(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 982 243**

(51) Int. Cl.:

C07C 319/28 (2006.01)
C07C 323/58 (2006.01)
C12P 13/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2019 PCT/KR2019/001286**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2019 WO19151769**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2019 E 19747674 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024 EP 3720841**

(54) Título: **Método para preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína natural mediante cromatografía continua**

(30) Prioridad:

31.01.2018 KR 20180012290

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2024

(73) Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
330, Dongho-ro,Jung-gu,
Seoul 04560, KR

(72) Inventor/es:

KIM, JUN-WOO;
LEE, JUNG MIN;
JO, SE-HEE;
KIM, IL CHUL;
LEE, IN SUNG y
JUNG, JUN YOUNG

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína natural mediante cromatografía continua

Campo técnico

La presente descripción se refiere a un método para preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína, y cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína preparados mediante el método.

Técnica anterior

La L-cisteína se produce generalmente descomponiendo la L-cistina de origen animal, que utiliza plumas de pato o cabello humano como materia prima, o la L-cistina derivada de la fermentación, que utiliza un líquido de metabolismo microbiano como materia prima, en L-cisteína, mediante una reacción de reducción electroquímica. Por el contrario, como métodos para producir L-cisteína utilizando microorganismos, se ha descrito un proceso para producir L-cisteína natural mediante fermentación utilizando una cepa que tiene una *O*-acetiltransferasa modificada, en un medio que contiene sulfuro (documentos US-8802399B, US-6946268B), y un proceso para producir L-cisteína natural mezclando *O*-fosfohomoserina producida mediante un método de cultivo microbiano con sulfuro e induciendo una reacción catalítica enzimática utilizando *O*-fosfoserina sulfhidrilasa (documentos WO2013/089478, WO2012/053794).

Aunque se ha descrito que la L-cisteína producida por el método de cultivo microbiano se puede separar mediante intercambio iónico y otros métodos conocidos, no se proporciona información sobre el procedimiento específico, el rendimiento, la pureza, *etc.* (documentos EP1645623A1, EP1298200B1, US-20050221453A1, EP1234874A1, EP1571223A2 y EP1650296A).

Mientras tanto, se conoce un método para producir monohidrato de clorhidrato de L-cisteína a partir de un caldo de fermentación de L-cisteína mediante intercambio iónico. Por ejemplo, se ha descrito un proceso para purificar la L-cisteína, con un rendimiento del 90 % o más, reduciendo el pH de un caldo de fermentación que contiene L-cisteína, a un pH de 5 o inferior, y luego poniéndolo en contacto con un intercambiador de cationes ácido o fuertemente ácido, de manera que la L-cisteína se una al intercambiador de iones, y eluyendo la L-cisteína unida con una solución acuosa de ácido clorhídrico. Por consiguiente, el monohidrato de clorhidrato de L-cisteína puede producirse utilizando el eluyente de clorhidrato de L-cisteína (documento US-8088949B).

Además, se ha descrito un proceso para purificar la L-cisteína, con un rendimiento del 85 % o más, poniendo un caldo de fermentación que contiene L-cisteína, con un pH de 6 a 9, en contacto con un intercambiador aniónico básico, de manera que la L-cisteína se una al intercambiador aniónico, eluyendo la L-cisteína unida con una solución acuosa de ácido clorhídrico, y poniendo después el eluato en contacto con un intercambiador catiónico ácido a un pH de 4 o inferior, de manera que la L-cisteína se una al intercambiador catiónico y eluya la L-cisteína unida con una solución acuosa de ácido clorhídrico. Además, el monohidrato de clorhidrato de L-cisteína se puede producir utilizando el eluyente de clorhidrato de L-cisteína (documento US-9120729B).

Sin embargo, los procesos descritos anteriormente tienen desventajas porque implican una reacción química, ya que se llevan a cabo mediante etapas repetidas de intercambio iónico, porque requieren una gran cantidad de agua de proceso, ya que se utiliza repetidamente una gran cantidad de eluyente como etapa posterior del proceso de adsorción iónica, y porque debe llevarse a cabo una etapa de purificación adicional. Por lo tanto, existe una necesidad continua de un método para aislar la L-cisteína con un mayor rendimiento y pureza, y producir hidrato de clorhidrato de L-cisteína.

En estas circunstancias, los presentes autores han realizado grandes esfuerzos para aumentar la pureza y el rendimiento del hidrato de clorhidrato de L-cisteína, y han completado un método para producir hidrato de clorhidrato de L-cisteína que incluye las ventajas de tener una mayor productividad efectiva y un menor consumo de agua, así como un alto rendimiento y pureza.

El documento US-2008/0190854 A1 se refiere a "un proceso para purificar L-cisteína" en el cual "la L-cisteína se separa de un caldo fermentado que contiene L-cisteína, que contiene un agente oxidante que es capaz de oxidar la L-cisteína a un pH < 5".

El documento EP 1106602 A1 se refiere a "un método para separar un aminoácido de una solución que contiene dicho aminoácido e impurezas, en donde el medio para la separación es la cromatografía en lecho móvil simulado, con un material cromatográfico de intercambio catiónico fuerte".

Wu y col. (Ind. Eng. Chem. Res. 1998, 37, 10, 4023-4035) se refiere al "diseño de cromatografía en lecho móvil simulado para separaciones de aminoácidos".

Descripción

Problema técnico

Un objeto de la presente descripción es proporcionar un método para preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína.

También se describe en la presente memoria, pero no se reivindica, el suministro de cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína preparados mediante el método para preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína.

Solución técnica

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. Esta y otras facetas de la presente descripción pueden entenderse más completamente haciendo referencia a la siguiente descripción. A continuación, se describirá la presente descripción en detalle.

En la presente memoria se proporciona un método para preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína, que comprende:

(a) obtener un líquido separado después de introducir un caldo de fermentación en un rango de pH de 3,0 a 9,0, que contiene L-cisteína, en un aparato de cromatografía continua que tiene una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida como fase estacionaria;

(b) añadir ácido clorhídrico al líquido separado, de manera que la relación de equivalencia ([HCl]/[L-cisteína]) del ácido clorhídrico a la L-cisteína sea de 0,9 a 3,0;

(c) concentrar el líquido separado al que se añade ácido clorhídrico; y

(d) recuperar del líquido concentrado cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "L-cisteína" es uno de los aminoácidos constituyentes, y es el único aminoácido que contiene azufre con un grupo tiol (R-SH) entre los L-aminoácidos.

Según el método reivindicado, los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína se obtienen de un caldo de fermentación que contiene L-cisteína. También se describe en la presente memoria, que la L-cisteína se puede obtener mediante síntesis química o síntesis biológica mediante fermentación microbiana. Específicamente, en la presente descripción, la L-cisteína puede ser L-cisteína producida biológicamente mediante fermentación microbiana, o puede ser L-cisteína natural obtenida induciendo una reacción catalítica enzimática de la *O*-fosfohomoserina, que es un precursor preparado mediante fermentación microbiana, con un sulfuro en presencia de fosfoserina sulfhidrilasa. En cuanto al proceso de preparación, la L-cisteína natural puede ser L-cisteína obtenida sin pasar por una reacción química, adsorción química o elución.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "natural" indica que algo no depende de una reacción química. Según el Reglamento 1334/2008 de la UE sobre aromas, solo las sustancias obtenidas mediante un proceso físico, enzimático o microbiano se definen como agentes aromatizantes "naturales". Desde el punto de vista anterior, independientemente de si se deriva de una fermentación animal o microbiana, la L-cisteína producida por una reacción de reducción electroquímica de la L-cistina no puede denominarse totalmente natural.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "caldo de fermentación" se refiere a un medio de cultivo obtenido mediante el cultivo de microorganismos productores de L-cisteína, un cultivo que contenga los microorganismos cultivados junto con el medio de cultivo, o una solución de conversión enzimática que contenga un precursor capaz de producir L-cisteína y una enzima. Específicamente, el caldo de fermentación que contiene L-cisteína puede ser un medio de cultivo o una solución de conversión enzimática que contenga L-cisteína natural. Más específicamente, puede ser un cultivo o medio de cultivo de L-cisteína preparado biológicamente mediante la fermentación de microorganismos que tengan la capacidad de producir L-cisteína, o una solución de conversión enzimática de L-cisteína natural obtenida al inducir una reacción catalítica enzimática de la *O*-fosfohomoserina, que es un precursor preparado mediante fermentación microbiana, con un sulfuro en presencia de fosfoserina sulfhidrilasa. Los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína preparados utilizando el caldo de fermentación como líquido fuente no dependen de una reacción química y, por lo tanto, se puede dar a entender que son de origen natural.

En la presente descripción, el caldo de fermentación se puede utilizar como líquido fuente para un proceso de cromatografía continua. Es decir, se puede introducir en el aparato de cromatografía continua de la etapa (a).

El pH del caldo de fermentación a introducir en el aparato de cromatografía continua puede variar según el método de preparación, pero en la invención reivindicada puede estar en el rango de 3,0 a 9,0, 3,5 a 8,5, 3,5 a 7,5, 4,5 a 7,0, o 5,0 a 6,0. El caldo de fermentación en sí se puede utilizar como líquido fuente para la cromatografía continua, y se puede incluir, además, una etapa de ajuste del caldo de fermentación que contiene L-cisteína a un pH de 3,0 a 9,0, específicamente de 3,5 a 8,5, o de 3,5 a 7,5, más específicamente de 4,5 a 7,0, o de 5,0 a 6,0. Por ejemplo, el pH se

puede ajustar añadiendo un ácido, tal como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, o una base, tal como hidróxido de sodio (sosa cáustica), amoniaco, hidróxido de litio o hidróxido de potasio, *etc.,* pero no se limita a los mismos. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y utilizar adecuadamente el agente de ajuste del pH, siempre que se puedan obtener cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína sin afectar a la estructura de la L-cisteína.

A medida que se reduce el pH del caldo de fermentación de la L-cisteína, existe una fuerte tendencia a la cationización de la L-cisteína. Como la fase estacionaria de la cromatografía continua utilizada en la presente memoria es una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida, tiende a adsorber cationes, de modo que cuando la L-cisteína se cationiza, puede adsorberse parcialmente en la fase estacionaria, reduciendo así la tasa de recuperación del proceso de cromatografía continua. Además, la L-cisteína tiene una fuerte tendencia a oxidarse y convertirse en L-cistina a un pH más alto, lo que puede reducir la tasa de recuperación del proceso de cromatografía continua. Por lo tanto, en la invención reivindicada, el caldo de fermentación que contiene L-cisteína puede ser un caldo de fermentación que tenga un pH de 3,0 a 9,0, específicamente de 3,5 a 8,5, más específicamente de 3,5 a 7,5, de 4,5 a 7,0, o de 5,0 a 6,0.

Sin embargo, dado que la tasa de recuperación del proceso de cromatografía continua puede verse afectada por diversos parámetros del proceso, tales como el caudal entre las torres de resina del proceso de cromatografía continua, la temperatura del proceso, la composición de la fase móvil, la secuencia de cromatografía continua, *etc.,* la tasa de recuperación del proceso de cromatografía continua no es un factor que se limite solo por el pH del líquido fuente para la cromatografía continua.

En la presente descripción, el método puede incluir, además, una etapa de diluir o concentrar el caldo de fermentación, que contiene L-cisteína, antes de la etapa (a). La etapa se puede llevar a cabo antes o después de la etapa de ajuste del pH descrita anteriormente.

La concentración se puede llevar a cabo en un evaporador convencional (por ejemplo, un evaporador de circulación forzada, un evaporador de película delgada, o un evaporador rotatorio, *etc.*).

La concentración de L-cisteína en el caldo de fermentación diluido o concentrado puede ajustarse de 10 g/L a 180 g/L, específicamente de 10 g/L a 150 g/L, pero no es un factor que afecte en gran medida a la tasa de recuperación del proceso de cromatografía continua y a la calidad del líquido separado (específicamente, el contenido sólido de L-cisteína, excluyendo la humedad, en el líquido separado) obtenido a través del proceso de cromatografía continua. Por lo tanto, ajustar la concentración del caldo de fermentación que contiene L-cisteína utilizado como líquido fuente para el proceso de cromatografía continua no es un proceso esencial para separar y purificar la L-cisteína. Sin embargo, cuando la concentración se ajusta a 180 g/L o más, la concentración de L-cisteína es mayor que la solubilidad de la L-cisteína, de modo que se producen cristales de L-cisteína de baja calidad que no son adecuados para la recuperación, lo que resulta en el deterioro de la tasa de recuperación del proceso de cromatografía continua. Cuando la concentración del líquido fuente para el proceso de cromatografía continua es alta, la cantidad de agua utilizada en el proceso de cromatografía continua puede reducirse en relación con la cantidad de L-cisteína utilizada para el tratamiento. Tal característica no se puede encontrar en un proceso de intercambio iónico, en el cual la cantidad de agua utilizada se determina por la cantidad máxima de adsorción de L-cisteína y una resina de intercambio iónico.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "cromatografía continua" se refiere a un proceso mediante el cual un proceso de cromatografía por lotes convencional se lleva a cabo de forma continua. Específicamente, se pueden suministrar de manera continua una fase sólida y una fase líquida al aparato de cromatografía, y la fase sólida y la fase líquida se mueven en direcciones opuestas entre sí para provocar el contacto a contracorriente, lo que permite, de una manera más eficiente, la separación de sustancias. En la presente descripción, la cromatografía continua se puede utilizar en el sentido de que incluye tanto la cromatografía en lecho móvil verdadero (TMB, por sus siglas en inglés) como la cromatografía en lecho móvil simulado (SMB, por sus siglas en inglés). Además, dado que la cromatografía en lecho móvil verdadero y la cromatografía en lecho móvil simulado emplean los mismos principios, los expertos en la técnica pueden seleccionarlas y utilizarlas adecuadamente teniendo en cuenta la productividad y otros aspectos.

Cuando en la presente descripción se emplea el proceso de cromatografía continua, no se requiere un proceso de adsorción/elución y, por lo tanto, tiene las ventajas de tener una alta productividad por hora, en comparación con un proceso de intercambio iónico, y de reducir la cantidad de agua utilizada en el proceso. Además, a fin de obtener un producto de L-cisteína en polvo a partir de un líquido de proceso que contiene L-cisteína obtenida mediante un proceso de intercambio iónico o un proceso de cromatografía común con un alto rendimiento, se precisa una gran cantidad de energía en un proceso de cristalización por concentración. En este sentido, el coste de la energía puede reducirse según el método de la presente descripción.

En algunos casos, se puede utilizar un aparato de cromatografía en SMB, y en la Figura 2 se muestra un diagrama esquemático del aparato de cromatografía en SMB. Los parámetros del proceso, tal como el número de torres de resina, el volumen de las torres de resina, la capacidad de llenado de la resina, el caudal de cada sección, la presencia o ausencia de una instalación de tanque intermedio, el tiempo de movimiento de las torres de resina, *etc.*, pueden variar, y no se limitan a las condiciones fijas especificadas anteriormente.

La fase estacionaria del aparato de cromatografía continua puede ser una resina de intercambio iónico y, específicamente, puede ser una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida. En la invención reivindicada, la resina de intercambio catiónico fuertemente ácida tiene un grupo funcional de ácido sulfónico. En los casos descritos, el grupo funcional de la resina de intercambio catiónico fuertemente ácida puede ser un grupo sulfato, pero no se limita al mismo. Además, el compuesto base de la resina de intercambio catiónico fuertemente ácida utilizada en la presente memoria, no está limitado, siempre que pueda unirse al mismo un grupo funcional fuertemente ácido. Por ejemplo, se pueden utilizar los que se deriven de un copolímero de estireno-divinilbenceno, pero no se limitan a los mismos. En un ejemplo específico, la resina de intercambio catiónico fuertemente ácida puede ser un copolímero de ácido sulfúrico de estireno-divinilbenceno, pero no se limita al mismo.

Cuando copolímeros de estireno-divinilbenceno sin grupo funcional, resinas de intercambio sin grupo funcional, tales como polímeros de metacrilato sin grupo funcional; resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas, tales como los copolímeros estireno-divinilbenceno de trimetilamina; resinas de intercambio aniónico débilmente básicas, tales como los copolímeros de estireno-divinilbenceno de amina terciaria; resinas de intercambio catiónico débilmente básicas, tales como los polímeros de metacrilato de carboxilo, *etc.,* se utilizan en la presente descripción como otros tipos de fases estacionarias utilizadas comúnmente en la separación y purificación de aminoácidos en la técnica, es difícil purificar la L-cisteína en un contenido sólido del 50 % (p/p) o más, excluyendo la humedad, en el líquido separado obtenido mediante el proceso de cromatografía continua. Mientras tanto, cuando se utiliza una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida, tal como un copolímero de ácido sulfúrico de estireno-divinilbenceno, es posible purificar la L-cisteína en un contenido sólido del 80 % (p/p) o más, excluyendo la humedad, en el líquido separado obtenido mediante el proceso de cromatografía continua, específicamente del 90 % (p/p) o más.

En el aparato de cromatografía, se puede utilizar como fase móvil agua a la que no se añaden compuestos químicos (tal como un disolvente orgánico, tal como metanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo, *etc.*), una solución diluida de sosa cáustica, una solución diluida de ácido sulfúrico, una solución diluida de ácido fosfórico, una solución diluida de ácido clorhídrico, una solución diluida de hidróxido de potasio, o una mezcla de las mismas, pero no se limita a las mismas. En un ejemplo específico, se puede utilizar agua como fase móvil para la cromatografía continua. Cuando se utiliza una fase móvil que contiene un compuesto químico, el compuesto químico puede permanecer en el producto final, por lo que puede que no sea posible vender el producto, ya que puede haber superado el límite estándar de residuos para el compuesto químico, o puede ser imposible distribuir el producto como un producto natural. Además, dado que no se añaden al agua de proceso sustancias químicas distintas del agua, se puede esperar un efecto de ahorro en costes de producción. En el proceso de intercambio iónico, para eluir la L-cisteína unida, se utiliza esencialmente como eluyente un disolvente, tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y, en consecuencia, su uso va acompañado inevitablemente de un aumento en el coste del producto, asociado con el uso y la eliminación de las sustancias químicas.

Cuando el caldo de fermentación que contiene L-cisteína se introduce en el aparato de cromatografía continua en la etapa (a), se puede obtener un líquido separado que contiene L-cisteína a medida que la L-cisteína se separa según la cromatografía continua. En la presente descripción, el líquido separado que contiene la L-cisteína separada puede denominarse de forma breve “líquido separado”, “líquido separado por cromatografía” o “líquido de proceso”.

La calidad del líquido separado puede evaluarse por el contenido de L-cisteína en el sólido, excluyendo la humedad, en el líquido separado. El líquido separado de la presente descripción puede tener un contenido sólido de L-cisteína, excluyendo la humedad, del 80 % (p/p), específicamente del 85 % (p/p), más específicamente del 90 % (p/p) o más. Se confirmó experimentalmente que se pueden preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína con una pureza del 98 % o más, cuando el contenido sólido de L-cisteína, excluyendo la humedad, en el líquido separado sea del 80 % o más. Sin embargo, dado que la pureza de los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína puede verse afectada por otras condiciones del proceso, tales como la concentración, la cristalización, la separación de cristales, *etc.,* la pureza de los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína no es un factor que se limite solo por el contenido sólido de L-cisteína, excluyendo la humedad, en el líquido del proceso producido por la cromatografía continua.

En la presente descripción, la etapa (a) puede denominarse “proceso de cromatografía continua”. El término “tasa de recuperación del proceso de cromatografía continua” se refiere a la tasa de recuperación de L-cisteína en el líquido separado obtenido, en relación con el caldo de fermentación introducido en la etapa (a), y se utiliza para evaluar la eficiencia del proceso. La tasa de recuperación de la cromatografía continua en la presente descripción puede ser del 50 % (p/p), específicamente del 60 % (p/p), más específicamente del 70 % (p/p), y más específicamente del 80 % (p/p) o más, pero no se limita a esto.

A fin de convertir la L-cisteína contenida en el líquido separado de la presente descripción, en clorhidrato de L-cisteína, se puede añadir ácido clorhídrico al líquido separado en la etapa (b). Específicamente, el ácido clorhídrico se puede añadir de manera que la relación de equivalencia ([HCl]/[L-cisteína]) del ácido clorhídrico a la L-cisteína contenida en el líquido separado, sea mayor de 0,85 y 3,5 o menos, mayor de 1,0 y menor de 3,0, 0,9 a 3,0, específicamente, de 1,5 a 2,5, más específicamente, 2,0. En la invención reivindicada, el ácido clorhídrico se añade al líquido separado, de manera que la relación de equivalencia ([HCl]/[L-cisteína]) del ácido clorhídrico a la L-cisteína, sea de 0,9 a 3,0. Cuando la relación de equivalencia es de 0,9 a 3,0, la tasa de recuperación del proceso de cristalización puede ser del 40 % o más, y se espera que sea del 50 % o más en una relación de equivalencia de más de 1,0 y menos de 3,0,

y la tasa de recuperación del proceso de cristalización puede ser del 60 % o más en la relación de equivalencia de 1,5 a 2,5.

La etapa (c) es una etapa para concentrar el líquido separado al que se añade ácido clorhídrico para la cristalización. En la etapa (c), se puede obtener un concentrado concentrando el líquido separado al que se añade ácido clorhídrico. Los expertos en la técnica, mediante una selección adecuada, pueden llevar a cabo la concentración en un evaporador convencional (por ejemplo, un evaporador de circulación forzada, un evaporador de película delgada, o un evaporador rotatorio, *etc.*). La concentración de L-cisteína en el concentrado de la etapa (c) puede estar en el rango de 100 g/L a 900 g/L, específicamente de 200 g/L a menos de 900 g/L, de 300 g/L a menos de 900 g/L, de 400 g/L a menos de 900 g/L, más específicamente de menos de 500 g/L a 900 g/L.

Cuando la concentración de L-cisteína en el concentrado es baja, la cristalización no se produce durante la concentración debido a la falta de sobresaturación requerida para la nucleación y el crecimiento de los cristales, y la cristalización puede lograrse durante el enfriamiento, o la cristalización puede llevarse a cabo mediante un proceso adicional. Sin embargo, la tasa de recuperación puede ser baja o el tiempo de cristalización puede prolongarse. Cuando la concentración de L-cisteína en el concentrado es de 300 g/L o más, se pueden formar núcleos cristalinos de hidrato de clorhidrato de L-cisteína durante el proceso de concentración. Además, cuando se enfría la suspensión de hidrato de clorhidrato de L-cisteína concentrada a 300 g/L o más, la tasa de recuperación del proceso de cristalización para el hidrato de clorhidrato de L-cisteína puede aumentar. Cuando la concentración del hidrato de clorhidrato de L-cisteína en el concentrado es de 900 g/L, puede producirse la solidificación debido a la formación de una gran cantidad de partículas cristalinas y, en consecuencia, la agitación de la suspensión cristalina y la separación de los cristales pueden no ser posibles. Por lo tanto, la etapa de concentrar el líquido separado al que se añade el ácido clorhídrico, se concentra de manera que la concentración de L-cisteína sea de 200 g/L a menos de 900 g/L, específicamente de 300 g/L a menos de 900 g/L, más específicamente de 500 g/L a menos de 900 g/L.

La cristalización del hidrato de clorhidrato de L-cisteína puede producirse durante la concentración según la etapa (c). Tal como se usa en la presente memoria, el término "cristalización" se refiere a un fenómeno por el cual un líquido o un sólido en estado amorfo forma un cristal, y va acompañado de dos fenómenos denominados nucleación y crecimiento cristalino.

El concentrado puede formar y/o hacer crecer núcleos cristalinos mediante enfriamiento y/o envejecimiento, antes de la recuperación. Además, incluso cuando los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína no se precipitan del concentrado, se pueden formar cristales durante el enfriamiento o el envejecimiento del concentrado.

La etapa de enfriamiento puede referirse específicamente al enfriamiento a una temperatura de -10 °C a 55 °C, durante un período de 2 horas a 6 horas, específicamente al enfriamiento a una temperatura de 0 °C a 45 °C, durante un período de 2 horas a 6 horas, más específicamente al enfriamiento a una temperatura de 0 °C a 30 °C, e incluso más específicamente al enfriamiento a una temperatura de 0 °C a 15 °C, durante un período de 2 horas a 6 horas. La etapa de envejecimiento puede referirse a dejar reposar sin cambiar la temperatura. En la presente descripción, puede referirse a mantener constantemente la temperatura enfriada, o puede referirse a mantener constantemente la temperatura del concentrado, incluso cuando no se enfría. Específicamente, el envejecimiento se puede lograr durante un período de 1 hora a 3 horas.

La serie de la etapa (c) en la presente descripción puede denominarse "proceso de cristalización". La "tasa de recuperación del proceso de cristalización" se refiere a la tasa de recuperación de L-cisteína de los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína obtenidos en relación con la L-cisteína en el líquido separado, según el proceso de cromatografía continua, y se utiliza para evaluar la eficiencia del proceso de cristalización. La tasa de recuperación del proceso de cromatografía continua puede ser del 40 % (p/p), específicamente del 50 % (p/p), más específicamente del 60 % (p/p), incluso más específicamente del 70 % (p/p).

En la etapa (d), se pueden recuperar los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína precipitados del concentrado. Específicamente, los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína se pueden recuperar de la suspensión al someter el concentrado a una separación sólido-líquido. Esto puede llevarse a cabo utilizando un separador sólido-líquido, tal como un aparato de filtración por membrana a presión reducida, un aparato de filtración por membrana a presión, un aparato de separación centrífuga, *etc.,* pero no se limita a los mismos. La suspensión y/o los cristales de cisteína precipitados pueden someterse a un lavado o secado adicionales.

En la presente descripción, el filtrado obtenido al recuperar los cristales en la etapa (d) es un líquido madre que tiene L-cisteína residual, y puede añadirse total o parcialmente al caldo de fermentación de la etapa (a), al líquido separado de la etapa (b), o al líquido separado al que se añade ácido clorhídrico de la etapa (c), a fin de mejorar la tasa de recuperación durante la purificación final de la L-cisteína, pero no se limita a esto.

El hidrato de clorhidrato de L-cisteína preparado según el método de preparación de la presente descripción puede ser un monohidrato. La pureza de los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína preparados según el método de preparación de la presente descripción, puede ser del 95 % (p/p) o más, específicamente del 98 % (p/p), más específicamente del 99 % (p/p).

También se proporcionan en la presente memoria cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína preparados mediante el método para preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína descrito anteriormente.

Los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína y su método de preparación son los descritos anteriormente.

Efectos ventajosos

El método para preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína de la presente descripción, es capaz de separar y purificar el caldo de fermentación de L-cisteína tal como está en estado natural sin una reacción química o el uso de compuestos sintéticos artificiales, y obtener al mismo tiempo cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína con una alta tasa de recuperación y/o pureza. Además, el método de preparación de la presente descripción muestra una productividad eficiente y, en particular, el consumo de agua puede reducirse notablemente.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una ilustración representativa de un proceso para preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína mediante cromatografía continua, a partir de L-cisteína natural contenida en un caldo de fermentación.

La Figura 2 muestra la disposición de las torres de resina y el caudal para cada sección de cromatografía en SMB utilizada.

Modo

De aquí en adelante, la presente descripción se describirá con más detalle mediante ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos.

Métodos de prueba

Los métodos analíticos comunes utilizados en los ejemplos de la presente descripción, son los siguientes:

(1) HPLC para el análisis cuantitativo del monohidrato de clorhidrato de L-cisteína

Las condiciones para el análisis por HPLC para analizar la pureza y la concentración del monohidrato de clorhidrato de L-cisteína en la presente descripción, son las siguientes:

Aparato: HPLC 1260 Infinity System (Agilent Technology Inc.)

Columna: HP C18 (150 mm × 3,9 mm; 5 µm)

Fase móvil: Acetonitrilo/Agua/Ácido heptafluorobutírico (8/92/0,1)

Caudal: 0,425 ml/min

Temperatura: 30 ℃

Detección: UV a 220 nm

Volumen de muestra introducido: 2 µL

(2) Método para medir la pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína

En la presente descripción, la calidad de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína se evalúa en base a la pureza del monohidrato de clorhidrato de L-cisteína, y su procedimiento es el siguiente:

(a) Preparar cristales anhidros de clorhidrato de L-cisteína colocando los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína en una secadora al vacío que contenga gel de sílice, durante 24 horas a un vacío de 20 mmHg o menos, para eliminar la humedad residual y bajar la temperatura de los cristales anhidros de clorhidrato de L-cisteína hasta temperatura ambiente;

(b) Preparar una muestra de 0,5000 g/L midiendo cuantitativamente 0,5000 g de los cristales anhidros de clorhidrato de L-cisteína enfriados a temperatura ambiente, colocándola en un matraz volumétrico de 1 L, y diluyéndola con agua tridestilada;

(c) Preparar una muestra de 0,5000 g/L midiendo cuantitativamente 0,5000 g de los cristales anhidros de clorhidrato de L-cisteína, colocándola en un matraz volumétrico de 1 L, y diluyéndola con agua tridestilada, después

de tratar los cristales estándar de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (Sigma, ≥ 99,0 %), de la misma manera que en la etapa (a), determinando posteriormente la pureza de un producto estándar mediante certificado del fabricante del reactivo estándar y, a continuación, convertir la concentración de clorhidrato de L-cisteína anhidra en la muestra (convertida [concentración de clorhidrato de L-cisteína anhidro] es de 0,5000 g/L × [pureza del producto estándar]); y

(d) Analizar la pureza de los cristales anhidros de clorhidrato de L-cisteína utilizados en la etapa (a), utilizando la muestra preparada en la etapa (c) como estándar externo, y analizar la muestra preparada en la etapa (b) mediante HPLC (la pureza de los cristales anhidros de clorhidrato de L-cisteína es la misma que la pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína).

(3) Método para analizar el contenido de L-cisteína en base a sólidos en el caldo de fermentación o el líquido separado según el proceso de cromatografía

En la presente descripción, la calidad del caldo de fermentación o del líquido separado según el proceso de cromatografía, se evalúa en base al contenido de L-cisteína en los sólidos obtenidos al eliminar la humedad de la solución, y su procedimiento es el siguiente:

(a) desodorizar un recipiente de porcelana con alrededor de 5 g de arena marina (malla de 10 a 20 g; Daejung Chemicals), y eliminar la humedad residual colocándola en un horno de circulación forzada a 105 ℃ durante 3 horas y, a continuación, enfriándola a temperatura ambiente colocándola en una secadora al vacío que contenga gel de sílice, durante 1 hora;

(b) añadir la solución a analizar al recipiente de la etapa (a), y cuantificar la [masa de la solución] utilizando la diferencia de peso antes y después de la adición;

(c) eliminar la humedad residual colocando el recipiente en un horno de circulación forzada a 105 ℃ durante 3 horas y, a continuación, enfriándolo a temperatura ambiente colocándolo en una secadora al vacío que contenga gel de sílice durante 1 hora, posteriormente cuantificando la cantidad de humedad eliminada utilizando la diferencia de peso, y convirtiendo el contenido sólido en masa de la solución para medirlo utilizando lo mismo ([contenido sólido en masa] es ([masa de solución] - [masa de humedad eliminada]) / [masa de solución]);

(d) medir la densidad de la solución a analizar utilizando un analizador de gravedad específico;

(e) medir la concentración de L-cisteína en la solución a analizar mediante HPLC; y

(f) convertir el contenido de L-cisteína en el sólido, excluyendo la humedad de la solución a analizar, utilizando el contenido sólido en masa de la solución, la densidad y la concentración de L-cisteína ([contenido de L-cisteína en el sólido, excluyendo la humedad, de la solución] es [concentración de L-cisteína] / [densidad de la solución] / [contenido sólido en masa de la solución]).

Ejemplo de preparación

(1) Preparación de caldo de fermentación que contiene L-cisteína

Tras obtener un caldo de fermentación de *O*-fosfoserina mediante el cultivo de un microorganismo capaz de producir *O*-fosfoserina en un medio de fermentación, el caldo de fermentación se sometió a una reacción de conversión enzimática con un sulfuro, utilizando *O*-fosfoserina sulfhidrasa (OPS sulfhidrasa) para obtener un caldo de fermentación que contenía L-cisteína.

Concretamente, la cepa KCCM 11103P (CA07-0022/pCL-prmf-*serA**(G336V)-*serC*; patente coreana núm. 10-1381048), que es una cepa modificada de *E. coli* W3110, en la que se elimina el *serB* y se introduce la *serA** mutante para que tenga la capacidad de producir OPS, se cultivó en una placa de agar MMYE a 33 ℃ durante 24 horas, y 1/10 de las células de la placa se rasparon de una placa y se inocularon en un medio semilla de matraz (10 g/L de glucosa, 0,5 g/L de sulfato de magnesio, 3 g/L de dihidrogenofosfato de potasio, 10 g/L de extracto de levadura, 0,5 g/L de cloruro de sodio, 1,5 g/L de cloruro de amonio, 12,8 g/L de pirofosfato de sodio, 1 g/L de glicina) en un matraz deflector para llevar a cabo un cultivo semilla a 200 rpm a 30 ℃ durante 6 horas. Una vez completado el cultivo semilla, el medio de cultivo semilla con un volumen correspondiente al 16 % del volumen del medio de cultivo principal, se inoculó en un fermentador de tamaño pequeño de 1 L lleno con 300 ml del medio de cultivo principal, y el cultivo se llevó a cabo a 33 ℃ y pH 7,0, para obtener un caldo de fermentación de OPS. El caldo de fermentación de OPS a 50 mM se hizo reaccionar con la enzima Msm-T derivada del *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a concentración de 50 mg/mL en condiciones de 100 mM de Na_2S y 0,2 mM de piridoxal 5'-fosfato (PLP), para obtener un caldo de fermentación que contenía L-cisteína (patente coreana núm. 10-1381048).

El pH del caldo de fermentación de L-cisteína era de 9,3 y la concentración de L-cisteína era de 26 g/L. El contenido sólido de L-cisteína, excluyendo la humedad, en el caldo de fermentación de L-cisteína era del 26,7 %. El pH del caldo de fermentación se ajustó bajando a un pH de 5,5 utilizando ácido sulfúrico al 98 %. El caldo de fermentación se

concentró utilizando un evaporador de película fina para preparar un caldo de fermentación de L-cisteína con una concentración de L-cisteína de 120 g/L como líquido fuente para la cromatografía en SMB. Las condiciones de concentración son las siguientes:

Presión interna: 80 mm Hg (correspondiente a 10,7 kPa)

Presión de vapor: 2 bar

Cantidad máxima de inyección: 100 L

Caudal de circulación forzada del líquido de proceso: 10 L/min

Tasa de evaporación: alrededor de 25 L/h

(2) Obtención de un líquido separado en el que se separa la L-cisteína utilizando un aparato de cromatografía continua

A fin de obtener un líquido separado en el que se separara la L-cisteína, se utilizó un aparato de cromatografía en SMB. En la Figura 2 se muestra un diagrama esquemático del aparato de cromatografía en SMB.

Específicamente, como se muestra en la Figura 2, el aparato estaba compuesto por un total de 15 torres de resina. El volumen de cada torre era de 1,5 L, y la resina se llenó hasta el 95 % del volumen de la torre. El líquido fuente de SMB se introdujo en la torre 8 de resina a un caudal de 15 ml/min. La fase móvil se introdujo en la torre 1 de resina a un caudal de 95 ml/min. El líquido del proceso de producción de SMB (líquido separado) se descargó de la torre 3 de resina a un caudal de 50 ml/min. El líquido residual del proceso de SMB se descargó de la torre 12 de resina a un caudal de 60 ml/min. El líquido descargado desde la torre 15 de resina se mezcló con la fase móvil a un caudal de 65 ml/min y, a continuación, la mezcla se introdujo en la torre 1 de resina a un caudal total de 160 ml/min. Se instaló un tanque intermedio de 1 L entre las torres 7 y 8 de resina para permitir el control automático mediante el control del nivel del agua, de modo que el líquido fuente para la cromatografía en SMB pudiera fluir a un caudal constante hacia las torres de resina. Las torres de resina se movieron en la dirección al número decreciente cada 8 minutos, pero se accionaron de manera circular, de modo que la torre 1 de resina se movió a la torre 15 de resina.

En el Ejemplo de preparación, cada una de las resinas TRILITE® MCK32L, PUROLITE® PCR642, o DIAION® UBK555, que son resinas de copolímero de estireno-divinilbenceno que tienen un grupo sulfato de ácido fuerte como grupo funcional, se cargó en la torre de resina del aparato de cromatografía, y se introdujeron en ella 0,1 kL o más del líquido fuente, para la cromatografía en SMB. A continuación, se hizo funcionar el aparato para obtener un líquido para el proceso de producción de SMB (líquido separado). Los líquidos separados tenían un pH de 6,1, 6,3 y 5,9, respectivamente, y la concentración de L-cisteína era de 35,1 g/L, 34,8 g/L y 33,9 g/L, respectivamente.

(3) Reacción de adición y concentración de ácido clorhídrico

Se añadió ácido clorhídrico al 36 % al líquido separado anterior, de modo que la relación de equivalencia [HCl]/[L-cisteína] fuera de 2, y el líquido se concentró conectando linealmente un tubo de concentración de película delgada y un tubo de concentración de tipo circulación forzada, hasta que la concentración de L-cisteína alcanzó los 700 g/L. Los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína se precipitaron durante la concentración, y la temperatura de la suspensión de cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína era de 55 °C inmediatamente después de la concentración. Las condiciones de concentración son las siguientes:

Presión interna: 80 mm Hg (correspondiente a 10,7 kPa)

Presión de vapor: 2 bar

Cantidad máxima de inyección: 100 L

Caudal de circulación forzada del líquido de proceso: 10 L/min

Tasa de evaporación: alrededor de 10 L/h

(4) Enfriamiento y recuperación de cristales de clorhidrato de L-cisteína

La suspensión de cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína se enfrió en un tanque de chaqueta a 15 °C durante 4 horas, a una tasa de enfriamiento constante mientras se agitaba, y se agitó durante 2 horas a la misma temperatura que la temperatura al finalizar el enfriamiento. Posteriormente, los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína se sometieron a una separación sólido-líquido de la suspensión cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína, utilizando un separador centrífugo de cesta. Las condiciones de separación del separador de cestas son las siguientes:

Equipamiento: Separador de cestas de 4,5 litros (H-122; Kokusan)

Líquido de lavado: agua tridestilada

Tipo de filtro: Tejido de filtro de fibra multifilamento de poliamida

Permeabilidad al aire del filtro: 250 L/m^2/s (a 2 mbar)

Velocidad de rotación del cuenco: 3000 rpm

Tiempo de rotación del cuenco: 20 min

Durante la separación, al líquido de lavado se le añadió el 10 % del volumen de la suspensión de cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína. Tras la separación, el producto resultante se secó a 35 °C durante 2 horas o más, utilizando un secador de lecho fluidizado, para reducir la humedad residual al 12,0 % o menos y, finalmente, se prepararon cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína.

Por consiguiente, se midieron el rendimiento del proceso de cromatografía en SMB, el contenido sólido de L-cisteína (%) en el líquido separado obtenido mediante el proceso de cromatografía en SMB, y la pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína. La tasa de recuperación del proceso de cromatografía en SMB se calculó como la tasa de recuperación de L-cisteína en el líquido separado, en comparación con el caldo de fermentación introducido en el aparato de cromatografía en SMB. Los resultados se muestran en la Tabla 1 junto con los resultados obtenidos en el Ejemplo de preparación. Cuando se utilizó como fase estacionaria una resina de copolímero de estireno-divinilbenceno que tenía un grupo sulfato como grupo funcional, todos los resultados experimentales mostraron que el rendimiento del proceso de cromatografía en SMB era superior al 90 %, que el contenido sólido de L-cisteína, excluyendo la humedad, en el líquido separado obtenido mediante el proceso de cromatografía en SMB, era del 92,5 % o más, y que la pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína era del 99,5 % o más.

En base a esto, se puede confirmar que cuando la cromatografía continua se lleva a cabo empleando una resina de fase estacionaria que tenga un grupo funcional fuertemente ácido, se pueden obtener cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína con un mayor rendimiento y pureza.

Ejemplo experimental 1 - Evaluación según los tipos de resinas de intercambio iónico

En el Ejemplo de preparación, los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína se prepararon variando solo las resinas de fase estacionaria cargadas en el aparato de cromatografía en SMB. Como las resinas utilizadas como fase estacionaria, se seleccionaron aquellas que pueden utilizarse industrialmente sin dificultad y que pueden producirse mediante producción en masa. Las resinas se seleccionaron en base a los grupos funcionales, de manera que contengan un grupo carboxilo débilmente ácido, un grupo trimetilamina básico fuerte, un grupo amino terciario básico débil, y ningún grupo funcional.

Por consiguiente, se midieron el rendimiento del proceso de cromatografía en SMB, el contenido sólido de L-cisteína (%) en el líquido separado obtenido mediante el proceso de cromatografía en SMB, y la pureza de los cristales de monohidrato de hidrocloruro de L-cisteína finalmente recuperados. La tasa de recuperación del proceso de cromatografía en SMB se calculó como la tasa de recuperación de L-cisteína en el líquido separado, en comparación con el caldo de fermentación introducido en el aparato de cromatografía en SMB. Los resultados se muestran en la Tabla 1 junto con los resultados obtenidos en el Ejemplo de preparación.

Tabla 1

Tipo de fase estacionaria	**Componente**	**Grupo funcional**	**Rendimiento de la cromatografía en SMB (%)**	**Contenido de L-cisteína (%)**	**Pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (%)**
TRILITE® MCK32L	Copolímero de estireno-divinilbenceno	Grupo sulfato	92,4	93,2	99,7
PUROLITE® PCR642	Copolímero de estireno-divinilbenceno	Grupo sulfato	90,8	92,9	99,5
DIAION® UBK555	Copolímero de estireno-divinilbenceno	Grupo sulfato	91,4	92,5	99,6

Tipo de fase estacionaria	Componente	Grupo funcional	Rendimiento de la cromatografía en SMB (%)	Contenido de L-cisteína (%)	Pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (%)
DIAION® SP850	Copolímero de estireno-divinilbenceno	Ninguna	22,6	37,5	Sin cristalización
MACRONE T® MN202	Copolímero de estireno-divinilbenceno	Ninguna	25,4	44,5	Sin cristalización
AMBERLIT E® XA1600	Copolímero de estireno-divinilbenceno	Ninguna	25,8	31,8	Sin cristalización
DIAION® HP2MGL	Polímero de metacrilato	Ninguna	16,2	39,1	Sin cristalización
DIAION® WK10	Copolímero de metacrilato-divinilbenceno	Grupo carboxilo	15,4	32,7	Sin cristalización
TRILITE® AMP16	Copolímero de estireno-divinilbenceno	Grupo trimetilamina	13,5	38,9	Sin cristalización
TRILITE® AW90	Copolímero de estireno-divinilbenceno	Grupo amino terciario	14,2	32,2	Sin cristalización

Cuando la resina de copolímero de estireno-divinilbenceno que tiene un grupo sulfato como grupo funcional se utilizó como fase estacionaria, todos los resultados experimentales mostraron que el rendimiento del proceso de cromatografía en SMB era superior al 90 %, que el contenido de L-cisteína era del 92,5 % o más, y que la pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína era del 99,5 % o más. Por el contrario, cuando los cristales se obtuvieron empleando resinas que tenían un grupo carboxilo débilmente ácido, un grupo trimetilamina básico fuerte, un grupo amino terciario básico débil, o sin grupo funcional, el rendimiento del proceso de cromatografía en SMB era del 13,5 % al 25,8 %, y el contenido de L-cisteína era del 31,8 % al 44,5 %. Es decir, el rendimiento y el contenido se redujeron en un 50 % o más, en comparación con el rendimiento y el contenido obtenidos cuando se utilizó como fase estacionaria un grupo funcional fuertemente ácido.

En base a esto, se confirmó que en el caso en donde la resina con un grupo funcional fuertemente ácido se utilizara como fase estacionaria cuando el caldo de fermentación de L-cisteína se separara y cristalizara mediante cromatografía continua, se podían obtener cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína con un alto rendimiento, concentración y pureza.

Ejemplo experimental 2 - Evaluación del caldo de fermentación que contiene L-cisteína, según el pH

En el Ejemplo de preparación (utilizado TRILITE® MCK32L), se prepararon cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína variando solo el pH del caldo de fermentación que contenía L-cisteína. Específicamente, tras obtener el caldo de fermentación que contenía L-cisteína de la misma manera que en el Ejemplo de preparación, el pH del caldo de fermentación se varió de 2,5 a 9,5 utilizando ácido sulfúrico al 98 % o una solución de sosa cáustica al 50 %.

Por consiguiente, se midieron el rendimiento del proceso de cromatografía en SMB, el contenido sólido de L-cisteína (%) en el líquido separado obtenido mediante el proceso de cromatografía en SMB, y la pureza de los cristales de monohidrato de hidrocloruro de L-cisteína finalmente recuperados. La tasa de recuperación del proceso de cromatografía en SMB se calculó como la tasa de recuperación de L-cisteína en el líquido separado, en comparación con el caldo de fermentación introducido en el aparato de cromatografía en SMB. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

pH del caldo de fermentación	Tasa de recuperación de la cromatografía en SMB (%)	Contenido de L-cisteína (%)	Pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (%)
2,5	30,1	81,3	98,2
3,0	59,4	85,4	98,9

pH del caldo de fermentación	Tasa de recuperación de la cromatografía en SMB (%)	Contenido de L-cisteína (%)	Pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (%)
3,5	68,2	90,1	99,6
4,0	76,5	91,2	99,5
4,5	88,2	93,7	99,6
5,0	90,2	94,5	99,7
5,5	92,4	93,2	99,7
6,0	91,8	92,1	99,5
6,5	89,4	92,7	99,4
7,0	86,1	92,2	99,5
7,5	69,2	90,3	99,3
8,0	60,3	88,4	99,0
8,5	58,2	87,9	99,1
9,0	50,4	85,7	98,7
9,5	22,7	58,2	75,6

Se determinó que el rendimiento del proceso de cromatografía en SMB era del 50 % o más en un rango de pH de 3,0 a 9,0, del 85 % o más en un rango de pH de 4,5 a 7,0, y del 90 % en un rango de pH de 5,0 a 6,0. El contenido sólido de L-cisteína, excluyendo la humedad, en el líquido separado obtenido mediante el proceso de cromatografía en SMB era del 85 % o más en un rango de pH de 3,0 a 9,0, y del 90 % o más en un rango de pH de 3,5 a 7,5.

Además, se determinó que la pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína era del 98 % o más en un rango de pH de 2,5 a 9,0, y del 99 % o más en un rango de pH de 3,5 a 8,5. Es decir, se confirmó que cuando se empleó el método de la presente descripción, los cristales de monohidrato de hidrocloruro de L-cisteína se podían obtener con una pureza muy alta, sin afectar en gran medida al rango de pH.

Ejemplo experimental 3 - Evaluación según la cantidad de ácido clorhídrico añadida

En el Ejemplo de preparación (utilizado TRILITE® MCK32L), se prepararon cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína variando solo la relación de equivalencia [HCl]/[L-cisteína] del ácido clorhídrico añadido en el rango de 0,80, 0,85, 0,90, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 y 3,5.

Por consiguiente, se midieron el rendimiento de la cromatografía en SMB y la pureza de los cristales de monohidrato de hidrocloruro de L-cisteína finalmente recuperados. La tasa de recuperación del proceso de cristalización se calculó como la tasa de recuperación de la L-cisteína contenida en los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína finalmente recuperados, en relación con la L-cisteína en el líquido separado según el proceso de cromatografía en SMB. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Relación de equivalencia [HCl]/[L-cisteína]	Tipo de cristales	Pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (%)	Tasa de recuperación del proceso de cristalización (%)
0,80	L-cisteína	-	-
0,85	L-cisteína	-	-
0,90	Monohidrato de clorhidrato de L-cisteína	99,5	43,7
1,0	Monohidrato de clorhidrato de L-cisteína	99,7	46,1
1,5	Monohidrato de clorhidrato de L-cisteína	99,5	60,2

Relación de equivalencia [HCl]/[L-cisteína]	Tipo de cristales	Pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (%)	Tasa de recuperación del proceso de cristalización (%)
2,0	Monohidrato de clorhidrato de L-cisteína	99,7	79,1
2,5	Monohidrato de clorhidrato de L-cisteína	99,6	64,9
3,0	Monohidrato de clorhidrato de L-cisteína	99,6	44,9
3,5	Monohidrato de clorhidrato de L-cisteína	99,7	24,8

Todos los cristales se precipitaron durante la concentración, pero cuando la relación de equivalencia [HCl]/[L-cisteína] era de 0,85 o menos, se precipitaron los cristales de L-cisteína, y cuando la relación de equivalencia era de 0,9 o más, se precipitaron los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína. Es decir, se puede interpretar que cuando la relación de equivalencia era superior a 0,85, los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína se precipitaron.

Se determinó que la pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína era del 98 % o más cuando se formaba el monohidrato de clorhidrato de L-cisteína independientemente de la relación de equivalencia [HCl]/[L-cisteína]. Se determinó que la tasa de recuperación del proceso de cristalización para el monohidrato de clorhidrato de L-cisteína era del 40 % o más en la relación de equivalencia [HCl]/[L-cisteína] de 0,9 a 3,0, y se espera que sea superior al 50 % en la relación de equivalencia superior a 1,0 e inferior a 3,0. Además, se determinó que la pureza era del 60 % o más en la relación de equivalencia de 1,5 a 2,5, y se predice que puede haber una condición óptima para alcanzar la tasa de recuperación más alta en la relación de equivalencia de 1,5 a 2,5.

Ejemplo experimental 4 - Evaluación según la concentración del concentrado

En el Ejemplo de preparación (utilizado TRILITE® MCK32L), se prepararon cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína variando solo la concentración del concentrado obtenido al concentrar el líquido separado al que se añadió ácido clorhídrico de 100 g/L a 900 g/L.

Por consiguiente, en el momento en que se produjo la nucleación, finalmente se recuperó la pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína, y se midió la tasa de recuperación del proceso de cristalización. La tasa de recuperación del proceso de cristalización se calculó como la tasa de recuperación de la L-cisteína contenida en los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína finalmente recuperados, en relación con la L-cisteína en el líquido separado según el proceso de cromatografía en SMB. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Concentración (g/l)	Momento y qué nucleación se produjo	Pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (%)	Tasa de recuperación del proceso de cristalización (%)
100	Sin formación de cristales	Sin formación de cristales	0
200	Durante el enfriamiento	99,8	28,3
300	Durante la concentración	99,7	50,7
400	Durante la concentración	99,5	62,1
500	Durante la concentración	99,7	70,6
600	Durante la concentración	99,6	73,4
700	Durante la concentración	99,7	79,1
800	Durante la concentración	99,1	83,2
900	Durante la concentración	No hay separación de cristales debido a la solidificación	No hay separación de cristales debido a la solidificación

La nucleación del monohidrato de clorhidrato de L-cisteína se produjo cuando la concentración era de 200 g/L o más, pero la nucleación se produjo durante la concentración cuando la concentración era de 300 g/L o más, y fue posible llevar a cabo una cristalización rápida.

La pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína era del 99 % o más en todos los casos en que se formaron cristales. Es decir, se confirmó que cuando los cristales se obtuvieron utilizando el método de la presente descripción, los cristales de monohidrato de hidrocloruro de L-cisteína se podían obtener con una pureza muy alta, independientemente de la concentración del líquido separado. La tasa de recuperación del proceso de cristalización aumentó en proporción a la concentración. Sin embargo, cuando la concentración era de 800 g/L, se podían obtener cristales de L-cisteína con una alta pureza y una alta tasa de recuperación, mientras que, cuando la concentración era de 900 g/L, se producía la solidificación de la suspensión de cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína y, en consecuencia, eran imposibles la agitación y la separación de los cristales. Por lo tanto, se espera que los cristales de L-cisteína se puedan obtener con una alta pureza y una alta tasa de recuperación a una concentración inferior a 900 g/L.

En base a estos resultados, se confirmó que cuando la concentración del líquido separado para la cromatografía en SMB era de 200 g/L a menos de 900 g/L, los cristales de L-cisteína se obtuvieron fácilmente. En particular, se confirmó que cuando la concentración estuvo en el rango de 300 g/L a 800 g/L, los cristales podían obtenerse con un proceso de cristalización más rápido, con una alta pureza y una alta tasa de recuperación.

Ejemplo experimental 5 - Evaluación según el cambio de las condiciones de enfriamiento a baja concentración

El concentrado, a partir del cual no se formaron cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína, incluso cuando se enfrió a 15 °C, cuando la concentración del líquido separado para la cromatografía en SMB era de 100 g/L en el Ejemplo 4, se enfrió a -10 °C a una tasa de enfriamiento constante durante 2 horas y 30 minutos en un tanque de chaqueta junto con agitación, y después se agitó a la misma temperatura que la temperatura al finalizar el enfriamiento durante 12 horas. Como resultado, se formaron cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína. Los cristales se sometieron a una separación sólido-líquido utilizando un aparato de filtración por membrana a presión reducida, se les añadieron 100 ml de un líquido de lavado, y se secaron en una secadora de horno a 35 °C durante 12 horas, para reducir la humedad residual al 12,0 % o menos. Finalmente, se prepararon cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína. La pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína era del 99,8 %, y se determinó que la tasa de recuperación del proceso de cristalización era del 9,7 %.

En base a esto, se confirmó que, incluso cuando la concentración del líquido separado para la cromatografía en SMB era inferior a 200 g/L, los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína se podían obtener controlando la temperatura de enfriamiento. Sin embargo, la tasa de recuperación del proceso de cristalización era demasiado baja para aplicarse industrialmente. Además, había desventajas porque el proceso de cristalización por enfriamiento debe llevarse a cabo incluso en condiciones de temperatura severas por debajo de cero, y porque el tiempo de cristalización es largo.

Ejemplo experimental 6 - Evaluación según la temperatura de enfriamiento

En el Ejemplo de preparación, los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína se prepararon variando solo la temperatura de enfriamiento de la suspensión de cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína. Específicamente, se llevaron a cabo un total de 5 experimentos de cristalización, incluyendo la agitación de la suspensión de cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína a 55 °C durante 2 horas sin refrigeración, y el enfriamiento de la suspensión de cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína a un rango de temperatura diferente de 0 °C a 45 °C, con una velocidad de enfriamiento de 10 °C/h mientras se agitaba. El volumen inicial de la suspensión de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína utilizada en cada experimento era de 1 L.

Por consiguiente, la pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína y la tasa de recuperación del proceso de cristalización, se muestran en la Tabla 5. La tasa de recuperación del proceso de cristalización se calculó como la tasa de recuperación de la L-cisteína contenida en los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína finalmente recuperados, en relación con la L-cisteína en el líquido separado según el proceso de cromatografía en SMB. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Temperatura de enfriamiento (°C)	Pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (%)	Tasa de recuperación del proceso de cristalización (%)
0	99,5	83,5
15	99,7	79,1
30	99,7	74,2
45	99,8	68,9

Temperatura de enfriamiento (°C)	Pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (%)	Tasa de recuperación del proceso de cristalización (%)
55 (Sin cristalización)	99,8	64,3

La pureza de los cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína era del 99,5 % o más en todos los casos. Además, la tasa de recuperación del proceso de cristalización era del 64 % o más, incluso cuando no se produjo el enfriamiento, y la tasa de recuperación del proceso de cristalización aumentó a medida que disminuía la temperatura de enfriamiento. Se determinó que la tasa de recuperación del proceso era del 70 % o más a una temperatura inferior a 45 °C, y se esperaba que la tasa de recuperación del proceso fuera del 74 % o más a una temperatura de 30 °C o inferior.

Ejemplo 7 - Evaluación según la concentración del caldo de fermentación que contiene L-cisteína utilizado como materia prima para la cromatografía en SMB

En el Ejemplo de preparación, los cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína se prepararon variando solo la concentración del caldo de fermentación (pH 5,5) que contenía L-cisteína utilizado como materia prima para la cromatografía en SMB. Específicamente, se realizaron un total de 6 experimentos, incluido el uso del caldo de fermentación de L-cisteína que tenía una concentración de 26 g/L obtenido en el Ejemplo de preparación como líquido fuente para la cromatografía en SMB, el uso de un caldo de fermentación que tenía una concentración de L-cisteína de 10 g/L como líquido fuente para la cromatografía en SMB por dilución con agua, y el uso de un caldo de fermentación que tenía una concentración de L-cisteína de 60 g/L a 150 g/L como líquido fuente para la cromatografía en SMB por concentración utilizando un evaporador de película fina. Cuando la concentración de L-cisteína se incrementó a 180 g/L, el proceso de cromatografía en SMB no se llevó a cabo, ya que los cristales de L-cisteína se precipitaron.

El volumen del líquido fuente utilizado en cada experimento era de 0,1 kL o más. El rendimiento del proceso de cromatografía en SMB y el contenido sólido de L-cisteína, excluyendo la humedad, en el líquido del proceso producido por cromatografía en SMB, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Concentración de L-cisteína en el líquido fuente para la cromatografía en SMB (g/L)	Rendimiento del proceso de cromatografía en SMB (%)	Contenido sólido de L-cisteína en líquido separado (%)
10	90,3	94,2
26	91,5	93,0
60	90,9	93,4
90	91,8	92,8
120	92,4	93,2
150	92,0	93,2

El rendimiento del proceso de cromatografía en SMB era del 90 % o más en todas las secciones, y el contenido sólido de L-cisteína, excluyendo la humedad, en el líquido del proceso producido mediante cromatografía en SMB era del 90 % o más en todas las secciones. Según los resultados anteriores, se puede interpretar que el método para purificar la L-cisteína mediante cromatografía en SMB de la presente descripción es muy eficaz para purificar y cristalizar el caldo de fermentación que contiene L-cisteína, independientemente de la concentración de L-cisteína en el líquido fuente.

Si bien la presente descripción se ha descrito con referencia a los ejemplos ilustrativos particulares, los expertos en la técnica a la que se refiere la presente descripción entenderán que la presente descripción puede realizarse de otras formas específicas.

Por lo tanto, los ejemplos anteriores se consideran ilustrativos en todos los aspectos, y no restrictivos. El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas, en lugar de por la descripción detallada.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína, que comprende:

(a) obtener un líquido separado tras introducir un caldo de fermentación que tiene un intervalo de pH de 3,0 a 9,0 y que contiene L-cisteína, en un aparato de cromatografía continua que tiene como fase estacionaria una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida;
(b) añadir ácido clorhídrico al líquido separado, de manera que la relación de equivalencia ([HCl]/[L-cisteína]) del ácido clorhídrico a la L-cisteína sea de 0,9 a 3,0;
(c) concentrar el líquido separado al que se añade ácido clorhídrico; y
(d) recuperar del concentrado cristales de hidrato de clorhidrato de L-cisteína;
en donde la resina de intercambio catiónico fuertemente ácida de la etapa (a) tiene un grupo funcional de ácido sulfónico; y
en donde en la etapa (a) el proceso de cromatografía continua no comprende la adsorción/elución de L-cisteína.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además, ajustar el caldo de fermentación que contiene L-cisteína, a un pH de 3,5 a 7,5, antes de la etapa (a).

3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además, concentrar el caldo de fermentación en un rango de pH de 3,0 a 9,0, que contiene L-cisteína, antes de la etapa (a).

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la resina de intercambio catiónico fuertemente ácida de la etapa (a) es un copolímero de estireno-divinilbenceno.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el aparato de cromatografía continua de la etapa (a) es un aparato de cromatografía en lecho móvil simulado (SMB).

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el líquido separado en la etapa (a) tiene un contenido sólido de L-cisteína, excluyendo la humedad, del 85 % (p/p) o más.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la tasa de recuperación del proceso de cromatografía continua en la etapa (a), como una proporción de L-cisteína en el líquido separado obtenido en relación con la L-cisteína en el caldo de fermentación introducido, es del 50 % (p/p) o más.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la relación de equivalencia ([HCl]/[L-cisteína]) del ácido clorhídrico a la L-cisteína en la etapa (b), es de 1,5 a 2,5.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa (c) se lleva a cabo de manera que la concentración de L-cisteína en el líquido separado, al que se añade ácido clorhídrico, sea de 200 g/L a menos de 900 g/L.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la etapa (c) se lleva a cabo de manera que la concentración de L-cisteína en el líquido separado, al que se añade ácido clorhídrico, sea de 500 g/L a menos de 900 g/L.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además, enfriar el concentrado antes de la etapa (d).

12. El método de la reivindicación 11, en donde el concentrado se enfría a una temperatura de 0 °C a 30 °C.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende añadir un filtrado obtenido al recuperar los cristales de la etapa (d) al caldo de fermentación de la etapa (a), al líquido separado de la etapa (b), o al líquido separado al que se añade ácido clorhídrico.

Figura 1

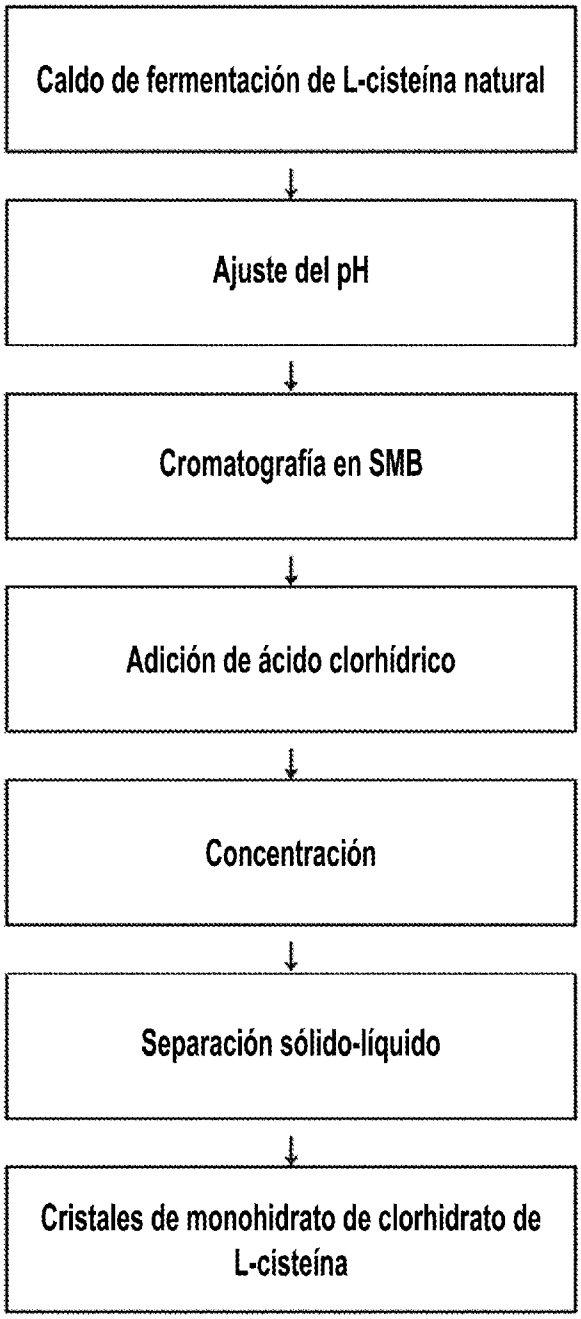
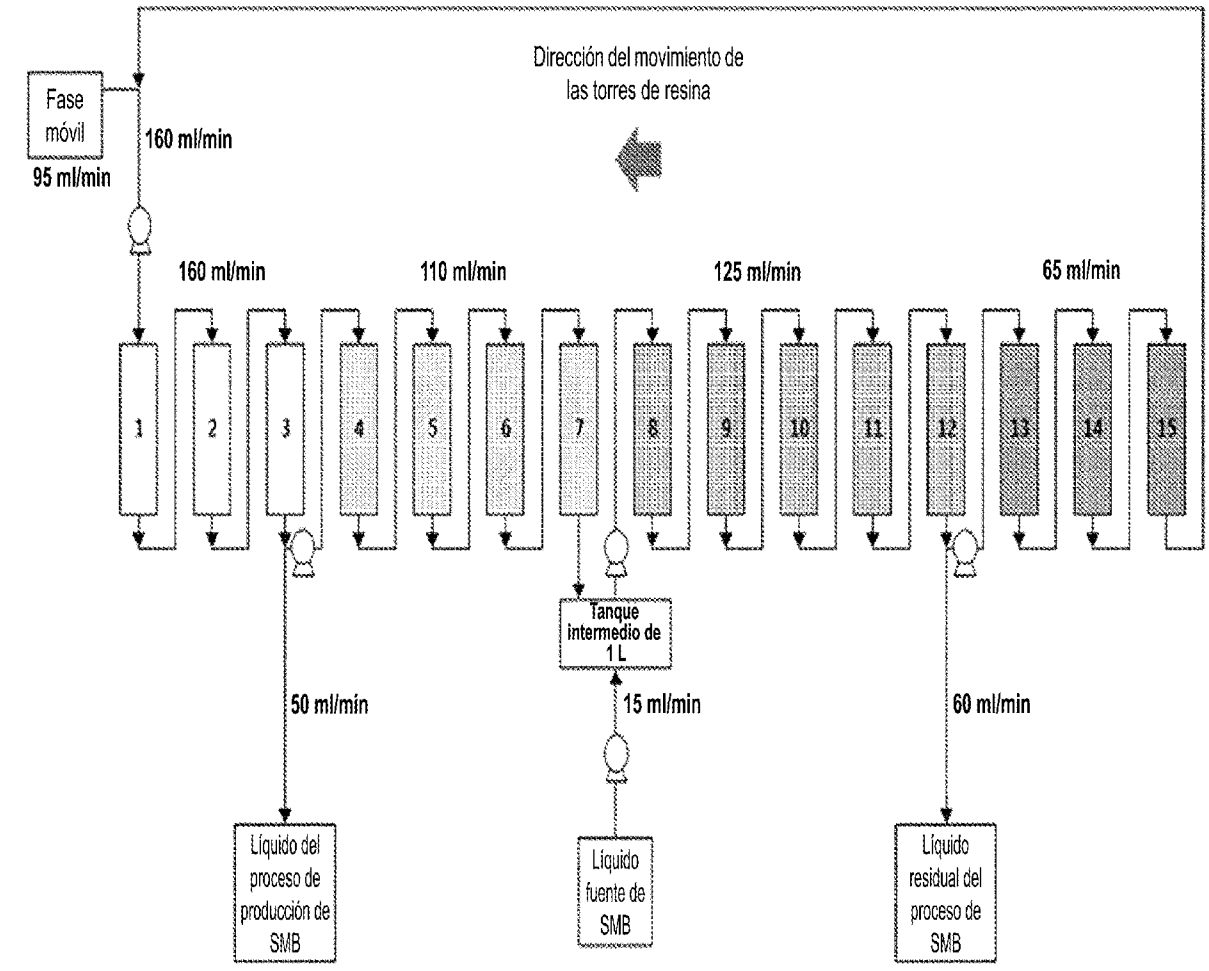

Caldo de fermentación de L-cisteína natural
Ajuste del pH
Cromatografía en SMB
Adición de ácido clorhídrico
Concentración
Separación sólido-líquido
Cristales de monohidrato de clorhidrato de L-cisteína

Figura 2


Dirección del movimiento de las torres de resina
Fase móvil
95 ml/min
160 ml/min
160 ml/min
110 ml/min
125 ml/min
65 ml/min
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
Tanque intermedio de 1 L
50 ml/min
15 ml/min
60 ml/min
Líquido del proceso de producción de SMB
Líquido fuente de SMB
Líquido residual del proceso de SMB