

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 911**

51 Int. Cl.:

C07H 3/02 (2006.01)

C07H 1/06 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2016** **PCT/KR2016/003843**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017** **WO17150766**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2016** **E 16892779 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021** **EP 3423460**

54 Título: **Método de producción de d-psicosa de alta pureza**

30 Prioridad:

29.02.2016 KR 20160024193

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

28.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LEE, JOO HANG;
KIM, MIN HOE;
KIM, SEONG BO y
PARK, SEUNG WON

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 870 911 T3

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 de producción de d-psicosa de alta pureza

5 1. Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para producir D-psicosa, y más particularmente, a un método para producir D-psicosa de alta pureza con alto rendimiento sin deformación por calor durante la producción.

10 2. Descripción de la técnica relacionada

Se ha informado que la D-psicosa es un edulcorante que apenas se metaboliza en el cuerpo a diferencia de la fructosa o la sacarosa, no tiene sustancialmente calorías y tiene poco efecto sobre el aumento de peso corporal porque inhibe la formación de grasa corporal (Matsuo, T. y otros. Asia Pac. J. Clin. Untr., 10, 233-237, 2001; Matsuo, T. y K. Izumori, Asia Pac. J. Clin. Nutr., 13, S127,2004).

El documento WO 2011/119004 describe un método para producir cristales de D-psicosa, el método que comprende eliminar impurezas de una solución de D-psicosa para obtener una solución de D-psicosa purificada; concentrar la solución de D-psicosa purificada; y cristalización de D-psicosa a partir de la solución de D-psicosa concentrada en un estado sobresaturado bajo una zona metaestable.

La patente de Estados Unidos 2012/094940 describe un proceso para producir una composición de azúcar que comprende una cantidad definida de una hexosa objetivo, el proceso que comprende tratar un material de azúcar líquido de partida que comprende hexosa o una mezcla de las mismas en presencia de al menos un miembro seleccionado de una resina de intercambio iónico básica, un álcali y una sal de calcio, de esta manera se realiza una reacción de isomerización que es una reacción de equilibrio para transformar la hexosa como un material de azúcar inicial en la hexosa objetivo, para dar una mezcla de azúcar que contiene una cantidad definida de la hexosa objetivo y que tiene una constitución de azúcar diferente del material de azúcar de partida.

Recientemente, los presentes inventores han informado un método para producir económicamente D-psicosa mediante la isomerización de D-glucosa a D-fructosa, seguido de hacer reaccionar la D-fructosa resultante con células inmovilizadas capaces de producir D-psicosa epimerasa (solicitud de patente de Corea núm. 10-2009-0118465).

Dado que las soluciones de reacción que contienen D-psicosa producidas mediante la reacción enzimática son productos de baja pureza que contienen D-psicosa con un contenido de sólidos de aproximadamente 20 % (p/p) a aproximadamente 30 % (p/p), es necesario purificar la D-psicosa mediante cromatografía continua para producir cristales de D-psicosa de alta pureza que tengan una pureza del 98 % (p/p) o más.

Dado que la velocidad de conversión para la reacción enzimática de D-psicosa producida a partir de D-fructosa por el método anterior es del 20 % (p/p) al 30 % (p/p), la reacción muestra el flujo de proceso en el que la cantidad de licor madre generada en el proceso, es decir, la cantidad de licor madre de D-fructosa separada de la cromatografía continua y el licor madre separado de la cristalización es mayor que la cantidad de D-psicosa producida. Como resultado, la reducción en la cantidad producida de D-psicosa conduce a un aumento en el costo de fabricación que a su vez aumenta los costos de producción, lo que provoca problemas en vista de la producción industrial antieconómica.

En consecuencia, para inhibir el aumento del costo de fabricación debido al bajo rendimiento, existe la necesidad de un método capaz de producir D-psicosa de alta pureza con alto rendimiento.

50 Breve Resumen

Las modalidades de la presente invención proporcionan un método para producir D-psicosa de alta pureza con alto rendimiento.

De acuerdo con la presente invención, un método para producir D-psicosa incluye: someter la D-fructosa a epimerización de D-psicosa para producir una solución que contiene D-psicosa; someter la solución que contiene D-psicosa a un primer enfriamiento y purificación iónica; someter la solución purificada que contiene D-psicosa a una primera concentración y un segundo enfriamiento; someter la solución que contiene D-psicosa, que se ha sometido a una primera concentración y un segundo enfriamiento, a cromatografía para obtener un licor madre que contiene D-fructosa y una solución separada que contiene D-psicosa; y someter la solución separada que contiene D-psicosa a una segunda concentración y un tercer enfriamiento para cristalizar la D-psicosa, con lo que se obtienen cristales de D-psicosa y un licor madre que contiene D-psicosa, en donde el licor madre que contiene D-fructosa que se produce por cromatografía se vuelve a usar en la epimerización de D-psicosa, y en donde el licor madre que contiene D-psicosa se vuelve a usar en cualquiera del primer enfriamiento y purificación iónica, la primera

concentración y segundo enfriamiento y cromatografía. En una modalidad, el licor madre que contiene D-psicosa se vuelve a usar en el primer enfriamiento y purificación iónica.

5 En una u otra modalidad, el método puede incluir además enfriar el licor madre que contiene D-fructosa producido por la cromatografía o el licor madre que contiene D-psicosa producido por la cristalización de D-psicosa de 25 °C a 45 °C, específicamente de 30 °C a 40 °C, antes de que se vuelva a usar. La cromatografía puede ser, por ejemplo, cromatografía continua.

10 En una u otra modalidad, el primer enfriamiento y el tercer enfriamiento pueden referirse a un proceso de reducción de la temperatura de la solución o la temperatura ambiente de 25 °C a 45 °C, específicamente de 30 °C a 40 °C, y el segundo enfriamiento puede referirse a un proceso de reducción de la temperatura de la solución o la temperatura ambiente de 45 °C a 65 °C, específicamente de 50 °C a 60 °C.

15 En una u otra modalidad, la primera concentración se refiere a un proceso de concentración de la solución purificada que contiene D-psicosa para tener una concentración de D-psicosa de 50 brix a 70 brix. La segunda concentración se refiere a un proceso de concentración de D-psicosa en la solución separada para tener una concentración de 75 brix o más, por ejemplo, 80 brix o más.

20 En una u otra modalidad, como el licor madre que contiene D-fructosa se produce mediante cromatografía, se puede usar una fracción que contiene D-fructosa que tiene una pureza del 70 % (p/p) o más. Como el licor madre se produce por cristalización de D-psicosa, se puede usar una fracción que contiene D-psicosa que tiene una pureza del 90 % (p/p) o más.

25 En una u otra modalidad, la epimerización de D-psicosa puede incluir la epimerización a una temperatura de 40 °C a 70 °C, específicamente, 40 °C a 60 °C, más específicamente 40 °C a 50 °C en presencia de D-psicosa epimerasa, variantes de la misma, cepas capaces de producir la enzima o cultivos de la misma.

30 En una u otra modalidad, la purificación iónica se puede realizar mediante el uso de una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida y/o una resina de intercambio aniónico débilmente básica.

En una u otra modalidad, la solución separada que contiene D-psicosa puede contener D-psicosa en una cantidad de 93 % (p/p) o más, específicamente 95 % (p/p) o más.

35 En una u otra modalidad, del primer al tercer enfriamiento puede ser un enfriamiento por intercambio de calor. Ventajosamente, el enfriamiento por intercambio de calor proporciona una amplia área de transferencia de calor y un rápido intercambio de calor debido a la aparición de un flujo turbulento de fluidos, evita la formación de incrustaciones para proporcionar una pequeña reducción en las funciones, de esta forma proporciona una alta viabilidad económica.

40 En una u otra modalidad, los cristales de D-psicosa que se obtienen pueden tener una pureza del 95 % (p/p) o más, más específicamente del 99 % (p/p) o más.

45 En una u otra modalidad, los cristales de D-psicosa preparados por el método expuesto anteriormente pueden tener un rendimiento del 75 % o más, específicamente del 85 % o más.

En otra modalidad, el método de producción de D-psicosa proporciona D-psicosa que tiene una pureza del 99 % (p/p) o más.

50 El método de producción de D-psicosa de acuerdo con las modalidades de la presente invención puede prevenir la deformación térmica de la D-psicosa y permite la producción de D-psicosa con alto rendimiento a través de un proceso estabilizado.

55 Además, el método de producción de D-psicosa de acuerdo con modalidades de la presente invención recoge un licor madre que contiene D-fructosa que se produce por cromatografía y/o licor madre que se produce por cristalización de D-psicosa, que a su vez se vuelve a usar en la epimerización de D-psicosa, primer enfriamiento y purificación iónica, primera concentración y segundo enfriamiento, o cromatografía, de esta manera facilita la separación estable de D-psicosa mediante cromatografía después de un largo período de recirculación, y asegurando la producción de D-psicosa con alto rendimiento.

60 Breve descripción de los dibujos

Los aspectos, características y ventajas anteriores y otros de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada de las siguientes modalidades junto con los dibujos adjuntos, en los que:

65 La Figura 1 es una vista esquemática que representa un método de producción de D-psicosa de acuerdo con una modalidad de la presente invención;

La Figura 2 es una vista esquemática que representa un método de producción de D-psicosa de acuerdo con otra modalidad de la presente invención;

La Figura 3 es una vista esquemática que representa un método de producción de D-psicosa de acuerdo con el Ejemplo Comparativo 2; y

Las Figuras 4 a 8 muestran gráficos que representan cambios en el % de pureza (p/p) de D-psicosa en dependencia de la temperatura y concentración de D-psicosa.

Descripción detallada

En lo adelante, se describirán con más detalle modalidades de la presente invención. En la presente descripción se omitirán las descripciones de detalles evidentes para los expertos en la técnica que tengan conocimientos ordinarios en este campo técnico o campo relevante.

La presente invención se refiere a un método para producir D-psicosa que incluye: someter la D-fructosa a epimerización de D-psicosa para producir una solución que contiene D-psicosa; someter la solución que contiene D-psicosa a un primer enfriamiento y purificación iónica; someter la solución purificada que contiene D-psicosa a una primera concentración y un segundo enfriamiento; someter la solución que contiene D-psicosa, que se ha sometido a una primera concentración y un segundo enfriamiento, a cromatografía para obtener un licor madre que contiene D-fructosa y una solución separada que contiene D-psicosa; someter la solución separada que contiene D-psicosa a una segunda concentración y un tercer enfriamiento para cristalizar D-psicosa, de manera que se obtienen cristales de D-psicosa y un licor madre que contiene D-psicosa, en donde el licor madre que contiene D-fructosa que se produce por cromatografía es vuelve a usar en la epimerización de D-psicosa, y en donde el licor madre que contiene D-psicosa se vuelve a usar en cualquiera del primer enfriamiento y purificación iónica, primera concentración y segundo enfriamiento y cromatografía. En una modalidad, el licor madre que contiene D-psicosa se vuelve a usar en el primer enfriamiento y purificación iónica.

En el método de acuerdo con la presente invención, el licor madre que contiene D-fructosa que se produce por cromatografía o el licor madre que se produce a través de la cristalización de D-psicosa se vuelve a usar en cualquiera de las epimerizaciones de D-psicosa, el primer enfriamiento y purificación iónica, la primera concentración y segundo enfriamiento, y cromatografía, y por lo tanto puede producir D-psicosa con alto rendimiento, de esta manera se mejora la eficiencia de producción y se reducen los costos de producción.

Primero, la D-fructosa usada como sustrato para la epimerización puede usarse en una concentración de 30 brix (%) a 50 brix (%) y puede disolverse en agua a una temperatura de 30 °C a 40 °C en uso. Alternativamente, la D-fructosa puede mezclarse con los licores madre que contienen D-fructosa producidas por cromatografía y usarse en una concentración de 30 brix (%) a 50 brix (%) a una temperatura de 30 °C a 40 °C. En la presente descripción, como el licor madre que contiene D-fructosa producido por cromatografía, se puede usar una fracción que contiene D-fructosa que tiene una pureza del 70 % (p/p) o más, específicamente del 75 % (p/p) o más.

La epimerización de D-psicosa se refiere a un proceso de producción de D-psicosa a través de la epimerización de D-fructosa en presencia de D-psicosa epimerasa, variantes de la misma, cepas capaces de producir la enzima o cultivos de la misma. La D-psicosa epimerasa de acuerdo con la presente invención puede incluir enzimas o variantes de las mismas derivadas de varios microorganismos donantes tales como *Agrobacterium tumefaciens*, *Flavonifractor plauti* y *Clostridium hylemonae*. Las cepas para la transformación pueden incluir *Escherichia coli* o el género *Corynebacterium*, el género *Bacillus* y el género *Aspergillus*, sin limitarse a ellas. Las cepas transformadas por *Escherichia coli* pueden incluir, por ejemplo, BL21 (DE3)/pET24-ATPE [Publicación de Patente Coreana No. 10-2011-0035805A], BL21 (DE3)/pET24-ATPE-2 [Patente Coreana No. 10-1203856]. La cepa del género *Corynebacterium* puede incluir *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pCJ-1-ATPE [número de acceso KCCM11046 descrito en la publicación de patente coreana No.10-2011-0035805A, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pFIS-1-ATPE-2 [Número de acceso KCCM11204P descrito en la patente coreana No.10-1203856], *Corynebacterium glutamicum* CJ KY [número de acceso KCCM11403P descrito en la patente coreana núm.10-1455759], *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pFIS-2-ATPE-2 [Número de acceso KCCM11678P descrito en la publicación de patente coreana No.10-2015-0047111A], y similares.

En una modalidad, la epimerización se puede realizar inmovilizando D-psicosa epimerasa, variantes de la misma, cepas capaces de producir la enzima o cultivos de la misma en un portador, por ejemplo, alginato de sodio, llenado de equipo de isomerización, por ejemplo, una columna, con la enzima inmovilizada, y suministrando una solución que contiene D-fructosa a la columna llena. La temperatura en el equipo puede mantenerse entre 40 °C y 70 °C, por ejemplo, entre 40 °C y 55 °C, para la epimerización. La temperatura de la solución que contiene D-fructosa suministrada puede aumentarse, por ejemplo, de 40 °C a 60 °C, por ejemplo 50 °C, a una velocidad de calentamiento de 5 °C a 20 °C por hora a través de un intercambiador de calor tal como el SV [Velocidad espacial: velocidad de flujo (L)/hora (h)/cantidades de resina (L)] se convierte de 0,5 a 3. La D-psicosa producida por la epimerización puede tener una pureza de aproximadamente el 15 % (p/p) a aproximadamente el 35 % (p/p), por ejemplo, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 30 % (p/p).

La solución que contiene D-psicosa que se produce como anteriormente se somete a un primer enfriamiento y purificación iónica. El primer enfriamiento se refiere a un proceso de reducción de la temperatura de la solución o la temperatura ambiente de 25 °C a 45 °C, específicamente de 30 °C a 40 °C. En una modalidad, los licores madre producidos por cristalización de D-psicosa se pueden volver a usar en el primer enfriamiento y purificación iónica. Específicamente, el enfriamiento se puede realizar de manera que la temperatura se reduzca lentamente a una velocidad de 1 °C a 10 °C por hora a través de un intercambiador de calor. Si la D-psicosa se expone continuamente a una determinada temperatura, la D-psicosa puede descomponerse mediante deformación por calor, de esta manera se reduce la pureza de la D-psicosa en el flujo de producción del proceso. En consecuencia, es difícil lograr una producción de alto rendimiento de D-psicosa (véanse las Figuras 4 a 8). Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se evita la deformación térmica de la D-psicosa mediante el control de la temperatura en cada proceso del método.

A continuación, la purificación iónica se refiere a un proceso de purificación que permite que la solución enfriada pase a través de una columna llena con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida y/o una resina de intercambio aniónico débilmente básica. Si se utiliza una resina aniónica fuertemente básica, la D-psicosa se puede deformar a una temperatura baja de 25 °C a 45 °C, lo que provoca un deterioro de la pureza. Por lo tanto, para producir D-psicosa con alto rendimiento, se puede usar una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida o una resina de intercambio aniónico débilmente básica. Más específicamente, se usa una resina de intercambio aniónico débilmente básica al 100 %. Se puede usar una resina de intercambio catiónico y una resina de intercambio aniónico al mismo tiempo para eliminar efectivamente los componentes iónicos. En este caso, la relación entre la resina de intercambio catiónico y la resina de intercambio aniónico puede ser de 1:0,5 a 1:3. Durante la purificación iónica, se mantiene una temperatura de 25 °C a 45 °C, específicamente de 30 °C a 40 °C para evitar la deformación de la D-psicosa. En consecuencia, es posible eliminar los componentes iónicos contenidos como contaminantes en la solución que contiene D-psicosa. Después de la purificación iónica, el contenido de componentes iónicos es de 20 microsiemens o menos, específicamente 10 microsiemens por cm o menos, medido con un conductímetro. La D-psicosa en la solución purificada de iones tiene una pureza de aproximadamente el 10 % (p/p) a aproximadamente 35 % (p/p).

Luego, la solución que contiene D-psicosa purificada con iones se somete a una primera concentración y un segundo enfriamiento.

La primera concentración se refiere a un proceso de concentración de la solución que contiene D-psicosa purificada con iones de manera que la solución tenga una concentración de D-psicosa de 50 a 70 brix, por ejemplo, de 55 a 65 brix. Específicamente, es posible concentrar la solución que contiene D-psicosa purificada con iones a una temperatura de 60 °C a 80 °C, por ejemplo, de 65 °C a 75 °C durante 1 minuto a 1 hora, específicamente de 1 minuto a 30 minutos. Para la concentración, se puede usar un evaporador de baja temperatura para evitar la deformación de la D-psicosa. Como se usa en la presente descripción, el término brix se refiere al porcentaje en peso de D-psicosa o D-fructosa en base al peso total de la solución. Después de la primera concentración, se puede realizar un segundo enfriamiento. Cuando se realiza el segundo enfriamiento, la temperatura de la solución o la temperatura ambiente puede reducirse a una temperatura más baja en al menos 10 °C que la de la primera concentración. En una modalidad, la temperatura para el segundo enfriamiento puede ser de 50 °C a 60 °C. Específicamente, la temperatura puede reducirse lentamente a una velocidad de enfriamiento de 5 °C a 25 °C por hora a través de un intercambiador de calor. En una modalidad, los líquidos madre producidos por cristalización de D-psicosa se pueden volver a usar en la primera concentración y/o segundo enfriamiento.

Posteriormente, la solución que contiene D-psicosa concentrada y enfriada puede someterse a cromatografía para obtener los líquidos madres y una solución separada que contiene D-psicosa.

La cromatografía se refiere a un proceso de separación de la D-psicosa aprovechando la fuerza de unión débil entre la D-psicosa y los iones metálicos unidos a las resinas iónicas. Por ejemplo, la cromatografía puede ser cromatografía continua. Las resinas iónicas usadas en cromatografía pueden ser una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida a la que se unen residuos de K, Na, Ca o Ma. En vista de la separación de D-psicosa y D-fructosa, se usa ventajosamente K, Ca o Na. Por cromatografía, es posible obtener una solución que contiene D-fructosa y una solución separada que contiene D-psicosa. La solución separada que contiene D-psicosa puede ser una fracción que contiene D-psicosa que tiene una pureza del 90 % (p/p) o más, por ejemplo, 95 % (p/p) o más. Específicamente, la D-psicosa tiene una pureza del 90 al 99 % (p/p) o más.

La solución que contiene D-fructosa puede ser una fracción que contiene D-fructosa que tiene una pureza del 70 % (p/p) o más. La solución que contiene D-fructosa se puede volver a usar en la epimerización de D-psicosa. Antes de volverse a usar, el método puede incluir además enfriar la solución a una temperatura de 25 °C a 45 °C, específicamente de 30 °C a 40 °C.

A continuación, la solución separada que contiene D-psicosa se somete a una segunda concentración y un tercer enfriamiento para obtener cristales de D-psicosa. La solución de D-psicosa separada por cromatografía y que tiene una pureza del 90 % (p/p) o más, por ejemplo, una pureza del 95 % (p/p) o más, se somete a una segunda concentración de modo que la solución separada tenga una concentración de D-psicosa de 75 brix o más, por

ejemplo, 80 brix o más. La concentración se realiza específicamente de 60 °C a 80 °C, por ejemplo, 65 °C a 75 °C durante 1 minuto a 1 hora, específicamente durante 1 minuto a 30 minutos. Para la concentración, es posible usar un evaporador de baja temperatura para evitar la deformación de la D-psicosa. Después de la segunda concentración, se puede realizar un tercer enfriamiento. El tercer enfriamiento sirve para cristalizar la D-psicosa y puede incluir reducir la temperatura de la solución o la temperatura ambiente de 30 °C a 40 °C. Más específicamente, el tercer enfriamiento puede realizarse lentamente de modo que la temperatura de la solución o la temperatura ambiente se reduzca de 5 °C a 20 °C por hora a 25 °C a 45 °C, por ejemplo, 30 °C a 40 °C. Dentro del intervalo de temperatura, el calentamiento y enfriamiento se pueden realizar repetidamente de 5 a 10 veces durante 40 horas a 120 horas para realizar la cristalización. El cristal de D-psicosa obtenido puede deshidratarse y secarse adicionalmente. El cristal de D-psicosa obtenido puede tener una pureza del 95 % o más, específicamente del 99 % o más. Además, el cristal de D-psicosa puede tener un rendimiento de 75 % o más, 80 % o más, u 85 % o más, calculado de acuerdo con la Ecuación 1:

$$\text{Rendimiento (\%)} = (\text{Peso de cristales de D-psicosa deshidratados y secos} / \text{peso de D-psicosa contenidos en la solución a cristalizar}) \times 100.$$

En el cálculo del rendimiento, el peso (g/L) de D-psicosa contenido en la solución a cristalizar se determina mediante análisis de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). Luego, el valor medido se sustituye en la Ecuación 1, calculando así el peso de D-psicosa contenida en una solución específica (L).

Los licores madre, excepto los cristales de D-psicosa producidos tras la cristalización de D-psicosa, se pueden volver a usar en cada uno de los procesos anteriores. En una modalidad, los licores madre producidos tras la cristalización se pueden volver a usar en uno o más procesos seleccionados entre los procesos de primer enfriamiento y purificación iónica, primera concentración y segundo enfriamiento y cromatografía. Los licores madre producidos por cristalización de D-psicosa se pueden enfriar de 25 °C a 45 °C y luego se vuelven a usar. El licor madre producido por cristalización de D-psicosa puede ser una fracción que contiene D-psicosa que tiene una pureza del 90 % (p/p) o más, una pureza del 92 % (p/p) o más, o una pureza del 95 % (p/p) o más.

En lo adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a algunos ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse en modo alguno como limitantes de la presente invención.

En la presente descripción se omitirán descripciones de detalles evidentes para los expertos en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se mezclaron fructosa cristalina que tiene una pureza del 99 % (p/p) o más, un licor madre recogido de cromatografía continua a aproximadamente 30 °C, un licor madre recogido de cristalización a aproximadamente 30 °C y agua a aproximadamente 30 °C en un tanque de solución para preparar una solución de sustrato de 50 brix (%) para la reacción enzimática.

Como se describe en la Solicitud de Patente Coreana No.10-2009-0118465, la reacción enzimática se realizó mediante inmovilización de D-psicosa epimerasa separada de *Corynebacterium glutamicum* KCCM 11046 en alginato de sodio como portador, seguido del llenado del equipo de isomerización (torre de isomerización, fabricada por Hanju Machine Industry Inc.) con la enzima inmovilizada, aplicando la solución de sustrato preparado para la reacción enzimática a la torre de isomerización, y calentando la solución de sustrato de 5 °C a 20 °C por hora hasta 50 °C a través de un intercambiador de calor tal como SV[Velocidad espacial: caudal (L)/hora (h)/cantidad de resina (L)] se convirtió en 0,5. Aquí, la D-psicosa resultante tenía una pureza de aproximadamente el 24 % (p/p).

La solución de D-psicosa que tiene una pureza del 24 % (p/p) se sometió a un primer enfriamiento a una velocidad de 5 °C a 10 °C por hora hasta una temperatura de 30 °C a 40 °C a través de un intercambiador de calor, y luego se pasó a través de una columna llena con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida sustituida con grupos de hidrógeno (Lewatit S 1668) y una columna llena con una resina de intercambio aniónico débilmente básica sustituida con grupos hidroxilo (Lewatit S 4528) tal como SV[Space Velocidad: caudal (L)/ hora(h)/cantidad de resina (L)] se convirtió en 3, de esta manera se eliminan los componentes iónicos que quedan en la solución de reacción enzimática. La eliminación de los componentes iónicos se midió mediante el uso de un conductímetro. Aquí, la conductividad se ajustó a no más de 10 microsiemens por cm, y la pureza de la D-psicosa se mantuvo al 24 % (p/p).

La solución que contiene D-psicosa purificada con iones se introdujo en un evaporador de baja temperatura (evaporador de película fina forzada, Welcronhantec Co., Ltd.), se concentró a 60 brix (%) (Solución de D-psicosa x 100/solución total) de 65 °C a 75 °C durante un corto período de tiempo de 10 minutos a 15 minutos. La solución resultante se sometió a un segundo enfriamiento a una velocidad de 5 °C a 25 °C por hora a través de un intercambiador de calor, y luego se pasó a través de una columna llena con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida con grupos activos de calcio unidos a la misma de 50 °C a 60 °C. A través de dicha cromatografía

continua, se separaron una fracción que contenía D-psicosa que tiene una pureza del 95 % (p/p) o más y una fracción que contenía D-fructosa que tiene una pureza del 75 % (p/p) o más.

5 El licor madre separado mediante cromatografía continua, específicamente, la fracción de D-fructosa que tiene una pureza del 75 % (p/p) o más, se recogió y se enfrió a una velocidad de 20 °C a 30 °C por hora. Cuando la fracción alcanzó los 30 °C, la fracción se volvió a circular a un proceso de reacción enzimática.

10 La solución de D-psicosa que tiene una pureza del 95 % (p/p) o más separada mediante cromatografía continua se concentró a 80 brix (%) de 65 °C a 75 °C en un corto período de tiempo de 10 minutos a 15 minutos. La solución concentrada de D-psicosa que tiene una pureza del 95 % (p/p) o más se enfrió rápidamente hasta 40 °C a una velocidad de 5 °C a 20 °C por hora mediante un intercambiador de calor. El calentamiento y enfriamiento se repitieron de 5 a 10 veces dentro del intervalo de temperatura de 35 °C a 40 °C, tal que la cristalización se realizó durante 80 horas a 120 horas, de esta manera se obtiene la D-psicosa (véase la Figura 1). Además, el licor madre separado por cristalización, específicamente, una fracción de D-psicosa que tiene una pureza del 90 % o más, se
15 recogió, se enfrió a 30 °C y se pasó a través de una columna llena con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida sustituida con grupos de hidrógeno y una columna llena con una resina de intercambio aniónico débilmente básica sustituida con grupos hidroxilo.

20 A través de los procedimientos anteriores, la solución de D-psicosa se concentró durante un corto período de tiempo en un evaporador de baja temperatura mientras que la temperatura del proceso se ajustó a una temperatura baja a través del intercambiador de calor, de esta manera se obtiene una D-psicosa de alta pureza que tiene una pureza de 99 % o más con un rendimiento excepcional del 75 % o más.

25 Ejemplo comparativo 1

Se produjo D-psicosa de alta pureza que tiene una pureza del 99 % o más mediante el mismo método que en el Ejemplo 1, en donde el licor madre que contiene D-fructosa que se produce en la cromatografía continua se volvió a usar en la epimerización de D-psicosa y el licor madre que se produjo mediante la cristalización de D-psicosa se volvió a usar, excepto que se omitieron los procedimientos de enfriamiento que incluían el primer enfriamiento y el
30 segundo enfriamiento. El rendimiento de producción fue del 60 %.

La pureza de la D-psicosa se reduce en una cierta concentración o menos y después de un cierto período de tiempo (véase las Figuras 4 a 8). Por lo tanto, si el licor madre de D-fructosa separado mediante cromatografía continua y el licor madre separado mediante cristalización se recirculan continuamente sin enfriamiento, la pureza de D-psicosa
35 introducida en cromatografía continua disminuirá desde una pureza inicial del 24 % (p/p) en proporción a los tiempos repetidos de recirculación, y también se reducirá el rendimiento de una fracción de D-psicosa de alta pureza que tiene una pureza del 95 % (p/p) o más para cristalizar. Por lo tanto, se considera que un rendimiento tan bajo de la fracción de D-psicosa de alta pureza que tiene una pureza del 95 % (p/p) o más actúa como una causa de disminución en el rendimiento de producción de D-psicosa de alta pureza que tiene una pureza del 99 % o más. Además, las impurezas deformadas derivadas de la D-psicosa se separan como una fracción de D-fructosa en el curso de la separación cromatográfica continua, provocando así problemas en la separación cromatográfica continua a medida que se acumulan los tiempos de recirculación. Para controlar tal acumulación de impurezas, se descarta
40 aproximadamente del 5 % (v/v) al 10 % (v/v) de la fracción de D-fructosa, lo que provoca una disminución en el rendimiento de producción de D-psicosa de alta pureza que tiene una pureza del 99 % o más.

45 Si no se descarta aproximadamente del 5 % (v/v) al 10 % (v/v) del licor madre de D-fructosa separado mediante cromatografía continua, la pureza de la D-psicosa introducida en la cromatografía continua disminuirá continuamente debido a las impurezas acumuladas. Por lo tanto, para separar la D-psicosa de alta pureza que tiene una pureza del 95 % (p/p) o más, las condiciones de separación para la cromatografía continua deben modificarse continuamente, de esta manera se provoca un deterioro en la eficiencia de la producción industrial. Además, para separar la D-psicosa de alta pureza que tiene una pureza del 95 % (p/p) o más, también se aumenta la cantidad de agua desionizada, de esta manera se provocan cargas en el proceso de concentración. Como resultado, se produce un fenómeno de cuello de botella en un flujo de proceso, lo que provoca una disminución en la cantidad de producción y un aumento en los costos de producción.

55 Ejemplo comparativo 2

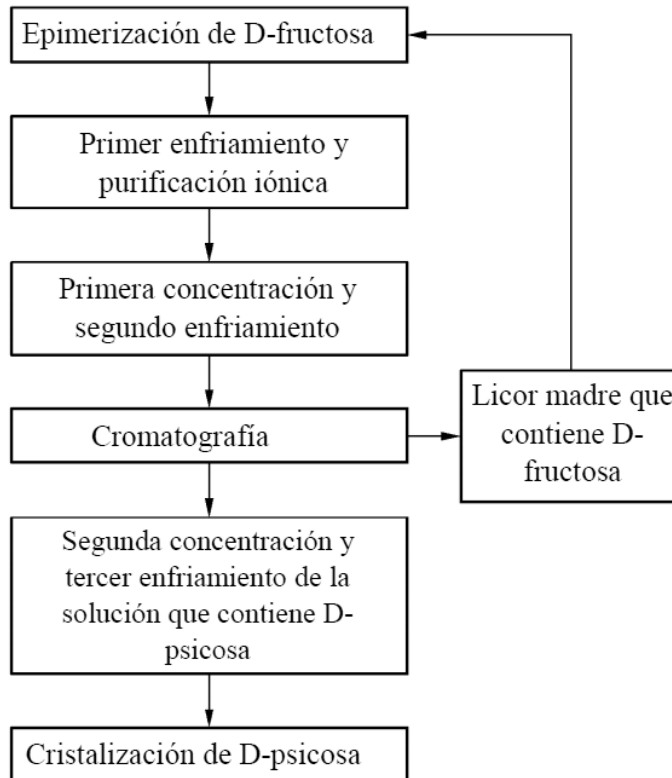
Se produjo D-psicosa de alta pureza que tiene una pureza del 99 % o más mediante el mismo método que en el Ejemplo 1, excepto que se omitieron el volver a usar el licor madre que contiene D-fructosa que se produjo mediante cromatografía continua en epimerización de D-psicosa y el volver a usar el licor madre que se produjo a través de la cristalización de D-psicosa. El rendimiento de producción fue del 20 % (véase la Figura 3).

REIVINDICACIONES

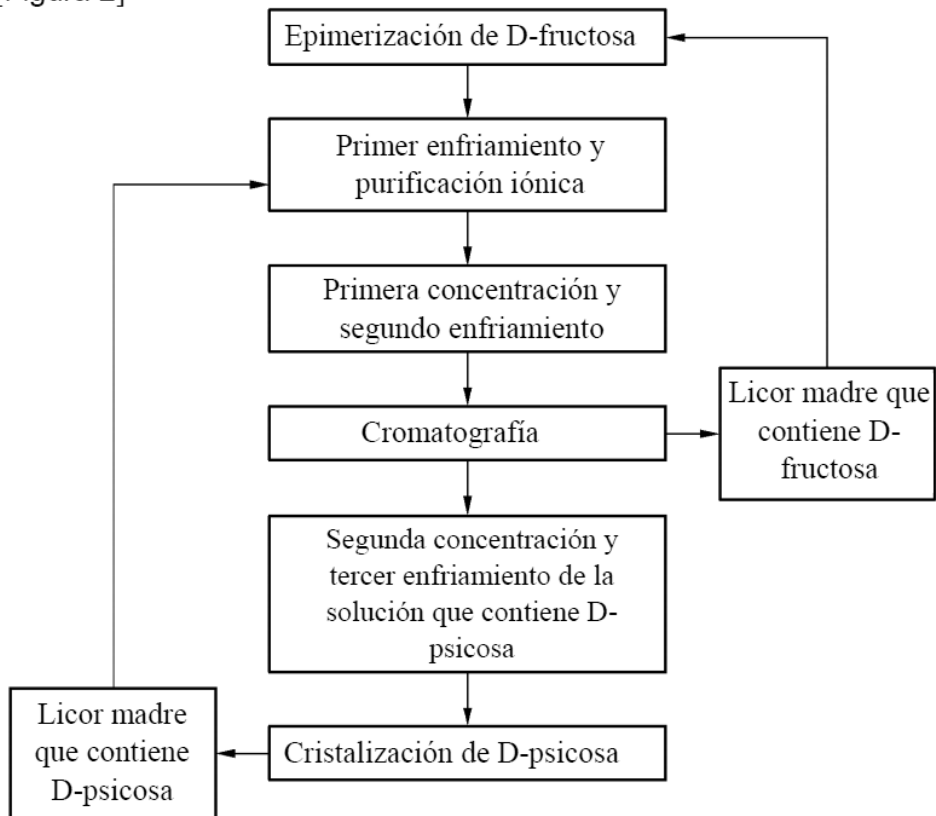
1. Un método para producir D-psicosa, que comprende:
 - 5 someter la D-fructosa a epimerización de D-psicosa para producir una solución que contiene D-psicosa, someter la solución que contiene D-psicosa a un primer enfriamiento y purificación iónica, someter la solución purificada que contiene D-psicosa a una primera concentración y un segundo enfriamiento, someter la solución que contiene D-psicosa, que se ha sometido a una primera concentración y un segundo enfriamiento, a cromatografía para obtener un licor madre que contiene D-fructosa y una
 - 10 solución separada que contiene D-psicosa, y someter la solución separada que contiene D-psicosa a una segunda concentración y tercer enfriamiento para cristalizar la D-psicosa, de manera que se obtienen cristales de D-psicosa y un licor madre que contiene D-psicosa, en donde el licor madre que contiene D-fructosa producido por cromatografía se vuelve a usar en la epimerización de D-psicosa y en donde el licor madre que contiene D-psicosa se vuelve a usar en el primer enfriamiento y purificación iónica, la primera concentración y el segundo enfriamiento o la cromatografía.
 2. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el licor madre que contiene D-psicosa se vuelve a usar en el primer enfriamiento y purificación iónica.
 - 20 3. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cromatografía es cromatografía continua.
 4. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el licor madre que contienen D-fructosa producido por la cromatografía o el licor madre que contiene D-psicosa producido por la cristalización de D-psicosa se enfrían de 25 °C a 45 °C antes de volverse a usar.
 - 25 5. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el primer enfriamiento y el tercer enfriamiento se realizan al enfriar la temperatura de la solución o la temperatura ambiente de 25 °C a 45 °C, y el segundo enfriamiento se realiza al reducir la temperatura de la solución o la temperatura ambiente de 45 °C a 65 °C.
 - 30 6. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el primer enfriamiento y el tercer enfriamiento se realizan al enfriar la temperatura de la solución o la temperatura ambiente de 30 °C a 40 °C, y el segundo enfriamiento se realiza al reducir la temperatura de la solución o la temperatura ambiente de 50 °C a 60 °C.
 - 35 7. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la primera concentración se realiza de manera que la solución purificada que contiene D-psicosa tenga una concentración de D-psicosa de 50 brix a 70 brix, y la segunda concentración se realiza de manera que la solución separada tenga una concentración de D-psicosa de 75 brix o más.
 - 40 8. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el licor madre que contienen D-fructosa producido por la cromatografía es una fracción que contiene D-fructosa que tiene una pureza del 70 % (p/p) o más.
 - 45 9. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el licor madre producido por la cristalización de D-psicosa es una fracción que contiene D-psicosa que tiene una pureza del 90 % (p/p) o más.
 - 50 10. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la epimerización de D-psicosa se realiza de 40 °C a 70 °C en presencia de D-psicosa epimerasa, variantes de la misma, cepas capaces de producir la enzima o cultivos de la misma.
 - 55 11. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la purificación iónica emplea una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida o una resina de intercambio aniónico débilmente básica.
 - 60 12. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la solución separada que contiene D-psicosa comprende D-psicosa que tiene una pureza del 93 % (p/p) o más.
 13. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde uno o más del primer enfriamiento al tercer enfriamiento son enfriamientos por intercambio de calor.
 - 65 14. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cristal de D-psicosa obtenido tiene una pureza del 95 % o más, preferentemente del 99 % o más.

15. El método de producción de D-psicosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cristal de D-psicosa tiene un rendimiento del 75 % o más.

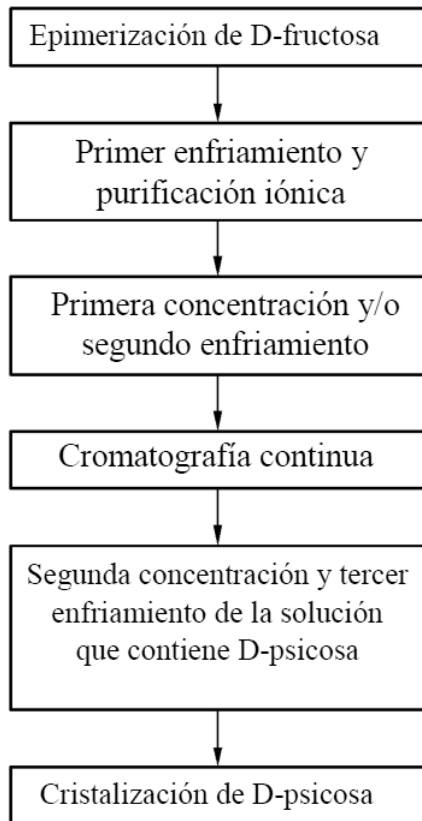
[Figura 1]



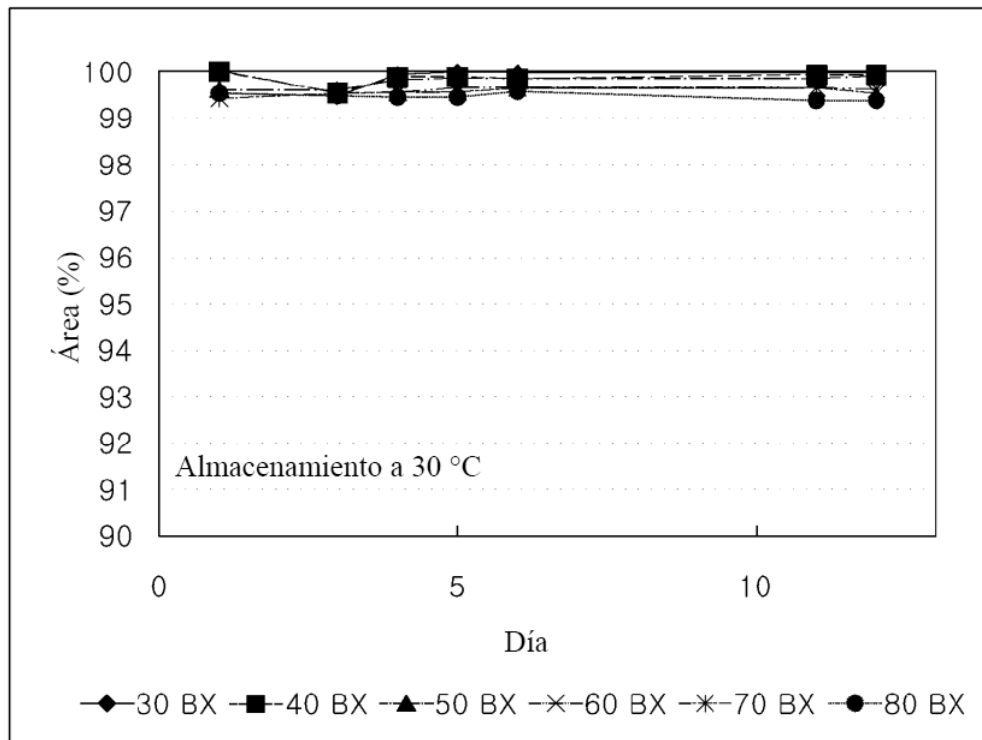
[Figura 2]



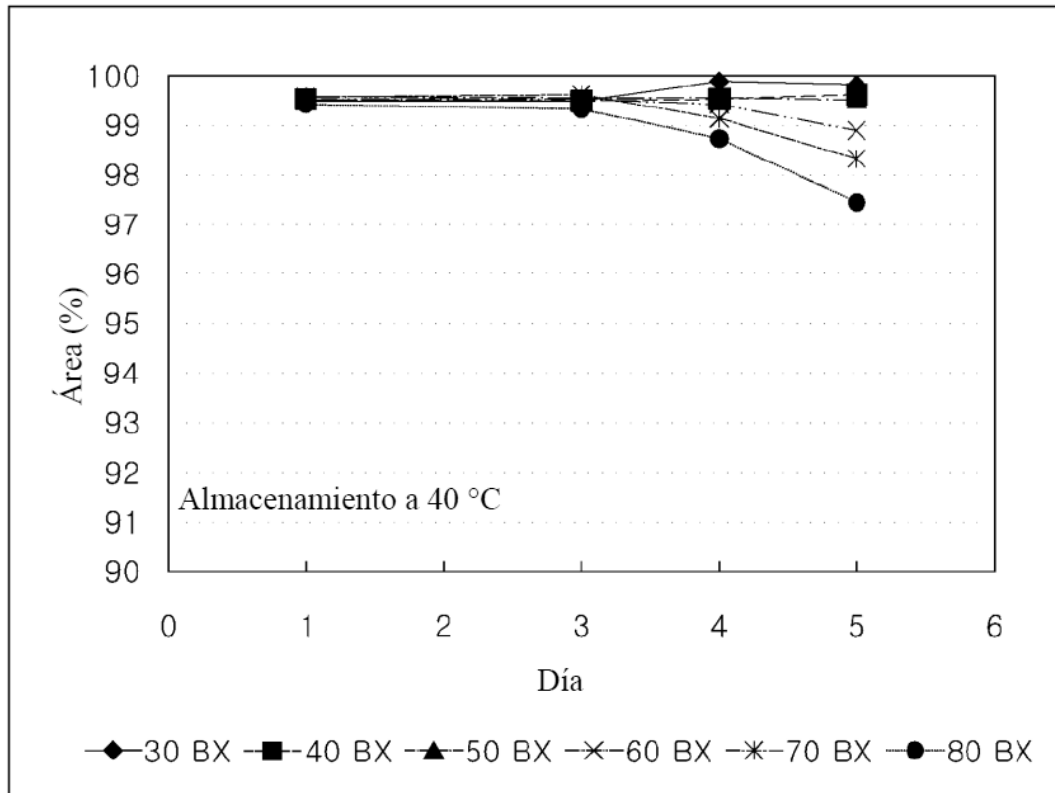
[Figura 3]



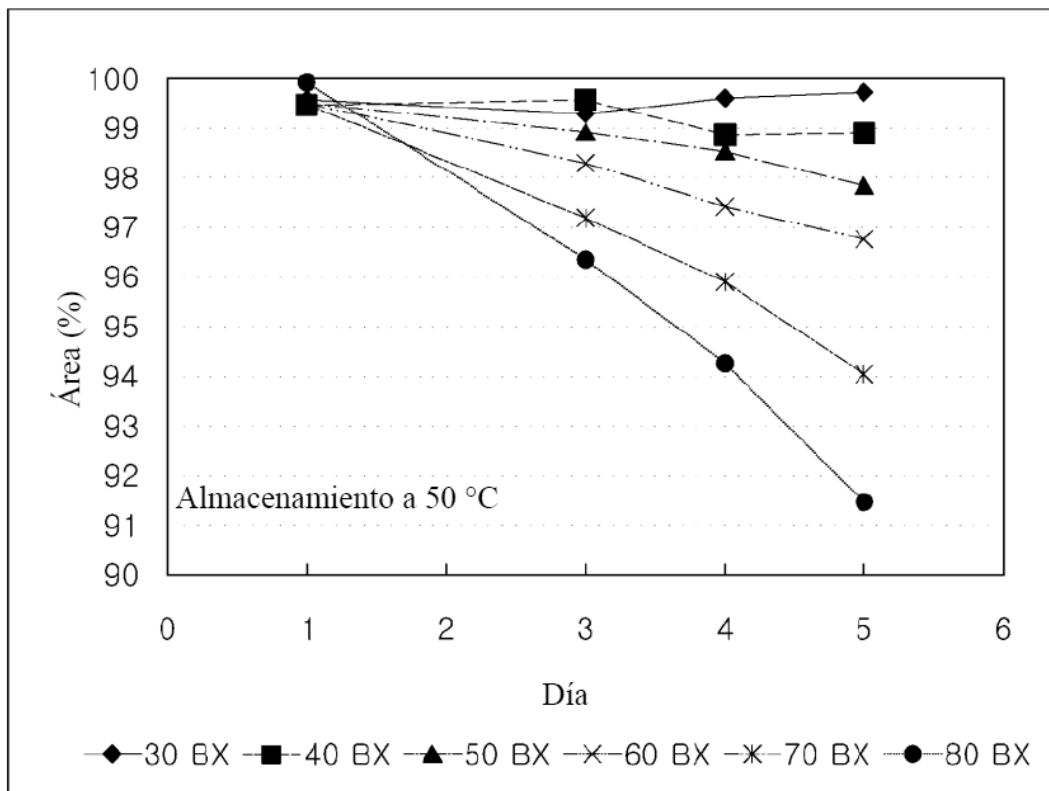
[Figura 4]



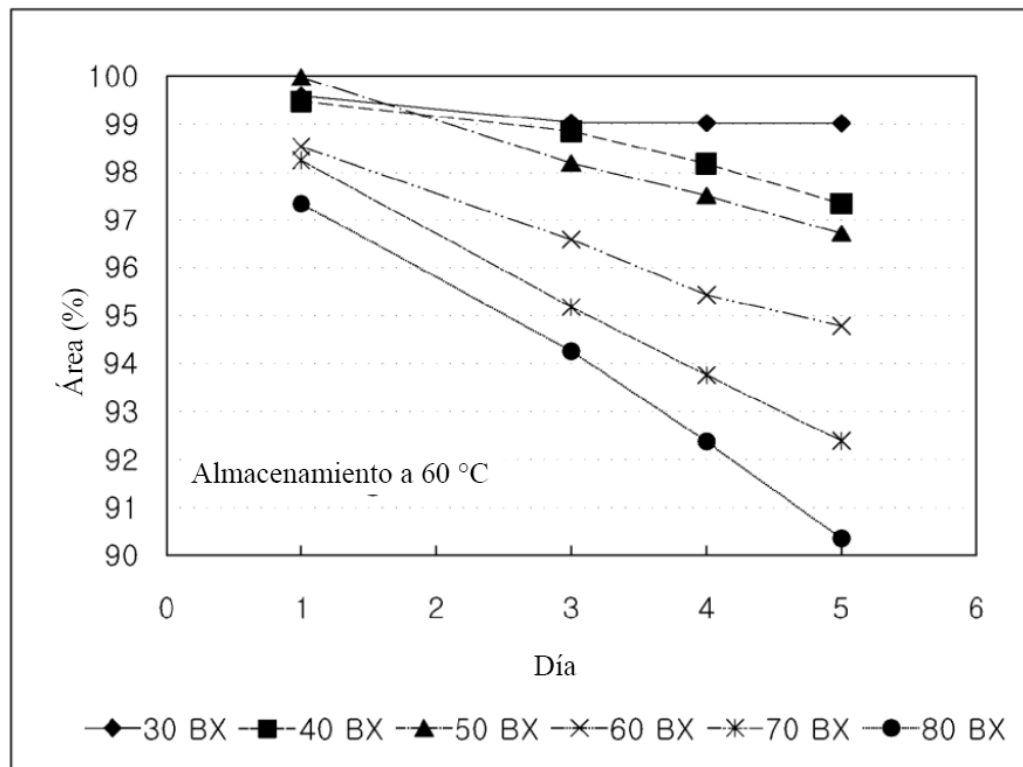
[Figura 5]



[Figura 6]



[Figura 7]



[Figura 8]

