

LAPPEENRANNAN TEKNILLINEN YLIOPISTO  
LUT School of Engineering Science  
LUT Chemtech  
BJ01A0030 Kandidaatintyö ja seminaari

**GLUKOOSI-FRUKTOOSISIIRAPIN  
KROMATOGRAFINEN FRAKTIOINTI**

Lappeenrannassa 6.4.2015

Markus Koskinen

Työn ohjaaja ja tarkastaja: TkT Jari Heinonen

## SISÄLLYSLUETTELO

### SYMBOLILUETTELO

1	JOHDANTO .....	5
2	GLUKOOSI-FRUKTOOSISIIRAPIN VALMISTUS .....	6
3	KROMATOGRAFINEN EROTUS .....	9
	3.1 Nestekromatografia .....	9
	3.2 Ioninvaihtohartsit.....	10
	3.3 Ligandinvaihtokromatografia .....	12
	3.4 Ligandien adsorptio.....	13
	3.4.1 Liuoksessa olevien ionien vaikutus .....	14
	3.5 Adsorptioisotermit.....	14
4	KROMATOGRAFISEN EROTUKSEN PROSESSIVAIHTOEHTOJA .....	16
	4.1 Kierrätyskromatografia .....	16
	4.2 SSR-prosessin suunnittelu Unified design –menetelmällä.....	18
	4.3 Simuloitu liikkuva peti -prosessi .....	21
5	GLUKOOSI-FRUKTOOSISIIRAPIN KROMATOGRAFINEN FRAKTIOINTI.....	24
6	KOKEIDEN SUORITUS .....	27
	6.1 Käytetyt materiaalit ja kemikaalit .....	27
	6.2 Hartsipedin huokoisuuden määrittäminen.....	27
	6.3 Adsorptioisotermien määrittäminen .....	27
	6.4 Kromatografinen erotus.....	28
	6.4.1 Panoserotus.....	29
	6.4.2 Kierrätyskromatografia.....	29
	6.5 Analyysit .....	29
7	LASKENTA .....	30
	7.1 Isotermien määrittäminen ja mallinnus .....	30
	7.2 SSR-prosessin suunnittelu .....	30
	7.3 Panos- ja SSR-prosessien tehokkuuden arviointi .....	30
8	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU .....	32
	8.1 Glukoosin ja fruktoosin adsorptioisotermit ja niiden validointi.....	32
	8.2 Glukoosin ja fruktoosin erotus SSR-prosessilla.....	34
9	JOHTOPÄÄTÖKSET .....	39

## SYMBOLILUETTELO

### *Symbolit*

$C$	liuoksen konsentraatio, mol/L
$C_{\text{syöttö}}$	syöttöliuoksen konsentraatio, mol/L
$d_{\text{col}}$	kolonnin halkaisija, cm
$h_{\text{col}}$	kolonnin korkeus, cm
$EC$	eluentin kulutus, L/g
$k$	Henry vakio, -
$L_c$	kolonnin minimipituus, cm
$m$	suunnitteluparametri, -
$n$	ainemäärä, mol
$n^{\text{ulos}}$	ainemäärä ulostulo virrassa, mol
$Q$	virtausnopeus, mL/min
$q$	adsorptioisotermi, mol/L
$q_{\text{sat}}$	adsorbentin saturaatiokapasiteetti, mol/L
$P_u$	tuotteen puhtaus, %
$P_r$	tuotteen tuottavuus, g/(L h)
$\Delta t_f$	syöttöpulssin kesto, min
$t_{A1}$	fraktiointi aika, min
$t_{A2}$	fraktiointi aika, min
$t_{B1}$	fraktiointi aika, min
$t_{B2}$	fraktiointi aika, min
$V_0$	kolonnin tyhjän tilan tilavuus, mL
$V_{\text{bed}}$	hartsipedin tilavuus, mL
$V_E$	elutio tilavuus käyrän käännepisteessä, mL
$V_{\text{FF}}$	tuoesyötön tilavuus, mL
$V_R$	kierrätysfraktion tilavuus, mL
$V_{\text{syöttö}}$	syötön (injektio) tilavuus, mL
$Y$	tuotteen saanto, %

### *Kreikkalaiset kirjaimet*

$\varepsilon$	huokoisuus, -
$\omega$	isotermiparametri
$\eta$	tuottavuus, -

### *Ala- ja yläindeksit*

1	1. komponentti
2	2. komponentti
glukoosi	glukoosi
fruktoosi	fruktoosi
i	komponentti i
pulssi	pulssi
syöttö	syöttöliuos
kierrätys	kierrätysliuos

sykli            sykli

*Kirjainlyhenteet*

Ag	hopea
BV	petitilavuus
Ca	kalsium
Mg	magnesium
Ni	nikkeli
H <sup>+</sup>	protoni
PS-DVB	polystyreeni–divinyylibentseeni
SSR	kierrätyskromatografia
SMB	simuloitu liikkuva peti -prosessi

## 1 JOHDANTO

Kuluttajamarkkinoilla on suuri kysyntä vähäkalorisille ruuille ja juomille. Näitä tuotteita voidaan valmistaa mm. korvaamalla makeuttimena perinteisesti käytetty sakkaroosi fruktoosilla joka on 73% makeampi ja sisältää vähemmän kaloreita kuin sakkaroosi. Koska fruktoosi on makeampaa kuin sakkaroosi, sitä tarvitaan vähemmän elintarvikkeissa saman makeusasteen saavuttamiseksi. Glukoosi-fruktoosisiirappia valmistetaan maissista tai sakkaroosista hydrolyysin avulla. Teollisuudessa glukoosi-fruktoosisiirapin fraktiointi tehdään käyttämällä jatkuvatoimista simuloitu liikkuva peti-prosessia (Simulated Moving Bed, SMB-prosessi).

Tässä työssä tutkitaan voidaanko kierrätyskromatografiaa (Steady State Recycling , SSR-prosessi) käyttäen fraktioida glukoosi-fruktoosisiirappia tehokkaasti. Fruktoosi erotetaan glukoosista käyttämällä erotusmateriaalina vahvoja kationinvaihtohartseja kalsium-muodossa. Työssä tehtiin kirjallisuusselvitys, jonka perusteella valittiin sopiva erotusmateriaali ja koeolosuhteet. Kokeellisessa osassa glukoosille ja fruktoosille määritettiin adsorptioisotermit Frontal analysis -menetelmällä. Kokeellisesti määritettyihin isotermeihin sovitetut mallit validoitiin ja SSR-prosessi suunniteltiin panoserotuskokeiden avulla. SSR-prosessia mallinnettiin käyttäen MATLAB-ohjelmaa.

## 2 GLUKOOSI-FRUKTOOSISIIRAPIN VALMISTUS

Glukoosi-fruktoosisiirappia voidaan valmistaa tärkkelyspitoisesta raaka-aineesta, kuten maissista, riisistä ja vehnästä. Valmistusmenetelmiä on kaksi: glukoosi-fruktoosisiirapin valmistus maissista ja valmistus sakkaroosista hydrolyysin avulla. Tässä kappaleessa esitellään nämä menetelmät.

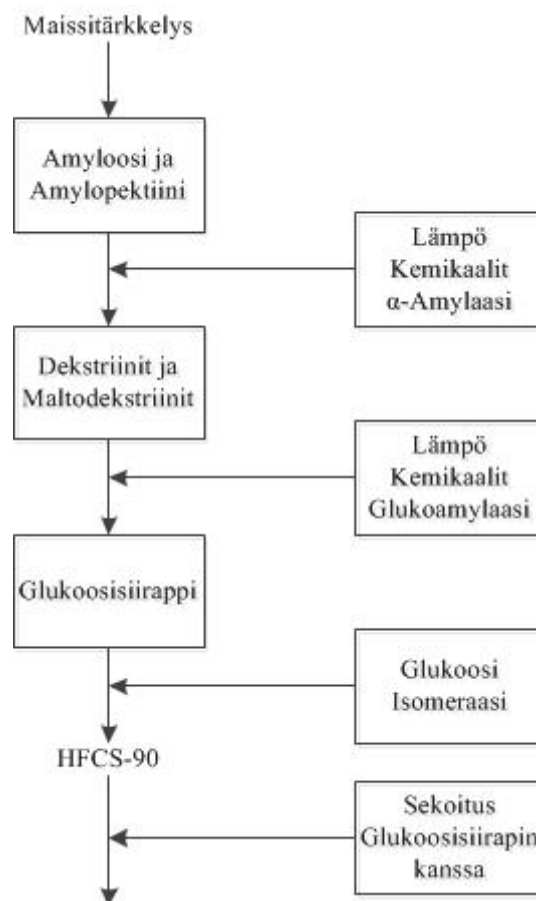
### 2.1 Valmistus maissitärkkelyksestä

Maissisiirappia (High Fructose Corn Syrup, HFCS, Kuva 1) valmistetaan maissin sisältämästä tärkkelyksestä pilkkomalla tärkkelysketjut glukoosiksi. Tärkkelys sekä maissin sisältämät proteiinit ja öljyt erotetaan maissin jyvistä erilaisten yksikköprosessien kuten haudutus ja märkäjauhaminen avulla. Maissitärkkelys kuten muutkin tärkkelykset koostuvat toisiinsa kiinnittyneistä glukoosiyksiköistä. Tärkkelys voi olla suoraketjuista amyloosia tai haaroittunutta amylopektiiniä, ja se koostuu noin 45 glukoosimolekyylin pituisista ketjuista [1]. Tärkkelysketjujen pilkkominen glukoosiksi vaatii lämpöä ja suolahappoa sekä kahta eri entsyymiä. Teollinen entsyymi  $\alpha$ -amylaasi, jota tuotetaan *Bacillus*-suvun bakteereiden avulla, hydrolysoi maissitärkkelyksen lyhyemmiksi sokeriketjuiksi, dekstriineiksi ja oligasakkarideiksi (pituus noin 5 glukoosimolekyylä). Nämä pilkotaan edelleen glukoamylaasin, jota valmistetaan muun muassa *Aspergillus*-sienestä, avulla glukoosimolekyyleiksi. Saatua tuotetta kutsutaan glukoosisiirapiksi. Glukoosisiirapin sisältämä glukoosi voidaan muuttaa fruktoosiksi glukoosi-isomeraasin avulla [2].

$\alpha$ -amylaasi ja glukoosiamylaasi lisätään suoraan prosessilietteen, mutta kalliimpaa glukoosi-isomeraasia käytetään kiinteään kantajafaasiin sidottuna kiintopetireaktorissa, jonka läpi glukoosisiirappi johdetaan. Siinä missä  $\alpha$ -amylaasia ja glukoamylaasia käytetään kerran, glukoosi-isomeraasia käytetään niin kauan kuin entsyymi säilyy aktiivisessa muodossa. [2]

Entsyyttisessä glukoosin isomeroinnissa saadaan tuoteseos, jossa on 42 % fruktoosia ja 58 % glukoosia. Tästä seoksesta käytetään lyhennettä HFCS-42. Entsyyttisesti tuotetun maissisiirapin fruktoosipitoisuutta voidaan kasvattaa erottamalla glukoosi ja fruktoosi toisistaan kromatografisesti jatkuvatoimisella simuloitu liikkuva peti -prosessilla (Simulated Moving Bed, SMB). Tällöin saadaan siirappia, jossa on 90 % fruktoosia (HFCS-90). Sekoittamalla oikealla suhteella 42 % ja 90 % fruktoosia sisältäviä siirappijakeita saadaan valmistettua kaupallista 55 % fruktoosia sisältävää maissisiirappia (HFCS-55). [2]

HFCS-42:ta käytetään ruokien makeutusaineena esimerkiksi säilykkeissä, kastikkeissa ja keitoissa, koska sen heikohko makeus ei vaikuta ruuan luonnolliseen makuun. HFCS-55:tä puolestaan käytetään makeutusaineena virvoitusjuomissa ja mehuissa, koska korkean fruktoosipitoisuuden takia se on makeampaa kuin sakkaroosi. HFCS-90:tä käytetään ainoastaan HFCS-55:n valmistukseen. [2]



Kuva 1. Maissisiirapin (glukoosisiirapin) valmistusprosessi. [2]

## 2.2 Valmistus sakkaroosista

Sakkaroosi eli ruokosokeri on disakkaridi, joka koostuu glukoosi- ja fruktoosiosasista. Sitä saadaan sokeriruo'osta ja sokerijuurikkaasta. Sakkaroosi voidaan hajottaa glukoosiksi ja fruktoosiksi hydrolyysireaktiolla, jossa glukoosi- ja fruktoosimolekyylien väliset sidokset pilkotaan lämmön tai happo- tai entsyymikatalyytin avulla. Happokatalysoitu hydrolyysi suoritetaan happamissa olosuhteissa, koska reaktio etenee nopeammin matalassa pH:ssa. Lämpötilan nostaminen myös kiihdyttää reaktiota.

Entsyymikatalysoidussa reaktiossa käytetään  $\beta$ -fruktofuranosidaasi- eli invertaasientsyymiä katalysoimaan sakkaroosin hydrolyysiä, jossa sakkaroosi sitoutuu invertaasin N-terminaaliin,

missä katalyyttisesti aktiiviset aminohapot sijaisevat. Tärkeimmät aminohapot ovat aspartaatti-ionimuodossa oleva asparagiinihappo ja glutamiinihappo. Aspartaatti-ioni reagoi fruktoosirenkaan C2-asemaan ja glutamiinihappo luovuttaa protonin fruktoosin ja glukoosin välisen glykosidisen sidoksen happiatomille. Tämä seurauksena glukoosin ja fruktoosin välinen sidos katkeaa ja glukoosi molekyyli irtoaa entsyymistä. Vesi hajottaa fruktoosin ja asparagiinihapon välisen kovalenttisen sidoksen, jolloin fruktoosi vapautuu entsyymistä. Entsyymien optimilämpötila on 60 °C ja optimi-pH 4,5. Teolliseen käyttöön invertaasi entsyymiä valmistetaan leiviniivasta. [3,4] Hydrolyysi tuottaa glukoosia ja fruktoosia suhteella 1:1 ja ne voidaan erottaa toisistaan kromatografisesti. Inverttisokerisiirappeja käytetään hunajassa, hilloissa ja sikareiden kuorissa lisäämään makua [5].



### 3 KROMATOGRAFINEN EROTUS

Kromatografia on kemiallisten yhdisteiden erottamis- ja analysointimenetelmä, jossa kaasu- tai nestevirtauksen mukana jonkin erotusmateriaalin läpi kulkevan seoksen komponentit erottuvat toisistaan kapeina vyöhykkeinä. Tutkittava yhdiste jakautuu kahden faasin välille. Näistä faaseista toinen pysyy paikallaan (stationäärifaasi) ja toinen liikkuu (liikkuva faasi) määrättyyn suuntaan. Liikkuvana faasina voi toimia neste tai kaasu, joka kulkee kiinteän tai nestemäisen stationäärifaasin läpi. Liikkuvassa faasissa oleva yhdiste rikastuu stationäärifaasiin, kunnes puhdas liuotin syrjäyttää yhdisteen ja näin ollen vapauttaa sen liikkuvaan faasiin. Jokaisella yhdisteellä on erilainen liikkumisnopeus stationäärifaasin läpi ja tästä johtuen eri yhdisteet erottuvat toisistaan.

#### 3.1 Nestekromatografia

Nestekromatografiassa yhdisteiden erottuminen toisistaan perustuu niiden ja kiinteän erotusmateriaalin (adsorbentti) välisiin vuorovaikutuksiin. Yksinkertaisessa yhden kolonnin nestekromatografialaitteistossa (Kuva 2) tarkoitukseen sopivalla erotusmateriaalilla täytetyn kolonnin läpi syötetään jatkuvana virtana liikkuva faasi (eluentti), jonka sekaan erotettavaa seosta syötetään tietyin väliajoin. [6]

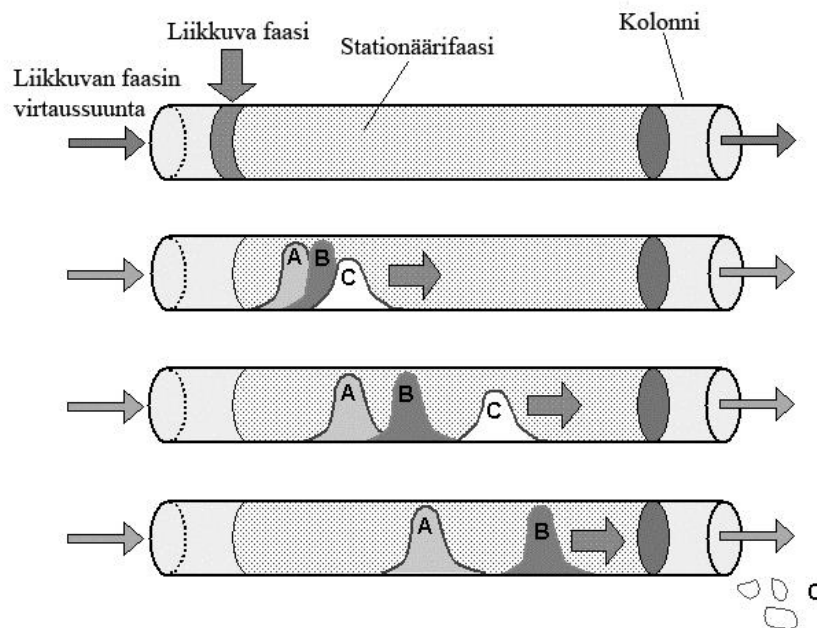
Kulkeutuessaan kolonnin läpi eri yhdisteet vuorovaikuttavat eri tavoin kolonniin pakatun erotusmateriaalin kanssa. Ne yhdisteet joilla on voimakkaita vuorovaikutuksia erotusmateriaalin kanssa kulkeutuvat kolonnin läpi hitaammin kuin ne joilla on heikompia vuorovaikutuksia (Kuva 2). Näin ollen yhdisteet erottuvat toisistaan ja ne voidaan kerätä omiin fraktioihinsa kolonnin ulostulossa. [6]

Nestekromatografiassa eluenteina käytetään yleensä vettä, jotain orgaanista liuotinta tai näiden seosta riippuen sekä erotusmateriaalin että erotettavien yhdisteiden ominaisuuksista. Nestekromatografiassa käytettyjä erotusmateriaaleja on lukuisia mm. silikageeli, zeoliitit, aktiivihiili ja ioninvaihtohartsit. Yhteistä näille materiaaleille on se, että ne ovat erittäin huokoisia, jolloin niillä on erittäin suuri pinta-ala yhdisteiden adsorboitumista varten. [6,7]

Kromatografia voidaan jakaa analyttiseen ja preparatiiviseen kromatografiaan. Analyttisen kromatografian tavoitteena on erottaa yhdisteitä toisistaan siten, että yhdisteet voidaan tunnistaa ja niiden pitoisuudet määrittää. Kolonniin syötettävät näytemäärät ja yhdisteiden

pitoisuudet ovat pieniä ja tästä johtuen erotettavan seoksen yhdisteillä ei ole vuorovaikutuksia keskenään. [7]

Preparatiivisessa kromatografiassa on yleensä tarkoituksena erottaa ja puhdistaa erilaisissa seoksissa olevia yhdisteitä niiden jatkokäsittelyä varten. Toisin kuin analyttisessä kromatografiassa, preparatiivisessa kromatografiassa käsiteltävät liuosmäärät ja yhdisteiden konsentraatiot ovat suuria. Tästä johtuen yhdisteiden välillä esiintyy usein vuorovaikutuksia, jotka voivat hankaloittaa yhdisteiden erottumista. Preparatiivista kromatografiaa sovelletaan mm. lääketieteellisyydessä, sokeri- ja makeutusaineteollisuudessa sekä petrokemiassa. [7]



Kuva 2. Nestekromatografian toimintaperiaatte. [8]

### 3.2 Ioninvaihtohartsit

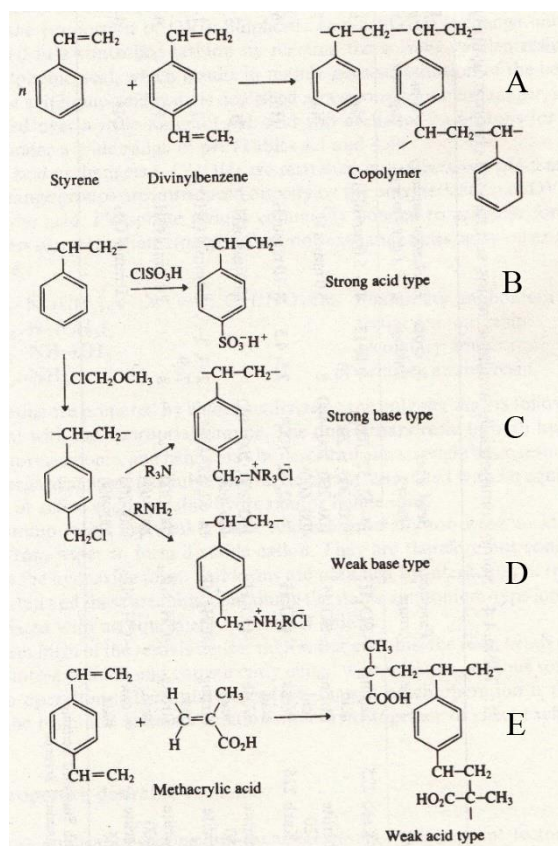
Nestekromatografiassa voidaan käyttää useita erilaisia materiaaleja adsorbentteina. Muun muassa sokeriteollisuudessa glukoosin ja fruktoosinerotuksessa käytetään adsorbentteina vahvoja kationinvaihtohartseja kalsium-ionimuodossa. Ioninvaihtohartsit ovat kiinteitä polyelektrolyyttejä, jotka sisältävät kiinteitä negatiivisesti tai positiivisesti varautuneita ryhmiä (funktionaaliset ryhmät). Näihin ryhmiin on kiinnittyneinä vastakkaisen varauksen omaavia ioneja, jotka toimivat vaihtuvina ioneina. Ioninvaihtohartsit jaetaan kahteen ryhmään, kationin- tai anioninvaihtohartseihin. Kationinvaihtohartseissa yleisimmät funktionaaliset ryhmät ovat

negatiivisesti varautuneet sulfonihapporyhmät (vahvat kationinvaihtohartsit) ja karboksyylihapporyhmät (heikot kationinvaihtohartsit). Vastaioneina toimivat kationit. Anioninvaihtohartseissa vastaavasti positiivisesti varautuneina funktionaalisenä ryhmänä on yleisimmin sekundäärisiä ja tetriäärisiä amiineja (heikot anioninvaihtohartsit) sekä kvaternäärisiä ammoniumsuoloja (vahvat anioninvaihtohartsit). Vaihtuvina ioneina ovat tässä tapauksessa anionit [9].

Yleisimmin käytetyt ioninvaihtohartsit ovat polystyreeni–divinyylibentseenirunkoisia (PS–DVB). Näitä valmistetaan polymeroimalla styreenia ja divinyylibentseenia (Kuva 3, reaktio A). Polymeroinnin tuloksena syntyy huokoinen kolmiulotteinen säleikkö, jonka läpi ionit ja muut molekyylit voivat liikkua diffuusion avulla. [9]

Vahvojen kationinvaihtohartsien tapauksessa valmistettuihin PS–DVB-runkoihin voidaan liittää sulfonihapporyhmiä. Tämä tapahtuu kun annetaan kloorisulfonihapon ja hartsin reagoida keskenään, jolloin sulfonihapporyhmä kiinnittyy hartsin rungon bentseenirenkaisiin (Kuva 3, reaktio B).

Heikkoja kationinvaihtohartseja (funktionaalinen ryhmä on karboksyylihapporyhmä, -COOH) valmistetaan divinyylibentseenin ja metakrylaattihapon polymeroinnilla (Kuva 3, reaktio E). Anioninvaihtohartseja puolestaan valmistetaan esimerkiksi ensin klorometyloimalla PS–DVB-matriisi ja sen jälkeen käsittelemällä se halutulla amiinilla (Kuva 3, reaktiot C ja D ). [9]



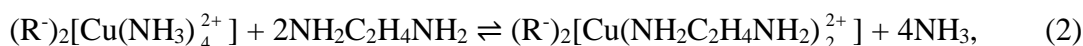
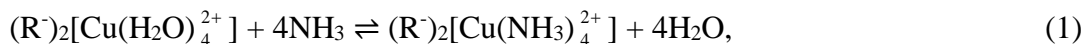
Kuva 3. PS–DVB-runkoisten ioninvaihtohartsien runkojen valmistaminen ja funktionaalisten ryhmien lisääminen PS–DVB-runkohin. Anioninvaihtohartsien runkoa on muokattu kloorimetyyllillä. A = Styreenin ja divinyylibentseenin polymerointi. B = vahvojen kationinvaihtohartsien valmistus; C = vahvojen anioninvaihtohartsien valmistus; D = heikkojen anioninvaihtohartsien valmistus; E = heikkojen kationinvaihtohartsien valmistus. [10]

### 3.3 Ligandinvaihtokromatografia

Glukoosin ja fruktoosin, kuten myös muiden sokereiden, kromatografinen erotus perustuu niin kutsuttuun ligandinvaihtokromatografiaan. Ligandinvaihtokromatografiassa käytetään adsorbentteina kationinvaihtohartseja, jotka sisältävät kompleksinmuodostukseen pystyviä kationeja kuten Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> ja Ag<sup>+</sup>. Tällaisia kationeja sisältäviä ioninvaihtohartseja voidaan käyttää erittäin selektiivisinä adsorbentteina sellaisille molekyyille ja anionille, jotka voivat muodostaa komplekseja näiden metalli-ionien kanssa. Potentiaalisia ligandeja ovat muun muassa hydroksidiryhmiä sisältävät yhdisteet, ammoniakki, alifaattiset amiinit ja aminohapot. Ligandinvaihtokromatografiassa ei tehdä ioninvaihtoa vaan hartsit toimivat ainoastaan kiinteinä kantajina metalli-ioneille, jotka toimivat kompleksinmuodostajina. [11]

Ligandinvaihtokromatografiassa hartsia ympäröivän liuoksen sisältämät ligandimolekyylit korvaavat liuotinmolekyylit hartsin sisältämien metalli-ionien solvataatiokuoressa tai

korvaavat muita ligandeja aiemmin muodostuneissa komplekseissa. Alla esitettyinä tyypillisiä ligandinvaihtoreaktioita, jossa  $R^-$  on kationinvaihtajan funktionaalinenryhmä. Reaktiossa (1) ammoniakki muodostaa kompleksin kationin vaihtajan  $Cu^{2+}$ -ionin kanssa korvaten vesimolekyylit ja reaktiossa (2) ammoniakki vaihtuu etyleenidiaamiiniin:



### 3.4 Ligandien adsorptio

Ligandinvaihtokromatografiassa käytetyt adsorbentit (metalli-ionimuotoiset kationinvaihtohartsit) yhdistävät korkean adsorptiokyvyn ja korkean selektiivisyyden ligandille. Esimerkiksi PS–DVB-tyyppisen kationinvaihtohartsin ioninvaihtokapasiteetti on 5 mekv/g kuivaa hartsia  $H^+$ -muodossa, kun taas  $Ni^{2+}$ -muodossa ioninvaihtokapasiteetti on 2 mekv/g kuivaa hartsia.  $Ni^{2+}$  on kuitenkin heksavalentti-ioni ja näin ollen sen ligandinvaihtokapasiteetti on 12 mmol/g kuivaa hartsia yhden kompleksin muodostukseen osallistuvan ryhmän (monodentaatti) sisältäville ligandeille, kuten ammoniakki, joka miehittää yhden nikkelin koordinaatiovalensseista. Kaksi kompleksin muodostukseen osallistuvaa ryhmää (bidentaatti) sisältäville ligandeille, jotka vievät kaksi koordinaatiovalenssia,  $Ni^{2+}$ :n ligandinvaihtokapasiteetti on noin 6 mmol/g. ”Vapaat” ligandit eli ligandit joilla on vapaita koordinaatiovalenssipaikkoja, voivat adsorboitua ylimäärin verrattuna niihin, jotka ovat muodostaneet kompleksin metalli-ionin kanssa. [11]

Hartsien selektiivisyys tietyille ligandeille riippuu muodostuvien kompleksien vahvuudesta: mitä vahvempi kompleksi on sitä suurempi on selektiivisyys. Ioninvaihtaja suosii ligandia, jolla on voimakas taipumus muodostaa komplekseja metalli-ionin kanssa. Lisäksi selektiivisyys on suuri jo hyvin pienissä liuoksen ligandipitoisuuksissa. Ligandien adsorptioisotermit poikkeavat tavanomaisten yhdisteiden isotermeistä siinä, että ligandien adsorption laimeista liuoksista on huomattavasti voimakkaampaa, mutta erotusmateriaali myös satureituu ligandien tapauksessa alhaisemmassa konsentraatiossa. Voimakasta ja hyvin selektiivistä ligandien adsorptiota laimeista liuoksista voidaan käyttää hyväksi ligandien erottamiseen yhdisteistä, jotka eivät pysty muodostamaan komplekseja metalli-ionien kanssa. [11]

Ligandinvaihto liuosten ja kompleksisia metalli-ioneja sisältävien ionin vaihtajien kanssa on analoginen normaalin ioninvaihdon kanssa. Ligandinvaihto kuten ioninvaihto on stoikiometrinen prosessi. Ligandinvaihtotasapaino voidaan määrittellä ligandinvaihtoisotermillä ja -erotustekijöillä samalla lailla kuin normaalin ioninvaihdon isotermit ja erotustekijät. Yksi ligandinvaihdon parhaista puolista on, että siinä on erittäin suuri selektiivisyys. [11]

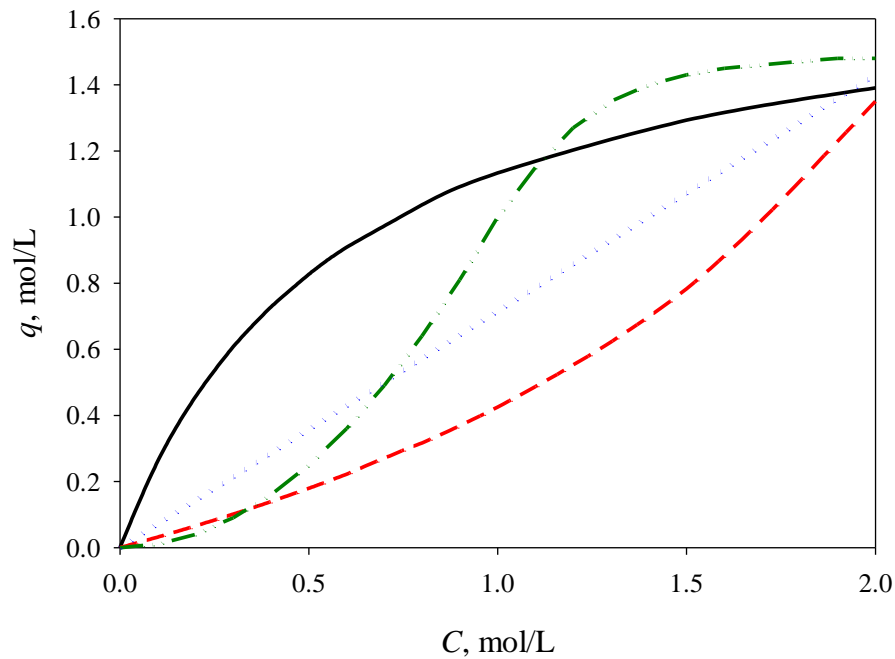
### **3.4.1 Liuoksessa olevien ionien vaikutus**

Ligandinvaihdossa ioninvaihtoa liuoksen sisältämien kationien ja hartsissa olevien kompleksin muodostukseen osallistuvien kationien välillä tulee välttää. Käytännön sovelluksissa tämä on kuitenkin usein mahdotonta ja ioninvaihdon seurauksena hartsin ligandinvaihtokapasiteetti ja -selektiivisyys laskevat. Lisäksi ulkopuoliseen liuokseen siirtyneet syrjäytetyt metalli-ionit haittaavat ligandien adsorptiota ja ligandinvaihdon selektiivisyyttä muodostamalla komplekseja ligandien kanssa liuosfaasissa. [11]

Metalli-ionien vaihtuminen toisiin ioneihin on vaarana jos ulkopuolinen liuos sisältää elektrolyyttejä korkeissa konsentraatioissa. Ioninvaihtoa voidaan rajoittaa valitsemalla hartsi, joka on erittäin selektiivinen kompleksin muodostukseen pystyvälle metalli-ionille. Monissa tapauksissa karboksyylihapporyhmiä sisältävät, eli heikot, kationinvaihtajat tarjoavat tyydyttävää suojaa metalli-ionien menetystä vastaan. Myös anioninvaihtajia, joissa on amiiniryhmiä voidaan käyttää. [11]

### **3.5 Adsorptioisotermit**

Adsorptioisotermit kuvaavat yhdisteiden jakautumista adsorbentin ja liuosfaasin välillä tasapainotilassa. Kuvassa 4 on esitettyä erilaisia isotermityyppejä, jotka ovat lineaarinen, Langmuir-tyyppinen (alaspäin kovera), anti-Langmuir -tyyppinen (ylöspäin kovera ja S-muotoinen isotermit).



Kuva 4. Adsorptioisotermit: lineaarinen (sininen); alaspäin kovera (musta); ylöspäin kovera (punainen); S-muotoinen (vihreä). [12]

Lineaarista isotermiä voidaan kuvata yhtälöllä:

$$q = kC, \quad (3)$$

missä on  $k$  on isotermin kulmakerroin (Henryn vakio) ja  $C$  liuoksen konsentraatio.

Alaspäin koveraa eli Langmuir-tyyppistä isotermiä voidaan kuvata yhtälöllä:

$$q = \frac{q_{sat}\omega C}{1+\omega C}, \quad (4)$$

jossa  $q_{sat}$  on adsorbentin saturaatiokapasiteetti ja  $\omega$  on isotermin parametri.

Ylöspäin koveraa eli anti-Langmuir -tyyppistä isotermiä voidaan kuvata yhtälöllä:

$$q = \frac{\omega_1 C}{1-\omega_2 C}. \quad (5)$$

S-muotoista eli kvadraattista isotermiä voidaan kuvata yhtälöllä:

$$q = \frac{q_{sat}(\omega_1 C + 2\omega_2 C^2)}{1 + \omega_1 C + 2\omega_2 C^2}. \quad (6)$$

## 4 KROMATOGRAFISEN EROTUKSEN PROSESSIVAIHTOEHTOJA

Preparatiivisessa mittakaavassa toteutettava kromatografinen erotuksen toteuttamiseksi on olemassa useita erilaisia prosessivaihtoehtoja. Perustoteutustapa on yhden kolonnin panoserotus, joka on esitelty kappaleessa 3. Kromatografisen erotuksen tuottavuutta voidaan parantaa tilanteesta riippuen käyttämällä joko yhden kolonnin kierrätyskromatografiaa (Steady Steady Recycling, SSR) tai erilaisia monikolonnisia jatkuvatoimisia kromatografisia prosesseja kuten niin kutsuttua simuloitu liikkuva peti (Simulated Moving Bed, SMB) – prosessia [13]. SSR- ja SMB-prosessien avulla voidaan tuottaa puhtaampaa tuotetta halutulla tuottomäärällä tai enemmän tuotetta halutulla puhtausmäärällä verrattuna panoskromatografiaan, koska SSR:ssä ja SMB:ssä tuotantokustannukset ovat panoskromatografiaa pienemmät. [13,14]

### 4.1 Kierrätyskromatografia

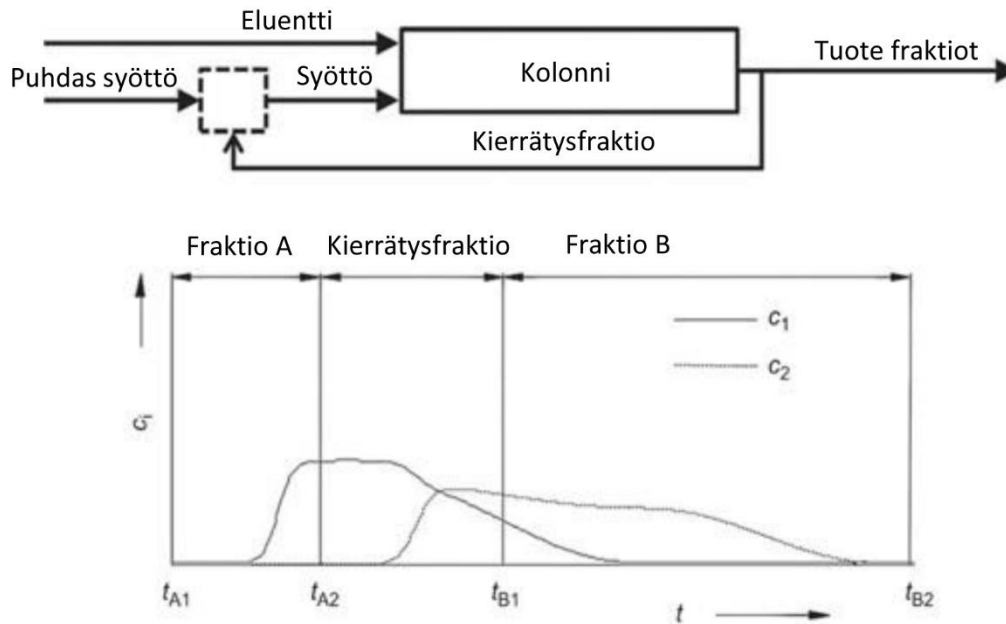
Kierrätyskromatografia (SSR) on yhden kolonnin prosessi, jossa erotusprosessin tehokkuutta parannetaan kierrättämällä osa kolonnista ulostulevasta virrasta takaisin syöttövirtaan. Kierrätettävä fraktio sisältää toisistaan erottumattomat osat kolonniin syötetyn seoksen komponenteista. SSR on syklinen prosessi, jossa saavutetaan tietty syklinen vakiotila, kun prosessia toistetaan riittävän monta kertaa. Tässä tilassa tuotteiden keskimääräinen koostumus pysyy vakiona joka syklissä [15]. SSR:llä on mahdollista päästä yli 99 %:n puhtauksiin huomattavasti suuremmilla saannoilla ja tuottavuuksilla kuin panoskromatografiassa [16]. Suurin kierrätyskromatografisen prosessin suunnitteluun liittyvä ongelma on prosessin dynaaminen luonne.

SSR-prosessia voidaan operoida kahdella eri tavalla joita ovat ns. mixed-recycle tai closed-loop. Ensin mainitussa operointitavassa koko kierrätettävä fraktio kerätään talteen, sekoitetaan tuoresyötön kanssa ja saatu seos injektoidaan kolonniin. Kierrätettävä fraktio voidaan sekoittaa tuoresyötön kanssa myös siten, että kierrätettävästä fraktio konsentroidaan poistamalla osa sen sisältämästä eluentista [16]. Closed-loop operointitavassa joko koko kolonnista ulostuleva osittain erottuneista komponenteista koostuva profiili tai osa tästä profiilista kierrätetään useita kertoja kolonnin sisäänmenoon kunnes haluttu erotus saavutetaan. Tämä prosessivaihtoehto vähämerkityksellinen alhaisen tuottavuuden takia. Tässä kappaleessa keskitytään mixed-recycle -tavalla operoitavan SSR-prosessin kuvaamiseen [16].



SSR-prosessi (Kuva 5) käynnistetään (1. sykli) injektoimalla tuoresyöttöä (sisältää tuotteita A ja B) eluentilla tasapainotettuun kolonniin. Kolonnista ulostulevasta virrasta aletaan kerätä talteen tuotetta A (heikommin adsorboitunut komponentti) ajan hetkellä  $t_{A1}$  (sykli alkaa) A:n keräys lopetetaan ja kierrätysfraktion keräys aloitetaan ajanhetkellä  $t_{A2}$ , joka riippuu tuotteelle A asetetuista puhtausvaatimuksista. Kierrätysfraktiota, joka sisältää sekä A:ta että B:tä, kerätään ajanhetkeen  $t_{B1}$ , joka taas riippuu tuotteelle B asetetuista puhtausvaatimuksista. Tämän jälkeen tuotetta B kerätään omaan fraktioonsa ajanhetkeen  $t_{B2}$  asti. SSR-prosessin yhden syklin pituus on aikojen  $t_{A1}$  ja  $t_{B2}$  erotus. Seuraavassa syklissä kerätty kierrätysfraktio sekoitetaan tiettyyn määrään tuoresyöttöä ja saatu seos syötetään kolonniin pelkän tuoresyötön sijaan. Toistettaessa syklejä tarpeeksi monta kertaa saavutetaan edellä mainittu vakiotila, jonka jälkeen prosessi toimii samalla tavalla joka syklissä.

SSR-prosessin suunnittelu on haastavaa sen dynaamisen eli muuttuvan luonteen vuoksi. Suunnitteluun vaikuttavia vapaasti valittavia parametreja on kuusi: syöttöpulssin kesto, syötön määrä ja fraktiointiajat ( $t_{A1}$ ,  $t_{A2}$ ,  $t_{B1}$ ,  $t_{B2}$ ). Näiden optimiarvot riippuvat vakiotilan konsentraatioprofiileista ja toisinpäin [15]. SSR-prosessien suunnittelun avuksi on kuitenkin tehty useita yksinkertaistettuja työkaluja [16,17]. Yksi uusimmista SSR-prosessin suunnittelua helpottamaan luoduista menetelmistä on ns. Unified design -menetelmä, jota käytetään tässä työssä [16]. Unified design -menetelmän avulla voidaan yhden tyyppisen kromatografisen erotusprosessin, esimerkiksi yhden kolonnin panoserotus, tapauksessa määritettyjen suunnitteluparametrien avulla suunnitella SSR- tai SMB-prosessi. Tämän lisäksi Unified design -menetelmä mahdollistaa näiden täysin erilaisten kromatografisten erotusprosessien yksinkertaisen vertailun. [16]



Kuva 5. Mixed-recycle tilassa toimivan kierrätyskromatografiaprosessin toimintaperiaate ja kolonnista ulostulevien profiilien fraktiointi. Ajat kolonnin ulostuloprofiilit esittävässä kuvassa:  $t_{A1}$  = fraktion A keräyksen aloitus;  $t_{A2}$  = fraktion A keräyksen lopetus;  $t_{B1}$  = fraktion B keräyksen aloitus;  $t_{B2}$  = fraktion B keräyksen lopetus. [14]

#### 4.2 SSR-prosessin suunnittelu Unified design –menetelmällä

Kromatografisten prosessien suunnittelussa on käytetty useita eri laaduttomia suunnitteluparametreja [16]. Näitä ovat esimerkiksi, dimensiottomat jaeajat sekä virtausnopeudet. Unified design -menetelmän tarkoituksena on luoda säännöt, kuinka laaduttomat parametrit määritellään, jotta erilaisia kromatografisia erotusprosesseja voidaan vertailla keskenään. Unified design -menetelmässä oletetaan, että kolonnin dimensiot ja syöttövirran konsentraatiot ovat vakioita sekä hartsin pedin ja isotermien parametrit tunnetaan. SSR-prosessia kuvaamaan valitaan viisi dimensiotonta m-parametria,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ ,  $m_4$  ja  $m_R$ . SSR:n tapauksessa  $m_1$ – $m_4$  kuvaavat jaeaikoja ja  $m_R$  kuvaa kierrätysfraktion kokoa. [16]

Yllä olevat parametrit määritetään siten, että tuoresyötön,  $m_{FF}$ , ja eluentin,  $m_E$ , tilavuudet yhdessä sykliässä suhteessa kolonnin kiintofaasin tilavuuteen määritellään yhtälöillä

$$m_{FF} = m_3 - m_2, \quad (7)$$

$$m_E = m_1 - m_4. \quad (8)$$

Lisäksi tuotejakeiden A ja B määrät suhteessa kolonnin kiintofaasin tilavuuteen määritellään yhtälöillä

$$m_A = m_3 - m_4, \quad (9)$$

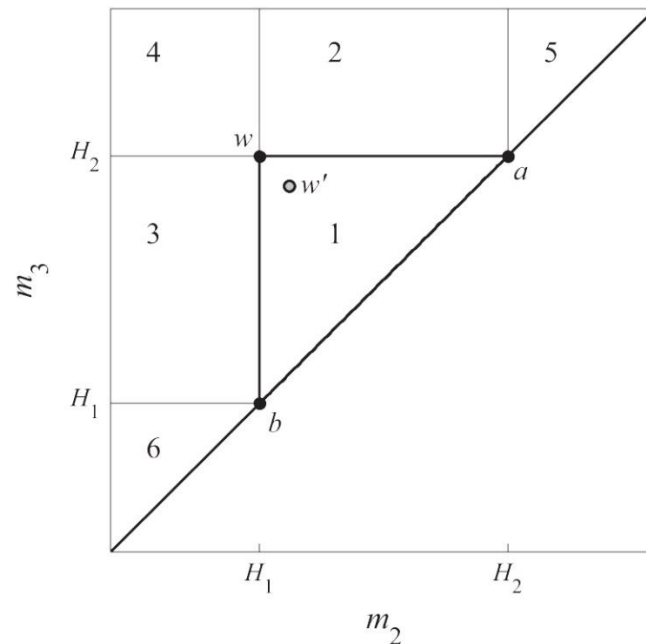
$$m_B = m_1 - m_2. \quad (10)$$

Yhtälöt (5)-(8) eivät määritä yksiselitteisesti parametreja  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  ja  $m_4$ , vaan yksi niistä täytyy määrittää erikseen. Tästä johtuen yhdellä neljästä m-parametrilla on sama numeerinen arvo kaikissa kromatografisissa prosesseissa toimiessaan samoissa olosuhteissa. Taulukossa I on esitetty m-parametrien määritelmät, kun  $m_1$ -parametri on määritelty siten, että sen alin raja-arvo on yhtä suuri kaikille prosesseille ideaali olosuhteissa ja ensimmäisenä erottuvan komponentin puhtausvaatimus on 100 %. [16] Valitsemalla sopivat  $m_2$  ja  $m_3$  parametrit päästään haluttuun syöttöliuoksen erotukseen, kun taas  $m_1$  ja  $m_4$  parametrit liittyvät kiinteän ja nestefaasin regeneroitumiseen. [16]

Laaduttomat suunnitteluparametrit mahdollistavat toteuttamiskelpoisen kahden komponentin täydellisen erotuksen alueen määrittämisen  $m_2, m_3$ -tasossa (Kuva 6).  $m_2, m_3$ -tason avulla voidaan määrittää parametrit, joiden avulla haluttu erotus saavutetaan.

Taulukko I. m-parametrien laskeminen panos- ja SSR-prosessille. Panosprosessille  $m_R=0$ .

$m_1$	$\frac{Q(t_{B2}-\Delta t_f)-\varepsilon V_{bed}}{(1-\varepsilon)V_{bed}} = \frac{\tau_{B2}-\Delta\tau_F-1}{F} \quad (1.1)$
$m_2$	$\frac{Q(t_{B1}-\Delta t_f)-\varepsilon V_{bed}}{(1-\varepsilon)V_{bed}} = \frac{\tau_{B1}-\Delta\tau_F-1}{F} \quad (1.2)$
$m_3$	$\frac{Qt_{A2}-\varepsilon V_{bed}}{(1-\varepsilon)V_{bed}} = \frac{\tau_{A2}-1}{F} \quad (1.3)$
$m_4$	$\frac{Qt_{A1}-\varepsilon V_{bed}}{(1-\varepsilon)V_{bed}} = \frac{\tau_{A1}-1}{F} \quad (1.4)$
$m_R$	$\frac{V_R}{(1-\varepsilon)V_{bed}} = \frac{\tau_{B1}-\tau_{A2}}{F} \quad (1.5)$



Kuva 6. Erottumisalueet SMB-, panos- ja SSR-prosesseille lineaarisissa olosuhteissa. 1 = täydellisen erottumisen alue, 2 = puhdas tuote B ja epäpuhdas tuote A, 3 = puhdas tuote A ja epäpuhdas B, 4 = molemmat tuotteet ovat epäpuhtaita, 5 = tuote A tulvitetaan puhtaalla syötöllä ja tuote B eluentin, 6 = tuote A tulvitetaan eluentin mukana ja tuote B puhtaan syötön. Piste  $w'$  on vakaa toimintapiste täydellisen erottumisalueen sisällä. Pisteessä  $w$  saavutetaan suurin tuottavuus ja pienin eluentin kulutus. [16]

Täydellisen erottumisen aikaansaamiseksi  $m$ -parametrien raja-arvot voidaan ilmaista seuraavassa yleisessä muodossa:

$$m_{1,min} \leq m_1 \quad (11)$$

$$m_{2,min} \leq m_2 \leq m_{2,max} \quad (12)$$

$$m_{3,min} \leq m_3 \leq m_{3,max} \quad (13)$$

$$m_4 \leq m_{4,max} \quad (14)$$

$$m_R \geq 0 \quad (15)$$

Yleisessä tapauksessa kaikkien  $m$ -arvojen ala- ja ylärajat riippuvat toisista  $m$ -parametreista, adsorptioisotermien parametreista, tuoresyötön konsentraatioista, ja kolonnin tehokkuudesta. Kuitenkin, jos  $m_1$  ja  $m_4$  valitaan niin, että ne varmistavat kiinteä- ja nestefaasin täydellisen regeneroitumisen, raja-arvot tulevat riippumattomiksi niistä. [16]

Panos-, SMB- ja SSR-prosesseja voidaan vertailla keskenään piirtämällä  $m_2$ - ja  $m_3$ -parametrit  $m_2, m_3$ -tasoon. Lineaaristen isotermien tapauksessa  $m_2, m_3$ -parametrien raja-arvojen avulla

saadaan aikaan kolmion muotoinen alue 1 (Kuva 6), jota rajaavat suorat ab, bw ja aw. Tämä edellä mainittu on täydellisen erottumisen alue, missä molempien tuotejakeiden puhtaudet ovat 100 %. Alueella 2 saadaan puhdasta tuotetta B, kun taas tuote A on epäpuhdasta. Samalla tavalla alueella 3 saadaan puhdasta tuotetta A, mutta epäpuhdasta tuotetta B. Jos käyttöparametrien pisteet osuvat alueelle 4, niin molemmat tuotteet ovat epäpuhtaita. Alue 5 viittaa tilanteeseen, jossa tuote A tulvii puhtaan syötön mukana ja B eluentin, kun taas alue 6 tarkoittaa päinvastaista tapausta. [16]

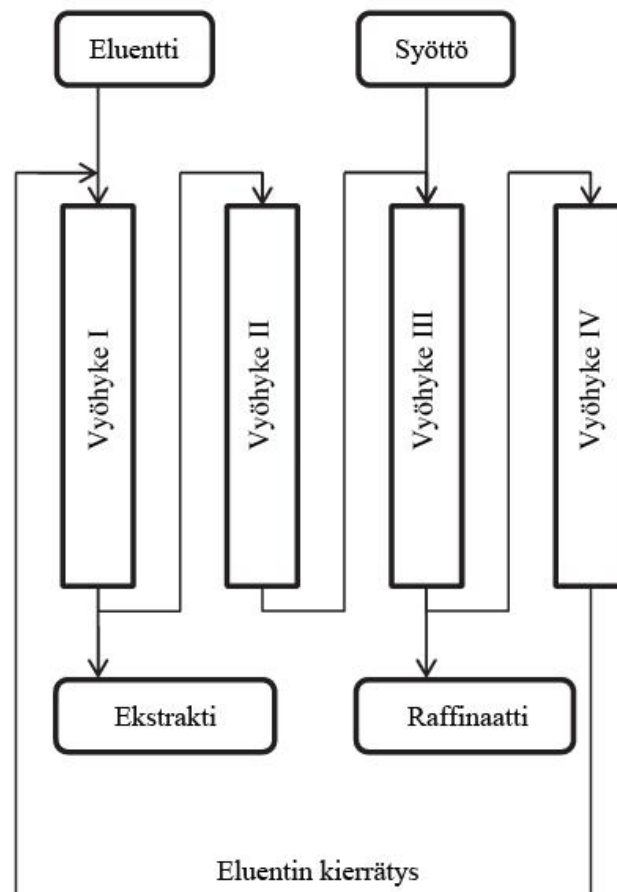
### 4.3 Simuloitu liikkuva peti -prosessi

Kromatografisessa erotuksessa jatkuvatoiminen prosessi, jossa liuos- ja kiintofaasit virtaavat vastakkaisiin suuntiin on mahdoton toteuttaa, koska kiinteän ja nestefaasin välille ei voida muodostaa vastavirtaliikettä korkeilla virtausnopeuksilla [13]. Tästä johtuen on kehitetty monikolonninen simuloitu liikkuva peti -prosessi (Simulated Moving Bed, SMB-prosessi), jossa faasien vastakkaissuuntaista liikettä simuloidaan siirtämällä eri virtojen sisään- ja ulosmenoportteja liuosfaasin suuntaisesti tietyin väliajoin. Näin voidaan simuloida vastavirtaliikettä kiintofaasin ja nestefaasin välillä. Kuten SSR-prosessi, on SMB-prosessi myös syklinen prosessi ja saavuttaa tietyn ajan kuluessa syklisen vakiotilan. [13]

Kuvassa 7 on esitetty tavanomainen 4-vyöhykkeinen SMB-prosessi, jota käytetään seosten erottamiseen kahdeksi fraktioksi. Systemissä olevat vyöhykkeet koostuvat yhdestä tai useammasta kolonnista. I vyöhyke on eluentin sisääntulon ja ekstraktin, eli voimakkaammin adsorboituvan komponentin ulostulon, välissä. Tällä alueella tapahtuu voimakkaammin adsorboituvan komponentin desorptio kiintofaasista ja kiintofaasin regeneroituminen. Vyöhyke I toimii myös puskurivyöhykkeenä, jonka tarkoituksena on estää voimakkaammin adsorboituvan komponentin liikkuminen vyöhykkeelle IV kierrätysvirran kautta. [13]

Komponenttien erottuminen tapahtuu vyöhykkeillä II ja III. Vyöhyke II sijaitsee ekstraktin ulostulon ja syötön sisäänmenon välissä ja siinä tapahtuu heikommin adsorboituvan komponentin desorptio kiintofaasista. Raffinaatin, eli heikommin adsorboituvan komponentin ulostulon ja syötön sisäänmenon välissä olevat kolonnit kuuluvat vyöhykkeeseen III ja siinä tapahtuu voimakkaammin adsorboituvan komponentin adsorptio. Binaariseoksen komponenteilla on päällekkäin menevät profiilit vyöhykkeillä II ja III. [13]

Vyöhykkeessä IV tapahtuu heikommin adsorboituvan komponentin adsorptio kiintofaasiin. Se on myös puskurialue, joka estää heikommin adsorboituvan komponentin liikkumisen vyöhykkeelle I kierrätysvirran kautta. Eluentia ja syöttöä syötetään jatkuvasti vyöhykkeiden I ja III ensimmäisten kolonnien sisäänmenoihin. Vähiten adsorboituva komponentti otetaan ulos systeemistä raffinaattina vyöhykkeen III viimeisestä kolonnista ja enemmän adsorboituva ekstraktina vyöhykkeen I viimeisestä kolonnista. Kun SMB-prosessin portteja siirretään liuosvirran suunnan mukaisesti, simuloidaan kiintofaasin vastakkaissuuntaista liikettä. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä että vyöhykkeen III ensimmäisestä kolonnista tulee vyöhykkeen II viimeinen kolonni ja vyöhykkeen II ensimmäisestä kolonnista tulee vyöhykkeen I viimeinen kolonni ja niin edelleen. Komponenttien erotus saavutetaan vaihtelemalla virtausnopeuksia ja porttien siirron aikaväliä, jolloin voimakkaammin adsorboituva komponentti liikkuu kiintofaasin mukana kohti ekstraktin ulostuloaja heikommin adsorboituva kohti raffinaatin ulostuloa. Toisin sanoen heikommin adsorboituva komponentti on saatava liikkumaan nopeammin kuin porttien vaihtoväli (eli liikkuu liuosfaasin mukana) ja voimakkaammin adsorboituva hitaammin kuin porttien vaihtoväli (eli liikkuu kiintofaasin mukana). [13]

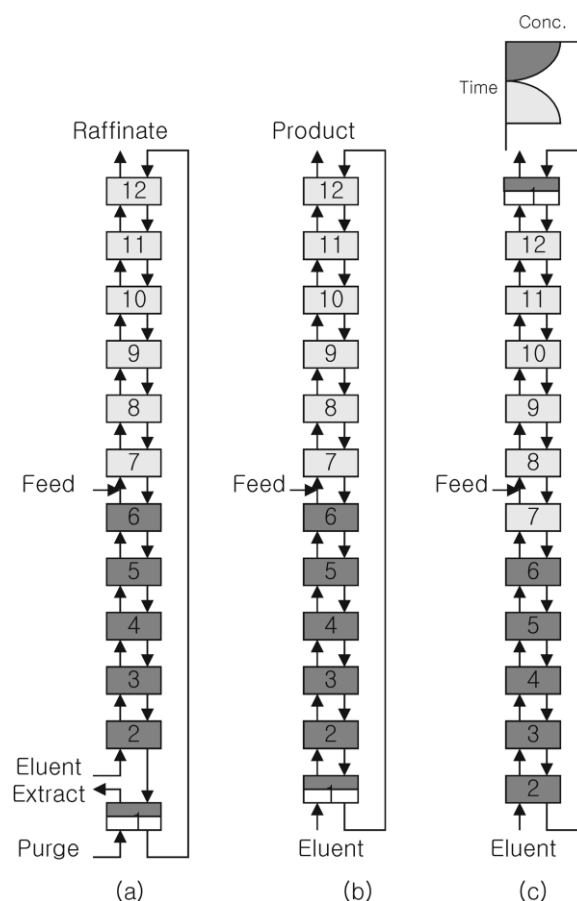


Kuva 7. Kaavakuva 4-vyöhykkeisestä SMB-laitteistosta. [13]

## 5 GLUKOOSI-FRUKTOOSISIIRAPIN KROMATOGRAFINEN FRAKTIOINTI

Glukoosi-fruktoosisiirapin kromatografista fraktiointia on tutkittu myös ennen tätä työtä. Julkaistuissa tutkimuksissa fraktiointi on suoritettu käyttämällä simuloitua liikkuva peti - prosessia [18–21].

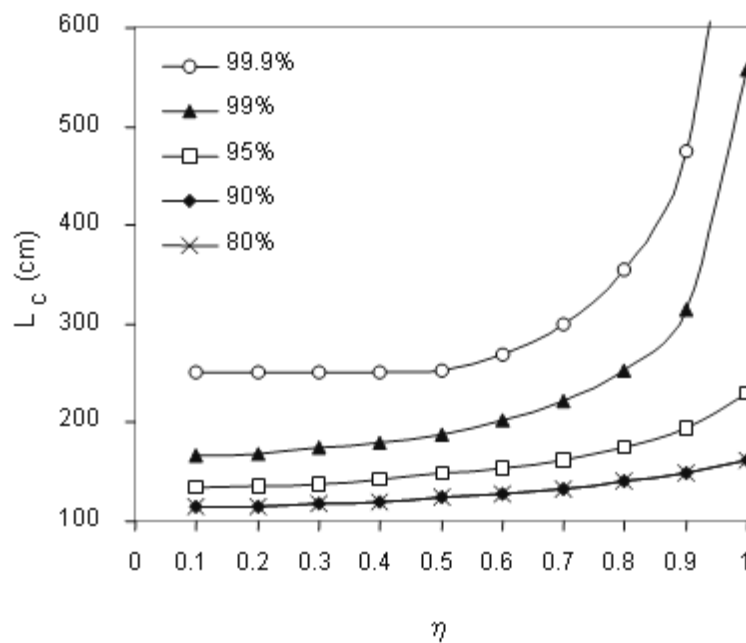
Kwang Nam Lee [18] tutki glukoosin ja fruktoosin erotusta kaksiosaisella SMB -laitteistolla ja vertaamalla sen erotustehokkuutta Baker *et al.* [19] käyttämään kolmiosaiseen SMB-laitteistoon (Kuva 8). Laitteistossa käytettiin 12 kolonna, jotka olivat valmistettu ruostumattomasta teräksestä ja täytetty Dowex 50W-X12  $\text{Ca}^{2+}$ -muodossa olevalla hartsilla. Kokeet suoritettiin 50 °C lämpötilassa ja syöttöliuos sisälsi 500 g/L molempia sokereita. Kaksiosaisella SMB -laitteistolla oli yhtä hyvä suorituskyky kuin kolmiosaisella laitteistolla ja fruktoosin maksimi puhtausasteeksi saatiin 96,98 %. [18]



Kuva 8. Baker *et al.* [19] käyttämä kolmiosainen SMB-laitteisto (a), ja Lee:n [18] käyttämä kaksiosainen SMB yhden vaiheen lopussa (b) ja seuraavan alussa (c).



Azevedo ja Rodrigues [20] ovat tutkineet glukoosin ja fruktoosin erotusta SMB-prosessilla simulointien avulla. Tutkimuksessa käytettiin glukoosi–fruktoosi-seosta, jossa molempien konsentraatiot olivat 400 g/L, erotusmateriaalina toimi  $\text{Ca}^{2+}$ -muotoinen Dowex Monosphere 99 ja prosessin operointilämpötila oli 50 °C. SMB-laitteistoon kuului 12 kolonnia, konfiguraatiossa 3:3:3:3. Erotettavien komponenttien puhtausvaatimukseksi asetettiin 99 %. Kuvassa 10 esitettynä simuloinnin tulokset, kun haluttiin tietää mikä on minimi kolonnin pituus halutulla puhtausasteella ja tuottavuudella. Tuottavuus on esitettynä dimensiottomana lukuna, joka riippuu glukoosin ja fruktoosin adsorptioisotermeistä, kiinteän ja nestefaasin nopeuksien suhteesta sekä kiinteän ja nestefaasin tilavuuksien suhteesta. [20]

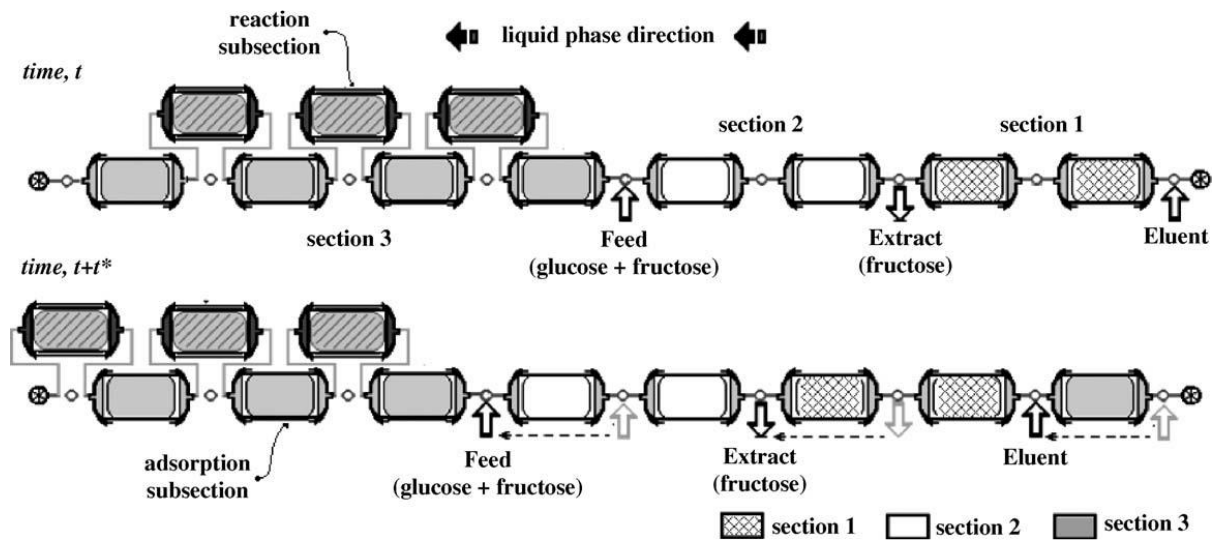


Kuva 10. Suunnittelu algoritmin antamat tulokset fruktoosin eri puhtausvaatimuksilla.  $L_c$  = kolonnin minimipituus,  $\eta$  = tuottavuus. [20]

D.C.S Azevedo ja A. Rodrigues [21] tutkivat fruktoosin ja glukoosin erotusta cashew omenoista SMB -kromatografian avulla. Kolonneina käytettiin Eleven Superformance SP 300x26 (Götec Labortechnik) lasikolonneja, ja hartsina käytettiin Dowex Monosphere 99/Ca (Supelco) kationinvaihtohartsia. Prosessin operointilämpötila oli 30 °C ja syöttöliuos sisälsi 40 g/L molempia sokereita. SMB laitteistoon kuului 11 kolonnia, joista vyöhykkeissä I-III oli kolme kolonnia per vyöhyke ja vyöhykkeessä IV oli kaksi kolonnia. Prosessilla päästiin 87,4 % puhtauteen fruktoosin suhteen ja 89,2 % glukoosin suhteen. [21]

Borges da Silva *et al.* [22] tutkivat glukoosi-fruktoosisiirapin valmistusta ja sokereiden erottamista toisistaan käyttämällä reaktiivista SMB-reaktoria. Kuvassa 9 esitettynä käytetty

reaktorisysteemi, joka koostuu erotuskolonneista ja bioreaktoreista, joissa glukoosin isomeroituminen tapahtuu. Katalyyttina isomeroitireaktiossa käytettiin kaupallista Sweetzyme IT:tä (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Tanska), jonka partikkelikoko oli 0,4-1,0 mm. Glukoosin ja fruktoosin kromatografisessa fraktionnissa erotusmateriaalina käytettiin  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{Mg}^{2+}$  muodossa olevia CG11CS kationinvaihtohartseja (valmistaja Finex Oy, Suomi).  $\text{Ca}^{2+}$ -muodossa olevan hartsin erotustekijäksi saatiin 1,52 ja  $\text{Mg}^{2+}$ -muodossa olevan 1,20. Kyseisellä reaktorilla päästiin fruktoosin 90 % puhtausasteeseen eli 90 % syötetystä glukoosista isomeroitiin fruktoosiksi. [22]



Kuva 9. SMB-reaktorilaitteisto glukoosi-fruktoosisiirapin valmistamiseksi ja fraktioimiseksi. [22]

## 6 KOKEIDEN SUORITUS

### 6.1 Käytetyt materiaalit ja kemikaalit

Työssä käytettiin hartsina geelimäistä vahvaa kationinvaihtohartsia CS11GC (Finex Oy)  $\text{Ca}^{2+}$ -muodossa, joka muutettiin  $\text{Ca}^{2+}$ -muotoon kalsiumkloridilla, jonka konsentraatio oli 1 mol/L ( $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich). Kaikissa kokeissa ja analyyseissa käytettiin ELGA CENTRA-R 60/120 -laitteella (ELGA, USA) puhdistettua vettä. Isotermimäärityksissä ja erotuskokeissa käytettiin synteettistä glukoosi–fruktoosiseosta, joka oli valmistettu D-(+)-glukoosista ( $> 99,5\%$ , Sigma Aldrich) ja D-(-)-fruktoosista ( $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich). Hartsipedin tyhjätila ja huokoisuus määritettiin Blue Dextran 2000:lla (Amersham Pharmacia).

### 6.2 Hartsipedin huokoisuuden määrittäminen

Hartsipedin tyhjä tilavuus ja huokoisuus määritettiin suuren moolimassan (2000 kg/mol) omaavan Blue Dextranin avulla. Dekstraani ei kokonsa puolesta mahdu geelimäisen hartsin huokosiin, ja näin ollen sen avulla voidaan määrittää hartsipedin tyhjätila ja huokoisuus [23]. Dekstraani-pulssien retentioajoista voidaan laskea hartsipedin huokoisuus:

$$\varepsilon = \frac{V_R}{V_{bed}}, \quad (16)$$

missä  $V_R$  on Blue Dextran 2000:n retentioaika ja  $V_{bed}$  kolonnin tilavuus.

Huokoisuuden määrittämisessä kolonniin syötettiin kuusi 0,5 mL dekstraanipulssia, joiden konsentraatio oli 1,5 g/L virtausnopeudella ollessa 1 mL/min.

### 6.3 Adsorptioisotermien määrittäminen

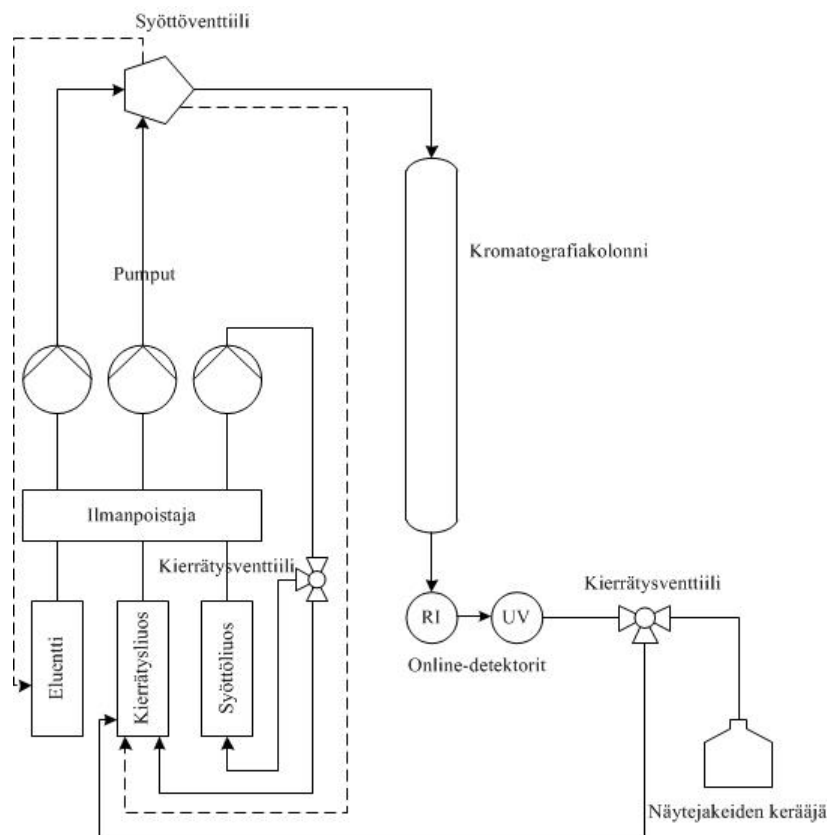
Glukoosin ja fruktoosin adsorptioisotermi  $\text{Ca}^{2+}$ -muotoiseen CS11GC-hartsiin määritettiin frontal analysis -menetelmällä, jossa isotermi määritetään syöttökonsentraation ja läpikulkuajien avulla [23]. Tässä työssä käytettiin porrasmenetelmää, jossa syöttökonsentraatiota kasvatetaan askelittain. Adsorptioisotermi määritetään läpikulkuajan avulla sokereiden läpäisykäyrien käännepisteissä, jotka voidaan määrittää integroinnin avulla.

Glukoosin ja fruktoosin isotermi määritettiin vesiliuoksissa sekä glukoosin ja fruktoosin seoksissa, miten tutkitut sokerit vaikuttavat toistensa adsorptioon  $\text{Ca}^{2+}$ -muotoiseen CS11GC-hartsiin.

Kokeet tehtiin kymmenellä eri glukoosin ja fruktoosin konsentraatiolla välillä 40-400 g/L. Tutkittaessa glukoosin ja fruktoosin vaikutusta toistensa adsorptioon, toisen sokerin määrää vaihdeltiin 80-320 g/L välillä ja toisen sokerin konsentraatio pidettiin vakiona 200 g/L. Isotermien määrittämisessä käytettiin virtausnopeutena 1,77 mL/min ja detektorina käytettiin taitekerroindetektoria.

#### 6.4 Kromatografinen erotus

Kokeissa käytettiin vesivaipallista ECO SR 15/750 kolonnia (YMC Europe), jonka pituus oli 70 cm ja sisähalkaisija 1,5 cm. Pumppuina käytettiin Waters:n 515 HPLC pumppuja. Detektoreina käytettiin RI 2000 -taitekerroindetektoria (Schambeck SFD) ja 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance UV-absorbanssidetektoria (Waters). Kaikki kokeet suoritettiin 50 °C asteen lämpötilassa. Kuvassa 11 esitettynä käytetty koelaitteisto.



Kuva 11. Panos- ja SSR-prosessissa käytetty kromatografialaitteisto. Online-detektorit: RI = taitekerroin; UV = UV-absorbanssi.

### 6.4.1 Panoserotus

Kierrätyskromatografiaprosessin suunnittelua varten ja isotermien validointia varten tehtiin kaksi pulssikoetta. Syöttöliuoksena käytettiin liuosta, jossa oli  $200 \text{ g/dm}^3$  glukoosia ja  $144 \text{ g/dm}^3$  fruktoosia eli syöttö vastasi sokereiden prosenttiosuuksien puolesta HFCS-42 glukoosi-fruktoosisiirappia. Syöttöpulssien koko oli 25 % ja 15 % kolonnin tilavuudesta ja virtausnopeus oli 2,65 mL/min. Kokeesta kerättiin 1 mL tuotefraktiot 1 minuutin välein.

### 6.4.2 Kierrätyskromatografia

SSR-prosessissa syöttöpulssin tilavuudeksi valittiin 25 % kolonnin tilavuudesta. Kierrätyskromatografisen prosessin kokeiden puhtausvaatimukseksi asetettiin 78 % molemmille tuotteille. Prosessia ajettiin kymmenen sykliä, jolloin se oli saavuttanut vakiotilan ja sykleistä 1, 5, 8 ja 10 kerättiin tuotefraktiot HPLC-analyysia varten. SSR-prosessin koelaitteisto esitetty kuvassa 10 ja prosessissa käytetyt käyttöparametrit on esitetty taulukossa II.

Taulukko II.

$C_{\text{glukoosi}}$	200 g/L
$C_{\text{fruktoosi}}$	144 g/L
Q	2.65 mL/min
$V_{\text{pulssi}}$	30.925 mL
$V_{\text{tuoesyöttö}}$	17.346 mL
$V_{\text{kierrätys}}$	13.579 mL
$t_{\text{sykli}}$	45 min
$t_{A2}$	35.433 min
$t_{B1}$	40,557 min

### 6.5 Analyysit

Liuosten sokerikonsentraatiot määritettiin Agilent/HP 1100 HPLC-nestekromatografilaitteistolla. Esikolonniina käytettiin SHODEX SP-G ja erotuskolonniina SHODEX SP0810 -kolonni. Kolonnin lämpötila oli  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  astetta, virtausnopeus 0,8 mL/min ja eluenttina käytettiin vettä.

## 7 LASKENTA

### 7.1 Isotermien määrittäminen ja mallinnus

Frontal analysis -menetelmällä määritettyjen sokereiden läpäisykäyrien avulla laskettiin kutakin liuosfaasin sokerikonsentraatiota vastaava adsorboitunut sokerikonsentraatio yhtälöllä

$$q_i = q_{i-1} + \frac{(C_i - C_{i-1})(V_{E,i} - V_0)}{(1 - \varepsilon)V_{bed}}, \quad (17)$$

missä  $C$  on liuoksen konsentraatio,  $V_{E,i}$  eluutio tilavuus käyrän käännealueella,  $V_0$  kolonnin tyhjä tilavuus,  $\varepsilon$  huokoisuus,  $V_{bed}$  kolonnin tilavuus.

Yhtälöstä 17 määritettyihin isotermeihin sovitettiin anti-Langmuir isotermimalli:

$$q = \frac{q_{S1} b_1 C_1}{1 - b_1 C_1 - b_2 C_2}, \quad (18)$$

jossa  $q_{S1}$  ja  $b$  ovat isotermiparametrit glukoosille ja fruktoosille (Taulukko III).

Taulukko II.

Langmuir-isotermimallin parametrit

	Glukoosi	Fruktoosi
b	4.60E-04	4.02E-04
q <sub>s</sub>	1318	1208

### 7.2 SSR-prosessin suunnittelu

Pulssikokeiden tulosten ja MATLAB-ohjelman avulla simulointiin kierrätyskromatografista prosessia ja verrattiin sitä panoskromatografiaan, kun glukoosin ja fruktoosin puhtausvaatimuksiksi asetettiin 75-80 % ja 85 %. Simulointitulosten perusteella SSR-prosessin syöttöpulssin kooksi valittiin 25 %.

### 7.3 Panos- ja SSR-prosessien tehokkuuden arviointi

Panos- ja SSR-prosessien tehokkuutta voidaan arvioida eri suorituskyky parametreilla: erotusprosessin tuottavuus  $Pr$ , tuotteen saanto  $Y_i$ , tuotteen puhtaus  $Pu$  ja eluutin kulutus  $EC$ . Yhtälöt näiden laskemiseen on esitetty taulukossa IV.

Taulukko IV. Kierrätyskromatografisen prosessin tehokkuuden arvioimiseen käytetyt yhtälöt.

---

Tuottavuus	$Pr = \frac{n_i}{(1-\varepsilon)V_{bed}t_{sykli}} \quad (2.1)$
------------	--

---

Saanto	$Y_i = \frac{n_i^{ulos}}{C_i^{syöttö}V_{syöttö}} \quad (2.2)$
--------	---

---

Puhtaus	$Pu = \frac{n_i^{ulos}}{\sum_j n_j^{ulos}} \quad (2.3)$
---------	---

---

Eluentin kulutus	$EC = \frac{Qt_{sykli} - V_{syöttö}}{n_i} \quad (2.4)$
------------------	--

---

## 8 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

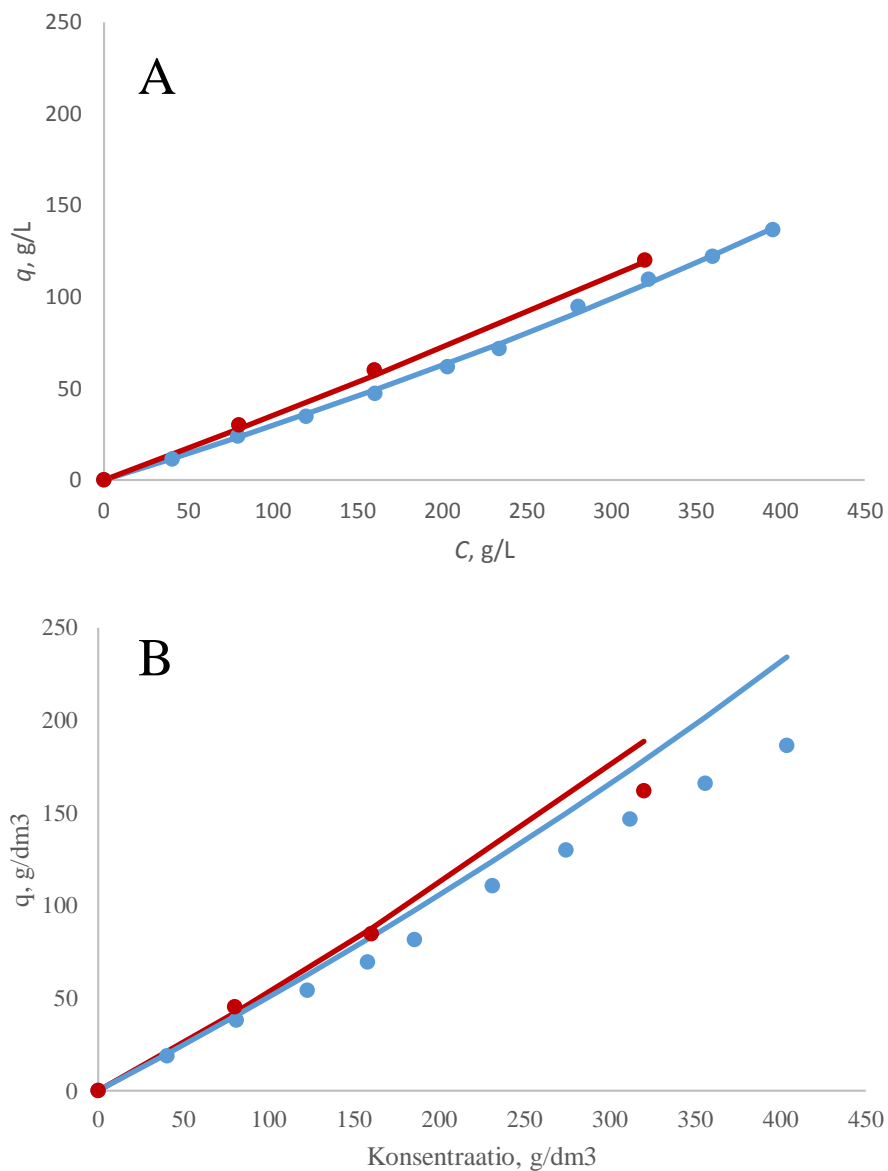
### 8.1 Glukoosin ja fruktoosin adsorptioisotermit ja niiden validointi

Kuvassa 12 on esitetty glukoosin ja fruktoosin isotermit sekä puhtaassa vedessä että toistensa läsnäollessa (200 g/L)  $\text{Ca}^{2+}$ -muotoiseen CS11GC-kationinvaihtohartsiin. Kummankin sokerin isotermit ovat hieman ylöspäin koveria eli anti-Langmuir -tyyppisiä. Isotermien epälineaarisuus johtuu epäideaalisuuksista liuosfaasissa, jotka johtuvat sokereiden pienistä jakautumisvakioista neste- ja kiintofaasin välillä [22]. Kuvista 12A ja 12B nähdään, että fruktoosilla on glukoosia suurempi adsorptio sekä se että toisen sokerin läsnäolo lisää adsorptiota, mutta se ei vaikuta isotermin muotoon.

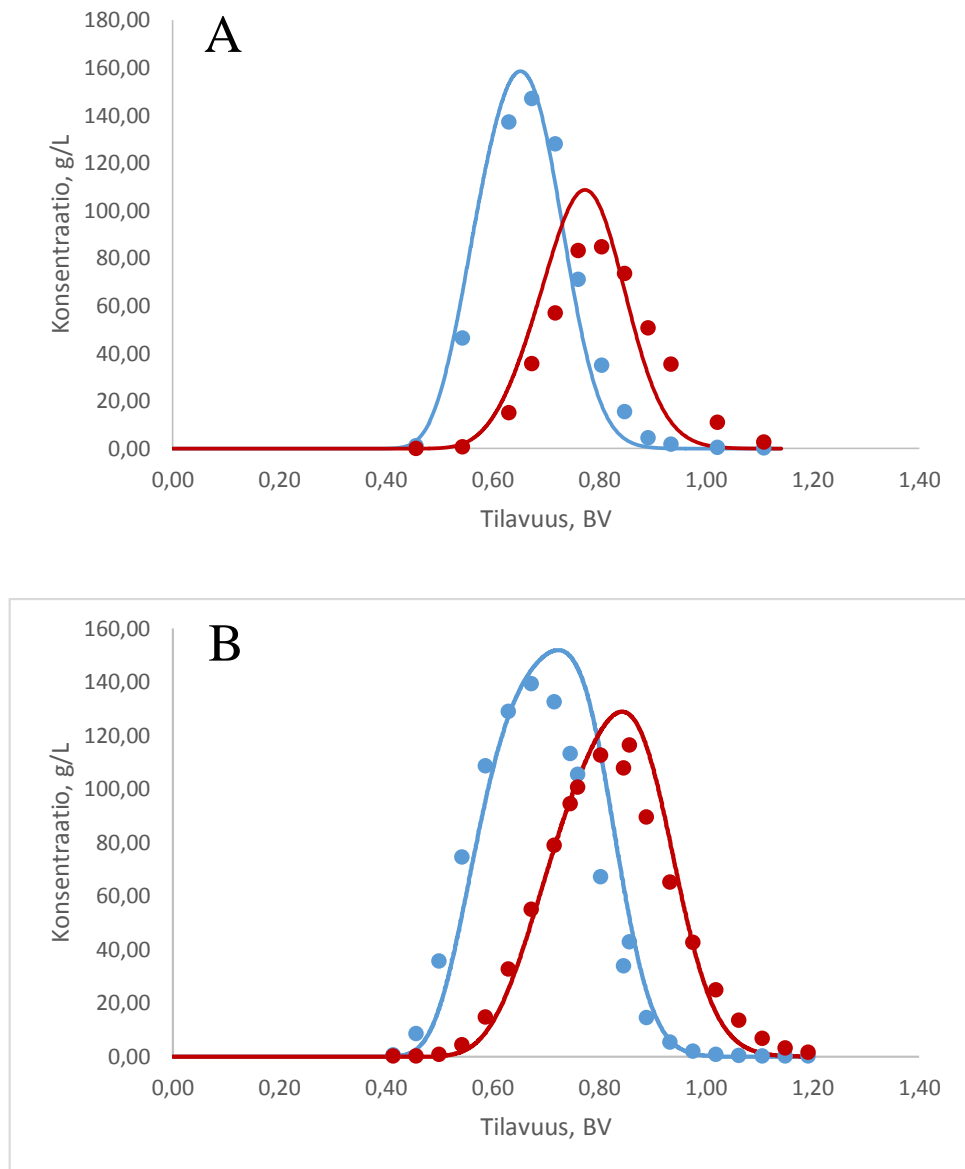
Kokeellisesti määritettyihin adsorptioisotermeihin sovitettiin anti-Langmuir -tyyppinen isotermimalli (Yhtälö 18) (Kuva 12). Isotermimalli validoitiin sovittamalla sen avulla saatu mallin ennuste kokeellisesti määritettyihin panoserotusdatoihin (Kuva 13A ja B). Isotermimallin sovituksessa käytettiin Matlab-ohjelmalle tehtyä kromatografisen erotuksen simulointiohjelmaa.

Glukoosin kohdalla kokeellisesti määritetty isotermit (Kuva 12A) ja siihen sovitettu isotermimalli kuvaa hyvin glukoosin käyttäytymistä kromatografisessa kolonnissa. Fruktoosin kohdalla kokeellisesti määritetty isotermit ennusti fruktoosille liian pientä adsorptiota (Kuva 12B). Tästä johtuen fruktoosin isotermimallin parametrejä säädettiin panoserotuskokeen datan perusteella siten, että mallin sovite fruktoosin koedataan oli mahdollisimman hyvä (Kuva 13A ja B). Glukoosi- ja fruktoosi-isotermien lievä epälineaarisuus ei näy panoserotuskokeesta kerätystä datasta (Kuva 12A ja B).





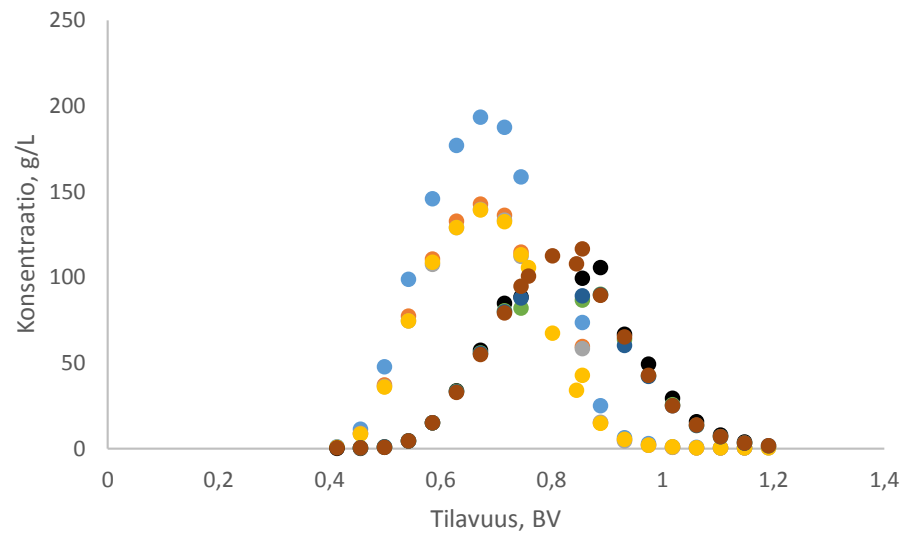
Kuva 12. Glukoosin (A) ja fruktoosin (B) adsorptioisotermit  $\text{Ca}^{2+}$ -muotoiseen vahvaan PS-DVB-runkoiseen kationinvaihtohartsiin CS11GC (Finex Oy). Koeolosuhteet: Frontal analysis -menetelmä;  $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $Q = 2,65\text{ mL/min}$ ;  $d_{\text{col}} = 1,5\text{ cm}$ ;  $h_{\text{col}} = 69\text{ cm}$ . Värit: sininen = isotermi puhtaassa vedessä; punainen = isotermi kun läsnä on  $200\text{ g/L}$  toista sokeria. Symbolit = koetulokset; viivat = mallin (Yhtälö 18) sovite.



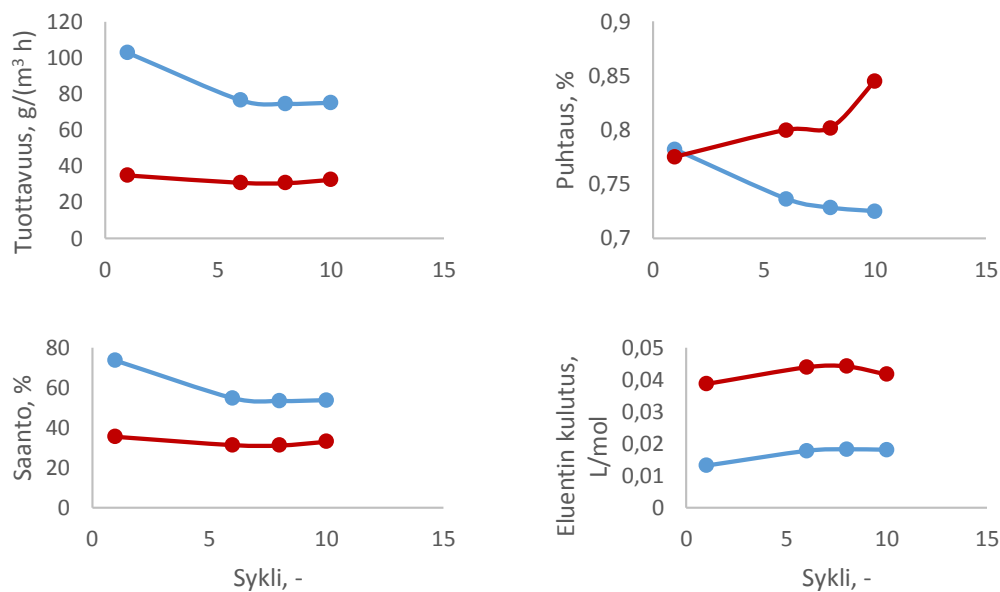
Kuva 13. Glukoosin ja fruktoosin erotus  $\text{Ca}^{2+}$ -muotoisella kationinvaihtohartsilla täytetyssä kromatografiakolonnissa kolonniin syötettävän pulssin tilavuuden ollessa 15 til. % (A) ja 25 til. % (B) kolonnin tilavuudesta. Koeolosuhteet:  $Q = 2,65 \text{ mL/min}$ ; muut koeolosuhteet annettu kuvan 12 kuvatekstissä. Symbolit: annettu Kuvan 12 kuvatekstissä.

## 8.2 Glukoosin ja fruktoosin erotus SSR-prosessilla

Kuvassa 14 on esitettyä glukoosin ja fruktoosin ulostuloprofiilit SSR-prosessin eri sykleissä; viimeisellä syklillä on mukana glukoosin ja fruktoosin ne osat, jotka menevät kierrätykseen.



Kuva 14. Glukoosin ja fruktoosin erotus  $\text{Ca}^{2+}$ -muotoisella kationinvaihtohartsilla täytetyssä kromatografiakolonnissa kolonniin syötettävän pulssin tilavuuden ollessa 25 til. % kolonnin tilavuudesta. Koeolosuhteet:  $Q = 2,65 \text{ mL/min}$ ; muut koeolosuhteet annettu kuvan 12 kuvatekstissä. Sininen = glukoosi 1. sykli, oranssi = glukoosi 6. sykli, harmaa = glukoosi 8. sykli, keltainen = glukoosi 10. sykli, musta = fruktoosi 1. sykli, vihreä = fruktoosi 6. sykli, tumman sininen = fruktoosi 8. sykli, punainen = fruktoosi 10. sykli.

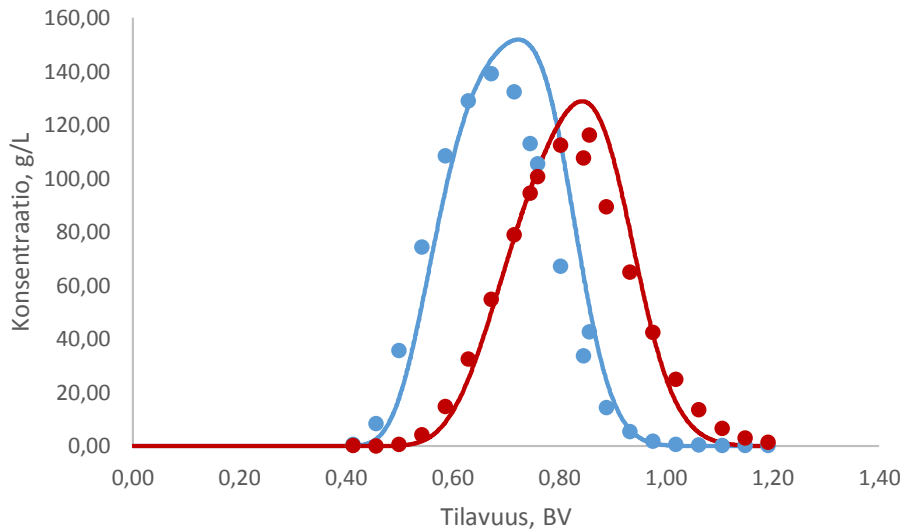


Kuva 16. SSR-prosessilla saavutetut glukoosin ja fruktoosin tuottavuudet (a), puhtaudet (b), saannot (c) ja eluentin kulutukset glukoosille (sininen) ja fruktoosille (punainen).

Kuvasta 16 ja taulukosta V nähdään, että SSR-prosessi on saavuttanut vakiotilan 10. syklin kohdalla. Kierroksella 10 ei kierrätetty mitään vaan myös se osuus mikä olisi pitänyt kierrättää kerättiin fraktioina, jotta nähdään millaiset ovat glukoosin ja fruktoosin ulostuloprofiilit vakiotilassa kierrätysfraktion kohdalla. Fruktoosilla päästään yli (80 %) tavoitteeksi asetetun puhtausvaatimuksen (78 %), koska kun taas glukoosilla (72,5 %) ei päästä puhtaus tavoitteeseen, koska glukoosin ja fruktoosin ulostulo profiilit ovat liian lähellä toisiaan. Glukoosilla tuottavuus, saanto, ja puhtaus laskevat prosessin eri sykleissä, kunnes saavutetaan vakiotila. Fruktoosilla tuottavuus ja saanto pysyvät lähes vakioina syklistä riippumatta, fruktoosin suuri puhtaus viimeisellä kierroksella johtuu analyysivirheestä.

Aiemmin julkaistuissa SMB-tutkimuksissa [19-22] päästiin huomattavasti parempiin puhtauksiin glukoosin ja fruktoosin suhteen (Lee; fruktoosi; 96,98 %; Azevedo & Rodrigues; glukoosi ja fruktoosi; 89,2 % ja 87,4 %; Silva; fruktoosi; 90 %) kuin tässä työssä tutkitulla SSR:llä (glukoosi ja fruktoosi; 72,5 % ja 78 %).

Kuvassa 17 on esitetty SSR-prosessin MATLAB simuloinnin ja kokeellisen ajon tuloksien kromatogrammit esitettynä. Kuvasta nähdään, että simuloinnissa käytetty mallin vastaa hyvin todellisuutta.



Kuva 17. SSR-prosessin MATLAB simuloinnin (ehyt viiva) ja kokeen (pisteet) kromatogrammit, glukoosi = sininen, punainen = fruktoosi. Koeolosuhteet:  $Q = 2,65 \text{ mL/min}$ ; muut koeolosuhteet annettu kuvan 12 kuvatekstissä.

Taulukko V. SSR-prosessin koetulosten perusteella lasketut tuottavuudet, puhtaudet, saannot ja eluentin kulutukset glukoosille ja fruktoosille.

Sykli	Pr glukoosi	Pr fruktoosi	Pu glukoosi	Pu fruktoosi	Y glukoosi	Y fruktoosi	EC glukoosi	EC fruktoosi
-	g/(L h)		%		%		L/g	
1	102.782	34.983	0.782	0.775	73.547	35.492	0.013	0.039
6	76.386	30.825	0.737	0.800	54.659	31.273	0.018	0.044
8	74.370	30.628	0.728	0.802	53.216	31.074	0.018	0.044
10	74.951	32.491	0.725	0.845	53.632	32.963	0.018	0.042

Taulukossa VI on esitetty simuloinnin tulokset, kun vertaillaan panos- ja kierrätyskromatografistaprosessia keskenään. Tuloksista nähdään, että kun puhtausvaatimukset tiputetaan 75 % molemmille tuotteille, niin SSR:n (tuottavuus A:lle 69 g/(L h)) tuoma etu tuottavuuden ja eluentin suhteen panosprosessiin (tuottavuus A:lle 66 g/(L h)) verrattuna pienenee. Kun taas puhtausvaatimus nostetaan 85 % molemmille tuotteille, SSR:n tuoma etu puhtauden ja tuottavuuden suhteen menetetään, mutta ei eluentin kulutuksen suhteen (kulutus A:lle; SSR ja panos; 0,06 ja 0,12) (kulutus B:lle; SSR ja panos; 0,38 ja 0,74).

Erot simuloitujen ja kokeellisten tulosten puhtauksien välillä johtuvat pääasiassa käytetyn isotermimallin epätarkkuudesta fruktoosin tapauksessa.

Taulukko VI. SSR ja panosprosessin puhtauksien, tuottavuuksien ja eluentin kulutuksen vertailua, kun tuotteille on asetettu erilaisia puhtausvaatimuksia. A ja 1 = glukoosi, B ja 2 = fruktoosi.

<b>85 % puhtausvaatimus kummallekin tuotteelle</b>						
	PUA	PUB	PR(1)	PR(2)	EC(1)	EC(2)
	%		g/m <sup>3</sup> (hartsia) h		dm <sup>3</sup> /g	
<b>SSR</b>	0.65	0.99	12.96	2.13	0.06	0.38
<b>Panos</b>	0.65	0.97	10.77	1.70	0.12	0.74
<b>80 % puhtausvaatimus kummallekin tuotteelle</b>						
<b>SSR</b>	0.78	0.90	42.43	19.09	0.02	0.04
<b>Panos</b>	0.78	0.87	15.03	7.01	0.08	0.17
<b>79 % puhtausvaatimus kummallekin tuotteelle</b>						
<b>SSR</b>	0.77	0.89	48.20	21.67	0.02	0.04
<b>Panos</b>	0.77	0.88	20.01	9.15	0.06	0.13
<b>78 % puhtausvaatimus kummallekin tuotteelle</b>						
<b>SSR</b>	0.77	0.87	53.72	23.96	0.02	0.03
<b>Panos</b>	0.77	0.87	31.83	14.14	0.04	0.08
<b>77 % puhtausvaatimus kummallekin tuotteelle</b>						
<b>SSR</b>	0.76	0.87	58.57	25.46	0.01	0.03
<b>Panos</b>	0.76	0.87	46.85	20.35	0.02	0.05
<b>76 % puhtausvaatimus kummallekin tuotteelle</b>						
<b>SSR</b>	0.76	0.85	63.80	27.58	0.01	0.03
<b>Panos</b>	0.76	0.85	56.47	24.35	0.02	0.04
<b>75 % puhtausvaatimus kummallekin tuotteelle</b>						
<b>SSR</b>	0.75	0.83	69.59	30.55	0.01	0.03
<b>Panos</b>	0.75	0.83	66.62	29.24	0.01	0.03

Vertailemalla simuloinnin tuloksia (taulukko VI) ja koetuloksia (taulukko V) keskenään nähdään, että kokeessa päästiin parempiin glukoosin ja fruktoosin tuottavuuksiin (MATLAB; 48,20 ja 21,67; glukoosi ja fruktoosi), mutta saavutetut puhtaudet olivat pienempiä kuin MATLAB simuloinnissa (MATLAB; 0,7728 ja 0,8877; glukoosi ja fruktoosi). Eli pienempi puhtaus tarkoittaa, että enemmän tuotetta on tuotefraktiossa ja näin ollen tuottavuus kasvaa. Vertailemalla eluentin kulutusta nähdään, että simuloinnissa (MATLAB; 0,02 ja 0,03; glukoosi ja fruktoosi) päästiin pienempään kulutukseen fruktoosin suhteen kuin kokeessa (Koetulokset; 0,02 ja 0,04; glukoosi ja fruktoosi)

## 9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä työssä selvitettiin voidaanko glukoosi–fruktoosisiirapin fraktiointiin käyttää kierrätyskromatografia prosessia (SSR). SSR-prosessin suunnittelua varten glukoosin ja fruktoosin adsorptioisotermit määritettiin frontal analysis -menetelmällä. Kokeellisesti määritettyihin isotermeihin sovitettiin anti-Langmuir -tyyppinen isotermimalli. Isotermit validoitiin panoserotuskokeessa saadun datan avulla. SSR-prosessi suunniteltiin panoserotuskokeesta saadun datan avulla hyödyntäen Unified design -menetelmää ja kokeista saatuja tuloksia verrattiin numeerisesti saatuihin tuloksiin.

Tulosten perusteella glukoosi-fruktoosisiirapin fraktiointi SSR-prosessilla onnistuu, mutta erotus on hankala sokereiden huonon erottumisen vuoksi käytetyssä systeemissä. SSR kokeiden ja simuloinnin tuloksien ja muiden tekemien SMB kokeiden tuloksien perusteella SMB:llä päästään parempiin glukoosin ja fruktoosin puhtauksiin kuin SSR:llä. Glukoosi–fruktoosierotuksen simuloinnissa käytetty isotermimalli kuvaa todellisuutta kohtuullisen hyvin. Kokeellisen ja simuloitujen tulosten välillä olevat erot johtuvat pääasiassa käytetyn isotermimallin epätarkkuudesta fruktoosin tapauksessa. SSR-prosessilla ei voida tuottaa erittäin puhtaita glukoosi ja fruktoosi määriä, jos tuottavuudet halutaan pitää suurina.

## LÄHDELUETTELO

1. A. R. Hallauer, Specialty Corns, Second Edition, CRC Press 2000. 40
2. K. Parker, M. Salas and V. C. Nwosu, High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 5(5), pp. 77–78 December 2010.
3. M. Shachman, *The Soft Drinks Companion: A Technical Handbook for the Beverage Industry*, 2014, CRC Press, s. 79–81.
4. M. de L. T. M. Polizeli, Mahendra Rai, *Fungal Enzymes*, CRC Press 2013.
5. British American Tobacco, [http://www.bat-ingredients.com/servlet/PageMerge?mainurl=%2Fgroupms%2Fsites%2FBAT\\_6X3ENK.nsf%2FvwPagesWebLive%2FEEB7C53A3AC263148025728B005D9C0D%3Fopendocument&alturl=%2Fgroupms%2Fsites%2FBAT\\_6X3ENK.nsf%2FvwPagesWebLive%2FD23047A62F4081DB8025725E0067DFAF%3Fopendocument&SKN=1&usealt=i\\_btn4%2Ci\\_show&i\\_CTRY=UK+Domestic&i\\_CLASS=STICK&i\\_BRAND=LUCKY%2BSTRIKE&i\\_btn4=%3E%3E&i\\_INGURL=%2Fgroupms%2Fgbl\\_ing\\_v3.nsf%2FvwMarketDetailsProductsTrans%2FLIVESTICKUK+Domestic2007ENGLISH%2F%24file%2FBS29115.html%3Fopenelement](http://www.bat-ingredients.com/servlet/PageMerge?mainurl=%2Fgroupms%2Fsites%2FBAT_6X3ENK.nsf%2FvwPagesWebLive%2FEEB7C53A3AC263148025728B005D9C0D%3Fopendocument&alturl=%2Fgroupms%2Fsites%2FBAT_6X3ENK.nsf%2FvwPagesWebLive%2FD23047A62F4081DB8025725E0067DFAF%3Fopendocument&SKN=1&usealt=i_btn4%2Ci_show&i_CTRY=UK+Domestic&i_CLASS=STICK&i_BRAND=LUCKY%2BSTRIKE&i_btn4=%3E%3E&i_INGURL=%2Fgroupms%2Fgbl_ing_v3.nsf%2FvwMarketDetailsProductsTrans%2FLIVESTICKUK+Domestic2007ENGLISH%2F%24file%2FBS29115.html%3Fopenelement), 20.03.2015.
6. Intro to Chromomatography, <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/CHROMO/chromintro.html>, 19.01.2015.
7. N. Hadden, F. Baumann, F. MacDonald, M. Munk, R. Stevenson, D. Gere, F. Zamaroni, Ronald Majors, *Basic liquid chromatography*, Varian Aerograph 1971, s. 2-1–2-8.
8. Principle of Chromatography, [http://separationprocesses.com/Adsorption/AD\\_Figures/CG\\_Fig001.gif](http://separationprocesses.com/Adsorption/AD_Figures/CG_Fig001.gif)
9. A. Braithwaite, F. J. Smith, *Chromatographic methods*, Fourth edition 1985, J. W. Arrowsmith Ltd, s. 98–102.
10. A. Braithwaite, F. J. Smith, *Chromatographic methods*, Fourth edition 1985, J. W. Arrowsmith Ltd, s. 99.
11. F. Helfferich, *Ion Exchange*, 1995, Dover Publications, s. 222–226.
12. J. Heinonen, *Isotermimäärityksistä*, 2015, Lappeenrannan teknillinen yliopisto, Lappeenranta.



13. J. Heinonen, T. Sainio, Chromatographic Fractionation of Lignocellulosic Hydrolysates. In Dmitry Yu. Murzin, editor: *Advances in Chemical Engineering*, Vol. 42, Burlington: Academic Press, 2013, pp. 274–285.
14. J. Heinonen, T. Sainio, Chromatographic Fractionation of Lignocellulosic Hydrolysates. In Dmitry Yu. Murzin, editor: *Advances in Chemical Engineering*, Vol. 42, Burlington: Academic Press, 2013, pp. 276.
15. T. Sainio, M. Kaspereit, Analysis of steady state recycling chromatography using equilibrium theory, *Sep. Purif. Technol.*, 66(2009), 9–18.
16. J. Siitonen, T. Sainio, Unified design of chromatographic separation processes, *Chemical Engineering Science* 112 (2015) 436–451.
17. M. Kaspereit, T. Sainio, Simplified design of steady-state recycling chromatography under ideal and nonideal conditions, *Chemical Engineering Science* 66 (2011) 5428–5438.
18. K. N. Lee, Continuous Separation of Glucose and Fructose at High Concentration Using Two-Section Simulated Moving Bed Process, *Korean J. Chem. Eng.*, 20(3), 532-537 (2003).
19. P. E. Barker, and R. E. Deeble, “Sequential Chromatographic Equipment for Separation of a Wide Range of Organic Mixtures,” *Chromatographia*, 8(2), 67 (1975).
20. D. C. S. Azevedo, A. E. Rodrigues, Design and optimization of new simulated moving bed plants, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 23 (2006) 171–181.
21. D.C.S Azevedo, A. Rodrigues, SMB Chromatography Applied to the Separation/Purification of Fructose from Cashew Apple Juice, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 17 (2000) 4–7.
22. E. A. Borges da Silva, A. A. Ulson de Souza, S. G. U. de Souza, A. E. Rodrigues, Analysis of the high-fructose corn syrup production using reactive SMB technology, *Chemical Engineering Journal* 118 (2006) 167–181.
23. M.L. Lameloise, V. Viard, *J. Chromatogr. A* 679 (1994) 255.
24. J. Heinonen, T. Sainio, Modelling and Performance Evaluation of Chromatographic Monosaccharide Recovery from Concentrated Acid Lignocellulosic Hydrolysates, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87 (2012), 1676–1686.