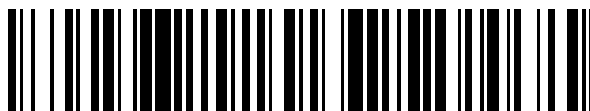


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 714**

51 Int. Cl.:

B01J 39/04 (2006.01)
B01D 15/18 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)
B01J 41/04 (2006.01)
C13B 20/14 (2011.01)
C13K 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2003 E 03708303 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1490521**

54 Título: **Separación de azúcares, alcoholes de azúcar, carbohidratos y mezclas de los mismos**

30 Prioridad:

27.03.2002 FI 20020592

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.03.2014

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1, Postboks 17
1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es:

**HEIKKILÄ, HEIKKI;
SARMALA, PÄIVI;
KÄRKI, ARI;
NURMI, NINA y
PAANANEN, HANNU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 449 714 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Separación de azúcares, alcoholes de azúcar, carbohidratos y mezclas de los mismos

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un método para separar azúcares y alcoholes de azúcar los unos de los otros. Más particularmente la presente invención se refiere al uso de una resina de intercambio aniónico débilmente básica seleccionada de un grupo que consiste en polímero poliacrílico reticulado aminado y resina de epíclorhidrin-trietilentetramina en un procedimiento de separación cromatográfica.

Fundamento de la invención

10 La solicitud de patente japonesa JP-1990000281929 describe el uso de una columna de cromatografía líquida rellena con carga que tiene un radical intercambiable aniónico débilmente básico para analizar sacáridos (monosacárido u oligosacárido). La carga tiene radical amino de primera clase, radical amino de segunda clase y/o radical amino de tercera clase. La columna se eluye primero con disolución de HNO₃ 0,1 N y agua y después a columna se eluye con metanol absoluto.

15 La patente de EE.UU. 5 482 631 describe un método para separar inositol de azúcar y alcoholes de azúcar. El método comprende una resina, que comprende una resina de intercambio de aniones de base fuerte en forma de cloruro. El método se realiza en un sistema cromatográfico de lecho móvil simulado.

20 Tanaka H. et al. describen en su artículo "Determination of Component Sugars in Soil Organic Matter by HPLC" en Zentralbl. Mikrobiol. 145 (1990), 621 - 628, un método para determinar azúcares componentes de carbohidratos del suelo. En el método se usó una columna de resina de intercambio aniónico de base fuerte y se separaron glucosa, galactosa, manosa, xilosa, ramnosa y ribosa. Sin embargo, la arabinosa, fucosa y fructosa se eluyeron en el mismo pico y no pudieron separarse las unas de las otras.

25 La Patente de EE.UU. 6 153 791 describe un procedimiento para la purificación de ácido 2-ceto-L-gulónico por cromatografía líquida continua usando un intercambiador de iones débilmente básico. Según la publicación la resina de intercambio iónico débilmente básica comprende resina de intercambio aniónico que tiene funcionalidad piridina. Sin embargo, el método sólo es capaz de separar ácido 2-ceto-L-gulónico de sorbosa y por lo tanto los azúcares no pueden separarse unos de los otros con este método.

30 Paskach, T. et al. han descrito en su artículo "High-performance anion-exchange chromatography of sugars and sugar alcohols on quaternary ammonium resins under alkaline conditions" en Carbohyd. Res. 215 (1991) 1 - 14, el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento fuertemente básica con resinas de amonio cuaternarias para separar azúcares y alcoholes de azúcares.

35 Murphy, P.T. et al. han afirmado en su artículo "A reversible reaction between reducing sugars and a weak-base anion-exchange resin" en Carbohyd. Res., 7 (1968) 460 - 467, que debería ejercitarse la precaución en el uso de una resina de intercambio aniónico de base débil en presencia de azúcares reductores. Según el artículo se sabe bien que el contacto entre una resina de intercambio aniónico de base fuerte y azúcares reductores lleva a la epimerización y la sorción irreversible. En el artículo se muestra que en intentos para usar resinas de intercambio aniónico de base débil en presencia de azúcares libres, los investigadores han detectado frecuentemente pérdidas significativas de azúcares neutros. En el artículo se muestra que el efecto está provocado por la formación reversible de un compuesto covalente entre la resina y el azúcar reductor.

40 La publicación WO 00/42225 describe un método para separar azúcares mientras aún se permite la rápida desorción de la resina. El método comprende el uso de una resina de intercambio aniónico de base fuerte en forma de cloruro. La resina se ha condicionado con una suficiente concentración de ión hidroxilo.

45 Bilik, V. et al. en su artículo en Chem zvesti 33 (1) 118 - 122 (1979) han descrito la separación de cetosas y aldosas con intercambiador de iones de polietilenimina en la forma de Cl u OH eluido con agua. Con el método descrito se separaron 9 cetosas y 14 aldosas. Sin embargo, las cetosas y aldosas no pueden separarse las unas de las otras. Además la fabricación de partículas esféricas, comenzando a partir de polietilenimina y epíclorhidrina, es más difícil en comparación con materiales de partida convencionales como estireno, acrilatos, acrilonitrilo y divinilbenceno. La etilenimina se considera además que es un material bastante peligroso.

50 Lindberg B. et al. en Carbohyd. Res. 5 (1967) 286 - 291, han estudiado el uso de resina de intercambio aniónico fuertemente básica en la forma de bisulfito para la separación preparativa de azúcares. La utilidad del método de columna de bisulfito se demostró no solo por la separación de cetosas a partir de aldosas sino además por la preparación de D-fructosa, D-glucosa y D-galactosa cromatográficamente puras a partir de productos comerciales.

Oshima R. et al. han estudiado la separación de anómeros de sacáridos mediante resina de intercambio aniónico macrorreticular fuertemente básica en la forma de sulfato. La resina tiene un grado relativamente alto de reticulado. El método se lleva a cabo a temperatura ambiente y el eluyente es disolución de etanol-agua (80%/20%). Los

experimentos mostraron que el mayor porcentaje de etanol mejoraba la separación. Se separaron por el procedimiento 2-desoxi-ribose, ramnosa, fucosa, galactosa, xilosa, manosa, fructosa, sorbitol, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa y rafinosa.

5 Bauer y Voelter han descrito una técnica de separación analítica para carbohidratos en Chromatographia, Vol 9, Núm. 9, Septiembre de 1976. Según Bauer y Voelter los azúcares reaccionan con ácido bórico para formar complejos aniónicos y son de esta forma separables en resinas de intercambio iónico fuertemente básicas. En el método la optimización de las condiciones de separación y detección permitieron la separación y detección de 10 azúcares que tienen lugar más rápido que con los métodos anteriores.

10 Brown, W. ha descrito la selectividad de adsorbentes de gel de poliacrilamida para azúcares en el artículo en J. Chromatog. 53 (1970) 572 - 575. La resina usada en el método es una resina de poliacrilamida, y los azúcares separados por el procedimiento son rafinosa, sacarosa, ramnosa, galactosa, glucosa, fructosa/manosa y xilosa. Sin embargo, los grupos amida de poliacrilamida no poseen capacidad de intercambio de iones.

15 Malan, A. et al. han descrito en su artículo en Ann. Fals. Exp. Chim., Julio - Agosto, 1988, 81, núm. 869, págs. 275 - 281, un método para separar por ejemplo sacarosa, maltosa, lactosa, manosa, fructosa, arabinosa, xilosa, glucosa y sus azúcares invertidos con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica.

Breve descripción de la invención

20 Sorprendentemente se ha encontrado que los azúcares y alcoholes de azúcar pueden separarse eficazmente de corrientes de carbohidrato usando una resina de intercambio aniónico débilmente básica (WBA) seleccionada de un grupo que consiste en polímero poliacrílico reticulado aminado y resina de epiclohidrintrietilentetramina. La ventaja de la presente invención comparado con la técnica anterior es que es especialmente adecuada para separar azúcares reductores en condiciones ácidas además de por ejemplo en condiciones débilmente ácidas.

25 La presente invención se refiere a un método para separar azúcares, alcoholes de azúcar y otros compuestos de carbohidrato a partir de una disolución que contiene al menos dos de ellos mediante un método que usa la separación cromatográfica que comprende al menos una etapa donde una resina de intercambio aniónico débilmente básica se usa para la separación cromatográfica. La disolución a separar cromatográficamente contiene monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos, alcoholes de azúcar correspondientes, polioles y mezclas de los mismos. Los monosacáridos son por ejemplo, monosacáridos de pentosa, hexosa, tetrosa, desoxihexosa, desoxipentosa y anhidroalditoles. Los disacáridos son por ejemplo, disacáridos de tetrosa, pentosa o hexosa. Los alcoholes de azúcar y polioles son por ejemplo, xilitol, eritritol, inositol, manitol y glicerol. Preferiblemente la resina de intercambio aniónico débilmente básica se usa para separar xilosa, arabinosa, ramnosa, glicerol, inositol y betaína. Preferiblemente la resina de intercambio aniónico débilmente básica se usa para separar inositol y glicerol de la betaína.

35 El método contiene preferiblemente etapas adicionales que comprenden el uso de columnas cromatográficas que contienen resinas de intercambio catiónico débilmente ácida (WAC), resinas de intercambio catiónico fuertemente ácidas (SAC), resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas (SBA), evaporación, cristalización, procesos de membrana, etc.

40 Una ventaja del método y la disposición de la invención es que la separación puede realizarse en un intervalo de pH donde los azúcares son más estables. La separación puede llevarse a cabo en condiciones ácidas y no se necesitan compuestos químicos, por ejemplo, NaOH, para ajustar el pH en comparación con la separación cromatográfica con una resina de intercambio catiónico débilmente ácida. El procedimiento de separación cromatográfica es además menos complicado y resultan beneficios económicos de esto. Una de las ventajas es además que la resina puede empaquetarse en condiciones ácidas. En contraste, la resina de intercambio catiónico débilmente ácida ha sido difícil de empaquetar en condiciones ácidas.

Breve descripción de los dibujos

45 En lo siguiente la invención se describirá en mayor detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en que

La Figura 1 es una presentación gráfica de los perfiles de elución y pH según el Ejemplo 1;

La Figura 2 es una presentación gráfica de los perfiles de elución y pH según el Ejemplo 2;

La Figura 3 es una presentación gráfica de los perfiles de elución y pH según el Ejemplo 3;

50 La Figura 4 es una presentación gráfica de los perfiles de elución y pH según el Ejemplo 4;

La Figura 5 es una presentación gráfica de los perfiles de elución y pH según el Ejemplo 5;

La Figura 6 es una presentación gráfica de los perfiles de elución y pH según el Ejemplo 6;

La Figura 7 es una presentación gráfica de los perfiles de elución y pH según el Ejemplo 8;

La Figura 8 es una presentación gráfica de los perfiles de elución y pH según el Ejemplo 9;

La Figura 9 es una presentación gráfica de los perfiles de elución y pH según el Ejemplo 10;

La Figura 10 es una presentación gráfica de los perfiles de elución y pH según el Ejemplo 11;

- 5 Las Figuras 11 y 12 son presentaciones gráficas de las selectividades de diferentes resinas según el Ejemplo 12.

Descripción detallada de la invención

Según la presente invención una disolución que contiene al menos dos de los azúcares, alcoholes de azúcar y/u otros carbohidratos o mezclas de los mismos se somete a un método que usa separación cromatográfica que comprende al menos una etapa donde una resina de intercambio aniónico débilmente básica seleccionada de un grupo que consiste en polímero poliacrílico reticulado aminado y resina epíclorhidrintrietilentetramina se usa en una columna cromatográfica o en una parte de una columna. La resina de intercambio aniónico débilmente básica es en este contexto una resina, que contiene principalmente grupos aniónicos débilmente básicos.

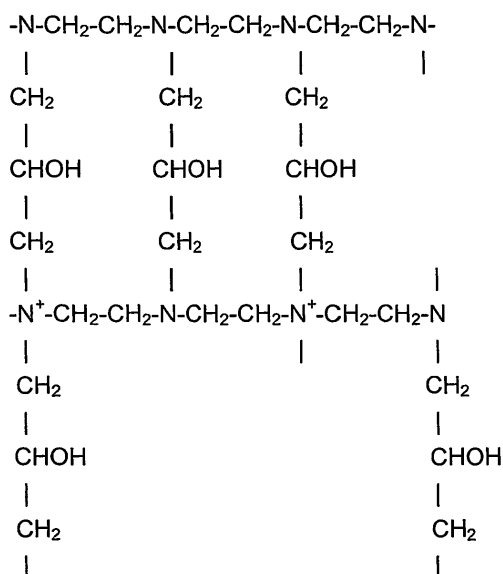
Los azúcares a separar se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y oligosacáridos. Los monosacáridos son por ejemplo, monosacáridos de pentosa, hexosa, tetrosa, desoxihexosa, desoxipentosa y anhidroalditoles. Los disacáridos son por ejemplo, disacáridos de tetrosa, pentosa o hexosa. Los alcoholes de azúcar a separar se seleccionan preferiblemente de un grupo que consiste en xilitol, eritritol e inositol. Los demás carbohidratos a separar son por ejemplo, polioles, tales como glicerol. Preferiblemente la resina de intercambio aniónico débilmente básica se usa para separar xilosa, arabinosa, ramnosa, glicerol, inositol y betaína. Preferiblemente la resina de intercambio aniónico débilmente básica se usa también para separar inositol y glicerol de la betaína.

El método según la invención puede comprender preferiblemente etapas adicionales, tales como usar columnas cromatográficas que contienen resinas de intercambio catiónico débilmente ácidas, resinas de intercambio catiónico fuertemente ácidas, resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas, evaporación, cristalización, intercambio iónico, procesos de membrana, etc., para mejorar la separación efectiva del producto o productos deseados.

Materias primas de partida adecuadas son disoluciones, hidrolisatos y extractos de plantas que contienen los azúcares, alcoholes de azúcar y/o carbohidratos mencionados anteriormente o materias primas convertidas de las mismas que contienen los azúcares, alcoholes de azúcar y/o carbohidratos mencionados anteriormente. Ejemplos de dichos materiales de partida son por ejemplo hidrolisatos de biomasa, molasas, vinasa, corrientes de proceso de xilosa, corrientes de proceso de sacarosa, y sus corrientes laterales, corrientes basadas en almidón o sacarosa, por ejemplo, corrientes de proceso de maltosa, glucosa o fructosa o sus corrientes laterales.

La columna cromatográfica o una parte de la columna usada en el método de la presente invención se rellena con una resina de intercambio aniónico débilmente básica, preferiblemente con una resina de intercambio aniónico débilmente básica que tiene un esqueleto acrílico. La resina de intercambio aniónico débilmente básica se deriva preferiblemente de ésteres acrílicos ($H_2=CR-COOR'$, donde R es H o CH_3 y R' es grupo alquilo, como metilo, etilo, isopropilo, butilo, etc.), como acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de butilo, metacrilato de metilo, acrilonitrilo o ácidos acrílicos o mezclas de los mismos. La matriz acrílica está reticulada con un reticulador adecuado que puede ser por ejemplo, de tipo aromático como divinilbenceno (DVB) o de tipo alifático, como isopreno, 1,7-octadieno, trivinilciclohexano, dietilenglicol-divinil-éter, N,N'-metilenbisacrilamida, N,N'-alquilen-bisacrilamidas, dimetacrilato de etilenglicol y otros di-, tri-, tetra-, pentacrilatos y pentametacrilatos. Un grado de reticulado adecuado con divinilbenceno es de 1 a 10% en peso de DVB, preferiblemente de 3 a 8% en peso. La resina aniónica débilmente básica se fabrica del polímero poliacrílico reticulado por aminación con amina adecuada como mono-, di-, tri-, tetra-, penta- o hexaminas u otras poliaminas. Por ejemplo, dimetilamina, dietilen-triamina, trietilen-tetramina, tetraetilen-pentamina, pentaetilen-hexamina y dimetilaminopropilamina son aminas adecuadas.

Otra estructura de resina de intercambio aniónico débilmente básica es intercambiadores aniónicos de policondensación basados en epíclorhidrina. El grupo clorometilo y epoxi de la epíclorhidrina reaccionan con poliaminas formando intercambiadores aniónicos tipo gel reticulado. Por ejemplo, la reacción de condensación de epíclorhidrina con trietilentetramina resulta la siguiente estructura de resina aniónica. Este tipo de resina aniónica contiene tanto grupos funcionales débilmente básicos (amina terciaria) como fuertemente básicos (amonio cuaternario).



5 En comparación con las resinas tipo poliacrílicas las resinas basadas en epíclorhidrina son más difíciles de producir en forma de gotas por técnica de polimerización en suspensión, que es una forma física favorable de un producto de intercambio iónico para propósitos cromatográficos. Por ejemplo, la patente de EE.UU. 4 184 019 muestra algunos métodos para producir las resinas basadas en epíclorhidrina en forma de gotas. Está claro a partir de la patente de EE.UU. que los métodos son difíciles de realizar ya que necesitan el uso de disolventes especiales.

El tamaño de partícula promedio de la resina es normalmente de 10 a 2000 micrómetros, preferiblemente de 100 a 400 micrómetros.

10 La resina puede regenerarse por ejemplo en forma de SO_4^{2-} . Sin embargo, esto depende de la composición iónica de la disolución circundante.

El procedimiento de separación cromatográfica usando resina de intercambio aniónico débilmente básica se ha llevado a cabo como procedimientos de carga en los Ejemplos de la presente aplicación. Sin embargo, en aplicaciones industriales son preferibles sistemas de lecho móvil simulado (SMB, del inglés simulated moving bed). El sistema de lecho móvil simulado es o bien secuencial o continuo.

15 La columna se eluye preferiblemente a temperaturas que se seleccionan en base de la estabilidad de la disolución a separar y la resina a usar en la separación.

Un eluyente preferido en la separación cromatográfica de la presente invención es agua, por ejemplo, agua desmineralizada o agua condensada, o alguna disolución acuosa, alcohol o una mezcla de los mismos. Preferiblemente el eluyente es agua y lo más preferiblemente el eluyente es agua condensada.

20 El pH de la disolución de alimentación es o bien, ácido, neutro o básico. Preferiblemente el pH de la disolución de alimentación es débilmente ácido. El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se ajusta a un nivel apropiado y después de que la disolución de alimentación se precalienta.

25 Ventajosamente un dispositivo de alimentación especial puede usarse para alimentar la disolución a la columna para asegurar la alimentación constante. La disolución de alimentación se eluye en la columna por un eluyente de alimentación, por ejemplo, agua, por ejemplo, agua de intercambio iónico precalentada por la parte superior de la columna. El pH y la forma iónica de la resina pueden equilibrarse mediante varias alimentaciones antes de alcanzarse el equilibrio. El caudal en la columna se ajusta a un nivel apropiado. Las fracciones de las disoluciones de salida se recogen a intervalos adecuados y se analizan. El término "fracciones de las disoluciones de salida" significa en esta aplicación todas las fracciones que salen de la columna.

30 Es obvio para un experto en la técnica que los parámetros del procedimiento se seleccionan cada vez de forma individual, dependiendo de los compuestos a separar. Por ejemplo, la temperatura de la columna, la disolución de alimentación y el eluyente puede ser de 10 a 95°C, preferiblemente de 40 a 95°C.

35 Es claro para un experto en la técnica que el método puede alterarse reorganizando el orden de las unidades de procedimiento o añadiendo o eliminando algunas unidades del procedimiento. Un experto en la técnica puede además añadir o alterar el orden de otras unidades de separación, recuperación y concentración.

Además, es posible disponer dos o más columnas cromatográficas en secuencia, en donde al menos una columna o parte de una columna contiene una resina de intercambio aniónico débilmente básica y las otras columnas o parte

de las columnas contienen otros materiales de relleno de columnas, por ejemplo, resina de intercambio catiónico fuertemente ácida o resina de intercambio aniónico fuertemente básica. Por ejemplo, es posible separar una fracción que contiene ramnosa de la disolución de alimentación con una resina de intercambio catiónico débilmente ácida y después alimentar la fracción que contiene ramnosa de la separación débilmente ácida a una separación cromatográfica de intercambio aniónico débilmente básica y separar adicionalmente una fracción que contiene ramnosa de los demás componentes. Es además posible separar simultáneamente otros productos posiblemente deseados de la fracción que contiene ramnosa. Por otro lado es posible purificar una cierta fracción, por ejemplo fracción de betaína, con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida después de que se ha separado primero de la disolución de alimentación con una resina de intercambio aniónico débilmente básica. Según una realización de la presente invención la disolución de alimentación puede además someterse primero a una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida y después la resultante disolución que contiene ramnosa puede someterse a una resina de intercambio aniónico débilmente básica.

Diversas posibilidades para combinar resinas de intercambio catiónico débilmente ácidas, resinas de intercambio catiónico fuertemente ácidas y resinas de intercambio catiónico débilmente básicas se muestran en los Ejemplos. La separación del escurrido de la cristalización de xilosa con resina de intercambio catiónico fuertemente ácida se muestra en el Ejemplo 2, después de cuya separación la fracción de xilosa se alimenta a una resina de intercambio catiónico débilmente ácida según el Ejemplo 3. La fracción que contiene ramnosa producida según el Ejemplo 3 se alimenta entonces a una resina de intercambio catiónico débilmente ácida según el Ejemplo 4 o a una resina de intercambio aniónico débilmente básica según el Ejemplo 5. El rendimiento de ramnosa de ambos Ejemplos 4 y 5 fue bueno.

La separación cromatográfica adicional de la fracción que contiene ramnosa del Ejemplo 4 con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida se muestra en el Ejemplo 6 y la separación de la fracción que contiene ramnosa, que se ha obtenido de la misma forma como en el Ejemplo 5 con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida, se muestra en el Ejemplo 7.

La separación cromatográfica de glicerol e inositol a partir de betaína se muestra en el Ejemplo 8. Una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida puede usarse para purificar la fracción de betaína cuando las sales se eliminan. Por otro lado puede alimentarse también vinasa a una columna que contiene una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida antes de la separación cromatográfica con una resina de intercambio aniónico débilmente básica.

La separación cromatográfica de oligosacáridos, maltosa y glucosa unos de otros con una resina de intercambio aniónico débilmente básica se muestra en el Ejemplo 9. Con resina de intercambio aniónico débilmente básica puede separarse la maltosa en buen rendimiento a partir de los demás componentes.

La separación cromatográfica de maltosa a partir de hidrolisato de almidón con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida se muestra en el Ejemplo 10.

La separación cromatográfica de betaína e inositol a partir de una disolución que los contiene con una resina de intercambio aniónico débilmente básica se muestra en el Ejemplo 11.

La comparación de selectividades de diferentes compuestos con resina de intercambio catiónico débilmente ácida, resina de intercambio catiónico fuertemente ácida y resina de intercambio aniónico débilmente básica se muestra en el Ejemplo 12.

Se sabe generalmente que cuando se usa la resina de intercambio aniónico débilmente básica con esqueleto acrílico la resina es más tolerante, por ejemplo, para el ensuciamiento orgánico, que ha sido un problema en la separación cromatográfica, por ejemplo, con intercambiadores aniónicos fuertemente básicos. Los azúcares tienden a descomponer en altos valores de pH. Una ventaja de la presente invención es que la separación se lleva a cabo en valores menores de pH y los azúcares reductores tienen una buena estabilidad en valores de pH de 3 a 5. En condiciones ácidas la resina de intercambio catiónico débilmente básica está en forma iónica. Otra ventaja de la presente invención es que la separación puede llevarse a cabo en una disolución de azúcar ácida. La resina de intercambio aniónico débilmente básica es especialmente ventajosa cuando se separan azúcares reductores.

Será obvio para un experto en la técnica que, como la tecnología avanza, el concepto inventivo puede implementarse de varias formas. La invención y sus realizaciones no están limitadas a los ejemplos descritos sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Separación cromatográfica del escurrido de la cristalización de xilosa con una resina de intercambio catiónico débilmente ácida en forma H^+/Mg^{2+}

5 El escurrido de la cristalización de xilosa a partir de un/el procedimiento de producción de xilosa basado en lejías residuales de Mg-si (madera de haya) se sometió a una separación cromatográfica. La separación se realizó en una columna cromatográfica como un procedimiento en cargas. El equipo consistió en contenedores de alimentación y agua eluyente que tienen una camisa de calentamiento, una columna de separación cromatográfica, tuberías para entrada de disolución de alimentación además de tuberías de agua eluyente, una bomba y un colector de muestra para la descarga. La columna con un diámetro de 0,045 m se rellena con una resina de intercambio catiónico débilmente ácida acrílica (Finex CA 12 GC) fabricada por Finex Ltd., Finlandia. La resina era una resina basada en acrilato de etilo. La altura del lecho de resina fue aproximadamente 0,70 m. El grado de reticulado de la resina fue 6,0% de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,26 mm. La resina se regeneró principalmente en forma H^+ (94%) y parcialmente en forma Mg^{2+} (6%) y un dispositivo de alimentación se colocó en la parte superior del lecho de resina. La temperatura de la columna y disolución de alimentación y agua eluyente fue aproximadamente 65°C. El caudal en la columna se ajustó a 4 ml/min. La filtración de la disolución de alimentación se llevó a cabo por filtración al vacío antes de los ensayos.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

Etapa 1: El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se determinó y ajustó a 25 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución. El pH de la disolución de alimentación fue 3,5.

Etapa 2: 100 ml de disolución de alimentación precalentada se inyectó a la parte superior del lecho de resina (a través del dispositivo de alimentación).

Etapa 3: La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibró por varias alimentaciones antes del muestreo.

Etapa 4: Muestras de 10 ml de la disolución de salida se recogieron a intervalos de 3 min. La composición de las muestras se analizó con HPLC (PED).

15 La resina dio una buena separación de ramnosa de otros monosacáridos. La ramnosa se eluye al final del perfil cuando la ramnosa se eluye antes de los demás monosacáridos con resina WAC en forma Na^+ . La ramnosa se eluye además antes de otros monosacáridos con resina WBA aunque la ramnosa se eluye con resina SAC de forma simultánea con otros monosacáridos.

20 Ejemplo 2

Separación cromatográfica del escurrido de la cristalización de xilosa con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida en forma Na^+ .

25 El escurrido de la cristalización de xilosa a partir de un/el procedimiento de producción de xilosa basado en lejías residuales de Ca-si (madera de abedul) se sometió a una separación cromatográfica en una columna de separación por cargas. La separación se realizó en una columna de separación cromatográfica a escala piloto como un procedimiento por cargas.

El equipo consistió en un tanque de alimentación, una bomba de alimentación, un intercambiador de calor, una columna de separación cromatográfica, contenedores de producto, tuberías para entrada de disolución de alimentación además de agua eluyente, tuberías para la salida y control de flujo para el líquido de salida.

30 La columna con un diámetro de 0,225 m se rellena con una resina de intercambio de cationes fuerte (fabricada por Finex Ltd, Finlandia). La altura del lecho de resina fue aproximadamente 5,1 m. El grado de reticulado fue 5,5% de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,41 mm. La resina se regeneró en forma de sodio (Na^+) y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte superior del lecho de resina. La temperatura de la columna, disolución de alimentación y agua eluyente fue aproximadamente 65°C. El caudal en la columna se ajustó a 30 l/h.

35 La disolución de alimentación se pre-trató por filtración usando un filtro de presión y tierra diatomea como auxiliar de filtro. La disolución de alimentación se calentó entonces a 65°C y el pH se ajustó a pH 6, después de lo cual la disolución se filtró.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

Etapa 1. El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se determinó y ajustó a 35 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución.

Etapa 2. 15 l de la disolución de alimentación precalentada se bombeó a la parte superior del lecho de resina (a través del dispositivo de alimentación).

Etapa 3. La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibraron por varias alimentaciones antes del muestreo.

Etapa 4. La densidad y conductividad de la disolución de salida se midió continuamente. La disolución de salida se recogió y se dividió en dos fracciones en el siguiente orden: fracción residual (contiene la mayoría de las sales) y fracción de xilosa (contiene xilosa, ramnosa, arabinosa y otros monosacáridos).

5 La cantidad de sustancia seca además del contenido de ramnosa, arabinosa y xilosa en la disolución de alimentación y en la fracción de producto (fracción de xilosa) se presentan en la Tabla 1. Las concentraciones de los componentes se expresan como porcentajes de la sustancia seca total en la fracción particular. El rendimiento de ramnosa, arabinosa y xilosa en una/la fracción de producto se presentan también (la cantidad del componente en la fracción particular en relación con la cantidad total de ese componente en todas las fracciones de salida). El color (ICUMSA, medido a pH 5) de la disolución de alimentación y fracción de producto se presenta también, además del % de eliminación de color.

Tabla 1. Composiciones, rendimientos y colores

	Disolución de alimentación (nominal)	Fracción de xilosa (analizada a partir de muestras)	Fracción residual (analizada a partir de muestras)
SS en fracción, kg	5,9	4,3	2,1
SS g/100 g de disolución	34,5	9,3	3,5
Ramnosa, % en SS	5,6	7,1	0,04
Arabinosa, % en SS	2,8	3,9	0,03
Xilosa, % en SS	26,0	37,7	0,1
Color, ICUMSA	38 900	5 000	
Ramnosa, rendimiento en %		99,7	
Arabinosa, rendimiento en %		99,6	
Xilosa, rendimiento en %		99,9	
Eliminación de color, %		87,1	

10 La mayoría de las sales y color se eliminaron a partir del escurrido de la cristalización de xilosa con una resina de intercambio catiónico fuerte ácida con forma Na^+ . Además del contenido de ramnosa, arabinosa y xilosa fueron mayores en la fracción de producto que en la disolución de alimentación.

Ejemplo 3

15 Separación cromatográfica de fracción de xilosa que contiene ramnosa y arabinosa con resina de intercambio catiónico débilmente ácida

20 La fracción de xilosa preparada según el Ejemplo 2 (que contiene xilosa, ramnosa, arabinosa y otros monosacáridos) se sometió a una separación cromatográfica en una columna de separación por cargas. La separación se realizó en una columna de separación cromatográfica a escala piloto como un procedimiento por cargas.

El equipo consistió en un tanque de alimentación, una bomba de alimentación, un intercambiador de calor, una columna de separación cromatográfica, contenedores de producto, tuberías para entrada de disolución de alimentación además de agua eluyente, tuberías para la salida y control de flujo para el líquido de salida.

25 La columna con un diámetro de 1,0 m se rellenó con una resina de intercambio catiónico débilmente ácida (Finex CA 16 GC) fabricada por Finex Ltd, Finlandia. La resina era una resina basada en acrilato de metilo. La altura del lecho de resina fue aproximadamente 5,0 m. El grado de reticulado fue 8% en peso de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,28 mm. La resina se regeneró en forma de sodio (Na^+) y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte superior del lecho de resina. La temperatura de la columna, disolución de alimentación y agua eluyente fue 65°C. El caudal en la columna se ajustó a 785 l/h.

El pH de la disolución de alimentación se ajustó a pH 6,5 después de lo cual la disolución se filtró.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

- Etapa 1. El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se ajustó a 35 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución.
- Etapa 2. 400 l de la disolución de alimentación precalentada se bombearon a la parte superior del lecho de resina.
- Etapa 3. La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibraron por varias alimentaciones antes del muestreo.
- Etapa 4. La densidad y conductividad de la disolución de salida se midió continuamente. La disolución de salida se recogió y se dividió en tres fracciones (cuando los perfiles de alimentación no se superpusieron) en el siguiente orden: fracción residual (que contiene la mayoría de las sales), fracción rica en ramnosa (que contiene la mayoría de la ramnosa) y fracción rica en xilosa (que contiene la mayoría de la xilosa, arabinosa y otros monosacáridos).

- 5 La cantidad de sustancia seca además del contenido de ramnosa y xilosa en la disolución de alimentación y en las fracciones de producto se presentan en la Tabla 2. Las concentraciones de los componentes se expresan como porcentajes del contenido de sustancia seca total en la fracción particular. El rendimiento de ramnosa y xilosa en fracciones de producto se presenta también (la cantidad del componente en la fracción particular en relación con la cantidad total de ese componente en todas las fracciones de salida).

Tabla 2. Composiciones y rendimientos, composición de fracciones se analizaron a partir de las muestras

	Disolución de alimentación (nominal)	Fracción de ramnosa	Fracción de xilosa	Fracción residual
SS en fracción, kg	160	44	114	11
SS g/100 g de disolución	36,1	6,2	10,6	2,3
Ramnosa, % en SS	6,7	21,9	0,9	0,2
Xilosa, % en SS	37,4	24,5	36,5	2,3
Ramnosa, rendimiento en %		90,4	--	--
Xilosa, rendimiento en %		--	79,0	--

- 10 El contenido en ramnosa (% del contenido de sustancia seca total) en una/la fracción de producto rica en ramnosa fue de 3,3 veces en comparación con el contenido en ramnosa en una/la disolución de alimentación. La ramnosa se separó de la disolución de alimentación con un buen rendimiento.

Ejemplo 4

- 15 Separación cromatográfica de fracción rica en ramnosa con una resina de intercambio catiónico débilmente ácida
- Una/la fracción rica en ramnosa preparada según el Ejemplo 3 se sometió a una separación cromatográfica en una columna de separación por cargas. La separación se realizó en una columna de separación cromatográfica a escala industrial como un procedimiento por cargas.

- 20 El equipo consistió en un tanque de alimentación, una bomba de alimentación, un intercambiador de calor, una columna de separación cromatográfica, contenedores de producto, tuberías para la entrada de disolución de alimentación además de agua eluyente, tuberías para la salida y control de flujo para el líquido de salida.

- 25 La columna con un diámetro de 1,0 m se rellenó con una resina de intercambio catiónico débilmente ácida (Finex CA 16 GC) fabricada por Finex Ltd, Finlandia. La resina era resina basada en acrilato de metilo. La altura del lecho de resina fue aproximadamente 5,0 m. El grado de reticulado fue 8% en peso de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,28 mm. La resina se regeneró en forma de sodio (Na⁺) y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte superior del lecho de resina. La temperatura de la columna, disolución de alimentación y agua eluyente fue 65°C. El caudal en la columna se ajustó a 785 l/h.

El pH de la disolución de alimentación se ajustó a pH 6,5, después de lo cual la disolución se filtró.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

- Etapa 1. El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se ajustó a 35 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución.
- Etapa 2. 250 l de la disolución de alimentación precalentada se bombeó a la parte superior del lecho de resina.
- Etapa 3. La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibraron por varias alimentaciones antes del muestreo.
- Etapa 4. La densidad y conductividad de la disolución de salida se midieron continuamente. La disolución de salida se recogió y se dividió en tres fracciones (cuando los perfiles de alimentación no se superpusieron) en el siguiente orden: primera fracción residual (que contiene la mayoría de las sales), fracción rica en ramnosa (que contiene la mayoría de la ramnosa) y segunda fracción residual (que contiene la mayoría de la xilosa y otros monosacáridos).

5 La cantidad de sustancia seca además del contenido de ramnosa y xilosa en la disolución de alimentación y en la fracción de producto se presentan en la Tabla 3. Las concentraciones de los componentes se expresan como porcentajes del contenido de sustancia seca total en la fracción particular. El rendimiento de ramnosa en la fracción de producto se presenta también (la cantidad del componente en la fracción particular en relación con la cantidad total de ese componente en todas las fracciones de salida).

Tabla 3. Composiciones y rendimientos

	Disolución de alimentación (nominal)	Fracción de ramnosa (analizada a partir de muestras)	Fracción residual (analizada a partir de muestras)
SS en fracción, kg	100	39	67
SS g/100 g de disolución	35,5	8,6	4,5
Ramnosa, % en SS	21,6	47,0	4,5
Xilosa, % en SS	23,1	6,2	29,2
Ramnosa, rendimiento en %		86,0	

10 El contenido en ramnosa (% del contenido de sustancia seca total) en la fracción de producto fue de 2,2 veces en comparación con el contenido en ramnosa en la disolución de alimentación. La ramnosa se separó de la disolución de alimentación con un buen rendimiento y se eluyó de la columna esencialmente antes que los demás azúcares.

Ejemplo 5

Separación cromatográfica de fracción rica en ramnosa con una resina de intercambio aniónico débilmente básica

15 Una disolución preparada según el Ejemplo 3 (que contiene ramnosa y xilosa) se sometió a una separación cromatográfica. La separación se realizó en una columna de separación cromatográfica como un procedimiento por cargas. El equipo consistió en contenedores de alimentación y agua eluyente, un intercambiador de calor, una columna de separación cromatográfica que tiene una camisa de calentamiento, tuberías para entrada de disolución de alimentación además de agua eluyente, tuberías, una bomba y un colector de muestra para la salida. La columna
 20 con un diámetro de 0,09 m se relleno con una resina de intercambio aniónico débilmente básica (Finex AA 545 GC) fabricada por Finex Ltd., Finlandia. La resina era un metilacrilato aminolizado con resina basada en dimetilaminopropilamina. La altura del lecho de resina fue aproximadamente 1,4 m. El grado de reticulado de la resina fue 4% en peso de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,385 mm. La resina se regeneró en forma de SO_4^{2-} y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte superior del lecho de resina. La temperatura de la columna y disolución de alimentación y agua eluyente fue 50°C. El caudal en la columna se ajustó a 43 ml/min.
 25 El pH de la disolución de alimentación se ajustó a pH 4 con ácido sulfúrico. La filtración de la disolución de alimentación se hizo por filtración al vacío antes de los ensayos.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

- Etapa 1: El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se ajustó a 30 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución.
- Etapa 2: 750 ml de la disolución de alimentación precalentada se bombeó a la parte superior del lecho de resina.
- Etapa 3: La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibraron mediante varias alimentaciones antes del muestreo.
- Etapa 4: Muestras de 43 ml de la disolución saliente se recogieron a intervalos de 3 min. La composición de las muestras se analizó con equipo Dionex HPLC con detector electroquímico pulsado y columna de intercambio aniónico CarboPac PA1™ (agua y NaOH 0,2 M como eluyentes).

5 La resina da una buena separación de ramnosa de otros monosacáridos. Las primeras sales se eluyeron de la columna. La ramnosa eluyó de la columna antes que otros monosacáridos y se superpuso parcialmente con sales. Otros monosacáridos eluyeron de la columna después de la ramnosa. El perfil de separación de salida se dividió en cinco fracciones en el siguiente orden: primera fracción residual (que contiene la mayoría de las sales), primera fracción reciclada, fracción rica en ramnosa (que contiene la mayoría de la ramnosa), segunda fracción reciclada y segunda fracción residual (que contiene la mayoría de la xilosa y otros monosacáridos).

el pH del efluente estuvo entre 2,5 y 3. Los resultados se muestran de forma gráfica en la FIG. 5.

10 La cantidad de sustancia seca además del contenido de ramnosa y xilosa en la disolución de alimentación y en las fracciones de producto se presentan en la Tabla 4. Las concentraciones de los componentes se expresan como porcentajes del contenido de sustancia seca total en la fracción particular. El rendimiento de ramnosa en las fracciones de producto se presenta también (la cantidad del componente en la fracción particular en relación con la cantidad total de ese componente en todas las fracciones de salida).

15 Tabla 4. Composiciones y rendimientos

	Disolución de alimentación	Fracción de ramnosa (analizada a partir de muestras)	Fracciones residuales combinadas (analizadas a partir de muestras)
SS en fracción, g	253	125	81
SS g/100 g de disolución	29,7	13,2	3,4
Ramnosa, % en SS	26,8	39,2	9,7
Xilosa, % en SS	22,2	16,6	33,1
Ramnosa, rendimiento en %		86,1	

El contenido en ramnosa (% del contenido de sustancia seca total) en la fracción de producto fue de 1,4 veces en comparación con el contenido en ramnosa en la disolución de alimentación. La ramnosa se separó de la disolución de alimentación con un buen rendimiento.

20 Ejemplo 6

Separación cromatográfica de fracción rica en ramnosa con una resina de intercambio catiónico fuerte ácida en forma Ca^{2+}

25 Una/la fracción rica en ramnosa preparada según el Ejemplo 4 se sometió a una separación cromatográfica en una columna de separación por cargas. La separación se realizó en una columna de separación cromatográfica a escala piloto como un procedimiento por cargas.

El equipo consistió en un tanque de alimentación, una bomba de alimentación, un intercambiador de calor, una columna de separación cromatográfica, contenedores de producto, tuberías para entrada de disolución de alimentación además de agua eluyente, tuberías para la salida y control de flujo para el líquido de salida.

5 La columna con un diámetro de 0,6 m se rellenó con una resina de intercambio catiónico fuerte ácida (Finex CS 11 GC) fabricada por Finex Ltd, Finlandia. La altura del lecho de resina fue aproximadamente 5,0 m. El grado de reticulado fue 5,5% en peso de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,40 mm. La resina se regeneró en forma de calcio (Ca^{2+}) y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte superior del lecho de resina. La temperatura de la columna, disolución de alimentación y agua eluyente fue 65°C. El caudal en la columna se ajustó a 210 l/h.

El pH de la disolución de alimentación se ajustó a pH 6,5, después de lo cual la disolución se filtró.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

Etapa 1. El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se ajustó a 30 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución.

Etapa 2. 110 l de la disolución de alimentación precalentada se bombeó a la parte superior del lecho de resina.

Etapa 3. La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibraron mediante varias alimentaciones antes del muestreo.

Etapa 4. La densidad y conductividad de la disolución de salida se midió continuamente. La disolución de salida se recogió y se dividió en tres fracciones (cuando los perfiles de alimentación no se superpusieron) en el siguiente orden: primera fracción residual (que contiene componentes distintos de monosacáridos), fracción rica en ramnosa (que contiene la mayoría de la ramnosa) y segunda fracción residual (que contiene otros monosacáridos y otros componentes).

10 La cantidad de sustancia seca además del contenido de ramnosa en la disolución de alimentación y en la fracción de producto se presenta en la Tabla 5. La concentración de ramnosa se expresa como porcentaje del contenido de sustancia seca total en la fracción particular. El rendimiento de ramnosa en la fracción de producto se presenta también (la cantidad del componente en la fracción particular en relación con la cantidad total de ese componente en todas las fracciones de salida).

15 Tabla 5. Composiciones y rendimientos

	Disolución de alimentación (nominal)	Fracción de ramnosa (analizada a partir de muestras)	Fracciones residuales combinadas (analizadas a partir de)
SS en fracción, kg	37	34,8	3,7
SS g/100 g de disolución	30	10,2	1,6
Ramnosa, % en SS	47,9	55,4	5,4
Ramnosa, rendimiento en %		99,0	

La pureza de la ramnosa se aumentó en 16%. El rendimiento de ramnosa fue excelente, siendo de 99%.

Ejemplo 7

20 Separación cromatográfica de fracción rica en ramnosa con una resina de intercambio catiónico fuerte ácida con forma Ca^{2+}

Una/la fracción rica en ramnosa preparada según el método en el Ejemplo 5 aunque usando equipamiento mayor, se sometió a una separación cromatográfica en una columna de separación por cargas. La separación se realizó en una columna de separación cromatográfica a escala piloto como un procedimiento por cargas.

25 El equipo consistió en un tanque de alimentación, una bomba de alimentación, un intercambiador de calor, una columna de separación cromatográfica, contenedores de producto, tuberías para entrada de disolución de alimentación además de agua eluyente, tuberías para la salida y control de flujo para el líquido de salida.

30 La columna con un diámetro de 0,6 m se rellenó con una resina de intercambio catiónico fuerte ácida (Finex CS 11 GC) fabricada por Finex Ltd, Finlandia. La altura del lecho de resina fue aproximadamente 5,0 m. El grado de reticulado fue 5,5% en peso de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,40 mm. La resina se regeneró en forma de calcio (Ca^{2+}) y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte superior del lecho de

resina. La temperatura de la columna, disolución de alimentación y agua eluyente fue 65°C. El caudal en la columna se ajustó a 210 l/h.

El pH de la disolución de alimentación se ajustó a pH 6,5, después de lo cual la disolución se filtró.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

- Etapa 1. El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se ajustó a 30 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución.
- Etapa 2. 110 l de la disolución de alimentación precalentada se bombeó a la parte superior del lecho de resina.
- Etapa 3. La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibran mediante varias alimentaciones antes del muestreo.
- Etapa 4. La densidad y conductividad de la disolución de salida se midió continuamente. La disolución de salida se recogió y se dividió en cinco fracciones (cuando los perfiles de alimentación no se superpusieron) en el siguiente orden: primera fracción residual (que contiene principalmente componentes distintos de monosacáridos), primera fracción de reciclado (que contiene además pequeñas cantidades de ramnosa y otros monosacáridos), fracción rica en ramnosa (que contiene la mayoría de la ramnosa), segunda fracción de reciclado y segunda fracción residual (que contiene otros monosacáridos y otros componentes).

5

La cantidad de sustancia seca además del contenido de ramnosa en la disolución de alimentación, en las fracciones de producto y además en la fracción de reciclado combinada, se presenta en la Tabla 6. La concentración de ramnosa se expresa como porcentaje del contenido de sustancia seca total en la fracción particular. El rendimiento de ramnosa en la fracción de producto se presenta además (la cantidad del componente en la fracción particular en relación con la cantidad total de ese componente en todas las fracciones de salida - excluyendo la fracción de reciclado).

10

Tabla 6. Composiciones y rendimientos

Disolución de alimentación	Fracción de ramnosa	Fracción residual	Fracción de reciclado
SS en fracción, kg 37	23,8	6,4	6,4
SS g/100 g de disolución 30	14,2	2,0	7,4
Ramnosa, % en SS 40,3	52,3	7,9	24,6
Ramnosa, rendimiento en %	96,1		

La pureza de ramnosa se aumentó en 30%. El rendimiento de ramnosa fue excelente, siendo de 96,1%.

15 Ejemplo 8

Separación cromatográfica de vinasa con una resina de intercambio aniónico débilmente básica

Una disolución de vinasa, que contiene, por ejemplo, sales, betaína, inositol y glicerol, se sometió a una separación cromatográfica. La separación se realizó en una columna de separación cromatográfica como un procedimiento por cargas. El equipo consistió en contenedores de alimentación y agua eluyente, un intercambiador de calor, una columna de separación cromatográfica que tiene una camisa de calentamiento, tuberías para la entrada de disolución de alimentación además de agua eluyente, tuberías y una bomba para la salida y un colector de muestra. La columna con un diámetro de 0,09 m se rellenó con una resina de intercambio aniónico débilmente básica (Finex AA 545 GC) fabricada por Finex Ltd., Finlandia. La resina era una resina basada en acrílico. La altura del lecho de resina fue aproximadamente 1,4 m. El grado de reticulado de la resina fue 4% en peso de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,385 mm. La resina se regeneró en forma de SO_4^{2-} y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte superior del lecho de resina. La temperatura de la columna y disolución de alimentación y agua eluyente fue 50°C. El caudal en la columna se ajustó a 43 ml/min. El pH de la disolución de alimentación fue pH 5,4. La filtración de la disolución de alimentación se llevó a cabo por filtración al vacío antes de los ensayos.

20

25

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

- Etapa 1: El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se ajustó a 30 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución.
- Etapa 2: 750 ml de la disolución de alimentación precalentada se bombeó a la parte superior del lecho de resina.
- Etapa 3: La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibraron mediante varias alimentaciones antes del muestreo.
- Etapa 4: Muestras de 43 ml de la disolución de salida se recogieron a intervalos de 3 min. La composición de las muestras se analizó con equipo HPLC con un detector de índice refractivo (IR) y columna de intercambio catiónico de forma Ca^{2+} ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,001M como un eluyente) y además con una columna de intercambio catiónico de forma Na^+ (Na_2SO_4 0,003M como un eluyente).

5 La resina separa glicerol e inositol de la betaína y la mayoría de los demás compuestos. Los resultados se muestran de forma gráfica en la FIG. 7. Una/la fracción de betaína puede purificarse por ejemplo con resina SAC con forma Na^+ , que elimina las sales. En contraste, la disolución de vinasa puede someterse al principio a resina SAC y después a resina WBA.

Ejemplo 9

Separación cromatográfica de hidrolisato de maltosa con una resina de intercambio aniónico débilmente básica

10 Una disolución que contiene maltosa, glucosa y oligosacáridos se sometió a una separación cromatográfica. La separación se realizó en una columna de separación cromatográfica como un procedimiento por cargas. El equipo consistió en contenedores de alimentación y agua eluyente, un intercambiador de calor, una columna de separación cromatográfica que tiene una camisa de calentamiento, tuberías para entrada de disolución de alimentación además de agua eluyente, tuberías y una bomba para la salida y un colector de muestra. La columna con un diámetro de 0,09 m se rellenó con una resina de intercambio aniónico débilmente básica (Finex AA 545 GC) fabricada por Finex Ltd., Finlandia. La resina era una resina basada en acrílico. La altura del lecho de resina fue aproximadamente 1,5 m. El grado de reticulado de la resina fue 4% en peso de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,385 mm. La resina se regeneró en forma de SO_4^{2-} y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte superior del lecho de resina. La temperatura de la columna y disolución de alimentación y agua eluyente fue 50°C. El caudal en la columna se ajustó a 43 ml/min. El pH de la disolución de alimentación fue pH 4,7. La filtración de la disolución de alimentación se hizo por filtración al vacío antes de los ensayos.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

- Etapa 1: El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se ajustó a 20 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución.
- Etapa 2: 750 ml de la disolución de alimentación precalentada se bombeó a la parte superior del lecho de resina.
- Etapa 3: La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibraron mediante varias alimentaciones antes del muestreo.
- Etapa 4: Muestras de 43 ml de la disolución de salida se recogieron a intervalos de 3 min. La composición de las muestras se analizó con equipo HPLC con un detector de índice refractivo (IR) y columna de intercambio catiónico en forma Na^+ (Na_2SO_4 0,003M como un eluyente).

25 La resina separa oligosacáridos, maltosa y glucosa los unos de los otros. Los oligosacáridos se eluyeron de la columna en la parte delantera y la glucosa en la pendiente de salida del perfil de separación de la maltosa. el pH del efluente estaba entre 3 a 4. Los resultados se muestran de forma gráfica en la FIG. 8.

30 La cantidad de sustancia seca además del contenido de maltosa en la disolución de alimentación y en la fracción de producto se presenta en la Tabla 7. El perfil de separación se cortó en tres fracciones: primera fracción residual (que contiene oligosacáridos y alguna maltosa), fracción rica en maltosa (que contiene la mayoría de la maltosa) y segunda fracción residual (que contiene la mayoría de la glucosa). La concentración de maltosa se expresa como porcentaje del contenido de sustancia seca total en la fracción particular. El rendimiento de maltosa en la fracción de producto se presenta además (la cantidad del componente en la fracción particular en relación con la cantidad total de ese componente en todas las fracciones de salida). También se presentan las eliminaciones de oligosacáridos y

glucosa. La eliminación se expresa como la cantidad del componente en fracciones residuales en comparación con la cantidad de ese componente en fracciones residuales y en la fracción de producto.

Tabla 7. Composiciones y rendimientos

	Disolución de alimentación	Fracción de maltosa	Fracción residual combinada
SS en fracción, g	165	137	28
SS g/100 g de disolución	20	8,6	1,4
Maltosa, % en SS	85,1	94,0	42,1
Glucosa, % en SS	8,1	1,7	36,9
Oligosacáridos,% en SS	5,8	4,2	13,8
Maltosa, rendimiento en %		91,5	
Eliminación de oligosacárido, en %		41	
Eliminación de glucosa, en %		81	

- 5 La resina WBA separó maltosa bien a partir de otros componentes. Especialmente, la resina separó maltosa bien de glucosa. La pureza y rendimiento de la maltosa fueron buenos.

Ejemplo 10

Separación cromatográfica de maltosa a partir de hidrolisato de almidón con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida

- 10 El hidrolisato de almidón (hidrolisato de maltosa) se sometió a una separación cromatográfica en una columna de separación por cargas. La separación se realizó en una columna de separación cromatográfica a escala piloto como un procedimiento por cargas.

- 15 El equipo consistió en un tanque de alimentación, una bomba de alimentación, un intercambiador de calor, una columna de separación cromatográfica, contenedores de producto, tuberías para entrada de disolución de alimentación además de agua eluyente, tuberías para la salida y control de flujo para el líquido de salida.

- 20 La columna con un diámetro de 0,225 m se rellenó con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida. La altura del lecho de resina fue aproximadamente 5,2 m. El grado de reticulado fue 4% en peso de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,36 mm. La resina se regeneró en forma de sodio (Na⁺) y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte superior del lecho de resina. La temperatura de la columna, disolución de alimentación y agua eluyente fue 80°C. El caudal en la columna se ajustó a 30 l/h.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

- Etapa 1. El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se ajustó a 36 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución.
- Etapa 2. 15 l de la disolución de alimentación precalentada se bombeó a la parte superior del lecho de resina.
- Etapa 3. La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibraron mediante varias alimentaciones antes del muestreo.
- Etapa 4. La densidad y conductividad de la disolución de salida se midió continuamente. La disolución de salida se recogió y se dividió en cinco fracciones en el siguiente orden: primera fracción residual (que contiene oligosacáridos), fracción de reciclado (que contiene principalmente maltosa y maltotriosa), fracción rica en maltosa (que contiene la mayoría de la maltosa), segunda fracción de reciclado (que contiene principalmente maltosa y glucosa) y segunda fracción residual (que contiene principalmente glucosa). Ambas fracciones de reciclado se combinaron con la disolución de alimentación para diluir la alimentación a una concentración adecuada.

La cantidad de sustancia seca además del contenido de maltosa en la disolución de alimentación y en la fracción de producto se presentan en la Tabla 8. La concentración de maltosa se expresa como porcentaje del contenido de

5 sustancia seca total en la fracción particular. El rendimiento de maltosa en la fracción de producto se presenta también (la cantidad del componente en la fracción particular en relación con la cantidad total de ese componente en todas las fracciones de salida). También se presentan las eliminaciones de oligosacárido, maltotriosa y glucosa. La eliminación se expresa como la cantidad del componente en fracciones residuales en comparación con la cantidad de ese componente en fracciones residuales y en la fracción de producto.

Tabla 8. Composiciones y rendimientos

	Disolución de alimentación	Fracción de maltosa	Fracción residual combinada
SS en fracción, kg	6,0	2,8	0,9
SS g/100 g de disolución	36	16	2,3
Maltosa, % en SS	83	89	54
Maltotriosa, % en SS	2,0	0,3	9,6
Glucosa, % en SS	6,5	9,0	1,8
Oligosacáridos, % en SS	6,2	0,1	32,0
Maltosa, rendimiento en %		84	
Eliminación de oligosacárido, en %		99	
Eliminación de maltotriosa, en %		92	
Eliminación de glucosa, en %		6,1	

10 Una resina con 4% en peso de DVB separó maltosa bien de los demás componentes. Especialmente, la resina separó maltosa bien de oligosacáridos y maltotriosa. La pureza de la maltosa se aumentó en 7%. El rendimiento de maltosa fue bueno, siendo 84%.

Ejemplo 11

Separación cromatográfica de disolución que contiene betaína e inositol con una resina de intercambio aniónico débilmente básico

15 Una disolución que contiene sacarosa, betaína, manitol, inositol y sal (Na_2SO_4) en la relación de 15:50:15:15:5 se sometió a una separación cromatográfica. La separación se realizó en una columna de separación cromatográfica como un procedimiento por cargas. El equipo consistió en contenedores de alimentación y agua eluyente, un intercambiador de calor, una columna de separación cromatográfica que tiene una camisa de calentamiento, tuberías para entrada de disolución de alimentación además de agua eluyente, tuberías y una bomba para la salida y un colector de muestra. La columna con un diámetro de 0,09 m se rellenó con una resina de intercambio aniónico débilmente básica (Finex AA 545 GC) fabricada por Finex Ltd., Finlandia. La resina era una resina basada en acrílico. La altura del lecho de resina fue aproximadamente 1,5 m. El grado de reticulado de la resina fue 4% en peso de DVB y el tamaño de partícula promedio de la resina fue 0,385 mm. La resina se regeneró en forma de SO_4^{2-} y se colocó un dispositivo de alimentación en la parte superior del lecho de resina. La temperatura de la columna y disolución de alimentación y agua eluyente fue 50°C. El caudal en la columna se ajustó a 43 ml/min. El pH de la disolución de alimentación se ajustó a pH 4,4 con ácido sulfúrico. La filtración de la disolución de alimentación se hizo por filtración al vacío antes de los ensayos.

La separación cromatográfica se llevó a cabo como sigue:

- Etapa 1: El contenido de sustancia seca de la disolución de alimentación se ajustó a 20 g de sustancia seca en 100 g de disolución según el índice refractivo (IR) de la disolución.
- Etapa 2: 750 ml de la disolución de alimentación precalentada se bombeó a la parte superior del lecho de resina.
- Etapa 3: La disolución de alimentación se eluyó hacia abajo en la columna alimentando agua intercambiada en iones precalentada a la parte superior de la columna. El pH y forma iónica de la resina se equilibraron mediante varias alimentaciones antes del muestreo.
- Etapa 4: Muestras de 43 ml de la disolución de salida se recogieron a intervalos de 3 min. La composición de las muestras se analizó con equipo HPLC con un detector de índice refractivo (IR) y columna de intercambio catiónico en forma Na^+ (Na_2SO_4 0,003M como un eluyente).

Con esta resina es posible separar, por ejemplo, inositol de betaína. La composición de la disolución de alimentación además de algunas purezas máximas analizadas a partir de las muestras de perfil se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. La composición de la disolución de alimentación

	% en SS	% de pureza máx. en IR-SS
Na ₂ SO ₄	5	
Sacarosa	15	
Manitol	15	55,9
Inositol	15	34,1
Betaína	50	76,8

- 5 Los volúmenes de elución, coeficientes de partición y un factor de separación para el inositol y la betaína se muestran en la Tabla 10. Un/el coeficiente de partición K(d) para un componente particular se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$K(d) = [V(e) - V(0)] / V(i) \quad (1)$$

donde:

- 10 – V(e) es el volumen de elución de un componente particular (por ejemplo, el volumen de efluente a partir del comienzo de la alimentación hasta el mayor pico de concentración de ese componente).
- V(0) es el volumen hueco (por ejemplo, el volumen de efluente desde el comienzo de la alimentación hasta que las sales comienzan a eluir de la columna).
- 15 – V(i) es el volumen interno de la gota de resina (por ejemplo, aproximadamente el 45% del volumen del lecho de resina).

El factor de separación α es la proporción de coeficientes de partición de diferentes componentes.

Tabla 10. Volúmenes de elución, coeficientes de partición y factores de separación

	Volumen de elución V(e) (ml)	Coefficiente de partición K(d)	Factor de separación α de Inositol/betaína
Betaína	5676	0,49	1,24
Inositol	6149	0,6	

Ejemplo 12

- 20 Valores de selectividad de diferentes resinas WBA comparadas con resinas SAC y WAC

Las selectividades de tres resinas WBA basadas en acrílico que tienen diferentes funcionalidades aminas y una resina WBA basada en epiclorhidrina se estudiaron usando disoluciones de ramnosa-arabinosa-xilosa y betaína-inositol-manitol-glicerol. Los coeficientes de partición para cada componente se determinaron con el método del tubo de ensayo. La selectividad se calculó a partir de los coeficientes de partición para cada par de componentes.

- 25 La funcionalidad amina en 1. WBA (Finex AA 546 GC) fue tetraetilenpentamina, en 2. WBA (AA 547 GC) fue pentaetilenhexamina y en 3. WBA (Finex AA 548 GC) fue trietilentetramina. El grado de reticulado de estas resinas fue 4% de DVB. La funcionalidad amina en resina WBA de policondensación basada en epiclorhidrina (núm. 4) fabricada también por Finex fue trietilentetramina. Las resinas se regeneraron en forma de ión SO₄²⁻ antes de los ensayos.

- 30 Por comparación, los parámetros se determinaron además para una resina SAC (resina de intercambio catiónico fuertemente ácida, 5,5% de DVB) y una resina WAC (resina de intercambio catiónico débilmente ácida, 8% de DVB). Ambas resinas se regeneraron en forma de ión Na⁺ antes de los ensayos.

Las disoluciones que se estudiaron se prepararon como sigue:

Disolución A: 1,9 g de arabinosa, 19 g de xilosa y 3,8 g de ramnosa se pesaron en 100 ml.

Disolución B: Arabinosa, xilosa y ramnosa, 8,3 g de cada una se pesaron en 100 ml.

Disolución C: 15 g de betaína, 3,75 g de inositol, 2,5 g of manitol y 3,75 g de glicerol se pesaron en 100 ml.

- 5 El pH de las tres disoluciones anteriores se ajustó para ensayos de resina WBA a pH 3, para ensayos de resina SAC a pH 6 y para ensayos de resina WAC a pH 8,5.

- 10 Todas las resinas se secaron superficialmente por centrifugado (15 min/ 2000 rpm) y después aproximadamente 6 g de cada resina seca superficialmente se pesó exactamente en tubos para sangre de cristal. 4 ml de la disolución en cuestión se añadieron y los tubos se templaron durante 1 hora en 65°C. La resina núm. 4 se templó toda la noche. Una muestra se succionó con una jeringa a través del tapón y la concentración de los componentes "fuera de la resina" (C_{fuera}) se analizaron por HPLC.

- 15 Las muestras que contenían disoluciones A y B se analizaron mediante equipo HPLC con detector de índice refractivo (IR) y agua de columna de intercambio catiónico con forma de Pb^{2+} como eluyente. La composición de las muestras que contenían disolución C se analizaron con equipo HPLC con detector de índice refractivo (IR) y columna de intercambio catiónico con forma Ca^{2+} ($Ca(NO_3)_2$ 0,001M como un eluyente.

La concentración de componente dentro de la resina se calculó usando la siguiente ecuación,

$$C_{resina} = m / V_{resina}$$

- 20 donde m es la masa del componente en la resina y V_{resina} es el volumen de la resina. V_{resina} se calculó dividiendo la cantidad de resina pesada con la densidad de la resina. El volumen de disolución añadido original V_i se asumió que era constante ($V_{salida} = 4$ ml).

El coeficiente de partición para cada azúcar respectivamente se calculó usando la ecuación de

$$K = C_{resina} / C_{fuera}$$

La selectividad se calculó de forma separada para cada par de componentes estudiados: $\alpha = K_1/K_2$. Las selectividades se muestran en las Figuras 11 (disoluciones A y B) y 12 (disolución C).

- 25 Según los resultados todas las resinas WBA estudiadas tienen una gran selectividad para separar ramnosa de arabinosa y xilosa. Además de esto, las resinas WBA que tienen tri-, tetra- o pentaetilentetramina como una funcionalidad amina parecen ser capaces de separar, por ejemplo, inositol y glicerol de betaína mejor que las resinas WAC o SAC. La resina WBA de policondensación basada en epiclorhidrina que tiene trietilentetramina como una funcionalidad amina tiene casi las mismas selectividades que la resina WAC.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para separar azúcares, alcoholes de azúcar, otros carbohidratos y mezclas de los mismos a partir de una disolución que contiene al menos dos de ellos, caracterizado por que el método comprende al menos una etapa en que la resina de intercambio aniónico débilmente básica seleccionada de un grupo que consiste en polímero poliacrílico reticulado aminado y resina epiclorhidrintrietilentetramina se usa en la separación cromatográfica.
2. El método según la reivindicación 1, caracterizado por que la disolución que contiene azúcares, alcoholes de azúcar y otros carbohidratos se alimenta en una columna cromatográfica que contiene resina de intercambio aniónico débilmente básica, eluyendo dicha columna con un eluyente y separando y recuperando un producto y/o productos.
- 10 3. El método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la resina de intercambio catiónico débilmente ácida se usa además en una columna cromatográfica.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se usa además resina de intercambio catiónico fuertemente ácida en una columna cromatográfica.
5. El método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la resina está reticulada con un reticulador aromático.
- 15 6. El método según la reivindicación 5, caracterizado por que la resina está reticulada con divinilbenceno.
7. El método según la reivindicación 6, caracterizado por que el grado de reticulado es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10% en peso de divinilbenceno.
8. El método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la resina puede reticularse con un reticulador alifático, tal como isopreno, 1,7-octadieno, trivinilciclohexano, dietilenglicol-diviniléter, N,N'-metilenbisacrilamida, N,N'-alquilenbisacrilamidas, dimetacrilato, di-, tri-, tetra-, pentacrilato o pentametacrilato de etilenglicol.
- 20 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la temperatura de la columna, la disolución de alimentación y el eluyente está entre 10 y 95°C.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el tamaño de partícula de la resina de intercambio aniónico débilmente básica es de 10 a 2000 micrómetros, preferiblemente de 100 a 400 micrómetros.
- 25 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el pH de la disolución de alimentación está en el lado ácido del intervalo de pH.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el eluyente es agua, una disolución acuosa, un alcohol o una mezcla de los mismos.
- 30 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los azúcares a separar son monosacáridos, disacáridos, trisacáridos u oligosacáridos.
14. El método según la reivindicación 13, caracterizado por que los monosacáridos a separar son monosacáridos de pentosa, hexosa, tetrosa, desoxihexosa, desoxipentosa o anhidroalditoles.
- 35 15. El método según la reivindicación 13, caracterizado por que los disacáridos a separar son disacáridos de tetrosa, pentosa o hexosa.
16. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 12, caracterizado por que los alcoholes de azúcar a separar son xilitol, eritritol o inositol.
17. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los demás carbohidratos a separar son polioles.
- 40 18. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 12, caracterizado por que los azúcares y alcoholes de azúcar se separan de la betaína.
19. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 13, caracterizado por que el azúcar separado es ramnosa.
20. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 13, caracterizado por que el azúcar separado es maltosa.
21. El método según la reivindicación 16, caracterizado por que el alcohol de azúcar separado es inositol.
- 45 22. El método según la reivindicación 17, caracterizado por que el poliol separado es glicerol.
23. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 14, caracterizado por que el azúcar separado es xilosa.

**Separación cromatográfica de escurrido de cristalización de xilosa
Una resina de intercambio catiónico débilmente ácida en forma H⁺/Mg²⁺**

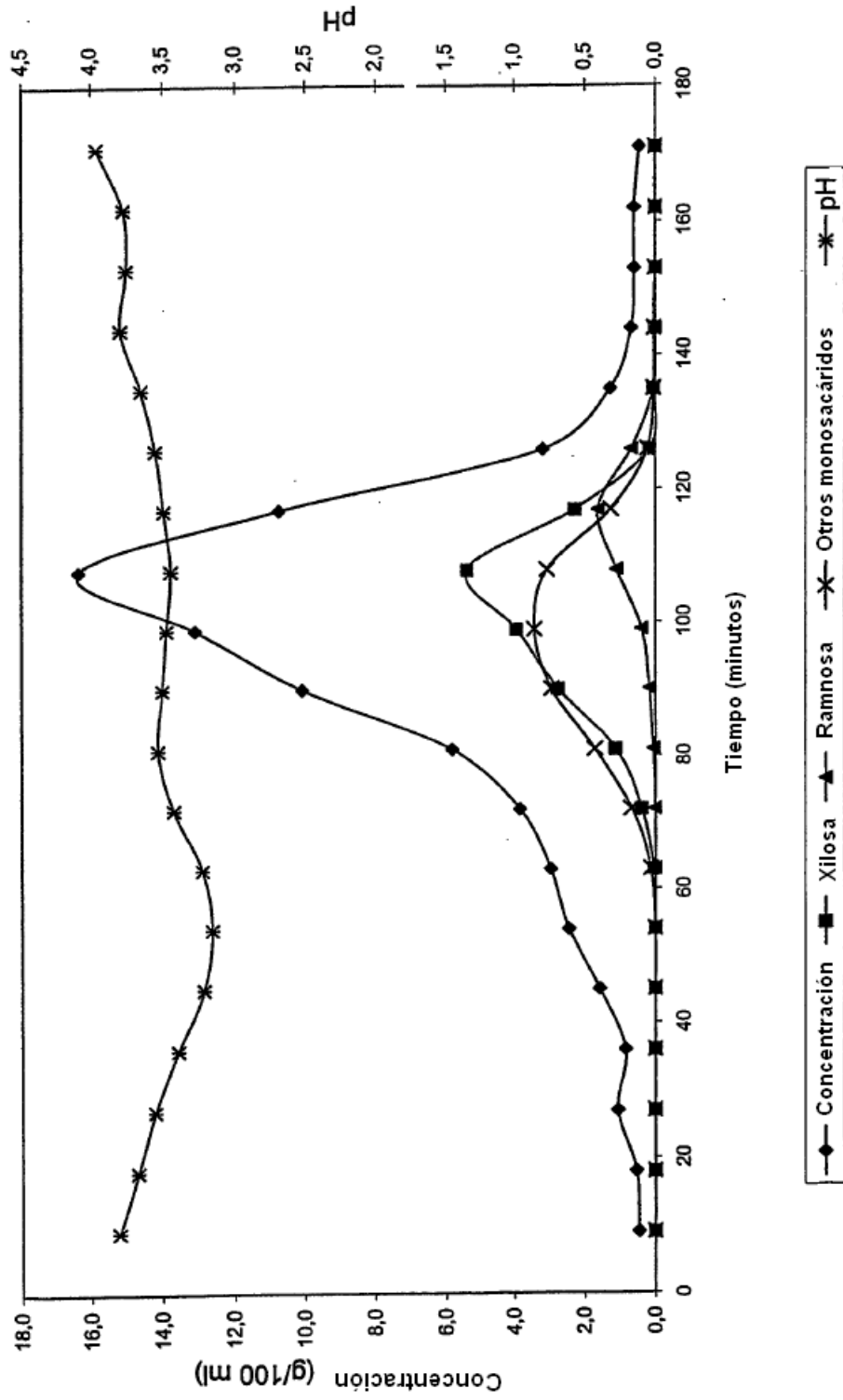


FIG. 1

Separación cromatográfica de escurrido de cristalización de xilosa
Una resina de intercambio catiónico fuerte ácida de forma Na+

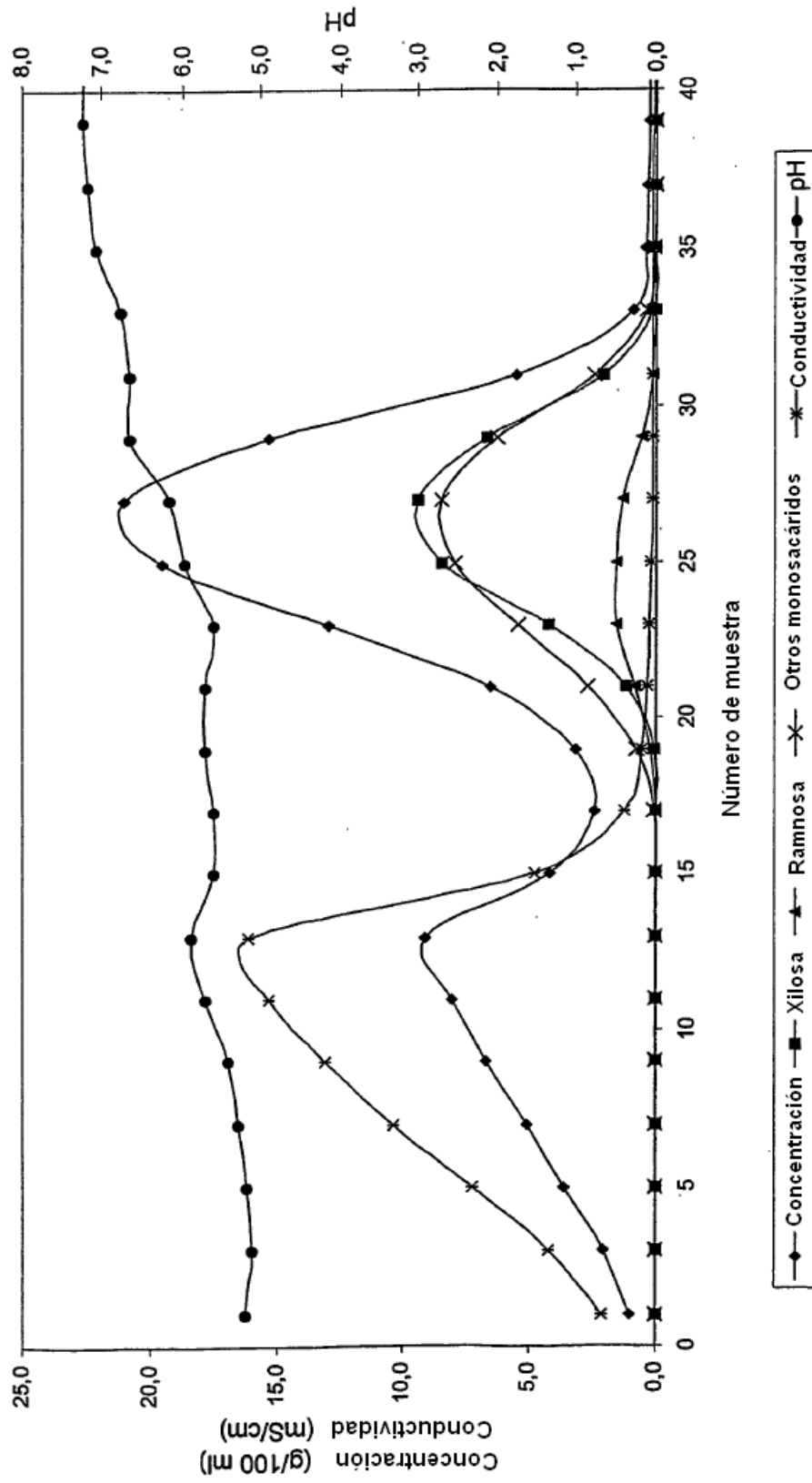


FIG. 2

Separación cromatográfica de fracción de xilosa que contiene ramnosa y arabinosa
Una resina de intercambio catiónico débilmente ácida de forma Na+

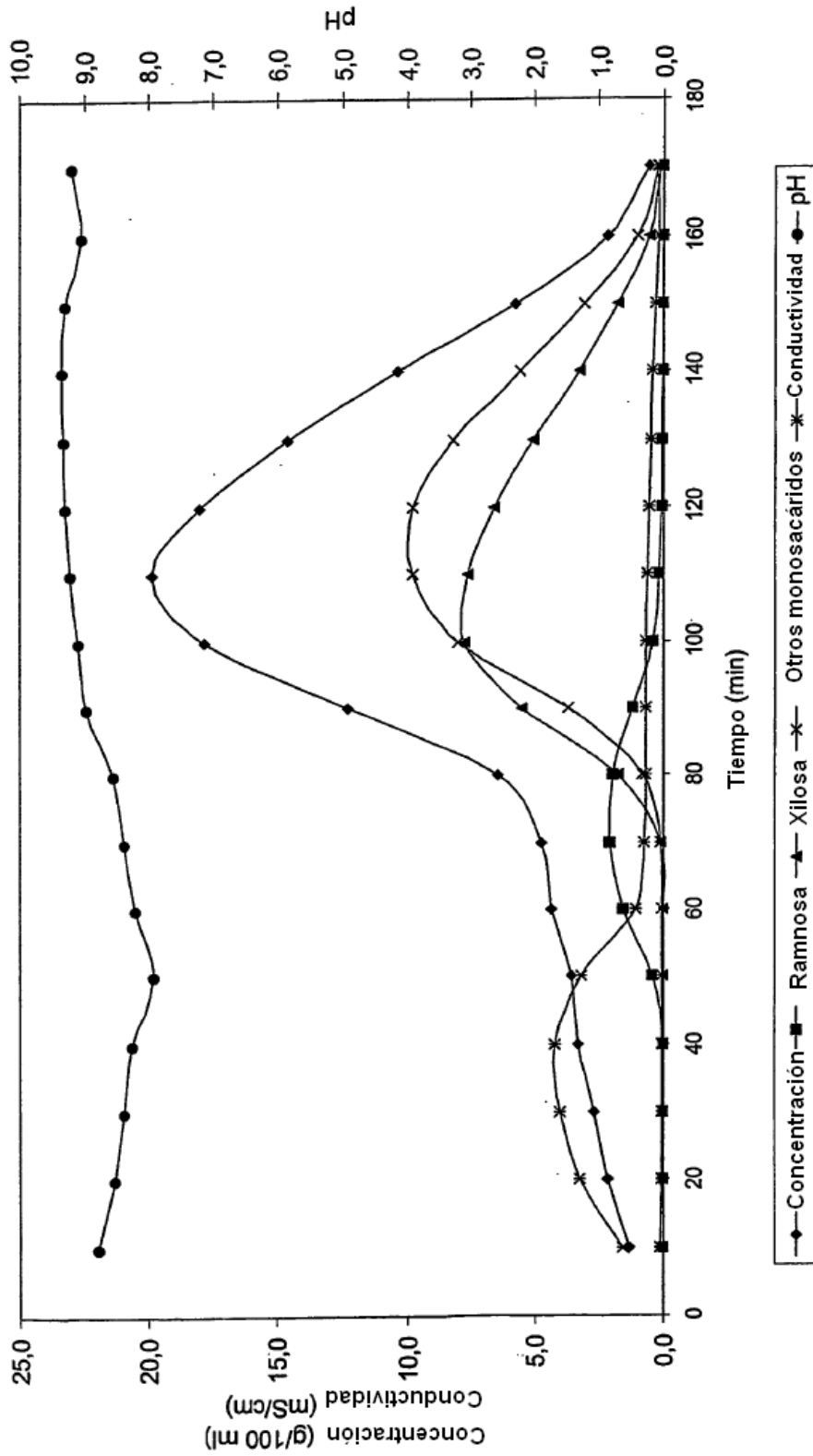


FIG. 3

**Separación cromatográfica de fracción rica en ramnosa
Una resina de intercambio catiónico débilmente ácida en forma Na⁺**

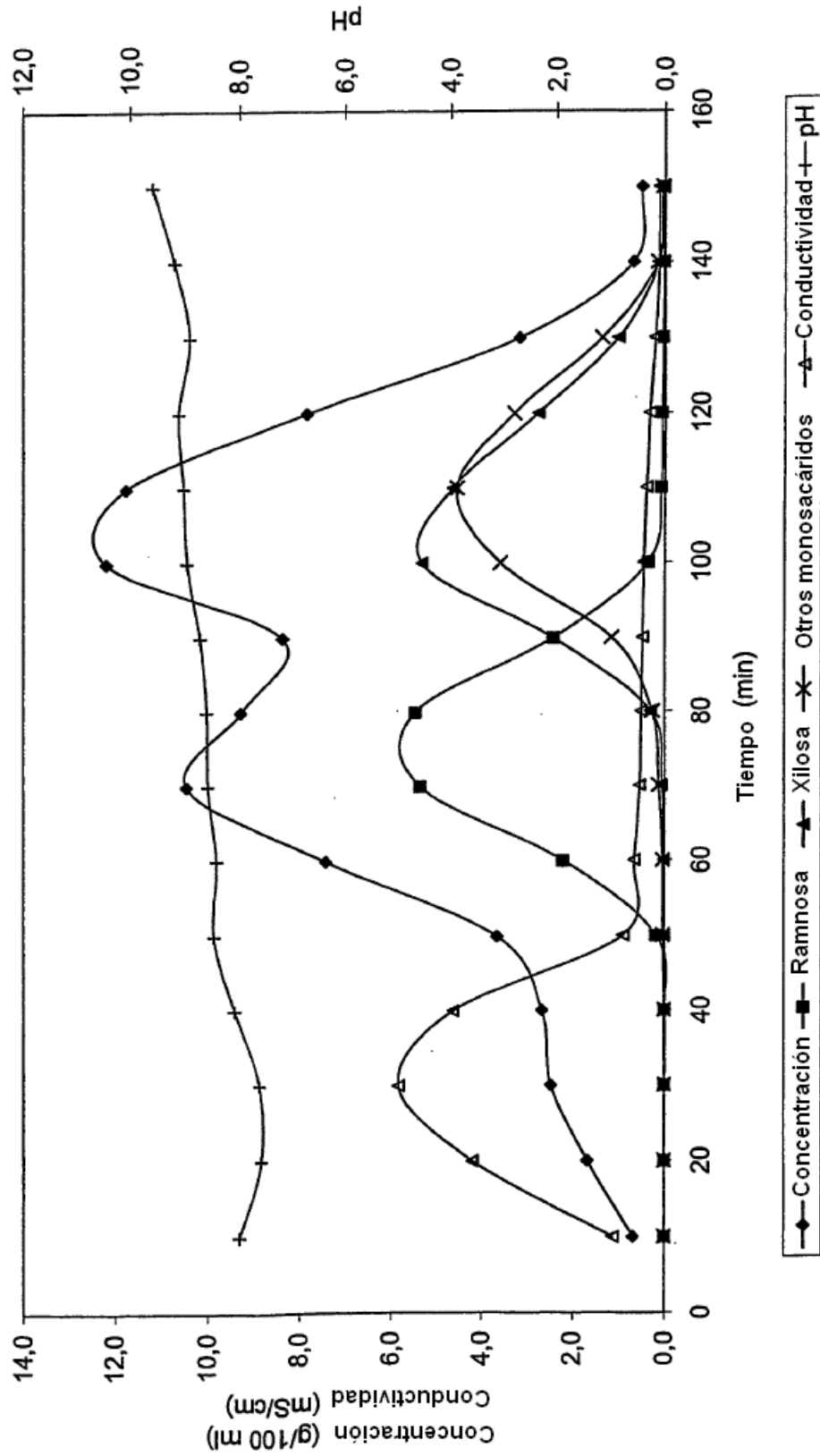


FIG. 4

**Separación cromatográfica con una resina de intercambio aniónico débilmente básica
Una resina de intercambio aniónico débilmente básica**

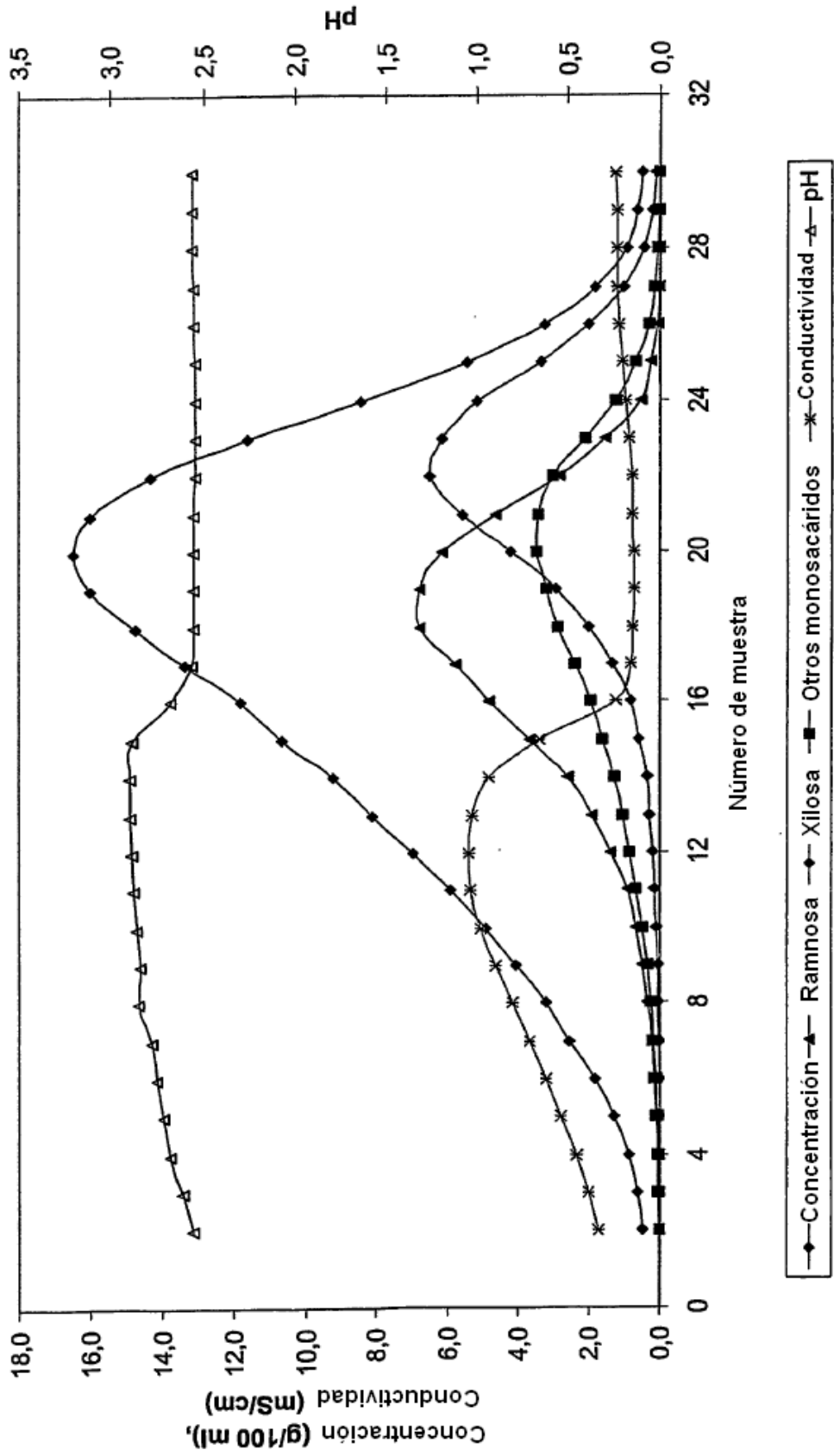


FIG. 5

**Separación cromatográfica de fracción rica en ramnosa
Una resina de intercambio catiónico fuerte ácida en forma Ca²⁺**

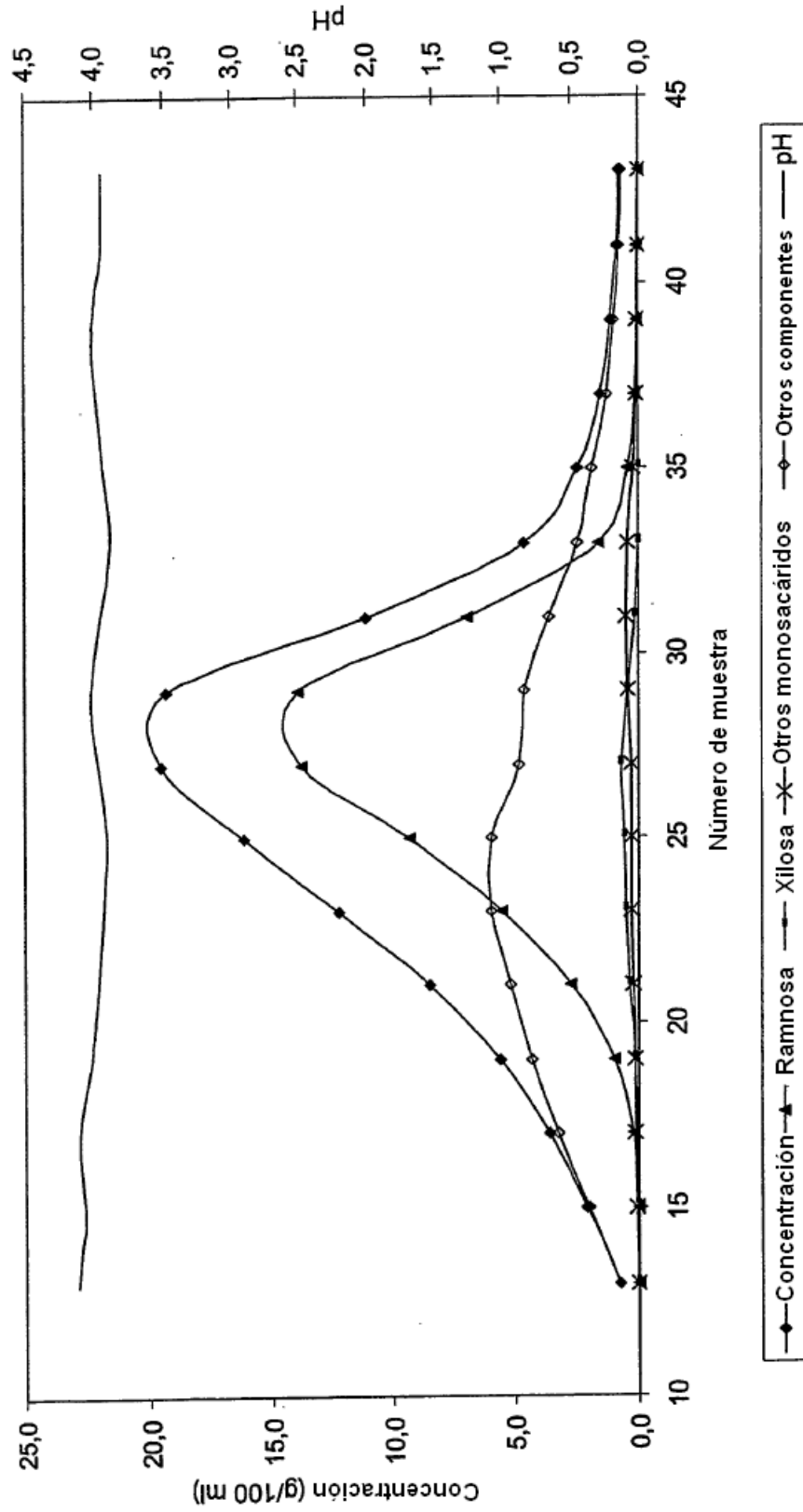


FIG. 6

Separación cromatográfica de vinasa
Una resina de intercambio aniónico débilmente básica

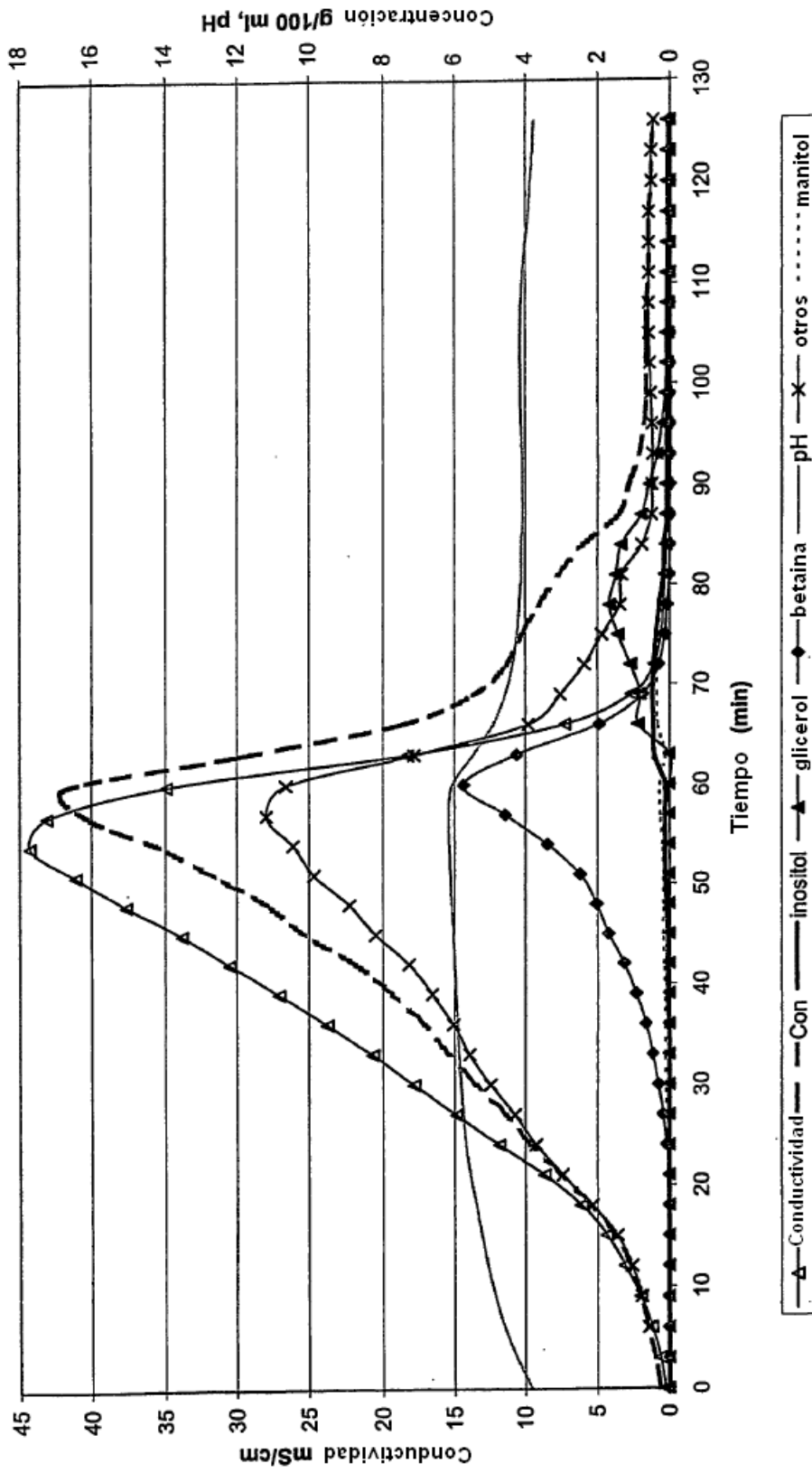


FIG. 7

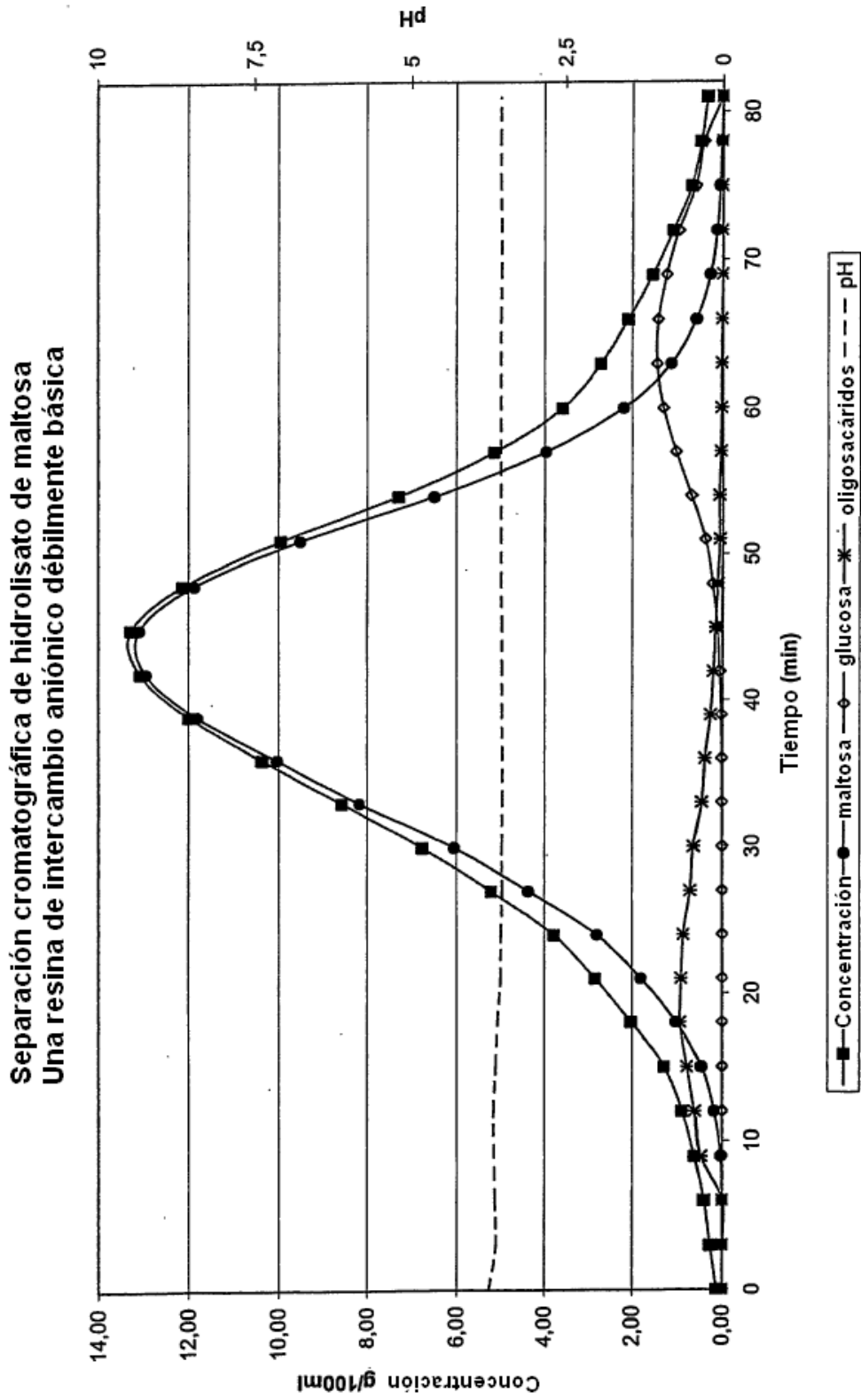


FIG. 8

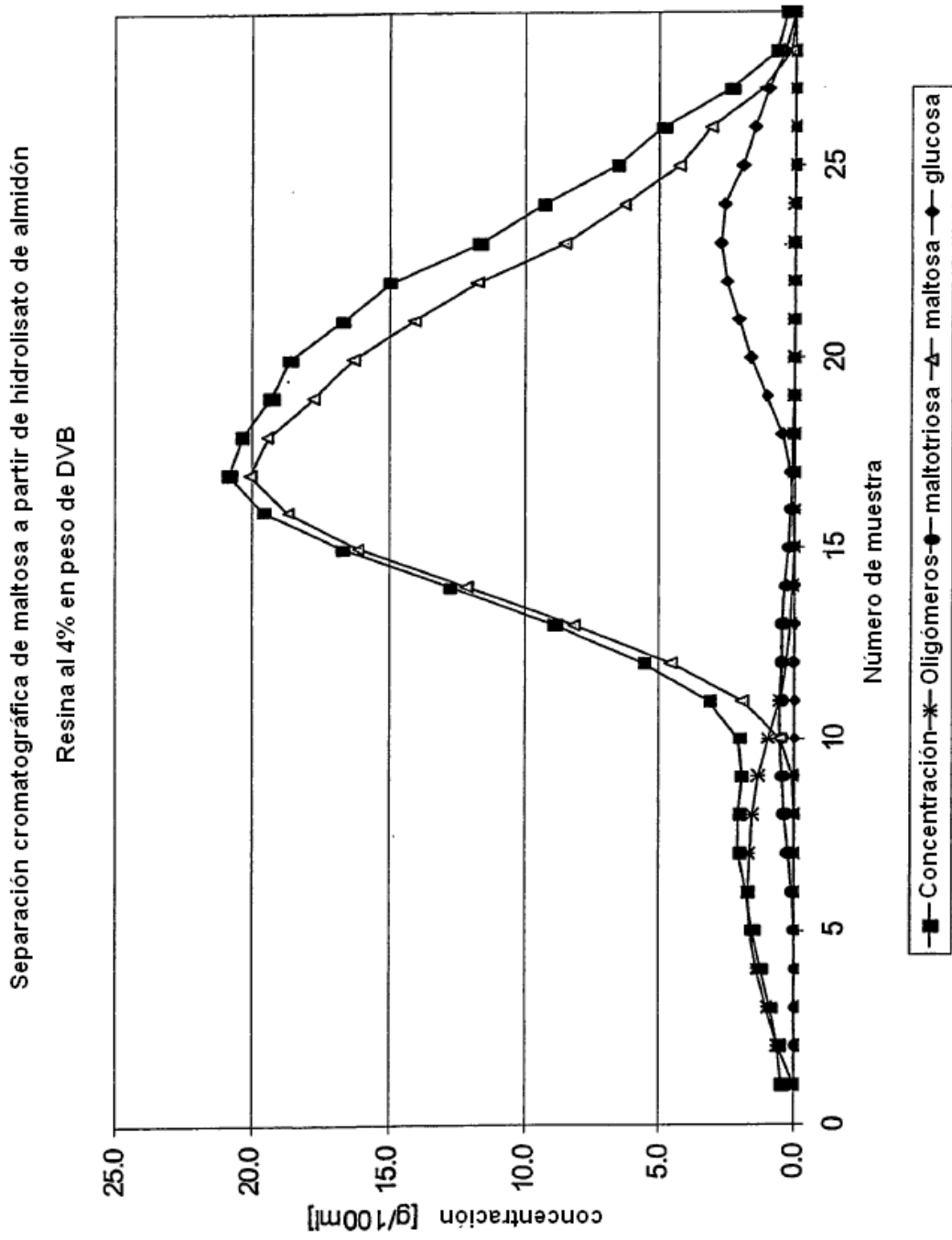


FIG. 9

**Separación cromatográfica de disolución que contiene betaina e inositol
Una resina de intercambio aniónico débilmente básica**

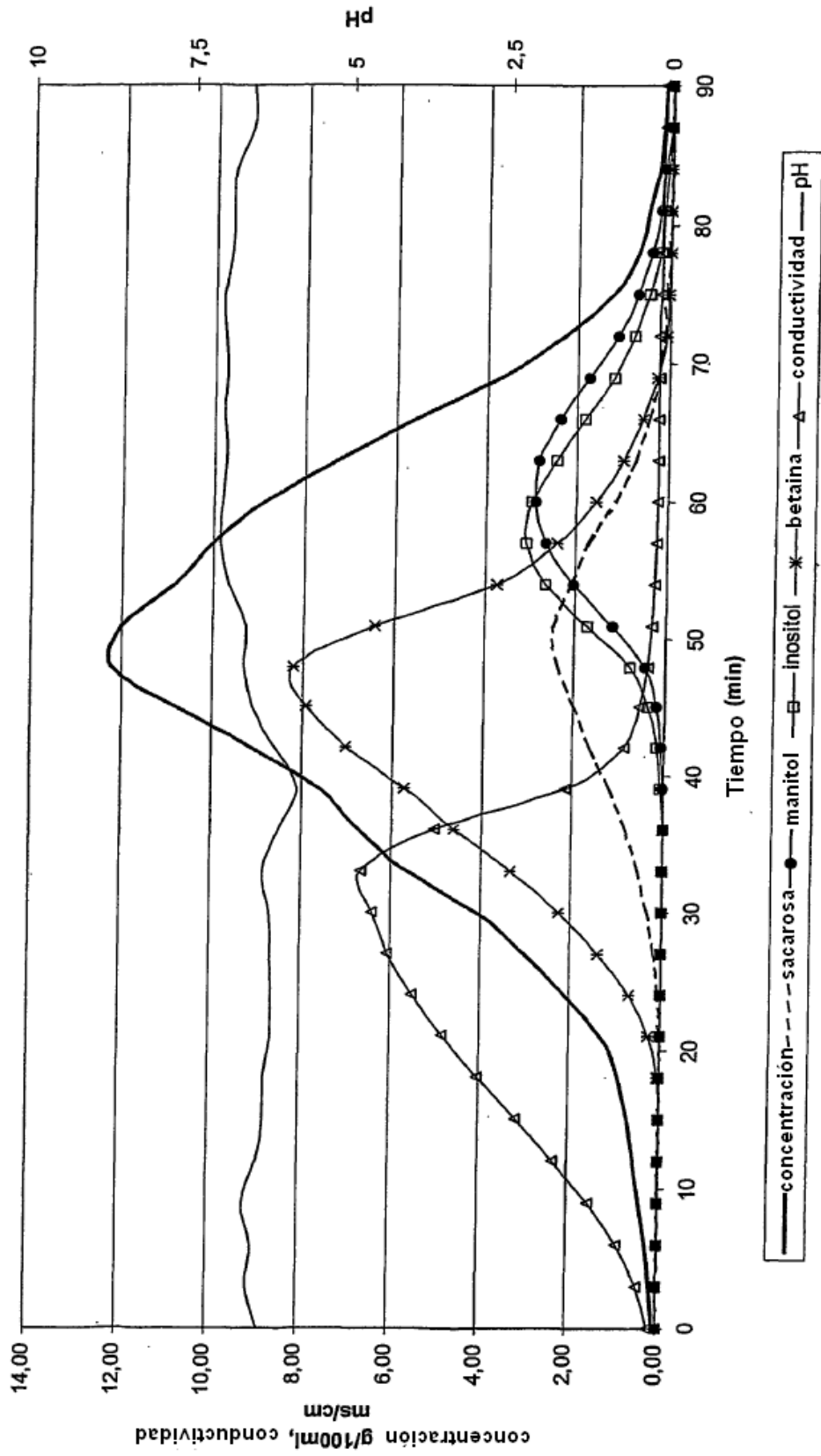


FIG. 10

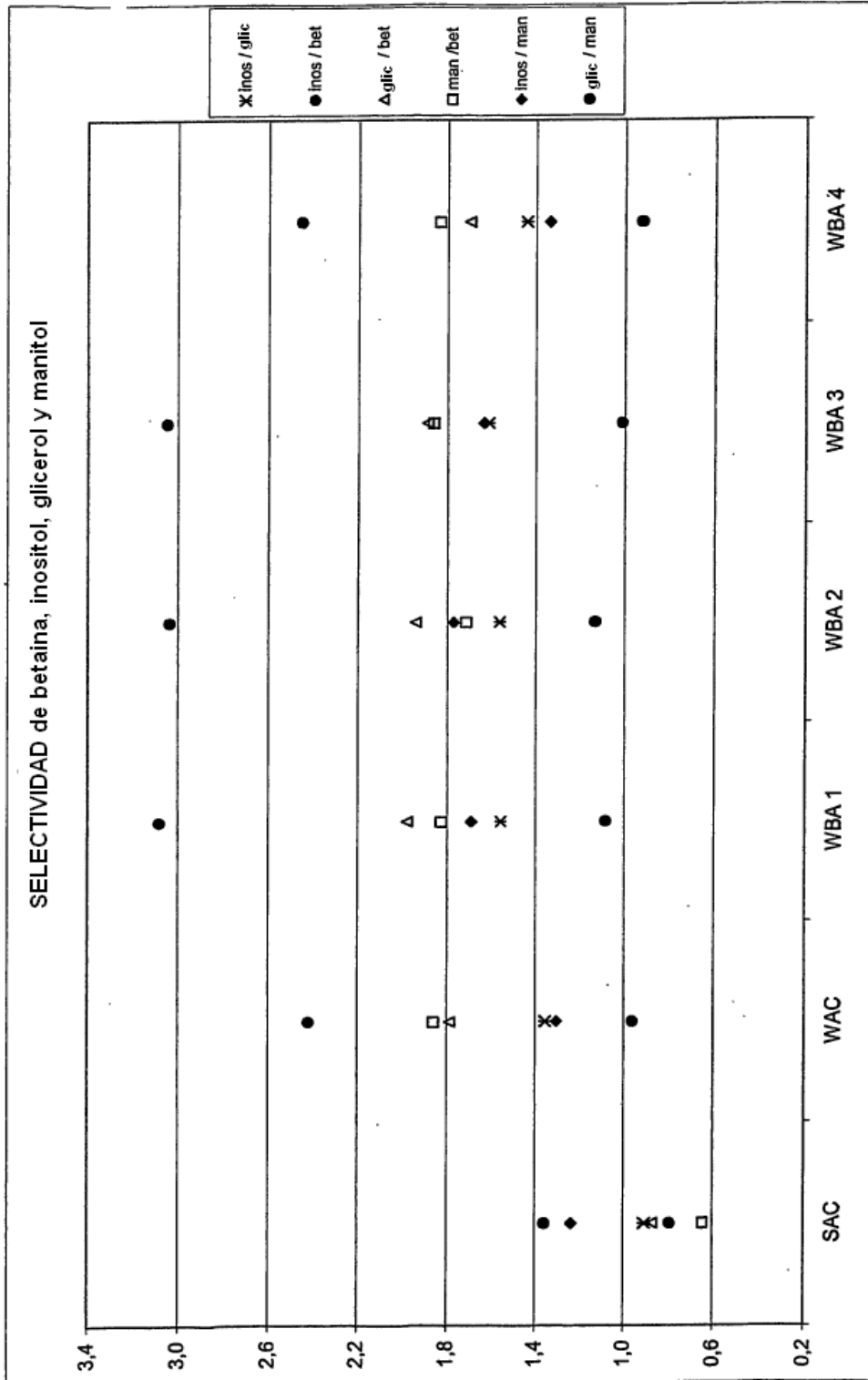


FIG. 11

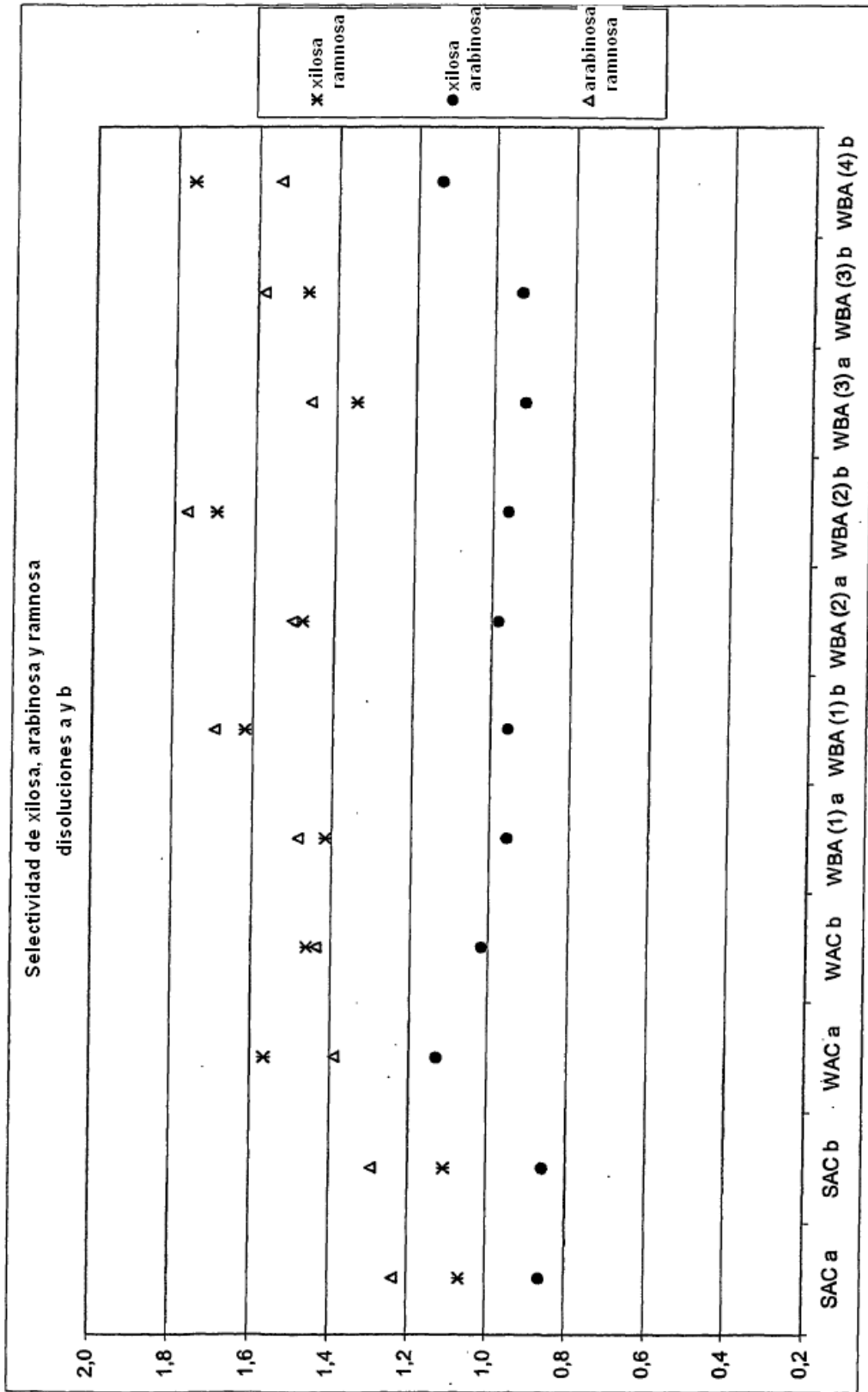


FIG. 12