

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 845 603**

51 Int. Cl.:

C12P 13/00 (2006.01)

C07C 211/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2013** **PCT/CN2013/071045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014** **WO14114000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2013** **E 13872599 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020** **EP 2948558**

54 Título: **Purificación de cadaverina usando un solvente de alto punto de ebullición**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
27.07.2021

73 Titular/es:

CATHAY BIOTECH INC. (50.0%)
4th Floor, Building 5, 1690 Cailun Road,
Zhangjiang Hitech Park, Pudong New District
Shanghai 201203, CN y
CIBT AMERICA INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

LIU, XIUCAI;
LIU, CHARLIE;
DAI, DUANFANG;
QIN, BINGBING y
LI, NAIQIANG

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 845 603 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

Purificación de cadaverina usando un solvente de alto punto de ebullición

5 Campo técnico de la invención

La divulgación se refiere a métodos para la purificación de cadaverina a partir de composiciones de sales de cadaverina. Más específicamente, la divulgación se refiere a métodos para la purificación de cadaverina biológica a partir de producciones biológicas de la misma.

10 Antecedentes

La cadaverina biológica es una sustancia química plataforma valiosa implicada en la producción de productos parcial o completamente biológicos, tal como Nylon 56 y Nylon 510 parcial o totalmente biológicos. La cadaverina biológica se puede sintetizar a través de la descarboxilación de lisina de lisina en microorganismos. Una manera de separar y purificar cadaverina de la producción biológica incluye la evaporación/destilación de cadaverina de una composición acuosa de cadaverina. Sin embargo, el caldo de fermentación de cadaverina o la solución de conversión enzimática puede comprender impurezas no volátiles que interfieren con la evaporación/destilación de cadaverina. Por tanto, la evaporación/destilación de cadaverina puede requerir alta temperatura de calentamiento y largo tiempo de evaporación/destilación, mientras que el rendimiento de recuperación de cadaverina es aún relativamente bajo y puede contener contaminaciones indeseadas.

Por tanto, hay una necesidad para proporcionar un método de purificación de cadaverina (por ejemplo, cadaverina biológica) en presencia de impurezas no volátiles con rendimiento de recuperación y calidad de cadaverina mejorados.

El documento JP 2012 106935 describe un método para conservar pentametilendiamina o una sal de la misma. El documento JP 2009 195202 describe un método para producir pentametilendiamina purificada. El documento EP 2 543 736 describe un método para producir diisocianato de 1,5-pentametileno.

30 Compendio de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a un método para la purificación de cadaverina a partir de una composición acuosa de cadaverina que comprende una o más impurezas no volátiles, el método comprende:

a) obtener cadaverina de la evaporación o destilación de la composición acuosa de cadaverina en donde uno o más solventes se añaden al sistema de evaporación/destilación antes de que empiece la evaporación/destilación, durante la evaporación/destilación y/o después de que la evaporación/destilación sustancialmente se pare cuando no se observa más evaporación/destilación; en donde el uno o más solventes comprenden al menos uno o más solventes de alto punto de ebullición (HBP) que tienen un punto de ebullición de al menos 185°C (1 atm); y en donde la evaporación o destilación se hace a una temperatura de calentamiento de 80°C a 180°C, y la evaporación o destilación está sometida a una presión menor que la presión ambiente.

Breve descripción de las figuras y dibujos

Figura 1: Un diagrama de flujo que muestra una forma de realización según un método divulgado en el presente documento.

Figura 2: Curvas de solubilidad de sulfato de sodio en una composición de cadaverina (ac.) a 5°C (Serie 1); 18°C (Serie 2); y 65°C (Serie 3).

Figura 3: Curva de solubilidad de cloruro de sodio en una composición de cadaverina (ac.) a 24°C (serie 1).

Descripción detallada de la invención

La producción de cadaverina biológica se puede producir a través de un proceso de fermentación o conversión enzimática de lisina (por ejemplo, como se muestra en el bloque I, figura 1). Como se usa en el presente documento, un compuesto "biológico" significa que el compuesto se considera biológico según el estándar ASTM D6866. En el proceso de fermentación, microorganismos que producen lisina y expresan lisina descarboxilasa (LDC) se fermentan para producir cadaverina. En la conversión enzimática de lisina, se puede convertir lisina/sal de lisina a cadaverina catalizado por LDC (por ejemplo, bloque I-2, figura 1; y ejemplo 3). En una forma de realización, la LDC se produce fermentando microorganismos que expresan lisina descarboxilasa (LDC) (por ejemplo, bloque I-1, figura 1; y también ejemplo 2). El producto obtenido de la conversión catalizada por LDC de lisina habitualmente es una o más sales de cadaverina, que se pueden convertir a cadaverina ajustando el pH a aproximadamente 12 o más (bloque II-1, figura 1).

La cadaverina tiene un punto de ebullición relativamente bajo y es relativamente fácil de evaporar/destilar. Sin embargo, la mezcla de producción cruda puede contener impurezas inorgánicas y/o orgánicas no volátiles que son solubles/dispersables en agua. Tales impurezas pueden interferir significativamente con la evaporación/destilación de cadaverina, en particular según se elimina el agua de la composición acuosa de cadaverina. Las impurezas inorgánicas pueden comprender una o más sales inorgánicas. Las impurezas orgánicas pueden incluir hidratos de carbono, proteína y/u otros residuos orgánicos que están implicados en los procesos de fermentación. Como se usa en el presente documento, un sistema de evaporación/destilación es una composición calentada durante la evaporación/destilación. La fluidez de un sistema de evaporación/destilación disminuirá cuando más y más agua/cadaverina se evapora/destila del sistema de evaporación/destilación. Requerirá un tiempo de calentamiento largo a alta temperatura de calentamiento para proporcionar un rendimiento de recuperación de cadaverina deseado del sistema de evaporación/destilación con menor fluidez. Se pueden añadir uno o más solventes orgánicos en el sistema de evaporación/destilación para mejorar la fluidez, y la evaporación/destilación a menor temperatura de calentamiento y/o durante un menor tiempo de calentamiento puede proporcionar un mejor rendimiento de recuperación de cadaverina y/o una mejor calidad de cadaverina (por ejemplo, bloque II-0, figura 1, en donde el solvente se puede añadir a una o más de las opciones A, B, C y D). En ciertos casos, parte de las impurezas se pueden opcionalmente precipitar y/o eliminar del sistema de evaporación/destilación (por ejemplo, bloque II-2, figura 1). En ciertos casos, los métodos divulgados en el presente documento tienen aplicabilidad industrial mejorada con la temperatura de calentamiento disminuida y el tiempo de calentamiento acortado. En ciertas formas de realización, el solvente orgánico comprende además un solvente orgánico de bajo punto de ebullición.

A) Evaporación/destilación facilitada con adición de solvente

Un aspecto de la invención se refiere a un método para la purificación de cadaverina de una composición acuosa de cadaverina que comprende una o más impurezas volátiles, el método comprende:

a) obtener cadaverina de la evaporación o destilación de la composición acuosa de cadaverina en donde uno o más solventes se añaden al sistema de evaporación/destilación antes de que empiece la evaporación/destilación (por ejemplo, opción C, figura 1), durante la evaporación/destilación y/o después de que la evaporación/destilación sustancialmente se pare (es decir, cuando no se observa más evaporación/destilación) (por ejemplo, opción D, figura 1); en donde el uno o más solventes comprenden al menos uno o más solventes de alto punto de ebullición (HBP) que tienen un punto de ebullición de al menos 185°C (1 atm); y en donde la evaporación o destilación se hace a una temperatura de calentamiento de 80°C a 180°C, y la evaporación o destilación está sometida a una presión menor que la presión ambiente.

En ciertos casos, el uno o más solventes se añaden al sistema de evaporación/destilación para mejorar y/o mantener la fluidez del sistema de evaporación/destilación durante la evaporación/destilación. En general, una fluidez deseada es una fluidez a la que el sistema de evaporación/destilación completo o sustancialmente completo puede fluir. La cantidad del uno o más solventes usados puede depender del tipo del uno o más solventes y la cantidad y/o los componentes del sistema de evaporación/destilación. Un experto en la materia sabría cómo determinar la cantidad necesaria. En un ejemplo, la cantidad del uno o más solventes es al menos aproximadamente 0,1 veces, al menos aproximadamente 1 vez, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 7 veces, o al menos aproximadamente 10 veces de la cantidad inicial de cadaverina en el sistema de evaporación/destilación (en peso).

Un sistema de evaporación/destilación evaporó/destiló según los métodos novedosos divulgados en el presente documento, comparado con un sistema de evaporación/destilación evaporó/destiló sin la adición del uno o más solventes, puede proporcionar un rendimiento de recuperación de cadaverina sustancialmente similar ($\pm 10\%$) o mayor mientras que evapora/destila a menor temperatura de calentamiento durante un periodo de calentamiento más corto. Las diferencias en las temperaturas de calentamiento, los tiempos de calentamiento, y/o el rendimiento de recuperación dependen de la cantidad y/o los componentes del sistema de evaporación/destilación, y el uno o más solventes usados. En un caso, la diferencia en la temperatura de calentamiento puede ser al menos aproximadamente 10°C, al menos aproximadamente 20°C, al menos aproximadamente 40°C, al menos aproximadamente 30°C, al menos aproximadamente 50°C, al menos aproximadamente 60°C, al menos aproximadamente 80°C, al menos aproximadamente 100°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 100°C. El tiempo de calentamiento más corto puede ser no más de aproximadamente el 50% del tiempo de calentamiento más largo, no más de aproximadamente el 30% del tiempo de calentamiento más largo, o no más del 10% del tiempo de calentamiento más largo.

Un experto en la materia apreciará tales mejoras especialmente cuando los métodos divulgados en el presente documento se usan en una evaporación/destilación industrial. En ciertas formas de realización, el método se usa en donde el sistema de evaporación/destilación es al menos aproximadamente 50 kg, al menos aproximadamente 100 kg, al menos aproximadamente 200 kg, al menos aproximadamente 500 kg, o al menos aproximadamente 1000 kg. Un sistema de evaporación/destilación evaporó/destiló según los métodos novedosos divulgados en el presente documento, comparado con un sistema de evaporación/destilación evaporó/destiló sin la adición del uno o más solventes, cuando evaporó/destiló durante un tiempo similar o más corto (no más de aproximadamente el 50% del tiempo de calentamiento más largo, no más de aproximadamente el 30% del tiempo de calentamiento más largo, o no

más del 10% del tiempo de calentamiento más largo) y a una temperatura de calentamiento similar o menor (menor en al menos aproximadamente 10°C, al menos aproximadamente 20°C, al menos aproximadamente 40°C, al menos aproximadamente 30°C, al menos aproximadamente 50°C, al menos aproximadamente 60°C, al menos aproximadamente 80°C, al menos aproximadamente 100°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 100°C), el rendimiento del método divulgado en el presente documento es al menos aproximadamente el 110%, al menos aproximadamente el 120%, al menos aproximadamente el 130%, al menos aproximadamente el 140%, al menos aproximadamente el 150%, al menos aproximadamente el 160%, al menos aproximadamente el 170%, al menos aproximadamente el 180%, al menos aproximadamente el 190%, al menos aproximadamente el 200%, al menos aproximadamente el 210%, al menos aproximadamente el 220%, al menos aproximadamente el 230%, al menos aproximadamente el 240%, al menos aproximadamente el 250%, al menos aproximadamente el 260%, al menos aproximadamente el 270%, al menos aproximadamente el 280%, al menos aproximadamente el 290%, al menos aproximadamente el 300%, al menos aproximadamente el 310%, al menos aproximadamente el 320%, al menos aproximadamente el 330%, al menos aproximadamente el 340%, al menos aproximadamente el 350%, al menos aproximadamente el 360%, al menos aproximadamente el 370%, al menos aproximadamente el 380%, al menos aproximadamente el 390%, o al menos aproximadamente el 400% del rendimiento del método sin la adición del uno o más solventes.

La cadaverina se puede evaporar/destilar de la composición acuosa de cadaverina a través de cualquier método/equipo adecuado de evaporación/destilación. Los ejemplos incluyen, sin limitación, evaporador mutiefecto, y equipos de destilación/rectificación fraccional.

Se describe que cada evaporación/destilación se puede llevar a cabo a una presión reducida o presión ambiente, aunque la presión reducida es preferida. El primer destilado obtenido de la primera evaporación/destilación comprende cadaverina y agua. Después el primer destilado (mezcla cadaverina/agua) se destila adicionalmente para proporcionar cadaverina con mayor pureza. Cada proceso de evaporación/destilación se puede lograr usando cualquier método/equipo adecuado (por ejemplo, evaporación, evaporación mutiefecto, y rectificación).

En un caso, la temperatura de calentamiento es de aproximadamente 50°C a aproximadamente 250°C, de aproximadamente 50°C a aproximadamente 80°C, de aproximadamente 70°C a aproximadamente 185°C, de aproximadamente 70°C a aproximadamente 120°C, de aproximadamente 75°C a aproximadamente 120°C, de aproximadamente 75°C a aproximadamente 130°C, de aproximadamente 75°C a aproximadamente 135°C, de aproximadamente 80°C a aproximadamente 120°C, o de aproximadamente 80°C a aproximadamente 180°C. La presión de destilación es aproximadamente 5 kg o menos (presión manométrica), una presión menor que la presión ambiente (presión manométrica), aproximadamente 0,02 MPa o menor (presión absoluta), aproximadamente 0,015 MPa o menor (presión absoluta), aproximadamente 0,005 MPa o menor (presión absoluta), o aproximadamente 0,004 MPa o menor (presión absoluta).

Según la invención, la evaporación o destilación se hace a una temperatura de calentamiento de 80°C a 180°C, y la evaporación o destilación se somete a una presión menor que la presión ambiente.

La temperatura de calentamiento depende de la presión de destilación. En general, cuanto menor sea la presión de destilación, menor la temperatura de calentamiento. En un caso, la cadaverina purificada se obtiene de calentar la composición acuosa de cadaverina con un baño de aceite (120°C) al vacío (-0,096 MPa), con un baño de aceite (135°C) al vacío (-0,095 MPa), o con un baño de aceite (180°C) al vacío (-0,085 MPa).

En ciertos casos, se pueden añadir los mismos o diferentes uno o más solventes al sistema de evaporación/destilación múltiples veces antes de que empiece la evaporación/destilación, durante la evaporación/destilación y/o después de que la evaporación/destilación sustancialmente se pare.

El solvente de alto punto de ebullición puede comprender cualquier solvente polar, solvente no polar, o cualquier combinación de los mismos, y tiene un punto de ebullición mayor que el de cadaverina. El solvente de alto punto de ebullición es sustancialmente no reactivo en la condición de evaporación/destilación y no afecta la calidad de la cadaverina purificada obtenida de la etapa a) anterior. Como se usa en el presente documento, un solvente sustancialmente no reactivo significa que menos de aproximadamente el 2% del solvente reacciona con cadaverina durante la evaporación/destilación. En ciertos casos, el solvente añadido además comprende solventes que tienen bajo punto de ebullición (por ejemplo, aproximadamente 180°C a 1 atm o menor).

Según la invención, el punto de ebullición del solvente de alto punto de ebullición es al menos aproximadamente 185°C (1 atm). Se describen solventes con puntos de ebullición de al menos aproximadamente 190°C (1 atm), o aproximadamente de 190 a 260°C (1 atm). El punto de ebullición de cadaverina es aproximadamente 179°C (1 atm). En un caso, se usa un solvente de alto punto de ebullición que tiene un punto de ebullición de al menos aproximadamente 5°C mayor que el de la cadaverina. En otro caso, se usa un solvente de alto punto de ebullición que tiene un punto de ebullición de al menos aproximadamente 10°C más que el de la cadaverina.

En otro caso, el solvente de alto punto de ebullición tiene un punto de fusión que es no más de aproximadamente temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), En otro caso, el solvente de alto punto de ebullición tiene un punto de fusión que es no más de 80°C.

- 5 Los ejemplos del solvente de alto punto de ebullición incluyen, sin limitación, alcanos, cloroalcanos, derivados de benceno, alcoholes, éteres, aminas, ésteres, nitrilos, y cualquier combinación de los mismos.

Los ejemplos de alcanos adecuados incluyen, sin limitación, alcanos de C_a , $a = 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20$ (por ejemplo, dodecano, tetradecano, ... y mezclas de los mismos). Los ejemplos de cloroalcanos adecuados incluyen, sin limitación, alcanos de C_a sustituidos con uno o más grupos cloro, $a = 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20$ (por ejemplo, 1-cloro-dodecano, 1-cloro-tetradecano, y mezclas de los mismos). Los ejemplos de derivados de benceno adecuados incluyen, sin limitación, benceno sustituido con uno o más grupos alquilo C_a , $a = 11, 12, 13, 14, 15, o 16$, o derivados de cloro de los mismos (por ejemplo, dodecibenceno, tetradecibenceno, diclorotolueno, y combinaciones de los mismos), bifenilo, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de alcoholes adecuados incluyen sin limitación, alcoholes de C_b , $b = 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20$ (por ejemplo, 1-octanol, dodecanol, tetradecanol, glicerol, y combinaciones de los mismos). Los ejemplos de éteres adecuados incluyen, sin limitación, éter difenílico. Los ejemplos de aminas adecuadas incluyen, sin limitación, aminas de C_c que tienen uno o más grupos amino, $c = 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20$ (por ejemplo, hexanodiamina, decanodiamina, y combinaciones de las mismas). Los ejemplos de ésteres adecuados incluyen, sin limitación, succinato de dietilo, adipato de dietilo, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de nitrilos adecuados incluyen, sin limitación, butano dinitrilo, hexano dinitrilo, y combinaciones de los mismos. Como se usa en el presente documento, a menos que se especifique de otra manera, las fracciones hidrocarbonadas de los solventes de alto punto de fusión adecuados puede estar saturadas o insaturadas con uno o más dobles enlaces y/o uno o más triples enlaces, y pueden ser de cadena lineal o cadena ramificada. En ciertas formas de realización, el solvente de alto punto de ebullición no comprende ningún alcohol.

El solvente de alto punto de ebullición puede ser un solvente orgánico, o una mezcla de múltiples solventes orgánicos del mismo o diferentes tipos químicos, siempre que los solventes de una mezcla sean sustancialmente no reactivos entre sí. Por ejemplo, se puede usar una mezcla de octanol, butano dinitrilo y adipato de dimetilo como el solvente de alto punto de ebullición. En otro ejemplo, se usa una mezcla de alcano de C_{11} y alcano de C_{14} (1:1 en peso) como el solvente de alto punto de ebullición.

En un caso, las impurezas no volátiles significativamente impiden la evaporación de cadaverina del sistema de evaporación/destilación de cadaverina.

- 35 Los ejemplos de las impurezas no volátiles incluyen, sin limitación, impurezas inorgánicas (por ejemplo, sales tal como sulfatos, cloruros, fosfatos y combinaciones de las mismas), e impurezas orgánicas (por ejemplo, hidratos de carbono, proteínas, células y fragmentos de las mismas).

40 **I) Composición acuosa de cadaverina**

En ciertas formas de realización, la composición acuosa de cadaverina se obtiene a partir de las siguientes etapas:

a0-1) proporcionar una composición acuosa de sal de cadaverina;

a0-0) opcionalmente añadir uno o más solventes de alto punto de ebullición; y

- 45 a1) ajustar el pH de la composición acuosa de sal de cadaverina para proporcionar una composición acuosa de cadaverina que tiene un pH de al menos aproximadamente 12.

En ciertas formas de realización, la composición acuosa de cadaverina se obtiene a partir de las siguientes etapas:

- 50 a0-2) proporcionar una composición acuosa de sal de cadaverina que comprende una composición de producción de cadaverina, en donde la composición de producción de cadaverina se obtiene de un proceso de producción de cadaverina biológico;

a0-0) opcionalmente añadir uno o más solventes de alto punto de ebullición; y

- 55 a1) ajustar el pH de la composición acuosa de sal de cadaverina para proporcionar una composición acuosa de cadaverina que tiene un pH de al menos aproximadamente 12.

En ciertos casos, el pH de la composición acuosa de cadaverina en la etapa a1) es aproximadamente 14 o mayor.

60 **1) Composiciones acuosas de sal de cadaverina**

- Una composición acuosa de sal de cadaverina comprende una sal de cadaverina y/o una cadaverina total o parcialmente protonada. En un caso, el pH de la composición acuosa de sal de cadaverina no es más de aproximadamente 12, no más de aproximadamente 11, no más de aproximadamente 10 o menor, no más de aproximadamente 9, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. En otro caso, la sal de cadaverina se forma a partir de cadaverina y uno o más ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido orgánico, ácidos inorgánicos, y cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen, sin limitación, clorhidrato, ácido

sulfúrico, ácido carbónico, y ácido fosfórico. Los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen, sin limitación, ácido hexadecarboxílico, y ácido acético. En otro caso, la composición acuosa de sal de cadaverina comprende aniones ácidos. Los ejemplos de los aniones ácidos incluyen, sin limitación, Cl^- , SO_4^{2-} , $\text{OOC}(\text{CH}_2)_3\text{COO}^-$, CH_3COO^- , CO_3^{2-} , PO_4^{3-} y cualquier combinación de los mismos. Como se usa en el presente documento, cloruro de cadaverina es

En otro caso, la composición acuosa de sal de cadaverina comprende una composición de producción de cadaverina obtenida de un proceso de producción de cadaverina biológico.

Los ejemplos de procesos de producción de cadaverina biológicos incluyen, sin limitación, producción fermentativa y producción enzimática *in vitro*. En ciertos casos, las composiciones de producción de cadaverina obtenidas de la producción de cadaverina biológica tienen un pH de no más de aproximadamente 12, no más de aproximadamente 11, no más de aproximadamente 10 o menor, no más de aproximadamente 9, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, en donde la mayoría de la cadaverina en la composición de producción de cadaverina se presenta en forma de sal.

a) Producción enzimática de cadaverina biológica

En un caso, la composición acuosa de sal de cadaverina comprende una composición de producción de cadaverina obtenida de un proceso de producción de cadaverina biológico enzimático. El proceso de producción de cadaverina biológico enzimático comprende convertir lisina y/o una sal de lisina (lisina/sal de lisina) a cadaverina en presencia de lisina descarboxilasa (LDC). En un ejemplo, la producción se lleva a cabo en un medio acuoso.

i) Lisina/sal de lisina

Las sales de lisina son sales formadas de lisina y uno o más ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, y cualquier combinación de los mismos. En ciertas formas de realización, las sales de lisina son una o más sales de lisina/ácido inorgánico. Los ejemplos de sales de lisina/ácido inorgánico incluyen, sin limitación, clorhidrato de lisina, sulfato de lisina y cualquier combinación de las mismas.

Se puede preparar lisina/sal de lisina de cualquier producción fermentativa adecuada, y el caldo de fermentación de lisina obtenido de la misma se puede usar en la producción enzimática de cadaverina biológica. En un caso, el caldo de fermentación de lisina comprende una solución acuosa de sulfato de lisina. En otro caso, el caldo de fermentación de lisina se procesa adicionalmente antes del uso en la producción de cadaverina biológica enzimática. Por ejemplo, el caldo de fermentación de lisina se puede procesar adicionalmente (por ejemplo, a través de filtración, centrifugación o filtración con membrana) para eliminar impurezas (por ejemplo, microbios) y proporcionar la solución acuosa de sal de lisina. En un ejemplo, se obtiene una solución acuosa de sulfato de lisina del proceso de fermentación de lisina. La solución acuosa de sulfato de lisina se procesa adicionalmente usando una resina de intercambio iónico, en donde el eluato se neutraliza con ácido clorhídrico para proporcionar solución acuosa de clorhidrato de lisina. En otro ejemplo, el caldo de fermentación de lisina se decolora con carbón activado y se filtra para proporcionar solución acuosa de sulfato de lisina.

Los productos de lisina/sal de lisina comercialmente disponibles (por ejemplo, clorhidrato de lisina) también se pueden usar en la producción de cadaverina biológica enzimática. En un caso, se usa un caldo de fermentación de lisina obtenido del proceso de fermentación en la producción de cadaverina biológica enzimática.

Cualquier microbio adecuado para la fermentación de lisina se puede usar en el presente documento. Los ejemplos de microbios incluyen, sin limitación, cepas de tipo salvaje, cepas mutantes inducidas, y/o cepas recombinantes. Los ejemplos de las cepas incluyen, sin limitación, cepas de *Corynebacterium* (por ejemplo, *C. glutamicum*, *C. pectinense*, y *C. crenatum*), y cepas de *Brevibacterium* (por ejemplo, *B. lactofermentum* y *B. flavum*).

El proceso de fermentación de lisina se lleva a cabo en un medio. Tal medio puede ser cualquier medio adecuado para la fermentación. Por ejemplo, el medio puede contener fuentes de carbono y fuentes de nutrientes diferentes de carbono. Los ejemplos de las fuentes de carbono incluyen, sin limitación, azúcar (por ejemplo, hidratos de carbono tal como glucosa y fructosa), aceite y/o grasa, un ácido graso, y/o derivados de los mismos. El aceite y la grasa pueden contener ácidos grasos saturados y/o insaturados que tienen 10 o más átomos de carbono, por ejemplo, aceite de coco, aceite de palma, aceite de palmiste, y similares. El ácido graso puede ser un ácido graso saturado y/o insaturado, por ejemplo, ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido láurico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido mirístico, y similares. Los ejemplos de los derivados de un ácido graso incluyen, sin limitación, ésteres y sales del mismo. Los ejemplos de fuentes diferentes de carbono incluyen, sin limitación, fuentes de nitrógeno (por ejemplo, extracto de vacuno, extracto de levadura y licor de maceración del maíz), sales inorgánicas, y otras fuentes de nutrientes orgánicos.

Los ejemplos de la fuente de nitrógeno pueden comprender amoníaco, sales de amonio (por ejemplo, cloruro de amonio, sulfato de amonio y fosfato de amonio), triptona, extracto de carne, extracto de levadura, y similares. Los ejemplos de sales inorgánicas incluyen, sin limitación, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato dipotásico,

fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, y similares. Los ejemplos de las otras fuentes de nutrientes orgánicos incluyen, sin limitación, aminoácidos (por ejemplo, glicina, alanina, serina, treonina y prolina), vitaminas (por ejemplo, vitamina B1, vitamina B12 y vitamina C), y similares. La composición del medio se puede ajustar y optimizar según el tipo de cepas y el producto de fermentación.

La fermentación se puede llevar a cabo a cualquier temperatura a la que las células puedan crecer, y preferiblemente a de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C, o a aproximadamente 35°C. El periodo de cultivo puede ser aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, o aproximadamente 10 días.

ii) LDC

LDC es una enzima que puede convertir lisina a 1,5-cadaverina. LDC se puede preparar de cualquier producción fermentativa adecuada, y el caldo de fermentación de LDC obtenido de la misma se puede usar directamente en la producción enzimática de cadaverina biológica. En ciertas formas de realización, el caldo de fermentación de LDC se puede procesar adicionalmente antes del uso en la producción enzimática de cadaverina. Por ejemplo, el caldo de fermentación de LDC se puede centrifugar, filtrar o procesar de otra manera o purificar adicionalmente para proporcionar composiciones de LDC procesadas o purificadas. Los ejemplos de las composiciones de LDC procesadas/purificadas incluyen, sin limitación, células de fermentación de LDC y/o fragmentos de las mismas; sobrenadante de LDC obtenido de centrifugar o filtrar el caldo de fermentación de LDC; sobrenadante de LDC obtenido de la eliminación de células por centrifugación o filtración del caldo de fermentación de LDC; LDC purificada y composiciones de la misma; y cualquier combinación o más de un tipo de LDC.

En el presente documento se puede usar cualquier microbio adecuado para la fermentación de LDC. Los ejemplos de los microbios incluyen, sin limitación, cepas de tipo salvaje, cepas mutantes inducidas, y/o cepas recombinantes. Los ejemplos de las cepas incluyen, sin limitación, *Escherichia coli* mutante inducida, *Hafnia alvei* mutante inducida, y *Escherichia coli* recombinante, y *Hafnia alvei* recombinante (por ejemplo, la *Hafnia alvei* recombinante divulgada en la solicitud china 201210177392.X).

El proceso de fermentación de LDC se lleva a cabo en un medio. Tal medio puede ser cualquier medio adecuado para la fermentación. Por ejemplo, el medio puede ser el mismo o similar al medio usado en el proceso de fermentación de lisina, que contiene fuentes de carbono y fuentes de nutrientes no carbono como se ha descrito anteriormente, y está optimizado para la fermentación de LDC.

La fermentación se puede llevar a cabo a cualquier temperatura a la que las células puedan crecer, y preferiblemente a de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C, o aproximadamente 35°C. El periodo de cultivo puede ser aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, o aproximadamente 10 días.

iii) Reacción de descarboxilación de lisina (LDCN)

Cualquier producción enzimática adecuada de cadaverina biológica a partir de lisina/sal de lisina se puede usar en el presente documento. En una reacción de LDCN, el sustrato es lisina/sal de lisina como se ha descrito anteriormente, y la enzima de LDC como se ha descrito anteriormente. La temperatura de la reacción puede ser desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 60°C. El pH de reacción deseado es un pH que sea adecuado para la conversión enzimática, y depende de la LDC usada en la reacción de LDCN. En ciertas formas de realización, el pH de reacción adecuado puede variar desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.

En un caso, se añade un ácido en la reacción de LDCN para mantener el pH de reacción en el intervalo adecuado. En un ejemplo, el ácido se añade en la solución de lisina/sal de lisina antes de añadir LDC para ajustar el pH a un pH adecuado, después se añade LDC para facilitar la conversión de lisina a cadaverina. En otro ejemplo, el ácido se añade a la reacción después de que LDC se mezcle con la solución de lisina/sal de lisina. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen, sin limitación, ácido inorgánico (por ejemplo, HCl, ácido sulfúrico, y cualquier combinación de los mismos), y gas ácido (por ejemplo, CO₂).

En otro caso, se usa un tampón en la reacción de LDCN para mantener el pH en el intervalo adecuado para optimizar el rendimiento de conversión. Los ejemplos de los tampones incluyen, sin limitación, tampones comunes usados en el intervalo de funcionamiento de LDC, por ejemplo, 7 partes de ácido acético 0,2 mol/l más 3 partes de solución de acetato de sodio 0,2 mol/l.

En otro caso, el pH inicial y el pH final de la reacción de LDCN están en el intervalo de pH adecuado para la conversión enzimática, y se puede añadir o no ácido adicional u otra sustancia en la reacción para el control del pH.

En ciertos casos, el sustrato y la enzima se pueden añadir a la reacción en más de un momento, respectivamente. La manera de adición de la enzima y/o el sustrato se puede ajustar para optimizar la conversión de la conversión enzimática.

- 5 En ciertos casos, se aplica tecnología de inmovilización celular sobre LDC para mejorar el rendimiento de reacción. Cualquier método de inmovilización celular adecuado se puede usar, por ejemplo, método de embeber (por ejemplo, método de embeber con alginato de calcio).

- 10 En ciertos casos, pueden estar presentes otros aditivos que facilitan la conversión enzimática en la mezcla de reacción de LDCN. Los ejemplos de tales aditivos incluyen, sin limitación, sales inorgánicas y vitaminas.

2) Ajustar el pH de una composición acuosa de sal de cadaverina para proporcionar una solución acuosa de cadaverina que tiene un pH de al menos aproximadamente 12

- 15 La composición acuosa de sal de cadaverina es como se ha descrito anteriormente. En una forma de realización, el pH de la composición acuosa de sal de cadaverina es no más de aproximadamente 12, no más de aproximadamente 11, no más de aproximadamente 10 o menor, no más de aproximadamente 9, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

- 20 En otro caso, la composición acuosa de sal de cadaverina comprende una composición de producción de cadaverina obtenida de una reacción de LDCN como se ha descrito anteriormente.

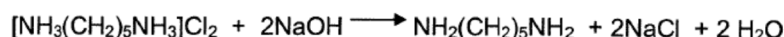
- El pH de una composición acuosa de cadaverina depende de la concentración de cadaverina y la temperatura (por ejemplo, la tabla 1 del ejemplo 5).

- 25 El pH de la composición acuosa de sal de cadaverina se puede ajustar añadiendo una o más bases inorgánicas a la misma. Una sal de cadaverina reacciona con la una o más bases inorgánicas para proporcionar cadaverina y la correspondiente una o más sales inorgánicas.

- 30 Los ejemplos de la una o más bases inorgánicas incluyen, sin limitación, hidróxidos, tal como hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo, NaOH, KOH, y una mezcla de los mismos), hidróxidos de metales alcalinotérreos (por ejemplo, Mg(OH)₂, Ca(OH)₂, y una mezcla de los mismos), y sales básicas de los mismos (por ejemplo, fosfato de sodio, fosfato de potasio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, y una mezcla de los mismos). La una o más bases se pueden añadir a la composición acuosa de sal de cadaverina a sustancialmente el mismo tiempo o a tiempos diferentes.

- 35 Cuando se añade más de una base, las bases diferentes se pueden añadir como una o más mezclas o por separado. En ciertos casos, las mezclas de bases pueden ser una mezcla de una o más bases fuertes y una o más bases débiles. Los ejemplos de las mezclas de bases incluyen, sin limitación, una mezcla de fosfato de sodio e hidróxido de sodio, y una mezcla de carbonato de sodio, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio. En ciertos casos, las mezclas de bases pueden ser una mezcla de una o más bases fuertes. Los ejemplos de las mezclas de bases incluyen, sin limitación, una mezcla de hidróxido de sodio e hidróxido de potasio.

- 40 El esquema 1 ilustra un ejemplo de la reacción en donde la sal de cadaverina es una sal clorhidrato y la base es NaOH:



- 45 Esquema 1

- Un experto en la materia entendería y apreciaría fácilmente otras reacciones en donde se producen cadaverina y una o más sales inorgánicas a partir de reacciones entre una o más sales de cadaverina específicas y una o más bases específicas. Los ejemplos de una o más sales inorgánicas incluyen, sin limitación, sulfato de sodio, carbonato de sodio, NaCl, sulfato de potasio, y KCl.

- La una o más bases se pueden añadir como sólido y/o como solución (por ejemplo, solución acuosa).

- 55 Las cantidades de la una o más bases añadidas dependen de la cantidad de cadaverina en la composición acuosa de sal de cadaverina. Las cantidades de la una o más bases son adecuadas cuando una cantidad sustancial de sal de cadaverina se convierte a cadaverina. En ciertos casos, el pH de la solución acuosa resultante es no menos de aproximadamente 12, no menos de aproximadamente 13, no menos de aproximadamente 13,3 o no menos de aproximadamente 13,5.

- 60 La una o más bases se pueden añadir a y/o hacer reaccionar con la composición acuosa de sal de cadaverina a cualquier temperatura que permita la producción de cadaverina a partir de la sal de cadaverina. En general, cuanto mayor sea la temperatura de reacción, más rápida corre la reacción.

En un caso, la base es una solución acuosa de hidróxido de sodio, la composición acuosa de sal de cadaverina es una solución acuosa de sulfato de cadaverina, la base se añade a aproximadamente 60°C y la reacción casi se completa inmediatamente después de la adición de la base, hidróxido de sodio.

En otro caso, los métodos divulgados en el presente documento comprenden además añadir la una o más bases a una primera temperatura, y opcionalmente hacer reaccionar la reacción a una segunda temperatura durante aproximadamente un primer tiempo. La primera y segunda temperaturas pueden ser la misma o diferentes. La primera y/o la segunda temperatura puede ser de aproximadamente 10°C a aproximadamente 80°C, de aproximadamente 40°C a aproximadamente 80°C, aproximadamente 10°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 70°C, o aproximadamente 80°C. El primer tiempo de reacción es el tiempo requerido para sustancialmente convertir la cantidad de la sal de cadaverina a cadaverina (es decir, la concentración de la sal de cadaverina restante es no más de aproximadamente el 5%). Un experto en la materia entendería y apreciaría cómo determinar el primer tiempo de reacción. En cierta forma de realización, el primer tiempo de reacción es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 horas.

a) Eliminar una composición sólida de la composición acuosa de cadaverina de la etapa a1).

En ciertos casos, la una o más sales inorgánicas no se pueden disolver por completo en la solución acuosa, y se precipitan de la solución acuosa como una composición sólida. Por tanto, la composición acuosa de cadaverina de la etapa a1) comprende una composición sólida y una solución acuosa, en donde la composición sólida comprende la una o más sales inorgánicas, y la solución acuosa comprende cadaverina y la una o más sales inorgánicas. La etapa a1) opcionalmente además comprende:

a1-1) Eliminar una composición sólida de la composición acuosa de cadaverina de la etapa a1).

Como se usa en el presente documento, a menos que se especifique de otra manera, todas las concentraciones son concentraciones en peso (p/p).

En general, cuanto mayor sea la concentración de cadaverina en una solución acuosa, menor es la solubilidad de una sal inorgánica en la misma. (Véanse, las figuras 1 y 2, las curvas de solubilidad de NaCl y Na₂SO₄ en una composición acuosa de cadaverina a diferentes concentraciones de cadaverina, respectivamente).

Aunque cualquier concentración de la composición acuosa de sal de cadaverina puede ser adecuada para este método, en ciertas formas de realización, la composición sólida se elimina de la composición acuosa de cadaverina en donde la concentración de cadaverina de la composición acuosa de cadaverina es aproximadamente el 5% o mayor, aproximadamente el 10% o mayor, aproximadamente el 15% o mayor, aproximadamente el 20% o mayor, o aproximadamente el 30% o mayor. En ciertas formas de realización, la etapa a1-1) comprende además las siguientes etapas antes de que se realice la etapa a1-1) descrita anteriormente:

a1-11) concentrar la composición acuosa de sal de cadaverina antes de la adición de la una o más bases; y/u opcionalmente

a1-12) concentrar la reacción de la composición acuosa de sal de cadaverina/base antes de la adición de la una o más bases; y/u opcionalmente

a1-13) concentrar la reacción de la composición acuosa de sal de cadaverina/base durante la adición de la una o más bases;

de modo que la concentración de cadaverina de la composición acuosa de cadaverina de la etapa a) sea aproximadamente el 5% o mayor, aproximadamente el 10% o mayor, aproximadamente el 15% o mayor, aproximadamente el 20% o mayor, o aproximadamente el 30% o mayor.

En un caso, la composición acuosa de sal de cadaverina es una solución de sulfato de cadaverina obtenida de una reacción de LDCN; la base es NaOH. Se proporciona una mezcla cadaverina/Na₂SO₄ de la reacción de sulfato de cadaverina y NaOH. Cuando la concentración de cadaverina de la solución acuosa de la mezcla cadaverina/Na₂SO₄ es aproximadamente el 17% o mayor, aproximadamente el 80% o más del Na₂SO₄ precipita de la solución acuosa.

La composición sólida se puede separar de la composición acuosa de cadaverina de la etapa a1) por cualquier método adecuado para separar sólido de líquido, por ejemplo, centrifugación, y filtración.

En ciertas formas de realización, el contenido de anión ácido de la composición acuosa de cadaverina obtenida en la etapa a1-1) es no más de aproximadamente el 70%, o no más de aproximadamente el 50%, de esa de la composición de sal de cadaverina.

En general, cuanto menor sea la temperatura de la solución, menor es la solubilidad de una sal inorgánica en la misma. Como se muestra en la figura 2, a aproximadamente la misma concentración de cadaverina (por ejemplo, aproximadamente el 20%), la solubilidad del sulfato de sodio a una mayor temperatura (18°C) es más que esa a una menor temperatura (5°C). La figura 2 también mostró que cuando la concentración de cadaverina es relativamente

alta (por ejemplo, aproximadamente el 30% o mayor, o aproximadamente el 40% o mayor), la solubilidad del sulfato de sodio es baja incluso a una temperatura relativamente alta (por ejemplo, 65°C).

En ciertos casos, los métodos divulgados en el presente documento opcionalmente además comprenden:

a1-21) mantener la primera composición a una tercera temperatura durante un segundo tiempo antes de la realización de la etapa a1-1).

La tercera temperatura puede ser desde aproximadamente 2°C a aproximadamente 80°C, aproximadamente 2°C, aproximadamente 4°C, aproximadamente 5°C, aproximadamente 10°C, aproximadamente 15°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 38°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 50°C, o aproximadamente 65°C. En ciertos casos, la tercera temperatura no es mayor que la primera y/o la segunda temperatura descritas anteriormente. En ciertos casos, la tercera temperatura es menor que la segunda temperatura para facilitar la precipitación de la una o más sales inorgánicas de la solución acuosa de la etapa a1).

En ciertas formas de realización, la etapa a-1-1) divulgada en el presente documento comprende:

a1-31) filtrar/centrifugar la primera composición para proporcionar un sólido y un filtrado/sobrenadante; a1-32) enjuagar el sólido con una solución salina acuosa y filtrar/centrifugar la mezcla obtenida para proporcionar otro sólido y otro filtrado/sobrenadante;

a1-33) opcionalmente repetir la etapa a1-32) hasta que el sólido obtenido esté sustancialmente libre de cadaverina; y a1-34) combinar los filtrados/sobrenadantes obtenidos de las etapas a1-31, a1-32 y a1-33) para proporcionar la composición acuosa de cadaverina para que sea procesada adicionalmente en la etapa a).

En ciertos casos, la solución salina acuosa usada en el enjuague de cada etapa a1-32) puede ser la misma o diferente. Los ejemplos de tal solución salina acuosa incluyen, sin limitación, soluciones salinas acuosas saturadas (por ejemplo, solución acuosa saturada de NaOH, y solución acuosa saturada de sulfato de sodio).

En ciertos casos, la temperatura a la que se realizan las etapas a1-31) y a1-32) puede ser la misma o diferente, y puede ser la tercera temperatura descrita anteriormente.

En un caso, la composición acuosa de sal de cadaverina es sulfato de cadaverina, la base es NaOH, y la primera y segunda temperaturas son 60°C. Cuando la tercera temperatura es 35°C, en la solución acuosa obtenida, la concentración de cadaverina es aproximadamente el 20%, y la concentración de SO_4^{2-} es aproximadamente el 3% o menor.

En otro caso, la composición acuosa de sal de cadaverina es sulfato de cadaverina, la base es NaOH, y la primera y segunda temperaturas son 10°C. En la solución acuosa obtenida, la concentración de cadaverina de la solución acuosa de la reacción resultante es aproximadamente el 10%. Cuando la tercera temperatura es 2°C, y el segundo tiempo es aproximadamente 1 hora, la concentración de SO_4^{2-} es aproximadamente el 3,5% o menor.

En otro caso, la composición acuosa de sal de cadaverina es sulfato de cadaverina, la base es NaOH, y la primera y segunda temperaturas son 80°C. La tercera temperatura es 40°C, y el segundo tiempo es aproximadamente 1 hora. En la solución acuosa obtenida, la concentración de cadaverina de la solución acuosa de la reacción resultante es aproximadamente el 30%, y la concentración de SO_4^{2-} es aproximadamente el 2% o menor.

B) Ventajas

Los métodos divulgados en el presente documento mejoran la evaporación/destilación de cadaverina de una composición acuosa de cadaverina que comprende impurezas no volátiles al añadir uno o más solventes en el sistema de evaporación/destilación de cadaverina. La adición del uno o más solventes mejora la fluidez del sistema de evaporación/destilación de cadaverina, y por tanto facilita la evaporación/destilación de cadaverina del mismo. La fluidez mejorada de la cadaverina produce una temperatura de calentamiento inesperadamente menor y un tiempo de calentamiento inesperadamente más corto para proporcionar un rendimiento de evaporación/destilación deseado. Puesto que la cadaverina se puede descomponer a alta temperatura (por ejemplo, ejemplo 18), la temperatura de calentamiento inesperadamente menor y el tiempo de calentamiento inesperadamente más corto disminuye la descomposición indeseada de cadaverina.

En ciertos casos, los métodos divulgados en el presente documento reducen significativamente la temperatura de calentamiento para la evaporación/destilación de cadaverina a pesar de las impurezas que interfieren con la evaporación/destilación. En un ejemplo (ejemplo 12), una primera composición acuosa de sulfato de cadaverina (21,36%, 252,07 g) se convirtió a una primera composición acuosa de cadaverina sin tratamiento de reducción de sal adicional de la etapa a1-1). La destilación de la primera composición acuosa de cadaverina se realizó con la adición de una mezcla de alcano de $\text{C}_{14}/\text{C}_{11}$ (1/1). La destilación se llevó a cabo con una temperatura de calentamiento desde aproximadamente 80°C hasta aproximadamente 130°C (baño de aceite) a una presión de no menos de -0,096 MPa, y el rendimiento de recuperación fue el 86,68% (ejemplo 12). En otro ejemplo (ejemplo 14), una segunda composición

acuosa de sulfato de cadaverina (28,52%, 150 g) se convirtió a una segunda composición acuosa de cadaverina sin tratamiento de reducción de sal adicional de la etapa a1-1). La destilación de la primera composición acuosa de cadaverina se realizó sin la adición de un solvente adicional. La destilación se llevó a cabo con una temperatura de calentamiento desde aproximadamente 80°C hasta aproximadamente 180°C (baño de aceite) a una presión de no menos de -0,095 MPa, y el rendimiento de recuperación fue el 77,52% (ejemplo 14). En otro ejemplo (ejemplo 14), una segunda composición acuosa de sulfato de cadaverina (28,52%, 150 g) se convirtió a una segunda composición acuosa de cadaverina con tratamiento de reducción de sal adicional de la etapa a1-1). La destilación de la primera composición acuosa de cadaverina se realizó sin la adición de otro solvente. La destilación se llevó a cabo con una temperatura de calentamiento desde aproximadamente 80°C hasta aproximadamente 180°C (baño de aceite) a una presión de no menos de -0,095 MPa, y el rendimiento de recuperación fue el 93,26% (ejemplo 14).

En ciertos casos, los métodos divulgados en el presente documento aumentan significativamente el rendimiento de recuperación de cadaverina cuando el sistema de evaporación/destilación de cadaverina acuosa comprende una cantidad significativa de sales inorgánicas. Como se ha discutido anteriormente, sin el tratamiento de reducción de sal de la etapa a1-1), el rendimiento de evaporación/destilación de la cadaverina con la adición de otro solvente (86,68%, ejemplo 12) es significativamente mayor que el rendimiento de evaporación/destilación de la cadaverina sin la adición de otro solvente (77,52%, ejemplo 14).

Además, la temperatura de calentamiento inesperadamente menor y el tiempo de calentamiento inesperadamente más corto son especialmente apreciados para una evaporación/destilación de cadaverina industrial. Debido a las dificultades de agitación y transferencia de calor, la falta de fluidez en el sistema de evaporación/destilación presenta un problema más significativo cuando la escala es relativamente grande (por ejemplo, aproximadamente 50 kg, al menos aproximadamente 100 kg, al menos aproximadamente 200 kg, al menos aproximadamente 500 kg, o al menos aproximadamente 1000 kg). En ciertos casos, el sistema de evaporación/destilación (aproximadamente 100 kg de composición de cadaverina) proporciona una tasa de recuperación del 20% después de destilar en un destilador de 150 l en un baño de aceite (200°C) y una presión reducida (-0,095 MPa) durante 10 horas (ejemplo 15). El sistema de evaporación/destilación es sustancialmente sólido, y no se puede agitar. El residuo de evaporación/destilación después de que la evaporación/destilación sustancialmente se para no se puede descargar del destilador porque es sustancialmente sólido sin fluidez. En ciertos casos, el sistema de evaporación/destilación (aproximadamente 200 kg de composición de cadaverina) proporciona una tasa de recuperación del 33,87% después de destilar en un baño de aceite (aumentado de 80~180°C en 130 min) a una presión reducida (-0,095 MPa) (ejemplo 15). Sin embargo, los métodos divulgados en el presente documento proporcionan una tasa de recuperación inesperadamente alta (~100%) en la evaporación/destilación de cadaverina a una escala similar a partir de una composición de cadaverina similar a una temperatura de calentamiento inesperadamente menor (130°C) (ejemplo 16).

C) Ejemplos

La siguiente descripción proporciona detalles específicos para un entendimiento exhaustivo de, y permite la descripción para, formas de realización de la divulgación. Sin embargo, un experto en la materia entenderá que la divulgación se puede practicar sin estos detalles. En otros casos, estructuras y funciones bien conocidas no se han mostrado o descrito en detalle para evitar oscurecer innecesariamente la descripción de las formas de realización de la divulgación.

La lisina se detectó según el método estándar para la determinación del aditivo alimentario clorhidrato de L-lisina (documento GB10794-2009). El ion sulfato se detectó según el método estándar para la determinación de sulfato de sodio anhidro industrial (documento GB6009-92). Otros iones se detectaron por cromatografía iónica. La cadaverina se detectó según la absorción característica de cadaverina cerca de 2,5 ppm en espectro de RMN. Se usó DMSO como el estándar interno. Las composiciones de sal de cadaverina también se caracterizaron por la concentración de cadaverina ajustando el pH de a muestra de prueba a al menos aproximadamente 14 antes de tomar los espectros de RMN.

Las composiciones acuosas de sal de cadaverina biológicas se prepararon según los métodos divulgados en los ejemplos 1, 2 y 3. También se pueden usar otros enfoques en la transformación de lisina a cadaverina por microorganismos. (Véase, por ejemplo, "Study on the transformation of L-lysine into cadaverine by microorganism," Jing Zhu, Master Thesis, Tianjin University of Science and Technology, Marzo, 2009). El ejemplo de referencia 4 describe una purificación de extracción convencional de cadaverina a partir de una composición de sal de cadaverina. El ejemplo 5 muestra los cambios de pH de la solución acuosa de cadaverina cuando la concentración de cadaverina cambia. Los ejemplos 6 y 7 muestran la reducción de sal eficaz de unas pocas formas de realización según los métodos novedosos divulgados en el presente documento. El ejemplo 8 es la medida de las solubilidades de NaCl y Na₂SO₄ en soluciones acuosas de cadaverina de diferentes concentraciones de cadaverina. Los ejemplos 13 y 17 muestran la purificación eficaz de cadaverina a partir de una composición acuosa de sulfato de cadaverina preparada a partir de cadaverina purificada (pureza del 95,00%) usando los métodos novedosos divulgados en el presente documento con diferentes solventes (por ejemplo, mezcla de alcanos en el ejemplo 13, y alcohol en el ejemplo 17). Los ejemplos 9-12 incluyen purificaciones de cadaverina de composiciones de sal de cadaverina biológicas según los métodos novedosos divulgados en el presente documento, con diferentes maneras de adición de solvente (por ejemplo, el ejemplo 9, usa un alcano como el solvente de alto punto de ebullición); y/o con diferentes solventes de alto punto de

ebullición (por ejemplo, alcanos en los ejemplos 9 y 12, éter en el ejemplo 10, y alcohol en el ejemplo 11). Los ejemplos 14 y 15 describen purificaciones de cadaverina de composiciones de sales de cadaverina biológicas sin adiciones de solvente a diferentes escalas (por ejemplo, una escala menor en el ejemplo 14, y una escala mayor en el ejemplo 15). El ejemplo 16 describe purificaciones de cadaverina a partir de composiciones de sales de cadaverina biológicas según los métodos novedosos divulgados en el presente documento a una escala mayor. El ejemplo 18 muestra que la cadaverina se puede descomponer después de calentarla a 160°C, por tanto, un tiempo de calentamiento más corto disminuirá la posible descomposición de cadaverina y proporcionará una mayor tasa de recuperación.

Ejemplo 1. Preparación de un caldo de fermentación de lisina

(1) Tubos inclinados de medio LB

Se prepararon tubos inclinados de medio LB usando medio LB que contenía triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5% y NaCl al 1%, pH 7,2.

(2) Medio de cultivo semilla primario (medio de cultivo semilla en matraz con agitación)

Se hizo crecer un cultivo de *Corynebacterium* que expresa lisina en los tubos inclinados con medio LB, y se transfirió a un matraz semilla de 500 ml que contenía 200 ml de medio líquido (medio de caldo líquido que contenía extracto vacuno al 1%, triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, y NaCl al 0,5%, pH 7,0), después se cultivó a 33°C en un lecho de agitación a 200 rpm durante 10-15 horas.

(3) Fermentación de lisina

Se añadió un medio de fermentación (5 l) a un fermentador de 10 l. Después el líquido semilla preparado anteriormente se transfirió al fermentador para la fermentación. El medio de fermentación contenía: glucosa al 1,5%, melaza al 0,2%, licor de maceración de maíz al 0,06%, hidrolizado de harina de soja al 0,05%, sulfato de amonio al 0,2%, hidrogenofosfato dipotásico al 0,01% y sulfato de magnesio al 0,005%. Después de esterilizar a 121°C durante 20 minutos, el fermentador se hizo rotar a 400-500 rpm a 31-33°C para la fermentación, la cantidad de aire introducido al fermentador se controló a 0,5-1,2 vvm, DO>20%. En el proceso, se añadió una corriente de azúcar para controlar la concentración de azúcar a aproximadamente el 0,5%; se añadió una corriente de sulfato de amonio para controlar la concentración de amoniaco a aproximadamente el 0,1%; y se añadió una corriente de amoniaco para controlar el pH a aproximadamente 6,5-6,8. Mientras tanto se añadió adversario en burbujas (éteres de glicerol polioxipropileno y polioxietilo) para controlar las burbujas en el proceso de fermentación. El proceso de fermentación entero duró aproximadamente 41 horas. El líquido del tanque liberado tenía una concentración de lisina de aproximadamente el 12%.

(4) Tratamiento final del caldo de fermentación de lisina

El caldo de fermentación de lisina opcionalmente se procesó más (por ejemplo, filtró, centrifugó, y/o filtró a través de membrana) para eliminar las células para obtener un líquido transparente.

Ejemplo 2. Preparación de lisina descarboxilasa (LDC)

(1) Medio semilla y de fermentación:

Medio de cultivo semilla (g/l): Triptona 10, extracto de vacuno 5, NaCl 5, licor de maceración de maíz, 5, pH 7,2. Una cepa silvestre de *Hafnia alvei* (*Hafnia alvei* 1.1009 de CGMCC, <http://www.cgmcc.net/index.php/Contents/shlow/id/460>) que expresa LDC se hizo crecer en tubo inclinado, se transfirió a un matraz Erlenmeyer que contenía 30 ml de medio semilla, y se cultivó a 35°C con agitación a 170 R/min durante 15 horas.

(2) Condiciones de cultivo

Medio de fermentación (g/l): glucosa 18, extracto de levadura 20, licor de maceración de maíz 36,6, MgSO₄ 0,3, KH₂PO₄ 0,1, NaCl 3, L-lisina 5, vitamina B₆ 1, y pH 6,5-7,0.

Se transfirió semilla al 10% a un matraz de 250 ml que contenía 100 ml de medio de fermentación. En la fase de crecimiento celular, la temperatura se controló a 35°C y las células se cultivaron en un agitador rotatorio con oscilación de 200 r/min durante 13 horas; después se cultivó estáticamente durante 5 horas. El caldo de fermentación de LDC obtenido se usó directamente en la conversión catalizada por LDC de lisina o se centrifugó para obtener células húmedas.

Ejemplo 3. Conversión de lisina catalizada por LDC

(1) Conversión enzimática de clorhidrato de lisina

Se añadieron 100 l de caldo de fermentación de LDC (ejemplo 2) en un reactor de 250 l, se añadieron ácido acético y acetato de sodio a la reacción a concentraciones molares finales de 0,2 mol/l, respectivamente. Se añadió clorhidrato de lisina comercialmente disponible a la reacción para controlar la concentración de lisina a 3 g/l, y se añadió Tween-80 (total 0,15 kg) a la reacción. La reacción se agitó a 35°C. La reacción se completó en aproximadamente 5 horas, con una tasa de conversión molar de lisina de aproximadamente el 98%. La conversión enzimática se concentró para obtener solución de sal de cadaverina (aproximadamente el 5%), que estaba lista para procesamiento opcional adicional.

(2) Conversión enzimática de sulfato de lisina

Se añadieron 100 l de caldo de fermentación de LDC (ejemplo 2) en un reactor de 250 l, se añadieron ácido acético y acetato de sodio a la reacción a concentraciones molares finales de 0,2 mol/l, respectivamente. Se añadió sulfato de lisina (65%) comercialmente disponible a la reacción para controlar la concentración de lisina a 3 g/l, y se añadió Tween-80 (total 0,15 kg) a la reacción. La reacción se agitó a 35°C. La reacción se completó en aproximadamente 5 horas, con una tasa de conversión molar de lisina de aproximadamente el 86%. La solución de conversión enzimática se concentró para obtener solución de sal de cadaverina (aproximadamente el 5%), que estaba lista para procesamiento opcional adicional.

(3) Conversión enzimática de caldo de fermentación de lisina

Se pusieron 1670 gramos del caldo de fermentación de lisina anteriormente preparado (ejemplo 1) en el caldo de fermentación de LDC anteriormente preparado (Ejemplo 2) para llegar a 100 l de una solución mezcla (concentración de lisina a 2 g/l). Se añadieron ácido acético y acetato de sodio a la reacción a concentraciones molares finales de 0,2 mol/l, respectivamente y se añadió Tween-80 (total 0,15 kg) a la reacción. La reacción se agitó a 35°C. La reacción se completó en aproximadamente 8 horas, con una tasa de conversión molar de lisina de aproximadamente el 83%. La solución de conversión enzimática se concentró para obtener solución de sal de cadaverina (aproximadamente el 5%), que estaba lista para procesamiento opcional adicional.

Ejemplo de referencia 4. Purificación de cadaverina usando extracción con solvente orgánico

Una solución de conversión enzimática de cloruro de cadaverina (6% de cadaverina) se concentró por evaporación a presión reducida para proporcionar una solución acuosa de cloruro de cadaverina (1.075 l, 1.118 kg y el 9,83% de cadaverina). Se añadió hidróxido de sodio (ac., al 30%, 332 l) para proporcionar composición acuosa de cadaverina, pH 14. Se añadió solución de butanol acuosa saturada a la reacción anterior para extracción (400 l). La mezcla de extracción se agitó/extrajo a 50-60°C durante 40 minutos, y se dejó reposar durante 1 hora para la separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa se extrajo adicionalmente dos veces con solución de butanol saturada (ac., 400 l) como se ha descrito anteriormente. Las fases orgánicas se combinaron y tenían una concentración de cadaverina del 9%. La fase orgánica combinada se concentró a 50-60°C a -0,085 MPa. y se destiló adicionalmente a 80-120°C a -0,085 MPa durante 6 horas para proporcionar un rendimiento de recuperación de cadaverina del 62,35%.

Aunque la composición acuosa de cadaverina se extrajo antes de la destilación, cantidades significativas de impurezas se quedaron aún en el sistema, que interferían con la destilación de cadaverina y proporcionaron un bajo rendimiento de recuperación de cadaverina.

Ejemplo 5. pH de algunas composiciones acuosas de cadaverina a temperatura ambiente

Se detectó el pH de algunas composiciones acuosas de cadaverina a temperatura ambiente usando un pH-metro (tabla 1).

Tabla 1. El pH de algunas composiciones acuosas de cadaverina a temperatura ambiente

Concentración de cadaverina (%)	pH
1	12,29
4,91	12,59
9,9	12,74
19,8	12,89
30	13,4
50	14

Ejemplo 6. Procesos de reducción de sal (I)

Una solución de conversión enzimática de sulfato de cadaverina (1000 g) se concentró en un rotavapor de 50 a 70°C a -0,09 MPa a una primera composición de sulfato de cadaverina (139,63 g). Otra solución de conversión enzimática de sulfato de cadaverina (1000 g) se concentró a una segunda composición de sulfato de cadaverina (161,00) en

sustancialmente la misma condición. Se añadió hidróxido de sodio (calidad química, aproximadamente 28,3 g) a la primera composición de sulfato de cadaverina, y se agitó hasta que el pH fue mayor de 13,3. La mezcla se filtró a aproximadamente 65°C, y el sólido filtrado se flameó para proporcionar un sólido seco (44,38 g) que contenía 43,87 g de sulfato de sodio (98,85%). El mismo proceso se llevó a cabo en la segunda composición de sulfato de cadaverina, y el sólido seco obtenido (42,70 g) contenía 42,16 g de sulfato de sodio (98,94%). Por tanto, este ejemplo mostró que según los métodos divulgados en el presente documento, la reducción de sal en una composición de sal de cadaverina más concentrada era más eficaz.

Ejemplo 7. Procesos de reducción de sal (II)

Una primera solución de conversión enzimática de sulfato de cadaverina (300,74 g, 4,6% de cadaverina, 2,83% de SO_4^{2-}) se concentró en un rotavapor de 50 a 70°C a -0,09 MPa a una primera composición de sulfato de cadaverina (120,13 g, 11,51% de cadaverina, 7,08% de SO_4^{2-}). Una segunda solución de conversión enzimática de sulfato de cadaverina (300,79 g, 4,6% de cadaverina, 2,83% de SO_4^{2-}) se concentró a una segunda composición de sulfato de cadaverina (79,69 g, 17,36% de cadaverina, 10,68% de SO_4^{2-}) en sustancialmente la misma condición. Se añadió hidróxido de sodio (ac., 18,05 g, 60%, aproximadamente 1 equivalente) a la primera composición de sulfato de cadaverina y se filtró a aproximadamente 65°C para proporcionar una primera composición acuosa de cadaverina (9,8% de cadaverina y 6,03% de SO_4^{2-} en la solución). Se llevó a cabo el mismo proceso en la segunda composición de sulfato de cadaverina, y se obtuvo una segunda composición acuosa de cadaverina (14,90% de cadaverina y 5,17% de SO_4^{2-} en la solución). Por tanto, este ejemplo mostró que según los métodos divulgados en el presente documento, la reducción de sal en una composición de sal de cadaverina más concentrada era más eficaz, y la composición acuosa de cadaverina obtenida tenía una menor concentración de sal y una mayor concentración de cadaverina.

Ejemplo 8. Solubilidades de NaCl y sulfato de sodio en soluciones acuosas de cadaverina

A una temperatura específica (por ejemplo, 5°C, 18°C, 24°C o 65°C), se añadió sulfato de sodio a una solución acuosa de cadaverina con una concentración específica de cadaverina hasta que una pequeña cantidad de sulfato de sodio no se disolvió. La mezcla se agitó durante media hora y se dejó reposar durante media hora. El sobrenadante se retiró para detectar la concentración de cadaverina y la concentración de sulfato. El protocolo se repitió para diferentes concentraciones de cadaverina y/o a diferentes temperaturas (Tabla 2 y Figura 2).

A una temperatura específica (por ejemplo, 5°C, 18°C, 24°C o 65°C), se añadió NaCl a un sistema hermético que consistía en una solución acuosa de cadaverina al 50% con agitación hasta que una pequeña cantidad de NaCl no se disolvió. La cantidad de NaCl añadida se registró. Se añadieron pequeñas cantidades de agua justo hasta que el NaCl insoluble se disolvió por completo. La cantidad de agua añadida también se registró. Repetir las etapas de adición de sal y agua descritas anteriormente para obtener las solubilidades de NaCl a diferentes concentraciones de cadaverina (Tabla 3 y Figura 3).

Tabla 2 Solubilidades de sulfato de sodio en composición de cadaverina (ac.) a 5°C, 18°C y 65°C.

T (°C)	Concentración de cadaverina (%)	Concentración de sulfato de sodio (%)
5	5,48	5,09
	9,71	3,33
	13,46	3,31
	17,47	1,51
	24,14	0,97
18	5,61	10,46
	11,48	6,41
	17,63	4,07
	24,62	2,57
	36,32	0,93
65	29,90	3,56
	31,41	3,24
	38,82	0,77
	41,06	1,05
	51,23	0,13

Tabla 3 Solubilidades de cloruro de sodio en composición de cadaverina (ac.) a 24°C.

T (°C)	Concentración de cadaverina (%)	Concentración de sulfato de sodio (%)
24	41,0053	9,4428
	39,9805	10,0113
	38,5559	11,1982
	36,7162	12,1321
	33,6967	13,1604

Ejemplo 9. Purificación de cadaverina de composiciones de sulfato de cadaverina (I): con diferentes maneras de adición de solvente (alcano de C₁₄ (n-tetradecano))

Una solución de conversión enzimática de sulfato de cadaverina se concentró en un rotavapor de 50 a 80°C a -0,09 MPa a una composición de sulfato de cadaverina (30% de cadaverina). Se añadió hidróxido de sodio a la composición de sulfato de cadaverina a 60°C y se agitó a la misma temperatura para proporcionar una composición acuosa de cadaverina, pH 14,00. La mezcla obtenida se filtró a 60°C para proporcionar un filtrado, que se concentró adicionalmente en un rotavapor de 50 a 90°C a -0,09 MPa a una composición acuosa de cadaverina (47% de cadaverina). La cantidad de cadaverina era la cantidad inicial usada para calcular el rendimiento de recuperación.

Se usaron 100 ml de n-tetradecano en la destilación de cadaverina de la composición acuosa de cadaverina (150,00 g, 47% de cadaverina) de diferentes maneras, respectivamente como se describe a continuación.

En un primer experimento se añadieron 10 ml de alcano de C₁₄ a la composición acuosa de cadaverina (150,00 g, 47% de cadaverina) antes de que empezara la destilación de cadaverina. Después de recoger 30 ml de destilado con una temperatura de calentamiento de 85°C (baño de aceite) y una presión de destilación de -0,095 MPa, se añadieron 20 ml de mezcla de alcano de C₁₄ al sistema de destilación y la destilación siguió con una temperatura de calentamiento de 85°C (baño de aceite) y una presión de destilación de -0,095 MPa durante media hora. A continuación, se añadieron 70 ml de mezcla de alcano de C₁₄ al sistema de destilación para destilación adicional con una temperatura de calentamiento final de 135°C (baño de aceite) y una presión de destilación de -0,095 MPa, hasta que no se observó más destilación. El rendimiento de recuperación de cadaverina fue el 85,81%.

En un segundo experimento, se añadieron 100 ml de mezcla de alcano de C₁₄ a la composición acuosa de cadaverina (150,00 g, 47% de cadaverina) durante la destilación de cadaverina a través de succión de vacío controlada. La adición de alcano de C₁₄ estaba completa después de recoger aproximadamente 40 ml de destilado con una temperatura de calentamiento de 75°C (baño de aceite) y una presión de destilación de -0,095 MPa. La destilación siguió con una temperatura de calentamiento final de 135°C (baño de aceite) y una presión de destilación de -0,093 MPa, hasta que no se observó más destilación. El rendimiento de recuperación de cadaverina fue el 73,27%.

En un tercer experimento, se añadieron 100 ml de mezcla de alcano de C₁₄ a la composición acuosa de cadaverina (150,00 g, 47% de cadaverina) antes de que empezara la destilación de cadaverina. Después se realizó la destilación con una temperatura de calentamiento de 65°C~135°C (baño de aceite) y una presión de destilación de -0,094 MPa, hasta que no se observó más destilación. El rendimiento de recuperación de cadaverina fue el 86,60%.

En un cuarto experimento, se añadieron 100 ml de mezcla de alcano de C₁₄ a la composición acuosa de cadaverina (150,00 g, 47% de cadaverina) antes de que empezara la destilación de cadaverina. Después se realizó la destilación con una temperatura de calentamiento de 80°C~120°C (baño de aceite) y una presión de destilación de -0,03 MPa, hasta que se recogieron aproximadamente 40 ml de destilado. Después la destilación siguió con una temperatura de calentamiento final de 135°C (baño de aceite) y una presión de destilación de -0,096 MPa, hasta que no se observó más destilación. El rendimiento de recuperación de cadaverina fue el 89,85%.

Ejemplo 10. Purificación de cadaverina de composiciones de sulfato de cadaverina (II): con éter difenílico

Una solución de conversión enzimática de sulfato de cadaverina se concentró en un rotavapor de 50 a 80°C a -0,09 MPa a una composición de sulfato de cadaverina (30% de cadaverina). Se añadió hidróxido de sodio a la composición de sulfato de cadaverina a 60°C y se agitó a la misma temperatura para proporcionar una composición acuosa de cadaverina, pH 14,00. La mezcla obtenida se filtró a 60°C para proporcionar un filtrado, que se concentró adicionalmente en un rotavapor de 50 a 90°C a -0,09 MPa a una composición acuosa de cadaverina (47% de cadaverina). La cantidad de cadaverina era la cantidad inicial usada para calcular el rendimiento de recuperación.

La composición acuosa de cadaverina (154,4 g, 48% de cadaverina) se concentró en un rotavapor a 100°C a -0,095 MPa hasta que no se observó más destilación. El destilado recogido se nombró destilado A (52,46 g, 25,3% de cadaverina). A continuación, se añadieron 100 ml de éter difenílico en el sistema de destilación de cadaverina, y la destilación siguió con la temperatura de calentamiento lentamente subida a 160°C (baño de aceite) y a una presión de destilación de -0,095 MPa, hasta que no se observó más destilación. El destilado recogido se nombró destilado B (72,1 g, 71% de cadaverina). El rendimiento de recuperación de cadaverina total fue el 86,71%.

Ejemplo 11. Purificación de cadaverina de composiciones de cloruro de cadaverina (III): con dodecanol

Una solución de conversión enzimática de cloruro de cadaverina (939 g, 5,28% de cadaverina) se concentró en un rotavapor de 50 a 70°C a -0,09 MPa a una composición de cloruro de cadaverina (153,01 g, 31,92% de cadaverina). Se añadió hidróxido de sodio (70,00 g, 60% ac.) a la composición de cloruro de cadaverina a 60°C y se agitó a la misma temperatura para proporcionar una composición acuosa de cadaverina, pH > 14,00. Se añadió dodecanol (103,81 g) a la mezcla obtenida antes de la destilación. A continuación, la destilación se llevó a cabo con una

temperatura de calentamiento subida de 80°C a 150°C (baño de aceite a -0,095 MPa para proporcionar un destilado de cadaverina (95,84 g, 38,28% de cadaverina). El rendimiento de recuperación de cadaverina total fue el 73,98%.

Ejemplo 12. Purificación de cadaverina de composiciones de sulfato de cadaverina (IV): con mezcla de alcanos de C₁₄-C₁₁ (1:1)

Se añadió hidróxido de potasio (57,31 g) a la composición de sulfato de cadaverina (252,07 g, 21,36% de cadaverina) a 80°C y se agitó a la misma temperatura. Después la mezcla obtenida se enfrió a 30°C para proporcionar una composición acuosa de cadaverina, pH > 14,00. Se añadió mezcla de alcanos de C₁₄-C₁₁ (1:1, aproximadamente 250 g) a la composición acuosa de cadaverina antes de la destilación. La destilación se llevó a cabo a -0,03 MPa con una temperatura de calentamiento lentamente subida hasta que la destilación empezó. La destilación se ralentizó cuando la temperatura de calentamiento era aproximadamente 120°C (baño de aceite). La destilación siguió a una presión más reducida lentamente ajustada a -0,096 MPa. Después la temperatura de calentamiento siguió subiendo lentamente hasta 130°C (baño de aceite) para seguir la destilación hasta que no se observó más destilación. El destilado se recogió (210,52 g, 22,17% de cadaverina) y el rendimiento de recuperación de cadaverina fue el 86,68%.

Ejemplo 13. Purificación de cadaverina de composiciones de sulfato de cadaverina obtenidas de cadaverina al 95%: con glicerol

Se mezcló cadaverina (95%) con agua para proporcionar una composición acuosa de cadaverina (250,94 g, 19,99% de cadaverina, pH 12,62). La composición acuosa de cadaverina se mezcló con ácido sulfúrico (30%, 168,76 g) para proporcionar una composición de sulfato de cadaverina (pH 7,00). Después se añadieron NaCl (2,51 g), fosfato de sodio (1 g) y glicerol (100,07 g) a la composición de sulfato de cadaverina para proporcionar una composición de sal de cadaverina (pH 7,85). Se añadió NaOH (232,61 g, 30,0%) a la composición de sal de cadaverina para proporcionar una composición que tiene un pH de 13,90. La composición obtenida se destiló con una temperatura de calentamiento lentamente subida en un baño de aceite (80 ~ 135°C) a -0,095 MPa. El destilado se recogió y el rendimiento de recuperación de cadaverina fue el 66,46%.

Ejemplo 14. Purificación de cadaverina de composiciones de sulfato de cadaverina sin adición de solvente y con/sin etapa de reducción de sal a1-1)

Una solución de conversión enzimática de sulfato de cadaverina se concentró en un rotavapor de 50 a 70°C a -0,09 MPa a una composición de sulfato de cadaverina (28,52% de cadaverina).

Se añadió hidróxido de potasio (ac., 47,46 g, 60%) a una primera composición de sulfato de cadaverina (150 g, 28,52% de cadaverina) a 60°C y se agitó a la misma temperatura para proporcionar una primera composición acuosa de cadaverina, pH 13,99. La primera composición acuosa de cadaverina se evaporó a -0,095 MPa de un baño de aceite hasta que no se observó más evaporación. La temperatura del baño de aceite aumentó de 80°C a 180°C en 130 min. El destilado recogido fue 143,48 g (ac., 23,12% de cadaverina). El rendimiento de recuperación de cadaverina fue el 77,52%.

Se añadió hidróxido de potasio (ac., 47,46 g, 60%) a una segunda composición de sulfato de cadaverina (150 g, 28,52% de cadaverina) a 60°C y se agitó a la misma temperatura para proporcionar una segunda composición acuosa de cadaverina, pH 13,98. La segunda composición acuosa de cadaverina se filtró a 60°C para proporcionar un filtrado de 143,36 g (28,14% de cadaverina). El sólido obtenido de la filtración se pesó mientras estaba húmedo (51,66 g), se lavó con sulfato de sodio saturado (ac., 26,00 g) y se filtró para proporcionar otro filtrado de 26,55 g (18,65% de cadaverina). Los filtrados obtenidos de ambas filtraciones se combinaron (169,91 g, que contenía 45,29 g de cadaverina) y se evaporó a -0,095 MPa en un baño de aceite hasta que no se observó más evaporación. La temperatura del baño de aceite aumentó de 80°C a 180°C en 130 min. El destilado recogido fue 197,38 g (ac., 20,22% de cadaverina). El rendimiento de recuperación de cadaverina fue el 93,26%.

Ejemplo 15. Escala mayor de purificación de cadaverina de composiciones de sulfato de cadaverina sin adición de solvente y con/sin etapa de reducción de sal a1-1)

Una solución de conversión enzimática de sulfato de cadaverina se concentró en un rotavapor de 50 a 70°C a -0,09 MPa a una composición de sulfato de cadaverina (28,52% de cadaverina).

Se añadió hidróxido de sodio (sólido) a una primera composición de sulfato de cadaverina (100 kg, 28,52% de cadaverina) a 60°C y se agitó a la misma temperatura para proporcionar una primera composición acuosa de cadaverina, pH 13,99. La primera composición acuosa de cadaverina se evaporó en un destilador de 150 l a -0,095 MPa en un baño de aceite de 200°C durante 10 horas. El sistema de evaporación/destilación era sustancialmente sólido, y no se pudo agitar. El residuo de evaporación/destilación después de que la evaporación/destilación parase sustancialmente no se pudo descargar del destilador porque era sustancialmente sólido sin fluidez. El rendimiento de recuperación de cadaverina fue el 20%.

Se añadió hidróxido de sodio (sólido) a una segunda composición de sulfato de cadaverina (200 kg, 28,52% de cadaverina) a 60°C y se agitó a la misma temperatura para proporcionar una segunda composición acuosa de cadaverina, pH 14,00. La segunda composición acuosa de cadaverina se centrifugó para eliminar el sólido en la misma y proporcionar un sobrenadante de cadaverina. El sólido obtenido se lavó con sulfato de sodio saturado y se filtró para proporcionar un filtrado de cadaverina. El filtrado y el sobrenadante de cadaverina se combinaron y concentraron para proporcionar una composición acuosa de cadaverina (50 kg, 62% de cadaverina), que se destiló a -0,095 MPa en un destilador (100 l) en un baño de aceite (200°C) hasta que no se observó más evaporación (al menos 12 horas). El destilado recogido fue 21 kg (ac., 50% de cadaverina). El rendimiento de recuperación de cadaverina fue el 33,87%.

Ejemplo 16. Escala mayor de purificación de cadaverina de composiciones de sulfato de cadaverina con etapa de reducción de sal a 1-1): con alcano de C₁₄ (n-tetradecano)

Una solución de conversión enzimática de sulfato de cadaverina se concentró en un rotavapor de 50 a 70°C a -0,09 MPa a una composición de sulfato de cadaverina (28,52% de cadaverina).

Se añadió hidróxido de sodio (sólido) a una composición de sulfato de cadaverina a 60°C y se agitó a la misma temperatura para proporcionar una primera composición acuosa de cadaverina, pH 14,00. La primera composición acuosa de cadaverina se centrifugó para eliminar el sólido en la misma y proporcionar un sobrenadante de cadaverina. El sobrenadante de cadaverina se concentró para proporcionar una segunda composición acuosa de cadaverina (516,8 kg, 22,90% de cadaverina). La segunda composición acuosa de cadaverina se destiló a presión reducida (-0,092 MPa) en un baño de aceite con la adición de n-tetradecano (160,00 kg) en una o más porciones durante la destilación. La temperatura del baño de aceite aumentó de 80°C a 130°C en 130 min. El destilado se recogió, y el rendimiento de recuperación de cadaverina fue aproximadamente el 100%.

Ejemplo 17. Purificación de cadaverina de composiciones de sulfato de cadaverina obtenidas de cadaverina al 95%: con mezcla de alcanos de C₁₄-C₁₁ (1:1)

Se mezcla cadaverina (95%) con agua para proporcionar una composición acuosa de cadaverina (250,94 g, 19,99% de cadaverina, pH 12,62). La composición acuosa de cadaverina se mezcla con ácido sulfúrico (30%, 168,76 g) para proporcionar una composición de sulfato de cadaverina (pH 7,00). Se añade NaOH (232,61 g, 30,0%) a la composición de sal de cadaverina para proporcionar una composición que tiene un pH de 13,90. La composición obtenida se destila con una temperatura de calentamiento lentamente subida en un baño de aceite (80 ~ 135°C) a -0,095 MPa hasta que la destilación sustancialmente se para. Se añade mezcla de alcanos de C₁₄-C₁₁ (1:1, 250 g) al sistema de destilación, y después la destilación se sigue por destilación fraccional.

Ejemplo 18. Descomposición de cadaverina después de calentada a 160°C

Se colocó una cadaverina purificada en un tubo de ensayo de 20 ml y se calentó en un baño de aceite de 160°C en contacto con el aire libre. Se retiraron muestras del tubo de ensayo a las 0, 2 y 8 horas después de iniciar el calentamiento y se ensayó la pureza (Tabla 4).

Tabla 4. Pureza de muestras de cadaverina después de calentada a 160°C

Tiempo de calentamiento (hora)	Pureza (%)
0	98,64
2	98,53
8	97,74

REIVINDICACIONES

1. Un método para la purificación de cadaverina a partir de una composición acuosa de cadaverina que comprende una o más impurezas no volátiles, el método comprende:
 - a) obtener cadaverina de la evaporación o destilación de la composición acuosa de cadaverina en donde uno o más solventes se añaden al sistema de evaporación/destilación antes de que empiece la evaporación/destilación, durante la evaporación/destilación y/o después de que la evaporación/destilación sustancialmente se pare cuando no se observa más evaporación/destilación; en donde el uno o más solventes comprenden al menos uno o más solventes de alto punto de ebullición (HBP) que tienen un punto de ebullición de al menos 185°C (1 atm); y en donde la evaporación o destilación se hace a una temperatura de calentamiento de 80°C a 180°C, y la evaporación o destilación está sometida a una presión menor que la presión ambiente.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la composición acuosa de cadaverina se obtiene de las siguientes etapas:
 - a0-1) proporcionar una composición acuosa de sal de cadaverina;
 - a0-0) opcionalmente añadir uno o más solventes de alto punto de ebullición; y
 - a1) ajustar el pH de la composición acuosa de sal de cadaverina para proporcionar una composición acuosa de cadaverina que tiene un pH de al menos 12.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la composición acuosa de cadaverina se obtiene de las siguientes etapas:
 - a0-2) proporcionar una composición acuosa de sal de cadaverina que comprende una composición de producción de cadaverina, en donde la composición de producción de cadaverina se obtiene de un proceso de producción de cadaverina biológica;
 - a0-0) opcionalmente añadir uno o más solventes de alto punto de ebullición; y
 - a1) ajustar el pH de la composición acuosa de sal de cadaverina para proporcionar una composición acuosa de cadaverina que tiene un pH de al menos 12.
4. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la etapa a1) además comprende:
 - a1-1) eliminar una composición sólida de la composición acuosa de cadaverina de la etapa a1).
5. El método de la reivindicación 4, en donde la etapa a1-1) comprende además las siguientes etapas antes de realizar la etapa a1-1):
 - a1-11) concentrando la composición acuosa de sal de cadaverina antes de la adición de una o más bases; y/u opcionalmente
 - a1-12) concentrando la reacción de composición acuosa de sal de cadaverina/base después de la adición de la una o más bases; y/u opcionalmente
 - a1-13) concentrando la reacción de composición acuosa de sal de cadaverina/base durante la adición de la una o más bases.
6. El método de cualquier reivindicación de las reivindicaciones 1-5, en donde la concentración de cadaverina de la composición acuosa de cadaverina de la etapa a) es el 5%, el 20% o mayor.
7. El método de cualquier reivindicación de las reivindicaciones 4-6, en donde la etapa a1-1) divulgada en el presente documento comprende:
 - a1-31) filtrar/centrifugar la primera composición para proporcionar un sólido y un filtrado/sobrenadante;
 - a1-32) enjuagar el sólido con una solución salina acuosa y filtrar/centrifugar la mezcla obtenida para proporcionar otro sólido y otro filtrado/sobrenadante;
 - a1-33) opcionalmente repetir la etapa a1-32) hasta que el sólido obtenido esté sustancialmente libre de cadaverina; y
 - a1-34) combinar los filtrados/sobrenadantes obtenidos de las etapas a1-31), a1-32) y a1-33) para proporcionar la composición acuosa de cadaverina que se va a procesar adicionalmente en la etapa a).
8. El método de cualquier reivindicación de las reivindicaciones 2-7, en donde el contenido de anión ácido de la composición acuosa de cadaverina es no más del 50% o no más del 70% de ese de la composición acuosa de sal de cadaverina.
9. El método de cualquier reivindicación de las reivindicaciones 2-8, en donde la composición acuosa de sal de cadaverina comprende una o más sales de cadaverina seleccionadas del grupo que consiste en sulfato de

cadaverina, cloruro de cadaverina, carbonato de cadaverina, fosfato de cadaverina y cualquier combinación de las mismas.

- 5 10. El método de cualquier reivindicación de las reivindicaciones 2-9, en donde la composición acuosa de sal de cadaverina tiene un pH de 11 o menor y/o el pH de la primera composición de la etapa a1) es 13,5 o mayor.
- 10 11. El método de cualquier reivindicación de las reivindicaciones 2-10, en donde la etapa a1) comprende añadir una composición de base inorgánica en la composición acuosa de sal de cadaverina, en donde la composición de base inorgánica comprende una o más bases inorgánicas seleccionadas del grupo que consiste en hidróxidos de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalinotérreos, y sales básicas de los mismos.
- 15 12. El método de la reivindicación 11, en donde la una o más bases inorgánicas se seleccionan del grupo que consiste en NaOH, KOH, Na₃PO₄, Na₂CO₃, y cualquier combinación de las mismas.
- 20 13. El método de cualquier reivindicación de las reivindicaciones 1-12, en donde la composición acuosa de cadaverina se destila a una presión reducida o a presión ambiente en la etapa a).
14. El método de cualquier reivindicación de las reivindicaciones 1-13, en donde el uno o más solventes HBP tienen uno o más puntos de ebullición de al menos 190°C (1 atm).
- 25 15. El método de cualquier reivindicación de las reivindicaciones 1-14, en donde el uno o más solventes HBP se seleccionan del grupo que consiste en alcanos, cloroalcanos, derivados de benceno, alcoholes, éteres, aminas, ésteres, nitrilos, y cualquier combinación de los mismos, en donde preferiblemente
 - (a) el uno o más solventes HBP se seleccionan del grupo que consiste en alcanos de C₁₄, mezcla de alcanos de C₁₁/C₁₄, éter bifenílico, y dodecanol;
 - (b) el uno o más solventes HBP son alcanos; o
 - (c) el uno o más solventes HBP no comprenden alcohol.

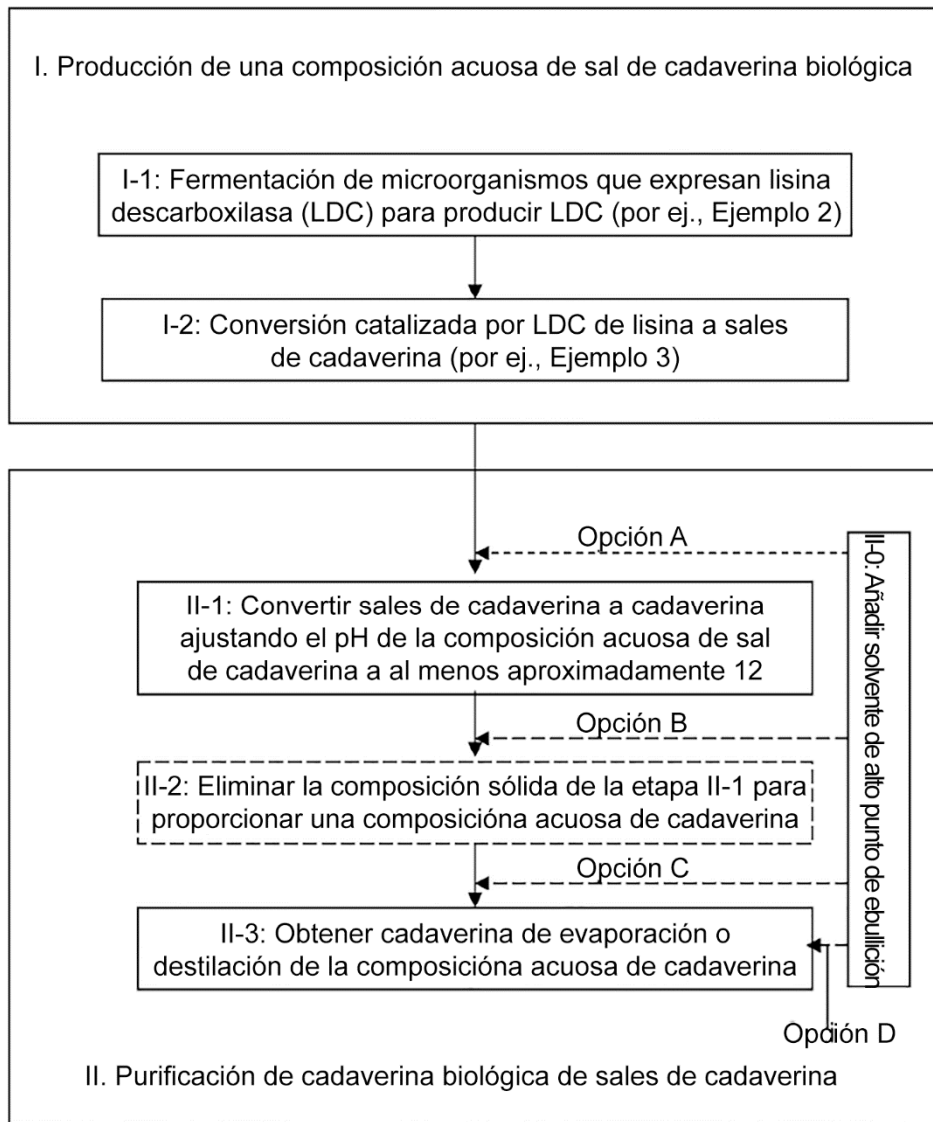


Figura 1

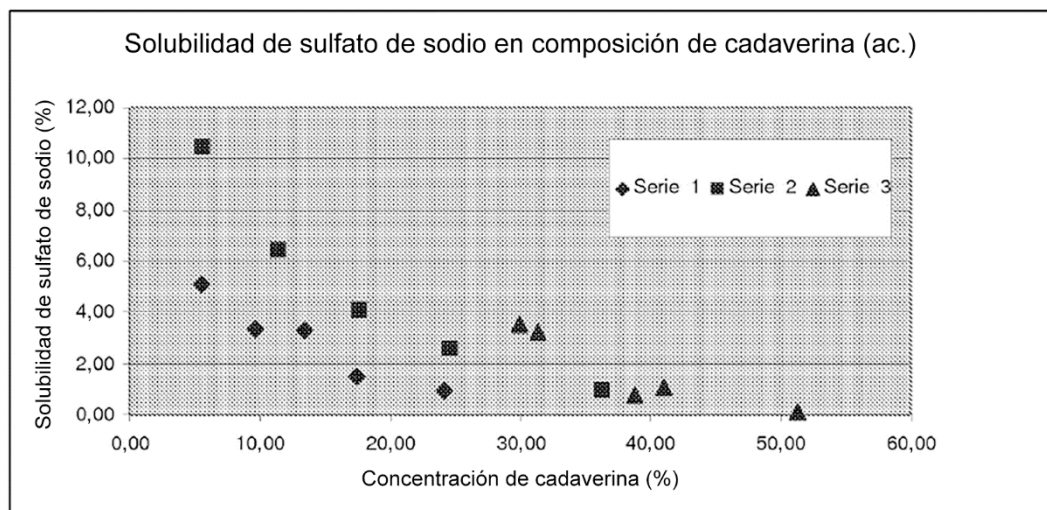


Figura 2

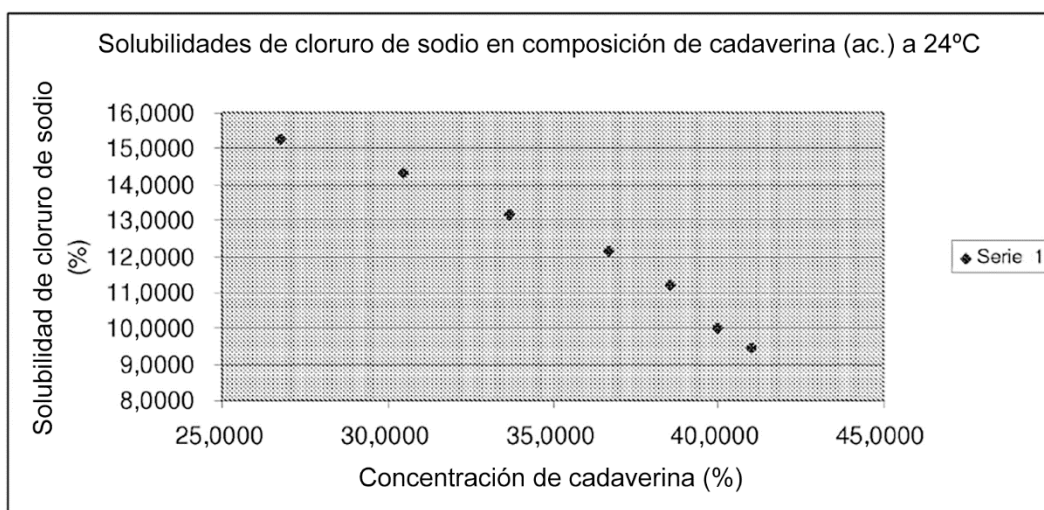


Figura 3