

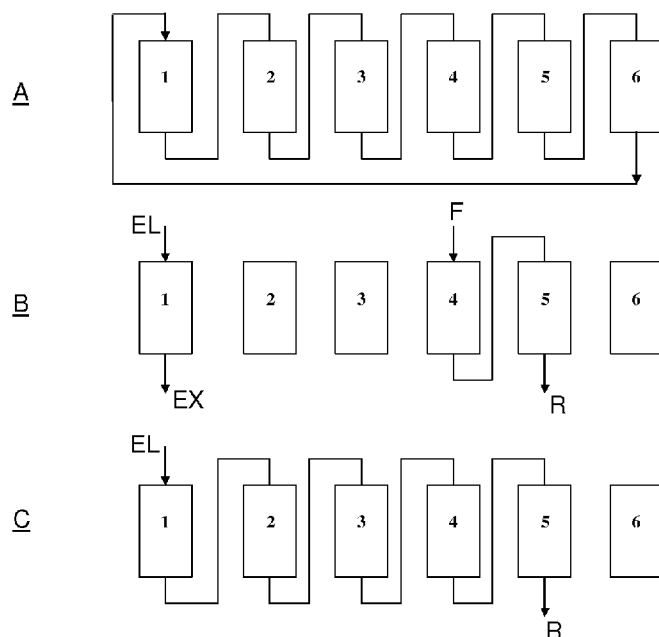


- (51) Classification internationale des brevets :
C07D 233/64 (2006.01) *C07D 209/20* (2006.01)
C07C 227/40 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/050015
- (22) Date de dépôt international :
7 janvier 2014 (07.01.2014)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (71) Déposant : **NOVASEP PROCESS** [FR/FR]; Site Eiffel, Boulevard de la Moselle, F-54340 Pompey (FR).
- (72) Inventeurs : **BRICHANT, Damien**; 21 domaine des Grèves de Sucinio, F-56370 Sarzeau (FR). **SCHAB, Frédéric**; 12bis rue Sébastien Gryphe, F-69007 Lyon (FR). **BAUDOUIN, Stanislas**; 35 rue des Ecoles, F-17180 Périgny (FR). **ORIEZ, Vincent**; 22 rue des Loges, F-78600 Maisons-Laffitte (FR).
- (74) Mandataires : **POCHART, François** et al.; August & Debouzy avocats, 6 / 8 avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : PROCESS FOR PURIFYING AROMATIC AMINO ACIDS

(54) Titre : PROCÉDÉ DE PURIFICATION D'ACIDES AMINÉS AROMATIQUES



(57) Abstract : The invention relates to a process for purifying an amino acid from a starting mixture, in which the amino acid comprises an aromatic ring and has an acidity constant K_a , the process comprising: - a first step of bringing the starting mixture into contact with a strong cationic resin, at a pH greater than or equal to pK_a ; - a second step of eluting with an aqueous solution of eluent having a pH greater than the pH of the first step, making it possible to collect a stream enriched with the amino acid.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de purification d'un acide aminé à partir d'un mélange de départ, dans lequel l'acide aminé comporte un cycle aromatique et présente une constante d'acidité K_a , le procédé comprenant : - une première étape de mise en contact du mélange de départ avec une résine cationique forte, à un pH supérieur ou égal à pK_a ; - une deuxième étape d'éluion avec une solution aqueuse d'éluant présentant un pH supérieur au pH de la première étape, permettant de collecter un flux enrichi en l'acide aminé.

WO 2015/104464 A1



MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, **Publiée :**
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, — *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

5 **PROCEDE DE PURIFICATION D'ACIDES AMINES AROMATIQUES**

DOMAINE DE L'INVENTION

10 La présente invention concerne un procédé de purification d'acides aminés aromatiques, c'est-à-dire d'acides aminés comportant un cycle aromatique, et en premier lieu le tryptophane, la phénylalanine, la tyrosine, et l'histidine.

15 **ARRIERE-PLAN TECHNIQUE**

 Les acides aminés aromatiques peuvent être produits par fermentation, par enzymation ou par voie synthétique.

 Le tryptophane, la phénylalanine et l'histidine (pour les nourrissons) font partie de la famille des acides aminés essentiels : à ce titre, ils sont
20 utilisés en tant que compléments nutritifs.

 Le moût d'acide aminé produit par voie fermentaire, synthétique ou enzymatique contient des impuretés parmi lesquelles des sucres et substrats résiduels, des minéraux, des pigments. Ces impuretés doivent être éliminées pour atteindre le degré de pureté requis pour son utilisation commerciale.

25 Diverses méthodes de purification ont été développées pour purifier les acides aminés aromatiques. Elles sont basées sur les technologies dominantes suivantes : cristallisation, extraction liquide / liquide et fixation sur résine.

 La purification par cristallisation est mise en œuvre en voie aqueuse
30 ou solvant. Des étapes de de prétraitement avant cristallisation sont parfois prévues, de manière à augmenter la pureté des cristaux. Il peut s'agir d'une étape de purification sur charbon actif (documents CN 101245047 et CN 102146052) ; d'une étape de filtration membranaire sur filtre inox (document CN 101376646) ; d'une étape d'ultrafiltration (document
35 CN 101691349) ; ou d'une combinaison de plusieurs filtrations successives pour éliminer plusieurs familles d'impuretés, par exemple un enchaînement microfiltration / ultrafiltration / nanofiltration (document CN 101812009).

Des solvants sont parfois ajoutés lors de la cristallisation pour atteindre de meilleurs degrés de pureté, tels que de l'acide acétique (documents JP 2097801 et EP 1756055), ou un alcool aliphatique (document EP 0274728). L'utilisation de ces solvants entraîne une augmentation des coûts de production, et des coûts de traitement ou de recyclage des liqueurs mères.

Une deuxième voie de purification consiste à procéder à une extraction liquide / liquide de l'acide aminé. Ainsi, il a été proposé une purification du tryptophane utilisant des tensioactifs pour former une phase micellaire inverse (document CN 102382030), ou encore du toluène (document EP 0299715). Ces techniques ne sont jamais suffisantes en tant que telles pour atteindre de hauts degrés de pureté. Des étapes de pré- et de post-traitement sont nécessaires. De plus, la mise en œuvre de volumes importants de solvants est économiquement peu intéressante pour traiter des volumes industriels d'acides aminés à l'échelle de plusieurs kilotonnes / an / unité.

Enfin, une troisième voie propose un traitement sur résine polymérique.

Dans les documents CN 101812488, CN 101948420 et US 2013/0079527, la purification repose sur une capture et fixation de l'acide aminé sur une résine adsorbante (donc neutre), puis une élution à l'éthanol (dans les deux premiers documents) ou avec un sel (dans le troisième document).

Le document FR 2581654 décrit l'adsorption du tryptophane sur une résine cationique forte polystyrénique faiblement réticulée. Le composé cible est précipité, puis dissout dans une solution acide, notamment une solution d'acide sulfurique ou chlorhydrique ayant un pH de 1 à 2. La solution acide est ensuite mise en contact avec une résine échangeuse de cations, qui est rincée à l'eau puis s'ensuit une élution par une base. Ce procédé de type « batch » est la voie couramment en usage aujourd'hui pour une mise en œuvre industrielle.

Le document FR 1502814 décrit l'adsorption du tryptophane sur une résine cationique forte ou sur une résine anionique forte. Dans ces deux cas, la résine sélectionnée présente un faible taux de réticulation. Dans le cas d'une résine cationique forte, le pH du mélange contenant le tryptophane est ajusté à 2 avant la mise en contact avec la résine. L'élution est effectuée en deux temps: d'abord une élution par une solution saline neutre pour éliminer des acides aminés polluants, puis une élution par une solution basique pour

désorber le tryptophane. Il s'agit d'un procédé nécessitant deux éluants distincts et des quantités importantes de régénérants.

L'inconvénient des traitements sur résines décrits ci-dessus est de nécessiter une consommation importante de régénérant chimique concentré (usuellement 2 à 10 % en masse) pour éluer l'acide aminé après fixation. Une quantité d'effluents équivalente à celle de régénérant est également engendrée.

Le document US 5300653 décrit la séparation sur colonne unique en batch d'au moins un acide aminé aromatique d'autres acides aminés non aromatiques sur une résine cationique forte de type gel initialement convertie sous forme saline avec un métal alcalin. La solution contenant l'acide aminé présente de préférence un pH de 2 à 12. L'acide aminé est adsorbé lors du passage de la solution sur la résine, puis il est désorbé avec de l'eau dépourvue d'acide ou de base ou un solvant organique.

Un inconvénient de cette méthode est que le mode d'élution ne permet pas de maîtriser la forme ionique de la résine. En effet, les espèces cationiques présentes dans la solution à traiter sont susceptibles de s'échanger avec le métal alcalin, sans qu'aucun éluant ne permette de maintenir la forme ionique initiale. Les performances de séparation entre les acides aminés peuvent être affectées par ces mécanismes d'échange d'ions intempestifs : par conséquent, les rendements et puretés en acides aminés produits risquent de diminuer ou de varier de manière incontrôlée dans le temps.

La majorité de ces traitements sur résine repose sur une mise en œuvre de type « *batch* », c'est-à-dire discontinue. Les résines sont installées en colonne, et les éluants successifs (moût contenant l'acide aminé ; eaux de rinçage ; solutions régénérantes – salines, basiques, acides ou alcooliques) sont percolés successivement à travers la colonne.

Toutefois le document US 2013/0079527 susmentionné décrit une séparation semi-continue sur résine adsorbante de type XAD7, dans un système de chromatographie à lit mobile simulé (SMB, pour Simulated Moving Bed) comportant trois zones de séparation. Le système est élué à l'eau ou au sel. Cette méthode présente l'inconvénient d'opérer sur une résine adsorbante, donc une résine plus coûteuse que des résines échangeuses d'ions. Les résines adsorbantes ont également tendance à s'encrasser rapidement. Leur utilisation nécessite un protocole de nettoyage à l'alcool, à la base et à l'acide pour éliminer les impuretés responsables de

l'encrassement, ce qui accroît les contraintes opératoires en termes de coûts et d'équipements installés.

Ainsi, il existe un besoin de mettre au point un procédé de purification d'acide aminé aromatique amélioré, permettant notamment une séparation
5 entre l'acide aminé cible et des impuretés telles que les sels, les sucres, les couleurs, avec une consommation minimale de produits chimiques.

RESUME DE L'INVENTION

L'invention concerne en premier lieu un procédé de purification d'un
10 acide aminé à partir d'un mélange de départ, dans lequel l'acide aminé comporte un cycle aromatique et présente une constante d'acidité K_a , le procédé comprenant :

- une première étape de mise en contact du mélange de départ avec une résine cationique forte, à un pH supérieur ou égal à
15 pK_a ;
- une deuxième étape d'élution avec une solution aqueuse d'éluant présentant un pH supérieur au pH de la première étape, permettant de collecter un flux enrichi en l'acide aminé.

Selon un mode de réalisation, le mélange de départ comprend en
20 outre des sucres et/ou des sels, et dans lequel le flux enrichi en l'acide aminé comporte moins de sucres et/ou de sels que le mélange de départ.

Selon un mode de réalisation, la deuxième étape d'élution est une étape d'élution isocratique.

Selon un mode de réalisation, l'acide aminé présente une constante
25 de basicité K_b et, lors de la première étape, le pH est inférieur ou égal à pK_b-3 , de préférence inférieur ou égal à pK_b-4 , de manière plus particulièrement préférée inférieur ou égal à pK_b-5 et idéalement inférieur ou égal à pK_b-6 .

Selon un mode de réalisation, la deuxième étape d'élution est
30 effectuée directement à la suite de la première étape de mise en contact, sans rinçage intermédiaire.

Selon un mode de réalisation, la solution d'éluant est une solution d'une base dans l'eau, la base étant de préférence de la soude, de la potasse, de l'ammoniac ou un mélange de ceux-ci, et de manière plus
35 particulièrement préférée de l'ammoniac.

Selon un mode de réalisation, la concentration de la base dans la solution d'éluant est de 0,01 à 50 g/L, de préférence de 0,2 à 20 g/L, plus particulièrement de 0,5 à 10 g/L, et tout particulièrement de 1 à 5 g/L.

Selon un mode de réalisation, le rapport du nombre de moles de base dans la solution d'éluant utilisée à la deuxième étape sur le nombre de moles d'acide aminé dans le mélange de départ mis en contact à la première étape est inférieur ou égal à 3, de préférence inférieur ou égal à 2, de préférence inférieur ou égal à 1,5, de préférence inférieur ou égal à 1, de préférence inférieur ou égal à 0,9, de préférence inférieur ou égal à 0,8, de préférence inférieur ou égal à 0,7, de préférence inférieur ou égal à 0,6, de préférence inférieur ou égal à 0,5, de préférence inférieur ou égal à 0,4.

Selon un mode de réalisation, l'acide aminé est le tryptophane ou la phénylalanine ou la tyrosine ou l'histidine.

Selon un mode de réalisation, la résine cationique forte est un copolymère polystyrène-divinylbenzène.

Selon un mode de réalisation, la résine cationique forte présente un taux de réticulation de 5 à 12 %, de préférence de 6 à 11 %, plus particulièrement de 7 à 10 %, de préférence de 8 à 9 %.

Selon un mode de réalisation, la résine cationique forte est sous forme cationique monovalente, de préférence sous forme Na^+ ou K^+ ou NH_4^+ , et de manière plus particulièrement préférée sous forme NH_4^+ .

Selon un mode de réalisation, le procédé est mis en œuvre dans une installation chromatographique multi-colonnes, l'installation comportant de préférence 30 colonnes au plus, de manière plus particulièrement préférée 20 colonnes au plus, ou 12 colonnes au plus, ou 8 colonnes au plus, ou 6 colonnes au plus.

Selon un mode de réalisation, le procédé est mis en œuvre dans une installation chromatographique à lit non-statique, et de préférence dans une installation chromatographique à lit mobile simulé, ou à lit mobile réel, ou à lit mobile simulé amélioré, ou à lit mobile simulé séquentiel, et de préférence à lit mobile simulé séquentiel.

Selon un mode de réalisation, le mélange de départ est obtenu à l'issue du traitement d'un mélange brut, le mélange brut étant de préférence un moût fermentaire, synthétique ou enzymatique, et ledit traitement comportant de préférence une ou plusieurs étapes choisies parmi une centrifugation, une filtration frontale, une cristallisation, une filtration tangentielle, une microfiltration et une ultrafiltration.

Selon un mode de réalisation, le procédé comprend une ou plusieurs étapes de concentration du flux enrichi en l'acide aminé, de préférence choisies parmi une concentration par évaporation et notamment par

évaporation à film tombant, une concentration par évaporation multi-effets, une concentration membranaire et notamment une nanofiltration.

Selon un mode de réalisation, à l'issue de la ou des étapes de concentration, un flux d'acide aminé concentré d'une part et un flux de solution d'éluant d'autre part sont collectés, le procédé comprenant le recyclage de ce flux de solution d'éluant vers la deuxième étape d'élution.

Selon un mode de réalisation, la différence entre le pH de la solution d'éluant utilisée à la deuxième étape et le pH de la première étape est supérieure ou égale à 2, de préférence supérieure ou égale à 4, plus particulièrement supérieure ou égale à 6, et notamment supérieure ou égale à 8.

La présente invention permet de surmonter les inconvénients de l'état de la technique. Elle fournit plus particulièrement un procédé de purification d'acide aminé aromatique amélioré, permettant notamment une séparation entre l'acide aminé cible et des impuretés telles que les sels, les sucres, les couleurs, avec une consommation minimale de produits chimiques.

Cela est accompli grâce à l'utilisation d'une résine cationique forte (résine échangeuse d'ions), qui n'est pas utilisée en mode d'échange d'ions. L'invention repose sur un mode d'élution chromatographique où l'acide aminé aromatique est séparé de sa solution initiale par un phénomène de retardation dû à son affinité avec la résine. Ainsi, l'invention prévoit de mettre en contact l'acide aminé sous forme majoritairement zwitterionique avec la résine (pH supérieur ou égal au pKa de l'acide aminé), puis de l'éluer avec une solution de pH plus élevé.

Le mode opératoire diffère des procédés existants qui mettent en œuvre un phénomène de capture par immobilisation de l'acide aminé, puis de désorption par un éluant de régénération concentré.

Sans vouloir être liés par une théorie, les inventeurs estiment que le mécanisme de séparation mis en œuvre est probablement un phénomène d'adsorption par interaction hydrophobe entre les liaisons Pi du groupement aromatique et/ou du doublet du ou des atomes d'azote présents dans le cycle de l'acide aminé, et les fonctions hydrophobes de la matrice de la résine : la séparation ne consiste donc pas en une séparation par échange d'ions.

La présente invention peut notamment être mise en œuvre avec une solution d'élution diluée et avec un ratio éluant / acide aminé plus faible, ce qui permet de minimiser les consommations chimiques et les quantités d'effluents.

L'invention permet également de mettre en œuvre un mécanisme de purification de façon contrôlée, évitant les variations importantes de rendement et de pureté en acides aminés produits.

5 BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

La **figure 1** représente de manière schématique une installation permettant de mettre en œuvre le procédé selon un mode de réalisation de l'invention.

La **figure 2** illustre l'évolution de la concentration de tryptophane (en g/L, symbole O), de la conductivité (en mS/cm, symbole X) et du taux de matière sèche (en degrés Brix, symbole ■) en fonction du volume injecté (en abscisse, en BV ou « Bed Volumes », c'est-à-dire en multiples du volume de lit) dans une colonne de séparation chromatographique. Les conditions opératoires sont précisées dans l'exemple 1.

La **figure 3** illustre l'évolution de la concentration de tryptophane (en g/L, échelle de gauche, symbole O), de la conductivité (en mS/cm, échelle de gauche, symbole X) et du taux de matière sèche (en degrés Brix, échelle de droite, symbole ■) sur plusieurs colonnes chromatographiques (en abscisse, le numéro de colonne) dans un système de purification de type SSMB. Les conditions opératoires sont précisées dans l'exemple 2.

La **figure 4** illustre l'évolution de la concentration de phénylalanine (en g/L, symbole O), de la conductivité (en mS/cm, symbole X) et du taux de matière sèche (en degrés Brix, symbole ■) en fonction du volume injecté (en abscisse, en BV) dans une colonne de séparation chromatographique. Les conditions opératoires sont précisées dans l'exemple 3.

La **figure 5** illustre l'évolution de la concentration d'histidine (en g/L, symbole O), de la conductivité (en mS/cm, symbole X) et du taux de matière sèche (en degrés Brix, symbole ■) en fonction du volume injecté (en abscisse, en BV) dans une colonne de séparation chromatographique. Les conditions opératoires sont précisées dans l'exemple 5.

DESCRIPTION DE MODES DE REALISATION DE L'INVENTION

L'invention est maintenant décrite plus en détail et de façon non limitative dans la description qui suit.

L'invention permet de collecter sous forme purifiée un acide aminé aromatique présent dans un mélange de départ, généralement une solution aqueuse (moût de fermentation, synthétique, ou issu d'enzymation)

contenant des impuretés de diverses natures : couleur, sels / minéraux, sucres.

Ainsi, selon un mode de réalisation, le mélange de départ contient des sucres, par exemple des nutriments de fermentation (glucose et/ou
5 saccharose, etc.) et/ou des métabolites. La teneur totale en sucres (et en particulier la teneur en monosaccharides et disaccharides) dans le mélange de départ peut ainsi être par exemple de 0,01 à 100 g/L, et de préférence de 0,1 à 15 g/L.

Selon un mode de réalisation, le mélange de départ contient des sels,
10 qui peuvent être des sels minéraux et/ou des sels organiques. La teneur totale en sels dans le mélange de départ peut ainsi être par exemple de 0,01 à 80 g/L, et de préférence de 0,5 à 20 g/L.

La conductivité du mélange de départ peut être par exemple de 1 à 200 mS/cm, de préférence de 2 à 100 mS/cm, et notamment de 5 à
15 50 mS/cm.

Selon un mode de réalisation, le mélange de départ est obtenu à l'issue d'un prétraitement par clarification du bouillon de culture (ou d'enzymation). Cette opération de clarification peut être menée par diverses technologies :

- 20 – Décantation / centrifugation.
- Filtration tangentielle sur membrane organique, plane ou spiralée, avec un seuil de coupure typiquement compris entre 2000 et 300.000 Da.
- Filtration tangentielle sur membrane céramique, avec un seuil de
25 coupure typiquement supérieur à 10.000 Da.
- Filtration sur filtre inox.
- Combinaison des opérations précédentes, l'ordre pouvant être ajusté selon les cas en fonction de la nature du mélange de départ et des objectifs du procédé.

30 L'acide aminé aromatique est de préférence la phénylalanine, le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, ou un dérivé de ceux-ci. On peut également chercher à récupérer un mélange d'acides aminés aromatiques.

L'invention prévoit une séparation chromatographique sur une résine cationique forte. Par « *résine cationique forte* », on entend une résine ayant
35 des fonctions acides greffées qui sont des acides forts.

Selon un mode de réalisation préféré, la « *résine cationique forte* » signifie une résine comportant des fonctions acide sulfonique.

Selon un mode de réalisation, la résine cationique est une résine polystyrène-divinylbenzène (DVB) forte.

Selon un mode de réalisation, la résine est sous forme de particules, dont le diamètre volumique moyen (Dv50) est de préférence de 20 à 600 μm , notamment de 200 à 350 μm . De préférence, la distribution du diamètre volumique des particules de résine présente un seul maximum (distribution monodisperse). Le coefficient d'uniformité de cette distribution peut être par exemple inférieur ou égal à 1,5, ou inférieur ou égal à 1,3, ou inférieur ou égal à 1,15. La distribution de taille des particules de résine peut être déterminée par granulométrie laser (norme NF 13320).

La résine est de préférence une résine macro-réticulée (et donc n'est pas une résine de type gel). Ainsi, selon des modes de réalisation, le taux de réticulation de la résine (taux de DVB lorsque la résine est le copolymère susmentionné) vaut de 5 à 6 % ; ou de 6 à 7 % ; ou de 7 à 8 % ; ou de 8 à 9 % ; ou de 9 à 10 % ; ou de 10 à 11 % ; ou de 11 à 12 %. On définit le taux de réticulation comme le rapport de la quantité de monomères agents de réticulation (par exemple monomères DVB) sur la quantité totale de monomères (par exemple monomères DVB et autres monomères de la résine) qui sont mis en œuvre dans la fabrication de la résine (les quantités étant exprimées en moles).

Selon un mode de réalisation, la résine est sous forme monovalente. Par exemple, elle peut être sous forme Na^+ , K^+ ou de préférence NH_4^+ .

Optionnellement, le procédé de l'invention peut comprendre une étape préliminaire de conditionnement de la résine sous une forme ionique souhaitée, notamment sous forme Na^+ , K^+ ou de préférence NH_4^+ . Cette étape préliminaire peut être effectuée notamment en faisant passer une solution saline ou basique appropriée sur la résine.

Les acides aminés se comportent comme des acides et bases faibles. Ils présentent une constante d'acidité K_a et une constante de basicité K_b . On définit $\text{p}K_a = -\log_{10}(K_a)$ et $\text{p}K_b = -\log_{10}(K_b)$. Le $\text{p}K_a$ et le $\text{p}K_b$ représentent les pH de demi-dissociation, c'est-à-dire les pH auxquels la fonction acide, respectivement la fonction basique, des acides aminés est à moitié ionisée.

On appelle zwitterion la forme de l'acide aminé dans laquelle la fonction acide et la fonction amine (basique) sont ionisées.

Les valeurs de $\text{p}K_a$ et de $\text{p}K_b$ pour les quatre acides aminés aromatiques susmentionnés sont les suivantes :

- Phénylalanine : $\text{p}K_a = 1,8$ et $\text{p}K_b = 9,1$.
- Tryptophane : $\text{p}K_a = 2,4$ et $\text{p}K_b = 9,4$.

- Tyrosine : $pK_a = 2,2$ et $pK_b = 9,1$.
- Histidine : $pK_a = 1,8$ et $pK_b = 9,2$.

L'invention prévoit une étape de mise en contact d'un mélange de départ (ou charge, ou produit d'alimentation) avec une résine chromatographique, puis une étape d'élution.

Dans la première étape, le pH est supérieur ou égal au pK_a de l'acide aminé aromatique recherché (ou aux pK_a des acides aminés aromatiques recherchés, s'il y en a plusieurs), afin d'assurer que l'acide aminé soit d'une façon significative sous forme de zwitterion.

Selon certains modes de réalisation, le pH lors de la première étape est supérieur ou égal à $pK_a + 0,5$; ou supérieur ou égal à $pK_a + 1$; ou supérieur ou égal à $pK_a + 1,5$; ou supérieur ou égal à $pK_a + 2$; ou supérieur ou égal à $pK_a + 2,5$; ou supérieur ou égal à $pK_a + 3$.

Il faut noter que le pH lors de la première étape peut également être inférieur ou égal à $pK_a + 3$; ou inférieur ou égal à $pK_a + 2,5$; ou inférieur ou égal à $pK_a + 2$; ou inférieur ou égal à $pK_a + 1,5$; ou inférieur ou égal à $pK_a + 1$; ou inférieur ou égal à $pK_a + 0,5$.

Selon certains modes de réalisation, le pH lors de la première étape est inférieur ou égal à $pK_b - 3$; ou inférieur ou égal à $pK_b - 3,5$; ou inférieur ou égal à $pK_b - 4$; ou inférieur ou égal à $pK_b - 4,5$; ou inférieur ou égal à $pK_b - 5$; ou inférieur ou égal à $pK_b - 5,5$; ou inférieur ou égal à $pK_b - 6$.

Par exemple, le pH lors de la première étape peut être compris entre pK_a et $pK_b - 3$, ou entre pK_a et $pK_b - 4$, ou entre pK_a et $pK_b - 5$, ou entre pK_a et $pK_b - 6$.

Selon certains modes de réalisation, le pH lors de la première étape vaut de 1,8 à 1,9 ; ou de 1,9 à 2,0 ; ou de 2,0 à 2,1 ; ou de 2,1 à 2,2 ; ou de 2,2 à 2,3 ; ou de 2,3 à 2,4 ; ou de 2,4 à 2,5 ; ou de 2,5 à 2,6 ; ou de 2,6 à 2,7 ; ou de 2,7 à 2,8 ; ou de 2,8 à 2,9 ; ou de 2,9 à 3,0 ; ou de 3,0 à 3,2 ; ou de 3,2 à 3,4 ; ou de 3,4 à 3,6 ; ou de 3,6 à 3,8 ; ou de 3,8 à 4,0 ; ou de 4,0 à 4,5 ; ou de 4,5 à 5,0 ; ou de 5,0 à 5,5 ; ou de 5,5 à 6,0 ; ou de 6,0 à 6,5 ; ou de 6,5 à 7,0.

Le pH de la charge (mélange de départ) peut être ajusté avant la mise en contact avec la résine par ajout d'acide ou de base.

Dans la deuxième étape, l'éluant est une solution aqueuse présentant un pH supérieur à celui de la première étape. L'éluant peut être une solution aqueuse basique, telle qu'une solution de NH_3 ou NaOH notamment.

La différence de pH entre la deuxième étape et la première étape (ΔpH) peut valoir de 0,5 à 1,0 ; ou de 1,0 à 1,5 ; ou de 1,5 à 2,0 ; ou de 2,0 à

2,5 ; ou de 2,5 à 3,0 ; ou de 3,0 à 3,5 ; ou de 3,5 à 4,0 ; ou de 4,0 à 4,5 ; ou de 4,5 à 5,0 ; ou de 5,0 à 5,5 ; ou de 5,5 à 6,0 ; ou de 6,0 à 6,5 ; ou de 6,5 à 7,0 ; ou de 7,0 à 7,5 ; ou de 7,5 à 8,0 ; ou de 8,0 à 8,5 ; ou de 8,5 à 9,0 ; ou de 9,0 à 9,5 ; ou de 9,5 à 10,0 ; ou de 10,0 à 10,5 ; ou de 10,5 à 11,0 ; ou de 11,0 à 11,5 ; ou de 11,5 à 12,0.

Le pH de l'éluant (deuxième étape) peut valoir notamment de 7,0 à 7,5 ; ou de 7,5 à 8,0 ; ou de 8,0 à 8,5 ; ou de 8,5 à 9,0 ; ou de 9,0 à 9,5 ; ou de 9,5 à 10,0 ; ou de 10,0 à 10,5 ; ou de 10,5 à 11,0 ; ou de 11,0 à 11,5 ; ou de 11,5 à 12,0 ; ou de 12,0 à 12,5 ; ou de 12,5 à 13,0 ; ou de 13,0 à 13,5 ; ou de 13,5 à 14,0.

L'éluant peut être une solution d'une base dans l'eau, par exemple NaOH ou NH_3 , à une concentration de 0,001 à 0,01 g/L ; ou de 0,01 à 0,1 g/L ; ou de 0,1 à 0,5 g/L ; ou de 0,5 à 1 g/L ; ou de 1 à 2 g/L ; ou de 2 à 3 g/L ; ou de 3 à 4 g/L ; ou de 4 à 5 g/L ; ou de 5 à 6 g/L ; ou de 6 à 7 g/L ; ou de 7 à 8 g/L ; ou de 8 à 9 g/L ; ou de 9 à 10 g/L ; ou de 10 à 15 g/L ; ou de 15 à 20 g/L ; ou de 20 à 25 g/L ; ou de 25 à 50 g/L ; ou de 50 à 100 g/L.

Selon un mode de réalisation, le nombre de moles de base utilisée pour l'élution, rapporté au nombre de moles d'acide aminé injecté, est inférieur ou égal à 3 ; ou inférieur ou égal à 2 ; ou inférieur ou égal à 1,5 ; ou inférieur ou égal à 1 ; ou inférieur ou égal à 0,9 ; ou inférieur ou égal à 0,8 ; ou inférieur ou égal à 0,7 ; ou inférieur ou égal à 0,6 ; ou inférieur ou égal à 0,5 ; ou inférieur ou égal à 0,4.

L'élution est de préférence isocratique, c'est-à-dire que la composition de l'éluant ne varie pas dans le temps.

Dans un mode de réalisation préféré, le cation de la base utilisée pour l'élution est le cation de la résine. Ainsi, par exemple, si la résine est sous forme Na^+ , l'éluant peut être une solution de NaOH ; si la résine est sous forme K^+ , l'éluant peut être une solution de KOH ; et si la résine est sous forme NH_4^+ , l'éluant peut être une solution d'ammoniac.

L'élution par la base permet de maintenir la forme ionique de la résine, qui pourrait sinon être modifiée par les sels minéraux présents dans solution de charge. En outre, sans vouloir être tenu par une théorie, les inventeurs font l'hypothèse d'un effet de charge osmotique sur la résine, qui tend également à libérer les espèces adsorbées.

L'acide aminé aromatique recherché présente une affinité plus forte pour la résine que la plupart des autres impuretés. On récupère donc les impuretés (par exemple sucres et sels) dans la fraction raffinat, tandis que l'acide aminé est récupéré dans l'extrait.

Selon un mode de réalisation, la teneur massique totale en sucres (en particulier en monosaccharides et disaccharides) dans l'extrait est réduite d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, ou d'au moins 95 %, ou d'au moins 98 %, ou d'au moins 99 %, ou d'au moins 99,5 %, ou d'au moins 99,9 %, par rapport à la teneur massique totale en sucres (en particulier e, monosaccharides et disaccharides) dans le mélange de départ. De préférence, l'extrait (flux enrichi en l'acide aminé) est dépourvu ou essentiellement dépourvu de sucres (en particulier de monosaccharides et disaccharides).

Selon un mode de réalisation, la teneur massique totale en sels dans l'extrait est réduite d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, ou d'au moins 95 %, ou d'au moins 98 %, ou d'au moins 99 %, ou d'au moins 99,5 %, ou d'au moins 99,9 %, par rapport à la teneur massique totale en sucres (en particulier de monosaccharides et disaccharides) dans le mélange de départ. De préférence, l'extrait (flux enrichi en l'acide aminé) est dépourvu ou essentiellement dépourvu de sels.

Selon un mode de réalisation, certaines impuretés très retenues peuvent être désorbées par une élution complémentaire par un éluant aqueux, salin ou polaire.

Selon un mode de réalisation, aucun rinçage intermédiaire n'est prévu entre l'étape de mise en contact et l'étape d'élution. L'injection de l'éluant suit ainsi directement l'injection du mélange de départ.

Selon un mode de réalisation, l'acide aminé récupéré dans l'extrait issu de la séparation chromatographique subit des traitements complémentaires, tels que :

- Décoloration sur charbon.
- Déminéralisation.
- Concentration sur membrane de type osmose inverse ou nanofiltration.
- Evaporation ou évaporation multi-effets, ce qui permet d'optimiser les consommations énergétiques.
- Cristallisation.
- Combinaison des opérations précédentes, l'ordre pouvant être ajusté selon les cas en fonction de la nature du mélange de départ et les objectifs du procédé.

Selon un mode de réalisation préféré, l'éluant (de préférence une solution de NH_3) est séparé de l'acide aminé et récupéré lors des étapes de

post-traitement susmentionnées, afin d'être recyclé en tête du procédé de séparation chromatographique.

Le procédé selon l'invention peut être discontinu (« batch »), semi-continu ou continu. De préférence, il est semi-continu ou continu.

5 La séparation chromatographique selon l'invention peut être mise en œuvre dans une unité chromatographique à lit statique ou, de préférence, dans une unité chromatographique à lit non-statique.

Dans un système chromatographique à lit statique, le mélange de composés à séparer percole dans une enceinte (ou colonne), généralement cylindrique. La colonne contient un lit de matériau poreux (phase stationnaire) perméable aux fluides. La vitesse de percolation de chaque composé dans le mélange dépend des propriétés physiques du composé. Les composés les plus retenus sur la phase stationnaire percolent plus lentement que les composés les moins retenus sur la phase stationnaire. Ce principe permet d'effectuer la séparation souhaitée.

Il est possible d'effectuer un tel traitement dans plusieurs colonnes en série ou en parallèle, mais généralement une séparation chromatographique dans un système à lit statique est mise en œuvre avec une colonne unique.

Des exemples de tels systèmes chromatographiques à lit statique sont les systèmes HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) ou CYCLOJET™ (système avec recyclage à l'état stationnaire).

Le système CYCLOJET™ est tel que décrit dans le document US 6,063,284, auquel il est fait expressément référence. Il s'agit d'un système de séparation chromatographique discontinue à colonne unique, dans lequel les espèces (i) les plus retenues puis (ii) les moins retenues sont collectées séparément à la sortie de la colonne, la portion non-séparée du chromatogramme étant recyclée par la pompe principale, et le mélange à séparer étant périodiquement injecté au moyen d'une boucle d'injection située essentiellement au milieu de la portion recyclée du chromatogramme. Après plusieurs cycles chromatographiques, le procédé atteint un état stationnaire périodique dans lequel la quantité de produits injectés est égale à la quantité de produits séparés collectés séparément à la sortie de la colonne.

Une variante du système CYCLOJET™ utilisant deux colonnes est décrite dans le document US 5,630,943, auquel il est fait expressément référence.

Un système à lit non-statique est un système multi-colonnes, dans lequel les positions relatives du lit de phase stationnaire et des points d'injection ou de collecte des flux se déplacent au cours du temps.

Des exemples de tels systèmes chromatographiques à lit non-statique sont les systèmes SMB (lit mobile simulé), iSMB (lit mobile simulé amélioré), SSMB (lit mobile simulé séquentiel), AMB (lit mobile réel), VARICOL™, MODICON™, POWERFEED™, MCSGP ou GSSR (chromatographie de gradient multi-colonnes).

Un système SMB comprend une pluralité de colonnes individuelles contenant un adsorbant, qui sont connectées en série. Un flux d'éluant traverse les colonnes selon une première direction. Les points d'injection du flux d'alimentation et de l'éluant, ainsi que les points de collecte des composés séparés, sont décalés périodiquement et simultanément au moyen d'un ensemble de vannes. L'effet global est de simuler le fonctionnement d'une colonne unique contenant un lit mobile d'adsorbant solide, l'adsorbant solide se déplaçant dans une direction à contre-courant du flux d'éluant. Ainsi, un système SMB est composé de colonnes qui contiennent des lits stationnaires d'adsorbant solide à travers lesquels passe l'éluant, mais le fonctionnement est tel qu'un lit mobile continu à contre-courant est simulé.

La forme la plus conventionnelle d'un système SMB est le système SMB à quatre zones. D'autres formes possibles sont les systèmes SMB à trois zones et les systèmes SMB à deux zones (tels que décrits dans l'article « Two Section Simulated Moving Bed Process » de Kwangnam Lee, dans Separation Science and Technology 35(4):519-534, 2000, auquel il est fait expressément référence).

Dans les systèmes iSMB et SSMB, il y a au moins une étape dans laquelle le système fonctionne en boucle fermée, sans entrée ou sortie de produit.

Un système iSMB est tel que décrit dans les documents EP 0342629 et US 5,064,539, auxquels il est fait expressément référence.

Un système SSMB découpe les introductions et collectes des flux en sous séquences appliquées de façons périodiques.

D'autres variantes des systèmes SMB sont : le système SMB variant dans le temps et le système POWERFEED™, tels que décrits dans le document US 5,102,553 et dans l'article « PowerFeed operation of simulated moving bed units: changing flow-rates during the switching interval », de Zhang et al. dans Journal of Chromatography A, 1006:87-99, 2003, auxquels

il est fait expressément référence; le système MODICON™, tel que décrit dans le document US 7,479,228, auquel il est fait expressément référence ; et le système SMB avec recirculation interne, tel que décrit dans le document US 8,282,831, auquel il est fait expressément référence.

5 Un système AMB présente un fonctionnement similaire à un système SMB. Toutefois, au lieu de déplacer les points d'injection du flux d'alimentation et de l'éluant, ainsi que des points de collecte, au moyen d'un système de vannes, un ensemble d'unités d'adsorption (colonnes) sont déplacées physiquement par rapport aux points d'alimentation et de collecte.
10 A nouveau, le fonctionnement permet de simuler un lit mobile continu à contre-courant.

Un système de chromatographie VARICOL™ est tel que décrit dans les documents US 6,136,198, US 6,375,839 US 6,413,419 et US 6,712,973, auxquels il est fait expressément référence. Un système VARICOL™
15 comprend une pluralité de colonnes individuelles contenant un adsorbant qui sont reliées en série. On fait passer un éluant dans les colonnes selon une première direction. Contrairement au système SMB, les points d'injection pour le mélange à séparer et pour l'éluant et les points de collecte des composés séparés dans le système sont déplacés périodiquement mais de
20 manière asynchrone, au moyen d'un ensemble de vannes. L'effet global est de créer des zones de séparation de longueur variable dans le temps, allouant ainsi la phase stationnaire de manière dynamique dans les zones où elle est la plus utile, et permettant une puissance de séparation similaire avec moins d'unités de séparation chromatographique et une productivité
25 accrue. Contrairement à un système SMB, un système VARICOL™ ne simule pas le fonctionnement d'une colonne unique contenant un lit mobile d'adsorbant solide, l'adsorbant solide se déplaçant dans une direction à contre-courant du flux d'éluant, et ainsi le principe de fonctionnement du VARICOL™ ne peut pas être mis en œuvre dans un système AMB
30 équivalent.

Un exemple préféré de lit mobile simulé est représenté en référence à la **figure 1**, sous la forme d'un système de chromatographie de type lit mobile simulé séquentiel (SSMB) sur six cellules ou colonnes. Ce système peut être opéré selon un fonctionnement cyclique en quatre phases.

35 – Phase n°1 (partie A de la figure) : phase de boucle, durant laquelle on maintient une circulation continue en boucle fermée sur toutes les cellules placées en série, pour déplacer le volume interstitiel d'une cellule vers la suivante, sans injection d'éluant.

- Phase n°2 (partie B de la figure) : charge / injection de charge. La charge (F) est injectée en tête de la quatrième cellule. Simultanément, on collecte un volume sensiblement identique de raffinat (R) en sortie de la cinquième cellule. Les cellules 4 et 5 constituent ici la zone 3. Les cellules 2 et 3 constituent la zone de séparation entre extrait et injection de charge. Elles constituent ici la zone 2.
- Phase n°3 (partie B de la figure) : élution de l'extrait. L'éluant (EL) est injecté sur la première cellule pour éluer l'extrait (EX), qui est collecté en volume sensiblement identique au bas de la première cellule. La cellule n°1 constitue ici la zone 1.
- Les phases n°2 et 3 sont de préférence opérées simultanément pour accroître la productivité du système.
- Phase n°4 : élution du raffinat. L'éluant (EL) est injecté en tête de la première cellule, et le raffinat (R) est collecté en volume sensiblement identique sortie de la cinquième. La cellule n°6 est ici une cellule tampon permettant d'assurer la séparation entre la queue de l'extrait et la tête du raffinat. Elle constitue la zone 4. Cette zone peut être omise dans le cas où le degré de pureté et/ou le rendement recherché est relativement limité.

Ces phases sont opérées dans l'ordre dans un mode de réalisation préféré, de 1 à 4. Leur enchaînement constitue une séquence complète.

Chaque séquence (phases n°1 à 4) est répétée six fois en décalant les entrées et sorties de cellules par incrémentation du numéro de cellule, de la gauche vers la droite du système : la charge est ainsi injectée en haut de cellule n°1 en séquence n°1, puis en haut de cellule n°2 en séquence n°2, etc.

Un cycle de production complet est réalisé après achèvement des six séquences successives, quand le point d'injection de la charge, initialement en entrée de cellule n°1, revient de nouveau en entrée de cellule n°1.

Dans ce qui précède, on a donné une description du système SSMB en référence au cas où les cellules correspondent à des colonnes. Ceci n'est pas limitatif, et l'invention s'applique aussi aux systèmes dans lesquels les cellules, ou encore compartiments, sont des parties de colonne.

Par ailleurs, le nombre de colonnes présentes en zones 1, 2, 3 et 4 peut varier en fonction de la qualité de séparation désirée. On peut donc concevoir des systèmes du même type avec une cellule, deux cellules, trois cellules, quatre cellules et jusqu'à douze cellules ou plus.

Le procédé peut encore être mis en œuvre dans une installation multi-colonnes non continue à boucle fermée ou à boucle ouverte, telle que le système DCC décrit dans le brevet WO 2007/012750.

5 Selon un mode de réalisation, une installation multi-colonnes (notamment du type SMB ou analogue) contient une ou plusieurs zones de nettoyage, permettant de déconnecter une colonne de la boucle de séparation, afin de désorber périodiquement des composés (impuretés) fortement adsorbés, puis de régénérer et rééquilibrer l'adsorbant avec l'éluant de la séparation.

10

EXEMPLES

Les exemples suivants illustrent l'invention sans la limiter.

Exemple 1 – étude de la rétention du tryptophane

15 Dans cet exemple, on traite un moût de fermentation de tryptophane, prétraité par ajustement à pH = 2,6, puis microfiltration et diafiltration sur membranes céramiques.

Le produit est traité sur une résine Applexion® XA2014-22 sur un volume de 30 mL par colonne (dans cet exemple, 30 mL représente 1BV où
20 BV signifie le volume de lit, ou Bed Volume, de résine). La résine est une résine cationique forte, de type polymérique polystyrène-DVB avec 8 % de DVB, de granulométrie monodisperse 220 µm, et de capacité d'échange ionique 1,8 eq/L_{resine}. La résine est préalablement convertie sous la forme Na à l'aide d'une solution de soude à 4 %.

25 Le mélange de départ pour l'étape de chromatographie contient 17,5 g/L de tryptophane, 3,7 g/L de sucres résiduels, et présente une conductivité de 18,5 mS/cm induite par les sels en solution.

Ce mélange est injecté en excès sur la résine. Lors de la phase d'injection, on observe une différence de comportement des différentes
30 espèces sur la résine :

- Les impuretés salines ne sont pas retenues sur la résine: on estime qu'un phénomène d'exclusion d'ions entre leur charge ionique et les charges de la résine empêche leur pénétration au sein de la matrice. Une conductivité identique à celle du mélange
35 de départ est mesurée en sortie de colonne pendant l'étape d'élution.

- Les sucres, espèces neutres, peuvent pénétrer dans la matrice de la résine, et sont légèrement ralentis, mais non retenus : ils sont co-élués avec les sels pendant la phase d'injection.
- Le tryptophane, injecté majoritairement sous forme zwitterionique à pH = 2,6 subit quant à lui un phénomène de retardation par interaction entre son groupe aromatique et ceux de la résine.

L'élution du tryptophane ainsi retenu est obtenue avec une concentration de soude de 4 g/L, à 2 BV/h.

La **figure 2** représente l'évolution des concentrations en un point du système qui voit se dérouler l'ensemble des étapes de séparation, du début de l'élution du raffinat à la fin de rinçage de l'extrait. La phase A est la phase d'injection du mélange de départ, la phase B est la phase d'élution avec la solution de soude.

Ce système permet d'opérer avec les performances suivantes :

- 205,6 g de tryptophane traité par litre de résine sur un cycle de production de 8 heures ;
- concentration < 100 μ S / cm pendant la collecte de l'extrait de tryptophane, correspondant à 99,5 % de déminéralisation.

Exemple 2 – séparation multi-colonnes du tryptophane

Dans cet exemple, l'invention est appliquée en mode chromatographique sur un système continu et multi-colonnes à un moût de fermentation à pH = 4 contenant du tryptophane à 40 g/L. Les impuretés principales sont des résidus de substrats, des minéraux, ainsi que des résidus solides de métabolisme cellulaire.

Le pH du moût est ici ajusté à 2,7 par ajout de H₂SO₄. A ce pH supérieur au pKa, le tryptophane se trouve sous une forme majoritairement zwitterionique.

Il est ensuite clarifié par microfiltration tangentielle sur une membrane céramique. Les matières solides en suspension sont retenues par la membrane et concentrées dans une fraction dénommée rétentat. Le tryptophane, ainsi que la majorité des impuretés solubles, sont transportés, quant à eux, à travers la membrane vers une fraction appelée perméat.

En fin de concentration, un ajout d'eau dans le compartiment rétentat permet de diluer puis de reconcentrer le rétentat : cette opération, dite de diafiltration, permet d'augmenter le rendement global en tryptophane en diminuant sa teneur résiduelle dans le compartiment rétentat.

Le perméat de microfiltration ainsi traité contient 98 % du tryptophane initialement présent dans le moût, à une concentration de 15 g/L. Les impuretés y sont présentes à hauteur de 25 g/L de sels minéraux : sa conductivité vaut 15,9 mS/cm. On mesure également un taux de sucres de 3 g/L.

Ce perméat est utilisé comme produit d'alimentation du système SSMB décrit ci-dessus.

Suivant le principe du SSMB préalablement exposé, le système utilisé dans ce cas précis est constitué de 9 cellules de séparation, mises en œuvre sous forme de colonnes, et réparties comme suit :

- Zone 1 : trois colonnes = zone d'élution du tryptophane ;
- Zone 2 : deux colonnes = zone de séparation ;
- Zone 3 : trois colonnes = zone de ralentissement du tryptophane ;
- Zone 4 : une colonne = zone de boucle.

Chaque colonne contient 475 mL de résine Applexion® XA2014-22. On définit ainsi la taille d'un volume de lit, ou Bed Volume : 1 BV = 475 mL.

La résine est initialement conditionnée sous forme NH_4^+ par percolation d'ammoniaque NH_3 de concentration 3 N.

On opère le système à 4,5 BV/h.

Le produit d'alimentation est injecté en tête de zone 3. A chaque période de production sont injectés 7,5 BV de produit d'alimentation. Sur trois colonnes, le tryptophane est ralenti par phénomène de retardation sur la résine, et ainsi séparé des impuretés qui sont éluées et collectées, en sortie de zone, dans une fraction dite « raffinat ». La majorité des impuretés (sels et sucres) sont éluées dans ce raffinat : sa conductivité vaut 17,6 mS/cm.

Le système est réglé de telle manière que 0,1 % du tryptophane initial est élué dans la fraction raffinat.

En tête de zone 1 est injecté de l'ammoniaque dilué à 2 g/L (éluant) qui permet de désorber le tryptophane. A chaque période de production sont injectés 5 BV d'éluant. Le tryptophane est récupéré lors de cette élution dans une fraction dite « *extrait* ». La conductivité de l'extrait est inférieure à 200 $\mu\text{S/cm}$: celui-ci est déminéralisé à hauteur de 98,8 % par rapport au produit d'alimentation. On mesure également une réduction de 89 % des sucres résiduels, et de 75 % de la couleur.

Une très faible quantité d'éluant ammoniacal est utilisé : le ratio éluant / produit d'alimentation vaut 0,67 (volume / volume). Aussi, un phénomène de concentration est observé pendant cette opération : le tryptophane est élué à 20 g/L (contre 15 g/L dans le produit d'alimentation). Plus de 99 % du

tryptophane initial est récupéré dans l'extrait au cours de cette étape. A chaque séquence du cycle SSMB, la quantité de NH_3 utilisée est de 0,59 mol par L de résine, pour une quantité de tryptophane injectée de 1,47 mol / L de résine (soit 0,4 mole NH_3 par mole de tryptophane) : ceci démontre que le

Le profil mesuré dans les neuf colonnes, en régime permanent, et pendant une étape de boucle, est représenté sur la **figure 3**.

Y sont représentés les profils de concentrations en tryptophane, de Brix (représentatif de la concentration de matière sèche) et de conductivité (représentatif de la concentration en impuretés salines). On observe ainsi la séparation entre la zone d'élution du tryptophane (zone 1, colonnes n°2, 3 et 4) et la zone de collecte du raffinat (zone 3, colonnes n°7, 8 et 9).

Exemple 3 – étude de la rétention de la phénylalanine

Cet exemple est mis en œuvre à partir d'un moût de fermentation de phénylalanine, prétraité par ajustement à $\text{pH}=2$, puis microfiltration sur membranes céramiques.

Le produit est traité sur une résine Applexion® XA2014-22, sur un volume de 30 mL par colonne = 1 BV. La résine est préalablement convertie sous la forme NH_4^+ à l'aide de NH_3 à 3%, rincée, puis équilibrée par passage de NH_3 à 2 g/L.

Le produit d'alimentation de chromatographie contient 32,76 g/L de phénylalanine et présente une conductivité de 36,8 mS/cm due à la concentration saline du milieu.

Le produit d'alimentation est injecté en excès sur la résine, à 4 BV/h : on observe un phénomène de rétention de phénylalanine par rapport aux sels et aux sucres, puis une fuite de l'acide aminé. Une fois la concentration en sortie égale à la concentration d'entrée en acide aminé, l'injection de produit d'alimentation est arrêtée.

L'élution de phénylalanine est faite avec une concentration de NH_3 de 2 g/L, à 4 BV/h.

La **figure 4** représente l'évolution des concentrations en un point du système qui voit se dérouler l'ensemble des étapes de séparation, du début de l'élution raffinat à la fin de rinçage de l'extrait. La phase A est la phase d'injection du mélange de départ, la phase B est la phase d'élution avec la solution de NH_3 .

Ce système permet d'opérer avec les performances suivantes :

- 169 g de phénylalanine traité par litre de résine sur un cycle de production de 6,75 heures.
- concentration d'environ 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pendant la collecte de l'extrait de phénylalanine, correspondant à 98,5% de déminéralisation.

5

Exemple 4 – étude de la rétention de l'histidine

Cet exemple est mis en œuvre à partir d'une solution d'histidine à 12,98 g/L, de conductivité 17,48 mS/cm et contenant 3,9 g/L de sucres. La solution est préalablement ajustée à $\text{pH} = 2,7$ par ajout d' H_2SO_4 .

10 Le produit est traité sur une résine Applexion® XA2014-22, sur un volume de 17 mL par colonne (= 1 BV). La résine est préalablement convertie sous la forme NH_4^+ à l'aide de NH_3 à 3%, rincée, puis équilibrée par passage de NH_3 à 2 g/L.

15 Le produit d'alimentation est injecté en excès sur la résine, à 2 BV/h : on observe un phénomène de rétention de l'histidine, puis une fuite de l'acide aminé. Une fois la concentration en sortie égale à la concentration d'entrée en acide aminé, l'injection de produit d'alimentation est arrêtée.

L'élution de l'histidine est faite avec une concentration de NH_3 de 2 g/L, à 2 BV/h.

20 La **figure 5** représente l'évolution des concentrations en un point du système qui voit se dérouler l'ensemble des étapes de séparation, du début de l'élution raffinat à la fin de rinçage de l'extrait. La phase A est la phase d'injection du mélange de départ, la phase B est la phase d'élution avec la solution de NH_3 .

25 Ce système permet d'opérer avec les performances suivantes :

- 120 g d'histidine traité par litre de résine sur un cycle de production de 30 heures.
- Concentration d'environ 220 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pendant la collecte de l'extrait de phénylalanine, correspondant à 98,8% de déminéralisation.

30

REVENDEICATIONS

- 5 **1.** Procédé de purification d'un acide aminé à partir d'un mélange de départ, dans lequel l'acide aminé comporte un cycle aromatique et présente une constante d'acidité K_a , le procédé comprenant :
- 10 – une première étape de mise en contact du mélange de départ avec une résine cationique forte, à un pH supérieur ou égal à pK_a ;
- une deuxième étape d'élution avec une solution aqueuse d'éluant présentant un pH supérieur au pH de la première étape, permettant de collecter un flux enrichi en l'acide aminé.
- 15 **2.** Procédé selon la revendication 1, dans lequel le mélange de départ comprend en outre des sucres et/ou des sels, et dans lequel le flux enrichi en l'acide aminé comporte moins de sucres et/ou de sels que le mélange de départ.
- 20 **3.** Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la deuxième étape d'élution est une étape d'élution isocratique.
- 25 **4.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel l'acide aminé présente une constante de basicité K_b , et dans lequel, lors de la première étape, le pH est inférieur ou égal à pK_b-3 , de préférence inférieur ou égal à pK_b-4 , de manière plus particulièrement préférée inférieur ou égal à pK_b-5 et idéalement inférieur ou égal à pK_b-6 .
- 30 **5.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel la deuxième étape d'élution est effectuée directement à la suite de la première étape de mise en contact, sans rinçage intermédiaire.
- 35 **6.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel la solution d'éluant est une solution d'une base dans l'eau, la base étant de préférence de la soude, de la potasse, de l'ammoniac

ou un mélange de ceux-ci, et de manière plus particulièrement préférée de l'ammoniac.

- 5 **7.** Procédé selon la revendication 6, dans lequel la concentration de la base dans la solution d'éluant est de 0,01 à 50 g/L, de préférence de 0,2 à 20 g/L, plus particulièrement de 0,5 à 10 g/L, et tout particulièrement de 1 à 5 g/L.
- 10 **8.** Procédé selon l'une des revendications 6 ou 7, dans lequel le rapport du nombre de moles de base dans la solution d'éluant utilisée à la deuxième étape sur le nombre de moles d'acide aminé dans le mélange de départ mis en contact à la première étape est inférieur ou égal à 3, de préférence inférieur ou égal à 2, plus particulièrement inférieur ou égal à 1, et idéalement
- 15 inférieur ou égal à 0,5.
- 9.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, dans lequel l'acide aminé est le tryptophane ou la phénylalanine ou la tyrosine ou l'histidine.
- 20 **10.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, dans lequel la résine cationique forte est un copolymère polystyrène-divinylbenzène.
- 25 **11.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, dans lequel la résine cationique forte présente un taux de réticulation de 5 à 12 %, de préférence de 6 à 11 %, plus particulièrement de 7 à 10 %, de préférence de 8 à 9 %.
- 30 **12.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, dans lequel la résine cationique forte est sous forme cationique monovalente, de préférence sous forme Na^+ ou K^+ ou NH_4^+ , et de manière plus particulièrement préférée sous forme NH_4^+ .
- 35 **13.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, qui est mis en œuvre dans une installation chromatographique multi-colonnes, l'installation comportant de préférence 30 colonnes au plus, de manière plus particulièrement préférée 20 colonnes au plus, ou

12 colonnes au plus, ou 8 colonnes au plus, ou 6 colonnes au plus.

- 5 **14.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, qui est mis en œuvre dans une installation chromatographique à lit non-statique, et de préférence dans une installation chromatographique à lit mobile simulé, ou à lit mobile réel, ou à lit mobile simulé amélioré, ou à lit mobile simulé séquentiel, et de préférence à lit mobile simulé séquentiel.
- 10 **15.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, dans lequel le mélange de départ est obtenu à l'issue du traitement d'un mélange brut, le mélange brut étant de préférence un moût fermentaire, synthétique ou enzymatique, et ledit traitement
- 15 comportant de préférence une ou plusieurs étapes choisies parmi une centrifugation, une filtration frontale, une cristallisation, une filtration tangentielle, une microfiltration et une ultrafiltration.
- 20 **16.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, comprenant une ou plusieurs étapes de concentration du flux enrichi en l'acide aminé, de préférence choisies parmi une concentration par évaporation et notamment par évaporation à film tombant, une concentration par évaporation multi-effets, une concentration
- 25 membranaire et notamment une nanofiltration.
- 30 **17.** Procédé selon la revendication 16, dans lequel, à l'issue de la ou des étapes de concentration, un flux d'acide aminé concentré d'une part et un flux de solution d'éluant d'autre part sont collectés, le procédé comprenant le recyclage de ce flux de solution d'éluant vers la deuxième étape d'élution.
- 35 **18.** Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, dans lequel la différence entre le pH de la solution d'éluant utilisée à la deuxième étape et le pH de la première étape est supérieure ou égale à 2, de préférence supérieure ou égale à 4, plus particulièrement supérieure ou égale à 6, et notamment supérieure ou égale à 8.
- 40

1 / 3

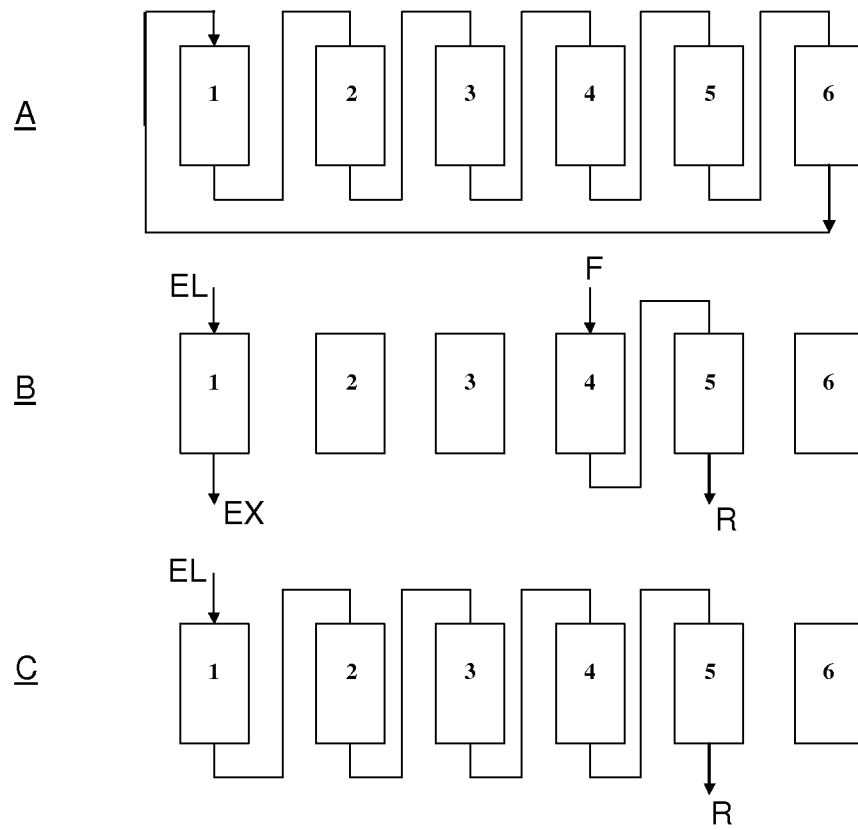


Fig. 1

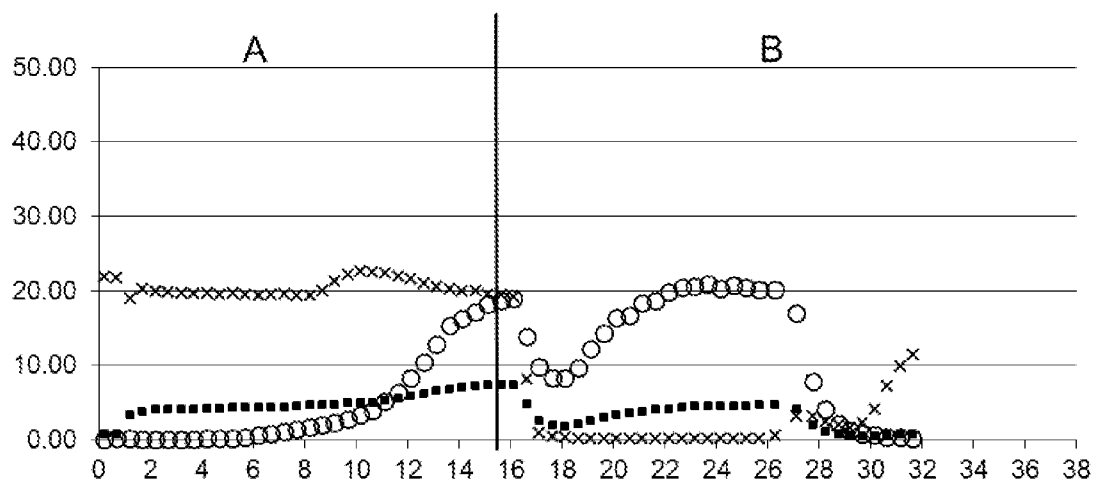


Fig. 2

2 / 3

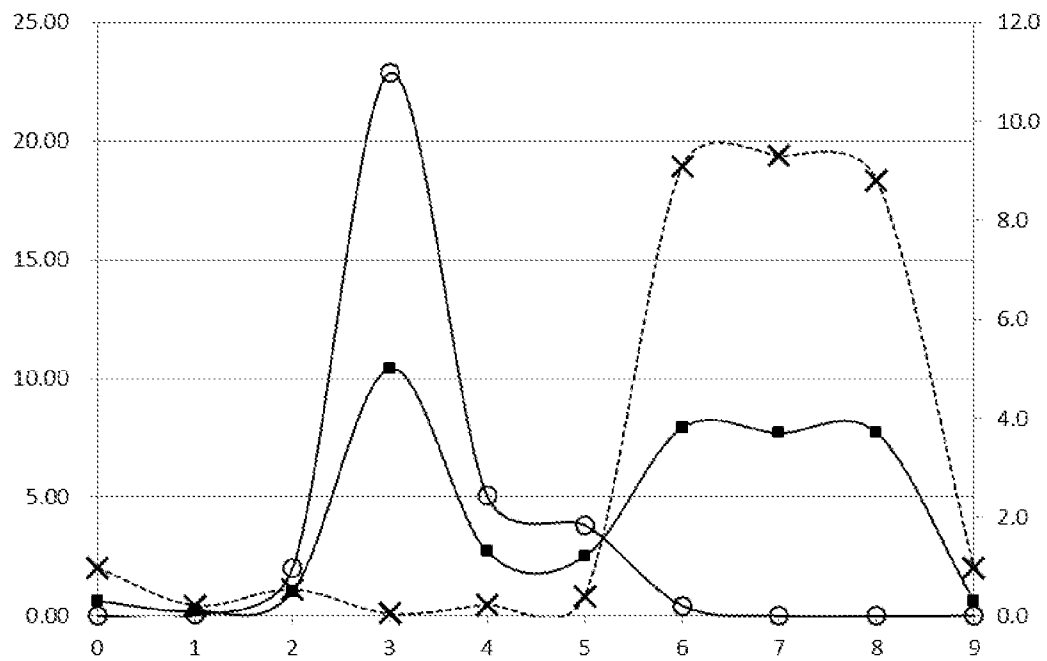


Fig. 3

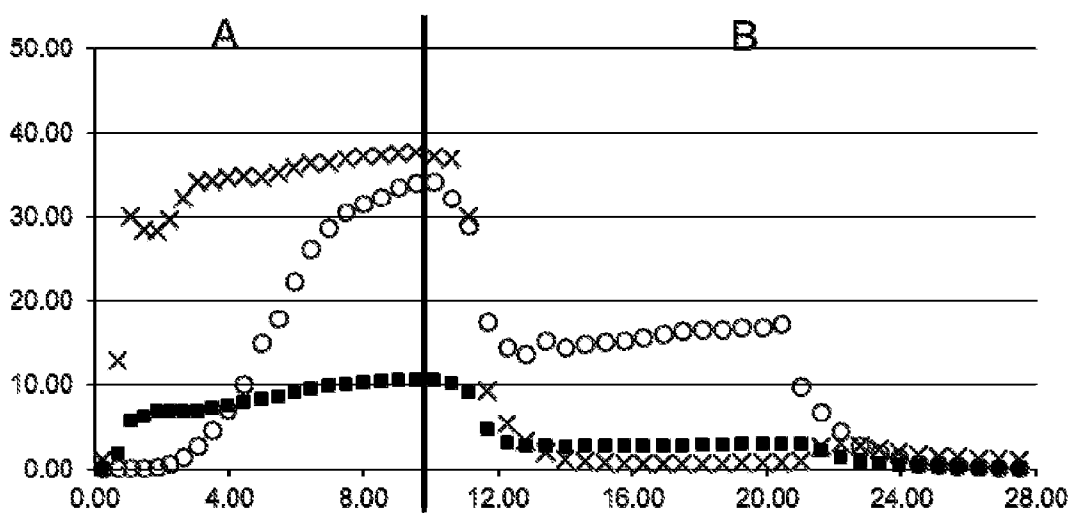


Fig. 4

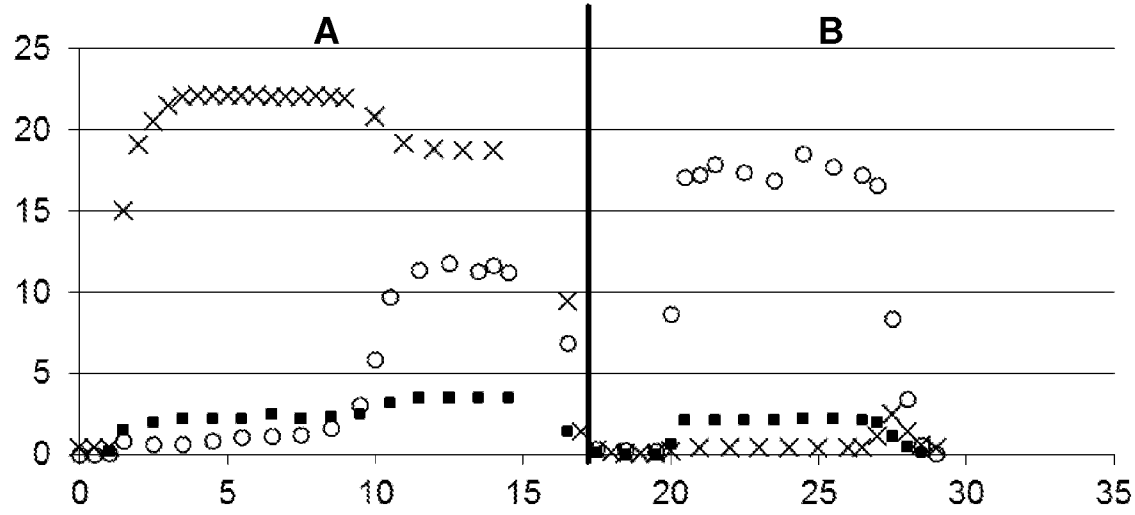


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/050015

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D233/64 C07C227/40 C07D209/20
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 200 944 A2 (MITSUI TOATSU CHEMICALS [JP]) 12 November 1986 (1986-11-12) page 8, last paragraph - page 9, paragraph 2; claims 1-3; examples -----	1-18
X	FR 2 557 872 A1 (MITSUI TOATSU CHEMICALS [JP]) 12 July 1985 (1985-07-12) claim; examples -----	1-18
X	EP 0 027 874 A1 (DEGUSSA [DE]) 6 May 1981 (1981-05-06) claim; examples -----	1-18
X	US 5 300 653 A (MITSUI TOATSU CHEMICALS [JP]) 5 April 1994 (1994-04-05) column 3, line 23 - column 4, paragraph 2; claims; examples ----- -/--	1



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 September 2014

Date of mailing of the international search report

26/09/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ginoux, Claude

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/050015

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 106 602 A1 (ARCHER DANIELS MIDLAND CO [US]) 13 June 2001 (2001-06-13) paragraph [0034] - paragraph [0040]; claims -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2014/050015

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0200944	A2	12-11-1986	AU 570839 B2 24-03-1988
		AU 5572686 A 16-10-1986	
		CA 1267652 A1 10-04-1990	
		DE 3685846 D1 06-08-1992	
		DE 3685846 T2 14-01-1993	
		EP 0200944 A2 12-11-1986	
		US 4769474 A 06-09-1988	
FR 2557872	A1	12-07-1985	AU 567903 B2 10-12-1987
		CA 1215069 A1 09-12-1986	
		CH 659827 A5 27-02-1987	
		DE 3400574 A1 18-07-1985	
		FR 2557872 A1 12-07-1985	
		GB 2152030 A 31-07-1985	
		JP H0453509 B2 26-08-1992	
		JP S5928484 A 15-02-1984	
		NL 8304496 A 16-07-1985	
EP 0027874	A1	06-05-1981	DE 2943761 A1 07-05-1981
		EP 0027874 A1 06-05-1981	
		JP S5673050 A 17-06-1981	
US 5300653	A	05-04-1994	DE 69010155 D1 28-07-1994
		DE 69010155 T2 08-12-1994	
		DK 0428984 T3 25-07-1994	
		EP 0428984 A1 29-05-1991	
		ES 2056342 T3 01-10-1994	
		JP 3178831 B2 25-06-2001	
		JP H03227963 A 08-10-1991	
		US 5300653 A 05-04-1994	
EP 1106602	A1	13-06-2001	AT 406345 T 15-09-2008
		DK 1106602 T3 03-11-2008	
		EP 1106602 A1 13-06-2001	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050015

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07D233/64 C07C227/40 C07D209/20 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07D C07C		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 200 944 A2 (MITSUI TOATSU CHEMICALS [JP]) 12 novembre 1986 (1986-11-12) page 8, dernier alinéa - page 9, alinéa 2; revendications 1-3; exemples -----	1-18
X	FR 2 557 872 A1 (MITSUI TOATSU CHEMICALS [JP]) 12 juillet 1985 (1985-07-12) revendication; exemples -----	1-18
X	EP 0 027 874 A1 (DEGUSSA [DE]) 6 mai 1981 (1981-05-06) revendication; exemples -----	1-18
X	US 5 300 653 A (MITSUI TOATSU CHEMICALS [JP]) 5 avril 1994 (1994-04-05) colonne 3, ligne 23 - colonne 4, alinéa 2; revendications; exemples ----- -/-	1
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 16 septembre 2014		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 26/09/2014
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Ginoux, Claude

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050015

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 1 106 602 A1 (ARCHER DANIELS MIDLAND CO [US]) 13 juin 2001 (2001-06-13) alinéa [0034] - alinéa [0040]; revendications -----	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050015

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP 0200944	A2	12-11-1986	AU	570839 B2	24-03-1988
			AU	5572686 A	16-10-1986
			CA	1267652 A1	10-04-1990
			DE	3685846 D1	06-08-1992
			DE	3685846 T2	14-01-1993
			EP	0200944 A2	12-11-1986
			US	4769474 A	06-09-1988

FR 2557872	A1	12-07-1985	AU	567903 B2	10-12-1987
			CA	1215069 A1	09-12-1986
			CH	659827 A5	27-02-1987
			DE	3400574 A1	18-07-1985
			FR	2557872 A1	12-07-1985
			GB	2152030 A	31-07-1985
			JP	H0453509 B2	26-08-1992
			JP	S5928484 A	15-02-1984
			NL	8304496 A	16-07-1985

EP 0027874	A1	06-05-1981	DE	2943761 A1	07-05-1981
			EP	0027874 A1	06-05-1981
			JP	S5673050 A	17-06-1981

US 5300653	A	05-04-1994	DE	69010155 D1	28-07-1994
			DE	69010155 T2	08-12-1994
			DK	0428984 T3	25-07-1994
			EP	0428984 A1	29-05-1991
			ES	2056342 T3	01-10-1994
			JP	3178831 B2	25-06-2001
			JP	H03227963 A	08-10-1991
			US	5300653 A	05-04-1994

EP 1106602	A1	13-06-2001	AT	406345 T	15-09-2008
			DK	1106602 T3	03-11-2008
			EP	1106602 A1	13-06-2001
