

Simulated Moving Bed 크로마토그래피를 이용한 프럭토 올리고당의 정제

오난숙 · 이종호* · 구윤모†

인하대학교 생물공학과, *초정밀생물분리기술연구센터
402-701 인천시 남구 용현동 253
(2005년 9월 30일 접수, 2005년 11월 24일 채택)

Purification of Fructooligosaccharides Using Simulated Moving Bed Chromatography

Nan-Suk Oh, Chong-Ho Lee* and Yoon-Mo Koo†

Department of Biological Engineering, *ERC for Advanced Bioseparation Technology, Inha University,
253, Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-701, Korea
(Received 30 September 2005; accepted 24 November 2005)

요 약

SMB 크로마토그래피 기술을 포도당, 수크로즈, 프럭토 올리고당(케스토즈, 니스토즈)의 혼합물 중 프럭토 올리고당을 고순도로 얻기 위해 사용하였다. SMB 운전 조건은 일반적으로 실험 중 칼럼 내에서 발생하는 반응을 고려하지 않는 삼각형 이론(triangle theory)이나 정지파(standing wave) 디자인을 따른다. 그러나 칼럼 내에서 반응은 실험 결과에 크게 영향을 미칠 수 있다. 프럭토 올리고당은 운전 중 가수분해되어 포도당과 과당으로 분해된다. 반응을 바로잡기 위해 가수분해 후 정상상태에서 각 성분의 농도를 역 추정하였고 이를 모사에 적용하였다. 수크로즈를 제외한 포도당과 케스토즈, 니스토즈의 농도 곡선은 거의 일치했으나 수크로즈는 중간물질이며 가수분해 속도가 프럭토 올리고당에 비해 느리기 때문에 농축되어 모사 결과와 일치하지 않았다. 프럭토 올리고당은 산성이고 높은 온도 조건에서 더 쉽게 가수분해가 일어난다. 분리수지에 전 처리를 하여 pH를 조정해 더 낮은 온도에서 실험을 수행하면 가수분해 정도를 감소시킬 수 있다.

Abstract – The SMB chromatography is used to obtain high purification of fructooligosaccharides (FOS), the mixture of kestose and nystose. SMB operation condition is usually determined by triangle theory or standing wave design when reactions do not occur within columns during experiment. Some of the reactions in columns may considerably affect experimental results. FOS can be hydrolyzed and converted into glucose and fructose during operation. To include the effect of reaction, the concentrations of each component at steady state after hydrolysis were used in simulation. The obtained simulation values are well matched with experimental results except sucrose. For sucrose, the experimental results were different from expected one due to the existence of an intermediate component. FOS is easily hydrolyzed and converted into glucose and fructose in more acidic condition and at higher temperature. Hydrolysis reaction can be prevented by the pretreatment of separation resin with NaOH as well as operation under lower temperature.

Key words: Simulated Moving Bed, Fructooligosaccharides, Sucrose, Glucose, Hydrolysis

1. 서 론

올리고당은 구성분자 2~10개의 당류 혼합물로서, 일반적으로 저감미, 보습성이 있으며, 난충치성, 저칼로리, 정장작용 등과 같은 생리적 기능이 있다. 올리고당은 일본을 중심으로 1970년대부터 연구가 진행되었고, 1980년대에 프럭토 올리고당(fructooligosaccharides)의 상용화를 시작하였다. 프럭토 올리고당은 바나나, 양파, 아스파라거스, 우엉, 마늘, 벌꿀, 치커리 뿌리 등과 같은 야채나 버섯, 과일류 등 식품에 다량 함유하고 있는 천연물질이지만 그 양이 미미하다. 그러므로 대량생산을 위해 *Aureobasidium sp*[1, 2]나

Aspergillus niger[3]를 이용하여 수크로즈와 과당을 결합시키는 효소반응을 통해 상업적으로 생산되고 있다. 프럭토 올리고당이란 수크로즈의 $\beta(2\rightarrow1)$ 의 위치에 과당이 결합하여 있는 모든 물질의 총칭을 말하며 케스토즈(β -D-Fru((2 \rightarrow 1)₂- α -D-glucopyranoside, GF₂)), 니스토즈(β -D-Fru((2 \rightarrow 1)₃- α -D-glucopyranoside, GF₃)), 프럭토피란노실-니스토즈(β -D-Fru((2 \rightarrow 1)₃- α -D-glucopyranoside, GF₄))가 있으며 포도당에 결합하여 있는 과당의 수에 따라 GF_n으로 나타낸다[4]. Fig. 1에서 GF_n의 화학적 구조식을 나타내었다. 프럭토 올리고당은 최근 건강에 유익하고 칼로리가 적은 음식의 요구에 부응하는 식품 첨가제로써 각광 받고 있다. 프럭토 올리고당은 위에서 언급한 대로 수크로즈와 효소 반응을 통해 생성되므로 순수한 물질을 얻기 위해서는 정제과정을 반드시 거쳐야 한다. 그러므로 프럭토 올리고

† To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ymkoo@inha.ac.kr

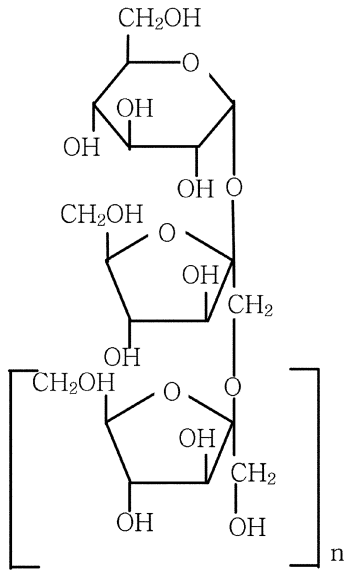


Fig. 1. Chemical structure of fructooligosaccharides.
n=1: 1-kestose, n=2: nystose, n=3: fructofuranosylnystose

당의 분리공정이 매우 중요하다. 일반적으로 분리 정제과정에서 쓰이는 방법은 크로마토그래피 기술로써 당 분리에 널리 사용되고 있는 Na^+ 나 Ca^{2+} 가 첨가된 강한 산성의 양이온 교환수지를 적용하고 있으며 이동상으로는 식품에 첨가하는 물질이므로 물을 사용하고 있다. 그러나 프럭토 올리고당은 낮은 pH와 높은 온도에서 빠르게 가수분해가 일어난다[5, 6]. 물은 상온에 오랫동안 보관할 경우 CO_2 와 반응하여 약산성이 되고 강산성의 수지를 사용하므로 분리 공정 중 칼럼내의 조건이 산성이 된다. 또한, 당 분리 공정은 높은 농도의 당이 적용되므로 점도 때문에 높은 온도에서 운전된다. 그러므로 올리고당이 쉽게 가수분해되는 조건에서 이루어진다. 이를 개선하기 위해 분리 수지의 전처리 공정을 거치거나 낮은 온도에서 공정이 이루어져야 프럭토 올리고당의 손실을 줄일 수 있다.

SMB 기술은 1960년 초기 UOP사에 의해 특허를 받았고[7, 8], 그 이후 응용범위는 p-xylene에서 제약 분야의 이성질체 분리[22]와 정밀화학산업[9, 10, 21] 아미노산과 단백질[11, 12], 단백질 염 투석[13, 23] 등 다양한 분야의 분리까지 확대되었다. SMB의 기본 원리는 칼럼 사이의 위치를 일정 시간 간격으로 움직이므로써 고정상과 이동상의 향류의 흐름을 모사하고 연속적인 분리를 가능하게 하는 것이다[14-16]. 흡착제와 친화력이 약해서 빨리 움직이는 물질은 액상의 흐름 방향으로 움직여서 extract로 모이고 흡착제와 친화력이 강해서 느리게 움직이는 물질은 고정상의 흐름 방향으로 움직여서 raffinate로 모인다. 칼럼은 연속적으로 연결되어 있으며 입구는 혼합물과 이동상, 출구는 extract, raffinate로 구성된다[17, 18]. SMB는 보통 4개의 구역으로 구성되며 입구와 출구의 위치에 따라 구분되고 각 구역은 중요한 역할을 한다[19]. 기본적인 4개의 구역으로 구성되어 있는 SMB 단면도는 Fig. 2에 나타내었다. SMB 기술은 연속적인 분리가 가능하며 회분식 분리공정에 비해 고 농도, 고 수율의 생산물을 얻을 수 있다. SMB 실험은 분리하고자 하는 각 물질의 흡착도, 확산 및 분산 등의 기본적인 인자를 구한 후 모사기로 실험을 미리 예상하고 최종적으로 SMB 실험을 수행한다. 그러나 모사기는 반응을 포함하고 있지 않기 때문에 실험 가동 중 반응이

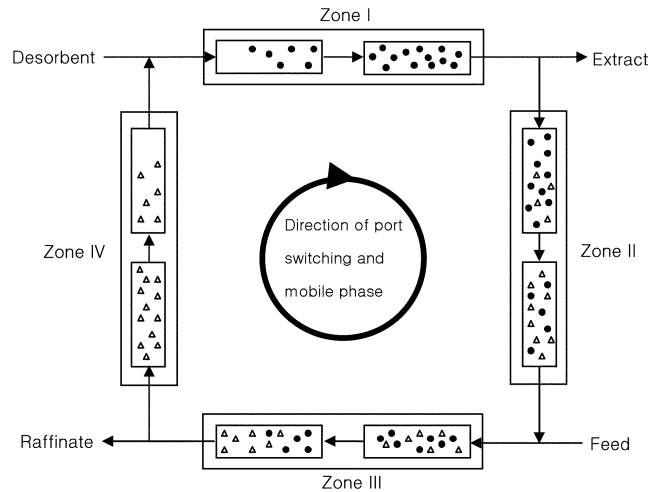


Fig. 2. Schematic explanation of simulated moving bed.

일어난다면 그 결과를 예상하기 어렵다.

본 실험에서는 SMB를 이용하여 연속적으로 프럭토 올리고당을 분리하고자 하였다. 이번 실험에서는 분리 공정이 가동되는 동안 위에서 언급한 대로 분리수지의 특성으로 인해 산성이며 고온의 조건이므로 프럭토 올리고당이 가수분해가 일어나 물질의 조성이 바뀌게 되고 실제 예상했던 실험 결과와 차이를 보였다. 이를 바로잡기 위해 SMB 실험 종료 후 extract와 raffinate에서 얻은 시료에서 가수분해 후 정상 상태에서 각 물질의 양을 역 추정하여 그 농도에서 모사하여 실험결과와 맞춰 보았다.

또한, SMB 실험 종료 후 가수분해 반응을 감소시키기 위해 분리수지를 전 처리하여 pH를 중성에 가깝게 조정하고 온도를 낮추었다. 이때 각 성분의 변화를 관찰하고 그 전과 비교 함으로써 반응이 감소하였음을 확인하였다.

2. 실험 방법 및 시약

올리고당은 시판되고 있는 식품 첨가제를 이용하였고 포도당, 수크로스, 케스토즈, 니스토즈를 포함하고 있으며 총 농도는 45 Brix이다. 올리고당의 전처리 과정으로써 음이온 교환수지와 양이온 교환수지를 통과시켜 착색물질과 미량의 불순물을 제거하였다. 이동상으로는 3차 증류수를 사용하였고 분리 수지는 Finex사에서 구입했으며 구조는 폴리스타이렌에 다이비닐벤젠이 가교 결합하였으며 황산이온(SO_3^-)을 포함하고 있는 강산 양이온 수지로써 Na^+ 가 첨가된 형태이다. SMB 실험은 구역마다 2개씩, 총 8개의 같은 칼럼 (21.5×2.5 cm)을 사용하였으며 Omni사에서 구입하였다. 이동상과 혼합물을 공급하기 위해 그리고 extract와 raffinate를 수집하기 위해 총 4개의 펌프가 사용되었으며 FPLC 펌프 2개(amersham phamacia biotech), HPLC 펌프 2개(young lin instrument)를 이용하여 유속을 조정하였다. 이동상은 식품으로 사용되기 위한 목적이므로 3차 증류수를 사용하였다.

분리 수지를 전 처리한 전후의 현상 비교를 위해 4%NaOH를 3.5 ml/min(2 bed/hour)의 속력으로 충분히 포화시킨 후 3차 증류수로 중성의 pH가 될 때까지 씻어 주었다. 또한, 65 °C와 50 °C를 비교하여 온도가 가수분해에 미치는 영향을 관찰하였다. 각 조

건에서 가수분해 정도를 비교하기 위해 12시간 동안 올리고당을 칼럼 내부에서 일정 유속으로 재순환시키면서 각 성분의 변화량을 측정하였다.

각 성분의 정량적인 분석은 Kromasil 100-10 NH₂의(250 × 4.6 mm) HPLC 칼럼을 이용하였으며 이동상은 acetonitrile/water/v/v/v/75/25 조성으로 acetonitrile은 HPLC용으로 J. T. Baker에서 구입하였다. 분석에 사용한 기기는 모두 Shimadzu사의 제품으로 LC-6AD 펌프, SIL-10AD VP 자동 주입기, RID-10A 굴절률 검출기로 구성된 HPLC 시스템이다.

3. 실험결과

3-1. 등은 흡착식의 결정

혼합물에 포함된 주요 물질은 포도당, 수크로즈, 케스토즈, 니스도트로써 각각 전체의 21%, 24%, 36%, 16%를 포함하고 있다. 이 네 물질의 흡착의 정도를 알아보기 위해 전단분석의 방법을 이용하였다. 혼합물에 포함된 각 양의 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 총 5단계로 실험하였으며 Fig. 3에 나타내었다. 실험을 통해 얻은 값을 (1)식을 적용하여 이동상에 있는 양과 고정상에 흡착된 양의 관계를 계산하였으며 이를 (2)식을 이용하여 흡착 상수를 구하였다[20]. 그 결과는 Table 1에 나타내었다.

$$Q_{i+1} = Q_i + \frac{(V_F - V_0)(C_{i+1} - C_i)}{V_a} \quad (1)$$

$$Q = aC \quad (2)$$

여기서 Q는 고정상의 부피당 흡착된 물질의 양, C는 이동상에 녹아 있는 물질의 농도, V_F는 체류 부피, V₀는 유체상의 부피, V_a는 고정상의 부피, V_c는 칼럼의 부피를 각각 의미한다.

3-2. 모사와 실험결과

실제 실험을 운전하기 전 미리 실험을 예상하는 모사 과정을 거친다. 운전의 최적조건을 구하기 위해 정지과 이론을 이용하였다. 정지과 이론은 SMB 공정 디자인을 위해 Ma and Wang[15]이 개발하였고 앞서 당 분리와 아미노산 분리에 실험에 적용된 바 있다. 이론의 기본 원리는 빨리 움직이는 물질의 흡착 곡선은 구역 IV에, 탈착 곡선은 구역 II에서 있고 또한 이와 비슷하게 느리게 움직이는

Table 1. Linear isotherm parameters of glucose, sucrose, kestose and nystose

	Glucose	Sucrose	Kestose	Nystose
a	0.4005	0.2372	0.1563	0.0848
R ²	0.9999	0.9979	0.9957	0.9881

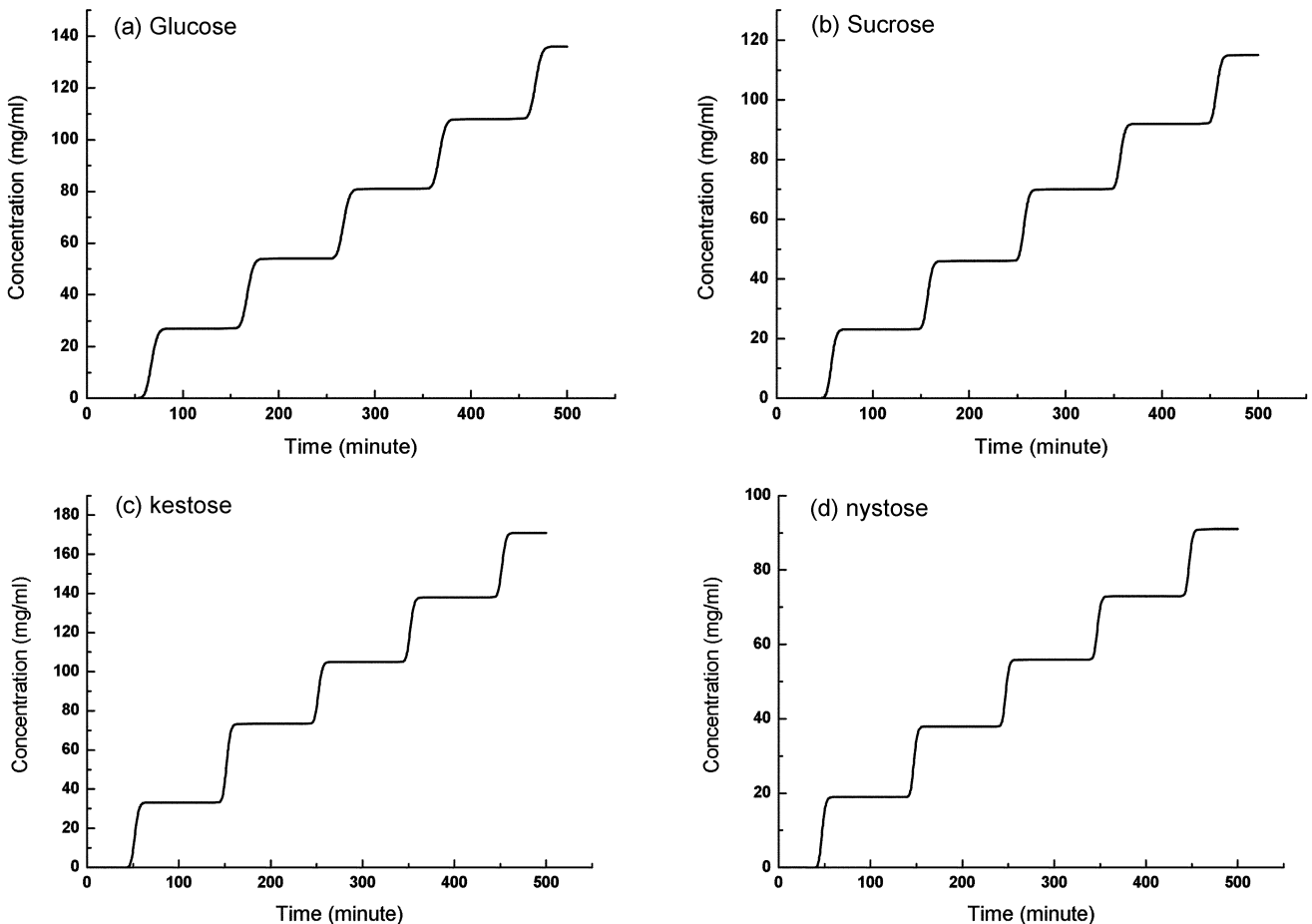


Fig. 3. Determination of isotherm by frontal test. (a) glucose, (b) sucrose, (c) kestose, (d) nystose.

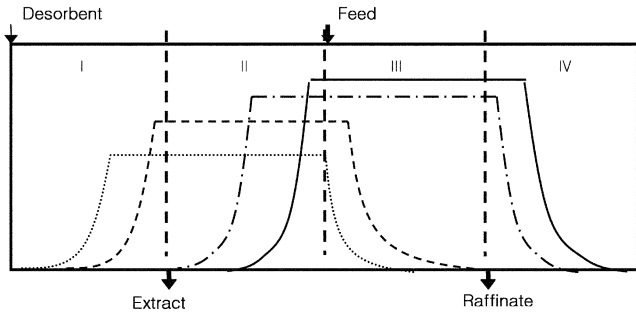


Fig. 4. Design for four zone SMB process : standing wave design.
 — : nystose, - - - : kestose, - · - · - : sucrose, ····· : glucose

Table 2. Operation condition of SMB

Feed	0.30 ml/min
Extract	1.68 ml/min
Raffinate	1.20 ml/min
Eluent	2.59 ml/min
Recycle	5.65 ml/min
Switching time	8.52 min

물질의 흡착 곡선은 구역, 탈착 곡선은 구역 III에 서있어야 함에 기초한다. 보통 구역 II와 III는 물질들의 부분적인 분리가 이루어지고 구역 I과 IV는 물질들의 오염을 방지하기 위해 깨끗한 이동상이 공급될 수 있도록 도와준다. 농도 곡선이 유지되기 위해서 각 구역의 유량과 포트가 움직이는 속도가 중요하며 이는 물질 전달의 영향을 받지 않는 평형 디자인과 물질전달의 영향에 의존하는 비 평형 디자인에서 구할 수 있다. 이 실험에서는 물질전달의 영향을 고려한 비 평형 디자인을 적용하였다. 실험에 사용된 혼합물은 포도당, 수크로즈, 케스토즈, 니스토즈의 순서로 흡착 친화도를 가진다. 프럭토 올리고당은 raffinate 위치에서, 포도당, 수크로즈는 extract 위치에서 얻기 위해 구역1은 포도당의 탈착곡선, 구역2는 케스토즈의 탈착곡선, 구역3은 수크로즈의 흡착곡선, 구역4는 니스토즈의 흡착곡선이 각각 서있도록 디자인하였다. 각 성분의 흡탈착 곡선은 Fig. 4에 나타내었다. 또한, 이 이론으로부터 구해 얻어진 운전조건은 Table 2에 표시 했으며 구한 조건으로부터 실험을 수행하였다.

위에서 언급한 대로 산성과 고온의 조건이므로 가수분해가 일어났다. 그러나 모사기는 반응을 반영하지 않으므로 이를 바로잡기 위해 실험 종료 후 각 성분의 농도를 역 추정하여 그 농도로 모사하였다. 역 추정한 식은 (3)식, 구한 농도는 Table 3 그리고 모사와 실험을 맞춘 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 과당은 생성된 물질로 실험 전에 미리 예상할 수 없었기 때문에 제외하여 나타내었다.

Table 3. Concentration of component in feed before and after Hydrolysis

	Before(mg/ml)	After(mg/ml)
Glucose & fructose	128.97	345.57
Sucrose	120.39	78.15
FOS	300.6	126.22

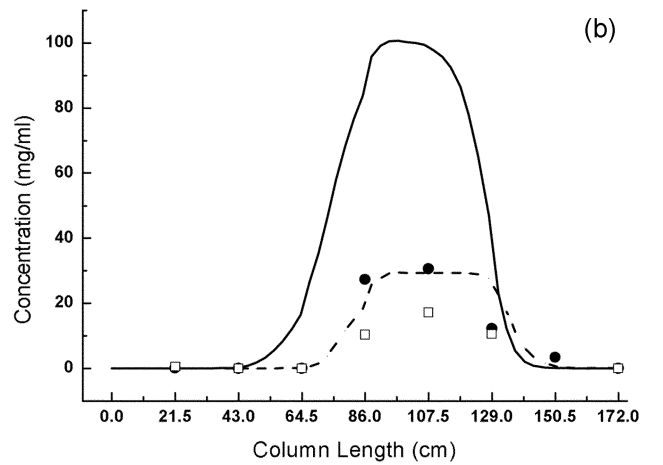
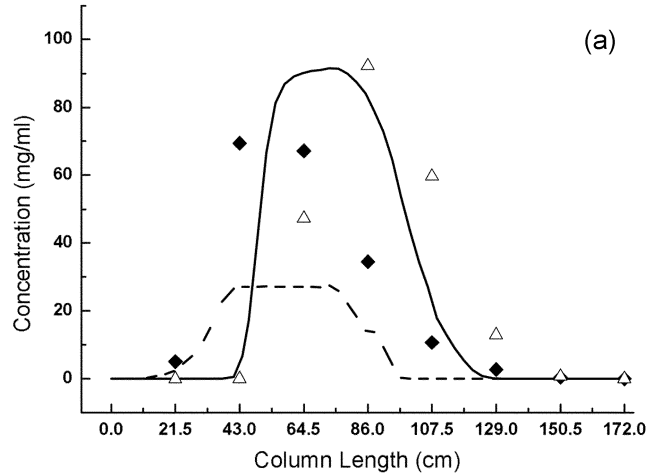


Fig. 5. Comparison of experimental and theoretical concentration profiles: without reaction at the end of a switch time.

- (a) —: simulation of sucrose, - - -: simulation of glucose
 △: experiment of sucrose, ◆: experiment of glucose
- (b) —: simulation of kestose, - - -: simulation of nystose
 ●: experiment of kestose, □: experiment of nystose

$$C_{Feed} * v_{Feed} = C_{Extract} * v_{Extract} + C_{Raffinate} * v_{Raffinate} \quad (3)$$

위 식에서는 C는 농도를, v는 유량을 나타낸다.

Fig. 5에서 볼 수 있듯이, 가수분해를 고려하지 않은 농도 곡선은 포도당은 예상보다 높은 농도의 실험값을, 수크로즈와 프럭토 올리고당은 가수분해 되어 예상보다 낮은 농도 실험값을 얻었다. 반응을 고려하지 않을 경우 농도에서 매우 큰 차이를 보인 반면 Fig. 6과같이 가수분해를 고려한 농도를 적용한 모사에서는 포도당과 케스토즈, 니스토즈의 농도 곡선은 예상한 것과 거의 일치하였으며 수크로즈의 농도곡선은 차이를 보였다. 그 이유는 수크로즈가 프럭토 올리고당보다 가수분해되는 속도가 느리기 때문에 수크로즈의 농도가 농축되고 최종 물질인 포도당과 과당으로 분해되기 전의 중간물질이기 때문에 실험결과와 일치하지 않았다.

3-3. 프럭토 올리고당의 가수분해

3-3-1. pH의 영향

프럭토 올리고당 가수분해에 크게 영향을 인자 중 하나는 pH이

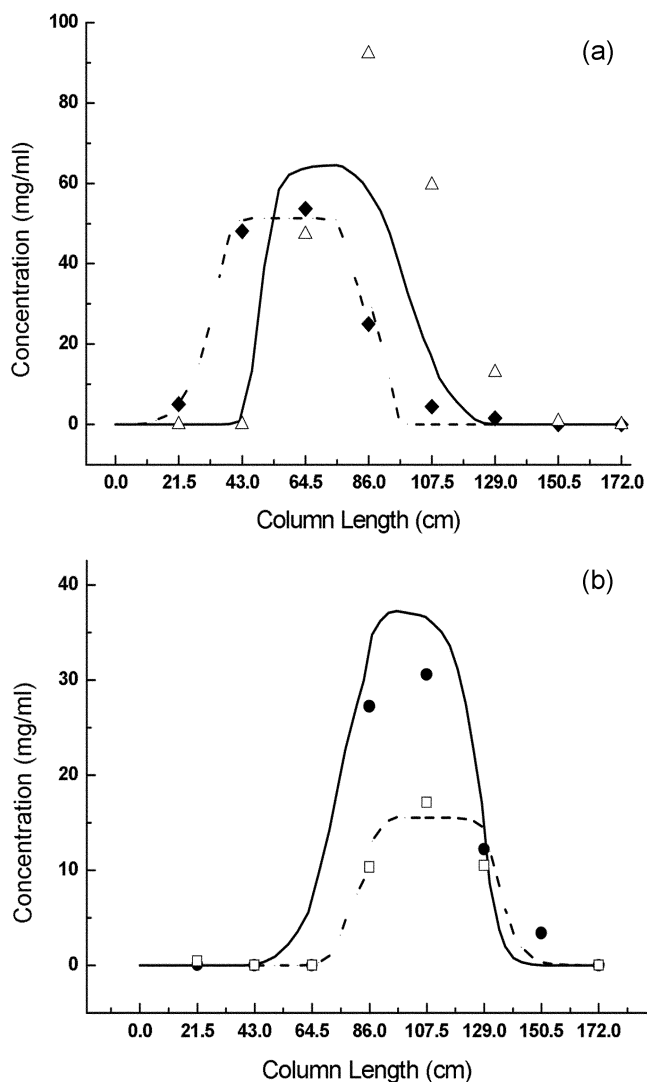


Fig. 6. Comparison of experimental and theoretical concentration profiles: with reaction at the end of a switch time.
 (a) —: simulation of sucrose, ----: simulation of glucose
 △: experiment of sucrose, ◆: experiment of glucose
 (b) —: simulation of kestose, ----: simulation of nystose
 ●: experiment of kestose, □: experiment of nystose

다[5, 6]. 분리 수지 전 처리 후 칼럼 내에서의 pH의 변화와 pH의 변화에 따른 가수분해 정도를 비교하기 위한 실험을 수행하였다. 실험은 65 °C로 온도를 고정하고 분리 수지를 40% NaOH를 처리한 전후의 조건에서 올리고당 혼합물을 12시간 동안 재순환 시키면서 2시간 간격으로 시료를 수집하였다. 이때 각 시료의 pH를 측정하고 HPLC 분석하여 성분의 변화율을 측정하였다. pH의 변화량과 전 처리 전후 각 성분의 변환율은 Fig. 8(a), (b)에 나타내었다. pH는 전 처리 전이 후보다 더 산성을 띠었고 프럭토 올리고당의 가수분해 속도가 빨랐다. 반응 12시간 후 전 처리 전후 각각 니스토즈는 초기의 5.3%, 33%, 케스토즈는 2.2%, 12.4%, 수크로즈는 42.1%, 67.6%로 감소하였으며 포도당과 과당은 347%, 245% 증가하였다. 전 처리를 함으로써 칼럼내의 pH를 중성에 가깝게 유지할 수 있었고 그 결과 가수분해반응 정도를 감소시킬 수 있었다.

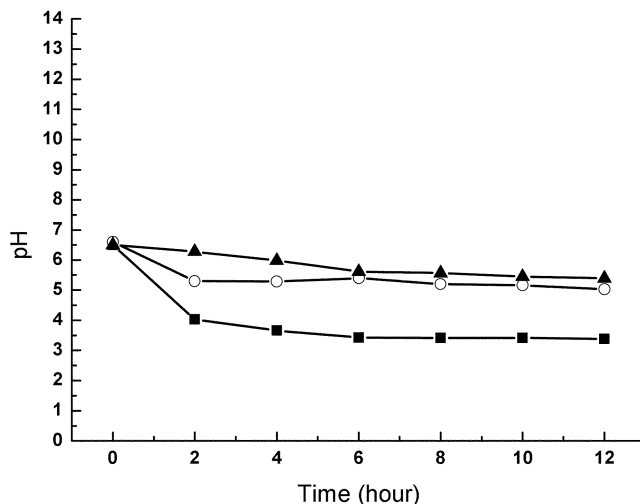


Fig. 7. The pH change in column.
 ■: without NaOH 65 °C, ○: with NaOH, 65 °C, ▲: with NaOH, 50 °C.

3-3-2. 온도의 영향

프럭토 올리고당의 가수분해에 영향을 미치는 다른 요인의 하나는 온도이다[5, 6].

위에서 언급했듯이 당 분리 공정은 약 50 Brix의 고농도에서 이루어지기 때문에 높은 점도를 지닌다. 그러므로 되도록 점도를 낮추기 위해 보통 50 °C~65 °C의 높은 온도에서 분리가 수행된다. 온도의 효과를 알아보기 위해 모두 전 처리한 수지를 이용하여 50 °C와 65 °C에서 각각 올리고당 혼합물을 12시간 동안 재순환 시키면서 2시간 간격으로 시료를 수집하여 분석하였다. 12시간 후 65 °C와 50 °C의 니스토즈는 초기의 33%, 88%, 케스토즈는 12%, 78%로 감소하였다. 그러나 수크로즈는 65 °C에서는 초기의 67%로 감소하였지만 50 °C에서 반대로 초기량의 114%로 증가하였다. 수크로즈가 증가한 이유는 프럭토 올리고당의 가수분해 반응속도가 수크로즈보다 훨씬 빠르고 수크로즈의 반응속도가 많이 감소하였기 때문에 역으로 양이 약간 증가한 것이다. 또한, 포도당과 과당은 65 °C, 50 °C에서 각각 초기량의 245%, 133%로 증가하였다. 온도에 따른 성분의 변화량은 Fig. 8의 (b), (c)를 통해 비교할 수 있다.

3-4. 정 반응과 역 반응에 대한 실험

프럭토 올리고당과 수크로즈의 양이 감소하였고 포도당과 과당의 양이 증가하였으므로 가수분해가 일어나는 것은 명확한 사실이다. 그러나 수크로즈와 과당이 반응하여 프럭토 올리고당이 생성되거나 포도당과 과당이 반응하여 수크로즈가 형성될 수 있을 가능성을 확인하고 비 가역반응을 정확히 알아보기 위해 실험을 수행하였다. 실험결과, Fig. 9와 10에서 볼 수 있듯이 수크로즈가 생성되거나 프럭토 올리고당이 생성되지 않았다. 그러므로 가수분해 반응은 역 반응이 일어나지 않는 연속적인 비 가역 반응으로 (4-6)식으로 나타낼 수 있다.



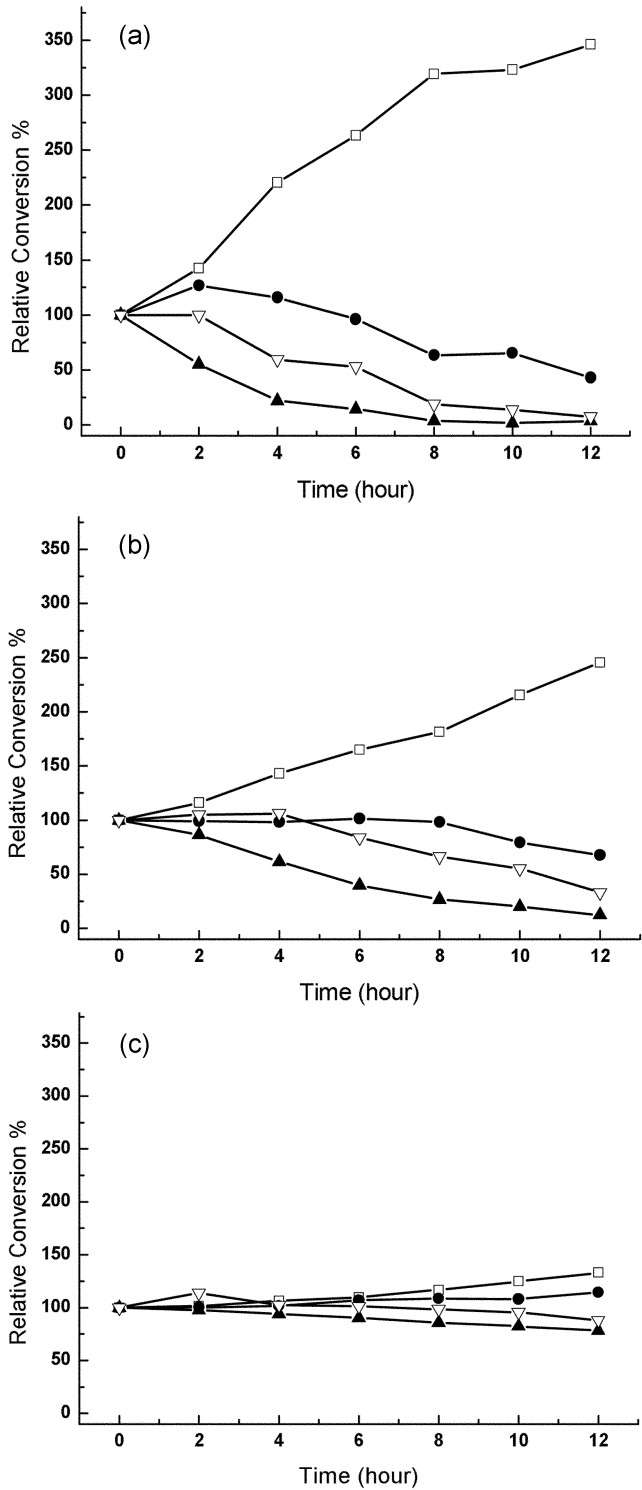


Fig. 8. Hydrolysis of fructooligosaccharides in columns as a function time.
 □: glucose and fructose, ●: sucrose, ▽: kestose, ▲: nystose
 (a): with NaOH, 65 °C
 (b): without NaOH, 65 °C
 (c): with NaOH, 50 °C



G: 포도당, F: 과당, GF: 수크로즈, GF₂: 케스토즈, GF₃: 니스토즈

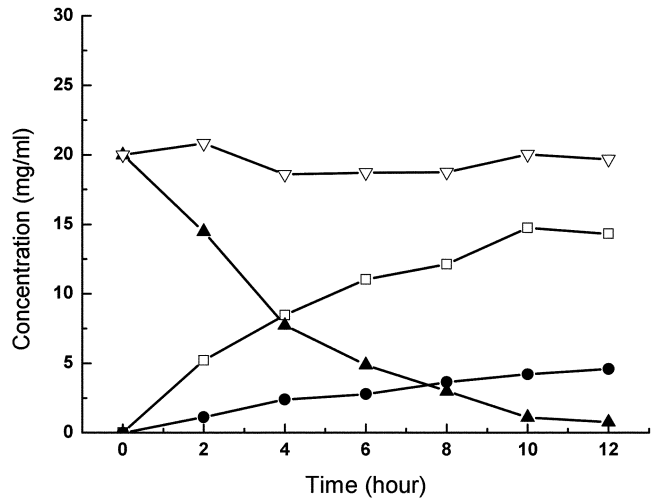


Fig. 9. Hydrolysis of sucrose in columns as a function time.
 □: glucose, ●: fructose, ▽: sucrose, ▲: total concentration

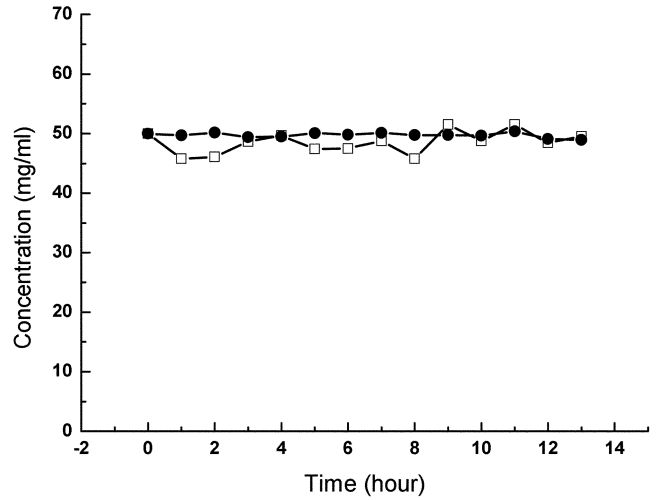


Fig. 10. Changes of concentrations in columns as a function time.
 □: glucose, ●: fructose

4. 결 론

프럭토 올리고당과 같이 유용한 물질이 혼합물에 섞여 있다면 이를 정제하는 분리공정이 매우 중요하다. 현재 프럭토 올리고당의 분리 정제는 크로마토그래피 기술을 널리 이용하고 있으며 이번 실험에서는 연속적인 분리공정인 SMB를 적용하였다.

분리수지로서 당당 분리 공정에도 널리 사용되고 있는 염이 첨가된 강산의 양이온 교환수지와 이동상으로 물을 사용하므로 산성의 상태에서 그리고 점도의 문제 때문에 고온에서 운전된다. 이 조건에서는 가수분해가 일어나 물질 조성의 변화를 가져온다. 그러나 SMB의 최적 운전조건을 결정하기 위한 디자인이나 모사기는 반응을 포함하고 있지 않아 반응이 일어나면 그 결과를 예측하기 어렵다.

SMB는 새로운 물질이 연속적으로 혼합물 위치로 도입되므로 반응의 초기나 말기 상태가 아닌 반응의 중간 상태에서 분리가 이루어지며 프럭토 올리고당과 같은 물질은 연속적인 반응이므로 매우

복잡하다. SMB를 통하여 반응하는 물질을 분리하기 위해서는 반응을 포함한 모사기의 개발이 요구된다.

기수분해는 낮은 pH와 높은 온도에서 더 쉽게 일어나므로 반응을 감소시키기 위해 분리 수지에 전 처리를 통해 pH를 중성에 가깝게 유지하고 점도의 영향을 받지 않은 최소한의 온도로 낮추어 조건을 잡는다면 반응을 최소화할 수 있다. 또한, 칼럼에 머무르는 체류시간을 최소한 짧게 디자인하면 이와 같은 문제를 해결하는데 도움이 될 것이다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터(ERC)의 지원과 CJ(주)의 협조를 받아 수행하였습니다.

참고문헌

1. Yun, J. W. and Song, S. K., "The Production of High-Content Fructooligo Saccharides from Sucrose by the Mixed-Enzyme System of Fructosyltransferase and Glucose Oxidase," *Biotechnol. Lett.*, **15**(7), 573-576(1993).
2. Yun, J. W., "Fructooligosaccharides-Occurrence, Preparation, and Application," *Enzyme Microb. Technol.*, **19**(2), 107-117(1996).
3. Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N. A., "Fructooligosaccharide Producing Enzyme from *Aspergillus Niger* ATCC 20611," *Agric. Biol. Chem.*, **52**(7), 1181-1187(1988).
4. Lewis, D., "Nomenclature and Diagrammatic Representation of Oligomeric Fructans a Paper for Discussion," *New Phytol.*, **124**(5), 583-594(1993).
5. Hogarth, A. J., Hunter, D. E., Jacobs, W. A., Garleb, K. A. and Wolf, B. W., "Ion Chromatographic Determination of Three Fructooligosaccharide Oligomers in Prepared and Preserved Foods," *J. Agric. Food Chem.*, **48**(11), 5326-5330(2000).
6. L'homme, C., Arbelot, M., Puigserver, A. and Biagini, A., "Kinetics of Hydrolysis of Fructooligosaccharides in Mineral-Buffered Aqueous Solutions: Influence of pH and Temperature," *J. Agric. Food Chem.*, **51**(1), 224-228(2003).
7. Broughton, D. B., "Molex Case History of a Process," *Chem. Eng. Prog.*, **64**(1), 60-72(1968).
8. Broughton, D. B., Neuzil, R. W., Pharis, J. M. and Brearley, C. S., "The Parex Process for Recovering Paraxylene," *Chem. Eng. Prog.*, **66**(1), 70-82(1970).
9. Ching, C. B., Chu, K. H., Hidajat, K. and Ruthven, D. M., "Experimental Study of a Simulated Counter-Current Adsorption System-VII: Effects of Non-Linear and Interacting Isotherms," *Chem. Eng. Sci.*, **48**(7), 1343-1351(1993).
10. Pais, L. S., Loureiro, J. M. and Rodrigues, A. E., "Separation of 1,1'-bi-2-Naphthol Enantiomers by Continuous Chromatography in Simulated Moving Bed," *Chem. Eng. Sci.*, **52**(2), 245-257(1997).
11. Zoltán, M., Melinda, N., Antal, A., László, H., János, A., István, P. and Tibor, S., "Separation of Amino Acids with Simulated Moving Bed Chromatography," *Journal of Chromatography A*, **1075**(1-2), 77-86(2005).
12. Xie, Y., Wu, D., Ma, Z. and Wang, N.-H. L., "Extended Standing Wave Design Method for Simulated Moving Bed Chromatography: Linear Systems," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **39**(6), 1993-2005(2000).
13. Hashimoto, K., Adachi, S. and Shirai, Y., "Continuous Desalting of Proteins with a Simulated Moving-bed Adsorber," *Agric. Biol. Chem.*, **52**(11), 2161-2171(1998).
14. Storti, G., Mazzotti, M., Morbidelli, M. and Carra, S., "Robust Design of Binary Counter Current Adsorption Separation Processes," *AIChE J.*, **39**(3), 471-485(1993).
15. Ma, Z. and Wang, N.-H. L., "Standing Wave Analysis of SMB Chromatography: Linear Systems," *AIChE J.*, **43**(10), 2488-2509(1997).
16. Gentilini, A., Migliorini, C., Mazzotti, M. and Morbidelli, M., "Optimal Operation of Simulated Moving Bed Units for Non Linear Chromatographic Separations II. Bi-Langmuir Isotherm," *J. Chromatogr. A.*, **805**(1-2), 37-44(1998).
17. Mazzotti, M., Storti, G. and Morbidelli, M., "Operation of Simulated Moving Bed Units for Nonlinear Chromatographic Separations," *J. Chromatogr. A.*, **769**(1), 3-24(1997).
18. Minceva, M., Pais, L. S. and Rodrigues, A. E., "Cyclic Steady State of Simulated Moving Bed Processes for Enantiomers Separation," *Chem. Eng. Proc.*, **42**(2), 93-104(2003).
19. Hashimoto, K., Adachi, S., Noujima, H. and Maruyama, A., "Models for Separation of Glucose-Fructose Mixture Using a Simulated Moving Bed Adsorber," *J. Chem. Engng. Japan.*, **16**(5), 400-423(1983).
20. Wankat, P. C. (Ed), *Rate-Controlled Separations*, Glasgow, Elsevier Applied Science, London and New York(1994).
21. Kim, Y. D., Lee, J. K. and Cho, Y. S., "Application of Simulated Moving Bed Chromatography for the Separation Between 2,6- and 2,7-Dimethylnaphthalene," *Korean J. Chem. Eng.*, **18**(6), 971-976(2001).
22. Han, S. K., Yeo, M. S., Park, T. J., Koo, Y. M. and Row, K. H., "Chiral Separation of Bupivacaine by Simulated Moving Bed (2) Determination of Optimum Condition by Simulation," *HWAHAK KONGHAK*, **41**(6), 728-735(2003).
23. Park, B. J., Lee, C. H. and Koo, Y. M., "Development of Novel Protein Refolding Using Simulated Moving Bed Chromatography," *Korean J. Chem. Eng.*, **22**(3), 425-432(2005).