



SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT



(10) FI 118564 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

31.12.2007

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C07C 229/12 (2006.01)
C07C 227/40 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)
C13D 3/14 (2006.01)
C12P 7/08 (2006.01)
C12P 7/48 (2006.01)

(21) Patentihakemus - Patentansökning

20065014

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

10.01.2006

(24) Alkupäivä - Löpdag

10.01.2006

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

11.07.2007

(73) Haltija - Innehavare

1 • **Finnfeeds Finland Oy**, Sokeritehtaantie 20, 02460 Kantvik, SUOMI - FINLAND, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • **Paananen, Hannu**, Niittypolku 14, 02460 Kantvik, SUOMI - FINLAND, (FI)

2 • **Saari, Pia**, Kivimäentie 40 a, 00670 Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

3 • **Nurmi, Nina**, Tammitie 20 A 17, 00330 Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä betaiinin erottamiseksi
Förfarande för separering av betain

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI 65800 C, JP 10179200 A, US 6770757 B2, US 3715235 A

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö liittyy menetelmään betaiinin erottamiseksi fermentaatioprosessiliuoksista, vinassista ja muista sokerijuurikas pohjaisista liuoksista H⁺-muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla kromatografisessa erottamisprosessissa. Esillä oleva keksintö liittyy myös H⁺-muodossa olevan heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttöön betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi.

Uppfinningen avser ett förfarande för separation av betain från fermentationsprocesslösningar, vinass och andra sockerbetsbaserade lösningar med ett svagt surt katjonbytesharts i H⁺ form i en kromatografisk separationsprocess. Föreliggande uppfinning avser även användning av ett svagt surt katjonbytesharts i H⁺ form för kromatografisk separation av betain.

Menetelmä betaiinin erottamiseksi

Keksinnön ala

Esillä oleva keksintö liittyy menetelmään betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla sokerijuurikas pohjaisista liuoksista. Sopivia sokerijuurikas pohjaisia liuoksia ovat esimerkiksi liuokset, jotka on saatu juurikkaasta johdettujen liuosten, melassien, fermentaatioprosessiliuoksien ja vinassien käsittelystä. Esillä oleva keksintö liittyy myös menetelmään muiden yhdisteiden kromatografiseksi erottamiseksi, kuten polyolien ja/tai karboksyylihappojen, H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla sokerijuurikas pohjaisista liuoksista.

Keksinnön tausta

Kromatografista erottamista on käytetty betaiinin talteenottamiseksi, luonnonmateriaaleista, kuten juurikasmelasseista, betaiinimelasseista ja vinassista. Tunnetuissa kromatografisissa erottamisissa yleisimmin käytetyt hartsit ovat olleet vahvasti happamia kationinvaihtajia, eli sulfonoituja polystyreneitä, jotka on silloitettu 3,5–8 paino-%:lla divinylibentseeniä, jolloin hartsi on monovalentissa tai divalentissa muodossa. Vesi on yleensä ollut edullinen eluentti, mutta ongelma vettä käytettäessä on ollut se, että eri tuotteilla, kuten betaiinilla, erytritolilla, inositolilla, sakkaroosilla ja mannitolilla, on samanlaiset retentioajat, jolloin fraktiot ovat limittyneet.

US-patentti 4 359 430 kuvaa prosessin betaiinin talteenottamiseksi melasseista ja vinassista käyttämällä polystyreenisulfonaattisuolaa kationinvaihtohartsina kromatografisessa kolonnissa ja eluoimalla vedellä. Voimakkaasti hapan kationinvaihtohartsi on alkalimetallimuodossa. Ensimmäinen erotettu fraktio on jätefraktio, toinen fraktio sisältää olennaisen osuuden syöttöliuoksen sokereista ja kolmas fraktio koostuu pääasiassa betaiinista.

US-patenttihakemus 2002/0120135 kuvaa menetelmän ramnoosin ja arabinoosin kromatografiseksi erottamiseksi muista monosakkarideista ksyloosin kiteytyksen ryönästä käyttämällä H^+/Mg^{2+} -muodossa olevaa heikosti hapan kationinvaihtohartsia.

US-patenttihakemus 2005/0161401 kuvaa kromatografisen menetelmän betaiinin, mannitolin, glyserolin ja inositolin erottamiseksi toisistaan käyttämällä heikosti emäksistä anioninvaihtohartsia.

US-patentti 6 770 757 kuvaa prosessin betaiinin ja muiden yhdisteiden, kuten erytritolin, inositolin, mannitolin, glyserolin ja aminohappojen, tal-

teenottamiseksi lähtöaineista, jotka sisältävät vastaavat yhdisteet, käyttämällä Na^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia kromatografisessa erottamisjärjestelmässä. Syöttöliuosten pH-arvot vaihtelevat välillä pH 6 ja pH 11 ja effluentin, kolonnista ulos tulevan liuoksen, vaihtelee välillä 6,5-11.

- 5 Betaiini eluoidaan järjestelmästä suolojen jälkeen, sen jälkeen erytritoli, mannitoli ja glyseroli. Inositoli eluoidaan viimeiseksi erillisenä piikkinä.

US-patentti 5 032 686 kuvaa menetelmän sitruunahapon talteenottamiseksi fermentaatioliuoksista käyttämällä H^+ -muodossa olevaa vahvasti hapanta kationinvaihtohartsia. Ensimmäiset eluoidut fraktiot sisälsivät suurmo-

10 lekyylipainoisia yhdisteitä, kuten sakkaroosi, maltoosi ja isomaltoosi. Seuraavat fraktiot sisälsivät sitruunahappoa ja viimeiset fraktiot sisälsivät esimerkiksi betaiinia ja erilaisia orgaanisia happoja, kuten glukonihappoa, oksalihappoa.

Tanaka K. et al. (Journal of Chromatography 850 (1999), 187-196) kuvaavat analyttisen ioninpoiston kromatografisen menetelmän karboksyyli-

15 happojen erottamiseksi H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla. Kun vettä käytettiin eluenttina, karboksyylihappojen välinen piikin muoto ja resoluutio eivät olleet tyydyttäviä. Piikin muodon parantamiseksi laimennettua rikkihappoliuosta testattiin eluenttina. Lisäksi metanolin lisäämisen tähän eluenttiin havaittiin vähentävän hydrofobisen luonteen omaavien

20 karboksyylihappojen retentioaikoja. Molekyylilikoeekskluusion ja ioniekskluusion lisäksi eluutiojärjestykseen vaikuttivat karboksyylihappojen pKa-arvot ja hydrofobinen/hydrofiilinen luonne.

On yllättävästi havaittu, että käytettäessä H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia, betaiini voidaan erottaa sokerijuurikas-

25 jaisista liuoksista, kuten fermentaatioprosessiliuoksista, vinasseista ja muista sokerijuurikkaasta, johdetuista liuoksista erillisenä fraktiona, joka eluoituu niiden yhdisteiden jälkeen, joiden aikaisemmin tiedettiin eluoituvan betaiinin jälkeen. Betaiinin eluutiojärjestys H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla on siten erilainen kuin aikaisemmin tunnettu vahvasti hap-

30 pamalla kationinvaihtohartseilla tai Na^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla. Tämä ilmiö on erityisen edullinen kun fraktioidaan monikomponenttisia liuoksia, jotka sisältävät betaiinia ja muita yhdisteitä, joilla on samanlaiset tai lähes samanlaiset retentioajat muilla erotusväliaineilla.

Keksinnön yhteenveto

- 35 Esillä oleva keksintö liittyy menetelmään betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi sokerijuurikas pohjaisista liuoksista H^+ -muodossa olevalla hei-

kosti happamalla kationinvaihtohartsilla. Esillä oleva keksintö liittyy myös menetelmään muiden yhdisteiden, kuten polyolien ja/tai karboksyylihappojen, kromatografiseen erottamiseen sokerijuurikas pohjaisista liuoksista H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla. Lisäksi esillä oleva keksintö liittyy menetelmään betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi muista karboksyyliyhdisteistä H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla. Lisäksi esillä oleva keksintö liittyy menetelmään betaiinin erottamiseksi sokerijuurikas pohjaisesta liuoksesta kromatografisessa erottamisjärjestelmässä, jossa H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään ainakin yhdessä kromatografisessa kolonnissa tai kolonnin osassa kromatografista erottamista varten. Esillä oleva keksintö liittyy myös menetelmään betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi sokerijuurikas pohjaisista liuoksista H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla, jossa kromatografisen järjestelmän pH:ta käytetään säätämään ja/tai ohjaamaan betaiinin retentiotekijää. Lisäksi esillä oleva keksintö liittyy H^+ -muodossa olevan heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttöön betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi ja valinnaisesti myös muiden yhdisteiden, kuten polyolien ja/tai karboksyylihappojen, sokerijuurikas pohjaisesta liuoksesta. Esillä oleva keksintö liittyy myös H^+ -muodossa olevan heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttöön betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi muista karboksyyliyhdisteistä.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Seuraavat piirrokset ovat keksinnön havainnollistavia suoritustapoja, eikä niitä ole tarkoitettu rajoittamaan patenttivaatimuksissa määriteltyä keksinnön piiriä.

Kuvio 1 on graafinen esitys esimerkin 1 mukaisista eluutioprofiileista ja pH:sta.

Kuvio 2 on graafinen esitys esimerkin 2 mukaisista eluutioprofiileista ja pH:sta.

Kuvio 3 on graafinen esitys esimerkin 3 mukaisista eluutioprofiileista ja pH:sta 3.

Kuvio 4 on graafinen esitys esimerkin 4 mukaisista eluutioprofiileista ja pH:sta 4.

Kuvio 5 on graafinen esitys esimerkin 5 mukaisista eluutioprofiileista ja pH:sta 5.

Kuvio 6 on graafinen esitys esimerkin 6 mukaisista eluutioprofiileista ja pH:sta 6.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

On olemassa jatkuva tarve käyttää hyväksi lisäraaka-aineita teollisesti ja/tai ravinnollisesti arvokkaiden yhdisteiden, kuten betaiinin, polyolien ja karboksyylihappojen, talteenottamiseksi. Eräs vaihtoehtoinen ratkaisu näiden yhdisteiden talteenottamiseksi on käyttää sokerijuurikaspohjaisia fermentaatioprosessiliuoksia, kuten esimerkiksi sitruunahappo-, hiiva- tai etanolifermentaatioprosessiliuoksia tai vinasseja, kuten esimerkiksi sitruunahappo- tai etanolivinasseja raaka-aineina. Nyt on yllättäen havaittu, että kun käytetään H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia, betaiini voidaan erottaa hyvin puhtaana fraktiona fermentaatioprosessiliuoksista. Lisäksi happaman fermentaatioprosessiliuoksen tai vinassin yleensä, ja erityisesti sitruunahappofermentaatiollemestä saadun vinassin, havaittiin olevan sopiva kromatografiseen erottamiseen H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla. Siten liuoksen esikäsittely pH:n säätämiseksi ennen kromatografista erottamista ei olisi tarpeen.

Yllä kuvatuissa olosuhteissa esimerkiksi H^+ -muodossa oleva voimakkaasti hapanta kationinvaihtoharts (SAC) ei pysyisi stabiilina. Kun syöttöliuoksessa on suoloja, SAC-hartsin funktionaalinen ryhmä muuttuu hyvin helposti H^+ -muodosta metallikationimuotoon jopa happamassa ympäristössä toisin kuin heikosti hapanta kationinvaihtoharts.

Esillä olevan keksinnön mukaan H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään menetelmässä betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi sokerijuurikaspohjaisista liuoksista. Esillä olevan keksinnön mukaan H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään myös menetelmässä betaiinin lisäksi myös muiden yhdisteiden, kuten polyolien ja karboksyylihappojen, kromatografiseksi erottamiseksi sokerijuurikaspohjaisista liuoksista. Lisäksi esillä olevan keksinnön mukaan H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään menetelmässä betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi muista karboksyyliyhdisteistä. Esillä olevan keksinnön mukaan H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään ainakin yhdessä kromatografisessa erottamisvaiheessa betaiinin erottamiseksi. Lisäksi esillä olevan keksinnön mukaan H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään ainakin yhdessä kromatografisessa kolonnissa tai yhdessä kolonnin osittain pakatussa

kerroksessa kromatografisessa erottamisjärjestelmässä betaiinin erottamiseksi sokerijuurikas pohjaisista liuoksista.

Esillä olevassa keksinnössä H^+ -muodossa oleva heikosti hapanta kationinvaihtohartsia tarkoittaa pääasiassa dissosioitumattomassa COOH-muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia. Keksinnön mukaisen dissosioitumattomassa COOH-muodossa olevan heikosti happaman kationinvaihtohartsin määrä on yli 50 %, edullisesti ainakin 67 % ja edullisemmin yli 90 %.

Esillä olevan keksinnön mukainen sokerijuurikas pohjainen liuos on mikä tahansa sokerijuurikkaasta johdettu liuos, hydrolysaatti ja/tai uutosto. Liuos voidaan saada tällaisten juurikkaasta johdettujen liuosten jatkokäsittelystä fermentaatiolla, esimerkiksi sitruunahappo-, hiiva- tai etanolifermentaatiolla tai sokerijuurikkaasta johdettujen liuosten, kuten juurikas ja/tai betaiinimelassit tai vinassi, käsittelystä. Fermentaatioliuokset, melassit ja vinassi sisältävät tyypillisesti paljon epäorgaanisia suoloja ja seoksen erityyppisiä orgaanisia yhdisteitä. Esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä erotettavat muut yhdisteet ovat polyoleja, kuten erytritoli, inositoli, mannitoli ja glyseroli ja/tai karboksyylihappoja, kuten sitruunahappo, maitohappo, etikkahappo, oksaalihappo ja pyroolidonikarboksyylihappo ja/tai niiden seokset. Esillä olevan keksinnön mukaisessa kromatografisessa erottamisessa yhdisteet erotetaan fraktioihin, jotka rikastetaan kohdeyhdisteen suhteen. Rikastettu fraktio sisältää korkeamman konsentraation yhdisteen kuiva-ainepohjaisen painon mukaan kuin syöttöliuoksena käytetty liuos.

Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä voitaisiin suorittaa itsenäisesti tai se voitaisiin yhdistää muihin prosessivaiheisiin tai se voisi käsitellä sellaisia, kuten esimerkiksi ylimääräinen kromatografinen erottaminen, kietyttäminen, haihduttaminen, ioninvaihto, suodattaminen, membraanin suodattaminen ja/tai jonkin muun tunnetun prosessivaiheen. Keksinnön mukainen menetelmä voidaan edullisesti yhdistää yhteen tai useampaan yllämainittuun lisäprosessointivaiheeseen tai se voi käsitellä sellaisen.

Ylimääräinen kromatografinen erottamisvaihe voitaisiin suorittaa käyttäen esimerkiksi voimakkaasti hapanta kationinvaihtohartsia (SAC), voimakkaasti emäksistä anioninvaihtohartsia (SBA) tai heikosti emäksistä anioninvaihtohartsia (WBA) sokerijuurikas pohjaisen lähtöliuoksen ja/tai erotettavaksi valittujen yhdisteiden koostumuksen mukaan.

Keksinnön mukainen menetelmä voidaan edullisesti yhdistää lisä-
vaiheeseen betaiinin talteenottamiseksi tai se voi käsittää sellaisen. Betaiinin
talteenotto voitaisiin suorittaa esimerkiksi kiteyttämällä. Keksinnön mukainen
menetelmä voidaan valinnaisesti myös yhdistää lisävaiheeseen muun yhdis-
teen tai -yhdisteiden talteenottamiseksi, kuten polyolien ja/tai karboksyylihap-
5 pojen, tai se voi käsittää sellaisen.

Kromatografinen kolonni tai kolonnin osa (kolonnin osittain pakattu
kerros), jota käytetään esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä täy-
tetään H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla, edul-
lisesti akryylikationinvaihtohartsilla, jossa on karboksyylin funktionaalisia ryh-
miä. Tällainen akryylihartsi johdetaan edullisesti metyyliakrylaatista, etyyliakry-
laatista, butyyliakrylaatista, metyylimetakrylaatista tai akrylonitriilistä tai akryyli-
hapoista tai niiden seoksista. Hartsia voidaan silloittaa silloitusaineen kanssa,
esim. di-vinyylibentseenin (DVB). Sopiva silloitusaste on 1–20 %, edullises-
ti 3–8 %. Hartsin keskimääräinen partikkelikoko on tavallisesti 10–2000 μm ,
15 edullisesti 100 - 400 μm .

Kromatografinen erottaminen suoritetaan edullisesti lämpötiloissa
välillä 10–95 °C, edullisemmin 30–95 °C, edullisimmin 65–95 °C. On tunnet-
tua, että korkeampi erotuslämpötila alentaa viskositeettia ja parantaa erotuk-
sen suorituskyyä, mutta on haitallisempi syöttöliuoksen herkille yhdisteille.
20

Esillä olevan keksinnön mukaisessa kromatografisessa erottami-
sessa käytetty eluentti on edullisesti vesi tai pH-säädetty vesi.

Fraktioitava sokerijuurikas pohjainen liuos esikäsittellään valinnaises-
ti ennen kromatografista erottamista suodattamalla, joka voidaan suorittaa
25 käyttämällä painesuodatinta suodatinavun kanssa tai ilman sitä. Lisäksi tarvit-
taessa syöttöliuoksena käytettävän liuoksen pH säädetään pH-arvon 6 alapuo-
lelle, edullisesti pH-arvon 5,1 alapuolelle, edullisemmin pH-arvojen 1,4–5,1 vä-
lille ja edullisimmin pH-arvojen 3–4,5 välille. Kun syöttöliuoksen pH on korkea
($> 4,2$), keksinnön mukainen heikosti hapan kationinvaihtohartsi muuttuu osit-
tain alkuperäisestä H^+ -muodostaan ionimuotoon ja balansoituu siten tietylle
30 H^+ -muodon tasolle. Ionimuodon tyyppi on riippuvainen syöttöliuoksen ioneista.

Syöttöliuos voidaan suodattaa ennen pH-säätöä tai sen jälkeen.
Ennen kromatografista erottamista syöttöliuoksen kuiva-aine säädetään sopi-
valle tasolle.

35 Syöttölaitetta käytetään liuoksen syöttämiseksi kolonniin. Kolonnin,
syöttöliuoksen ja eluentin lämpötila on edullisimmin likimäärin sama kuin kro-

matografisen erottamisen lämpötila. Tämä saavutetaan esilämmittämällä syöttöliuos. Syöttöliuos eluoidaan kolonnissa syöttämällä vettä, esimerkiksi demineralisoitua vettä tai kondensaattivettä tai jotakin muuta vesiliuosta kolonniin. Edullisesti käytetään esilämmitettyä eluenttia. Virtausnopeus kolonnissa
5 säädetään sopivalle tasolle. Ulos tulevien liuosten fraktiot kerätään sopivin välein ja analysoidaan. Ulosvirtausta kolonnista voidaan monitoroida on-line-instrumenteilla. Fraktioidut tuotteet, esim. betaiini, ja valinnaisesti myös polyolit, kuten erytritoli, mannitoli, inositoli, glyseroli ja/tai karboksyylihapot, kuten sitruunahappo, oksaalihappo, maitohappo, etikkahappo ja/tai pyrrolidonikar-
10 boksyylihappo voidaan ottaa talteen sopivilla menetelmillä, kuten esimerkiksi kiteyttämällä.

Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä voitaisiin suorittaa erillisenä vaiheena monivaiheprosessissa kun käytetään lisäksi esimerkiksi kromatografista erottamista, kiteyttämistä, haihduttamista ja/tai suodattamista
15 ainakin kerran monivaiheprosessin lisävaiheena. Lisäksi on mahdollista järjestää kaksi tai useampi kromatografinen kolonni sekvenssiin, jossa ainakin yksi kolonni tai osa kolonnista sisältää H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia, jolloin toinen kolonni tai toiset kolonnit sisältävät samaa tai erityyppistä hartsia, kuten esimerkiksi voimakkaasti hapanta kationinvaihto-
20 hartsia. Käytetty kromatografinen järjestelmä voi olla joko panosprosessi tai simuloitu liikkuva peti -järjestelmä. Simuloitu liikkuva peti -järjestelmä voi olla joko jatkuva tai sekventiaalinen.

On myös mahdollista yhdistää toisiinsa joillain muilla prosessiyksiköillä kaksi kromatografista kolonnia tai kolonnin osaa, jotka sisältävät H^+ -
25 muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia. Prosessiyksiköt voivat olla esimerkiksi suodattaminen, membraanisuodattaminen, pH-säätö tai konsentroiminen haihduttamalla. Alan ammattilaiselle on ilmeistä, että prosessiyksiköiden järjestys voidaan valita ja sitä voidaan vaihdella.

Eräässä suoritusmuodossa keksinnön mukainen menetelmä suori-
30 tetaan itsenäisenä prosessina. Tässä suoritusmuodossa sokerijuurikas pohjainen liuos voidaan fraktioida H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla betaiinia sisältäväksi fraktioksi ja valinnaisesti myös muun yhdisteen sisältäväksi fraktioksi. Edullisesti betaiini ja valinnaisesti myös muu yhdiste otetaan lisäksi talteen spesifisen yhdisteen sisältävästä fraktiosta. Esil-
35 lä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä eroteltavat muut yhdisteet ovat polyoleja, kuten erytritoli, inositoli, mannitoli, glyseroli ja/tai karboksyylihappoja,

kuten sitruunahappo, maitohappo, etikkahappo ja pyrrolidonikarboksylihappo ja/tai niiden seokset.

Eräässä toisessa suoritustavassa keksinnön mukainen menetelmä suoritetaan erillisenä vaiheena monivaiheprosessissa, jolloin se yhdistetään ainakin yhteen lisäprosessivaiheeseen. Tässä suoritustavassa sokeri-
5 juurikas pohjainen liuos voidaan fraktioida ensimmäisellä kolonnilla, joka sisältää esimerkiksi voimakkaasti hapanta kationinvaihtohartsia, joka on yhdistetty toiseen kolonniin, joka sisältää H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia, betaiinia sisältäväksi fraktioksi ja valinnaisesti myös muun
10 yhdisteen sisältäväksi fraktioksi. Edullisesti betaiini ja valinnaisesti myös muu yhdiste otetaan lisäksi talteen spesifisen yhdisteen sisältävästä fraktiosta. Tällainen järjestely parantaa edelleen erotuksen suoritustavaa ja lisää tuotteiden saantoja ja puhtautta. Betaiinin saanto paranee myös kun sivutuotteet poistetaan prosessista.

15 Vielä eräässä toisessa suoritustavassa keksinnön mukainen menetelmä käsittää ainakin yhden lisäprosessivaiheen, jossa keksinnön mukainen menetelmä on erillinen vaihe monivaiheprosessissa. Lisäprosessivaihe voisi olla esimerkiksi kromatografinen erottaminen, kiteyttäminen, haihduttaminen, suodattaminen ja/tai membraanisuodattaminen.

20 Yleensä eri yhdisteiden eluutiojärjestykseen heikosti happamilla kationinvaihtohartseilla näyttää vaikuttavan molekyylikokokoekskluusion ja ioniekskluusion lisäksi yhdisteiden hydrofobinen/hydrofiilinen interaktio hartsin kanssa. Aikaisempien tutkimusten mukaan eri yhdisteiden eluutiojärjestykseen (esim. karboksylihappojen) H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla vaikuttaa yhdisteiden pKa-arvo. Yleensä mitä alhaisempi
25 pKa-arvo, sitä lyhyempi saman yhdisteen retentioaika on. Betaiinin eluutiojärjestys (pKa = 1,832) H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla ei kuitenkaan noudata näitä sääntöjä. Yllättäen vaikuttaa siltä, että H^+ -muodossa oleva heikosti hapanta kationinvaihtoharts on hydrofobisempi
30 kuin metallikationimuoto ja sillä on erittäin korkea affiniteetti betaiinille, joka on hydrofobinen molekyyli.

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä erotettujen yhdisteiden eluutiojärjestys kromatografisessa kolonnissa on erilainen kuin se järjestys, joka saatiin aikaisemmillä menetelmillä esim. perustuen Na^+ -muo-
35 dossa olevan heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttöön tai voimakkaasti happamien kationinvaihtohartsien käyttöön, ja tätä piirrettä voidaan

edullisesti käyttää monikomponenttiyhdisteen komponenttien erottamisessa toisistaan. Esillä olevan keksinnön mukaan betaiini eluoituu erytritolin, inositolin, mannitolin, glyserolin ja karboksyylihappojen jälkeen. Lisäksi esimerkiksi inositolin eluoituu ennen glyserolia ja betaiinia keksinnön mukaisessa menetelmässä.

Yllättävästi betaiinin retentiovolyymien ja retentiotekijän havaittiin vaihtelevan kromatografisen erottamisen pH:n kanssa, erityisesti syöttöliuoksen pH:n kanssa; mitä alempi pH, sitä korkeampi retentiotekijä. Betaiinin eluotumiseen kromatografisesta erotuskolonnista vaikuttavat syöttöliuoksen pH-muutokset kun taas useimmat karboksyyliyhdisteet eluoituvat likimäärin samanaikaisesti huolimatta syöttöliuoksen pH:sta. Betaiinin retentiotekijää voidaan kontrolloida ja/tai säädellä säätämällä kromatografisen erottamisen pH:ta. Kromatografisen erottamisen pH:n säätäminen voidaan suorittaa säätämällä eluentin ja/tai syötteen pH:ta, mutta se suoritetaan edullisesti säätämällä syöttöliuoksen pH halutulle tasolle. Esimerkiksi muuttamalla syöttöliuoksen pH 5,1:stä pH 1,4:ään, betaiinin retentiotekijä muuttuu 1,3:sta 2,9:ään. Täten säätämällä syöttöliuoksen pH:ta, betaiinin kromatografisen erottamisen muista yhdisteistä sokerijuurikas pohjaisissa liuksissa voidaan optimoida H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla. Syöttöliuoksen pH:n säätöä voidaan myös käyttää betaiinin kromatografisen erottamisen kontrolloimiseksi ja/tai säätämiseksi muista karboksyyliyhdisteistä H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla.

Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä mahdollistaa betaiinin rikastamisen sokerijuurikas pohjaisesta liuksesta betaiinifraktioksi, jonka maksimipuhkaus on yli 50 % kuiva-aineesta laskettuna (DS), edullisesti yli 70 % DS.

Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä mahdollistaa betaiinin erottamisen ja valinnaisesti myös talteenottamisen hyvillä saannoilla ja korkealla puhtaudella (80–95 % DS) sokerijuurikas pohjaisesta liuksesta, kuten fermentaatioprosessiliuksista ja/tai vinasseista, mikä on ollut työlästä tunnetuilla menetelmillä käyttämällä esim. Na^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia tai voimakkaasti hapanta kationinvaihtohartsia. Esimerkiksi, kun voimakkaasti hapanta kationinvaihto (SAC) hartsia käytetään betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi, saavutetaan samat saanto- ja puhtaustasot kahdella kromatografisella erottamisella samaan aikaan kun tarvitaan vain yksi erotus H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla.

Lisäksi esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä mahdollistaa myös muiden yhdisteiden erottamisen ja talteenoton, kuten polyolien, kuten erytritoli, inositoli, mannitoli, glyseroli ja/tai karboksyylihappojen, kuten sitruunahappo, maitohappo ja/tai pyrrolidonikarboksyylihappo, hyvällä saannolla ja puhtaude-
 5 la fermentaatioprosessiliuoksista tai vinasseista, mikä on myös ollut työlästä tunnetuilla menetelmillä.

Eräässä keksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa käytämällä sitruunahappovinassia syöttöliuoksena, betaiini voidaan rikastaa beta-
 iinifraktioksi, jonka puhtaus on yli 60 % DS, edullisemmin yli 80 % DS ja sit-
 10 ruunahappo erilliseksi fraktioksi, jonka puhtaus on yli 20 % DS, edullisemmin yli 35 % DS.

Esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän eräs etu on se, että yhtä eluenttia, vettä, voitaisiin käyttää tehokkaasti haluttujen yhdisteiden erot-
 tamiseksi H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla ja
 15 myös valinnaisissa ylimääräisissä kromatografisissa vaiheissa. Kun vettä käytetään eluenttina kromatografisessa erottamisessa, käsittely on helpompaa, kustannukset ovat alhaisempia ja luotettavuus on parempi. Betaiinin ja esi-
 merkiksi inositolin erottamisen erilainen eluoitusjärjestys tuottaa lisäetua esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä, tehden mahdolliseksi
 20 erottaa betaiinin lisäksi myös muita yhdisteitä, kuten erytritoli, inositoli, mannitoli, glyseroli, sitruunahappo, maitohappo ja/tai pyrrolidonikarboksyylihappo.

IUPAC:n (International Union of Pure ja Applied Chemistry) mukaan, kromatografiseen prosessiin ja kromatografiateoriaan liittyviin termeihin kuuluvat:

- 25 • Hold-up-volyymi (aika) (V_M , t_M) on yhtä kuin ei-retentoidun yhdisteen retentiovolyymi (aika).
- Säädetty retentiovolyymi (aika) (V_R' , t_R') on kokonaiseluoitusvolyymi (aika) miinus hold-up-volyymi (aika).
- Retentiotekijä (k) on matemaattisesti säädetyn retentiovolyymien (aika) suhde hold-up-volyymiin (aika): $k = V_R'/V_M = t_R'/t_M$.
- 30

Seuraavat esimerkit havainnollistavat esillä olevaa keksintöä. Esi-
 merkkien tarkoitus ei ole rajoittaa patenttivaatimuksia millään tavalla.



ESIMERKKI 1

Vertaileva esimerkki, joka esittää betaiinin ryönästä kromatografista erottamista Na^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (pH 8,9)

- 5 Betaiinin ryönä oli peräisin juurikasmelassien kromatografisesta erottamisesta ja sisälsi useita yhdisteitä, kuten betaiini, inositoli, erytritoli, mannitoli ja glyseroli. Syöttöliuksena se altistettiin kromatografiselle erotukselle, joka suoritettiin laboratoriomittakaavan kromatografisessa erotuskolonnissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,045 m täytettiin akryylisella heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex CA 12 GC), valmistaja Finex Oy, Suomi. Hartsin silloitusaste oli 6,0 % DVB ja hartsin keskimääräinen partikkelikoko oli 0,26 mm. Hartsin pH oli korkea valmistusprosessin jälkeen. Syöttölaite asetettiin hartsikerroksen päälle. Kolonnin, syöttöliuksen ja eluenttiveden lämpötila oli noin 80 °C. Virtausnopeus kolonnissa säädettiin 4 ml:aan/min. Syöttöliuos suodatettiin suodattimen kautta käyttäen piimaata suodatinapuna. Syöttöliuksen pH oli 8,9.

Kromatografinen erottaminen suoritettiin seuraavasti:

- 20 Vaihe 1: Syöttöliuksen kuiva-aine määritettiin ja säädettiin 25 g:aan kuiva-ainetta 100 g:ssa liuosta liuksen taittumiskertoimen mukaan (RI).

Vaihe 2: 100 ml esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerroksen päälle (syöttölaitteen läpi).

- 25 Vaihe 3: Syöttöliuos eluoitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä esilämmitettyä ioninvaihtovettä kolonnin päälle.

Vaihe 4: 10 ml:n näytteitä ulostulevasta liuksesta kerättiin 3 minuutin välein. Näytteiden konsentraatio, johtavuus (mS/cm) ja pH määritettiin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:lla (Ca^{2+} -kolonni, 0,6 ml/min, 0,001 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 85 °C).

- 30 Betaiini eluoitui kolonnista suolojen jälkeen. Sakkaroosilla oli lähes sama retentioaika kuin betaiinilla. 99 minuutin hold-up-volyymilla ja 168 minuutin eluoitusajalla saatiin betaiinille retentiotekijä 0,7. Erytritolilla, mannitolilla ja glyserolilla oli lähes sama retentioaika eluoituen lähes yhtenä piikkinä betaiinipiikin jälkeen. Inositoli eluoitui viimeiseksi erillisenä piikkinä. Eluoitusjärjestys näyttää olevan yhdenmukainen komponenttien hydrofobisen/hydrofiilisen luonteen mukaan. Hartsin erotti betaiinin ja inositolin hyvin muista pää-
- 35

komponenteista. Effluentin (eli ulostulevan liuoksen) pH oli 8–11. Erotusprofiili on esitetty kuviossa 1.

ESIMERKKI 2

5 Vinassin kromatografinen erottaminen H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (pH 3,6)

Erotukseen käytetty aloitusliuos oli vinassi sitruunahapon fermentaatioprosessista. Vinassi sisälsi pääasiassa betaiinia, glyserolia, epäorgaanisia suoloja ja orgaanisia happoja, kuten sitruunahappoa, ja sillä oli likimäärin seuraava koostumus (% RDS:llä):

- 10 Betaiini 17,1
 Glyseroli 1,8
 Sitruunahappo 7,8
 Muut 73,3
 Liuoksen pH oli 3,6.

- 15 Liuos suodatettiin suodattimen kautta käyttäen piimaata suodatinapuna. Vinassia käytettiin syöttöliuoksena ja se alistettiin kromatografiselle erottamiselle. Erottaminen suoritettiin koemittakaavan kromatografisessa erotuskolonissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,09 m, täytettiin heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex CA 16 GC, 8 % DVB, kapasiteetti 4,4 ekv/l), valmistaja Finex Oy, Suomi. Hartsin oli akrylaattipohjainen
- 20 hartsin keskimääräinen partikkelikoko natriummuodossa oli 0,41 mm. Hartsin regeneroitiin vety (H^+) -muotoon, minkä jälkeen hartsikerroksen korkeus oli likimäärin 1,7 m. Kolonnin, syöttöliuoksen ja eluenttiveden lämpötila oli 75 °C. Virtausnopeus kolonnissa säädettiin 3 l/aan/h.

- 25 Kromatografinen erottaminen suoritettiin toistaen seuraavia vaiheita:

- Vaihe 1: Syöttöliuoksen kuiva-aine säädettiin 35 g:aan kuiva-ainetta 100 g:ssa liuosta liuoksen taittumiskertoimen (RI) mukaan.
- Vaihe 2: 640 ml esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerroksen päälle.
- 30 Vaihe 3: Syöttöliuos eluoiitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä esilämmitettyä ioninvaihtovettä kolonnin päälle.
- Vaihe 4: 50 ml:n näytteitä ulostulevasta liuoksesta kerättiin 5 minuutin välein. Näytteiden konsentraatio, johtavuus (mS/cm) ja pH määritettiin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:lla (Na^+ -kolonni, 0,6ml/min, 85 °C, 0,003 M Na_2SO_4).
- 35

Eluotuminen alkoi epäorgaanisilla suoloilla ja jatkui orgaanisilla hapoilla ja alditoleilla. Betaiini eluotui kolonnista viimeisenä pääkomponenteista. Effluentin pH vaihteli välillä 1,9 ja 4,6. Tehtiin kaikkiaan 5 syöttöä, joiden aikana hartsin ionimuoto ei täysin stabiloitunut. Näiden erotusten jälkeen 93 % hartsista oli vetymuodossa hartsikerroksen päällä. Harts erotti betaiinin erittäin hyvin muista komponenteista; hold-up-volyymi oli 75 min ja eluotumisaika 278 min. Betaiinin retentiotekijä tässä erotuksessa oli 2,7. Betaiini voitaisiin kerätä korkean puhtauden (80–95 %/DS) fraktion avulla hyvällä saannolla (>90 %). Sitruunahappo kerättiin fraktion, jonka puhtaus oli 20–50% DS. Betaiinin ja joidenkin syöttöliuoksen orgaanisten happojen retentiotekijät (k) on esitetty taulukossa 1. Taulukossa 1 esitetyt pK_a-arvot on johdettu kirjasta Lange's Handbook of Chemistry, (15th Edition), 1999. Voidaan nähdä, että nämä hapot eluotuvat niiden pK_a (1.) arvon mukaan. Yllättävästi betaiini, jonka pK_a-arvo on 1,832, muodostaa poikkeuksen ja eluotuu viimeisenä komponenttina. Erotusprofiili on esitetty kuviossa 2.

Taulukko 1

yhdiste	Hold-up-aika [min]	k	Eluotumisaika [min]	pK _a 1./2./3. dissosiaatiovakio 25 °C:ssa
oksaalihappo	75	0,6	120	1,271 / 4,272
sitruunahappo	75	0,9	141	3,128 / 4,761 / 6,396
maitohappo	75	1,5	186	3,858
etikkahappo	75	2,4	258	4,756
betaiini	75	2,7	278	1,832

ESIMERKKI 3

Vinassin kromatografinen erottaminen H⁺-muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (pH 5,1)

Erotuksessa käytetty aloitusliuos oli etanolin fermentaatioprosessista saatu vinassi. Vinassi sisälsi pääasiallisesti betaiinia, glyserolia, epäorgaanisia suoloja sekä orgaanisia happoja ja sillä oli likimäärin seuraava koostumus (% RDS:llä):

- Betaiini 13,8
- Glyseroli 12,3
- Muut 73,9
- Liuoksen pH oli 5,1.

Liuos suodatettiin suodattimen kautta käyttäen piimaata suodatinapuna. Vinassia käytettiin syöttöliuoksena ja se altistettiin kromatografiselle erottamiselle. Erottaminen suoritettiin koemittakaavan kromatografisessa erotuskolonissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0.09 m, täytettiin
5 heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex CA 16 GC, 8 % DVB, kapasiteetti 4,4 ekv/l), valmistaja by Finex Oy, Suomi. Hartsin oli akrylaattipohjainen hartsin ja hartsin keskimääräinen partikkelikoko natriummuodossa oli 0,41 mm. Hartsin regeneroitiin vety (H^+) -muotoon, minkä jälkeen hartsikerroksen korkeus oli likimäärin 1,7 m. Kolonnin, syöttöliuoksen ja eluentiveden lämpötila oli
10 75 °C. Virtausnopeus kolonnissa säädettiin 3 l/aan/h. Kromatografinen erottaminen suoritettiin seuraavasti:

Vaihe 1: Syöttöliuoksen kuiva-aine säädettiin 35 g:aan kuiva-ainetta 100 g:ssa liuosta liuoksen taittumiskertoimen (RI) mukaan.

15 Vaihe 2: 0,6 l esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerroksen päälle.

Vaihe 3: Syöttöliuos eluoiitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä kolonnin päälle esilämmitettyä ioninvaihtovettä, jonka pH säädettiin 3–4:ään muurahaishapolla.

20 Vaihe 4: 50 ml:n näytteitä ulostulevasta liuoksesta kerättiin 5 min välein. Näytteiden konsentraatio, johtavuus (mS/cm) ja pH määritettiin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:llä (Na^+ -kolonni, 0,6 ml/min, 85 °C, 0,003 M Na_2SO_4).

Eluoituminen alkoi epäorgaanisilla suoloilla ja jatkui orgaanisilla happoilla ja alditoleilla. Betaiini eluoiutui kolonnista myöhemmin kuin muut pääkomponentit. Betaiinipiikin paikka siirtyi taaksepäin (eli lähemmäksi muiden komponenttien piikkejä) ennen kuin hartsin ionimuodon tasapaino saavutettiin. 53 syötteen jälkeen 67 % hartsista hartsikerroksen päällä oli H^+ -muodossa. Siinä vaiheessa betaiinin hold-up-volyymi oli 75 min ja eluoitumisaika oli 180 min. Betaiinin retentiotekijä oli 1,3 ja betaiinipiikin maksimipuhkaus oli yli
30 75 %/DS. Effluentin pH vaihteli välillä 4,4 ja 6,3. 53. syötteen erotusprofiili on esitetty kuviossa 3.

ESIMERKKI 4

Vinassin kromatografinen erottaminen H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (pH 4,2)

35 Erotukseen käytetty aloitusliuos oli vinassi etanolin fermentaatio-prosessista. Vinassi sisälsi pääasiassa betaiinia, glyserolia, epäorgaanisia

suoloja sekä orgaanisia happoja ja sillä oli likimäärin seuraava koostumus (% RDS:llä):

Betaiini 15,8

Glyseroli 11,5

5 Muut 72,7.

Vinassia käytettiin syöttöliuksena ja se altistettiin kromatografiselle erottamiselle. Erottaminen suoritettiin koemittakaavan kromatografisessa erotuskolonissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,09 m, täytettiin heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex CA 16 GC, 8 % DVB, kapasiteetti 4,4 ekv/l). Hartsia oli akrylaattipohjainen hartsia ja hartsin keskimääräinen partikkelikoko natriummuodossa oli 0,41 mm. Hartsia regeneroitiin vety (H^+) -muotoon, minkä jälkeen hartsikerroksen korkeus oli likimäärin 1,7 m. Kolonnin ja syöttöliuksen ja eluenttiveden lämpötila oli 75 °C. Virtausnopeus kolonnissa säädettiin 3 l:aan/h. Syöttöliuksen pH säädettiin 4,2:een rikkihapolla (H_2SO_4). Syöttöliuos suodatettiin suodattimen kautta käyttäen piimaata suodatinapuna.

Kromatografinen erottaminen suoritettiin seuraavasti:

Vaihe 1: Syöttöliuksen kuiva-aine säädettiin 35 g:aan kuiva-ainetta 100 g:ssa liuosta liuksen taittumiskertoimen (RI) mukaan.

20 Vaihe 2: 2 l esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerroksen päälle.

Vaihe 3: Syöttöliuos eluoiitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä kolonnin päälle esilämmitettyä ioninvaihtovettä, jonka pH säädettiin 4,2:een muurahaishapolla.

25 Vaihe 4: 50 ml:n näytteitä ulostulevasta liuksesta kerättiin 5 minuutin välein. Näytteiden konsentraatio, johtavuus (mS/cm) ja pH määritettiin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:lla (Na^+ -kolonni, 0,6 ml/min, 85 °C, 0,003 M Na_2SO_4).

30 Eluoituminen alkoi epäorgaanisilla suoloilla ja jatkui orgaanisilla hapoilla ja alditoleilla. Betaiini eluoituivat kolonnista myöhemmin kuin muut pääkomponentit, mutta jonkin verran aikaisemmin verrattuna esimerkissä 2 esitettyyn erotukseen, jossa syötön pH oli matalampi. Hold-up-volyymi oli 75 min ja eluoitumisaika oli 205 min. Betaiinin retentiotekijä tässä pH:ssa oli 1,7 ja beta-iinifraktiossa saavutettiin yli 80 %:n maksimipuhkaus DS:llä. Glyserolifraktion puhtaus, joka eluoitui ennen betaiinia, oli yli 20 % DS:llä. Tehtiin yhteensä 20 syötettä, joiden aikana hartsin ionimuoto stabiloitui; 89 % hartsista oli vety-

muodossa hartsin päällä ja pohjalla. Effluentin pH vaihteli välillä 4,0 ja 6,4. 20. syötteen erotusprofiili on esitetty kuviossa 4.

ESIMERKKI 5

5 Vinassin kromatografinen erottaminen heikosti H^+ -muodossa olevalla happamalla kationinvaihtohartsilla (pH 3,1)

Erotukseen käytetty aloitusliuos oli vinassi sitruunahapon fermentaatioprosessista. Vinassi sisälsi pääasiassa betaiinia, glyserolia, epäorgaanisia suoloja ja orgaanisia happoja ja sillä oli likimäärin seuraava koostumus (% RDS:llä):

- 10 Betaiini 19,8
 Glyseroli 3,0
 Muut 77,2.

- 15 Vinassia käytettiin syöttöliuksena ja se altistettiin kromatografiselle erottamiselle. Erottaminen suoritettiin koemittakaavan kromatografisessa erot-
 tamiskolonnissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,09 m, täytet-
 tiin heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex CA 16 GC, 8 % DVB,
 kapasiteetti 4,4 ekv/l). Hartsia oli akrylaattipohjainen hartsia ja hartsin keskimää-
 räisen partikkelikoko natriummuodossa oli 0,41 mm. Hartsia regeneroitiin vety
 (H^+) -muotoon, minkä jälkeen hartsikerroksen korkeus oli likimäärin 1,6 m. Ko-
 20 lonni ja syöttöliuksen ja eluenttiveden lämpötila oli 75 °C. Virtausnopeus ko-
 lonnissa säädettiin 3 l/aan/h. Syöttöliuksen pH oli 3,1.

Kromatografinen erottaminen suoritettiin seuraavasti:

- 25 Vaihe 1: Syöttöliuksen kuiva-aine säädettiin 35 g:aan kuiva-ainetta
 100 g:ssa liuosta liuksen taittumiskertoimen (RI) mukaan.
 Vaihe 2: 1,5 l esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerrok-
 sen päälle.
 Vaihe 3: Syöttöliuos eluoitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä kolon-
 nin päälle esilämmitettyä ioninvaihtovettä, jonka pH säädettiin 3–
 4:ään muurahaishapolla.
 30 Vaihe 4: 50 ml:n näytteitä ulostulevasta liuksesta kerättiin 5 minu-
 tin välein. Näytteiden konsentraatio, johtavuus (mS/cm) ja pH mää-
 ritettiin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:lla (Na^+ -kolonni,
 0,6 ml/min, 85 °C, 0,003 M Na_2SO_4).

- 35 Eluoituminen alkaa epäorgaanisilla suoloilla ja jatkuu orgaanisilla
 hapoilla ja alditoleilla. Betaiini eluoituu kolonnista viimeisenä pääkomponen-
 teista. Betaiinin hold-up-volyymi oli 75 min, eluoitumisaika oli 245 min ja sen

retentiotekijä oli 2,3. Effluentin (esim. ulostuleva liuos) pH vaihteli välillä 2,4 ja 4,3. Tehtiin kaikkiaan 54 syötettä, joiden aikana hartsin ionimuoto stabiloitui, ja > 99 % hartsista oli vetymuodossa. Hartsit erottaa betaiinin erittäin hyvin muista komponenteista ja betaiinifraktiossa saavutettiin yli 85 %:n maksimipuhdistus DS:llä. Erotusprofiili on esitetty kuviossa 5.

ESIMERKKI 6

Vinassin kromatografinen erottaminen H^+ -muodossa olevalla heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (pH 1,4)

10 Erotukseen käytetty aloitusliuos oli vinassi etanolin fermentaatio-
prosessista. Vinassilla, joka sisälsi pääasiassa betaiinia, glyserolia, epäor-
gaanisia suoloja ja orgaanisia happoja, oli likimäärin seuraava koostumus (%
RDS:llä):

Betaiini 14,0

Glyseroli 10,6

15 Muut 75,4.

Vinassia käytettiin syöttöliuoksena ja se altistettiin kromatografiselle
erottamiselle. Erottaminen suoritettiin koemittakaavan kromatografisessa erot-
tamiskolonnissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,09 m, täytet-
tiin heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex CA 16 GC, 8 % DVB,
20 kapasiteetti 4,4 ekv/l). Hartsit oli akrylaattipohjainen hartsit ja hartsin keskimää-
räinen partikkelikoko natriummuodossa oli 0,41 mm. Hartsit regeneroitiin vety
(H^+) -muotoon, minkä jälkeen hartsikerroksen korkeus oli likimäärin 1,6 m. Ko-
lonnin ja syöttöliuoksen ja eluenttiveden lämpötila oli 75 °C. Virtausnopeus ko-
lonnissa säädettiin 3 l/aan/h. Syöttöliuoksen pH säädettiin vahvalla rikkihapolla
25 (H_2SO_4) 1,4:ään ja se suodatettiin suodattimen kautta käyttäen piimaata suo-
datinapuna.

Kromatografinen erottaminen suoritettiin seuraavasti:

Vaihe 1: Syöttöliuoksen kuiva-aine säädettiin 35 g:aan kuiva-ainetta
100 g liuosta liuoksen taittumiskertoimen (RI) mukaan.

30 Vaihe 2: 0,7 l esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerrok-
sen päälle.

Vaihe 3: Syöttöliuos eluoiitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä kolon-
nin päälle esilämmitettyä ioninvaihtovettä, jonka pH säädettiin 2,2:een vahvalla
 H_2SO_4 :lla.

35 Vaihe 4: 50 ml:n näytteitä ulostulevasta liuoksesta kerättiin 5 minuut-
tin välein. Näytteiden konsentraatio, johtavuus (mS/cm) ja pH määritettiin.

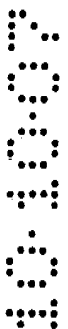
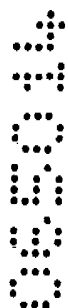
Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:lla (Na^+ -kolonni, 0,6 ml/min, 85 °C, 0,003 M Na_2SO_4).

- 5 Eluoituminen alkaa epäorgaanisilla suoloilla ja jatkuu orgaanisilla hapoilla ja alditoleilla. Betaiini eluoituu kolonnista viimeisenä pääkomponenteista. Betaiinin hold-up-volyymi oli 75 min, eluoitumisaika oli 290 min ja sen retentiotekijä oli 2,9. Effluentin (esim. ulostuleva liuos) pH vaihteli välillä 1,3 ja 3,3. Hartsia erottaa betaiinin erittäin hyvin muista komponenteista ja betaiinifraktiossa saavutettiin yli 85 %:n maksimipuhkaus DS:llä. Erotusprofiili on esitetty kuviossa 6.

10 ESIMERKKI 7

Betaiinin kiteyttäminen

- 15 Betaiinia sisältävä syöteneste lisättiin 400 litran kiehuvaan kiteyttimeen. Haihduttaminen aloitettiin. Ensimmäiset spontaanit kiteet havaittiin DS:llä noin 79 %, lämpötilassa 99 °C. Spontaanin siementämisen jälkeen keittokiteytystä jatkettiin 3 tuntia lämpötilassa noin 100 °C ja uutta syötenestettä lisättiin jatkuvasti kiehuvaan kiteyttimeen. 400 litran erä keittokiteytyksellä (massan DS 87 %) saatua massaa poistettiin. Massa sentrifugoitiin ja betaiinin vedetön tuote kuivattiin.



Patenttivaatimukset

1. Menetelmä betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi sokerijuuri-
kaspohjaisesta liuoksesta, jossa H^+ -muodossa olevaa heikosti hapanta ka-
5 tioninvaihtohartsia käytetään kromatografisessa erottamisessa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa sokerijuuri-
kaspohjainen liuos on fermentaatioprosessiliuos.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, jossa fermentaa-
tioprosessiliuos on sitruunahappo-, hiiva- tai etanolifermentaatioliuos.

10 4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa sokerijuuri-
kaspohjainen liuos on sokerijuurikkaasta johdettu prosessiliuos.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, jossa sokerijuurik-
kaasta johdettu prosessiliuos on vinassi, melassit tai betaiinimelassit.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa ainakin yhtä
15 kolonnia tai osaa kolonnista, joka sisältää H^+ -muodossa olevaa heikosti ha-
panta kationinvaihtohartsia, käytetään kromatografisessa erottamisessa.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa heikosti ha-
pan kationinvaihtoharts on akryylihartsi.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, jossa akryylihartsi
20 johdetaan ryhmästä johon kuuluvat metyyliakrylaatti, etyyliakrylaatti, butyyliak-
rylaatti, metyylimetakrylaatti ja akrylonitriili tai akryylihapot tai niiden seokset.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, jossa hartsi silloite-
taan divinyylibentseenin (DVB) kanssa.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, jossa hartsin silloi-
25 tusaste on 3–8 paino-%.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa kromatogra-
fisessa erottamisessa käytetty eluentti on vesi.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa kromatogra-
fisessa erottamisessa käytetyn eluentin lämpötila on välillä 10 °C ja 95 °C.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, jossa eluentin
30 lämpötila on välillä 65 °C ja 95 °C.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa heikosti
happaman kationinvaihtohartsin partikkelikoko on 10–2000 µm.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, jossa heikosti
35 happaman kationinvaihtohartsin partikkelikoko on 100–400 µm.

16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa syöttöliuoksen pH on alle 6.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, jossa syöttöliuoksen pH on alle 5,1.

5 18. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa kromatografisen erottaminen on panosprosessi.

19. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa kromatografisen erottaminen on simuloitu liikkuva peti -prosessi.

10 20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, jossa simuloitu liikkuva peti -prosessi on sekventiaallinen prosessi.

21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, jossa simuloitu liikkuva peti -prosessi on jatkuva prosessi.

15 22. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa menetelmään kuuluu lisäksi polyolin ja/tai karboksyylihapon erottaminen lisäyhdisteenä.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, jossa polyoli on inositoli ja/tai glyseroli.

24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, jossa karboksyylihappo on sitruunahappo, maitohappo ja/tai pyrrolidonikarboksyylihappo.

20 25. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, jossa betaiini-fraktio ja sitruunahappofraktio erotetaan liuksesta.

26. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa menetelmään lisäksi kuuluu betaiinin talteenotto erotetusta fraktiosta.

25 27. Patenttivaatimuksen 26 mukainen menetelmä, jossa talteenotto suoritetaan kiteyttämällä.

28. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa kromatografisen erottamisen pH-säätöä käytetään betaiinin retentiotekijän säätölemiseen tai kontrolloimiseen.

30 29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, jossa kromatografisen erottamisen pH säädetään syöttöliuoksen pH:lla.

30. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, jossa betaiini erotetaan muista karboksyyliyhdisteistä ja/tai polyoleista.

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, jossa karboksyyliyhdiste on sitruunahappo, maitohappo ja/tai pyrrolidonikarboksyylihappo.

35 32. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, jossa betaiini-fraktio ja sitruunahappofraktio erotetaan liuksesta.

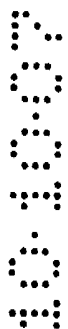
33. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, jossa betaiini erotetaan polyolilyhdisteistä.

34. Patenttivaatimuksen 33 mukainen menetelmä, jossa polyoli on inositoli ja/tai glyseroli.

5 35. H^+ -muodossa olevan heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö betaiinin kromatografiseksi erottamiseksi sokerijuurikas pohjaisesta liuoksesta.

36. Patenttivaatimuksen 35 mukainen käyttö, jossa betaiini erotetaan muista karboksyyliyhdisteistä ja/tai polyoleista.

10



Patentkrav

1. Förfarande för kromatografisk separation av betain från en sockerbetsbaserad lösning, vari ett svagt surt katjonbytesharts i H⁺ form används i
5 den kromatografiska separationen.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, vari den sockerbetsbaserade lösningen är en fermentationsprocesslösning.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, vari fermentationsprocesslösningen är en citronsyra-, jäst- eller etanolfermentationslösning.

10 4. Förfarande enligt patentkrav 1, vari den sockerbetsbaserade lösningen är en processlösning som härletts från sockerbeta.

5. Förfarande enligt patentkrav 4, vari processlösningen som härletts från sockerbeta är vinass, melasser eller betainmelasser.

6. Förfarande enligt patentkrav 1, vari åtminstone en kolonn eller en
15 del av en kolonn, som innehåller ett svagt surt katjonbytesharts i H⁺ form, används i den kromatografiska separationen.

7. Förfarande enligt patentkrav 1, vari det svagt sura katjonbyteshartset är akrylharts.

8. Förfarande enligt patentkrav 7, vari akrylhartset härleds från
20 gruppen bestående av metylakrylat, etylakrylat, butylakrylat, metylmetakrylat och akrylonitrol eller akrylsyror eller blandningar av dessa.

9. Förfarande enligt patentkrav 7, vari hartset tvärbinds med divinylbensen (DVB).

10. Förfarande enligt patentkrav 9, vari hartsets tvärbindningsgrad
25 är 3–8 vikt-%.

11. Förfarande enligt patentkrav 1, vari eluanten som används i den kromatografiska separationen är vatten.

12. Förfarande enligt patentkrav 1, vari temperaturen av eluanten som används i den kromatografiska separationen är mellan 10 °C och 95 °C.

30 13. Förfarande enligt patentkrav 12, vari eluantens temperatur är mellan 65 °C och 95 °C.

14. Förfarande enligt patentkrav 1, vari det svagt sura katjonbyteshartsets partikelstorlek är 10–2000 µm.

15. Förfarande enligt patentkrav 14, vari det svagt sura katjonbyteshartsets partikelstorlek är 100–400 µm.
35

16. Förfarande enligt patentkrav 1, vari matarlösningens pH är under 6.

17. Förfarande enligt patentkrav 16, vari matarlösningens pH är under 5,1.

5 18. Förfarande enligt patentkrav 1, vari den kromatografiska separationen är en satsprocess.

19. Förfarande enligt patentkrav 1, vari den kromatografiska separationen är en simulerad rörlig bäddprocess.

10 20. Förfarande enligt patentkrav 19, vari den simulerade rörliga bäddprocessen är en sekventiell process.

21. Förfarande enligt patentkrav 19, vari den simulerade rörliga bäddprocessen är en kontinuerlig process.

22. Förfarande enligt patentkrav 1, vari förfarandet ytterligare omfattar separation av polyol och/eller karboxylsyra som en tilläggsförening.

15 23. Förfarande enligt patentkrav 22, vari polyolen är inositol och/eller glycerol.

24. Förfarande enligt patentkrav 22, vari karboxylsyran är citronsyra, mjölksyra och/eller pyrrolidonkarboxylsyra.

20 25. Förfarande enligt patentkrav 22, vari betainfraktionen och citronsyrafraktionen separeras från lösningen.

26. Förfarande enligt patentkrav 1, vari förfarandet ytterligare omfattar återvinning av betain från den separerade fraktionen.

27. Förfarande enligt patentkrav 26, vari återvinningen utförs genom kristallisering.

25 28. Förfarande enligt patentkrav 1, vari pH-reglering av den kromatografiska separationen används för reglering eller kontrollering av betainets retentionsfaktor.

29. Förfarande enligt patentkrav 28, vari den kromatografiska separationens pH regleras med matarlösningens pH.

30 30. Förfarande enligt patentkrav 28, vari betain separeras från karboxylföreningarna och/eller polyolerna.

31. Förfarande enligt patentkrav 30, vari carboxylföreningen är citronsyra, mjölksyra och/eller pyrrolidonkarboxylsyra.

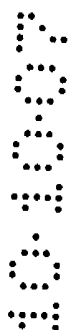
35 32. Förfarande enligt patentkrav 30, vari betainfraktionen och citronsyrafraktionen separeras från lösningen.

33. Förfarande enligt patentkrav 30, vari betainet separeras från polyolföreningarna.

34. Förfarande enligt patentkrav 33, vari polyolen är inositol och/eller glycerol.

5 35. Användning av ett svagt surt katjonbytesharts i H⁺ form för kromatografisk separation av betain från en sockerbetsbaserad lösning.

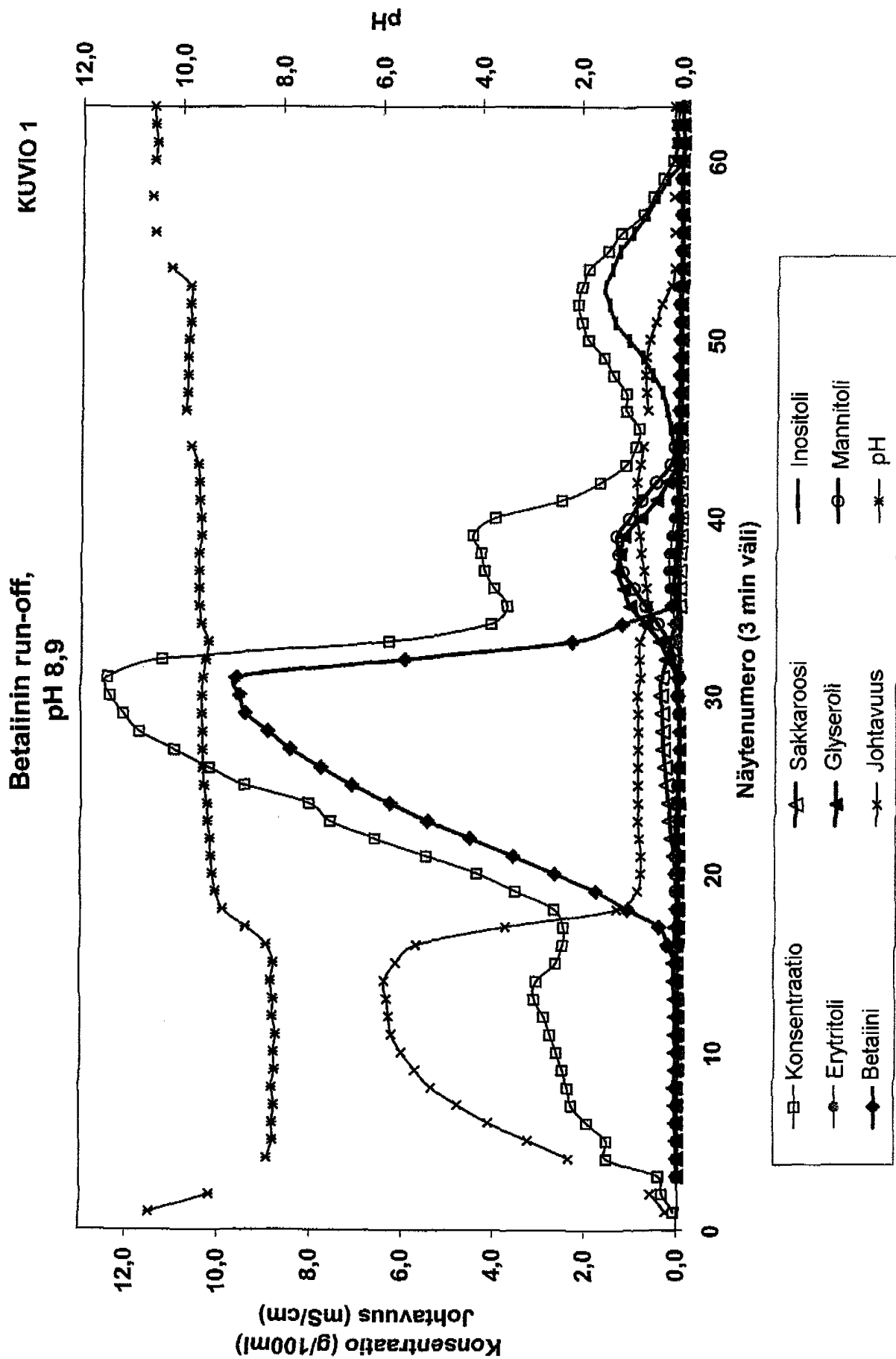
36. Användning enligt patentkrav 35, vari betainet separeras från andra karboxylföreningar och/eller polyoler.



10.10.07 08:30:14

1/6

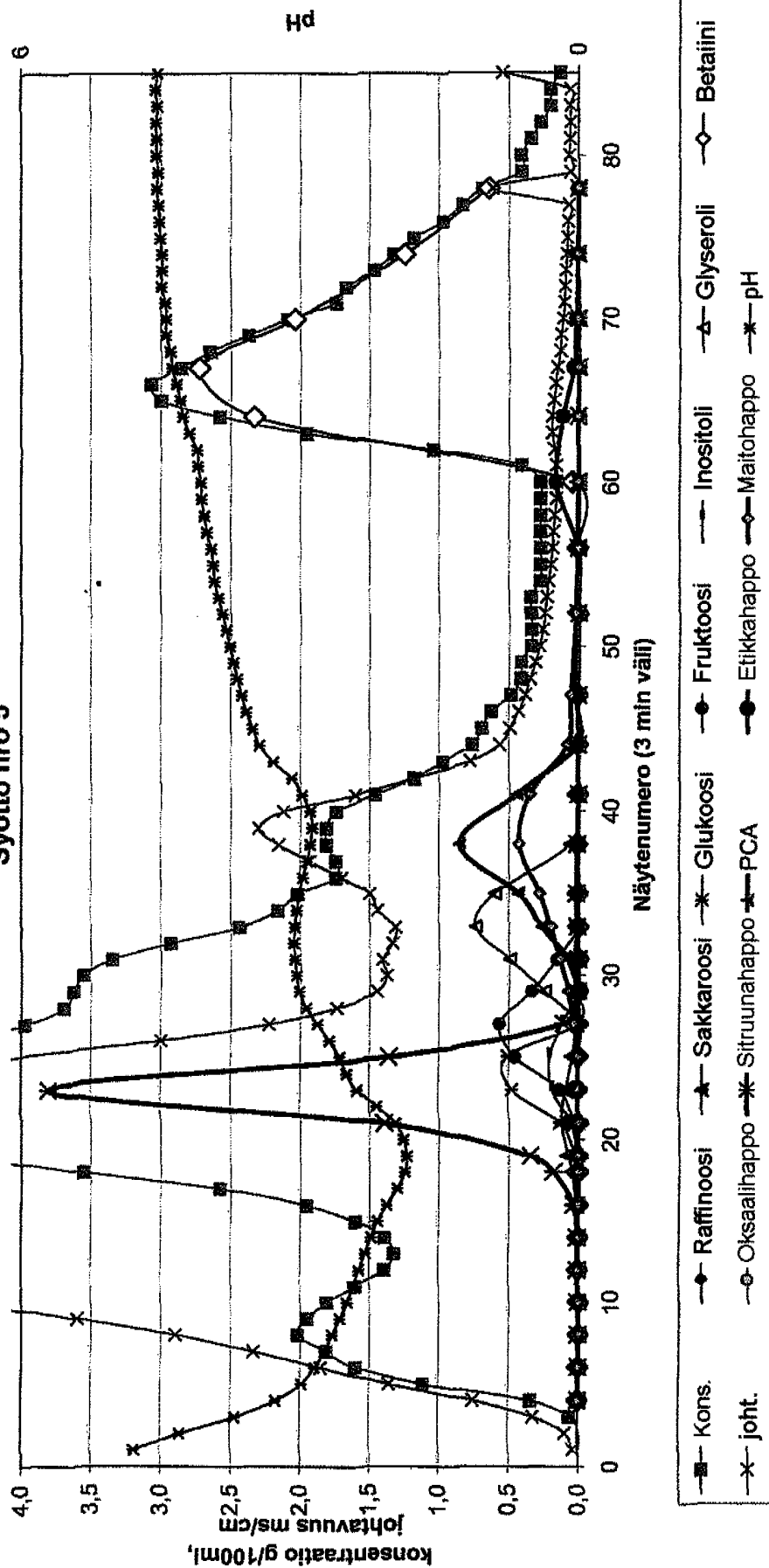
118564



10:10:07 08:30:14

Vinassi (sitruunahappopohjainen)
pH 3,6
Syöttö nro 5

KUVIO 2



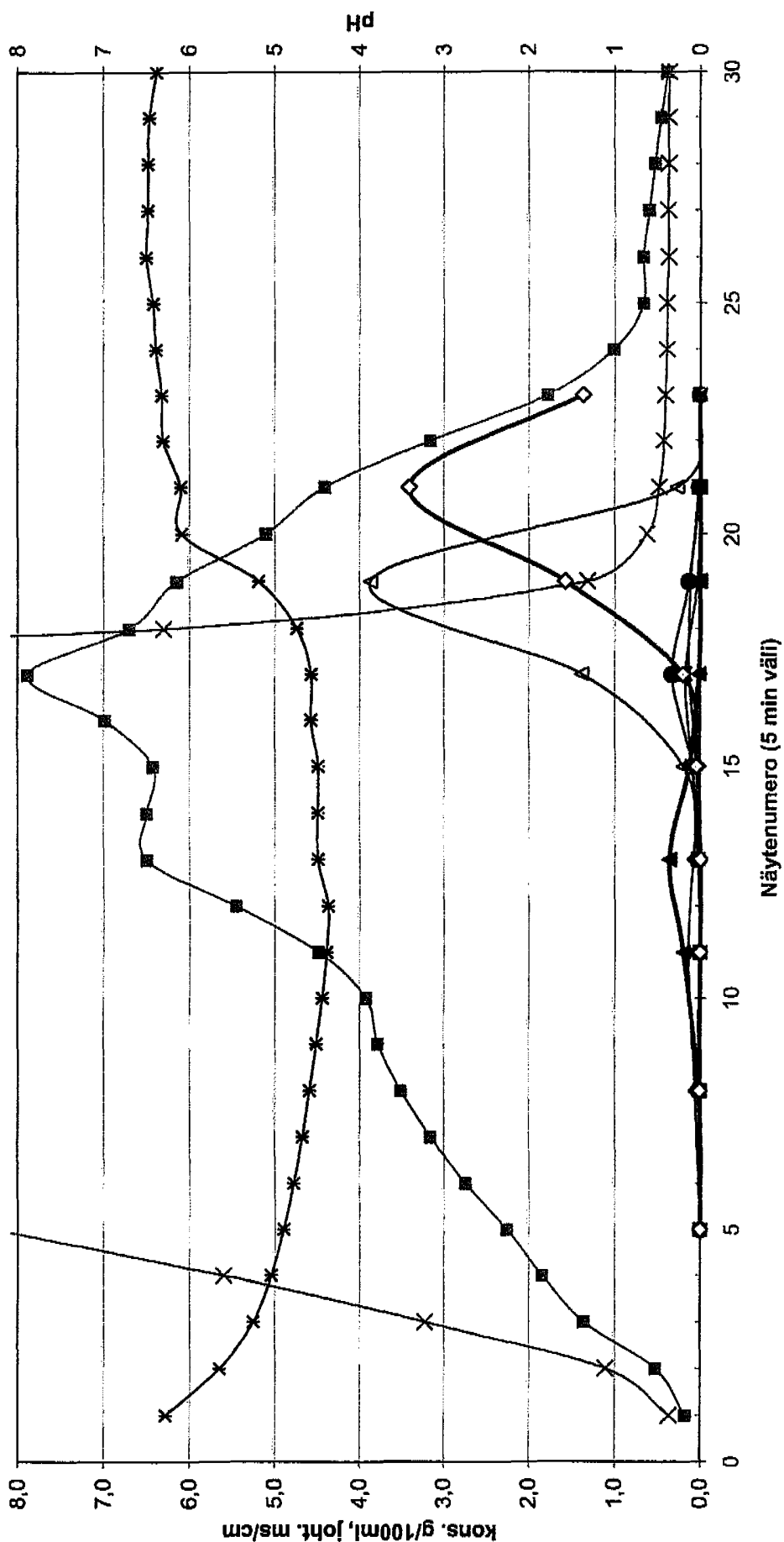
10.10.07 08:30:14

3/6

118564

KUVIO 3

Vinassi (etanolipohjainen) pH 5,1
Syöttö nro 53

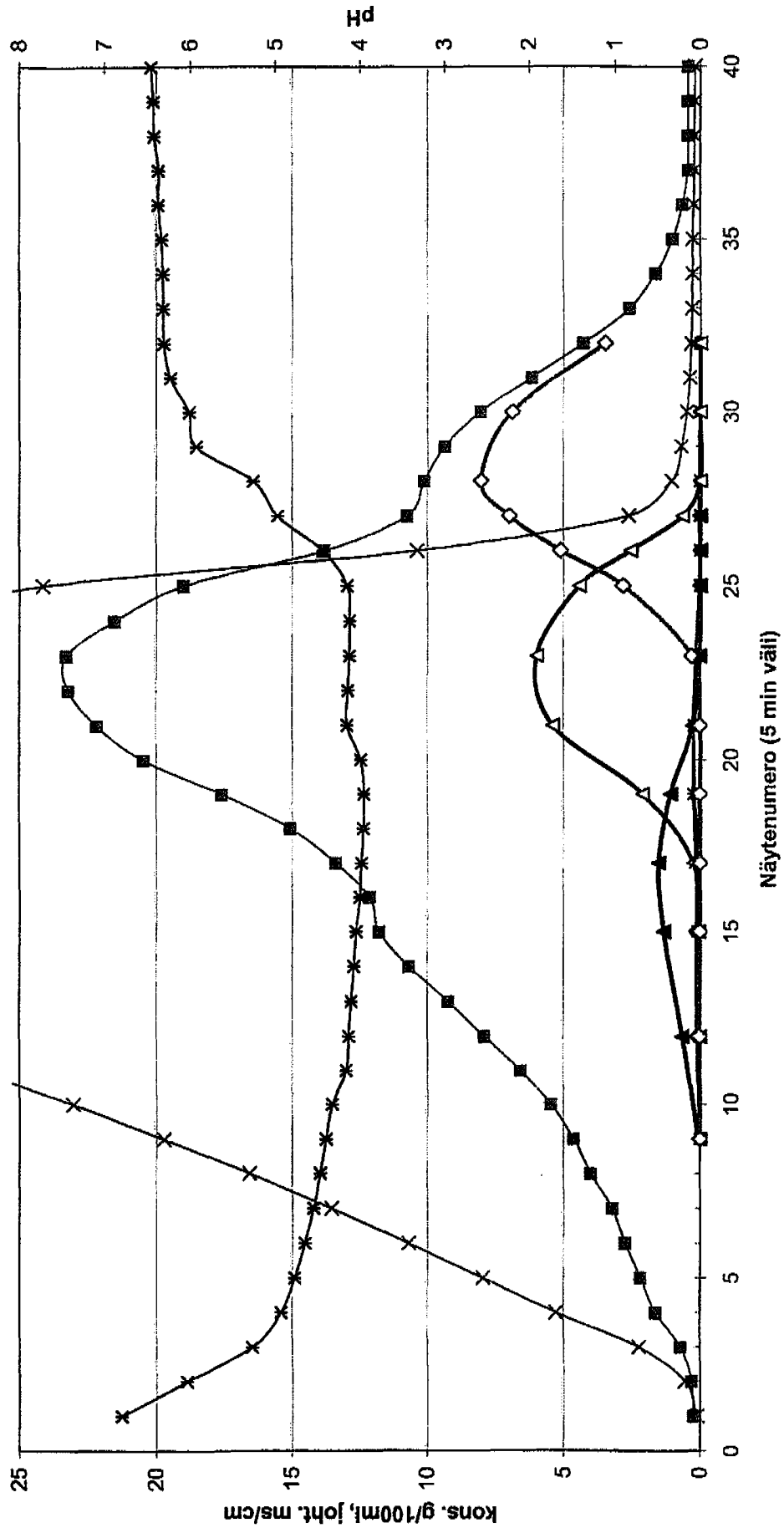


—■— Kons. —◆— Raffinoosi —▲— Sakkarooosi *— Glukoosi —●— Fruktooosi —— Inositoli —△— Glyceroli —×— joht. —◇— Betaini —*— pH

10:10:07 08:30:14

KUVIO 4

Vinassi (etanolipohjainen)
pH 4,2
Syöttö nro 20



—■— Kons. —◆— Raffinoosi —▲— Sakkarooosi —●— Glukoosi/mannitoli —□— Inositoli —◇— Glyseroli —△— Betaini —x— joht. —*— pH

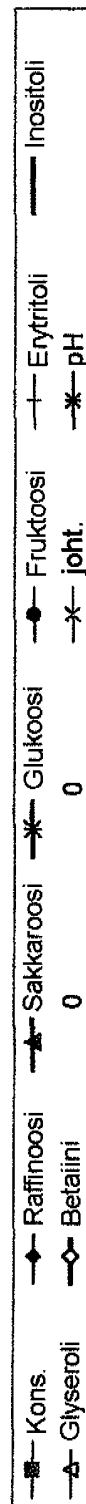
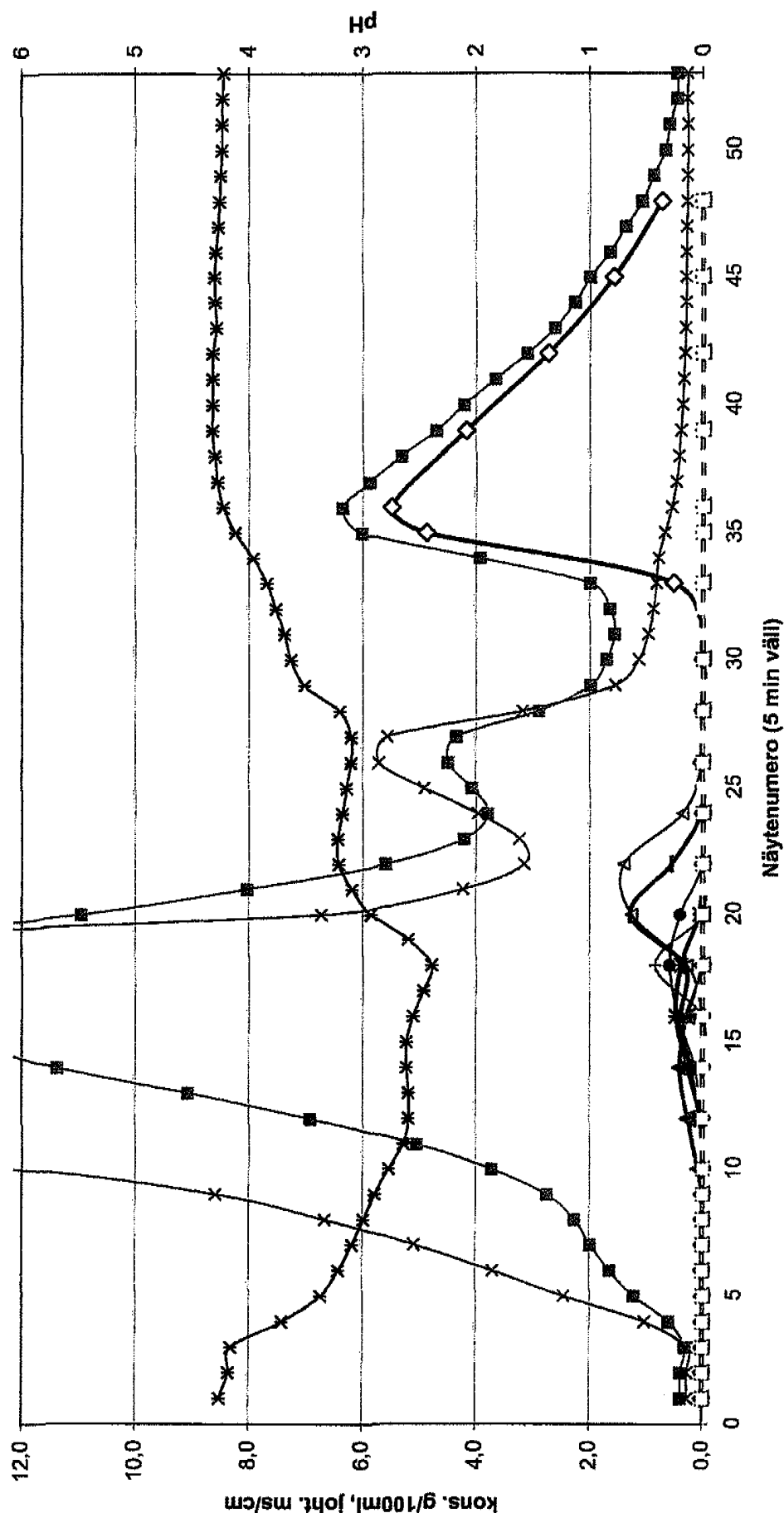
10:10:07.063014

KUVIO 5

Vinassi (sitruunahappopohjainen)

pH 3,1

Syöttö nro 54



10:10:07 08:50:14

Vinassi (etanolipohjainen)

pH 1,4

Syöttö nro 12

KUVIO 6

6/6

118564

