



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 476**

51 Int. Cl.:  
**C13J 1/06** (2006.01)  
**C13K 13/00** (2006.01)  
**C13D 3/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01972130 .7**  
96 Fecha de presentación : **28.09.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1348037**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2003**

54 Título: **Utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida para la separación cromatográfica de hidratos de carbono.**

30 Prioridad: **29.09.2000 FI 20002149**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73 Titular/es: **Danisco A/S**  
**Langebrogade 1, P.O. Box 17**  
**1001 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es: **Kärki, Ari;**  
**Heikkilä, Heikki;**  
**Jumppanen, Juho;**  
**Tiihonen, Jari;**  
**Tervala, Tiina;**  
**Mäyrä, Nina;**  
**Ravanko, Vili;**  
**Paananen, Hannu y**  
**Paatero, Erkki**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 316 476 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

Utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida para la separación cromatográfica de hidratos de carbono.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida para la separación cromatográfica de hidratos de carbono. En particular, la presente invención se refiere a la utilización de la interacción hidrófila/hidrófoba de hidratos de carbono, azúcares y alcoholes de azúcares, con la resina de intercambio de catión débilmente ácida. Más en particular, la invención se refiere a la utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida para separación de *monosacáridos entre sí, disacáridos y/u oligosacáridos*; sacáridos hidrófobos tales como desoxi-, metil- y anhidro-azúcares así como alcoholes de anhidroazúcares de sacáridos más hidrófilos; *y/o azúcares hexosa y pentosa y alcoholes de azúcares unos de otros*.

15 **Antecedentes de la invención**

La Patente estadounidense 2 684331 describe un método para separación cromatográfica entre sí de dos o más substancias que tienen constantes de ionización muy diferentes y al menos una de las sustancias sufre una ionización considerable en una solución acuosa diluida de las mismas. Sin embargo, el método no ha sido utilizado para separar hidratos de carbono. Los ejemplos de la Patente estadounidense 2 684 331 describen la separación de sales desde disolventes orgánicos, por ejemplo cloruro de sodio desde formaldehído. El método comprende una resina de intercambio de ión que tiene un ión idéntico al ión del soluto altamente ionizado. La resina de intercambio de ión es o bien una resina de intercambio de catión o una resina de intercambio de anión. La resina de intercambio de catión contiene grupos sulfonato como grupos funcionales. La resina de intercambio de anión contiene grupos amonio cuaternario como grupos funcionales.

La Patente estadounidense 2 911 362 describe un método que comprende un proceso de separación cromatográfica que emplea resinas de intercambio de ión para separar entre sí dos o más compuestos hidrosolubles orgánicos en un medio acuoso en ausencia de una reacción de intercambio de ión, es decir, en la ausencia sustancial de una reacción química que suponga una absorción de iones desde el medio acuoso por la resina o la introducción de iones en la solución desde la resina. Según el citado método, la resina de intercambio de ión puede ser una resina de intercambio de catión o una resina de intercambio de anión. La resina de intercambio de catión puede contener grupos sulfonato como grupos funcionales o grupos ácido carboxílico como grupos funcionales. La resina de intercambio de anión contiene grupos amonio cuaternario como grupos funcionales en ella. Sin embargo, la separación no ha sido utilizada para separar hidratos de carbono.

La separación cromatográfica ha sido utilizada para recuperar xilosa desde hidrolizados de materiales naturales tales como madera de abedul, mazorca de maíz, y cáscaras de semilla de algodón, con un método descrito en la Patente estadounidense No. 4 075 406. La resina empleada en la separación cromatográfica es un intercambiador de cationes fuertemente ácido, esto es poliestireno sulfonatado reticulado con divinil benceno. El empleo de un intercambiador de catión fuertemente ácido para la separación de monosacáridos, por ejemplo xilosa desde el licor de cocción de sulfito de magnesio también es conocido por la publicación de Patente internacional WO 97/49658. La separación cromatográfica se ha llevado a cabo empleando un lecho móvil simulado. Sin embargo, la separación de ciertos monosacáridos por utilización de resinas de intercambio de catión de ácido fuerte ha resultado difícil a su vez. Según Samuelson (Samuelson, O., "Cromatografía sobre resinas de intercambio de iones", *J. Methods Carbohydr. Chem.* 6 (1972) 65-75), por ejemplo, la separación de ramnosa de otros hidratos de carbono con resinas de intercambio de catión fuerte ha sido posible por empleo de disolventes, por ejemplo alcohol, como eluyente. La ramnosa eluye antes que la mayoría de otros hidratos de carbono debido a que tiene un tiempo de retención más corto que las aldosas y cetosas cuando se usa etanol acuoso como eluyente. El agua sería el eluyente preferido, pero cuando se utiliza, el problema es que los diversos hidratos de carbono, tales como ramnosa, arabinosa y/o xilosa tienen la tendencia a eluir en un tiempo de retención similar, por lo que las fracciones quedarán solapadas. Por tanto, no ha sido propuesta la separación con agua como eluyente.

La separación de hidratos de carbono, especialmente xilosa por intercambiadores de catión de ácido fuerte, ha sido practicada industrialmente, pero es complicada y solo ha dado buen resultado de una forma. Se ha utilizado el método presentado en la Patente estadounidense No. 5 998 607 especialmente para separación de xilosa desde el licor de desechos de magnesio. El problema ha sido la insuficiente separación de xilosa y ácido xilónico. La utilización de una resina de intercambio de catión de ácido débil no proporciona ningún beneficio cuando se trata de resolver el problema. En el método de separación se requieren dos etapas. En la primera etapa, la resina de intercambio de catión se utiliza preferiblemente en la forma de catión alcalino-térreo, más preferiblemente en la forma de  $Mg^{2+}$  y en la segunda etapa, la resina de intercambio de catión está preferiblemente en la forma de metal alcalino (por ejemplo, sodio). Sin embargo, se ha encontrado también que la separación de monosacáridos es insatisfactoria ya que eluyen los otros monosacáridos casi al mismo tiempo de retención que la xilosa. El pH del proceso era bajo. La resina en una forma divalente parecía separar la xilosa más eficazmente que la resina en una forma monovalente.

La publicación PCT/F100/00350 describe resinas de polímero sulfonatado, especialmente resinas de intercambio de ión y la preparación de tales resinas. El polímero es un copolímero de estireno/divinilbenceno, resina de intercambio

## ES 2 316 476 T3

de catión fuertemente ácida. El agente de reticulación puede ser también isopreno, metacrilato de alilo, metacrilato de vinilo, metacrilato de glicol o diacrilato de glicol. Según la publicación PCT/F100/00350, la resina de polímero sulfonatado se puede utilizar como resina cromatográfica, resina de intercambio de ión o como resina catalizadora.

5 La Patente estadounidense 4 359 430 describe un procedimiento para recuperación de betaina de fuentes naturales tales como melazas de remolacha, melazas de residuos y vinazas. El procedimiento utiliza una columna cromatográfica de resina de intercambio de catión de ácido fuerte en la forma metal alcalino, siendo el sodio el metal alcalino generalmente preferido. En el proceso se utiliza agua como eluyente. El proceso da por resultado tres fracciones. La primera fracción es una fracción de desecho no azúcar, la segunda es una fracción que contiene azúcar y la tercera  
10 fracción consiste substancialmente en betaína.

La publicación de Patente internacional WO 96/10650 describe un método para tratar una solución que contiene sacarosa derivada de remolacha para obtener una fracción enriquecida en sacarosa y una fracción enriquecida con un  
15 segundo compuesto orgánico, especialmente tal como betaína, inosita, rafinosa, galactinol o serina y otros aminoácidos. Se utiliza un intercambiador de catión de ácido fuerte preferiblemente en la forma de sodio o potasio para la separación de las fracciones. Por la Patente finlandesa No. 960225 se conoce también un método para fraccionamiento de melazas por utilización de un intercambiador de catión de ácido fuerte.

Se han utilizado resinas de intercambio de anión para separar fructosa de glucosa. Y Takasaki (*Agr. Biol. Chem.* 36 (1972) páginas 2575-77) y B. Lindberg y col. (*Carbohydr. Res.* 5 (1967), páginas 286-291) describen la utilización de un intercambiador de anión en forma de bisulfito para la separación de azúcares. Se utiliza agua como eluyente. Sin embargo, la utilización de resinas de intercambio de anión no da por resultado una buena separación de xilosa debido a que la xilosa queda solapada por otros azúcares. No ha sido sugerida la separación de ramnosa. La separación de fructosa y glucosa por intercambiador de anión en forma de bisulfito o sulfito se conoce también por la Patente FR-  
25 2.117.558.

La Patente estadounidense No. 5.084.104 describe un método para la separación de xilosa desde solución rica en pentosa, por ejemplo de madera de abedul. Se emplea una columna cromatográfica que comprende una resina de intercambio de anión de base fuerte. La resina de intercambio de anión está en forma de sulfato. Utilizando este  
30 método, la xilosa se retarda muy fuertemente, pero los otros monosacáridos eluyen más rápidamente.

Se conoce un método para preparar L-arabinosa por la publicación de Patente internacional WO 99/57326 donde el procedimiento se caracteriza por el contacto de fibras vegetales con un ácido para hidrolizar las fibras bajo condiciones tales que se obtienen selectivamente los ingredientes de L-arabinosa contenidos en las fibras de las plantas. La Patente estadounidense número 4.880 919 describe un procedimiento para separar arabinosa de las mezclas de monosacáridos que contienen arabinosa y otras aldopentosas y aldohexosas por adsorción sobre resinas de poliestireno sulfonadas de intercambio de ión reticuladas con divinil benceno en las formas  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{NH}_4^+$  y desorción del adsorbato con agua. Un procedimiento para producción de L-arabinosa cristalina es el descrito en la Patente estadounidense No. 4.816 078.

La preparación de arabinosa está descrita también en la Patente estadounidense 4.664.718, en cuyo método la arabinosa se separa de la mezcla de monosacáridos que contiene también otras aldopentosas y aldohexosas. El material de alimentación se pone en contacto con zeolita tipo-Y-calcio o zeolita tipo-X-calcio y la arabinosa es adsorbida selectivamente. La desorción se lleva a cabo con agua o etanol.

La publicación DE 3545107 describe un método para preparación de ramnosa de goma arábiga. Se utiliza una resina de intercambio de catión fuertemente ácida para separación del azúcar, y la ramnosa se purifica por adsorción con carbón activado. La arabinosa se separa también con este método.

Barker S.A. y col. (*Carbohydrate Research* 26 (1973 55-64) han descrito la utilización de resinas de ácido (poli(4-vinilbencenoborónico) en el fraccionamiento e interconversión de hidratos de carbono. En el método se utiliza agua como eluyente. Se obtuvo el mejor rendimiento de fructosa cuando el pH era alto. Las resinas han sido utilizadas para desplazar el pseudo-equilibrio establecido en álcali acuoso entre D-glucosa, D-fructosa y D-manosa para dar D-fructosa.

CN1234404 describe métodos para la separación de un azúcar desde licores de fermentación y se emplea una resina de intercambio de catión de ácido débil como una de las etapas de separación, el licor se hace pasar a través de tres clases de resinas de intercambio de ión. La primera resina separa cationes, la segunda separa aniones y la tercera resina separa ácidos débiles.

La Patente JP09127090 describe métodos de separación de azúcares. Se rellena una columna con dos tipos de medios: uno consiste en polímeros acrílicos que contienen grupos COOH. La separación se consigue utilizando dos grupos funcionales diferentes en la misma columna.

La Patente estadounidense 4359430 describe métodos para la separación de betaína de sacarosa y no azúcares, utilizando resina de catión fuertemente ácida.

La Patente estadounidense 4075406 describe métodos para la separación de xilosa desde una solución que contiene arabinosa, manosa, galactosa y glucosa utilizando resina de catión fuertemente ácido.

## ES 2 316 476 T3

La Patente estadounidense 4772334 describe métodos para separación de ramnosa, arabinosa y galactosa entre sí utilizando resina de catión fuertemente ácida.

Sorprendentemente se ha encontrado que cuando se utilizan resinas de intercambio de catión débilmente ácidas, se consigue una mejor separación cromatográfica de hidratos de carbono. Además de otras características, el orden de separación parece ser afectado por las interacciones hidrófobas/hidrófilas de hidratos de carbono con resina y el resultado es una separación mejorada de los hidratos de carbono. Otras características comúnmente conocidas en la separación cromatográfica de hidratos de carbono sobre resinas de intercambio de ión incluyen, por ejemplo, exclusión por iones y exclusión por tamaños. Si la resina está en la forma hidrófila, los monosacáridos más hidrófobos parecen eluir los primeros y los más hidrófilos los últimos. Esto da por resultado un orden de elución diferente que el encontrado previamente.

### Compendio de la invención

Los objetos mencionados antes, se consiguen con la presente invención en la que se utiliza una resina de intercambio de catión débilmente ácida para separar cromatográficamente monosacáridos, disacáridos u oligo-sacáridos. Preferiblemente, la resina de intercambio de ión utilizada es un intercambiador acrílico de catión de ácido débil con un grupo funcional carboxílico reticulado con aproximadamente 1 a aproximadamente 20%, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 8% de divinilbenceno. La resina está en la forma  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  y se pueden utilizar también otras formas de ión. Esta clase de resina ha demostrado ser más eficaz que las ensayadas anteriormente, por ejemplo las resinas de matriz de poliestireno. Esto parece afectar también al hecho de que las resinas de base aromática son más hidrófobas que las resinas de base acrílica.

La resina de intercambio de catión débilmente ácida se utiliza para la separación de hidratos de carbono *unos de otros, en particular monosacáridos entre sí, disacáridos y/u oligosacáridos; sacáridos hidrófobos tales como desoxi-, metil- y anhidroazúcares, así como alcoholes de anhidro-azúcares de sacáridos más hidrófilos y/o azúcares hexosa y pentosa y alcoholes de azúcares entre sí.* Preferiblemente, la resina de intercambio de catión de ácido débil se utiliza para la separación de monosacáridos hidrófobos tales como desoxi-, metil- y anhidro-azúcares y alcoholes de azúcares de sacáridos más hidrófilos. Lo más preferible es utilizar la resina de intercambio de catión débilmente ácida para separar sacáridos del grupo de hexosas, tales como cetohexosas, aldohexosas, pentosas tales como cetopentosas, aldopentosas los azúcares y alcoholes de azúcares correspondientes y mezclas de ellos, por ejemplo glucosa, fructosa, ramnosa, anhidrosorbita, sorbita, eritrita, inosita, arabinosa, xilosa y xilita. También se pueden separar ventajosamente soluciones que contienen sacarosa, betaina y aminoácido. La resina de intercambio de catión débilmente ácida se utiliza también para separación de anhidro-azúcares de los correspondientes azúcares, separando alcoholes de anhidro-azúcares de los correspondientes alcoholes de azúcares, separación de azúcares, alcoholes de azúcares y sus formas anhidras de sales y para separar eritrita de inosita. Cuando la resina está en la forma hidrófila, parece que eluyen primero los monosacáridos más hidrófobos y parece que los monosacáridos más hidrófilos se eluyen los últimos. Esto parece afectado por las interacciones hidrófilas/hidrófobas de la resina y los componentes.

Los materiales de partida que contienen los hidratos de carbono antes mencionados, hidrolizados y extractos de plantas o materiales de partida obtenidos por conversión de los mismos que contienen los hidratos de carbono antes mencionados para los que se utiliza el intercambiador de catión de ácido débil son, por ejemplo, corrientes de proceso, corrientes de proceso de xilosa, corrientes de proceso de sacarosa, corrientes basadas en almidón o sacarosa, por ejemplo corrientes de proceso de maltosa, glucosa o fructosa o sus corrientes de proceso secundarias.

La resina de intercambio de catión débilmente ácida antes descrita se utiliza en una columna cromatográfica. La resina se emplea en una columna cromatográfica a temperaturas de 10 a 95°C, preferiblemente de 40 a 95°C, más preferiblemente de 60 a 95°C. Se sabe que una temperatura de separación más alta hace disminuir la viscosidad y mejora la realización de la separación de los azúcares.

El eluyente utilizado en la separación cromatográfica es agua, por ejemplo, desmineralizada o agua condensada o cualquier otra solución acuosa, alcohol o una mezcla de ellos. Preferiblemente, el eluyente es agua.

El orden de elución de los monosacáridos de la presente invención es diferente del orden de elución obtenido anteriormente utilizando resinas de base fuerte en forma de bisulfito o sulfato o utilizando resinas de intercambio de catión de ácido fuerte. Como ejemplo preferido de la invención, se puede separar la ramnosa antes de monosacáridos más hidrófilos. Esto permite recuperar la ramnosa con un buen rendimiento como fracción altamente purificada. Cuando se separan betaína, eritrita e inosita, los hidratos de carbono se separan en el orden citado después de betaína. Si se separa la ramnosa de otros monosacáridos, es ventajoso que la ramnosa eluya primero. Si se separan la eritrita e inosita de una solución que contiene betaína, es ventajoso que la eritrita se separe antes de la inosita.

### Breve descripción de las figuras

Las Figuras siguientes son ilustrativas de modos de realización de la invención y no significan un límite del alcance de la invención.

La Figura 1 es una representación gráfica de los perfiles de elución y pH obtenidos en el Ejemplo 1.

## ES 2 316 476 T3

La Figura 2 es una representación gráfica de los perfiles de elución y pH obtenidos en el Ejemplo 2.

La Figura 3 es una representación gráfica de los perfiles de elución y pH obtenidos en el Ejemplo 3.

5 La Figura 4 es una representación gráfica de los perfiles de elución y pH en el Ejemplo 4.

La Figura 5 es una representación gráfica de los perfiles de elución y pH obtenidos en el Ejemplo 5.

10 La Figura 6 es una representación gráfica de los perfiles de elución y pH obtenidos en el Ejemplo 6.

La Figura 7 es una representación gráfica de los perfiles de elución y pH obtenidos en el Ejemplo 7.

### Descripción detallada

15 Se somete una solución que contiene hidratos de carbono a una separación cromatográfica. La separación se lleva a cabo en una columna de separación cromatográfica. La columna cromatográfica se rellena con una resina de intercambio de catión débilmente ácida.

20 La resina utilizada en la columna cromatográfica es, adecuadamente, un intercambiador de catión acrílico débilmente ácido que tiene grupos funcionales carboxílicos. La resina de intercambio de catión acrílica débilmente ácida deriva del grupo que consiste en ésteres acrilato, como acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de butilo y metacrilato de metilo o acrilonitrilo o ácidos acrílicos o mezclas de ellos. El esqueleto de la resina puede ser también distinto a acrílico. El grupo funcional activo puede ser también distinto al grupo carboxílico, por ejemplo puede seleccionarse de otros ácidos débiles. La resina acrílica de intercambio de catión se reticula con un compuesto del grupo que  
25 consiste en reticulador aromático, como divinil benceno o con un reticulador alifático como isopreno, 1,7-octadieno, trivinilciclohexano, éter divinílico de etilen glicol. El grado de reticulación de la resina es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20%, preferiblemente aproximadamente 3 a aproximadamente 8% de divinilbenceno. El tamaño medio de partícula de la resina de intercambio de catión débilmente ácida es de 10 a 2000 micras, preferiblemente de 100 a 400 micras. La resina puede ser regenerada, principalmente en la forma  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ . También se  
30 pueden emplear otras formas de ión.

La solución de hidratos de carbono que se va a fraccionar opcionalmente se trata previamente, primero por filtración que puede ser hecha utilizando un filtro a presión y tierra de diatomeas como material filtrante. La solución de alimentación se ajusta, opcionalmente, a pH de 1 a 11, preferiblemente de 2 a 10, más preferiblemente de 2 a 4 y de  
35 5 a 10, por ejemplo, con solución de hidróxido de sodio. Después de esto se puede filtrar opcionalmente la solución antes de la separación cromatográfica.

Se ajusta también el contenido de la sustancia seca de la solución de alimentación a un nivel apropiado antes de la separación cromatográfica.

40 Se puede utilizar un dispositivo para la alimentación de la solución a la superficie del lecho de resina. El flujo de la solución puede ser descendente o ascendente, siendo preferido el descendente. La temperatura de la columna y solución de la alimentación y la solución de alimentación y eluyente es 10 a 95°C., preferiblemente 40 a 95°C y lo más preferiblemente aproximadamente preferiblemente de 60 a 95°C. Esto se consigue por pre-calentamiento de  
45 la solución. El eluyente utilizado es agua o disolvente. El agua puede ser, por ejemplo, agua desmineralizada o agua condensada. El disolvente puede ser una solución acuosa o alcohol o una mezcla de ellos. Preferiblemente el eluyente es agua para una separación eficaz.

La solución de alimentación eluye en la columna por alimentación con agua precalentada, por ejemplo, agua desmineralizada o agua condensada o una solución acuosa o alcohol, o una mezcla de ellos. La velocidad de flujo en la columna se ajusta a un nivel apropiado.

55 Las fracciones de la solución resultante se recogen a intervalos apropiados y se analiza opcionalmente la composición de las fracciones. Se puede hacer el seguimiento de las corrientes resultantes empleando instrumentos en línea.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención. No se dan como limitativos de las reivindicaciones en manera alguna:

60 Ejemplo 1

*Separación cromatográfica del drenado de cristalización de xilosa con una resina de la forma  $H^+/Mg^{2+}$*

65 Se sometió a separación cromatográfica el drenado de cristalización de xilosa, que estaba basado en madera de haya originalmente de licor de cocción basado en Mg. La separación se llevó a cabo en una columna de separación cromatográfica de laboratorio como un proceso discontinuo. La columna, de 0,045 m de diámetro, se relleno con una resina acrílica de intercambio de catión de ácido débil (Finex™ CA 12 GC) fabricada por Finex Oy, Finlandia. La resina era una resina basada en acrilato de etilo. La altura del lecho de resina era de aproximadamente 0,70 m. El

## ES 2 316 476 T3

grado de reticulación de la resina era de 6,0% de DVB (divinilbenceno) y el tamaño medio de partícula de la resina era de 0,26 mm. La resina se regeneró en la forma principalmente de H<sup>+</sup> (94%) y parcialmente en la forma de Mg<sup>2+</sup> (6%) y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte de encima del lecho de resina. La temperatura de la columna y la solución de alimentación y agua eluyente era de aproximadamente 65°C. La velocidad de flujo de la columna se ajustó a 4 ml/minuto.

La separación cromatográfica se llevó a cabo de la manera siguiente.

- Etapa 1: Se ajustó la sustancia seca de la solución de alimentación a 25 g sustancia seca en 100 g de solución según el índice de refracción (RI) de la solución. El pH de la solución de alimentación era de 3,5.
- Etapa 2: Se bombearon 100 ml de solución de alimentación precalentada a la parte de encima del lecho de resina.
- Etapa 3: Se eluyó la solución de alimentación descendentemente en la columna por alimentación con agua intercambiada en ión pre-calentada a la parte de arriba de la columna.
- Etapa 4: Se recogieron muestras de 10 ml de la solución resultante a intervalos de 3 minutos. Se analizó la composición de las muestras con equipo de HPLC Dionex con detector electroquímico pulsante y columna de intercambio de anión CarboPac PA1<sup>TM</sup> (agua y NaOH 0,2 M como eluyentes)

La resina da una buena separación de ramnosa de otros monosacáridos. La arabinosa y la ramnosa son eluidas al final del perfil de separación. El pH del efluente está entre 3 y 4. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 1.

### Ejemplo 2

*Separación cromatográfica de anhidrosorbita (1,4-anhidro-D-glucita) y sorbita con una resina de forma Na<sup>+</sup>*

Se sometió una solución que contenía anhidrosorbita (1,4-anhidro-D-glucita) y sorbita a separación cromatográfica. La solución se preparó por disolución de anhidrosorbita pura y sorbita en agua intercambiada de ión. La separación se llevó a cabo en una columna de separación cromatográfica de laboratorio como un procedimiento discontinuo. La columna, con un diámetro de 0,045 m, se relleno con una resina acrílica de intercambio de catión débilmente ácida (Finex<sup>TM</sup> CA 12 GC) fabricada por Finex OY, Finlandia. La resina estaba basada en acrilato de etilo. La altura de la resina era aproximadamente 0,70 m. El grado de reticulación de la resina era de 6% de DVB y el tamaño medio de partícula de la resina era 0,26 mm. La resina estaba en la forma Na<sup>+</sup>. El pH de la resina era alto después del proceso de manufactura. Se colocó un dispositivo de alimentación en la parte de encima del lecho de resina. La temperatura de la columna y solución de alimentación y agua eluyente era de aproximadamente 65°C. La velocidad de flujo en la columna se ajustó a 4 ml/min.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

- Etapa 1: Se ajustó la sustancia seca de la solución de alimentación a 25 g de sustancia seca en 100 g de solución según el índice de refracción (RI) de la solución. La solución de alimentación estaba compuesta de 50% sobre sustancia seca (DS) de anhidrosorbita y 50% sobre DS de sorbita
- Etapa 2: Se bombearon 100 ml de solución de alimentación precalentada a la parte de encima del lecho de resina.
- Etapa 3: Se eluyó la solución de alimentación descendentemente en la columna por alimentación con agua intercambiada en ión pre-calentada a la parte alta de la columna.
- Etapa 4: Se recogieron muestras de 10 ml de la solución resultante a intervalos de 3 minutos. Se analizó la composición de las muestras con HPLC (resina de la forma Pb<sup>2+</sup>, 0,6 ml/minutos, eluyente agua a 85°C).

Los componentes se eluyeron desde la columna en el siguiente orden: anhidro-sorbita y sorbita. El orden de elución aparece como consistente con la naturaleza hidrófoba/hidrófila de los componentes. El pH del efluente era entre 7,5 y 11. Los componentes de la resina se separaban bien entre sí. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 2.

### Ejemplo 3

*Separación cromatográfica de sacarosa, glucosa y fructosa con una resina de la forma Na<sup>+</sup>*

Se sometió una solución que contenía sacarosa, glucosa y fructosa a una separación cromatográfica. La solución se preparó por disolución de sacarosa, glucosa y fructosa puras en agua intercambiada en ión. La separación se llevó a cabo en una columna de separación cromatográfica de laboratorio como un procedimiento discontinuo. La columna,

## ES 2 316 476 T3

de 0,045 m de diámetro, se rellenó con una resina acrílica de intercambio de catión de débilmente ácida (Finex™ CA 12 GC) fabricada por Finex Oy, Finlandia. La resina era una resina basada en acrilato de etilo. La altura de la resina era de aproximadamente 0,70 m. El grado de reticulación de la resina era 6% de DVB y el tamaño medio de partícula de la resina era 0,26 mm. La resina estaba en la forma Na<sup>+</sup>. El pH de la resina era alto después del proceso de manufactura. Se colocó un dispositivo de alimentación en la parte de encima del lecho de resina. La temperatura de la columna y la solución de alimentación y el agua eluyente era de aproximadamente 65°C. La velocidad de flujo de la columna se ajustó a 4 ml/minuto.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

Etapa 1: Se ajustó la sustancia seca de la solución de alimentación a 25 g de sustancia seca en 100 g de solución según el índice de refracción (RI) de la solución. La solución de alimentación estaba compuesta de 33% sobre sustancia seca (DS) de sacarosa, 33% sobre DS de glucosa y 33% sobre DS de fructosa.

Etapa 2: Se bombearon 100 ml de solución de alimentación precalentada a la parte de encima del lecho de resina.

Etapa 3: Se eluyó la solución de alimentación descendentemente en la columna por alimentación con agua intercambiada en ión pre-calentada a la parte alta de la columna.

Etapa 4: Se recogieron muestras de 10 ml de la solución resultante a intervalos de 3 minutos. Se analizó la composición de las muestras con HPLC (resina de la forma Na<sup>+</sup>, 0,6 ml/minutos, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,003 M 85°C).

La sacarosa eluyó primero desde la columna como pico separado. La glucosa y fructosa eluyeron juntas como un segundo pico después de la sacarosa. La resina dio una buena separación entre sacarosa y monosacáridos. El pH del effluente estaba entre 9 y 11. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 3.

### Ejemplo 4

#### *Separación cromatográfica de cloruro de sodio, betaína, eritrita e inosita con resina de forma Na<sup>+</sup>*

Se sometió una solución que contenía betaína, eritrita, inosita y cloruro de sodio (NaCl) a una separación cromatográfica. La solución se preparó por disolución de betaína, eritrita e inosita y cloruro de sodio, puros, en agua intercambiada de ión. La separación se llevó a cabo en una columna de separación cromatográfica como un proceso discontinuo. La columna, de 0,045 m de diámetro, se rellenó con una resina acrílica de intercambio de catión débilmente ácida (Finex™ CA 12 GC) fabricada por Finex OY, Finlandia. La resina era una resina basada en acrilato de etilo. La altura del lecho de resina era de aproximadamente 0,70 m. El grado de reticulación de la resina era 6% de DVB y el tamaño de partícula de la resina era de 0,26 mm. La resina estaba en la forma Na<sup>+</sup>. El pH de la resina era alto después del proceso de manufactura. Se colocó un dispositivo de alimentación en la parte de encima del lecho de resina. La temperatura de la columna y la solución de alimentación y el agua eluyente era de aproximadamente 80°C. La velocidad de flujo de la columna se ajustó a 4 ml/minuto.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

Etapa 1: Se ajustó la sustancia seca de la solución de alimentación a 25 g de sustancia seca en 100 g de solución según el índice de refracción (RI) de la solución. La solución de alimentación estaba compuesta de 30% sobre sustancia seca (DS) de betaína, 30% sobre DS de inosita, 30% sobre DS de eritrita y 10% sobre DS de cloruro de sodio

Etapa 2: Se bombearon 100 ml de solución de alimentación precalentada a la parte de encima del lecho de resina.

Etapa 3: Se eluyó la solución de alimentación descendentemente en la columna por alimentación con agua intercambiada en ión pre-calentada a la parte alta de la columna.

Etapa 4: Se recogieron muestras de 10 ml de la solución resultante a intervalos de 3 minutos. Se analizó la composición de las muestras con HPLC (resina de la forma Ca<sup>2+</sup>, 0,8 ml/minuto, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,001 M, 85°C).

Se eluyeron componentes desde la columna en el siguiente orden: cloruro de sodio, betaína, eritrita e inosita. El orden de elución de betaína e hidratos de carbono aparece como consistente con la naturaleza hidrófoba/hidrófila de los componentes. Los componentes se separaban bien de la resina y entre sí. El pH del effluente era entre 6 y 9. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 4.

## ES 2 316 476 T3

### Ejemplo 5

#### *Separación cromatográfica de cloruro de sodio, betaína, sacarosa y manita con una resina de la forma Na<sup>+</sup>*

5 Se sometió a separación cromatográfica una solución que contenía betaína, sacarosa, manita y cloruro de sodio (NaCl). La solución se preparó por solución de betaína, sacarosa, manita y cloruro de sodio, puros, en agua intercambiada de ión. La separación se llevó a cabo en una columna de separación cromatográfica de laboratorio como un proceso discontinuo. La columna, de un diámetro de 0,045 m, se relleno con una resina acrílica de intercambio de catión de débilmente ácida (Finex CA 12 GC) fabricada por Finex OY, Finlandia. La resina era una resina basada en acrilato de etilo, La altura de la de la resina era de aproximadamente 0,65 m. El grado de reticulación de la resina era de 0,6% de DVB y el tamaño medio de partícula de la resina era de 0,26 mm. La resina estaba en la forma Na<sup>+</sup>. El pH de la resina era alto después del proceso de manufactura Se colocó un dispositivo de alimentación en la parte de encima del lecho de resina. La temperatura de la columna y solución de alimentación y agua eluyente fue de aproximadamente 80°C. La velocidad de flujo en la columna se ajustó a 4 ml/minuto.

15 La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

20 Etapa 1: Se ajustó la sustancia seca de la solución de alimentación a 25 g de sustancia seca en 100 g de solución según el índice de refracción (RI) de la solución. La solución de alimentación estaba compuesta de 30% sobre sustancia seca (DS) de betaína, 30% de DS de sacarosa, 30% sobre DS de manita y 10% sobre DS de cloruro de sodio.

25 Etapa 2: Se bombearon 100 ml de solución de alimentación precalentada a la parte de encima del lecho de resina.

Etapa 3: Se eluyó la solución de alimentación descendentemente en la columna por alimentación con agua intercambiada en ión pre-calentada a la parte alta de la columna.

30 Etapa 4: Se recogieron muestras de 10 ml de la solución resultante a intervalos de 3 minutos. Se analizó la composición de las muestras con HPLC (resina de la forma Na<sup>+</sup>, 0,8 ml/minutos, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,003 M 85°C).

35 Primero eluyó cloruro de sodio desde la columna. Eluyeron sacarosa y betaína desde la columna juntas, como un pico, solapando con sales en alguna medida. Eluyó manita desde la columna como un pico separado después de sacarosa y betaína. La manita se separaban bien de la resina, de la manita y betaína. El pH del efluente era entre 7 y 11. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 5.

### Ejemplo 6

#### *Separación cromatográfica de melazas de remolacha con resina de intercambio de catión débilmente ácida*

40 Se sometieron melazas de remolacha a separación cromatográfica. La separación se llevó a cabo en una columna de separación cromatográfica a escala de laboratorio como proceso discontinuo. Se relleno la columna, de 0,045 m de diámetro, con resina acrílica de intercambio de catión débilmente ácida (Finex<sup>TM</sup> CA 16 GC, fabricada por Finex Oy, Finlandia). La resina estaba basada en acrilato de metilo, El grado de reticulación de la resina era 8% de DVB y el tamaño medio de partícula de aproximadamente 0,23 mm. La resina estaba en forma de Na<sup>+</sup> antes de la separación.

45 La altura de la resina era de aproximadamente 0,70 m. El pH de la resina era bastante alto después del proceso de manufactura (pH aproximadamente 9-10). Se colocó un dispositivo de alimentación en la parte de encima del lecho de resina. La temperatura de la columna, solución de alimentación y agua eluyente era de aproximadamente 80°C. La velocidad de flujo en la columna se ajustó a 4 ml/min. La solución de alimentación se filtró antes de la separación. El pH de la solución de alimentación era de aproximadamente 8,2.

50 La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

55 Etapa 1: Se ajustó la sustancia seca de la solución de alimentación a 25 g de sustancia seca en 100 g de solución según el índice de refracción (RI) de la solución.

60 Etapa 2: Se bombearon 100 ml de solución de alimentación precalentada a la parte de encima del lecho de resina.

Etapa 3: La solución de alimentación eluyó descendentemente en la columna por alimentación de agua intercambiada en ión pre-calentada a la parte alta de la columna.

65 Etapa 4: Se recogieron muestras de 10 ml de la solución resultante a intervalos de 3 minutos. Se analizó la composición de las muestras con HPLC (columna en la forma Na<sup>+</sup>, 0,8 ml/minutos, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,003 M, 85°C).



## ES 2 316 476 T3

Primero eluyeron sales de la columna. La sacarosa y la betaina eluyen al mismo tiempo de retención y se solapan con las sales en alguna medida. Los aminoácidos eluyen principalmente en la pendiente trasera del perfil. El pH del efluente está entre 7,5 y 10. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 6. La Tabla 1 muestra la concentración de amino ácidos de las muestras 21 a 39.

TABLA 1

*Concentración de amino ácidos*

| Número de la muestra | g RDS/100 g | Amino ácidos % sobre DS | g amino ácidos/ 100 g |
|----------------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| 21                   | 20,54       | 1,8                     | 0,370                 |
| 23                   | 16,36       | 3,1                     | 0,507                 |
| 25                   | 5,09        | 8,5                     | 0,433                 |
| 26                   | 3,58        | 13,0                    | 0,465                 |
| 27                   | 2,47        | 16,5                    | 0,408                 |
| 29                   | 1,28        | 4,9                     | 0,063                 |

### Ejemplo 7

#### *Separación cromatográfica del drenado de cristalización de fructosa con una resina de forma Na<sup>+</sup>*

El drenado de cristalización de fructosa concentrado y tratado con calor se sometió a separación cromatográfica. La separación se llevó a cabo en una columna de separación cromatográfica de laboratorio como un proceso discontinuo. La columna, con un diámetro de 0,045 m, se relleno con resina acrílica de intercambio de catión débilmente ácida (Finex™ CA 12 GC) fabricada por Finex Oy, Finlandia. La resina era una resina basada en acrilato de etilo. La altura del lecho de resina era de aproximadamente 0,70 m. El grado de reticulación de la resina era del 6% de DVB y el tamaño medio de partícula de la resina era de 0,26 mm. La resina se regeneró en la forma Na<sup>+</sup> y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte de encima del lecho de resina. La temperatura de la columna y solución de alimentación y el agua eluyente era de 60°C. La velocidad de flujo de la columna se ajustó a 4 ml/minuto. El pH de la solución de alimentación se ajustó a 7 con hidróxido de sodio.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

Etapa 1: Se ajustó la sustancia seca de la solución de alimentación a 25 g de sustancia seca en 100 g de solución según el índice de refracción (RI) de la solución.

Etapa 2: Se bombearon 100 ml de solución de alimentación precalentada a la parte de encima del lecho de resina.

Etapa 3: Se eluyó la solución de alimentación descendentemente en la columna por alimentación con agua intercambiada en ión pre-calentada a la parte alta de la columna.

Etapa 4: Se recogieron muestras de 10 ml de la solución resultante a intervalos de 3 minutos. Se analizó la composición de las muestras con HPLC (resina de la forma Na<sup>+</sup>, 85°C, eluyente agua, 0,8 ml/min.).

La fructosa y los oligosacáridos formados en la disociación ácida, térmica de la fructosa se separan bien de la resina. Los oligosacáridos eluyen de la columna más rápidamente que la fructosa. El pH del efluente era entre 6 y 11. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 7.

### Ejemplo 8

#### *Utilización de resinas de base acrílica en cromatografía de líquidos mientras se emplean, como eluyentes, agua desionizada y una solución agua-etanol de 30% en peso aproximadamente*

En un ensayo de cromatografía de líquidos, se utilizaron resinas de base acrílica fabricadas por Finex Oy (Finlandia) reticuladas con DVB (divinilbenceno) como fases estacionarias. Los grados de reticulación de las resinas eran 4% de DVB (CA08GC) y 6% de DVB (CA12GC). El tamaño medio de partículas de las resinas era 375 µm. Se utilizó

## ES 2 316 476 T3

una resina de intercambio de catión de ácido fuerte sulfonatada basada en estireno, (CS08G) del mismo fabricante, que tenía un tamaño medio de partícula de 395  $\mu\text{m}$  como resina de comparación.

5 En los ensayos con la columna se empleó un equipo de cromatografía de líquidos de *Pharmacia Biotech FPLC™*, componiéndose el equipo de una bomba, una columna de vidrio con camisa, con control de temperatura y detector de RI (Índice de refracción) y un ordenador utilizado en la recogida de datos de medida. Se utilizó un detector del índice de refracción *RI-98 SCOPE* en análisis en línea del efluente. La columna de ensayo era una *XX16 de Pharmacia Biotech* con un diámetro de 1,6 cm. Se utilizaron resinas de la forma  $\text{Na}^+$  en los ensayos y aproximadamente 60 ml de resina (resina hinchada con agua) como relleno de la columna. La altura del lecho en agua era de aproximadamente  
10 30 cm.

En los ensayos en la columna se utilizaron como eluyentes agua desionizada y una solución agua-etanol de aproximadamente 30 por ciento en peso, con el aire eliminado al vacío. La velocidad de flujo del eluyente era de 1 ml/minuto en todos los ensayos y los ensayos se llevaron a cabo a una temperatura de 25°C. La columna se equilibró antes de las  
15 medidas por bombeo del citado eluyente a través de ella hasta que la resina quedaba igualada y el nivel de fondo del detector del índice de refracción permanecía constante.

Las muestras utilizadas en las medidas se hicieron con el eluyente utilizado en la operación. El contenido de xilosa ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) y monohidrato de ramnosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) de las soluciones de la muestra era de 70 g/l y se empleó 1,5 g/litro de Azul Dextrano como componente sin retardo. El volumen de muestra era de 0,5 ml. La porosidad del lecho de resina se determinó a partir de los valores de la respuesta pulsada de las marchas con azul Dextrano.

Los parámetros cromatográficos se calcularon por el método de momentos. Antes de calcular los parámetros, se procesaron todos los cromatogramas con el programa *Jandel Scientific Fit v4 program*, por medio del cual se corrigió el nivel del fondo de las curvas y se eliminó el pico negativo causado por etanol. Las constantes de la división y el factor de separación de xilosa y ramnosa se calcularon a partir de las respuestas pulsadas como sigue:

$$30 \quad K_i = \frac{V_i - V_{BD}}{V_s} = \frac{\left( \frac{V_i}{v_n} - \frac{z\varepsilon}{v_n / (\pi r^2)} - \frac{V_i}{2v_n} \right)}{\frac{z(1-\varepsilon)}{v_n / (\pi r^2)}} \quad (1)$$

35 donde

- $K_i$  = la constante de distribución del subtipo i
- 40  $V_i$  = el volumen de retención del subtipo i
- $V_{BD}$  = el volumen de retención del subtipo sin retardar (Azuk Dextrano (BD))
- $V_s$  = volumen de fase estacionaria
- 45  $v_n$  = velocidad de flujo del eluyente
- $z$  = altura de fase estacionaria
- 50  $\varepsilon$  = porosidad
- $r$  = radio de columna
- $V_i$  = volumen de la muestra suministrada

$$55 \quad \alpha_{i/j} = \frac{V_i - V_{BD}}{V_j - V_{BD}}$$

60 donde

- $\alpha_{i/j}$  = factor de separación de subtipo i con respecto a subtipo j
- 65  $V_j$  = volumen de retención de subtipo j

## ES 2 316 476 T3

TABLA 2

| 5  | Resina | Eluyente       | Z<br>cm | $\epsilon$<br>- | $K_{ram}$ | $K_{xil}$ | $\alpha_{ram/xil}$ |
|----|--------|----------------|---------|-----------------|-----------|-----------|--------------------|
|    | CA08GC | Agua           | 29,2    | 0,34            | 0,39      | 0,56      | 1,44               |
| 10 |        | EtOH 29,3%peso | 18,4    | 0,35            | 0,60      | 1,14      | 1,89               |
|    | CA12GC | Agua           | 30,0    | 0,34            | 0,25      | 0,42      | 1,66               |
|    |        | EtOH 29,4%peso | 23,3    | 0,34            | 0,53      | 1,03      | 1,95               |
| 15 | CS08G  | Agua           | 29,9    | 0,37            | 0,47      | 0,53      | 1,13               |
|    |        | EtOH 29,3%peso | 26,5    | 0,36            | 0,70      | 0,85      | 1,21               |

20

Los resultados muestran que la adición de etanol al eluyente mejora la separación de xilosa y ramnosa. Los resultados muestran que la resina de intercambio de catión débilmente ácida es mejor para la separación cromatográfica de xilosa y ramnosa que una resina de intercambio de catión de ácido fuerte.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 316 476 T3

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida para la separación cromatográfica de hidratos de carbono entre sí **caracterizada** porque la resina se utiliza para separación en fracciones separadas monosacáridos entre sí, disacáridos y/o oligosacáridos desoxi-, metil- y anhidro-azúcares y alcoholes de azúcares desde sacáridos más hidrófilos; y/o azúcares hexosa y pentosa y alcoholes de azúcares unos de otros.
- 10 2. La utilización de una resina de intercambio de catión según la reivindicación 1 **caracterizada** porque la resina es una resina acrílica de intercambio de catión débilmente ácida.
- 15 3. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 **caracterizada** porque la resina acrílica deriva del grupo que consiste en éster acrilato o acrilonitrilo o ácidos acrílicos o mezclas de ellos.
- 20 4. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 3 **caracterizada** porque el éster acrilato se selecciona del grupo que consiste en metacrilato de metilo y acrilato de butilo.
- 25 5. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizada** porque la resina está en la forma  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ .
- 30 6. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizada** porque la resina está reticulada con un reticulador aromático, tal como divinilbenceno (DVB) o con un reticulador alifático tal como isopreno, 1,7-octadieno, trivinilciclohexano o éter divinílico de dietilén glicol.
- 35 7. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 6 **caracterizada** porque el grado de reticulación de la resina es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20% en peso de DVB.
- 40 8. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 7 **caracterizada** porque el grado de reticulación de la resina es de aproximadamente 3 a aproximadamente 8% en peso de DVB.
- 45 9. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 **caracterizada** porque el tamaño medio de partícula de la resina es de 10 a 2000 micras.
- 50 10. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 9 **caracterizada** porque el tamaño medio de partícula de la resina es de 100 a 400 micras.
- 55 11. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 **caracterizada** porque el pH de la solución de alimentación es de 1 a 11.
- 60 12. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 11 **caracterizada** porque el pH de la solución de alimentación es de 2 a 10.
- 65 13. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 11 **caracterizada** porque el pH de la solución de alimentación es de 2 a 4 o de 5 a 10.
- 70 14. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 **caracterizada** porque la temperatura de la columna, la solución de alimentación y el eluyente es de 10 a 95°C.
- 75 15. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 14 **caracterizada** porque la temperatura de la columna, la solución de alimentación y el eluyente es de 40 a 95°C.
- 80 16. La utilización de una resina de intercambio de catión de débilmente ácida según la reivindicación 15 que se **caracteriza** porque la temperatura de la columna, solución de alimentación y eluyente es de 60 a 95°C.
- 85 17. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 **caracterizada** porque el eluyente se selecciona del grupo que consiste en agua, un alcohol, y mezclas de ellos.
- 90 18. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 17 **caracterizada** porque el eluyente es agua.
- 95 19. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque los hidratos de carbono que se van a separar son azúcares y alcoholes de azúcares.
- 100 20. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque los anhidro-azúcares se separan de los azúcares correspondientes.

## ES 2 316 476 T3

21. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque los alcoholes de anhidro-azúcares se separan de los correspondientes alcoholes de azúcares.

5 22. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque los hidratos de carbono que se van a separar son monosacáridos.

23. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque el monosacárido es L-ramnosa.

10 24. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque los hidratos de carbono que se van a separar son disacáridos u oligosacáridos.

15 25. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque los hidratos de carbono que se van a separar se seleccionan del grupo que consiste en hexosas, tales como cetohehexosas, aldohexosas, pentosas, tales como cetopentosas, aldopentosas, los correspondientes azúcares y alcoholes de azúcares y mezclas de ellos, por ejemplo, glucosa, fructosa, ramnosa, anhidrosorbita, sorbita, eritrita, inosita, arabinosa, xilosa y xilita.

20 26. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde la betaína y amino ácidos se separan de los hidratos de carbono.

27. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque los azúcares, alcoholes de azúcares y sus correspondientes formas anhidras se separan de sales.

28. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque los azúcares, alcoholes de azúcares y sus correspondientes formas anhidras se separan de sustancias iónicas.

30 29. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 27 o la reivindicación 28 que se **caracteriza** porque los componentes sacarosa y no-azúcares se recuperan en la separación de melazas de remolacha.

35 30. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 29 **caracterizada** porque cuando la melaza es sometida a separación se recuperan los componentes azúcar y no azúcar.

31. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 30 **caracterizada** porque se separan los amino ácidos con la fracción sacarosa.

40 32. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según la reivindicación 31 **caracterizada** porque la manita se separa de la betaína, sacarosa y sales.

45 33. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque se separa la fructosa de los disacáridos y los oligosacáridos.

34. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 **caracterizada** porque se separan los monosacáridos de los oligosacáridos.

50 35. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque los monosacáridos se separan de los disacáridos.

36. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque se separa la sacarosa de la fructosa y glucosa.

55 37. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque se separan eritrita, inosita y manita de la betaína.

60 38. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque se separa la eritrita de la manita.

39. La utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 **caracterizada** porque se separan los hidratos de carbono hidrófilos de los hidratos de carbono hidrófobos.

65

Separacion cromatografica del drenado de cristalización de xilosa

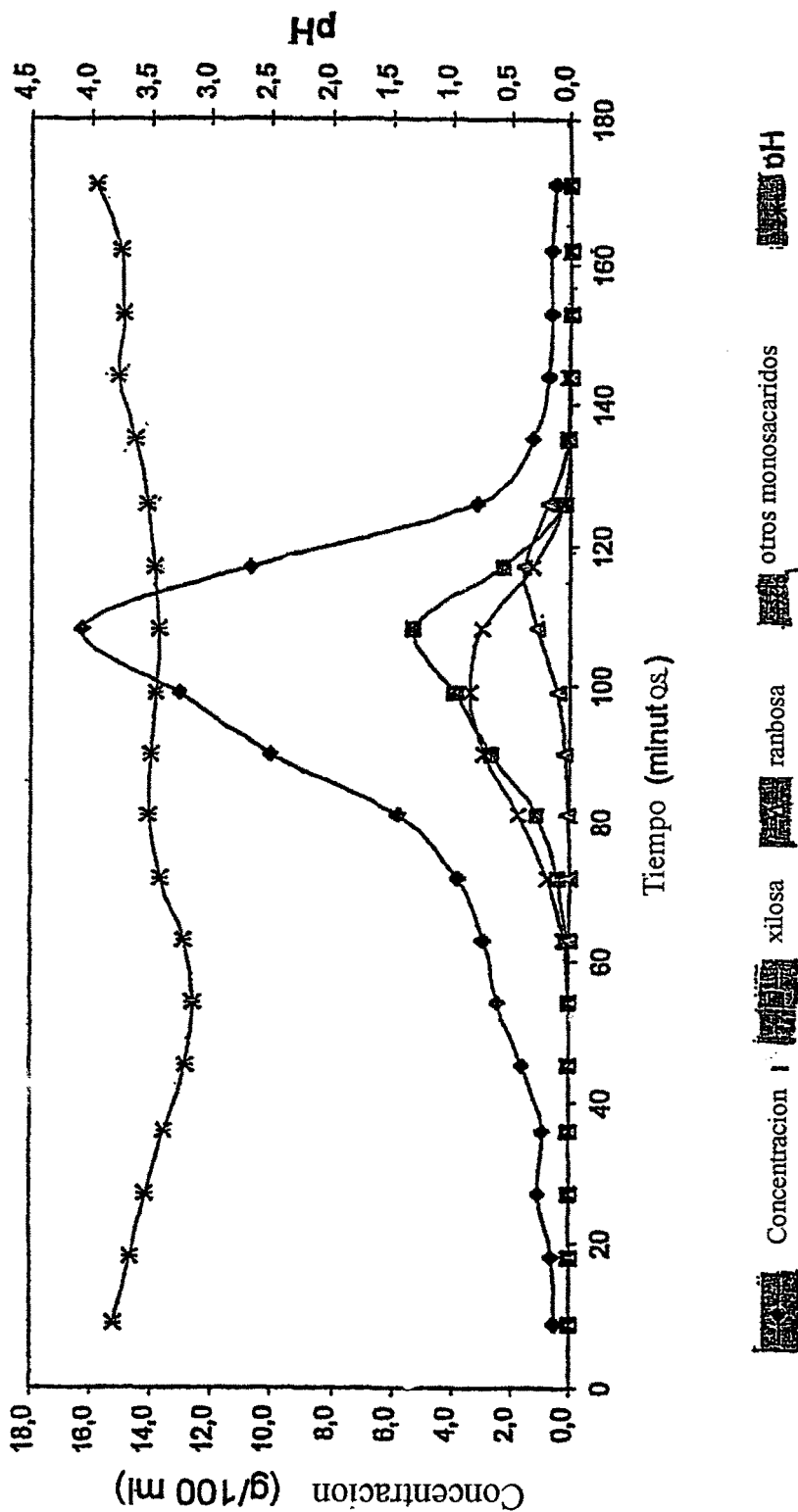


FIG. 1

Separacion cromatografica de anhídrosorbita y sorbita

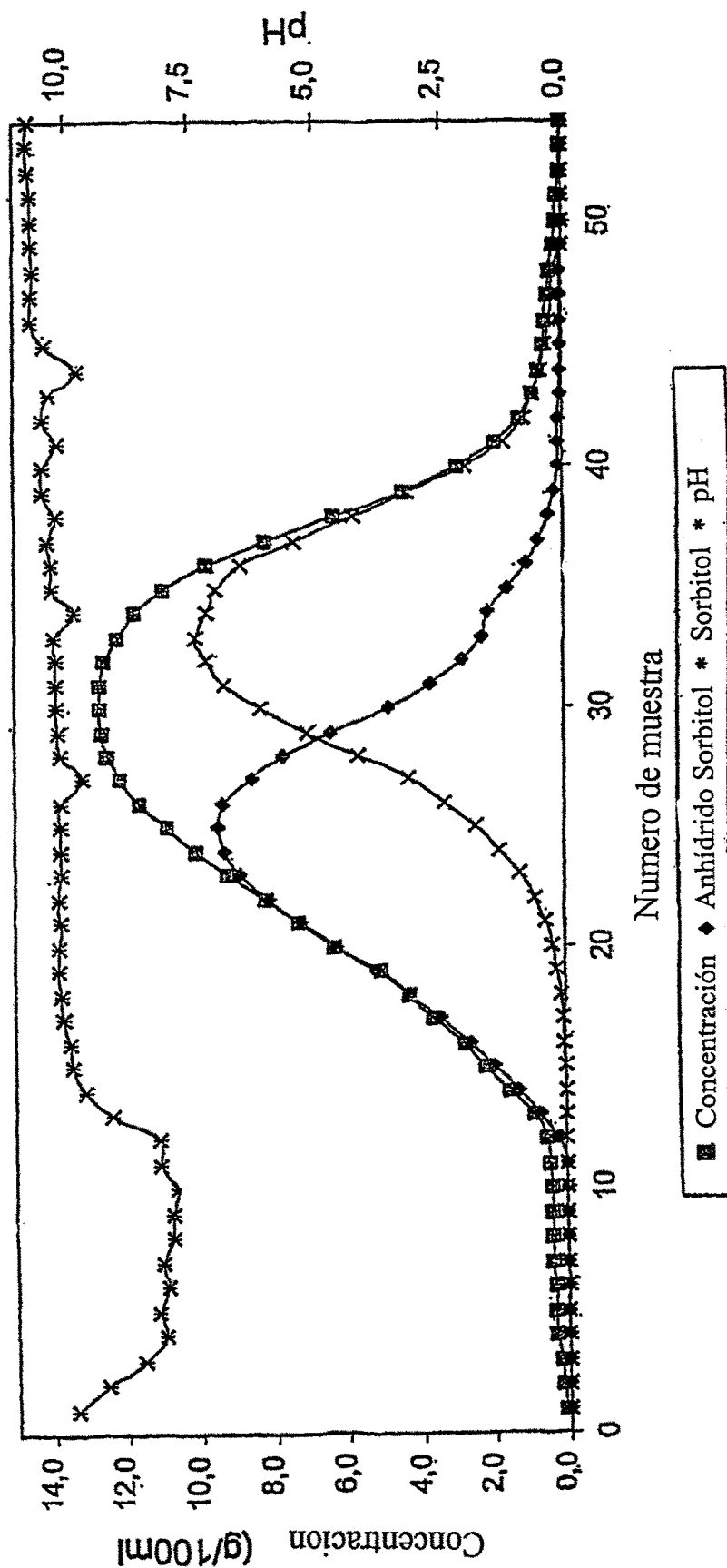


FIG. 2

Separacion cromatografica de sacarosa, glucosa y fructosa

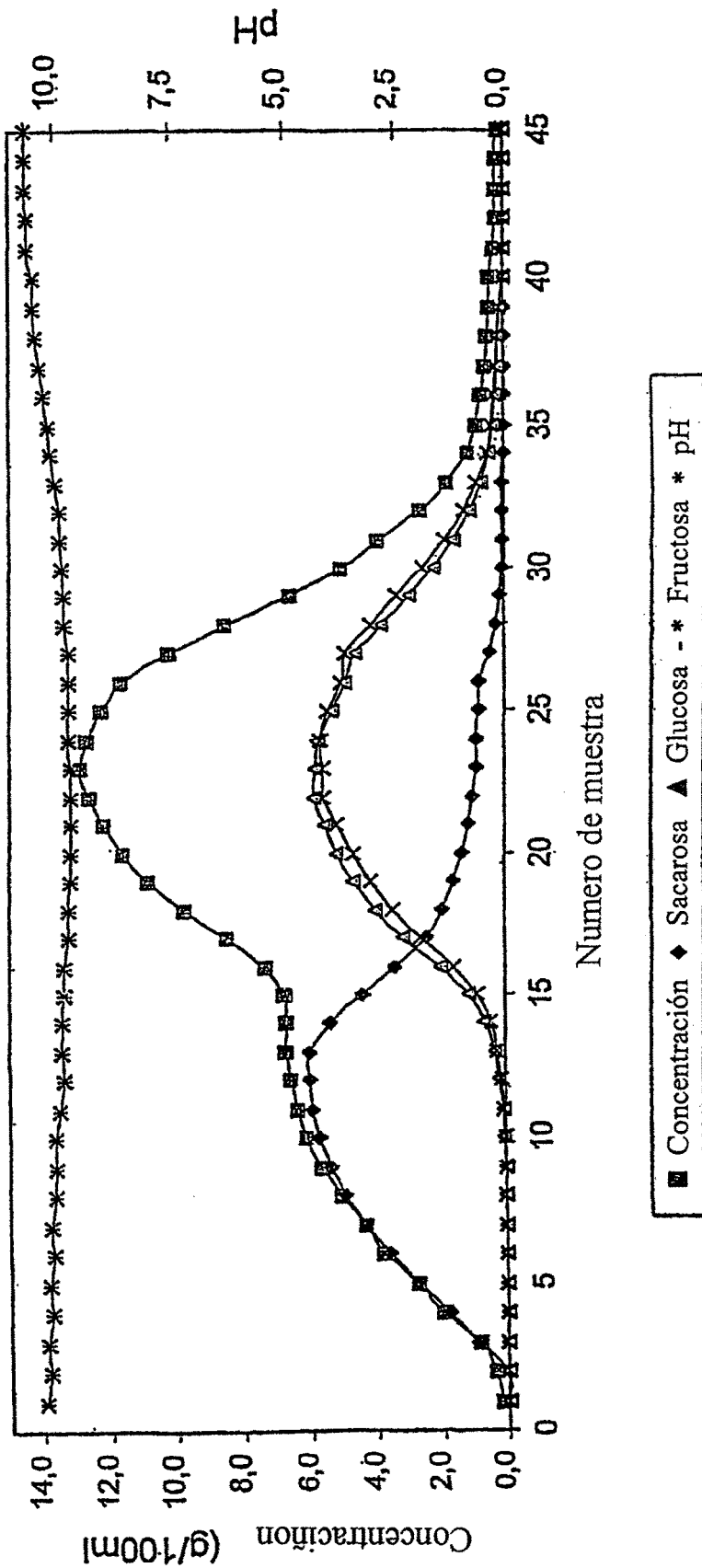


FIG. 3



Separacion cromatografica de betaina, eritrina e inosita

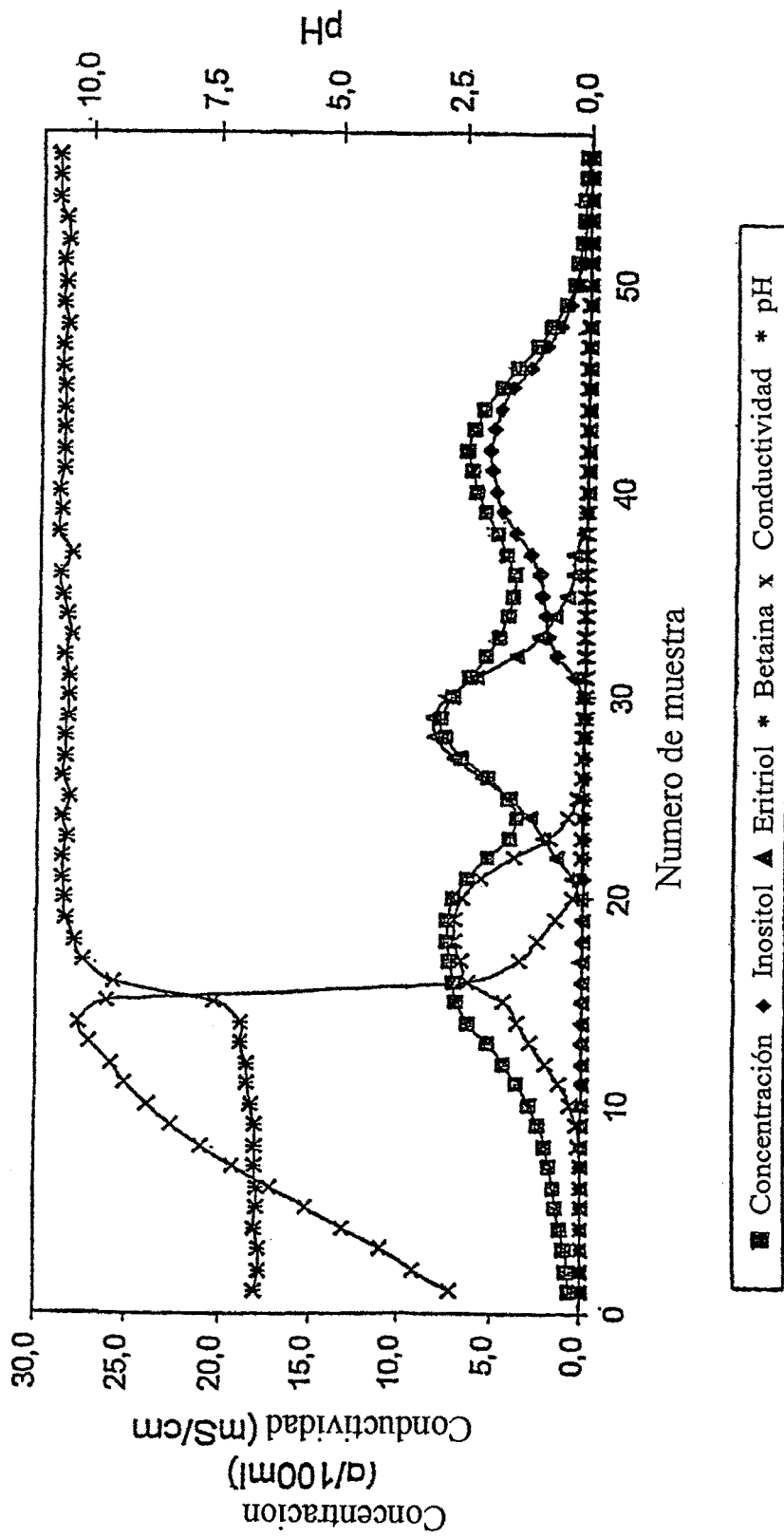


FIG. 4

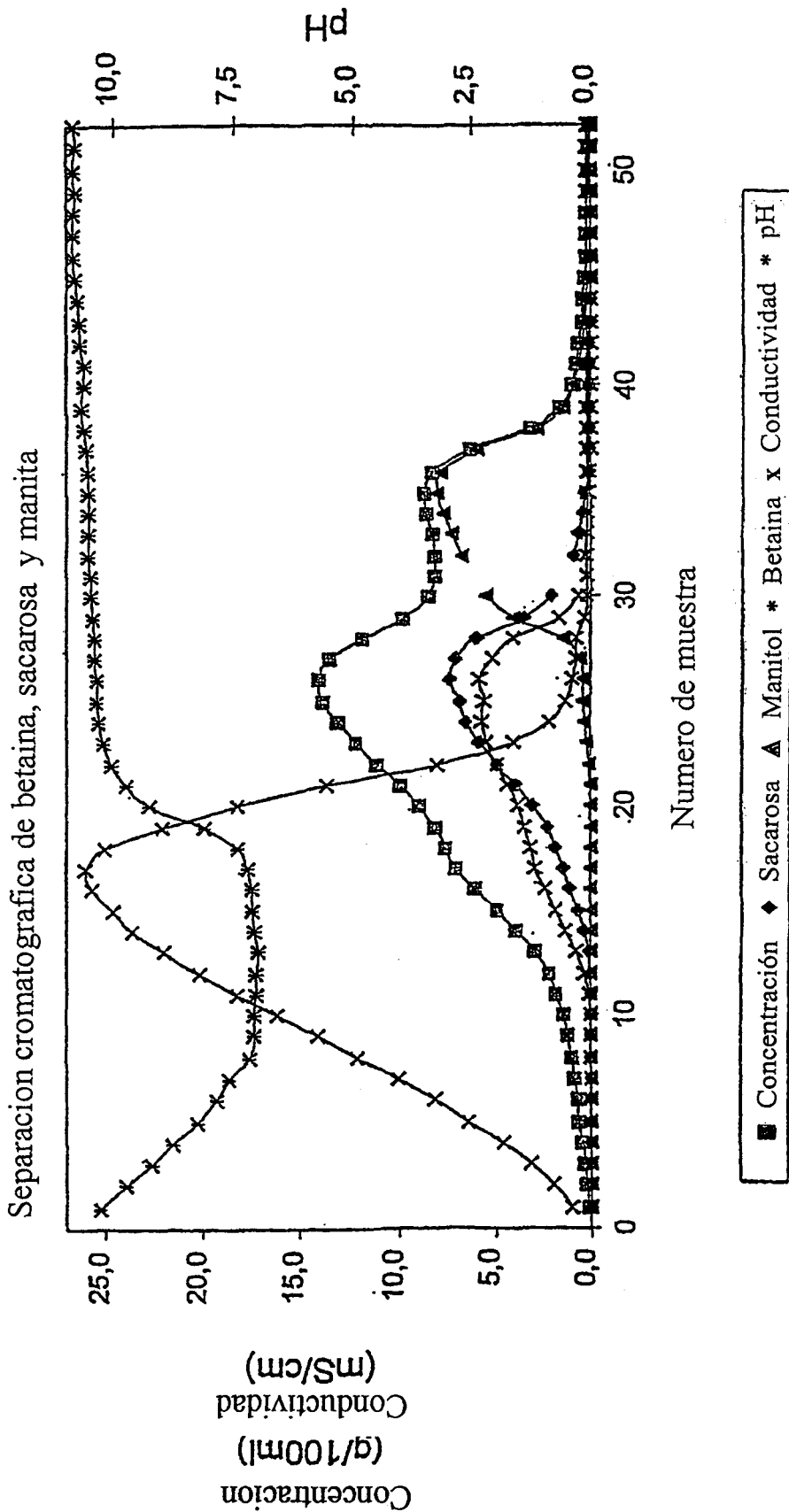


FIG. 5

Separacion cromatografica de melazas de remolacha

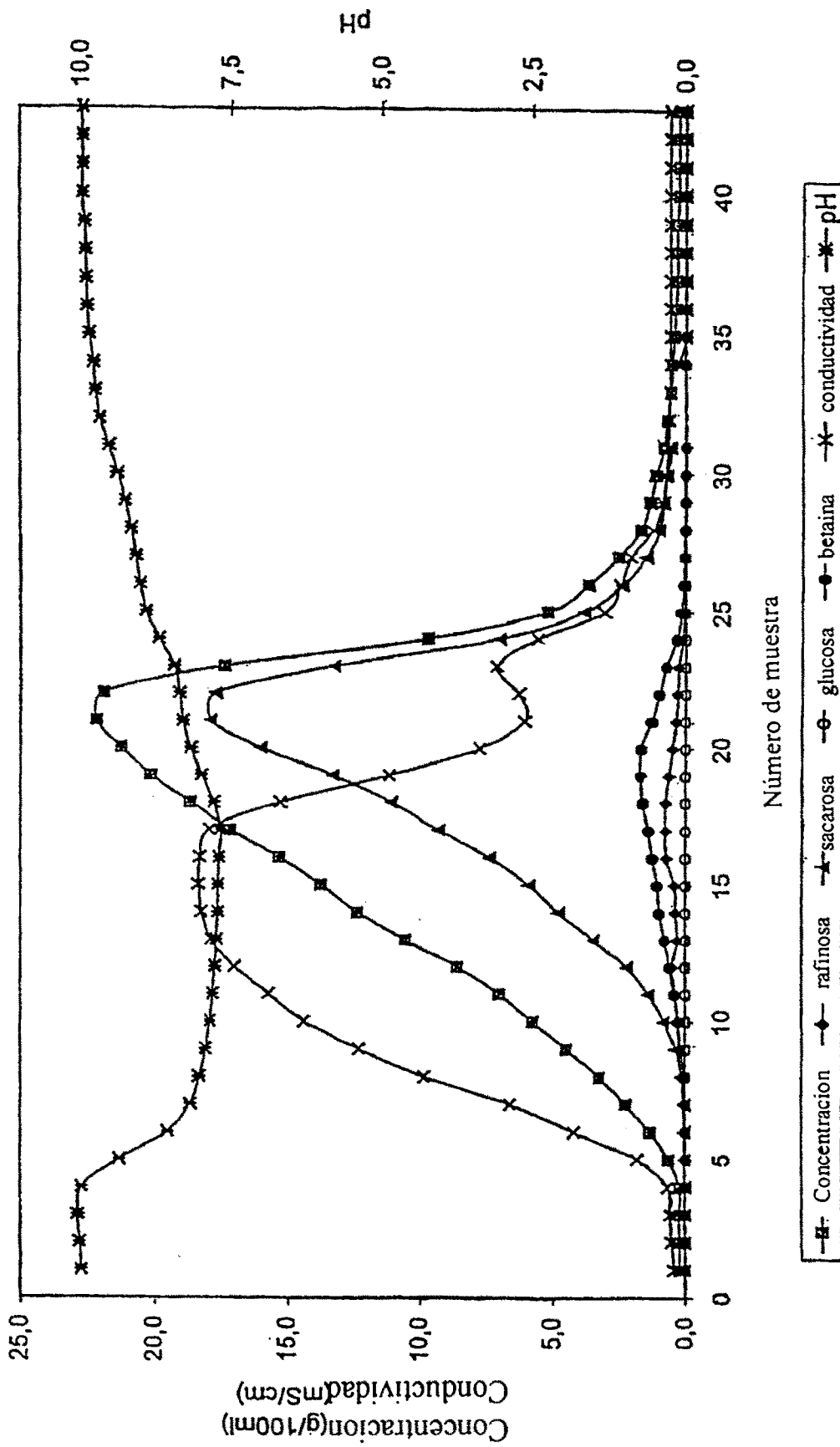


FIG. 6

Efluente de cristalización de fructosa de separación cromático

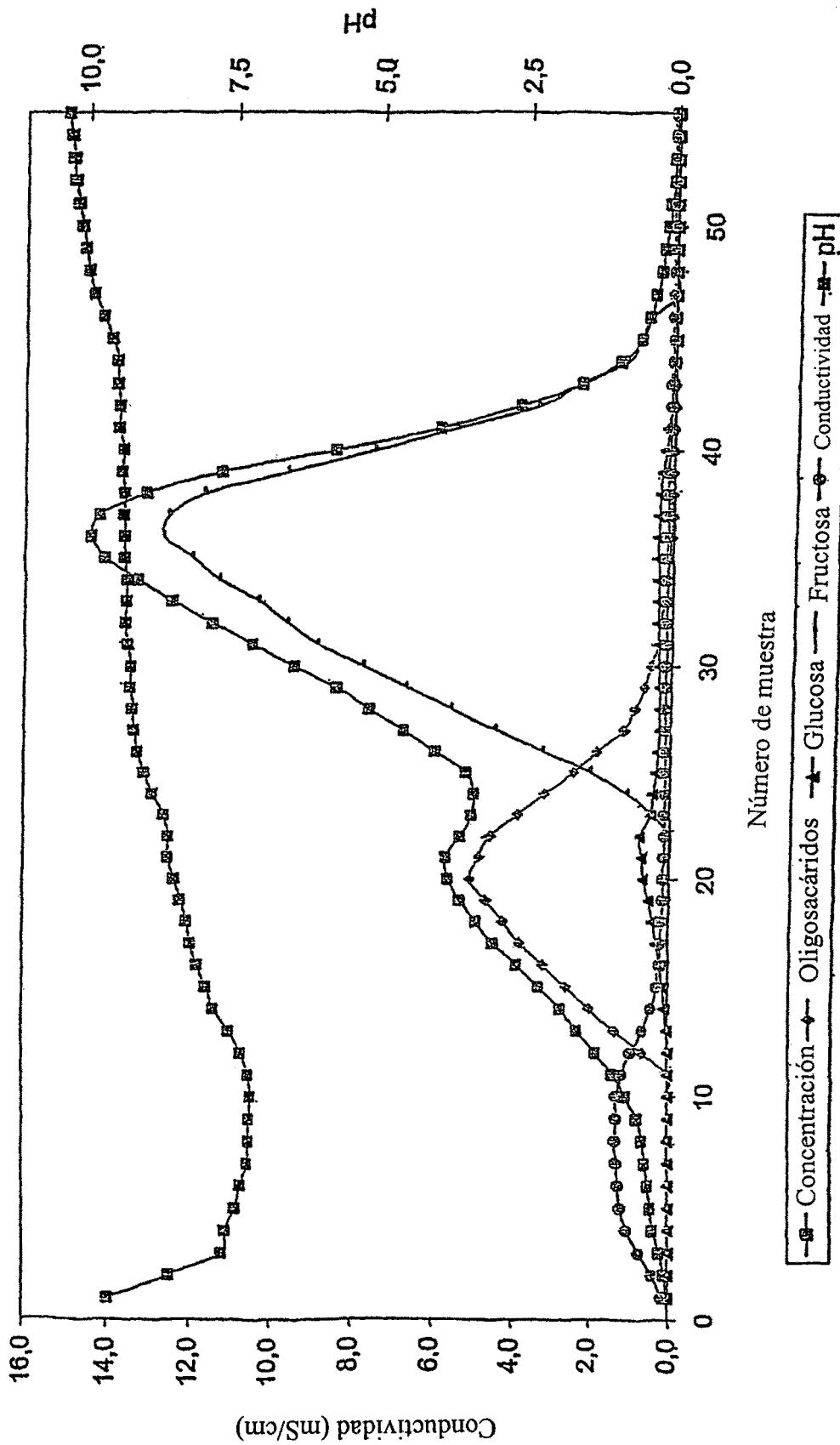


FIG. 7