

0.10128

402781



PATENTE DE INVENCION

Int. Cl.: C07D // A23J

402781

SECCION TECNICA  
CLASIFICACION I. P. C.  
CLASE \_\_\_\_\_  
SUBCLASE \_\_\_\_\_

MEMORIA DESCRIPTIVA

---

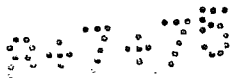
sobre:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION ENZIMATICA DE L-TRIPTOFANO"

---

Solicitante: SNAM PROGETTI S.p.A.,  
entidad italiana, establecida en  
MILAN (Italia), Corso Venezia, 16.

-----  
Prioridad: Solicitud de Patente Nº 23547 A/71,  
depositada en Italia en  
23 de Abril de 1971.  
-----



# 402781

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación enzimática de L-triptófano.

Es ya sabido que este aminoácido es muy importante en la industria de los alimentos dietéticos, como aditivo de forrajes y en el enriquecimiento de alimentos con baja cantidad de proteínas (harina de patata y, en general, hidratos de carbono).

Es también sabido que existen algunos métodos químicos y de fermentación para la producción del mismo.

10 Sin embargo, los métodos químicos son de limitada importancia desde el punto de vista industrial debido a los bajos rendimientos, a las materias primas de elevado coste y a la formación racémica con sus consiguientes complicaciones, y los métodos de fermentación, aunque frecuentemente utilizados, 15 no están exentos de considerables inconvenientes.

La selección de un microorganismo que sea buen productor del aminoácido es muy difícil y de prolongada duración, con la incertidumbre inherente siempre a una selección.

El microorganismo tiene que crecer adecuadamente en presencia de altas concentraciones de compuestos iniciadores 20 tales como ácido antranílico o indol y no debe ser obstaculizado por el triptófano que se vaya acumulando.

Se ha descubierto ahora un procedimiento para la preparación de L-triptófano que elimina los inconvenientes de la 25 fermentación.

El procedimiento según la presente invención consiste en poner en contacto indol y serina con estructuras filamentosas

402781

19



que lleven englobado en ellas un complejo enzimático capaz de sintetizar el triptófano.

El procedimiento según la invención puede utilizarse también para dotar de una cantidad de triptófano a compuestos  
5 hidrolizados de proteínas que no lo posean: es suficiente corregir el valor pH al valor más apropiado, añadir a dichos compuestos la cantidad necesaria de indol y ponerlos en contacto con la fibra enzimática.

Como consecuencia, una parte de la serina presente se  
10 transformará en triptófano.

De esta manera se puede recuperar fácilmente la enzima englobada al final de la reacción y se la puede reutilizar un número ilimitado de veces.

Las estructuras filamentosas susceptibles de ser empleadas  
15 en este procedimiento, así como el método para englobar las enzimas, corresponden a lo descrito en la Patente de Invención Nº 369.125, de acuerdo con la cual las fibras o filamentos en los que quedan englobadas las enzimas pueden obtenerse a partir de soluciones de polímeros capaces de producir fibras  
20 o filamentos, en los que los compuestos enzimáticos están dispersos bajo la forma de gotitas muy pequeñas del orden de magnitud de las emulsiones.

La emulsión así obtenida se puede hilar en solución o en seco para producir un filamento provisto en su interior de  
25 diminutos huecos en los que se alojan las enzimas, que quedan así separadas por una membrana muy fina del ambiente de la reacción, la cual impide que la enzima pueda salir y disper-



sarse en la masa de la reacción pero permite que la enzima pueda ejercer su actividad catalítica.

Entre los polímeros capaces de englobar a las enzimas pueden mencionarse los polímeros celulósicos esterificados, los nitratos, las poliolefinas, los polímeros y copolímeros obtenidos a partir del acrilonitrilo, los acrilatos, los metacrilatos, los ésteres de vinilo, el cloruro de vinilo, el cloruro de vinilideno, el estireno, las poliamidas, el butiral polivinilo y similares.

10 La enzima apropiada para acoplar la serina con el indol puede prepararse a partir de varias fuentes de microbios: E. Coli, Claviceps, Neurospora, B. Subtilis, Sacaromices, etc.

Los mejores resultados se han obtenido empleando triacetato de celulosa y la enzima de E. Coli.

15 La enzima englobada presenta una duración considerable: la actividad de la misma se ha controlado bajo condiciones de trabajo durante seis meses sin que se observara disminución alguna.

20 Este hecho reduce considerablemente, o convierte en insignificante, el coste de la preparación catalítica con respecto a la totalidad del coste del proceso. Ello permite el uso de compuestos enzimáticos muy puros que son además muy activos.

25 La enzima englobada no se difunde en la mezcla de la reacción. Por consiguiente no se presenta problema alguno de pérdidas y la solución final de triptófano no contiene

402781



impureza alguna que haga difícil la extracción, tal como ocurre en el caso de la fermentación; en efecto, en esta última se producen cantidades relativamente altas de algunos otros aminoácidos, particularmente de alanina y valina, y además están presentes también todas las impurezas de un medio de cultivo. La enzima utiliza únicamente la forma L de la serina, por lo cual se puede utilizar serina D, L en la mezcla de la reacción.

La serina D no utilizada puede ser recuperada con buenos rendimientos, transformada a la forma racémica por vía química y seguidamente reciclada.

El procedimiento según la invención no requiere trabajo alguno de selección y preservación de los microorganismos necesarios para una producción microbiológica de L-triptófano ni tampoco empleo alguno de elementos nutritivos que constituyan el medio de cultivo. Otra gran ventaja del procedimiento según la invención consiste en la posibilidad de un trabajo continuo, lo cual simplifica notablemente la instalación y disminuye el costo del procedimiento.

La fermentación requiere necesariamente una instalación relativamente compleja que asegure el agitación, la aireación y la esterilización de la masa, y ciertos controles de las variables físicas del procedimiento propiamente dicho.

Trabajando de acuerdo con el procedimiento de la invención es suficiente utilizar una o varias columnas de acero o de material plástico, así como una bomba.

También es posible trabajar en proceso discontinuo ha-

402781



ciendo entrar en contacto durante el tiempo necesario al  
substrato y a la enzima, extrayendo el producto, y alimen-  
tando un nuevo substrato a las mismas fibras enzimáticas  
que pueden utilizarse así durante un número ilimitado de  
5 ciclos de trabajo.

Cuando se trabaja en proceso continuo, se puede efec-  
tuar por una parte la reacción catalizada por las fibras  
enzimáticas, y se puede extraer por otra parte el L-triptófano  
producido, mediante métodos ya conocidos, como por ejemplo  
10 por absorción sobre carbono activo, sobre resina de inter-  
cambio de iones o mediante una simple cristalización cuando  
se alcanzan las condiciones de saturación.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la  
invención, de forma no limitativa.

15 Ejemplo 1

Se utilizaron 70 g de células de E. Coli, cultivadas en  
un medio mínimo de Davis. A estas células se añadieron pe-  
queñas cantidades de indol en 140 ml de reactivo compensador  
de fosfato ( $10^{-2}$  M EDTA,  $10^{-4}$  M fosfato de piridoxal, pH = 7,8).

20 La suspensión se sometió a un tratamiento ultrasónico y a una  
subsiguiente centrifugación.

El recipiente se calentó a  $53^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos y fue  
nuevamente centrifugado. Las proteínas, precipitadas a  $0^{\circ}\text{C}$   
en sulfato amónico y con un grado de saturación entre 0,30  
25 y 0,50, se disolvieron en un reactivo compensador de fosfato  
( $10^{-2}$  M EDTA,  $2 \times 10^{-2}$  M, DL serina,  $4 \times 10^{-4}$  M fosfato de piri-  
doxal, 30 % en volumen de glicerina).



402781

La solución obtenida contenía 32 mg de proteínas por ml y 110 unidades capaces de sintetizar el triptófano por cada mg de proteína (1 unidad es la cantidad de enzima que, a 25°C y en 30 minutos, cataliza la formación de 0,1 mmoles de L-triptófano).

Por separado se disolvieron bajo agitación 20 g de triacetato de celulosa (Fluka A.G., Chemische Fabrik CH-9470 Buchs Suiza) en 265 g de cloruro de metileno (Carlo Erba S.p.A., via Imbonati 24, Milano).

A esta solución de polímero se añadieron 30 ml de la solución enzimática.

La emulsión de las dos fases se efectuó mediante fuerte agitación a 0°C y durante 30 minutos.

La emulsión se introdujo en un pequeño crisol, mantenido a 0°C, y se hiló bajo presión de nitrógeno, siendo a continuación coagulada en tolueno a la temperatura ambiente. El filamento se secó en vacío para extraer el tolueno.

Se preparó un reactor cilíndrico de 2 litros, sumergido en agua a 25°C y sometido a rotación alrededor de su propio eje. En dicho reactor se introdujeron 10 g del filamento enzimático y 1 litro de la mezcla de reacción, estando constituida dicha mezcla de reacción por 20 mg/ml de DL-serina, 2 mg/ml de fosfato de piridoxal, en un reactivo compensador de fosfato de 0,01 M, y con un valor pH = 7,8.

Debido a su reducida solubilidad el indol se añadió gradualmente en estado sólido.

La fibra enzimática se mantuvo en contacto con la mezcla



de reacción durante ocho horas, después de lo cual se extrajo el líquido y se substituyó por una nueva mezcla de reacción; utilizando la misma fibra se efectuaron varios ciclos de trabajo.

5        La cantidad de L-triptófano en la mezcla de reacción al final de un ciclo resultó ser de 7,9 g.

Después de 150 ciclos de utilización, las cantidades de L-triptófano producidas en cada ciclo eran prácticamente constantes y equivalentes a 7,7 g.

10    Ejemplo 2

Se preparó un filamento de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 1, utilizando 20 g de triacetato de celulosa y 40 ml de una mezcla de agua y glicerina conteniendo 90 mg/ml de proteínas y con una actividad específica de 110 unidades  
15 por mg.

Se obtuvo un filamento conteniendo 180 mg de proteínas y 19.800 unidades por gramo de triacetato de celulosa.

Utilizando el mismo reactor del ejemplo 1, se mantuvieron 10 g de dicho filamento en contacto, a la temperatura de  
20 25°C y bajo agitación, con 1 litro de mezcla de reacción de composición análoga a la del ejemplo 1.

Después de ocho horas se formaron 15 g de L-triptófano en dicha solución.

El triptófano producido y la serina no transformada  
25 fueron adsorbidos sobre una resina de intercambio de iones y eluidos separadamente mediante variación del valor pH.

De esta forma se pudieron recuperar el 98 % del

402781



L-triptófano y el 90 % de la serina residual.

La serina recuperada fue transformada a la forma racémica mediante métodos químicos y se utilizó nuevamente para la síntesis de L-triptófano según el procedimiento descrito.

5 Ejemplo 3

Se utilizó un aparato constituido por una columna de vidrio, de un diámetro interior de 4 cm y de una longitud de 50 cm, provista de un termostato. Las vías de entrada y de salida se conectaron con un reactor provisto de un agitador.

10 En la línea de entrada se dispuso una bomba peristáltica de caudal variable comprendido entre 0 y 1000 ml/minuto.

En dicha columna se introdujeron 10 g del mismo filamento utilizado en el ejemplo 2. Seguidamente, con un caudal de 600 ml/minuto, se hicieron pasar por la misma 2 litros de  
15 mezcla de reacción, de composición equivalente a la de los ejemplos 1 y 2.

El indol se añadió gradualmente al reactor mantenido en continua agitación. Después de ocho horas de agitación, cuando la concentración del triptófano en la mezcla de reac-  
20 ción era de 8 mg/ml, se extrajo 1 litro de esta mezcla y se sustituyó por 1 litro de mezcla de reacción fresca. La solución extraída del sistema se sometió a una concentración bajo vacío, con objeto de hacer precipitar una fracción del triptó-  
fano presente. La solución, liberada de una parte del triptó-  
25 fano, fue reciclada con el fin de obtener gradualmente la transformación completa de la L-serina. La solución de D-serina residual se recuperó y se sometió a un tratamiento



químico para que resultase transformada a la forma racémica y pudiese volver a ser utilizada. De esta manera fue posible convertir aproximadamente el 80 % de serina racémica en L-triptófano.

5 Ejemplo 4

Se utilizó un compuesto hidrolizado de proteínas obtenido de caseína y de sangre de buey (50:50 en peso) y conteniendo 5,4 partes en peso de L-serina.

10 100 g de dicho compuesto hidrolizado se disolvieron en 500 ml de un reactivo compensador de fosfato de 0,01 M y el valor pH se corrigió a 7,8.

La solución obtenida se hizo pasar, después de la adición de 2 mg de fosfato de piridoxal, por la columna descrita en el ejemplo 3, regulada termostáticamente a 25°C, hasta  
15 obtener una conversión de un 20 % de la L-serina presente en el L-triptófano.

Finalmente se analizó la solución mediante un analizador automático de aminoácidos y la cantidad resultante de L-triptófano fue de 4 mg/ml.

20 Ejemplo 5

En el dibujo adjunto se ilustra un esquema simplificado del proceso continuo para la síntesis enzimática de L-triptófano, a partir de indol y DL-serina.

La mezcla de reacción se preparó de manera discontinua  
25 en el recipiente 5, consistiendo dicha mezcla de DL-serina, indol, fosfato de piridoxal y agua, compensada mediante fosfato potásico de 0,01 M a un valor pH = 7,8, siendo alimenta-

402781



dos estos componentes al recipiente 5 a través de los conductos 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

El recipiente 5 fue sometido a una fuerte agitación, para facilitar la disolución de los reactivos, y se dotó  
5 de una camisa.

La bomba 6 transfirió la mezcla obtenida, a través del conducto 7, al recipiente 8 que estaba destinado a alimentar de forma continua el reactor 12 que contenía los filamentos con las enzimas englobadas en los mismos.

10 Con el fin de que las enzimas pudiesen desarrollar una buena actividad catalítica, los filamentos no debían estar excesivamente apretados: preferiblemente se dispusieron de 10-100 kg de filamentos por 1 m<sup>3</sup> de volumen del reactor.

El grado de utilización de la L-serina decrecía a medida  
15 que iba progresando la reacción. Por consiguiente resultó conveniente trabajar con una conversión de un 60+70 % para evitar un grado de reacción excesivamente bajo y para permitir el reciclado de la DL-serina que no había reaccionado.

A continuación se indica un ejemplo real de un balance  
20 de material con respecto a 1 kg de filamentos.

A través de la bomba 9 y del conducto 11 se alimentaron:

	120	g/h	de DL-serina
	50,8	g/h	de indol
	6	mg/h	de fosfato de piridoxal
25	30	kg/h	de agua
	0,3	moles/h	de fosfato potásico

402781



Del reactor 12 se obtuvieron:

	60	g/h	de D-serina
	20	g/h	de L-serina
	78	g/h	de L-triptófano
5	6	g/h	de indol
	30	kg/h	de agua
	6	mg/h	de fosfato de piridoxal
	0,3	moles/h	de fosfato potásico

La bomba 10 estaba destinada a hacer circular rápidamente el medio de reacción en el reactor 12 con el fin de homogeneizar el sistema y mantener una baja concentración de indol en cualquier punto del reactor.

El flujo a través de dicha bomba 10 era de aproximadamente  $1 \text{ m}^3/\text{h}$  por 1 kg de filamentos. No se previó regulación alguna del pH, ya que el pH no variaba sensiblemente a medida que progresaba la reacción.

De la solución acuosa procedente del reactor 12 se eliminó el indol mediante una extracción líquido-líquido: como disolvente podía utilizarse por ejemplo el tolueno. La operación podía efectuarse mediante un sistema mixer-settler de una o varias etapas.

De acuerdo con el esquema ilustrado, en el recipiente 13 se extrajo el indol mediante tolueno, alimentado a través de 30, y la separación de las dos fases líquidas se efectuó en el separador 14. El disolvente se recuperó a través del conducto 31 y se envió a la purificación.

La bomba 15 estaba destinada a conducir la fase acuosa,

402781



conteniendo serina y triptófano, al separador 16 para la recuperación del triptófano.

La separación triptófano-serina puede efectuarse mediante una operación de intercambio de iones o mediante una absorción  
5 con carbono activo.

En el primero de los casos, por ejemplo, la solución acuosa de triptófano y serina puede enviarse a una columna rellena con "Amberlite IR 118" (forma  $H^+$ ) (Rohm and Haas Co. U.S.A.).

10 Dicha resina retiene ambos compuestos: sucesivamente se eluye en una primera etapa mediante una solución acuosa de 0,2 M de  $NH_4Cl$  para la recuperación de la serina, y en una segunda etapa mediante una solución acuosa de 0,2 M de amoníaco para la recuperación del triptófano.

15 Por el contrario, tal como se ilustra en la Fig. 1, el triptófano se separó de la serina haciendo pasar la solución acuosa procedente de 14 a una columna que contenía carbono activo (16).

El triptófano fue adsorbido, mientras que la solución  
20 que contenía la totalidad de la D-serina de partida y la L-serina no utilizada fue enviada al reactor 18 a través del conducto 17.

Para hacer continuo el proceso de absorción se utilizaron varias columnas en paralelo; mientras que en una de dichas  
25 columnas se efectuaba la absorción del triptófano, las demás columnas estaban disponibles para la elución del triptófano y para el lavado con agua desmineralizada, alimentada a través

402781



del conducto 20 y extraída por 32.

La elución del triptófano se efectuó mediante una solución de agua-alcohol (50 % en peso, con un valor pH = 8) que fue alimentada a través del conducto 19.

5 La solución de triptófano se recuperó a través del conducto 21 y se homogeneizó en el recipiente 22, conteniendo dicha solución asimismo vestigios de fosfato de piridoxal. Mediante la bomba 23 se envió la solución al evaporador 24 en el cual dicha solución se concentró bajo vacío a una temperatura de 40°C, siendo conducida seguidamente, mediante la  
10 bomba 25, al recipiente de cristalización 27, después de haber pasado por el intercambiador 26.

En 27 se precipitó el triptófano mediante corrección del valor pH a 5,9. Seguidamente la suspensión fue centrifugada: una cierta cantidad de agua fue reciclada a 22 a través  
15 del conducto 28, y el agua restante fue extraída para evitar una acumulación de impurezas. Los cristales húmedos fueron sometidos a un secado en vacío.

La solución de D-serina y L-serina, procedente de 16,  
20 fue transformada a la forma racémica en el reactor 18, mediante calentamiento bajo presión a la temperatura de 860°C.

Dicha solución de DL-serina, refrigerada en el intercambiador 29, fue conducida al depósito 33 donde estaba disponible para la preparación del medio de reacción que se requería  
25 en 5.

Por encima de 29 estaba prevista una purga para evitar la acumulación de impurezas.

402781



N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de ponerlo en práctica, se hace constar que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio fundamen-  
5 mental, puede quedar sometido a variaciones de detalle. También se hace constar que esta invención corresponde a la descrita en la solicitud de Patente N° 23547 A/71, depositada en 23 de Abril de 1971, cuya prioridad se reivindica de acuerdo con los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo esencial y  
10 por lo que se solicita Patente de Invención, por veinte años, lo que queda resumido en las siguientes reivindicaciones:

1ª.- Procedimiento para la preparación enzimática de L-triptófano, caracterizado porque se hacen entrar en contacto indol y serina con una estructura filamentosa dotada de un  
15 complejo enzimático englobado en la misma y capaz de sintetizar el triptófano.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la enzima se obtiene a partir de varias fuentes de microbios tales como E. Coli, Claviceps, Neurospora, B. Subtilis,  
20 Sacaromices.

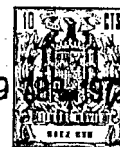
3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado porque la enzima preferentemente empleada se obtiene a partir de E. Coli.

4ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones  
25 precedentes, caracterizado porque los filamentos dotados del complejo enzimático englobado en los mismos se obtienen a partir de polímeros susceptibles de ser transformados en



402781

19



filamentos y seleccionados de entre polímeros celulósicos esterificados, nitratos, poliolefinas, polímeros y copolímeros de acrilonitrilo, acrilatos, metacrilatos, ésteres vínicos, cloruro de vinilo, cloruro de vinilideno, estireno y poliamidas.

5        5ª.- Procedimiento según la reivindicación 4ª, caracterizado porque dichos filamentos dotados de un complejo enzimático englobado en los mismos se obtienen de triacetato de celulosa.

6ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION ENZIMATICA DE L-TRIPTOFANO,

10 tal y como queda descrito y reivindicado en la presente memoria, que consta de dieciseis hojas mecanografiadas por una sola cara y de una lámina de dibujos.

BARCELONA, 19 de Abril de 1972.

SNAM PROGETTI S.p.A.  
P.P.

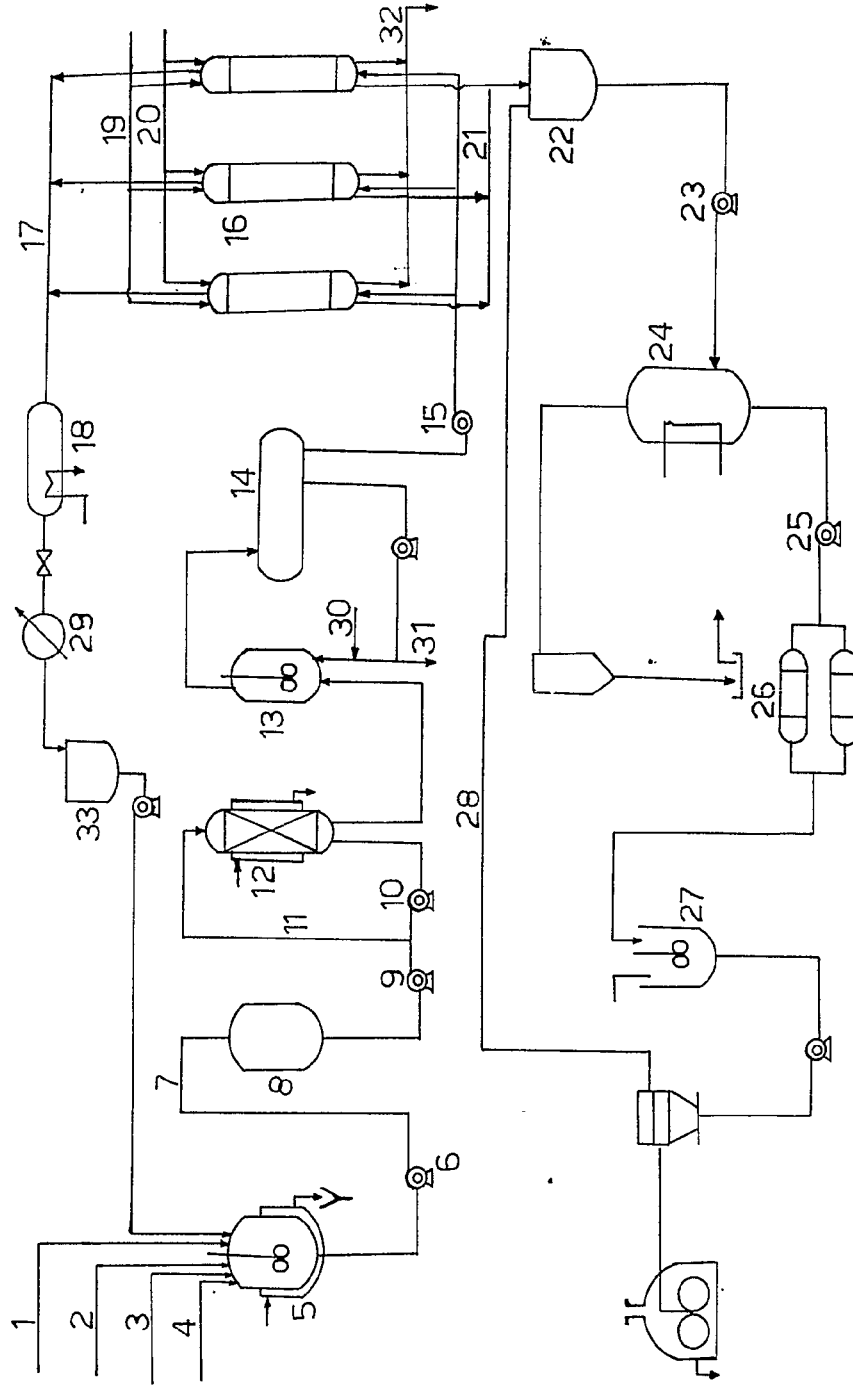
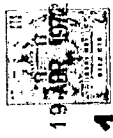
J. GOMEZ-ACEBO Y MODET  
p. r. Fdo.: E. Ferregüela Colón



ESQUEMA

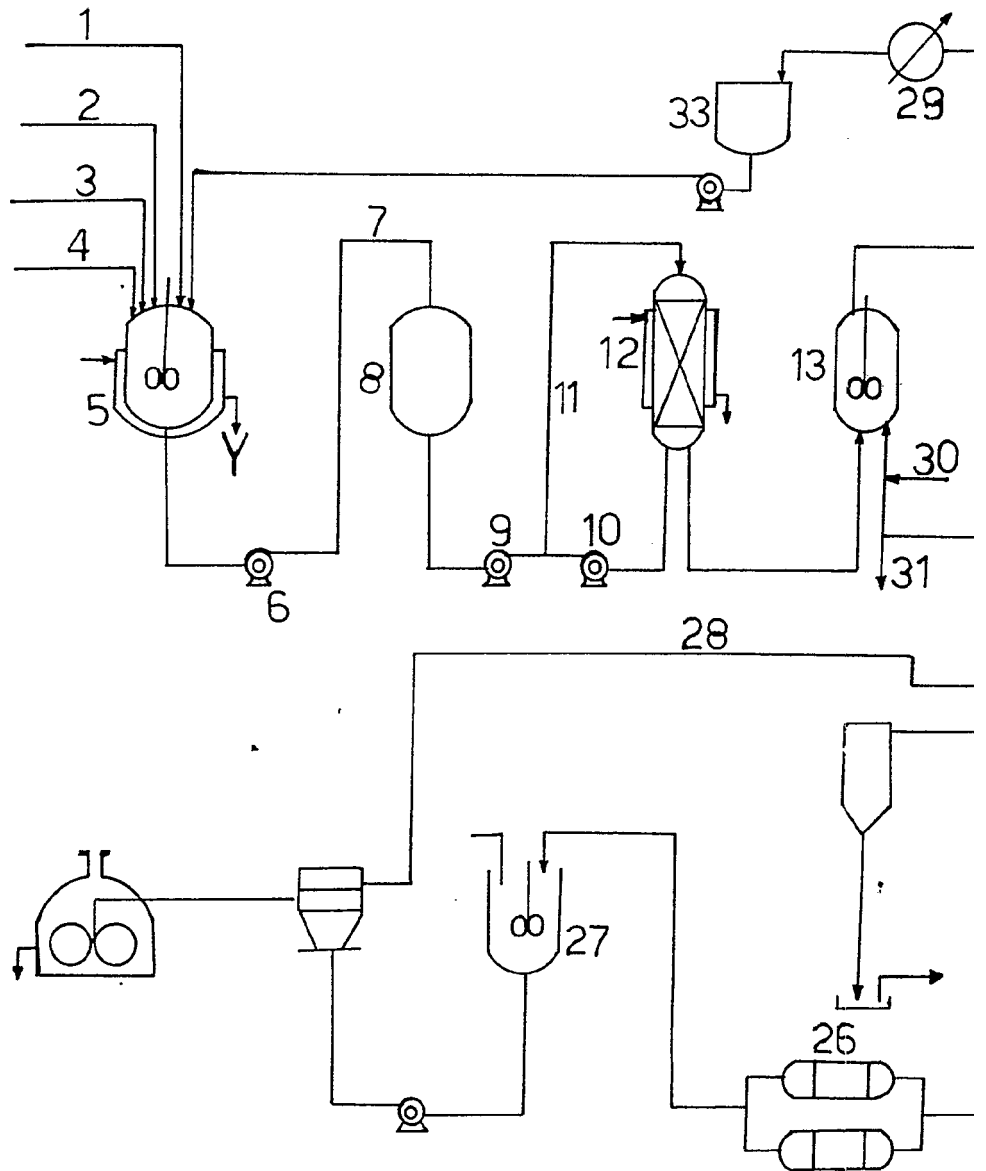
402781

402781



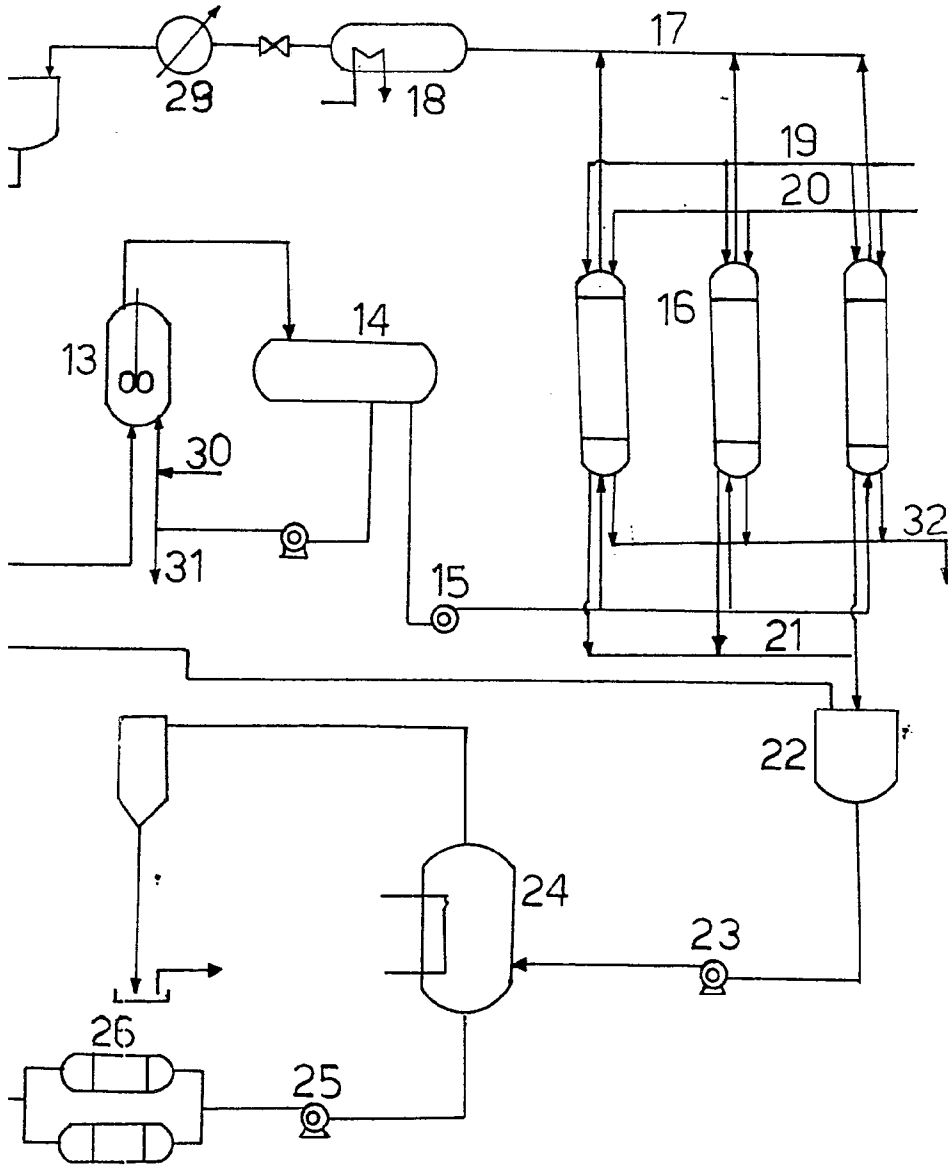
BARCELONA, 19 de Abril de 1972  
 SNAM PROGETTI S.p.A.  
 P.P. J. GOMEZ-ACEBO Y MODEI  
 P. P. P. E. Ferrer/Colón

402781



ESQUEMA

402781



BARCELONA, 19 de Abril de 1972  
SNAM PROGETTI S.p.A.  
P.P. J. GOMEZ-ACEBO Y MODEI  
p. p. Fdo.: E. Forregüelo Colón