



CASE O.Z. 725/31

P A T E N T E  
D E  
I N V E N C I O N

433954

por "PROCEDIMIENTO PARA SEPARAR LEUCINA E ISOLEUCINA", a favor de la firma suiza MAGGI A.G., residente en KEMPTAL (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a un procedimiento para separar leucina e isoleucina de una solución acuosa de estos dos ácidos aminados.

Los esfuerzos realizados para conocer con exactitud

- 5. las necesidades alimenticias del hombre han hecho posibles las técnicas para preparar alimentos que aplican, entre otras, las proporciones justas de ácidos aminados llamados esenciales. Cabe citar como ejemplo típico de alimento obtenido mediante estas técnicas las soluciones ricas en ácidos
- 10. aminados destinadas a inyecciones parenterales y a sustituir las soluciones ricas solamente en glúcidos. A fin de poder componer un alimento o rectificar su contenido en alguno



de sus componentes es necesario disponer aisladamente de estos últimos, hay que disponer sobre todo de los ácidos aminados esenciales en forma relativamente pura. A este respecto hay que observar que si bien es fácil aislar de una

5. proteína una fracción que contenga únicamente leucina e isoleucina, no sucede lo mismo cuando se trata de separar la isoleucina de esta fracción.

Un procedimiento tradicional para separar la isoleucina de la leucina se basa en el hecho de que los dos comple-

10. jos que ambas forman con una sal de cobre adecuada presentan con una de ellas una solubilidad nula y con la otra, una solubilidad débil en metanol. Esto posibilita aislar una isoleucina natural para mediante una serie de cristalizaciones y de extracciones sucesivas. Hay que repetir muchas veces

15. las operaciones y el rendimiento es muy pequeño. Lo mismo sucede con todos los procedimientos conocidos de este tipo. También se pueden obtener cantidades apreciables de isoleucina por medio de la síntesis química, pero el procedimiento resulta costoso por la necesidad de separar luego los isó-

20. meros L y D.

El presente invento se propone poner a punto un procedimiento industrial para separar la isoleucina de la leucina que comporta un número reducido de operaciones e implica la utilización de reactivos usuales y baratos.

25. El procedimiento según el invento se caracteriza por procederse a una cristalización fraccionada de sales de cobre o de níquel de la leucina y de la isoleucina con pH alternativamente inferiores y superiores en terreno ácido.



Es conveniente que la leucina y la isoleucina de la solución de partida estén en una relación ponderal de a lo sumo 7:1, pues si la relación es mayor resulta muy difícil llevar a cabo la separación, incluso empleando el presente 5. procedimiento.

Las bases y los ácidos que pueden emplearse para ajustar los pH deben elegirse entre los que no forman complejos con el ión metálico existente en la formación de leucinato o isoleucinato.

10. De preferencia, se añade a la solución de partida sulfato de cobre o de níquel y los ajustes de pH se efectúan añadiendo ácido sulfúrico o hidróxido sódico.

Se puede realizar la cristalización fraccionada en dos ciclos sucesivos de dos cristalizaciones cada uno para 15. una solución de partida en la que la leucina y la isoleucina estén en una relación ponderal mayor de 1:1.

Los valores recomendables de los pH para cristalizaciones denominadas inferiores están comprendidos entre 2 y 3,8.

20. Se ha comprobado que de este modo se puede realizar rápidamente y de manera muy económica una separación eficaz. El rendimiento puede alcanzar valores muy interesantes desde el punto de vista industrial.

Se advierte claramente la sencillez de las opera- 25. ciones y su escaso número si se tiene en cuenta que para alcanzar un tal rendimiento y un tal grado de pureza se puede ajustar, ventajosamente, el pH de una solución acuosa de leucina, de isoleucina y de sulfato de cobre a 1,0 - 1,8



- y obtener una primera solución límpida de coloración azul, ajustar el  $p^H$  de esta primera solución azul 2 - 3, recoger por filtración una primera fracción cristalizada compuesta por leucinato de cobre, neutralizar el filtrado y recoger
5. por filtración una segunda fracción cristalizada formada por leucinato y por isoleucinato de cobre, hacer una dispersión acuosa de la segunda fracción cristalizada, ajustar su  $pH$  a 1,3 - 2,2 y obtener una segunda solución límpida de coloración azul, ajustar el  $p^H$  de esta segunda solución azul a
10. 2,7 - 3,8, recoger por filtración una tercera fracción cristalina compuesta en su mayor parte por leucinato de cobre, neutralizar el filtrado y recoger por filtración una cuarta fracción compuesta en su mayor parte por isoleucinato de cobre.
15. Una vez que se ha terminado la separación propiamente dicha solo queda desembarazar las moléculas de ácido aminado de los iones metálicos unidos a ella, lo cual puede realizarse, por ejemplo, mediante un tratamiento alcalino en caliente.
20. Hemos de señalar que cuando hablamos aquí por razones de simplificación de sales de leucina o de isoleucina, de leucinato o de isoleucinato, hay que entender que nos referimos a los complejos formados por las moléculas del ácido aminado considerado con los iones metálicos del caso. Estos
25. complejos se describen en el lenguaje simbólico con expresiones del tipo  $Cu(Leu)_2$  o  $Cu(Ileu)_2$ .
- Se ha comprobado que si bien los iones  $Cu^{++}$  resultan muy adecuados a la ejecución del procedimiento, los iones



$Ni^{++}$  son también recomendables. Está claro que el número de iones metálicos que hay que colocar en la solución de partida es proporcional al número de moléculas de ácidos aminados que la misma contiene.

5. Cabe señalar también que la materia inicial de la solución de partida que hay que tratar con el presente procedimiento es toda fuente de proteínas rica en leucina e isoleucina, como por ejemplo bagazos de oleaginosas, gérmenes de trigo o de maíz, microorganismos, principalmente levaduras o caseína. El aislamiento de las proteínas de la materia inicial y el posterior aislamiento de dichas proteínas de una fracción que contenga la leucina bruta pueden ser realizados de cualquier manera bien conocida.

A continuación se dan algunos ejemplos a título de ilustración :

Ejemplo 1

A una solución de 80 g de leucina y 20 g de isoleucina en 1000 g de agua se añaden 96 g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ . Se ajusta el pH a 1,5 con ácido sulfúrico al 50 %. A la primera solución límpida de coloración azul así obtenida se le añade hidróxido sódico al 30 % para ajustar su pH a 2,5. Sobre un filtro ordinario de papel se retienen 87 g de  $Cu(Leu)_2$  cristalizado y se recogen. Se ajusta el pH del filtrado a 7 mediante la adición de NaOH al 30 %. Sobre un filtro ordinario de papel se retienen 33 g de una mezcla al 50 % de  $Cu(Leu)_2$  y 50 % de  $Cu(Ileu)_2$ . Se agregan a esta mezcla 20 g de agua y de ácido sulfúrico al 50 % para obtener una segunda solución límpida de coloración azul con pH de 1,5. A esta



segunda solución se añade hidróxido de sodio al 30 % para ajustar el pH a 3. Sobre un filtro ordinario de papel se retienen por filtrado 19 g de una mezcla al 80 % de  $\text{Cu}(\text{Leu})_2$  y 20 % de  $\text{Cu}(\text{Ileu})_2$  y se recogen. Se ajusta el pH del filtrado a 7 mediante la adición de NaOH al 30 %. Sobre un filtro ordinario de papel se recogen por filtrado 12 g de una mezcla al 15 % de  $\text{Cu}(\text{Leu})_2$  y 85 % de  $\text{Cu}(\text{Ileu})_2$ , a saber isoleucinato de cobre con un grado de pureza de 85 %.

Se someten por separado los 87 g de  $\text{Cu}(\text{Leu})_2$  y los 10. 12 g de  $\text{Cu}(\text{Ileu})_2$  a un tratamiento idéntico de separación del cobre procediendo como sigue: se mantienen durante 1 hora a 85°C 300 partes de  $\text{Cu}(\text{Leu})_2$  o  $\text{Cu}(\text{Ileu})_2$  mezcladas con 400 partes de NaOH al 25 %. Se agita y se separa el óxido de cobre por filtrado. Se neutraliza el filtrado con 15. ácido clorhídrico concentrado. Se recogen los ácidos aminados por filtrado, se lavan y se secan.

Teniendo en cuenta que los 19 g de mezcla al 80 % de  $\text{Cu}(\text{Leu})_2$  y 20 % de  $\text{Cu}(\text{Ileu})_2$  pueden ser reutilizados en una solución de partida, es decir reciclados, el rendimiento total en leucinas es del 95 %, siendo las pérdidas del 20. 5 %; el rendimiento en leucina es del 98 % y el rendimiento en isoleucina es del 78 %.

#### Ejemplo 2

Después de neutralizar y filtrar un hidrolisato 25. ácido de proteínas se efectúa una disolución ácida del residuo obtenido. Se decolora la solución con carbono activo y se la concentra. Se separa la materia que cristaliza y se



obtiene la leucina bruta o técnica en forma de clorhidrato.

- 1000 partes (p.) de clorhidrato de leucina técnica (Leu-HCl tecn), en el caso 120 kg, que comprenden 450 p. de leucina, 81 p. de isoleucina, 23 p. de metionina y 34 p. de
5. otros ácidos aminados son diluidos, calentados después de añadir agua oxigenada para solubilizar la metionina, enfriados y filtrados a un pH de 0,5 y se recogen 280 p. de clorhidrato de leucina cristalizado. Estas 280 p. se dispersan en agua, se neutralizan con sosa cáustica y se filtran obteniéndose 200 p. de cristales compuestos en el 97,5 % por leucina y en el 2,5 % por isoleucina. Del filtrado obtenido antes por filtración a un pH de 0,5 se retiran, después de ajustar el pH a 6 y filtrar, alrededor de 300 p. de cristales de ácidos aminados. La solución que resta, a la que se
15. añaden las aguas madres obtenidas por el anterior tratamiento de 280 p. de clorhidrato de leucina, proporciona todavía, después de concentrar y filtrar, por una parte aguas madres saturadas de cloruro sódico que se eliminan y, por otra, alrededor de 100 p. de cristales de ácidos aminados. La
20. agrupación de las anteriores 300 p. de ácidos aminados y de estas 100 p. dan 400 p. de cristales de ácidos aminados en las que la leucina y la isoleucina se encuentran en una relación ponderal cercana a 3,5:1.

- A estas 400 p. de cristales de ácidos aminados se
25. añaden 375 p. de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1000 p. de agua y 150 p. de ácido sulfúrico para obtener una primera solución límpida de coloración azul, cuyo pH es de 1,2. Se ajusta el pH de esta solución a 2,5 mediante la adición de hidróxido de sodio



- al 30 % y se recoge por filtrado sobre filtro ordinario en papel 300 p. de  $\text{Cu}(\text{Leu})_2$ , cuyo grado de pureza es del 97,5 %. Se ajusta el pH del filtrado a 7 con NaOH al 30 %. Sobre filtro ordinario de papel se recogen 120 p. de cristales de ácidos aminados por filtración. A estas 120 p. se añaden 200 p. de agua y 55 p. de ácido sulfúrico para obtener una segunda solución límpida de coloración azul cuyo pH es de 2. Se ajusta a 3,5 el pH de esta segunda solución azul y se recogen por filtración 70 p. de una mezcla al 70 % de  $\text{Cu}(\text{Leu})_2$  y 30 % de  $\text{Cu}(\text{Ileu})_2$ . Se ajusta el pH del filtrado a 7 con NaOH al 30 % se recogen por filtración 50 p. de una mezcla al 70 % de  $\text{Cu}(\text{Ileu})_2$ , 15 % de  $\text{Cu}(\text{Leu})_2$ , 10 % de  $\text{Cu}(\text{Val})_2$  y 5 % de complejos de otros ácidos aminados con el cobre, es decir, 50 p. de isoleucina de cobre con una pureza del 70 %.
15. Las 300 p. de  $\text{Cu}(\text{Leu})_2$  y las 50 p. de  $\text{Cu}(\text{Ileu})_2$  son sometidas a un tratamiento de separación del cobre idéntico al descrito en el ejemplo 1.
- Teniendo en cuenta que las 70 p. de mezcla al 70 % de  $\text{Cu}(\text{Leu})_2$  y 30 % de  $\text{Cu}(\text{Ileu})_2$  pueden ser recicladas, el rendimiento en leucina (pureza del 97,5 %) es del 95 %, mientras que el rendimiento en isoleucina (pureza del 70 %) es del 60 %.

#### REIVINDICACIONES

25. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente suiza nº 745/74 del 21 de Enero de 1974.



1.- Procedimiento para separar leucina e isoleucina de una solución acuosa de estos dos ácidos aminados, caracterizado por el hecho de que se procede a una cristalización fraccionada de sus sales de cobre o de níquel a unos 5. pH alternativamente inferiores y superiores en el campo ácido.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la leucina y la isoleucina de la solución de partida están en una relación ponderal de 10. a lo sumo 7:1.

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que se añade a la solución de partida sulfato de cobre o de níquel y porque los ajustes de pH se efectúan con adición de ácido sulfúrico o de hidró- 15. xido de sodio.

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por el hecho de que se efectúa la cristalización fraccionada en dos ciclos sucesivos de dos cristalizaciones cada uno, para una solución de partida donde la leu- 20. cina y la isoleucina se encuentran en una relación ponderal mayor que 1:1.

5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por el hecho de que los pH inferiores de las citadas cristalizaciones están comprendidos entre 2 y 3,8.

25. 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por el hecho de que se ajusta el pH de la solución de leucina, de isoleucina y de sulfato de cobre a 1,0 - 1,8 y se obtiene una primera solución límpida de colo-



ración azul, se ajusta el pH de esta primera solución azul a 2 - 3, se recoge por filtración una primera fracción cristalizada compuesta por leucinato de cobre, se neutraliza el filtrado y se recoge por filtración una segunda fracción

5. cristalizada compuesta por leucinato e isoleucinato de cobre, se pone en dispersión acuosa la segunda fracción cristalizada, se ajusta su pH a 1,3 - 2,2 y se obtiene una segunda solución límpida de coloración azul, se ajusta el pH de esta segunda solución azul a 2,7-3,8, se recoge por filtración una tercera fracción cristalizada compuesta en su mayor parte por leucinato de cobre, se neutraliza el filtrado y se recoge por filtración una cuarta fracción cristalizada compuesta en su mayor parte por isoleucinato de cobre.

7.- Procedimiento para separar leucina e isoleucina.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 10 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 20 de Enero de 1975.

20.

p.a.

JAIME IZERN  
P. P.  
Firmado: JCSE L. MOBA

fm.