

## **Séparation des sucres d'un milieu de fermentation par chromatographie à lit mobile simulé (Simulated Moving Bed – SMB)**

### **Sugars separation in a fermentative broth by Simulated Moving Bed chromatography - SMB**

SEVERINO Antoni<sup>a\*</sup>, NOBRE Clarisse<sup>b</sup>, TEIXEIRA José<sup>b</sup>, RODRIGUES Ligia M.<sup>b</sup>, VANDE WOUWER Alain<sup>a</sup> et DE WEIRELD Guy<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Mons

Place du Parc, 20, 7000 Mons – Belgique \*[Antoni.Severino@umons.ac.be](mailto:Antoni.Severino@umons.ac.be)

<sup>b</sup> Université de Minho

Campus de Gualtar 4710-057 Braga - Portugal

#### **Résumé**

Des sucres tels que les fructo-oligosaccharides (FOS) sont bénéfiques pour leurs hôtes car ils stimulent la croissance de bactéries bénéfiques dans le colon du fait qu'ils ne sont pas digérés par l'organisme. Ces FOS peuvent être produits à grande échelle par un procédé de fermentation du sucrose dont le milieu résultant (FOS + autres sucres + sels) doit être séparé en ses différents constituants afin de respecter les normes agroalimentaires. Parmi les techniques permettant cette séparation, seule la chromatographie liquide est applicable à grande échelle afin d'obtenir les puretés requises. La technique de séparation par lit mobile simulé (Simulated Moving Bed – SMB) permet de rendre le procédé continu et de diminuer la consommation d'éluant tout en augmentant la productivité. L'efficacité des techniques chromatographiques dépendant en grande partie de la nature de l'adsorbant, une étude préliminaire a été réalisée dans le but d'identifier le meilleur adsorbant pour cette séparation. Une résine échangeuse d'ions choisie, différentes techniques d'identification des paramètres de fonctionnement ont été mises en œuvre afin de tester la séparation en mode SMB. Les résultats obtenus permettent de montrer qu'à partir d'un milieu de fermentation contenant 40% de FOS, il est possible d'obtenir un produit final pur à plus de 80%. Néanmoins, il a été mis en évidence que si la présence de sucrose dans le milieu de fermentation est inévitable, il faut absolument la contrôler au maximum pour éviter la pollution du produit final.

**Mots-clés : Sucres, Séparation, Chromatographie, SMB**

#### **Abstract**

Fructooligosaccharides (FOS) are non-digestible sugars which affect positively the host by stimulating the growth of specific bacteria in the colon. At large scale, FOS can be produced from sucrose through fermentation. The fermentative broth obtained from this process is a complex mixture. The application of these sugars in the food industry requires their fractionation in order to meet final product specifications. Simulated moving bed chromatography (SMB) appears to be an efficient downstream process for the fractionation of sugars at an industrial scale. Thanks to this technique it is possible to work continuously reducing the solvent consumption and increasing the productivity. The major challenge when designing the separation process is the choice of an efficient adsorbent. A preliminary study was thus realized in order to identify the best adsorbent. An ion exchange resin was chosen and several parametric identification techniques were performed in order to realize the SMB separation. The results display the possibility to increase the FOS purity from 40% to 80%. Nevertheless, it was also displayed that sucrose present in the broth troubles the separation and must be strictly controlled during the fermentation.

**Keywords: Sugars, Separation, Chromatography, SMB**

## 1. Introduction

Les fructo-oligosaccharides (FOS) sont des sucres non-digérés par l'organisme humain qui affectent positivement leur hôte en stimulant la croissance de bactéries spécifiques dans le colon lors de la digestion (Hidaka *et al.*, 1986). A l'échelle industrielle, les FOS peuvent être produits à partir du sucrose par une réaction de fructosyl-transférase favorisée par certains microorganismes. Le milieu obtenu lors de cette fermentation contient non seulement des sucres mais aussi des sels. Pour pouvoir être utilisés dans l'industrie, les différents sucres doivent être séparés pour respecter les réglementations agroalimentaires.

Les différents FOS contenus dans ce mélange sont le kestose (GF2), le nystose (GF3) et le fructo-furanosyl-nystose (GF4) formés à partir d'un fructose et, respectivement, deux, trois et quatre glucoses. On retrouve aussi, dans ce mélange, des monosaccharides comme le fructose (F) et le glucose (G) ainsi que du sucrose (S) que nous assimilons à un monosaccharide unique dans cette étude. L'objectif de ce projet étant la récupération de chaque FOS indépendamment des autres constituants du mélange, la séparation a été divisée en deux parties : la première consiste à séparer les FOS des monosaccharides avant la deuxième étape de séparation des FOS entre-eux.

Les techniques de chromatographie utilisées industriellement pour la séparation de sucres se basent sur le phénomène d'adsorption. La mise en œuvre de base de ces techniques est la séparation batch qui consiste à injecter ponctuellement une quantité de mélange dans une colonne remplie d'une phase dispersée et parcourue par un éluant liquide. En fonction de leur affinité pour l'adsorbant, les différents composés du mélange sont récupérés à des temps différents en sortie de colonne. Malheureusement, cette technique est grande consommatrice de solvant et conduit à une productivité limitée liée à la mauvaise utilisation de la phase stationnaire. Afin de remédier à ces inconvénients, différentes techniques ont été étudiées pour permettre la mise en continu du procédé. Elles présentent un déplacement contre-courant du mélange à séparer et de l'adsorbant dans un lit mobile ou fluidisé. Pour éviter les problèmes d'attrition, la technique du lit mobile simulé a été développée au début des années 1950 (Broughton et Gerhold, 1961). Cette technique consiste à utiliser plusieurs colonnes connectées en série et à simuler le mouvement contre-courant de la phase liquide et de l'adsorbant par un jeu de vannes alors que l'adsorbant est immobilisé dans chaque colonne fixe du système. Cette technique est utilisée depuis sa création dans le domaine de la séparation des sucres et hydrocarbures et plus récemment dans le domaine de la chimie fine et pharmaceutique.

## 2. Principe de fonctionnement d'un SMB

L'intérêt des procédés SMB par rapport aux procédés batch réside dans la diminution de la consommation de solvant et l'augmentation de la productivité dues au fait que le mélange à séparer, appelé charge, est injectée en continu dans le procédé et non plus de manière ponctuelle. En effet, dans le cas d'un système à huit colonnes tel que représenté à la figure 1, les différentes colonnes sont séparées par différentes vannes qui permettent, chacune, d'injecter la charge ou l'éluant (solvant(s) propre(s)) ou de soustraire l'extrait (composé le plus retenu par l'adsorbant) ou le raffinat (composé le moins retenu).

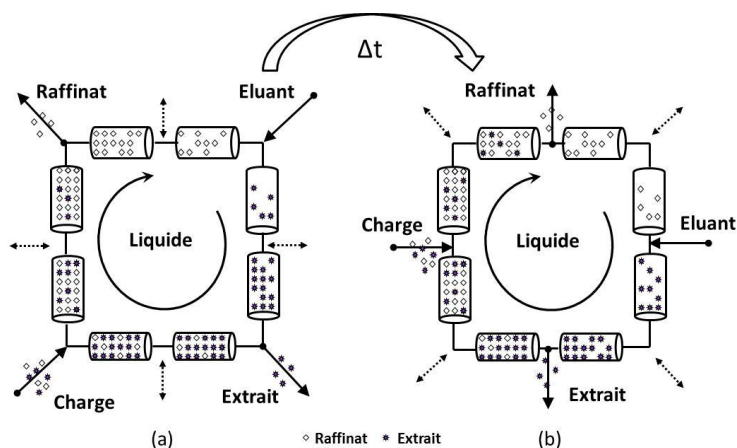


Figure 1. Principe de fonctionnement du jeu de vanne d'un procédé SMB

De la sorte, chacun des quatre flux externes (charge, éluant, extrait et raffinat) est alimenté de manière continue mais pas toujours au même endroit. Dans le cas de cette séparation, toutes les vannes changent de position en même temps, à la fin de la période,  $\Delta t$ , il s'agit du mode synchrone-SMB. Après autant de changement de position qu'il y a de colonnes dans le système, on revient à la situation initiale, il s'agit un procédé cyclique.

Les différentes colonnes se trouvant entre un point d'injection et un point de soutirage sont regroupées en zones comme illustré à la figure 2. On appelle zones de séparation, les zones II et III qui entourent l'injection de la charge, et zones de nettoyage, les zones I et IV qui encadrent l'injection de l'éluant.

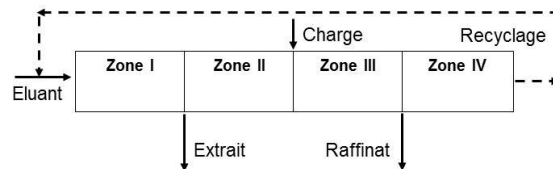


Figure 2. Représentation schématique des zones d'un SMB

Le design de tels procédés réside dans le choix du nombre de colonnes dans chaque zone, de la taille de ces colonnes ainsi que du type d'adsorbant et de l'éluant permettant la meilleure séparation. En plus de ces paramètres, d'autres caractéristiques physico-chimiques telles que la température, la concentration de la charge ou encore le ratio des différents composés du mélange à séparer doivent être maîtrisées ainsi que les paramètres hydrodynamiques. Il s'agit, dans ce dernier cas, de la période et des différents débits externes ( $Q_{charge}$ ,  $Q_{éluant}$ ,  $Q_{extrait}$  et  $Q_{raffinat}$ ) et internes dans les différentes zones ( $Q_I$ ,  $Q_{II}$ ,  $Q_{III}$  et  $Q_{IV}$ ) qui permettent d'obtenir les puretés requises en extrait et raffinat tout en respectant les pressions maximales des différents composants de l'installation (pompes, vannes, colonnes, ...).

### 2.1 Détermination des conditions opératoires

Les paramètres géométriques et physico-chimiques étant déterminés de manière expérimentale, la détermination des paramètres hydrodynamiques peut être réalisée grâce à la théorie dite du triangle (Mazzotti *et al.*, 1997). Cette théorie est basée sur la théorie de la chromatographie idéale négligeant la dispersion axiale ainsi que la résistance au transfert de masse et supposant l'équilibre d'adsorption établi en chaque instant à chaque endroit du système. La résolution du bilan matière d'une colonne du procédé permet de définir, moyennant l'utilisation du débit adimensionnel dans les différentes zones du procédé,  $m_j$  ( $j=I...IV$ ) [-], les conditions à respecter pour obtenir une bonne séparation. Dans le cas d'une séparation linéaire, comme c'est le cas pour les sucres, la quantité adsorbée de chaque composé  $i$ ,  $q_i$  [ $mol.g^{-1}$ ], est directement proportionnelle à la concentration de la phase liquide,  $c_i$  [ $mol.g^{-1}$ ], par l'intermédiaire du paramètre adimensionnel de Henry,  $H_i$  [-],

$$q_i = H_i \cdot c_i \quad (1)$$

ces conditions s'énoncent de la manière suivante :

$$m_I > H_A \quad H_B < m_{II} < m_{III} < H_A \quad m_{IV} < H_B \quad (2)$$

La deuxième condition représente, dans un plan ( $m_{II}$  ;  $m_{III}$ ), une zone de variation de ces débits permettant l'obtention de l'extrait et du raffinat purs. Dans le cas d'une séparation de composés dont l'équilibre entre la phase liquide et la phase solide est linéaire, la zone de variation est un triangle rectangle telle que représenté à la figure 3.

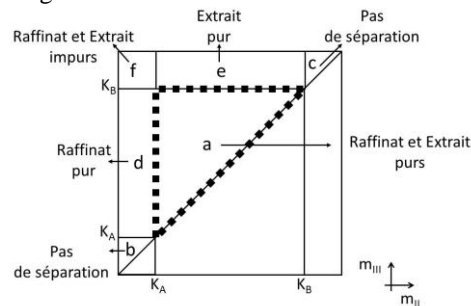


Figure 3. Représentation du triangle d'une séparation linéaire

Grâce à ce triangle et à ces conditions, il est possible de déterminer le débit réel dans les différentes zones,  $Q_j$  [ml.min<sup>-1</sup>], grâce à la définition des débits adimensionnels,  $m_j$  [-], qui tient compte de la porosité de l'adsorbant,  $\varepsilon$  [-], ainsi que du volume d'adsorbant dans la colonne,  $V$  [ml], et de la période de changement de position des vannes,  $\Delta t$  [min] :

$$m_j = \frac{Q_j * \Delta t - V * \varepsilon}{V * (1 - \varepsilon)} \quad (3)$$

### 3. Matériel

Les analyses de composition du milieu de fermentation ainsi que de la pureté des extraits et raffinats lors des tests de séparation SMB ont été réalisées sur une chaîne analytique HPLC Waters composée d'une pompe 600 (0-10ml.min<sup>-1</sup>), d'un système de contrôle/acquisition des données et d'un détecteur à indice de réfraction 2414 avec une colonne ALLTECH® Prevail™ Carbohydrates ES 250x4.6mm 5µm. La méthode analytique utilise, à 30°C, un éluant (70:30 v/v) acétonitrile/solution d'hydroxyde d'ammonium 0,04%. Tous les solvants et réactifs sont de pureté HPLC. L'acétonitrile a été fourni par CARLO ERBA, l'eau est dispensée par une installation MILLIPORE et l'hydroxyde d'ammonium provient de chez VWR ainsi que les monosaccharides (S-G-F) étalons. Les FOS étalons sont fournis par WAKO CHEMICALS GmbH.

L'installation SMB fournie par NOVASEP est un VARICOL LAB pouvant fonctionner avec, au plus, douze colonnes. Dans le cas de cette séparation, il a été décidé de travailler avec huit colonnes à raison de deux colonnes par zone. Les injections et soutirages sont réalisés à l'aide de pompe à deux pistons ARMEN. Une cinquième pompe permet de réaliser la circulation du liquide à l'intérieur du procédé, il s'agit de la pompe de recyclage. Un bain thermostaté permet de réguler la température. Le SMB est couplé à l'HPLC pour permettre la réalisation d'analyses en temps réel par l'intermédiaire d'une vanne automatique 6 voies RHEODYNE.

Les colonnes utilisées sur le SMB sont des colonnes semi-préparatives de 1,6 cm de diamètre sur une hauteur maximale de 30 cm réglable à l'aide de vis/piston. Il s'agit de colonnes transparente SUPERFORMANCE fournie par GÖTEC et pouvant résister à une pression de 80 bar. Ces colonnes sont munies d'une double enveloppe permettant de les thermostatier. Les adsorbants utilisés sont des résines DOWEX fournies par SIGMA-ALLDRICH.

### 4. Choix de l'adsorbant

De nombreuses séparations de sucres sont réalisées grâce à l'utilisation de résines échangeuses d'ions (Gramblicka *et al.*, 2008, Vente *et al.*, 2005). Il s'agit de résines sulfonées de polystyrène-codivinylbenzène (PS-DVB) largement utilisée industriellement pour tirer avantage de leur inertie chimique, de leur grande capacité ainsi que de leur grande sélectivité.

Différents tests ont été réalisés sur une colonne SUPERFORMANCE remplie avec différentes résines DOWEX™. La première résine testée est la 50WX2 (200-400 mesh – 37/74 µm) qui permet une résolution R=0.52 et une sélectivité  $\alpha=H_B/H_A=1.438$ . Malheureusement, les hauts débits de liquide conduisent à une importante augmentation de pression qui rend cette résine inutilisable dans un SMB. Nous avons donc testé la même résine mais avec des tailles de particules plus importantes, la 50WX2 50 (50-100 mesh – 149/297 µm), ce qui conduisit à une diminution de la résolution déjà mauvaise avec les petites particules. Notre choix final s'est donc porté sur la 99/320K (320±15 µm) pour laquelle, même si la résolution reste faible, R=0.58, pour une bonne séparation, la sélectivité,  $\alpha=61$ , est bien meilleure.

Ces résines sont fonctionnalisées avec des cations du type Ca<sup>++</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> qui peuvent former des complexes avec les groupements –OH des sucres en contact permettant une adsorption sélective. Ainsi, la conformation du sucre et le type de cation déterminent l'aptitude d'une résine à séparer lesdits sucres. Mais il faut aussi tenir compte de l'encombrement stérique ainsi que des interactions hydrophiles. Les résines sous forme Ca<sup>++</sup> sont les plus utilisées industriellement dans le domaine du F et du G car il se forme un complexe stable entre la résine et le F qui permet une séparation aisée de ces deux composés. Plusieurs auteurs (Nobre *et al.*, 2009) utilisent cette résine pour séparer F, G et S. Néanmoins, les résines sous formes K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> sont les plus recommandées car elles favorisent les cinétiques d'adsorption. Dans

le cas présent, il a été décidé d'utiliser la forme  $K^+$  et de préparer le milieu de fermentation comportant différents sels afin d'échanger tous les cations présents par du  $K^+$  afin de ne pas perturber l'équilibre d'adsorption et donc le phénomène de séparation.

## 5. Résultats

Une fois les colonnes conditionnées, les isothermes d'adsorption ont été déterminées par deux techniques différentes. Celle des temps de rétention (RTM) consiste à injecter une petite quantité du mélange à séparer ( $10\mu\text{l}$  de solutions 0 à  $20\text{ g.l}^{-1}$ ) sur une colonne et à calculer les paramètres d'Henry grâce aux temps de rétention et au bilan matière de la colonne. La méthode adsorption/désorption consiste à saturer la colonne semi-préparative avec des solutions de différentes concentrations et à en récupérer le contenu pour l'analyser avec la colonne analytique.

Tableau 1. Paramètres d'adsorption déterminés par deux méthodes expérimentales

	RTM	Ad/Des
$K_A$	0,014	0,2
$K_B$	0,322	0,4

Les résultats obtenus par ces deux techniques sont sensiblement différents et conduisent à des triangles distants comme illustré à la figure 4.

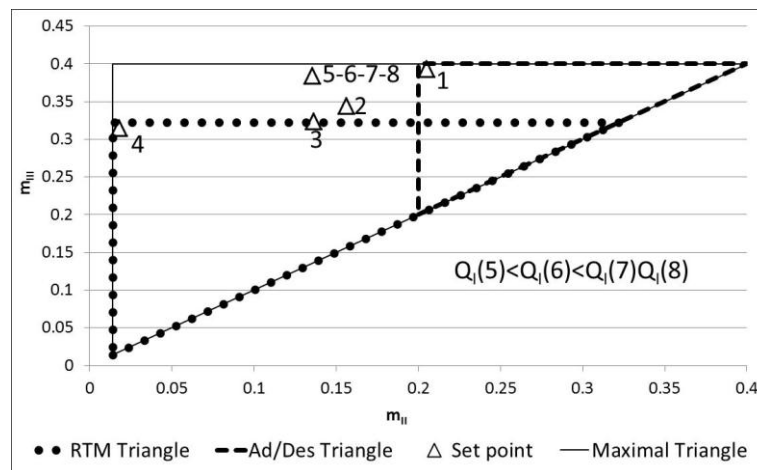


Figure 4. Triangle de la séparation FOS/SGF selon la technique de détermination des isothermes

Dans l'impossibilité de réaliser un choix entre ces deux méthodes, il a donc été décidé de réaliser plusieurs tests dans l'un ou l'autre triangle et de corriger les différents débits en fonction des résultats observés.

A partir des points correspondant aux sommets des deux triangles moyennant une marge de sécurité pour ne pas sortir de la zone de pureté maximale, différents tests de séparation SMB ont été réalisés dans la zone maximale étudiée, à savoir celle correspondant au plus petit  $H_A$  et au plus grand  $H_B$ . Les différents points testés (*set point*) sont représentés à la figure 4.

Comme illustré à la figure 5, il a été montré, expérimentalement, qu'à partir d'un milieu de fermentation composé d'environ 60% de SGF et de 40% de FOS, il est possible d'atteindre des puretés proches de 80% en FOS dans le raffinat. Cette augmentation de pureté pour le raffinat s'accompagne d'une diminution de celle de l'extrait qu'il faudrait éviter pour des questions de rendement. En effet, le but étant de récupérer les FOS dans le raffinat et les monosaccharides dans l'extrait, la diminution de la pureté de l'extrait signifie qu'une partie des FOS initialement présents dans la charge ne sortent pas dans le raffinat mais dans l'extrait. Il est néanmoins, envisageable de réaliser une nouvelle séparation de l'extrait pour diminuer cette perte.

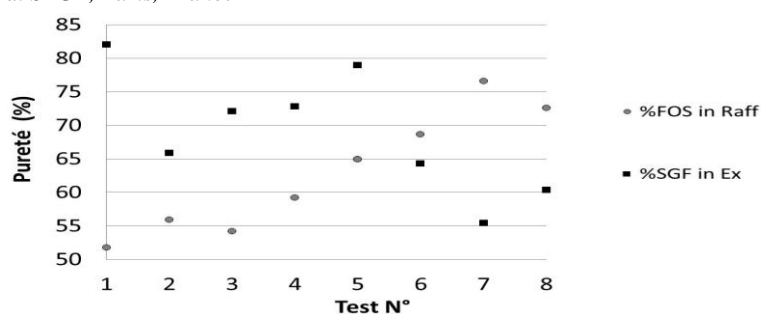


Figure 5. Résumé des puretés de l'extrait et du raffinat pour les différents tests de séparation SMB

Cette interdépendance des puretés de l'extrait et du raffinat réside dans la mauvaise résolution des pics correspondant aux deux groupes de sucres lors des tests batch. En effet, la résolution inférieure à l'unité ( $R=0.58$ ) signifie que les deux pics s'interpénètrent et se polluent donc l'un l'autre dans une certaine mesure. L'analyse en détail de l'extrait et du raffinat montre que le sucrose initialement présent dans le milieu de fermentation se répartit en part égale dans l'extrait et dans le raffinat. Il semble donc inutile d'envisager la poursuite expérimentale de l'augmentation de la pureté du raffinat dans les conditions opératoires actuelles. Néanmoins, d'autres actions peuvent être envisagées comme la modification des conditions de fermentation afin d'y empêcher l'accumulation des monosaccharides.

## 6. Conclusions et Perspectives

Suite aux différents tests réalisés, il a été mis en évidence que la séparation SMB des FOS et des monosaccharides SGF est réalisable à l'aide d'une résine échangeuse d'ions, comme adsorbant, et d'eau, comme seul éluant. Un travail de caractérisation de résines a préalablement dû être réalisé afin de mettre en évidence leurs propriétés de séparation. La préparation du milieu de fermentation a également dû être prise en compte avant la séparation SMB afin d'éviter l'influence des sels présents lors de la séparation.

La séparation SMB a alors été mise en pratique et a montré ses limites de par la présence du sucrose dans le milieu de fermentation. Afin de remédier à ce problème, plusieurs solutions expérimentales sont envisageables. Parallèlement à ce travail, le modèle mathématique permettant de simuler cette séparation est mis au point afin de déterminer la quantité maximale de sucrose qui pourrait être présente dans le milieu sans influencer la pureté du raffinat. Un travail d'identification paramétrique est également réalisé afin d'obtenir les paramètres d'adsorption à l'aide d'un simple chromatogramme et de la comparaison de ce résultat expérimental au modèle mathématique d'une colonne.

### Références

- Broughton, D. and Gerhold, C., Continuous sorption process employing fixed bed of sorbent and moving inlets and outlets, US patent 2,985,589, (1961).
- Gramblicka, M; Polakovic, M, Adsorption equilibria of glucose, fructose, sucrose, and fructooligosaccharides on cation exchange resins, *J.Chrom.A*, 1193, 1-2, 129-135 (2008).
- Hidaka H., Eida T., Takizawa T., Tokunaga T. and Tashiro Y., Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health, *Bifidobacteria Microflora*, 5, 37-50 (1986).
- Mazzotti, M., Storti, G., and Morbidelli, M., Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations. *J. Chrom. A*, 769, 3-24 (1997).
- Nobre, C., Santos, M. J., Dominguez, A., Torres, D., Rocha, O., Peres, A. M., Rocha, I., Ferreira, E. C., Teixeira, J. A. and Rodrigues, L. R., Comparison of adsorption equilibrium of fructose, glucose and sucrose on potassium gel-type and macroporous sodium ion-exchange resins, *Analytica Chimica Acta*, 654, 71-76 (2009).
- Vente J., Bosch H., de Haan A. and Bussman P., Comparison of sorption isotherms of mono- and disaccharides relevant to oligosaccharide separations for Na, K, and Ca loaded cation exchange resins, *Chem. Eng. Com.*, 192(1), 23-33 (2005).

### Remerciements

- A. Severino remercie le Fonds de la Recherche Scientifique F.R.S.-FNRS (Belgique) pour la bourse d'Aspirant dont il bénéficie pour la réalisation de sa thèse de doctorat
- C. Nobre acknowledges the F.C.T. - Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) for the PhD Grant ref. SFRH/BD/32514/2006.