

# Separace sacharidů kontinuální SMB chromatografií (část 2.)

CARBOHYDRATE SEPARATION USING CONTINUOUS SMB CHROMATOGRAPHY (PART 2)

Simona Gillarová, Svatopluk Henke, Zdeněk Bubník, Pavel Kadlec  
Ústav sacharidů a cereálií, VŠCHT Praha

Článek vychází z literárního přehledu prací zabývajících se SMB chromatografií, tak jak byl vypracován v teoretické části disertační práce GILLAROVÉ (1) a navazuje na předchozí článek, zahrnující aktuální aplikace kontinuálního SMB chromatografického procesu při separaci sacharidů (2).

## Separace a produkce vzácných cukrů

Komerčně atraktivní integrovanou operací je spojení biotransformace a SMB chromatografie při výrobě vzácných cukrů a kyseliny sialové. Implementace SMB systému do katalyzovaného reaktoru rapidně zvyšuje výtěžky požadovaných produktů. První taková implementace byla výroba D-psikosu (D-allulosa) (3), využitelné jako nízkoeenergetické sladidlo do potravin a nápojů. D-psikosu lze vyrobit katalyzovanou reakcí D-fruktosy pomocí D-tagatosa-3-epimerasy. Bylo zjištěno, že v případě využití integrovaného procesu (obr. 1.), skládajícího se z SMB systému ÄKTAbasic-10 (GE Healthcare, Švédsko), enzymatického membránového reaktoru a nanofiltrační (NF-90) membránové jednotky, lze zvýšit výtěžek produkce D-psikosu z 25 % (při klasické výrobě v samotném reaktoru) na 97 % s absolutní čistotou produktu  $\geq 99,5$  %. Kolony (150 mm  $\times$  7 mm) zmíněné SMB jednotky byly naplněny sorbentem DOWEX 50 WX4-400 v H<sup>+</sup> formě (Sigma Aldrich, Švýcarsko), který byl konvertován po dobu 1 h do Ca<sup>2+</sup> formy roztokem 300 mM CaCl<sub>2</sub>.

## Separace fruktooligosacharidů

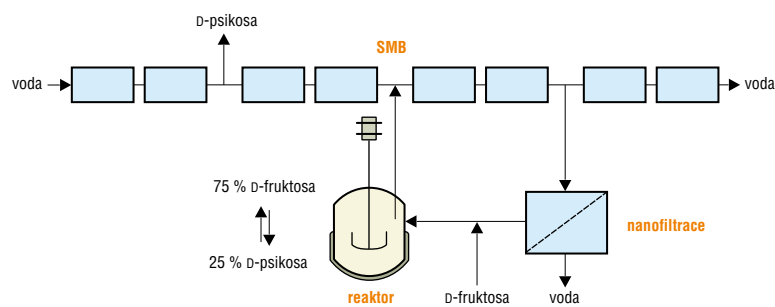
Fruktooligosacharidy (FOS) lze získávat SMB separací přímo v rafinátovém proudě, kdy další mono- a disacharidy ve směsi se separují do extraktivního proudě (4). SMB systém skládající se z 12 kolon byl naplněn kationtově výměnným sorbentem Amberlite CR1320Ca (DuPont, dříve Rohm and Haas) s velikostí částic 320  $\mu$ m. Separace probíhala při 60 °C a maximální koncentrace sacharidů se pohybovala až do 450 g·l<sup>-1</sup>. Kromě maximální produktivity FOS v rafinátu s čistotou 90 % a výtěžkem větším než 95 % byly dalšími výkonnostními kritérii spotřeba eluentu a zředění produktu. Pro modelování optimálních výsledků byly využívány simulace v softwaru Aspen Chromatography, použitá data pro kontinuální separaci byla získána již z předešlé práce (5), kde se měřila adsorpční rovnováha pro produkci FOS na čtyřech typech sorbentů – Dowex Monosphere 99CA/320, Lewatit S 2568, Amberlite CR1320Ca a Diaion UBK 530. Byly získány jednosložkové lineární izotermie pro fruktosu a glukosu a vícesložkové izotermie pro

FOS (kestosu, nystosu a fruktofuranosylnystosu). Výjimkou byla sacharosa, která byla upravena za využití konkávní izotermie. Jednotlivé separace fruktooligosacharidů byly porovnány na základě kapacity a selektivity použitých sorbentů. Chromatograficky lze získat FOS též z fermentovaných zápar (6). Bylo zjištěno, že nejlepšího separačního výkonu je dosaženo za použití komerčního katexového sorbentu Diaion UBK535Ca. Získaný výtěžek FOS činil 92 % o čistotě 90 %. Nastavená teplota se pohybovala přibližně kolem 25 °C, výkon separace však ovlivňovala minimálně.

## Separace galaktooligosacharidů

Galaktooligosacharidy (GOS) jsou charakterizovány jako nestravitelné oligosacharidy udržující růst prospěšných bakterií v tlustém střevě, hlavně *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Na trhu vystupují GOS jako prebiotikum, které pozitivně ovlivňuje imunitní systém, a také mají vliv na snížení rizika rakoviny tlustého střeva. GOS jsou přirozenou součástí mateřského mléka a jsou tedy důležitou součástí kojenecké výživy. Příprava GOS z laktosy (či syrovátky) probíhá enzymatickou transgalaktosylační reakcí pomocí  $\beta$ -galaktosidasy (laktasy, E.C 3.2.1.23), která je houbového nebo mikrobiálního původu. Výsledná směs obsahující GOS různých délek a vedlejších produktů, jako jsou zbytky nezreagované laktosy, glukosa či galaktosa, mohou být separovány pomocí chromatografie nebo membránové separace

Obr. 1. Výrobní schéma integrovaného biotransformačního procesu D-psikosu



Pramen: GILLAROVÁ (1)

Obr. 2. Celkový pohled na chromatografickou stanici KCHS-SMB-8-ND (34)



(konkrétně nanofiltrace). Kromě toho existuje velká poptávka po produktech s nízkým obsahem laktosy. Purifikační proces je zaměřen na získání GOS s obsahem  $\leq 1\%$  laktosy a zároveň na jejich vysoké výtěžky a čistotu. Zvolený chromatografický SMB systém CSEP® C9116 (Knauer, Německo) v jednoduché konfiguraci 1:1:1:1 byl založen na předběžných preparativních experimentech, kdy bylo vyzkoušeno několik sorbentů v kationtové formě ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) s ohledem na velikost částic. Pro následnou SMB jednotku byl vybrán polystyren-divinylbenzenový sorbent v původní  $H^+$  formě, konkrétně Nucleogel Sugar 810H (Macherey-Nagel, Německo). Během SMB separace byl porovnáván vliv teploty (30, 45 a 60 °C), koncentrace nástříku (50, 75, 125  $g \cdot l^{-1}$ ) a také různé varianty operačního režimu („open loop“, „closed loop“, „3 zones“). GOS frakce s čistotou  $\geq 99,5\%$  byly získány v rafinátovém výstupním proudu a zbylé sacharidy (disacharidy, glukosa a galaktosa) v extrakčním proudu. Zvolený systém potvrdil vysoký potenciál pro průmyslové využití (7–9).

### Separace laktosy a oligosacharidů

Separaci laktosy ze směsi dalších oligosacharidů na kontinuální SMB jednotce je možno provádět z lidského mléka (10), kde množství laktosy se přibližně pohybuje kolem 70  $g \cdot l^{-1}$  a slouží jako zásobárna energie pro kojence. Účelem této separace je získat čistou laktosu z obtížně separovatelné směsi oligosacharidů za účelem identifikace biologických funkcí. Separace probíhala na SMB jednotce Licosep-LAB-SMB 12  $\times$  26 1040 (Novasep, Francie) o konfiguraci 1:3:3:1 za použití dvou odlišných stacionárních gelových fází, a to na základě vytěšňovací

chromatografie (sorbent HW40C s velikostí částic 50–100  $\mu m$  a porozitou 50 Å, 1 Å =  $10^{-10}$  m) a iontově výměnné chromatografie (sorbent MCI gel CK08P v  $Ca^{2+}$  formě s velikostí částic 75–150  $\mu m$ ). Výsledná koncentrace čisté laktosy v extraktu dosahovala  $>96\%$  na obou sorbentech. Avšak za použití sorbentu MCI gel CK08P bylo dosaženo vyššího výtěžku laktosy v extraktu v rozmezí 90–110  $g \cdot d^{-1}$ , zatímco v případě HW40C bylo dosaženo pouhých 24–28  $g \cdot d^{-1}$ . Nicméně i přes tento nízký výtěžek byla pro další využití preferována vytěšňovací chromatografie z hlediska stabilnějších podmínek pro SMB proces a dosažení vysokých čistot a reprodukovatelnosti produktů.

### Separace enantiomerů

Vývoj chirální separace pomocí SMB chromatografie se stal nedílnou a významnou součástí farmaceutického průmyslu. Kontinuální SMB chromatografie prokázala slibné využití při výrobě léků a separaci enantiomerů, kdy je dosaženo vyšší produktivity a čistoty za současného snížení spotřeby rozpouštědla.

Důkazem je aplikace SMB chromatografie při separaci D- a L-methioninu za použití nové chirální stacionární fáze založené na imobilizaci makrocyclického glykopeptidového eremomycinu (11), kde byl důraz kladen nejen na čistotu a výtěžek, ale i na stabilitu stacionární fáze. Experimenty na SMB stanici byly prováděny za lineárních i nelineárních podmínek na základě výsledků adsorpčních izoterm a rovnovážné teorie. Ve výstupním rafinátovém proudu byl získáván L-methionin s čistotou 85–99 % a v extraktu D-methionin, jehož nižší čistota kolísala podle očekávání v rozmezí 65–96 %. Byl prokázán velký potenciál této metody pro preparativní separaci enantiomerů.

Na základě výzkumů v oblasti separace epoxidových enantiomerů (12–15) a izomerů 1,1'-bi-2-naftolu (16, 17) byla rovněž rozvedena oblast modelování a simulací chirální separace SMB systému z hlediska vlivů odporů proti přenosu hmoty (18). Porovnání SMB technologie s konvenční kapalinovou chromatografií bylo taktéž provedeno na podobném tématu separace epoxidů (19). Hlavní výhodou využití SMB chromatografie byla opět potvrzena výrazně nižší spotřeba mobilní fáze. Separaci enantiomerů zpracovávají i další autoři (20, 21). Další chirální SMB separace zahrnují například produkci stereoizomeru nandolu (22), analgetika tramadolu (23), nesteroidních protizánětlivých léků ketoprofenu (24), flurbiprofenu (25) a ibuprofenu (26).

### Izolace betainu z melasy

Získávání betainu z řepné melasy chromatografickou SMB metodou bylo patentováno HEIKILOU (27), kdy SMB proces pracuje minimálně se třemi kolonami, které jsou většinou naplněny silně kyselými katexy gelového typu s monovalentním vázaným iontem, a to buď  $Na^+$  nebo  $K^+$ . Betain i sacharosa jsou eluovány simultánně během jednoho pracovního cyklu. Izolace betainu z melasy je též předmětem patentu (28). Na téma purifikace melasy či jiných řepných šťáv a izolace bioaktivních látek z těchto cukrovarnických produktů existuje celá řada studií a publikací jako například (29–32). Separaci technických cukerných roztoků pomocí SMB je možné provádět na jednotce s 8 kolonami, experimentálně byly ověřeny vhodné provozní podmínky této stanice na modelových směsných roztocích sacharosa/KCl a sacharosa/betain pro další průmyslové aplikace (33).

### Kontinuální chromatografická separační stanice na Ústavu sacharidů a cereálií VŠCHT Praha

Kontinuální chromatografická separační stanice KCHS-SMB-8-ND byla vyvinuta na Ústavu sacharidů a cereálií VŠCHT Praha ve spolupráci s firmami Mikropur, s. r. o., Hradec Králové a Deltima Precision, s. r. o., Praha (obr. 2.). Původní verze stanice byla v roce 2007 doplněna solenoidovými ventily a vybavena počítačovým řídicím systémem (WinCC) navrženým a realizovaným Ústavem počítačové a řídicí techniky VŠCHT Praha a poté v roce 2012 novým distributorem toků, který zajišťuje širší rozsah kontinuálních režimů (34).

Na této stanici je možné odzkoušet separace sacharidů na různých sorbentech. Původně byla stanice navržena pro frakcionaci melasy s cílem získat frakce bohaté na sacharosu a betain (33), separovány dále byly i vodné roztoky obsahující sacharosu/KCl či sacharosu/betain (33), glukosu/betain, glukosu/mannosu, galaktooligosacharidy ze syrovátky, galaktosu/mannosu (1), případně mannitol od dalších sacharidů (35) a odbarvování cukerných šťáv (36).

### Souhrn

V článku je zpracován literární přehled prací zabývajících se SMB chromatografií. Jsou shrnuty trendy a aktuální aplikace kontinuálního SMB chromatografického procesu, zejména při separaci a produkci vzácných cukrů, separaci fruktooligosacharidů, separaci galaktooligosacharidů, separaci laktosy a oligosacharidů, separaci enantiomerů a izolaci betainu z melasy. V závěru článku je představena kontinuální chromatografická separační stanice, na níž je možno odzkoušet separaci sacharidů a dalších látek.

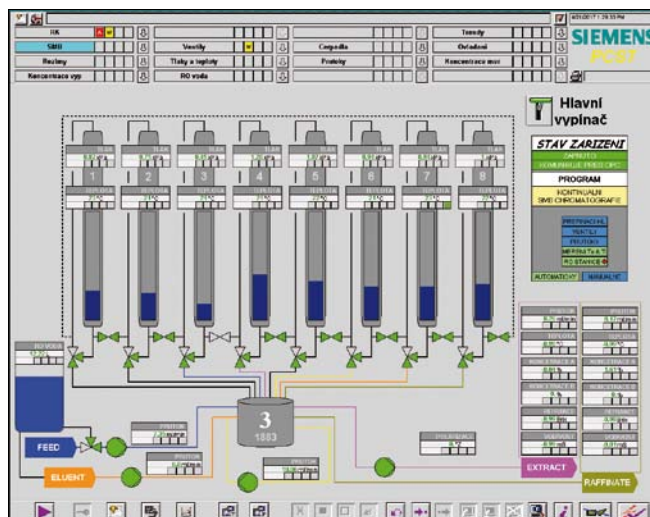
**Klíčová slova:** kontinuální SMB chromatografie, separace, fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, enantiomery, betain.

### Literatura

- GILLAROVÁ, S.: *Separace směsí v potravinářských výrobcích užitím kontinuální chromatografie*. Praha, 2021, 270 s., Disertační práce na Ústavu sacharidů a cereálií FPBT VŠCHT v Praze.
- WAGNER, N. ET AL.: Integrated operation of biotransformation and SMB separation for the high-yield synthesis of rare sugars. *New Biotechnol.*, 29, 2012, s. S211.
- VAŇKOVÁ, K.; POLAKOVIČ, M.: Design of Fructooligosaccharide Separation Using Simulated Moving-Bed Chromatography. *Chem. Eng. Technol.*, 35, 2012 (1), s. 161–168.
- GRAMBLIČKA, M.; POLAKOVIČ, M.: Adsorption Equilibria of Glucose, Fructose, Sucrose, and Fructooligosaccharides on Cation Exchange Resins. *J. Eng. Chem. Data*, 52, 2007 (2), s. 345–350.
- NOBRE, C.; SUVAROV, P.; DE WEIRELD, G.: Evaluation of commercial resins for fructo-oligosaccharide separation. *New Biotechnol.*, 31, 2014 (1), s. 55–63.
- WIŚNIEWSKI, L.; ANTOSOVA, M.; POLAKOVIC, M.: Simulated moving bed chromatography separation of galacto-oligosaccharides. *Acta Chimica Slovaca*, 6, 2013 (2), s. 206–210.
- VERA, C. ET AL.: Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 2016 (12), s. 197, DOI: 10.1007/s11274-016-2159-4.
- MUELLER, I.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; HAMEL, C.: Simulated-moving-bed technology for purification of the prebiotics galacto-oligosaccharides. *Sep. Purif. Technol.*, 271, 2021, s. 118829.
- GEISSER, A. ET AL.: Separation of lactose from human milk oligosaccharides with simulated moving bed chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1092, 2005 (1), s. 17–23.

- ZHANG, L. ET AL.: Application of an eremomycin-chiral stationary phase for the separation of DL-methionine using simulated moving bed technology. *J. Chromatogr. A*, 1162, 2007 (1), s. 90–96.
- RODRIGUES, A. E. ET AL.: Separation of enantiomers of 1a,2,7,7a-tetrahydro-3-methoxynaphtha-(2,3b)-oxirane by liquid chromatography: laboratory-scale elution chromatography and modelling of simulated moving bed. *J. Chromatogr. A*, 702, 1995 (1), s. 223–231.
- PAIS, L. S.; LOUREIRO, J. M.; RODRIGUES, A. E.: Modeling strategies for enantiomers separation by SMB chromatography. *AIChE J.*, 44, 1998 (3), s. 561–569.
- PAIS, L. S. S.; LOUREIRO, J. M.; RODRIGUES, A. R. E.: Separation of enantiomers of a chiral epoxide by simulated moving bed chromatography. *J. Chromatogr. A*, 827, 1998 (2), s. 215–233.
- PAIS, L. S. S.; LOUREIRO, J. M.; RODRIGUES, A. R. E.: Chiral separation by SMB chromatography. *Sep. Purif. Technol.*, 20, 2000 (1), s. 67–77.
- PAIS, L. S. S.; LOUREIRO, J. M.; RODRIGUES, A. R. E.: Modeling, simulation and operation of a simulated moving bed for continuous chromatographic separation of 1,1'-bi-2-naphthol enantiomers. *J. Chromatogr. A*, 769, 1997 (1), s. 25–35.
- MINCEVA, M.; PAIS, L. S.; RODRIGUES, A. E.: Cyclic steady state of simulated moving bed processes for enantiomers separation. *Chem. Eng. Process.: Process Intensif.*, 42, 2003 (2), s. 93–104.
- RODRIGUES, A. E.; PAIS, L. S.: Design of SMB Chiral Separations Using the Concept of Separation Volume. *Sep. Sci. Technol.*, 39, 2005 (2), s. 245–270.
- NICOUD, R.-M. ET AL.: Preparative scale enantioseparation of a chiral epoxide: Comparison of liquid chromatography and simulated moving bed adsorption technology. *Chirality*, 5, 1993 (4), s. 267–271.
- QUINONES, I. ET AL.: Modeling of separations by closed-loop steady-state recycling chromatography of a racemic pharmaceutical intermediate. *J. Chromatogr. A*, 867, 2000 (1–2), s. 1–21.
- JERMANN, S. ET AL.: Absence of experimental evidence of a delta-shock in the system phenetole and 4-tert-butylphenol on Zorbax 300SB-C18. *J. Chromatogr. A*, 1425, 2015, s. 116.
- ARAFAH, R. S. ET AL.: Improving the performance of nadolol stereoisomers' preparative separation using Chiralpak IA by SMB chromatography. *Chirality*, 31, 2019 (1), s. 62–71.
- CAVOY, E. ET AL.: Laboratory-developed simulated moving bed for chiral drug separations: Design of the system and separation of Tramadol enantiomers. *J. Chromatogr. A*, 769, 1997 (1), s. 49–57.
- RIBEIRO, A. E. ET AL.: Chiral Separation of Ketoprofen Enantiomers by Preparative and Simulated Moving Bed Chromatography. *Sep. Sci. Technol.*, 46, 2011 (11), s. 1726–1739.

Obr. 3. Hlavní ovládací panel s tlakovým profilem pro kontinuální stanici KCHS-SMB-8-ND (VŠCHT Praha)





24. RIBEIRO, A. E. ET AL.: Chiral separation of flurbiprofen enantiomers by preparative and simulated moving bed chromatography. *Chirality*, 23, 2011 (8), s. 602–611.

25. PEPPER, S. ET AL.: Separation of ibuprofen enantiomers by supercritical fluid simulated moving bed chromatography. *Sep. Sci. Technol.*, 37, 2002 (11), s. 2545–2566.

26. HEIKKILA, H.: *Method for the recovery of betaine from molasses*. 1992. U.S. Pat. no. 5127957.

27. KAMPEN, W. H.: *Continuous process for the recovery of betaine*. 1996. Eur. Pat. no. EP0411780.

28. LAMELOISE, M.-L.; LEWANDOWSKI, R.: Purification of beet molasses by ion-exclusion chromatography: fixed-bed modelling. *J. Chromatogr. A*, 685, 1994 (1), s. 45–52.

29. PAANANEN, H.; KUISMA, J.: Chromatographic separation of molasses components. *Zuckerindustrie*, 125, 2000 (12), s. 978–981.

30. GIACOBELLO, S.; STORTI, G.; TOLA, G.: Design of a simulated moving bed unit for sucrose–betaine separations. *J. Chromatogr. A*, 872, 2000 (1), s. 23–35.

31. BOON, F. ET AL.: Process innovation in the sugar industry: Chromatographic sugar separation using SMB technology. *Zuckerind.*, 132, 2007 (8), s. 634–637.

32. BUBNIK, Z. ET AL.: Application of continuous chromatographic separation in sugar processing. *J. Food Eng.*, 61, 2004 (4), s. 509–513.

33. HENKE, S.; GILLAROVÁ, S.: Kontinuální chromatografická separace. In KADLEC, K.; KMÍNEK, M.; KADLEC, P. (ED): *Měření a řízení chemických, potravinářských a biotechnologických procesů. Díl II. Řízení technologických procesů*. 1. vyd., Ostrava: Key Publishing Ostrava, 2017, s. 238–245, ISBN 978-80-7418-285-3.

34. GILLAROVA, S. ET AL.: Chromatographic separation of mannitol from mixtures of other carbohydrates in aqueous solutions. *Czech J. of Food Sci.*, 39, 2021 (4), s. 281–288.

35. HENKE, S.; HINKOVA, A.; GILLAROVA, S.: Colour Removal from Sugar Syrups. In INAMUDDIN (ED): *Applications of Ion Exchange Materials in Biomedical Industries*. 1<sup>st</sup> ed., Cham: Springer International Publishing, 2019, s. 189–225, ISBN 978-3-030-06082-4.

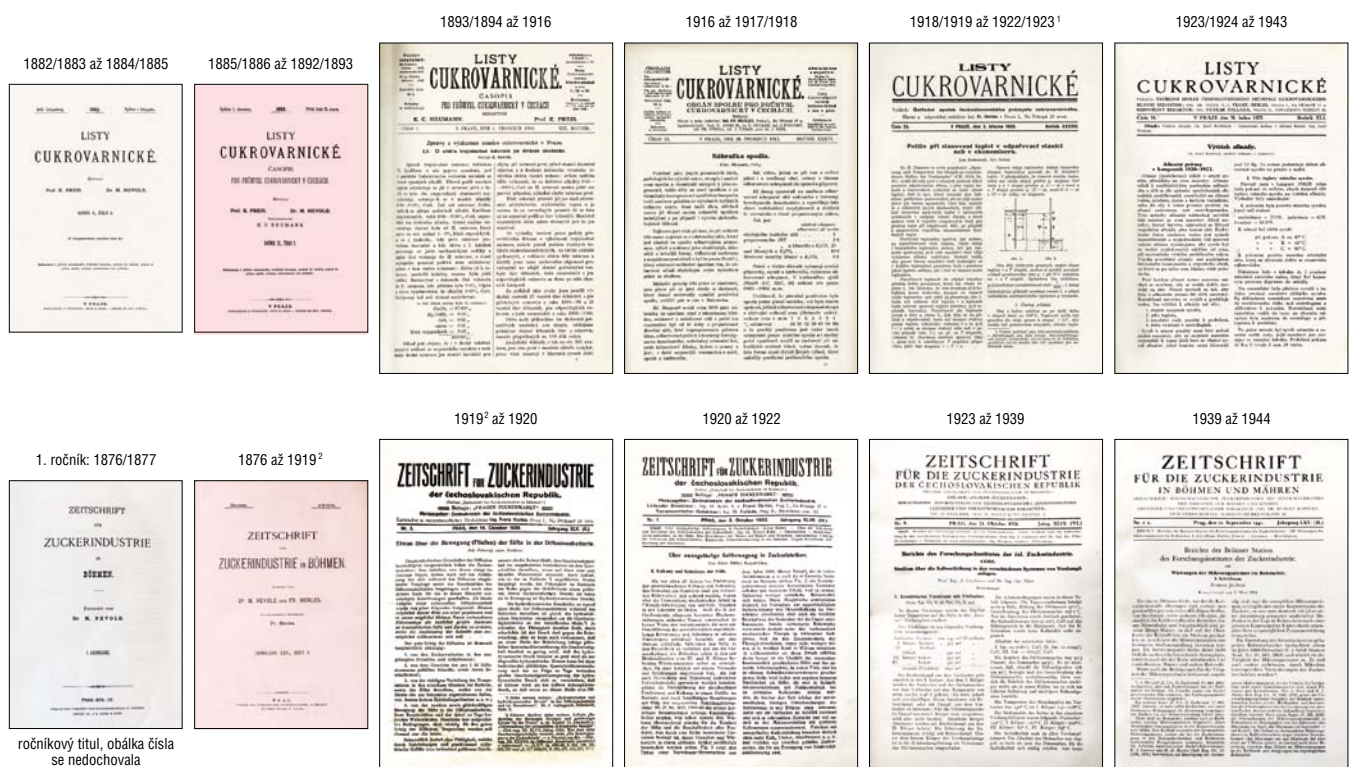
**Gillarová S., Henke S., Bubník Z., Kadlec P.: Carbohydrate Separation Using Continuous SMB Chromatography (Part 2)**

The article presents a literary review concentrating on SMB chromatography; it summarises its trends and up-to-date applications. The research is particularly aimed at separation and production of rare carbohydrates, separation of fructooligosaccharides, separation of galactooligosaccharides, separation of lactose and oligosaccharides, separation of enantiomers, and isolation of betaine from molasses. In conclusion, the paper introduces a continuous chromatography station that makes it possible to test separation of carbohydrates and other substances.

**Key words:** continuous SMB chromatography, separation, fructooligosaccharides, galactooligosaccharides, enantiomers, betaine.

**Kontaktní adresa – Contact address:**

Ing. Svatopluk Henke, Ph. D., Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav sacharidů a cereálií, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, Česká republika, e-mail: henkes@vscht.cz



Obr. 1. Obálky Listů cukrovarnických a Zeitschrift für Zuckerindustrie in Böhmen (der československé republik; in Böhmen und Mähren); pozn: 1 – mírně odlišná úprava záhlaví u ročníků 1921/22 a 1922/1923 (viz obr. 3.), 2 – pravděpodobně