffentlicht: 27.02.1987㉔ Inhaber:  
Mitsui Toatsu Chemicals, Incorporated,  
Chiyoda-ku/Tokyo (JP)㉔ Erfinder:  
Ohoka, Masaharu, Mobara-shi/Chiba-ken (JP)  
Yoshikawa, Yukihiro, Zushi-shi/Kanagawa-ken  
(JP)  
Kawashima, Nobuyuki,  
Kamakura-shi/Kanagawa-ken (JP)  
Kawashima, Nobuhiro,  
Sagamihara-shi/Kanagawa-ken (JP)  
Nagai, Syosuke, Yokohama-shi/Kanagawa-ken  
(JP)  
Takano, Takao, Fujisawa-shi/Kanagawa-ken (JP)㉔ Vertreter:  
Bovard AG, Bern 25⑤④ **Verfahren zur Abtrennung von L-Tryptophan.**

⑤⑦ Wenn eine L-Tryptophan enthaltende Reaktionsmischung, die durch eine Reaktion unter Verwendung eines Mikroorganismus erhalten wurde, mit einer Mineralsäure auf einen pH-Wert 2 - 5 eingestellt und dann erwärmt wird, wird der in der Reaktionsmischung enthaltende Mikroorganismus ausgeflockt. Der ausgeflockte Mikroorganismus wird entfernt, entweder durch (I) Filtration der Reaktionsmischung, oder durch (II) Zugabe eines Alkalis zur Reaktionsmischung, zur Überführung des L-Tryptophans in sein Alkalisalz, und anschliessender Filtration der Mischung. Das L-Tryptophan kann aus dem Filtrat in grosser Reinheit enthalten werden.

# PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Abtrennung von L-Tryptophan aus einer Reaktionsmischung, die L-Tryptophan und einen Mikroorganismus enthält, welche während der Herstellung des L-Tryptophans unter Verwendung des Mikroorganismus erhalten wurde, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Reaktionsmischung durch eine Mineralsäure auf 2–5 eingestellt wird, die Reaktionsmischung erwärmt wird und anschliessend die erwärmte Reaktionsmischung filtriert wird, um den Mikroorganismus zu entfernen.

2. Verfahren zur Abtrennung von L-Tryptophan aus einer Reaktionsmischung, die L-Tryptophan und einen Mikroorganismus enthält, welche während der Herstellung des L-Tryptophans unter Verwendung des Mikroorganismus erhalten wurde, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Reaktionsmischung mit einer Mineralsäure auf 2–5 eingestellt wird, die Reaktionsmischung erwärmt wird und Alkali zur erwärmten Reaktionsmischung gegeben wird, um das enthaltende L-Tryptophan in sein Alkalimetallsalz überzuführen und anschliessend die Reaktionsmischung filtriert wird, um den Mikroorganismus zu entfernen.

Diese Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Isolierung von L-Tryptophan aus einer Reaktionsmischung, die L-Tryptophan und einen Mikroorganismus enthält, die während der Produktion von L-Tryptophan unter Verwendung des Mikroorganismus erhalten wurde.

In Reaktionen, in welchen Mikroorganismen verwendet werden, ist es nötig, die Mikroorganismen aus den Reaktionsprodukten zu entfernen. Einige Methoden für die Entfernung von Mikroorganismen aus den Reaktionsmischungen und zur Isolierung der Reaktionsprodukte sind aus der Vergangenheit bekannt. Z.B. beschreibt die JP-A-16460/1963 ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass ein oberflächenaktives Agens zu einer L-Glutaminsäure-Fermentationsbrühe gegeben wird, die Mischung erwärmt wird, wobei der Mikroorganismus ausgeflockt und sedimentiert wird, und dass er durch Filtration mit Diatomeenerde abgetrennt wird; und die offengelegte JP-A-29996/1978 beschreibt ein Verfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Reaktionsmischung wie eine Aminosäure-Fermentationsbrühe, auf einer Ultrafiltrationsmembrane filtriert wird und anschliessend das Produkt durch Kristallisation isoliert wird.

Diese Verfahren haben sich jedoch für die industrielle Praxis noch nicht als vollständig befriedigend erwiesen, da im Verfahren, welches die Zugabe des oberflächenaktiven Mittels einschliesst, der Mikroorganismus leicht entfernt werden kann, das oberflächenaktive Mittel jedoch nicht leicht abgetrennt werden kann und dieses wahrscheinlich im Reaktionsprodukt bleibt, und das Verfahren, welches die Verwendung der Ultrafiltrationsmembrane einschliesst, Schwierigkeiten bereitet, bezüglich des Waschens des verwendeten Apparates wegen seiner Natur.

Es ist somit Aufgabe dieser Erfindung, ein Verfahren zur Isolierung von L-Tryptophan aus einer Reaktionsmischung, die während der Herstellung von L-Tryptophan unter Verwendung eines Mikroorganismus erhalten wurde, welches eine wirkungsvolle Entfernung des Mikroorganismus aus der Reaktionsmischung umfasst, zur Verfügung zu stellen.

Es wurden ausgedehnte Forschungsarbeiten ausgeführt, um diese Aufgabe zu lösen. Während es allgemein bekannt war, dass Tryptophan instabil ist, wenn in einer sauren Lösung erwärmt wird, haben diese Forschungsarbeiten zum überraschenden Ergebnis geführt, dass wenn eine Reaktions-

mischung, welche L-Tryptophan und einen Mikroorganismus enthält, auf einen pH-Wert 2–5 mittels Mineralsäure eingestellt wird und anschliessend erwärmt wird, das L-Tryptophan stabil wird, und dass der Mikroorganismus modifiziert wird und in einer solchen Grösse ausgeflockt wird, dass er leicht abfiltriert werden kann.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit die in den Ansprüchen 1 und 2 definierten Verfahren zur Isolierung von L-Tryptophan aus einer Reaktionsmischung, welche L-Tryptophan und einen Mikroorganismus enthält.

Beispiele der «Reaktionsmischung, welche L-Tryptophan und einen Mikroorganismus enthält, welche während der Erzeugung von L-Tryptophan unter Verwendung des Mikroorganismus erhalten worden ist» (nachstehend oft der Einfachheit halber als «Reaktionsmischung» bezeichnet) gemäss der vorliegenden Erfindung, sind Reaktionsmischungen, welche durch Umsetzung von L-Serin und Indol in Gegenwart von *Escherichia coli* erhalten werden; eine Reaktionsmischung, erhalten gemäss obenstehendem Verfahren unter Verwendung von DL-Serin anstelle von L-Serin und *Pseudomonas putida* (MT-10182) oder *Pseudomonas punctata* (MT-10243) alle zusammen mit *Escherichia coli* als Serin-Racemase; eine Reaktionsmischung, erhalten durch Verwendung von Anthranilsäure als Vorgänger, in Gegenwart von *Bacillus subtilis*; und eine Reaktionsmischung, erhalten unter Verwendung von Indol, Brenztraubensäure und Ammoniak in Gegenwart von *Aerobacter aerogenes*.

Diese L-Tryptophan enthaltenden Reaktionsmischungen enthalten die verwendeten Mikroorganismen in gelöstem oder suspendiertem Zustand. Da es nach dem Stand der Technik sehr schwierig war, die Mikroorganismen von L-Tryptophan abzutrennen, waren die Kosten des Reinigungsschrittes in der industriellen Praxis sehr hoch.

Wenn die Reaktionsmischung ein mit Wasser unmischbares organisches Lösungsmittel enthält, ist es wünschenswert, dass das organische Lösungsmittel vor Anwendung des erfindungsgemässen Verfahrens durch zweckmässige Mittel, wie Flüssigtrennung oder Destillation, entfernt wird.

Wenn die Reaktionsmischung unter neutralen oder alkalischen Bedingungen erwärmt wird, kann der Mikroorganismus in der Reaktionsmischung nicht in einem filtrierbaren Zustand ausgeflockt werden. Wenn die Reaktionsmischung hingegen auf einen pH-Wert 2–5 mittels einer Mineralsäure eingestellt wird und anschliessend in Übereinstimmung mit dem erfindungsgemässen Verfahren erwärmt wird, flockt der Mikroorganismus sehr leicht aus. Unerwarteterweise wird L-Tryptophan gleichzeitig nicht zersetzt und der ausgeflockte Mikroorganismus kann durch Filtration entfernt werden. Wenn nach der oben erwähnten Ausflockung des Mikroorganismus Alkali zur Reaktionsmischung zugegeben wird, um L-Tryptophan aufzulösen, bleibt der ausgeflockte Mikroorganismus in filtrierbarem Zustand. Demzufolge ist das erfindungsgemässe Verfahren ein industrielles Verfahren, welches die wirkungsvolle Abtrennung des L-Tryptophans, das durch die Verwendung eines Mikroorganismus erzeugt worden ist, aus der Reaktionsmischung erlaubt.

Beispiele von Mineralsäuren, die im erfindungsgemässen Verfahren Verwendung finden sind Schwefelsäure, Salzsäure und Phosphorsäure. Der pH-Wert der L-Tryptophan enthaltenden Reaktionsmischung wird auf 2–5, vorzugsweise auf 3–4, eingestellt, mit einer solchen Mineralsäure. Die Reaktionsmischung mit dem eingestellten pH-Wert wird dann auf eine Temperatur von 60–120 °C, vorzugsweise 80–105 °C, erwärmt. Bei dieser pH-Wert-Einstellung und Hitzebehandlung wird der Mikroorganismus modifiziert und ausgeflockt zu einer Grösse, sodass er leicht abfiltriert werden kann, während L-Tryptophan stabil bleibt ohne eine Veränderung.

Die Zeit der Hitzebehandlung wird somit nicht speziell eingeschränkt und die Hitzebehandlung kann nach derjenigen Zeitdauer beendet werden, in welcher der Mikroorganismus in passendem Zustand ausgeflockt ist.

Es kann ein Alkohol zugegeben werden als Lösungsmittel, um die Auflösung von L-Tryptophan in der Reaktionsmischung zu fördern. Niedere Alkohole, wie Methanol, Ethanol und Isopropanol, sind bevorzugt, während der Alkohol Isopropanol besonders bevorzugt wird. Der Alkohol kann in einer solchen Menge verwendet werden, dass seine Konzentration in der Reaktionsmischung nicht höher als 70 Gew.-%, vorzugsweise 40–60 Gew.-% beträgt. Wenn die Reaktionsmischung ein mit Wasser unlösliches organisches Lösungsmittel enthält, wird ein vorbestimmter Anteil des Alkohols zugegeben, nach der Entfernung des mit Wasser unlöslichen organischen Lösungsmittels.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens wird nach der vorhergenannten pH-Wert-Einstellung und Hitzebehandlung der ausgeflockte Mikroorganismus durch Filtration abgetrennt, um eine wässrige Lösung von L-Tryptophan zu erhalten. Um den Anteil des erhaltenen L-Tryptophans zu erhöhen, wird diese Operation durchgeführt, wenn das L-Tryptophan in der Reaktionsmischung in vollständig gelöstem Zustand vorliegt, nämlich, wenn die Konzentration von L-Tryptophan in der Reaktionsmischung unter ihrer Löslichkeit liegt. Üblicherweise ist es somit erforderlich, die Reaktionsmischung ausgiebig mit Wasser zu verdünnen und anschliessend zu filtrieren. Vom Gesichtspunkt der Operationswirksamkeit her wird die Heissfiltrierung unmittelbar nach der pH-Wert-Einstellung und Hitzebehandlung bevorzugt. Bei der Durchführung der Filtration wird Aktivkohle oder Siliciumdioxid-Filterhilfe oder beide davon verwendet.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens, als weiteres Verfahren zur Erhöhung des gewonnenen L-Tryptophananteils, wird ein Alkali zur Reaktionsmischung nach der Einstellung seines pH-Wertes und seiner Erwärmung zur Ausflockung des Mikroorganismus, zugegeben. Somit ist das L-Tryptophan im wesentlichen vollständig als Alkalisalz gelöst und anschliessend wird die Reaktionsmischung filtriert, um eine wässrige Lösung von L-Tryptophan zu erhalten. Nach dem Verfahren dieser Ausführungsform ist die Filtration oder Verdünnung wie in der vorhergehenden Ausführungsform nicht erforderlich, und Kosten für Wärmeenergie können gespart werden, und es kann mit einer wässrigen Lösung mit einer höheren L-Tryptophan-Konzentration gearbeitet werden. Demzufolge ist diese Ausführungsform allgemein vorteilhaft für die industrielle Praxis.

Das Alkali, welches nach der Wärmebehandlung zur Reaktionsmischung mit dem eingestellten pH-Wert gegeben wird, kann jedes Alkali sein, welches ein wasserlösliches Salz mit L-Tryptophan bildet. Beispiele umfassen Ammoniak, Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Natriumhydrogencarbonat und Kaliumhydrogencarbonat. Industriell ist Ammoniak bevorzugt wegen seiner hohen Löslichkeit in wässriger Lösung und seiner leichten Gewinnung.

Der Anteil des Alkali ist üblicherweise derjenige, welcher notwendig ist, um die Reaktionsmischung zu neutralisieren und das L-Tryptophan, das in der Reaktionsmischung vorhanden ist, in sein Alkalisalz überzuführen. Es wurden keine ernsthaften Unannehmlichkeiten verursacht, sogar wenn das Alkali im Überschuss verwendet wurde. Wenn jedoch zur Entnahme der L-Tryptophan-Kristalle der pH-Wert mit einer Säure bis zum isoelektrischen Punkt eingestellt wird, wird eine Erhöhung der Ausbeute des isolierten L-Tryptophans erzielt; die Verwendung eines Überschusses von Alkali

ist unerwünscht, da der Anteil an anorganischen Salzen erhöht wird.

Vorzugsweise wird das Alkali zugegeben, nachdem die hitzebehandelte Reaktionsmischung auf 0–50 °C, vorzugsweise 5–20 °C, abgekühlt ist. Wenn das Alkali bei höheren Temperaturen beigelegt wird, kann das L-Tryptophan einer Zersetzung oder Racemisierung unterworfen werden.

Wenn gasförmiges Ammoniak als Alkali verwendet wird, wird vorzugsweise gekühltes Ammoniakgas in die Reaktionsmischung eingeblasen, um die Löslichkeit des Ammoniaks in der Reaktionsmischung zu erhöhen. Wenn eine anorganische Base wie Natriumhydroxid verwendet wird, verursacht seine Zugabe bei Zimmertemperatur die Bildung eines Alkalisalzes von L-Tryptophan, welches sehr schnell gelöst wird.

Wenn eine Aktivkohle- und/oder Siliciumdioxid-Filterhilfe zur Reaktionsmischung, die das Alkalisalz von L-Tryptophan enthält gegeben wird, und in Gegenwart der zugegebenen Filterhilfe filtriert wird, kann der Mikroorganismus leicht abgetrennt werden und eine wässrige Lösung des Alkalisalzes von L-Tryptophan kann erhalten werden.

L-Tryptophan kann gewonnen werden, indem die erhaltene wässrige Lösung des Alkalisalzes von L-Tryptophan einer üblichen Kristallisationsmethode, wie Neutralisation, unterworfen wird.

Die folgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung im einzelnen.

#### Beispiel 1

Eine Platinschlinge voll *Escherichia coli* wurde in 50 ml des Kulturmediums, welches die untenstehende Zusammensetzung (I) aufweist, inokuliert und während 20 h bei 30 °C kultiviert. 1 l der Kulturbrühe wurde zentrifugiert, die Zellen wurden gewonnen und als Quelle für die Tryptophan-Synthetase verwendet.

#### Zusammensetzung des Kulturmediums (I)

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Fleischextrakt                  | 1,0 Gew.-% |
| Pepton                          | 0,5 Gew.-% |
| Hefeextrakt                     | 0,1 Gew.-% |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,2 Gew.-% |
| urspr. pH-Wert                  | 7,0        |

Eine Platinschlinge mit *Pseudomonas putida* (IFO 12996) wurde in 50 ml Kulturbrühe mit der folgenden Zusammensetzung (II) inokuliert, und unter Schütteln bei 30 °C während 20 h kultiviert. 1 l der Kulturbrühe wurde zentrifugiert und die Zellen wurden gewonnen und als Quelle für die Serin-Racemase verwendet.

#### Zusammensetzung des Kulturmediums (II)

|                |            |
|----------------|------------|
| Fleischextrakt | 1,0 Gew.-% |
| Pepton         | 0,5 Gew.-% |
| NaCl           | 0,5 Gew.-% |
| urspr. pH-Wert | 7,0        |

Ein 300 ml Reaktionsgefäss, ausgerüstet mit einem Rührer, wurde mit 11,3 g DL-Serin, 6 g Ammoniumsulfat, 10 mg Pyridoxalphosphat und 66 g Wasser beschickt und es wurde gut gerührt. Zur erhaltenen wässrigen Lösung wurde wässriges konzentriertes Ammoniak zugegeben, um den pH-Wert auf 8,5 einzustellen. Dann wurden 6,8 g (Feststoffgehalt 1,7 g) eines nassen Cremekuchens von *Escherichia coli* und 3,4 g (Feststoffgehalt 0,85 g) eines nassen Cremekuchens von *Pseudomonas putida* im Wasser suspendiert, wobei eine Suspension mit einem Gesamtvolumen von 20 ml gebildet wurde. Die erhaltene Suspension wurde zur obigen wässrigen Lösung zugegeben. Nachdem die Mischung bei 35 °C ge-

halten wurde, wurden 57,2 g Toluol-Lösung, welche 11,5 g Indol enthielt, zugegeben und während 48 h bei 35 °C umgesetzt. Die Reaktionsausbeute war quantitativ.

Die Reaktionsmischung wurde destilliert, um das Toluol zu entfernen und Wasser wurde zugegeben bis das Gewicht der Mischung 450 g betrug. Der pH-Wert wurde mit Schwefelsäure auf 3,5 eingestellt und 3 g Aktivkohle wurden zugegeben. Die Mischung wurde auf 95–98 °C erwärmt und bei dieser Temperatur während 1 h belassen. Sie wurde bei gleicher Temperatur heissfiltriert, wobei das L-Tryptophan in gelöstem Zustand von der Aktivkohle und dem ausgeflockten Mikroorganismus abgetrennt wurde. Das Filtrat wurde konzentriert zu einer L-Tryptophan-Konzentration von 10 Gew.-%. Es wurde auf 20 °C gekühlt und die erhaltenen Kristalle wurden durch Filtration abgetrennt.

Die Kristalle von L-Tryptophan, die eine Reinheit von 99,5% hatten, wurden in einer Ausbeute von 80% auf Basis von Indol erhalten.

#### Beispiel 2

Die gleiche Reaktion wie in Beispiel 1 wurde durchgeführt in Wasser unter Verwendung von Zellen von *Escherichia coli* (MT-10232) und Zellen von *Pseudomonas punctata* (MT-10243) welche in gleicher Weise kultiviert wurden wie in Beispiel 1. Die Reaktion wurde unter Zentrifugation filtriert, um die ausgefallenen L-Tryptophan-Kristalle von den mikrobischen Zellen, die in der Reaktion verwendet wurden, abzutrennen.

Der Cremekuchen wurde in Wasser gegeben, wobei die Konzentration von L-Tryptophan auf 4,0 Gew.-% eingestellt wurde. Dann wurde der pH-Wert der Lösung mit Phosphorsäure auf 4,0 eingestellt. 2 g Aktivkohle und 2 g «Celite 545» (Warenname eines Produktes von Johns-Manville Corporation) wurde zugegeben und die Mischung wurde während 1 h auf 95–98 °C erwärmt. Sie wurde bei gleicher Temperatur heiss filtriert, um die Aktivkohle, das «Celite» und die ausgeflockten mikrobischen Zellen abzutrennen. Das Filtrat wurde auf eine L-Tryptophan-Konzentration von 15 Gew.-% eingeeengt, und auf 20 °C abgekühlt. Die ausgefallenen Kristalle wurden durch Filtration gewonnen.

Die Ausbeute des isolierten L-Tryptophans war 87% und seine Reinheit war 99,7%.

#### Beispiel 3

Der gleiche Cremekuchen, der aus L-Tryptophan und mikrobischen Zellen bestand, wie er in Beispiel 2 erhalten wurde, wurde in einer 1:1 (Volumen) Mischung von Wasser und Isopropanol suspendiert und die Konzentration von L-Tryptophan wurde auf 7 Gew.-% eingestellt. Zur Einstellung des pH-Wertes der Suspension auf 3,5 wurde konzentrierte Salzsäure zugegeben und die Mischung wurde während 1 h auf 80–84 °C erwärmt. Die Mischung wurde bei gleicher Temperatur heissfiltriert. Das Filtrat wurde auf 5 °C abgekühlt und die ausgefallenen Kristalle wurden durch Filtration gewonnen.

Die Ausbeute des isolierten L-Tryptophans war 75% und seine Reinheit war 98,5%.

#### Beispiel 4

Es wurde die gleiche Reaktion wie in Beispiel 1 durchgeführt. Nach der Entfernung des Toluols, wurde die Reaktionsmischung mit Wasser bis zu einer L-Tryptophan-Konzentration von 1 Gew.-% verdünnt. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wurde mit Schwefelsäure auf 4,0 eingestellt und sie wurde bei Zimmertemperatur während 2 h gerührt, um das L-Tryptophan aufzulösen. 3 g Aktivkohle und 3 g «Standard Supercell» (Warenname eines Produktes von Johns-Manville Corporation) wurden als Filterhilfe zugege-

ben, und die Lösung wurde bei Zimmertemperatur filtriert. Das Filtrat wurde auf eine L-Tryptophan-Konzentration und 10 Gew.-% konzentriert und dann auf 5 °C gekühlt. Die niedergeschlagenen Zellen wurden durch Filtration gewonnen.

Die Ausbeute des isolierten L-Tryptophans war 97% und seine Reinheit war 98,8%.

#### Beispiel 5

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurde Indol und DL-Serin in einer Toluol-Lösung umgesetzt. Die Reaktionsausbeute war quantitativ. Das Toluol wurde aus der Reaktionsmischung durch Destillation entfernt.

Die erhaltene L-Tryptophan enthaltende Reaktionsmischung wurde durch Schwefelsäure auf einen pH-Wert 4 eingestellt und auf 95–98 °C während 1 h erwärmt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurde Ammoniakgas in die Reaktionsmischung geblasen, um das L-Tryptophan darin als Ammoniumsalz aufzulösen. Es wurden 10 Gew.-% auf Basis von L-Tryptophan Aktivkohle und ebenfalls 10 Gew.-% auf Basis von L-Tryptophan «Celite 545» (Warenname für ein Produkt von Johns Manville Corporation) zur Lösung gegeben und die Lösung wurde filtriert. Der abgetrennte Mikroorganismus wurde zusammen mit «Celite 545» und der Aktivkohle abgetrennt. Das Filtrat wurde auf 100 °C erwärmt, um das Ammoniak zu entfernen, und die Konzentration des L-Tryptophans wurde auf 10 Gew.-% eingestellt, durch Zugabe von Wasser. Die Lösung wurde auf 20 °C gekühlt und die ausgefallenen Kristalle wurden durch Filtration abgetrennt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Die Ausbeute des isolierten L-Tryptophans war 75% auf Basis des erhaltenen Tryptophans und seine Reinheit, gemessen durch Flüssigchromatographie war 98,5%.

#### Beispiel 6

Die gleiche L-Tryptophan enthaltende Reaktionsmischung, wie erhalten in Beispiel 5, wurde zentrifugiert und eine Mischung von L-Tryptophan-Kristallen und den Mikroorganismen wurde als Cremekuchen erhalten. Der Cremekuchen wurde in Wasser gegeben, wobei eine Aufschlämmung mit einer L-Tryptophan-Konzentration von 30 Gew.-% erhalten wurde. Der pH-Wert der Aufschlämmung wurde auf 3,5 eingestellt, und sie wurde während 2 h auf 95–98 °C erwärmt, um die in der Reaktion verwendeten Mikroorganismen auszuflocken. Nach der Abkühlung auf Zimmertemperatur wurde wässriges Ammoniak zugegeben, um das L-Tryptophan in der Reaktionsmischung als Ammoniumsalz aufzulösen. Zur Lösung wurden 20 Gew.-% auf Basis des L-Tryptophans Aktivkohle zugegeben, und die ausgeflockten mikrobischen Zellen wurden bei Zimmertemperatur abgetrennt. Es wurde Stickstoffgas in das Filtrat eingeblasen bei erhöhter Temperatur, um das Ammoniak zu entfernen. Nach Abkühlung auf 5 °C wurde das ausgefällte L-Tryptophan mittels eines Zentrifugaldehydrators abgetrennt.

Die Ausbeute des isolierten L-Tryptophans war 88% auf Basis des erhaltenen Tryptophans, und seine Reinheit war 98,0%.

#### Beispiel 7

Eine wässrige Lösung mit 12 Gew.-% L-Tryptophan, die in gleicher Weise wie in Beispiel 5 erhalten wurde, wurde mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert 4,0 eingestellt und auf 95–98 °C erwärmt. Nach der Abkühlung auf 25 °C wurde eine 20%ige wässrige Lösung Natriumhydroxid zugegeben, um den pH-Wert der Lösung auf 10 einzustellen. Zur wässrigen L-Tryptophanlösung wurden 10 Gew.-%, auf Basis von Tryptophan, Aktivkohle und 10 Gew.-%, auf Basis von

Tryptophan, von «Standard Supercell» (Warenname eines Produktes von Johns Manville Corporation) als Filterhilfe zugegeben, und die Lösung wurde bei 20 °C filtriert. Das Filtrat wurde mit Essigsäure auf einen pH-Wert 6 neutralisiert, und die ausgefallenen Kristalle von L-Tryptophan wurden durch Filtration abgetrennt und getrocknet. Die Ausbeute des isolierten L-Tryptophans war 75%, auf Basis des erhaltenen Tryptophans und seine Reinheit war 99,2%.

#### Beispiel 8

Ein Cremekuchen von L-Tryptophan, in gleicher Weise erhalten wie in Beispiel 5, wurde in einer 1:1 (Volumen) Mischung von Wasser und Isopropanol dispergiert, um eine Aufschlammung zu bilden mit einer L-Tryptophan-Konzentration von 20 Gew.-%. Die Aufschlammung wurde auf ei-

nen pH-Wert 3,5 mittels Schwefelsäure eingestellt und sie wurde auf 80–84 °C während 2 h erwärmt. Nach der Abkühlung auf 5 °C wurde Ammoniakgas in die Reaktionsmischung geblasen, um das L-Tryptophan im Lösungsmittel als Ammoniumsalz aufzulösen. Zur Lösung wurden 20 Gew.-%, auf Basis von Tryptophan, Aktivkohle zugegeben, und die Lösung wurde abgenutscht, wobei eine schwachgelbe klare L-Tryptophanlösung erhalten wurde. Es wurde unter Erwärmung Stickstoffgas in die Lösung eingeblasen, um das Ammoniak zu entfernen. Die Lösung wurde abgekühlt und die ausgefallenen L-Tryptophan-Kristalle wurden durch Filtration abgetrennt und getrocknet.

Die Ausbeute des isolierten L-Tryptophans war 83%, auf Basis des erhaltenen Tryptophans und seine Reinheit war 98,8%.