

CUPRINS

Capitolul 1. Etapele și caracteristicile proceselor de biosinteză	1
1.1. Caracteristicile proceselor biotehnologice	3
1.2. Fazele unui proces biotehnologic	7
1.3. Sinteza schemelor tehnologice de prelucrare în aval de bioreactor	7
1.4. Criterii principale pentru o prelucrare eficientă în aval de bioreactor	15
Capitolul 2. Separarea masei celulare de lichidul de fermentație	18
2.1. Condiționarea lichidului de fermentație prin floculare și coagulare	18
2.2. Separarea prin sedimentare gravitațională	21
2.3. Separarea prin filtrare	24
2.3.1. Mecanismul filtrării	24
2.3.2. Teoria filtrării. Posibilități de îmbunătățire a filtrării	26
2.3.3. Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare	27
2.4. Separarea prin centrifugare	35
2.4.1. Bazele teoretice ale sedimentării în câmp de forțe centrifugal	35
2.4.2. Tipuri de centrifuge utilizate în procesele de bioseparare	38
2.4.3. Aplicații ale separării centrifugale în biotehnologii	44
2.4.3.1. Separarea drojdiilor	44
2.4.3.2. Separarea bacteriilor	46
2.4.3.3. Separarea celulelor animale	47
2.4.3.4. Separarea resturilor celulare	48
2.4.3.5. Recuperarea și spălarea corpurilor de incluziune	48
2.4.3.6. Fraționarea plasmei umane	49
2.5. Separarea prin microfiltrare	51
2.6. Centrifugare sau microfiltrare ?	52
Capitolul 3. Dezagregarea masei celulare	53
3.1. Susceptibilitatea la rupere a celulelor	53

3.1.1. Celule animale	53
3.1.2. Celule vegetale	54
3.1.3. Fungii și drojdii	55
3.1.4. Bacterii	55
3.2. Metode de dezagregare a celulelor	57
3.2.1. Metode mecanice de dezagregare a celulelor și țesuturilor	58
3.2.1.1. Forfecarea lichidului cu ajutorul ultrasunetelor	58
3.2.1.2. Forfecarea lichidului prin agitare mecanică	59
3.2.1.3. Forfecarea lichidului prin presurizare	60
3.2.1.4. Forfecarea fazei solide prin măcinare	63
3.2.1.5. Forfecarea fazei solide prin presurizare	66
3.2.2. Metode nemecanice de dezagregare a celulelor și țesuturilor	67
3.2.2.1. Dezagregarea celulelor prin deshidratare	67
3.2.2.2. Permeabilizarea celulelor prin metode fizice	67
3.2.2.3. Permeabilizarea celulelor prin metode chimice	68
3.2.2.4. Permeabilizarea celulelor prin metode enzimatic	69
3.3. Influența dezagregării asupra proceselor ulterioare de separare	71
Capitolul 4. Separarea prin extracție	73
4.1. Extracția fizică lichid – lichid	74
4.1.1. Aspecte generale privind extracția lichid – lichid	74
4.1.2. Aspecte particulare ale extracției lichid – lichid în bioproc	75
4.1.2.1. Solvenți de extracție	76
4.1.2.2. Echipamente de extracție	77
4.1.2.2.1. Extractoare centrifugale	78
4.1.2.2.2. Extractoare rotative cu agitare	83
4.1.2.2.3. Extractoare cu talere pulsate	84
4.1.2.2.4. Alte echipamente de extracție	85
4.1.3. Aplicații ale extracției lichid – lichid în bioproc	86
4.1.3.1. Extracția antibioticelor	88
4.1.3.2. Extracția alcoolilor	90
4.1.3.3. Extracția acizilor carboxilici	90
4.2. Extracția în sisteme apoase bifazice	92
4.2.1. Formarea sistemelor apoase bifazice	92
4.2.2. Mecanismul extracției biopolimerilor	95
4.2.3. Proiectarea procesului de extracție în sisteme apoase bifazice	98
4.2.4. Aplicații ale extracției în sisteme apoase bifazice	100
4.2.5. Procesul tehnologic de extracție în sisteme apoase bifazice	101

4.2.6.	Recuperarea chimicalelor și reducerea costurilor	103
4.2.7.	Transpunerea la scară a extracției în sisteme apoase bifazice	104
4.2.8.	Aspecte economice ale extracției în sisteme apoase bifazice	105
4.3.	Extracția cu micle inverse	107
4.3.1.	Formarea și proprietățile micelilor inverse	107
4.3.2.	Mecanismul extracției în micle inverse	113
4.3.3.	Factorii care influențează transferul biomoleculelor în micelile inverse	115
4.3.4.	Reextracția din micle inverse	117
4.3.5.	Procesul tehnologic de extracție cu micle inverse	119
4.3.6.	Aplicații ale extracției cu micle inverse	121
4.3.6.1.	Extracția cu micle inverse în prezența masei celulare	121
4.3.6.2.	Izolarea și renaturarea proteinelor	122
4.3.6.3.	Sinteza proteinelor în micelile inverse	122
4.4.	Extracția cu afromi	125
4.5.	Extracția reactivă	127
4.5.1.	Mecanismul extracției reactive	128
4.5.2.	Agenti de extracție	132
4.5.2.1.	Derivați organofosforici	134
4.5.2.2.	Amine cu masă moleculară ridicată	135
4.5.2.3.	Compuși macrociclici	137
4.5.2.4.	Sinergismul agenților de extracție	140
4.5.3.	Echipamente pentru extracție reactivă	141
4.5.3.1.	Instalații cu unități distincte amestecător – decantor	141
4.5.3.2.	Extractoare tip coloană fără agitare mecanică	142
4.5.3.3.	Extractoare tip coloană cu agitare mecanică	142
4.5.3.4.	Alte tipuri de extractoare	143
4.5.4.	Extracția reactivă a produșilor de biosinteză	143
4.5.4.1.	Extracția acizilor carboxilici	143
4.5.4.1.1.	Extracția acizilor carboxilici cu derivați organofosforici	144
4.5.4.1.2.	Extracția acizilor carboxilici cu amine	145
4.5.4.2.	Extracția aminoacizilor	151
4.5.4.2.1.	Extracția aminoacizilor cu derivați organofosforici	152
4.5.4.2.2.	Extracția aminoacizilor cu amine	154
4.5.4.2.3.	Extracția aminoacizilor cu eteri-coroană și calixarene	156
4.5.4.3.	Extracția antibioticelor	159
4.5.4.4.	Alte aplicații ale extracției reactive	162
4.5.4.4.1.	Extracția acizilor organici din produse naturale	162
4.5.4.4.2.	Extracția vitaminelor	164

Cuprins

4.5.4.4.3. Extracția selectivă a enantiomerilor	167
4.6. Extracția cu membrane lichide	175
4.6.1.	

1. Etapele și caracteristicile proceselor de biosinteză

Noțiunea de biotehnologie nu înseamnă același lucru pentru toată lumea. Unii văd biotehnologia reprezentând toate formele de cercetare biologică, fie că este vorba de fabricarea brânzei, obținerea berii sau tehnologia ADN-ului recombinat. Alții consideră că biotehnologie înseamnă doar tehnici biologice moderne (ADN recombinat, tehnologii de hibridizare, anticorpi monoclonali). În timp ce unii consideră biotehnologia drept un nou set de unelte în „lădița cu scule” a biologilor, pe Wall Street biotehnologia reprezintă doar o sursă de noi oportunități și de riscuri financiare.

O definiție – destul de amplă – consideră biotehnologia ca fiind *orice tehnică ce utilizează organisme vii sau părți ale acestora pentru a elabora sau modifica produse, pentru a îmbunătăți plante sau animale, ori pentru a dezvolta microorganisme cu utilizări specifice*. O a doua definiție – mai restrânsă – definește biotehnologia drept *utilizarea industrială a ADN recombinat, a fuziunii celulare și a noilor tehnici de bioprelucrare* [1]. O definiție încă actuală este cea adoptată în 1978 de către Federația Europeană de Biologie: *utilizarea integrată a biochimiei, microbiologiei și ingineriei în scopul obținerii unei aplicații tehnologice (industriale), cu ajutorul microorganismelor, culturilor de celule și a părților componente ale acestora* [2]. Cuvântul „biotehnologie” provine din grecescul „bios”, care înseamnă „viață” (din care provine și „biologia” = „știința vieții”) și din „tehnologie”, care la rândul său provine tot din limba greacă, „technos” = „meșteșug” + „logos” = „știință”.

Utilizarea microorganismelor pentru a transforma materialele de origine vegetală sau animală în produse alimentare fermentate este cunoscută încă din antichitate. De atunci biotehnologiile au evoluat și s-au diversificat, la ora actuală fabricându-se un număr enorm de produse, de la relativ ieftinii solvenți organici și bio-etanol, până la produse costisitoare ca antibiotice, proteine terapeutice, vaccinuri, hormoni, etc.

Un proces biotehnologic (bioproces) necesită o abordare pluri- și interdisciplinară. Punerea la punct a unui bioproces industrial necesită o strânsă colaborare între specialiști din domeniul biochimiei, geneticii, enzimatologiei, microbiologiei, ingineriei

Capitolul 1 – Etapele și caracteristicile proceselor de biosinteză

biochimice. Această abordare este evidentă dacă ne uităm la etapele de dezvoltare necesare unui proces industrial de obținere a unui produs pe bază de ADN recombinat: insulină, hormon de creștere, interferon (fig. 1.1).

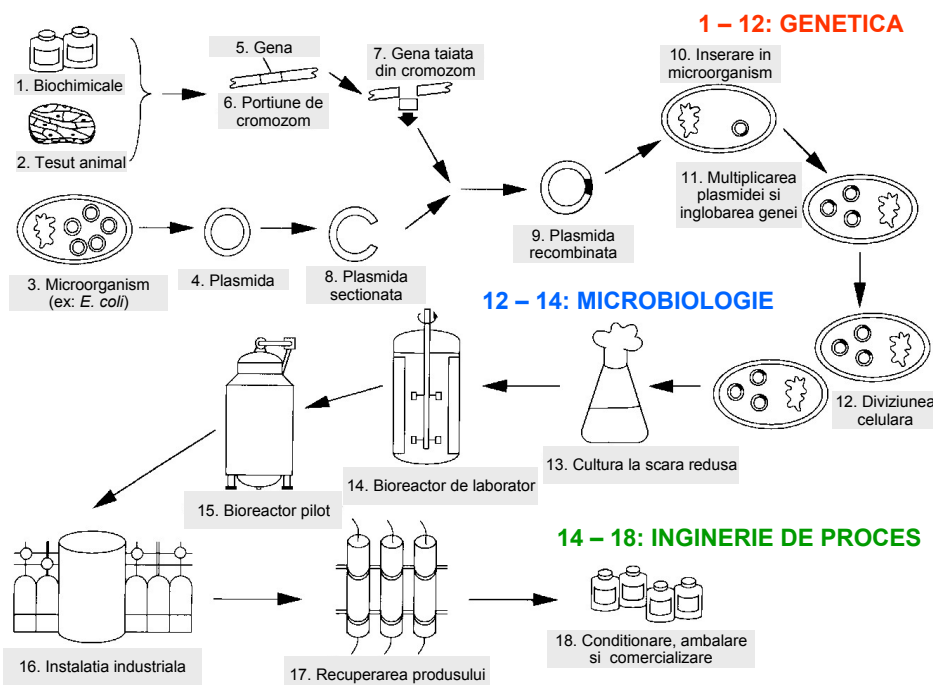


Figura 1.1. Etapele de dezvoltare ale unui bioproces pentru producerea și comercializarea unui bioproduct pe bază de ADN recombinat [3]

Un proces biotehnologic este un proces complex, format din mai multe procese tehnologice componente. Dintre procesele tehnologice componente nu trebuie să lipsească procesul esențial, respectiv procesul biochimic. Așa cum într-un proces tehnologic din industria chimică trebuie să existe cel puțin un proces chimic, proces care implică transformări de substanță la nivel molecular, și în procesul biotehnologic va exista cel puțin un proces biochimic, în care transformările de substanță la nivel molecular decurg la nivelul unui organism viu (microbian, vegetal sau animal) sau al unei porțiuni din acesta (enzimă). Între un proces chimic și un proces biochimic nu există deosebiri fundamentale. În ambele există o transformare fundamentală la nivel molecular (reacția chimică, respectiv reacția biochimică) însoțită de procese de transfer de masă sau de energie (fig. 2.1).

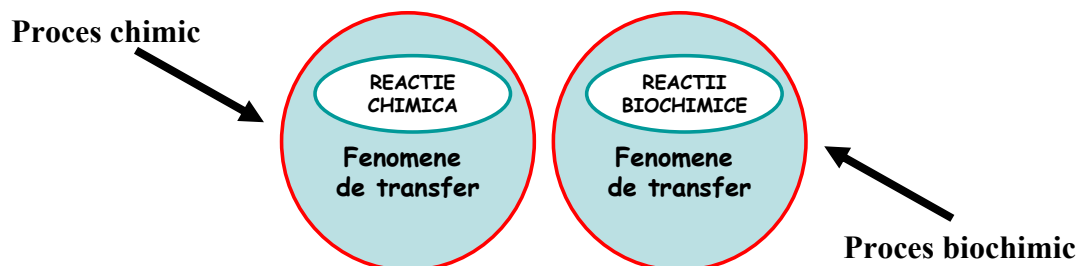


Figura 1.2. Asemănări între procesul chimic și procesul biochimic

1.1. CARACTERISTICILE PROCESELOR BIOTEHNOLOGICE

Fața de alte procese tehnologice întâlnite în industriile de proces, bioprocesele prezintă o serie de particularități, cum ar fi [2 - 4]:

- capacități de producție foarte variate: de la 20 milioane t/an (etanol) până la mai puțin de 20 kg/an (insulină, interferon, anticorpi monoclonali) – tab. 1.1;
- produsele de biosinteză se găsesc deseori într-o concentrație foarte scăzută în masa de reacție evacuată din bioreactor (lichidul de fermentație);
- separarea produsului se realizează în mai multe etape, acest lucru ducând la creșterea costurilor; costul separării poate atinge în unele cazuri 90 % din costul total al procesului biotehnologic (tab. 1.2);
- lichidele de fermentație au comportare de fluid nenewtonian; acest lucru necesită o abordare specifică în proiectarea echipamentelor în care se realizează procese de transfer de impuls, căldură și masă;
- produsele de biosinteză, în special cele cu masă moleculară mare, sunt labile termic și chimic, sunt sensibile la forțe de forfecare și la tensiuni interfaciale ridicate; acest lucru face ca procedeele clasice de separare (distilarea, de exemplu) să nu poată fi utilizate;
- în lichidele rezultate în bioprocese, alături de produsul util există o serie de compuși secundari (impurități) ale căror caracteristici fizice și chimice sunt similare cu ale produsului util; asemănarea proprietăților face foarte dificilă separarea;
- produsele de biosinteză, în special cele cu masă moleculară ridicată, prezintă o mobilitate foarte redusă.

Tabelul 1.1. Produse majore obținute prin biotehnologii [5]

Produsul de fermentație	Tipul de organism utilizat	Producție mondială [kg/an]
Solvenți organici - etanol (fără utilizări alimentare) - acetonă / butanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i>	2×10^{10} 2×10^6 (butanol)
Biomasă - culturi starter și drojdii pentru industria alimentară și agricultură - proteine monocelulare	Bacterii lactice sau drojdie de panificație <i>Pseudomonas methylotrophus</i> sau <i>Candida utilis</i>	5×10^8 $(0,5 - 1) \times 10^8$
Acizi organici - acid citric - acid gluconic - acid lactic - acid itaconic	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Aspergillus itaconicus</i>	$(2 - 3) \times 10^8$ 5×10^7 2×10^7
Aminoacizi - acid L-glutamic - L-lisina - L-fenilalanină - L-arginină - alți aminoacizi	<i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Brevibacterium flavum</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Brevibacterium flavum</i> <i>Corynebacterium spp.</i>	3×10^8 3×10^7 2×10^6 2×10^6 1×10^6

Capitolul 1 – Etapele și caracteristicile proceselor de biosinteză

Transformări microbiene - stereoizi - D-sorbitol în L-sorboză (la fabricarea vitaminei C)	<i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Acetobacter suboxydans</i>	4×10^7
Antibiotice - peniciline - cefalosporine - tetraciline - macrolidice (eritromicina) - polipeptidice (gramicidina) - aminoglicozidice (streptomicina) - aromatice (griseofulvina)	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Streptomyces aureofaciens</i> <i>Streptomyces erythreus</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>Penicillium griseofulvum</i>	$(3 - 4) \times 10^7$ 1×10^7 1×10^7 2×10^6 1×10^6
Polizaharide extracelulare - xanthan - dextran	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	5×10^6
Nucleotide - 5' guanozin monofosfat	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	1×10^5
Enzime - proteaze - α -amilaze - glucoamilaze - glucozizomerază - pectinaze - renină - total alte enzime	<i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Mucor miehei</i> sau drojdie recombinată	6×10^5 4×10^5 4×10^5 1×10^5 1×10^4 1×10^4 5×10^4
Vitamine - B ₁₂ - riboflavină	<i>Propionibacterium shermanii</i> sau <i>Pseudomonas denitrificans</i> <i>Eremothecium ashbyii</i>	1×10^4
Alcaloizi Ergot	<i>Claviceps paspali</i>	5×10^3
Pigmenți - shikonin - β -caroten	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> <i>Blakeslea trispora</i>	60
Vaccinuri - antidifteric - antitetanos - antipertussis (tuse convulsivă) - antipoliomielitic - antirubeolic - antihepatic B	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Bordetella pertussis</i> virusi activi atenuați crescuți în rinichi de maimuță sau în celulele diploide umane virusi activi atenuați crescuți în rinichi de pui de hamster antigen de suprafață evidențiat în drojdia recombinată	< 50
Proteine terapeutice - insulină - hormonul creșterii - eritropoietină - factorul VIII-C - activatorul plasminogen de țesut - interferonul α_2	<i>Escherichia coli</i> recombinată <i>Escherichia coli</i> recombinată sau celule de mamifere recombinate celule de mamifere recombinate celule de mamifere recombinate celule de mamifere recombinate <i>Escherichia coli</i> recombinată	< 20
Anticorpi monoclonali	<i>Celule Hybridoma</i>	< 20
Insecticide - spori bacterieni - spori de fungi	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Hirsutella thompsonii</i>	

Datele din tab. 1.1 nu sunt exhaustive: nu au fost incluse procesele de epurare a apelor uzate, de bioremediere a solurilor poluate, biolixivierea minereurilor sau procesele clasice de fabricare a unor produse alimentare tradiționale: iaurt, pâine, bere, vin, oțet.

Tabelul 1.2. Costul separării bioproduselor ca fracțiune din costul total de producție

Sursa	Produsul	Costul separării (% din costul total)
Celule de biomasă de drojdie	Proteine monocelulare, extract de drojdie	5
Produse de mare tonaj	Acid citric, lactic, malic	10 – 50
Enzime extracelulare	Amilaze, proteaze	10
Antibiotice	Penicilină	20 – 50
	Antibiotice noi	60
Enzime/proteine intracelulare	Insulină, interferon	90

Produsele de biosinteză se prezintă în forme diverse și provin din surse variate. Ele pot fi molecule de diferite dimensiuni, de la metaboliți organici cu masă moleculară mică (etanol, acid citric, antibiotice), până la peptide și proteine (insulină, anticorpi, enzime) sau molecule bazate pe nucleotide (ARN, plasmide ADN). Aceste produse pot fi metaboliți ai microorganismelor, celulelor vegetale sau animale; pot reprezenta produsul unei reacții enzimatică sau al unei sinteze peptidice sau pot fi, pur și simplu, componente ale unei surse naturale: sânge, lapte sau țesut vegetal. Dacă sursa produsului este un microorganism, acesta se poate regăsi excretat în mediul de cultură, se poate acumula în citoplasma sau periplasma celulelor sau poate forma corpi de incluziune – agregate mari de proteine denaturate care se găsesc în interiorul bacteriei.

Concentrația produselor de biosinteză poate varia pe o plajă foarte largă de valori: de la sute de g/L (etanol, acid citric) la mg/L (anticorpi recombinati) sau chiar $\mu\text{g/L}$ în cazul factorilor de coagulare ai sângelui. Dacă în cazul produselor aflate în concentrație ridicată izolarea/purificarea nu pune probleme deosebite, putându-se realiza prin intermediul operațiilor unitare clasice utilizate în industriile de proces (de ex. separarea și concentrarea etanolului prin distilare), în cazul produselor aflate în concentrații scăzute, alături de cantități considerabile de impurități, cum este cazul factorilor de sânge, anticorpilor monoclonali sau proteinelor recombinat, separarea și purificarea este mult mai dificilă și evident – mai costisitoare. În general, ponderea costului purificării în costurile totale de producție depinde de concentrația produsului în mediul de cultură, reprezentând între 5 și 90 % din costurile totale (tab. 1.2). Ca o consecință a acestui fapt, se poate constata că există o relație directă între prețul de vânzare al produselor de biosinteză, preț care reflectă costurile de producție, și concentrația bioprodusului în mediul de cultură (fig. 1.3).

Cerințele de puritate ale produselor de biosinteză sunt diferite. În funcție de destinația acestora este stabilit nivelul maxim acceptabil de impurități, precum și natura acestora. Produsele terapeutice de uz uman vor avea cele mai mari exigențe de puritate, în timp ce enzimele industriale se situează la polul opus (fig. 1.4). În tab. 1.3 se prezintă un exemplu de reglementare a compoziției unei proteine terapeutice recombinat.

Produsele de biosinteză sunt caracterizate prin randamentul de obținere, puritate, activitate specifică, noțiuni definite astfel:

Capitolul 1 – Etapele și caracteristicile proceselor de biosinteză

$$\text{Randament} = \frac{\text{masa de produs separata}}{\text{masa de produs alimentata în procesul de separare}} \times 100 [\%] \quad (1.1)$$

$$\text{Puritate} = \frac{\text{masa de produs}}{(\text{masa de produs}) + (\text{masa impuritatilor})} \times 100 [\%] \quad (1.2)$$

$$\text{Activitatea specifica} = \frac{\text{unitati de activitate biologica}}{\text{masa produsului}} \left[\frac{\text{UAB}}{\text{g}} \right] \quad (1.3)$$

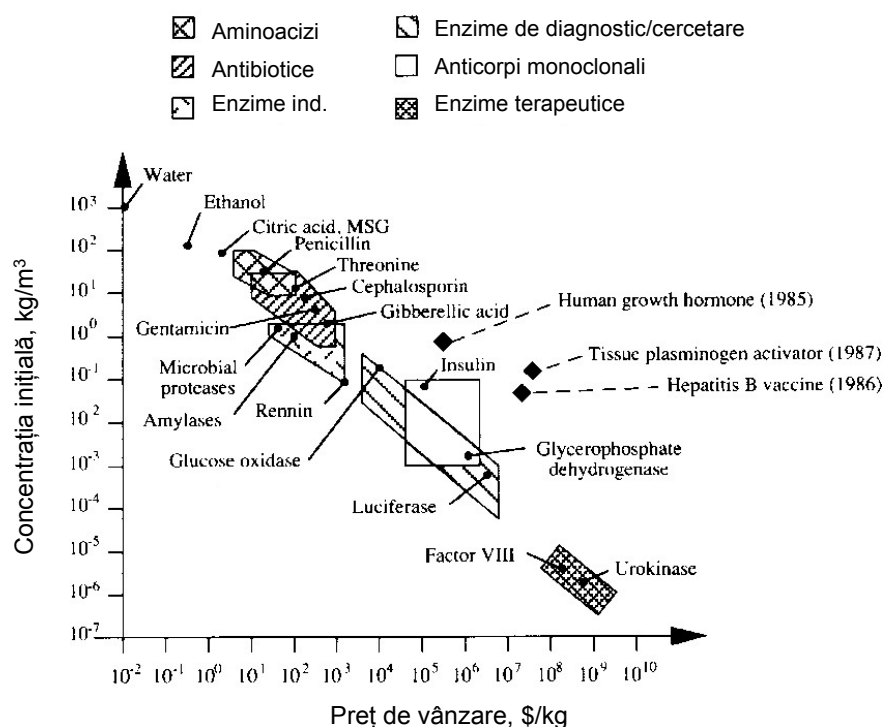


Figura 1.3. Relația dintre concentrația produsului în materialul de pornire și prețul de vânzare [6]

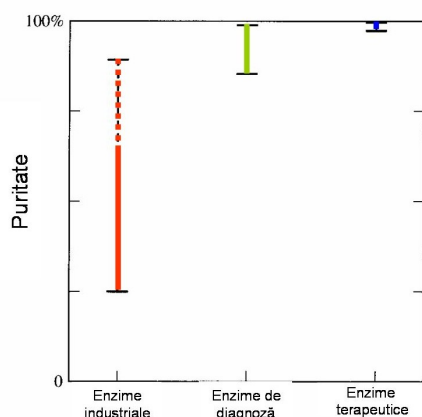


Figura 1.4. Cerințe de puritate pentru diverse enzime [7]

Tabelul 1.3. Exemplu de reglementare a compoziției unei proteine terapeutice recombinante

Puritate	> 99 %
Agregate	< 1 %
Proteine din celula gazdă	< 1 ppm
Acizi nucleici (majoritar ADN)	< 100 pg per doză
Endotoxine	< 5 UE* per kg masă corporală
Virusi	> 12 log reducere
Celule și particule	nedeletabile
Substanța solubilă	< 1 ppm

*UE = unități de endotoxine

1.2. FAZELE UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC

Un proces biotehnologic industrial, cuprinde, de regulă, următoarele procese componente principale: selecția microorganismelor (celulelor), pregătirea mediului de cultură, procesul biochimic propriu-zis, recuperarea (capturarea) produsului urmată de separarea, purificarea și condiționarea acestuia (fig. 1.5). În funcție de poziția acestor procese față de procesul biochimic propriu-zis, care decurge în bioreactor, ele pot fi incluse fie în prelucrarea în amonte de bioreactor (upstream processing), fie în prelucrarea în aval de acesta (downstream processing).

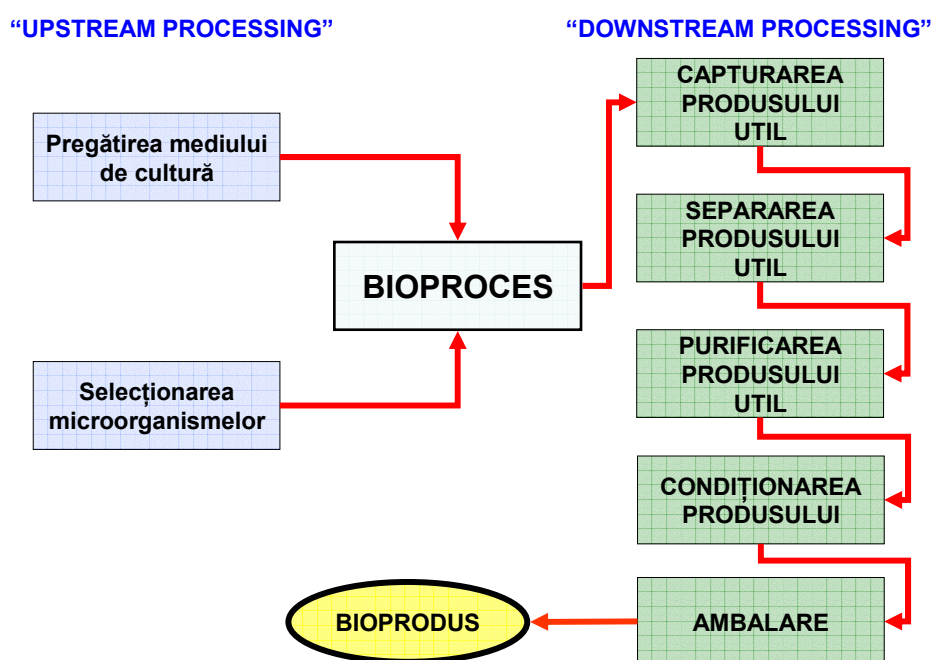


Figura 1.5. Fazele principale ale unui proces biotehnologic industrial

Prelucrarea masei de reacție în aval de bioreactor este dictată de numeroși factori, doi dintre aceștia fiind fundamentali: *natura produsului* de biosinteză obținut și *faza în care se găsește* acesta în urma procesului de biosinteză. În funcție de acești factori, la care se adaugă *cerințele de puritate*, se sintetizează schema tehnologică de separare care asigură obținerea produsului dorit în condiții de eficiență economică (respectiv cu costuri totale minime).

1.3. SINTEZA SCHEMELOR TEHNOLOGICE DE PRELUCRARE ÎN AVAL DE BIOREACTOR

Elaborarea unei scheme de flux tehnologic pentru recuperarea și purificarea unui produs de biosinteză este un proces creativ, bazat pe experiența și imaginația inginerului de proces. Deși există încercări de transpunere a experienței acumulate în programe de calculator, sub forma sistemelor expert, majoritatea inginerilor cu experiență se bazează

Capitolul 1 – Etapele și caracteristicile proceselor de biosinteză

pe câteva reguli de „bun simț” tehnic, cunoscute și ca „reguli euristice”. Câteva dintre aceste reguli sunt enumerate în continuare [8]:

1. Inițial se îndepărtează impuritatea aflată în cantitatea cea mai mare;
2. Inițial se îndepărtează impuritatea cel mai ușor de separat;
3. Cea mai dificilă și mai costisitoare separare se realizează la sfârșit;
4. Se alege acel proces de separare care face apel la diferența maximă între proprietățile produsului și proprietățile impurităților;
5. Se alege și se introduce alternativ în schema de separare procese care utilizează diferite forțe motoare pentru realizarea separării.

În funcție de dimensiuni și de masa moleculară, produsele de biosinteză pot fi molecule de mici dimensiuni (solvenți organici, chimicale fine, antibiotice, hormoni, aminoacizi, vitamine), molecule de dimensiuni mari (proteine, polizaharide, acizi nucleici) sau produse particulare (celule, spori, lipozomi, particule subcelulare). Tab. 1.4 prezintă o clasificare a produselor de biosinteză în conformitate cu acest criteriu.

Tabelul 1.4. Categoriile principale de produse de biosinteză în funcție de mărimea acestora [7]

Produsul	Exemple	Masa moleculară (Da)	Raza tipică
Molecule mici	Zaharuri	200 – 600	0,5 nm
	Aminoacizi	60 – 200	0,5 nm
	Vitamine	300 – 600	1 – 2 nm
	Acizi organici	30 – 300	0,5 nm
Molecule mari	Proteine	$10^3 - 10^6$	3 – 10 nm
	Polizaharide	$10^4 - 10^7$	4 – 20 nm
	Acizi nucleici	$10^3 - 10^{10}$	2 – 1000 nm*
Produse particulare	Ribozomi		25 nm
	Virusi		100 nm
	Bacterii		1 μm
	Celule de drojdii		4 μm
	Celule animale		10 μm

* - piese singulare de ADN genetic pot avea dimensiuni desfășurate de ordinul mm, în funcție de procedeul de izolare; diametrul elicii duble a ADN este de 2,5 nm.

Produsele obținute prin biosinteză pot fi excretate de către celule, găsindu-se în lichidul de fermentație: acestea sunt *produsele extracelulare*. Aproape toate produsele cu masă moleculară mică și multe produse cu masă moleculară mare sunt produse extracelulare. Recuperarea și purificarea acestora este relativ simplă, datorită cantităților reduse de impurități existente în faza lichidă în care se află aceste produse de biosinteză. Dacă produsul biosintetizat rămâne în interiorul celulei, vorbim despre un *produs intracelular*. Astfel de produse sunt, de exemplu, proteinele eucariote recombinante produse de către microorganisme procariote. Produsele intracelulare se acumulează în celule fie sub formă nativă, fie sub formă denaturată, caz în care, de cele mai multe ori formează corpi de incluziune. În alte cazuri, produsul biosintezei este *celula însăși*. Tabelul 1.5 prezintă câteva exemple de diverse tipuri de produse de biosinteză.

TEHNICI DE SEPARARE ȘI CONCENTRARE ÎN BIOTEHNOLOGII

Tabelul 1.5. Clasificarea produselor de biosinteză în funcție de faza în care se găsesc

Tip de produs	Exemple	Concentrație [g/L]
Extracelular	alcooli, acizi organici	100
	aminoacizi, enzime, antibiotice	20
Intracelular	proteine pe bază de ADN recombinat	10
Celula însăși	drojdie de panificație, proteine monocelulare	30

Indiferent de faza în care se găsește produsul util, prima etapă în prelucrarea în aval de bioreactor este separarea masei celulare de lichidul de fermentație (*se aplică regula euristică nr. 1: se îndepărtează impuritatea aflată în cantitatea cea mai mare*). Acest lucru fiind stabilit, prelucrarea ulterioară va merge pe una din cele trei căi redată în fig. 1.6, în funcție de faza în care se găsește produsul biosintetizat. În majoritatea cazurilor, biosepararea se realizează în patru trepte. Obiectivele și operațiile unitare utilizate în fiecare treaptă sunt redată în tab. 1.6.

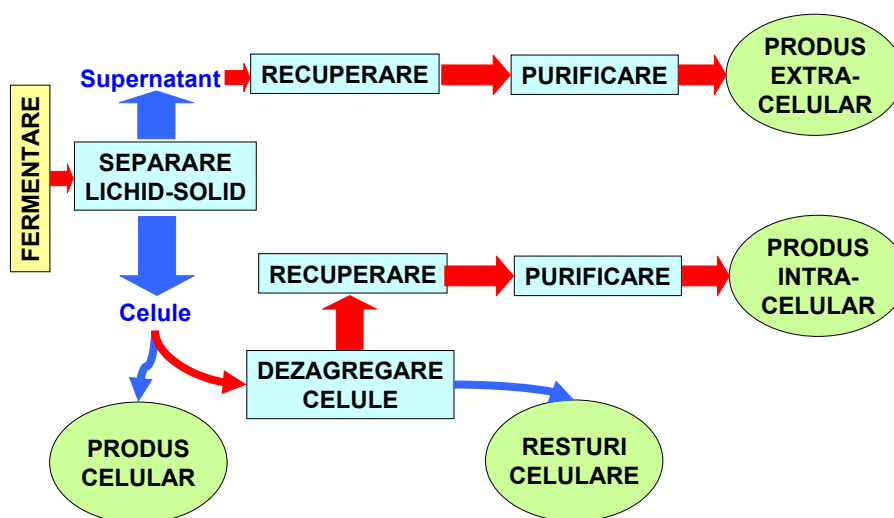


Figura 1.6. Schema generală de prelucrare în aval de bioreactor

Tabelul 1.6. Obiective și operații unitare tipice la biosepararea în patru trepte

Treapta	Obiective	Operații unitare tipice
Separare insolubile	- îndepărtarea celulelor, resturilor celulare și a impurităților insolubile - reducerea volumului de prelucrat	- filtrare - sedimentare - extracție - adsorbție
Izolare produs	- îndepărtarea componentelor cu proprietăți diferite de ale produsului - reducerea volumului de prelucrat	- extracție - adsorbție - ultrafiltrare - precipitare
Purificare primară	- îndepărtarea componentelor cu proprietăți similare cu ale produsului	- cromatografie - metode bazate pe afinitate - cristalizare fracționată - precipitare fracționată
Purificare avansată	- îndepărtarea lichidelor - trecerea produsului în formă cristalină	- uscare - cristalizare

O structură generalizată a prelucrării în aval de bioreactor este redată în fig. 1.7. Pentru fiecare tip de produs (extracelular sau intracelular) există mai multe alternative de prelucrare. Alegerea unei alternative de prelucrare și selectarea operației (operațiilor) unitare corespunzătoare se face ținând cont de proprietățile produsului, proprietățile impurităților și de proprietățile microorganismelor, celulelor sau țesuturilor producătoare. Sinteza procesului tehnologic de separare va consta în alegerea succesiunii operațiilor în conformitate cu cele 5 reguli euristice prezentate anterior, pe baza structurii redată în fig. 1.7. Majoritatea bioproceselor, în special în cazul obținerii produselor de mic tonaj și de valoare ridicată, sunt concepute pentru a fi conduse în *regim discontinuu*. *Procese continue* de bioseparare sunt utilizate în cazul produselor de valoare relativ redusă, fabricate în cantități considerabile: etanol, butanol, acizi organici, etc.

RECUPERAREA PRIMARĂ reprezintă prima etapă a procesului de prelucrare în aval de bioreactor, etapă în care are loc o oarecare purificare și o reducere a volumului de material supus prelucrării. Așa cum reiese din fig. 1.7, alegerea căii de urmate depinde de locul în care se găsește produsul, respectiv dacă acesta este intracelular sau extracelular.

În cazul produselor intracelulare, prima etapă de purificare o reprezintă **recoltarea celulelor**, respectiv îndepărtarea lichidului extracelular. Pentru realizarea acestui proces se face apel fie la centrifugare, fie la filtrarea membranară (atât microcât și ultrafiltrare). Centrifugarea este avantajoasă în cazul microorganismelor de dimensiuni mari și cu densitate ridicată ($\varnothing > 2 \mu\text{m}$, $\rho > 1,03 \text{ g/cm}^3$), cum este cazul drojdiilor. Pentru microorganisme mai mici se pot utiliza diverse tehnici de coagulare pentru a mări dimensiunea particulelor care sedimentează. Filtrarea membranară este avantajoasă pentru recoltarea celulelor mici și ușoare. Pierderile tipice de celule prin centrifugare sunt cuprinse între 1 și 5%. Filtrarea membranară asigură o recuperare practic integrală a celulelor, aceasta în cazul în care nu se produce dezagregarea celulelor sau sfâșierea membranei acestora.

Dezagregarea celulelor este de regulă al doilea pas în separarea produselor intracelulare. Scopul acestei operații este de a deschide celulele gazdă și de a elibera produsul intracelular. Dezagregarea bacteriilor și a drojdiilor se realizează fie în omogenizatoare de înaltă presiune, fie în mori cu bile. Pentru capacități mari (de câțiva m^3/h) numai omogenizatoarele sunt eficiente economic. Pentru eliberarea produselor periplasmice acumulate între membrana celulară și peretele celular se utilizează adeseori șocul osmotic. Înaintea dezagregării, concentratul de celule este deseori diluat cu un „tampon litic” al cărui rol este de a minimiza denaturarea produsului după eliberarea sa din celulă. Pentru microorganisme greu de dezagregat sunt necesare treceri multiple prin omogenizator, la presiuni de 50 – 100 MPa. Trecerile multiple sunt necesare și pentru eliberarea produșilor care formează corpi de incluziune. Suplimentar are loc fragmentarea resturilor celulare în particule foarte mici, facilitându-se astfel separarea ulterioară a corpurilor de incluziune de resturile celulare. În această etapă are loc o oarecare degradare a produselor proteice datorită forfecării puternice și a oxidării.

Îndepărtarea resturilor celulare se realizează de regulă prin centrifugare sau microfiltrare. Alte opțiuni posibile sunt separarea în filtre rotative sub vid sau în filtre presă, filtrarea în adâncime, extracția sau cromatografia de adsorbție în strat expandat (cromatografie ASE).

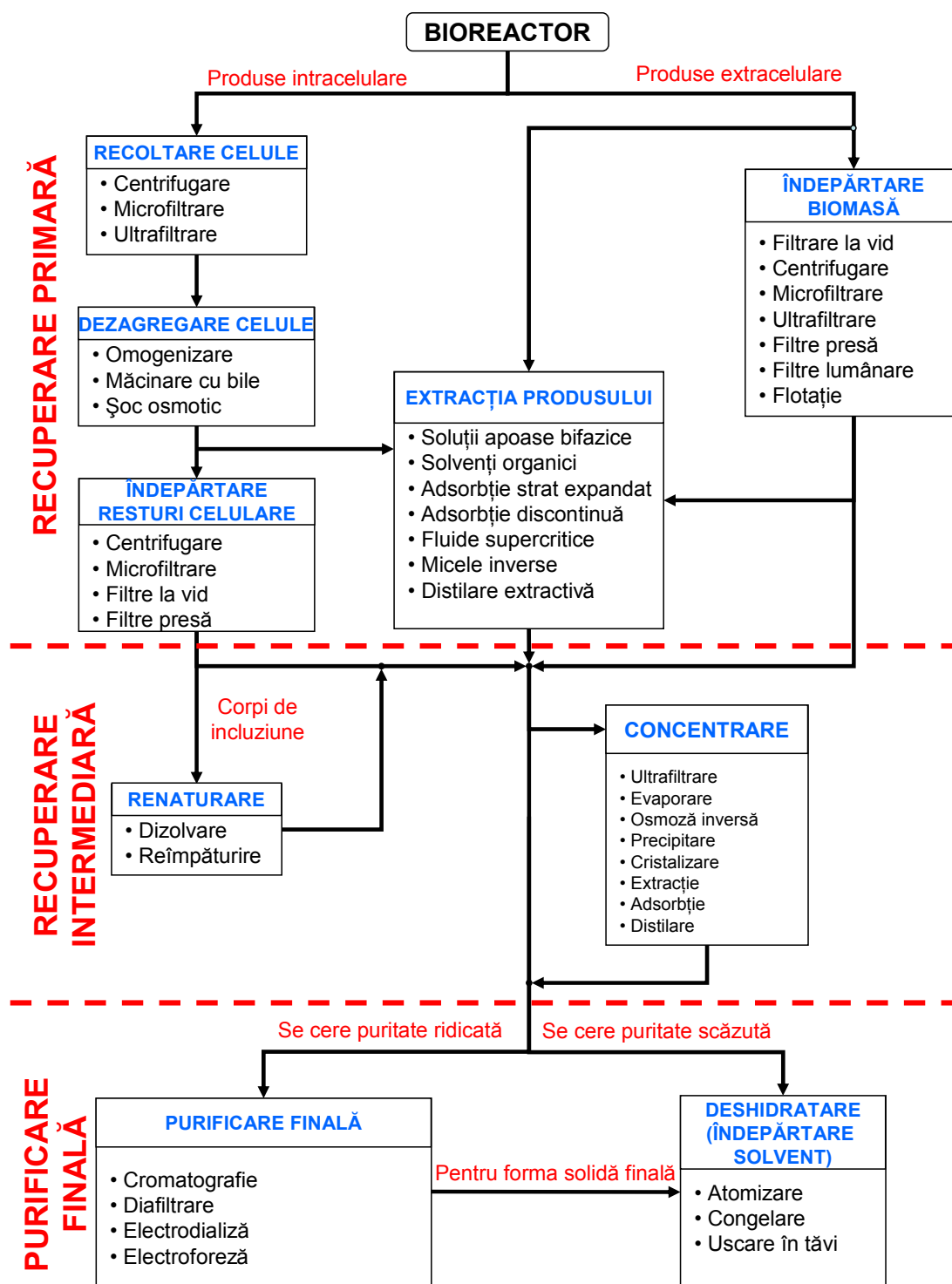


Figura 1.7. Schema-bloc generalizată a prelucrării în aval de bioreactor [9]

Dacă *produsul este solubil*, el este recuperat în timpul îndepărtării resturilor celulare fie în faza ușoară a unei centrifuge, fie în permeatul unui filtru. Centrifugarea asigură doar îndepărtarea resturilor celulare mari (cu un diametru Stokes de peste 0,5 μm), așa că după centrifugare este necesară o finisare a separării prin filtrare. În caz contrar, resturile celulare mici rămase în faza lichidă pot provoca probleme serioase în etapele ulterioare de prelucrare – în cazul separărilor cromatografice, de ex. Pentru finisarea separării se pot folosi diverse tipuri de filtre (în strat adânc, presă, lumânare, rotative sub vid, microfiltre membranare, etc.). Aceste filtre pot fi utilizate pentru îndepărtarea resturilor celulare și fără o centrifugare prealabilă a suspensiei.

Dacă *produsul este insolubil* și formează corpi de incluziune, el va trebui mai întâi separat de resturile celulare, apoi dizolvat și renaturat (a se vedea cazul insulinei, de ex.). Din fericire, corpii de incluziune sunt uzual de diametru mare (0,3 – 1,0 μm) și au densitate ridicată (1,3 – 1,5 g/cm^3), putându-se separa ușor de resturile celulare într-o centrifugă separatoare cu talere. Corpii de incluziune se regăsesc în faza grea colectată din centrifugă, în timp ce resturile celulare rămân în faza ușoară. Faza grea este uzual resuspendată și re-centrifugată de 2 – 3 ori, pentru a asigura o puritate corespunzătoare corpurilor de incluziune. Resuspendarea se realizează într-o soluție diluată de detergent pentru a facilita îndepărtarea altor contaminanți. Se reglează pH-ul și tăria ionică a soluției astfel încât să se reducă hidrofobicitatea resturilor celulare și să se ușureze trecerea lor în faza ușoară. O puritate finală a produsului mai mare de 70% în această etapă reprezintă un lucru comun.

Separarea produsului de resturile celulare se poate face și prin **extracție** și/sau **adsorbție**. Pentru extracția produselor cu masă moleculară mică (antibiotice, de ex.) se folosesc frecvent solvenți organici, iar recuperarea proteinelor se poate realiza folosind sisteme apoase bifazice (SAB). Separarea produsului de resturile celulare și concentrarea simultană a acestuia se poate realiza prin tehnici de adsorbție, putându-se folosi diverși adsorbanti: schimbători de ioni, adsorbanti de afinitate, de schimbare de fază, etc. Acest tip de purificare necesită amestecarea suspensiei cu conținut de resturi celulare cu un adsorbant într-un recipient cu agitare. După adsorbție este necesară o etapă de spălare care are drept scop îndepărtarea impurităților și a resturilor celulare. Mai recent se utilizează cromatografia ASE pentru separarea proteinelor de resturile celulare. Suspensia este pompată ascendent prin stratul expandat. Proteina țintă este legată de adsorbant în timp ce resturile celulare și alți contaminanți trec prin strat fără a se reține. O etapă de spălare îndepărtează materialul slab reținut. După spălare se realizează eluția de pe adsorbant, urmată de o purificare avansată.

În cazul produselor extarcelulare, prima etapă în procesul de separare o reprezintă **îndepărtarea biomasei**, care în acest caz este impuritatea aflată în cantitatea cea mai mare. Această etapă se realizează utilizând una sau mai multe dintre următoarele operații unitare: filtrarea în filtre rotative la vid, centrifugarea în centrifuge cu discuri sau centrifuge decantoare, filtrarea în filtre presă, ultrafiltrarea, flotația, etc. Întrucât fiecare operație unitară prezintă avantaje și dezavantaje pentru diverse produse și microorganisme, e dificil de selectat operația optimă pentru un sistem dat.

Filtrarea în filtre rotative la vid, în special cu utilizarea unui strat de adjuvant, este metoda clasică cea mai utilizată pentru îndepărtarea organismelor micelare. Aceste echipamente pot fi exploatate continuu pentru perioade lungi de timp și, în plus, debitele de filtrat prelucrate sunt mari: peste 200 $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, până la 1000 $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$. Dezavantajul

principal al acestor utilaje este problema depozitării amestecului de biomasă și adjuvant, acesta din urmă fiind adăugat într-o cantitate cel puțin egală cu biomasă. Reglementările severe de mediu fac costisitoare depozitarea acestor materiale.

Centrifugarea în centrifuge separatoare cu talere sau în centrifuge decantoare, se utilizează frecvent în instalațiile de capacitate mare. Centrifugele separatoare lucrează la turații mai ridicate, putând îndepărta microorganisme mai mici și mai ușoare. Performanțele centrifugelor decantoare pot fi îmbunătățite prin adaosuri de agenți de coagulare. Întrucât nu necesită adaos de adjuvant, centrifugarea este mai avantajoasă decât filtrarea în filtre rotative sub vid. Uzual, pasta de biomasă rezultată la centrifugare conține între 40 și 60% v/v lichid extracelular. Pentru recuperarea produsului dizolvat, pasta este de regulă spălată și apoi recentrifugată.

Filtrarea membranară (micro- și ultrafiltrare) permite trecerea în permeat a produsului extracelular, reținând în concentrat biomasă și alte componente particulare. Concentrarea este uzual urmată de diafiltrare, în vederea creșterii randamentului de recuperare a produsului. Filtrele cu membrană sunt utilizate în special în recuperarea produșilor cu masă moleculară redusă, cum ar fi antibioticele din miceliu. Pentru produșii cu masă moleculară mare, aplicațiile sunt limitate la cazurile în care cantitatea de solide este mai redusă decât în cazul culturilor celulare.

RECUPERAREA INTERMEDIARĂ, care urmează recuperării primare, are drept scop concentrarea și purificarea produsului. Dacă produsul este solubil, etapa de recuperare intermediară o reprezintă concentrarea. În cazul produselor denaturate insolubile, etapa de recuperare intermediară constă în dizolvarea și renaturarea (reîmpăturirea) produsului, urmată ulterior de concentrare și purificare.

Concentrarea produsului este o etapă necesară întrucât după separarea primară, produsul se găsește, de regulă, într-o soluție diluată. Reducerea volumului prin concentrare este în concordanță cu regulile euristice 1 și 2. Dintre posibilitățile de concentrare se pot menționa ultrafiltrarea, osmoza inversă, evaporarea, adsorbția, precipitarea, extracția și distilarea.

Ultrafiltrarea este utilizată în mod extensiv pentru concentrarea soluțiilor de proteine. Masa moleculară „de tăiere” a membranei este aleasă astfel încât să fie reținut produsul, în timp ce impuritățile nedorite (de regulă solubile și cu mase moleculare mici) să poată trece prin membrană în fluxul de permeat. În comparație cu evaporarea, ultrafiltrarea are avantajul operării la temperaturi scăzute și posibilitatea îndepărtării impurităților solubile. Parametrii tipici de operare sunt o cădere de presiune transmembranară de 0,2 – 0,5 kPa și un debit mediu specific de 20 L/(m².h).

Osmoza inversă necesită membrane cu dimensiuni ale porilor mai mici, pentru a putea face posibilă concentrarea produselor cu mase moleculare mai mici: antibiotice, anumiți aminoacizi, etc.

Evaporarea poate fi utilizată cu condiția asigurării condițiilor blânde de prelucrare, pentru a nu periclita produsul. Se utilizează evaporatoare rotative cu film subțire, operate la temperaturi relativ coborâte (40 – 50 °C), sub vid. În comparație cu ultrafiltrarea, evaporarea prezintă dezavantajul lipsei oricărui fel de purificare în timpul concentrării, având însă avantajul obținerii unor soluții cu o concentrație mai ridicată și pe acela al posibilității prelucrării comode a unor volume mari de soluție.

Precipitarea este o modalitate de concentrare și purificare frecvent utilizată pentru fracțiunile proteice din sânge, sau pentru acidul citric, de ex. Pentru precipitarea compusului dorit, în soluție se pot adăuga săruri, solvenți sau polimeri, sau se poate modifica pH-ul, tăria ionică sau temperatura soluției. De multe ori precipitarea apare ca etapă următoare extracției realizate prin intermediul soluțiilor apoase bifazice de polimer/sare (PEG și fosfat de potasiu, de ex.). Când produsul se recuperează în faza bogată în polimer precipitarea se realizează prin adaos suplimentar de polimer în soluție. Din punct de vedere economic se recomandă recuperarea și reciclarea agenților de precipitare. Procesul de precipitare se poate utiliza și pentru îndepărtarea impurităților. De ex., acizii nucleici pot fi îndepărtați prin precipitare cu sulfat de mangan și streptomycină sulfat.

Distilarea este utilizată în cazul concentrării și purificării solvenților organici care nu se degradează sub influență temperaturii: etanol, acid acetic, etc.

Renaturarea produsului este necesară atunci când acesta se găsește sub formă de corpi de incluziune. Proteinele eucariote sintetizate de către microorganismele procariote formează corpi de incluziune insolubili în celula gazdă. Aceștia pot fi dizolvați utilizând soluții de haotropi¹ puternici, cum ar fi clorhidratul de guanidină (6 M) sau ureea, în prezența unui agent reducător ca 2-mercaptoetanol (0,5 M) sau ditiotrietol (50 mM). Proteina dizolvată este lăsată apoi să-și reia conformația originală, îndepărtând agenții haotropi prin diafiltrare sau cromatografie și diluând soluția până la o concentrație totală de proteină de 20 – 50 mg/L. Diluția este necesară pentru minimizarea interacțiunilor intermoleculare care pot apărea în timpul reîmpăturirii și pot conduce la inactivarea produsului. Procesul de reîmpăturire este finalizat prin adaosul de mici cantități de glutatoin în formă redusă (2 – 5 mM) și oxidată (1 – 2 mM), urmat de incubarea timp de 5 – 10 ore la 35 – 40 °C.

PURIFICAREA FINALĂ ține cont de cerințele de puritate ale produsului obținut. De regulă produsele farmaceutice (antibiotice, hormoni, etc.) necesită o puritate ridicată, în timp ce produsele industriale (enzime pentru detergenți, solvenți, acizi organici, etc.) necesită o puritate relativ scăzută, ce poate fi asigurată prin deshidratare sau, mai general, prin îndepărtarea solventului. Pentru produsele de înaltă puritate, etapa de purificare finală implică o combinație de etape de cromatografie și de filtrare, iar dacă produsul finit este necesar în formă solidă, aceste etape sunt urmate de o deshidratare sau îndepărtare a solventului.

Cromatografia se realizează de regulă către sfârșitul procesului global de bioseparare, în conformitate cu regula euristică nr. 3: *cea mai dificilă și mai costisitoare separare se realizează la sfârșit*. În cazul produselor biologice cu valoare ridicată, până la aplicarea separărilor cromatografice s-a îndepărtat deja cea mai mare parte a impurităților, concomitent cu reducerea de 50 – 100 de ori a volumului de prelucrat, ajungându-se la un influent cu 1 – 5% (m/v) conținut de proteine la intrarea în unitatea de separare cromatografică. Progresele recente ale cromatografiei ASE permit utilizarea etapei cromatografice de separare în etapa de recuperare primară, deoarece

¹ **Haotropismul** (din cuvintele grecești “chaos” = dezordine, haos, confuzie și “tropos” = formă) este proprietatea anumitor substanțe, de regulă ioni (tiocianat, perclorat, guanidină), de a destructura proteinele, de a promova solubilitatea unor substanțe nepolare în solvenți polari, în general de a modifica structura apei, proteinelor, organismelor vii, permițând realizarea unor procese care altfel nu ar fi posibile. În contrast cu haotropismul este cunoscut cosmotropismul [10, 11].

această tehnică cromatografică permite captura, concentrarea și purificarea produsului direct din lichidul de fermentație care conține celule, resturi celulare și alte particule solide. În consecință, cromatografia ASE are potențialul de a elimina etapele preliminare de separare a biomasei sau a resturilor celulare sau de concentrare a produsului.

O secvență de mai multe etape de separare cromatografică este necesară de regulă pentru atingerea gradului de puritate cerut, iar aceste etape se aleg în conformitate cu regulile euristice 4 și 5. De ex., în concordanță cu regula euristică nr. 5, o etapă de separare prin schimb ionic nu trebuie să fie urmată de o altă etapă de separare de același tip, ci de o etapă de separare bazată pe o altă forță motoare: cromatografie de afinitate sau de inversie a fazelor.

Etapete de *filtrare membranară* se intercalează de regulă între separările cromatografice, în vederea modificării tamponului sau pentru concentrarea soluțiilor diluate de produs.

Deshidratarea sau *îndepărtarea solventului* se realizează prin uscare. Atunci când produsele suportă temperaturi de 50 – 100 °C se poate utiliza uscarea prin pulverizare, uscarea în strat fluidizat sau uscarea în strat fix. Dacă produsele sunt termolabile se utilizează uscarea prin congelare (așa-numita „freeze drying”). Echipamentele necesare pentru realizarea procesului implică costuri ridicate de investiții și se recomandă evitarea, pe cât posibil, a utilizării sale.

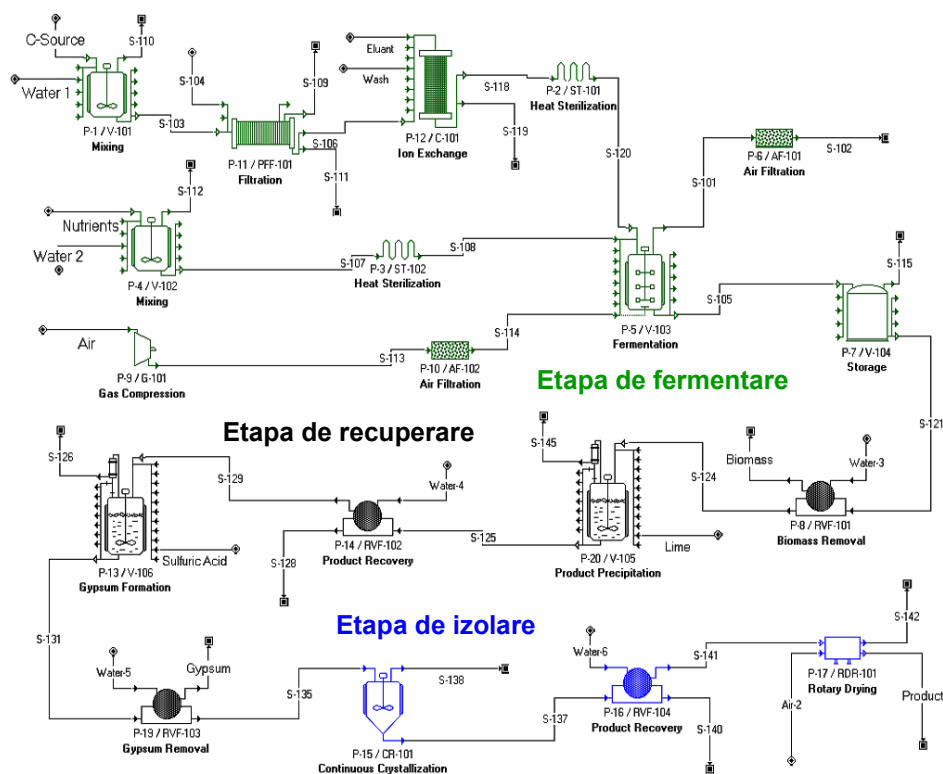
Cu titlu exemplificativ, în fig. 1.8 sunt prezentate schemele tehnologice de obținere a două bioproduse: sinteza, separarea și purificarea unui compus extracelular, cu valoare relativ scăzută și cerințe de puritate obișnuite – acidul citric (fig. 1.8 a); sinteza, separarea și purificarea unui compus intracelular, cu valoare ridicată și cerințe calitative înalte – insulina (fig. 1.8 b). Se poate remarca diferența de complexitate între cele două procese, precum și numărul net superior de etape de separare și purificare în cazul producerii insulinei.

1.4. CRITERII PRINCIPALE PENTRU O PRELUCRARE EFICIENTĂ ÎN AVAL DE BIOREACTOR

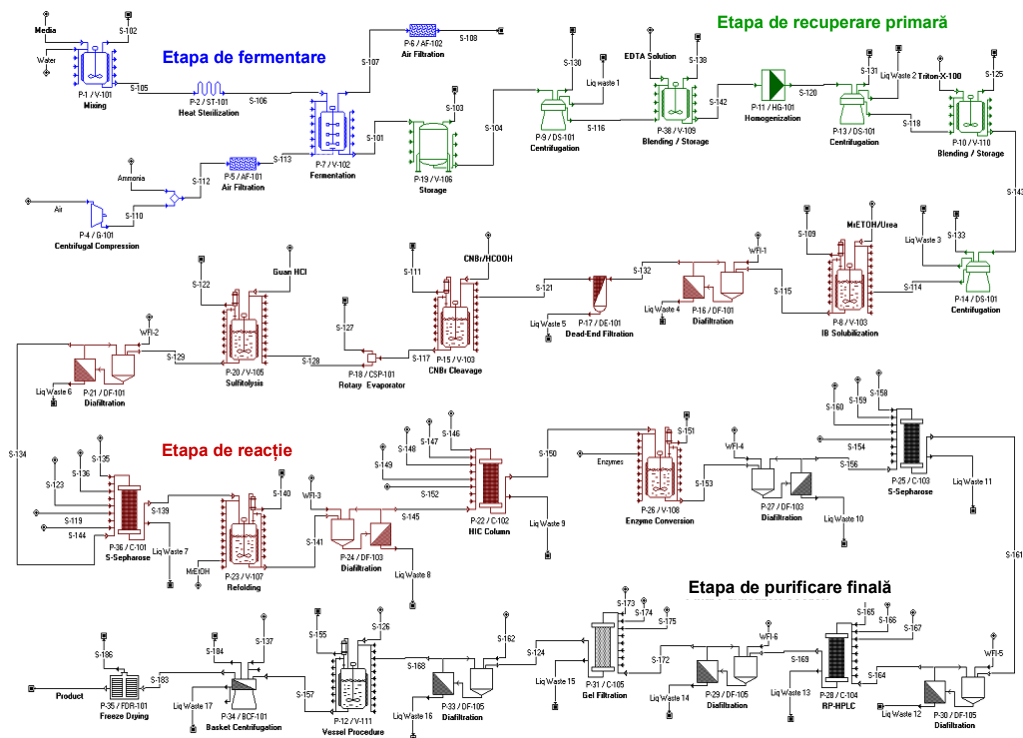
Așa cum s-a arătat anterior, inginerul de proces are de ales între diverse căi de prelucrare a masei de reacție. Pentru fiecare cale de prelucrare există mai multe operații unitare posibil de aplicat, iar fiecare operație unitară se poate realiza în câteva tipuri de echipamente. Pe lângă regulile euristice enunțate în capitolul precedent, este util de știut că:

- dacă produsul are o valoare de piață ridicată, gradul de recuperare trebuie să fie cât mai ridicat;
- echipamentele alese trebuie să aibă o fiabilitate cât mai înaltă;
- numărul etapelor de prelucrare trebuie redus la minimum, în acest mod scăzând costurile de investiții și de exploatare;
- procesul ales trebuie să asigure o reducere de volum considerabilă de la bulionul de fermentare inițial până la fluidul din faza finală de recuperare a produsului: o reducere cu minimum trei ordine de mărime (1000 : 1) ar fi rezonabilă;

Capitolul 1 – Etapele și caracteristicile proceselor de biosinteză



a – Biosinteza acidului citric



b – Biosinteza insulinei

Figura 1.8. Scheme tehnologice pentru obținerea produselor de biosinteză într-o formă comercializabilă [8]

TEHNICI DE SEPARARE ȘI CONCENTRARE ÎN BIOTEHNOLOGII

- prelucrarea trebuie să conducă la un bulion epuizat final ușor de reciclat, pentru a face posibilă recuperarea nutrienților neconsumați;
- prelucrarea în aval de bioreactor trebuie începută imediat ce bulionul părăsește secțiunea de fermentare; orice întârziere sau stocare necesită vase de stocare costisitoare, existând și posibilitatea deteriorării sau contaminării produsului din bulion;
- întrucât în majoritatea proceselor biotehnologice concentrația produsului este scăzută, costul pe unitate de volum de bulion procesată în recuperarea primară va avea o pondere însemnată în costul final de producție.

Alegerea metodei de recuperare este influențată și de alte criterii, cum ar fi: locul și starea în care se află produsul, concentrația produsului, proprietățile fizico-chimice ale produsului, aplicațiile acestuia, cerințele de minimă puritate, caracteristicile fizico-chimice ale impurităților, prețul de piață al produsului, etc.

Tabelul 1.7. Categorii de produse de biosinteză

Caracteristici	Produse „low-tech”	Produse „high-tech”
Producție	mare (peste 1.10^4 kg/an)	mică (sub 1.10^4 kg/an)
Valoare de piață	mică (sub 100 USD/kg)	mare (peste 1000 USD/kg)
Puritate cerută	mică (maximum 90 – 95 %)	mare (uzual peste 99 %)
Costuri de separare	mici (sub 50% din costurile totale)	mari (până la 90% din costurile totale)
Etape de separare	puține	numeroase
Tehnologia de separare	clasică, fără probleme deosebite	sofisticată
Exemple	solvenți (etanol, butanol, acetonă) acizi organici aminoacizi proteine monocelulare enzime industriale antibiotice	vitamine pigmenți enzime de diagnostic enzime terapeutice vaccinuri proteine terapeutice

Produsele obținute prin biosinteză pot fi încadrate în două mari categorii (tab. 1.7). În prima categorie intră produsele care se obțin în cantități mari, au o valoare de piață relativ scăzută și nu necesită o puritate prea ridicată: etanol, butanol, acetonă, acizi organici, proteine monocelulare, enzime industriale, antibiotice. Separarea și purificarea acestor produse se poate realiza folosind o succesiune de operații unitare „clasice”, cunoscute și aplicate frecvent în industriile de proces: filtrare, centrifugare, flotație, extracție cu solvenți, adsorbție, precipitare, evaporare, uscare, etc. În a doua categorie sunt incluse produsele care se obțin în cantități mult mai reduse, au o valoare de piață ridicată și necesită o purificare avansată: vitamine, pigmenți, enzime de diagnostic și terapeutice, vaccinuri, proteine terapeutice, etc. Pentru separarea și purificarea acestor produse, operațiile unitare „clasice” nu sunt suficiente, făcându-se apel la o serie de tehnici noi, de cele mai multe ori concepute inițial pentru operare la scară de laborator și ulterior transpuse la scară industrială: ultracentrifugare, dezagregare mecanică, precipitare fracționată, cromatografie în strat fix, ultrafiltrare, dializă, diafiltrare, osmoză inversă, liofilizare, etc.

2. Separarea masei celulare de lichidul de fermentație

Fie că este vorba de „recoltarea celulelor” sau de „îndepărtarea biomasei”, după cum produsul dorit este intra- sau extracelular (vezi fig. 1.7), acesta este primul proces de prelucrare în aval de bioreactor, al cărui scop este de a reține acea fază care conține produsul util, concomitent cu reducerea considerabilă a volumului de prelucrat, prin îndepărtarea celeilalte faze. Pentru separarea celulelor de lichidul de fermentație avem la îndemână cel puțin cinci tehnici de separare: sedimentarea, filtrarea, centrifugarea, ciclonarea și microfiltrarea. Suplimentar, flocularea celulelor poate fi utilizată pentru îmbunătățirea eficienței tuturor acestor tehnici.

2.1. CONDIȚIONAREA LICHIDULUI DE FERMENTAȚIE PRIN FLOCULARE ȘI COAGULARE

Pentru facilitarea proceselor ulterioare de separare a masei celulare de lichidul de fermentație este utilă aglomerarea particulelor celulare în agregate mari, ușor separabile. În absența floculării sau coagulării, sedimentarea gravitațională a particulelor celulare și subcelulare decurge foarte lent (tab 2.1).

Tabelul 2.1. Timpul de sedimentare naturală al diferitelor particule

Tipul particulei	Diametrul particulei [μm]	Suprafața specifică [m ² /m ³]	Durata de sedimentare
Bacterii	1	6 000 000	8 zile
Coloizi	0,1	60 000 000	2 ani
	0,01	600 000 000	20 ani
	0,001	6 000 000 000	200 ani

Flocularea este definită ca fiind fenomenul de agregare a particulelor solide, indus de adaosul unui polimer, în timp ce **coagularea** se referă la o agregare indusă de

către forțe de atracție electrostatice sau de tip van der Waals care apar între particule (fig. 2.1) [12]. **Agregarea** celulelor a fost definită drept aglomerarea acestora în scopul formării unor asociații multicelulare stabile și consistente, sub influența anumitor condiții fiziologice [13].

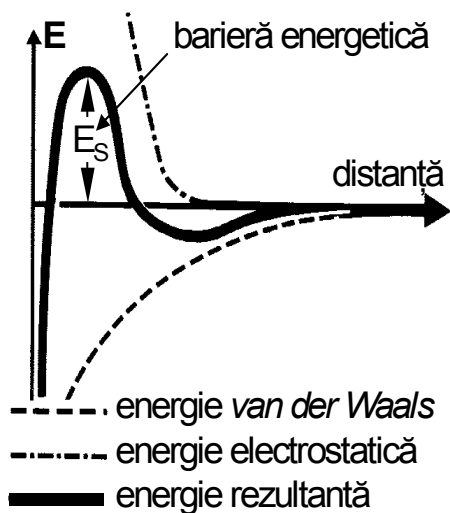


Figura 2.1. Diagrama energetică a suspensiilor coloidale

Din punctul de vedere al inginerului biotehnolog, distincția dintre coagulare, agregare, floclare și aglomerare, nu este întotdeauna clară. Cuvinte ca: *agregate*, *flocoane*, *aglomerate*, *cluster*, sunt deseori utilizate drept sinonime. Ele se referă la un ansamblu de celule individuale, format din celule inițial libere sau prin absența dispersiei celulare, sub influența anumitor condiții fiziologice, sau după adăugarea anumitor agenți în mediu.

În fig. 2.2 se prezintă două din mecanismele principale care produc aglomerarea celulelor. În primul caz (fig. 2.2 a) aglomerarea se datorează formei naturale a celulelor, care

prezintă diverși apendici. Acești apendici depășesc bariera energetică (reprezentată punctat) care ține la distanță celulele, permițându-le astfel apropierea și asociere. În al doilea caz, agentul de floclare (polimerul reprezentat prin linia curbă) se atașează de celulă (fig. 2.2 b). Dacă tăria ionică a soluției este suficient de scăzută, raza de repulsie (bariera energetică reprezentată punctat) se micșorează, permițând formarea punților de polimer între celule (fig. 2.2 c).

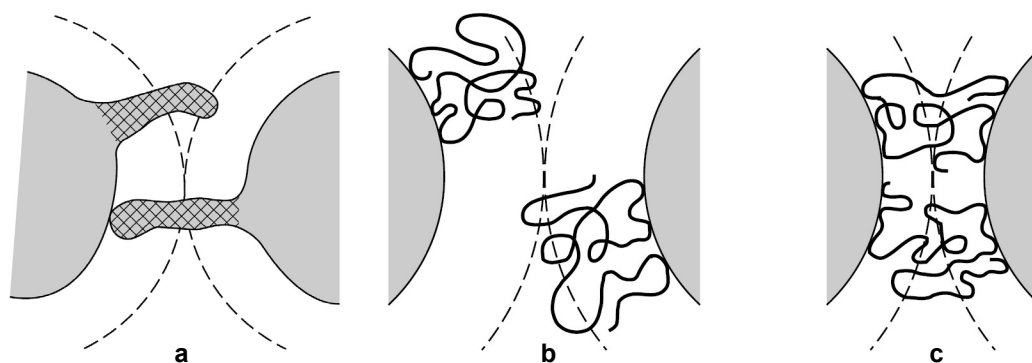


Figura 2.2. Mecanisme principale de aglomerare a celulelor:

a – prin apendici; b, c – prin punți de polimer

În cazul separării celulelor prin centrifugare, floclarea ar trebui să conducă la formarea unor flocoane cu rezistență mecanică sporită. În producerea microalgelor, metoda cea mai economică de recoltare s-a dovedit a fi floclarea chimică urmată de sedimentare, flotație sau filtrare [14].

Pentru aglomerare se pot utiliza particule coloidale, săruri, polimeri solubili, sau combinații ale acestora. Eficiența aglomerării poate fi hotărâtor influențată de tăria ionică a soluției. La creșterea tăriei ionice, eficiența aglomerării scade dramatic.

Celulele de *Saccharomyces cerevisiae* formează flocoane în prezența particulelor submicronice de $\text{Al}(\text{OH})_3$ încărcate pozitiv. De asemenea, pentru obținerea de flocoane din celule sau resturi celulare de *S. cerevisiae* și *Escherichia coli* se pot utiliza particule de polimer organic încărcate pozitiv (de ex. polistiren-divinilbenzen cu grupări de amoniu cuaternar la suprafață, având diametrul particulelor de $0,27\ \mu\text{m}$) [15].

Electroliții simpli favorizează coagularea particulelor prin comprimarea stratului dublu electric care înconjoară particulele coloidale. Efectul cel mai puternic îl au ionii metalici cu sarcină mare (Al^{3+} , Fe^{3+}), a căror tendință de adsorbție este mai mare. Mai mult, prin hidroliză acești ioni formează complecși polinucleari hidroxo, încărcăți pozitiv, care au capacitatea de a inversa sarcina superficială a coloizilor. Concentrația ionilor metalici trebuie să fie suficient de mare pentru a putea comprima stratul dublu electric. O supradozare poate duce însă la inversarea sarcinii particulelor coloidale și la restabilizarea lor.

Polimerii solubili folosiți pentru aglomerare sunt fie polimeri sintetici, fie biopolimeri de origine naturală. Polimerii sintetici folosiți ca floculanți pot fi anionici (acrilamide și copolimeri acizi), cationici (copolimeri ai acrilamidei cu metacrilatul sau acrilatul de dimetil-aminoetil) și neionici (poliacrilamida – PAA). Dintre aceștia, PAA și derivații săi sunt folosiți pe scară largă, datorită economicității și eficacității lor [16]. Întrucât monomerul acrilamidă are proprietăți puternic neurotoxice și cancerigene, se fac eforturi pentru găsirea unor înlocuitori mai siguri, biodegradabili, cu un impact mai redus asupra sănătății umane și asupra mediului înconjurător. Astfel, s-a constatat că anumite microorganisme (*Rhodococcus erythropolis*) provoacă flocularea celulelor de drojdii, de *E. coli*, de nămol activ, de *Microcystis aeruginosa*, etc. Procesul este efectiv la $\text{pH} = 3 \div 5$, și este considerabil îmbunătățit prin adaos de ioni de Ca^{2+} [17, 18]. Polizaharidele sintetizate și excretate de *Paecilomyces* provoacă flocularea *E. coli* la $\text{pH} = 4 \div 8$ și tării ionice de $0,0001 \div 0,1\ \text{M}$ [19].

Față de polimerii sintetici, chitosanul, un polimer natural derivat din chitină, componentul majoritar al exoscheletului crustaceelor, prezintă câteva avantaje: monomerii nu sunt toxici, poate fi sterilizat termic fără degradare, este biodegradabil. La pH acid este solubil, găsindu-se sub formă de lanțuri liniare (datorită repulsiei dintre grupările aminice încărcate electric, $-\text{NH}_3^+$), în timp ce la pH alcalin (peste 7,9, punctul de neutralizare) tinde să se încolăcească și să precipite. Chitosanul poate fi folosit în flocularea *E. coli*, *Euglena gracilis*, sau în separarea selectivă a β -D-galactozidazei de resturile celulare și acizii nucleici proveniți prin dezintegrarea celulelor de *E. coli* [20].

Utilizarea adaosurilor pentru aglomerare prezintă și o serie de dezavantaje, dintre care pot fi menționate: (1) cunoașterea insuficientă a mecanismelor care provoacă aglomerarea, ceea ce înseamnă un control redus al procesului, (2) fermentația având loc în șarje, caracteristicile suspensiei pot varia de la o șarjă la alta, astfel încât comportarea la adăugare de floculanți poate fi nepredictibilă, (3) de cele mai multe ori floculanții adăugați sunt incompatibili cu procesul de fermentare, făcându-se astfel imposibilă recircularea nutrienților neconsumați din lichidul de fermentație, (4) flocoanele formate sunt instabile, putând fi degradate prin forfecare, (5) procedura este puțin aplicabilă deșeurilor celulare, (6) apar costuri suplimentare.

Flocularea poate fi controlată și de către factori genetici. Astfel, adăugarea de amidon la o suspensie de *E. coli* a condus la formarea unor flocoane bacteriene, permițând ulterior o separare foarte eficientă a celulelor prin sedimentare. Flocularea a depins de un receptor maltoporin pentru amidon aflat la suprafața celulei. Expresia acestui receptor maltoporin poate fi controlată genetic, astfel încât prezența sa la suprafața celulei să fie independentă de proprietățile suprafeței.

Agregarea amidono-dependentă a celulelor este potențial aplicabilă și altor microorganisme care răspund următoarelor cerințe: (1) prezintă receptori pentru amidon, (2) suprafața celulară nu este mascată de un strat de proteină sau polizaharidă, (3) celula nu produce enzime amilolitice extracelulare. Utilizarea amidonului în recoltarea celulelor bacteriene oferă câteva avantaje: (1) legarea de celule este rapidă, (2) amidonul este netoxic, (3) spre deosebire de floclanții încărcăți electric, nu afectează pH-ul, iar legarea sa este efectivă în condițiile de pH în care au loc de regulă procesele de fermentație, (4) este un produs ieftin, (5) este ușor separabil de bacterii, dacă acest lucru este necesar [21].

2.2. SEPARAREA PRIN SEDIMENTARE GRAVITAȚIONALĂ

Sedimentarea gravitațională, ca proces de separare a celulelor de faza lichidă, este aplicată în diverse procese de biosinteză sau de bioseparare: (1) producerea proteinelor terapeutice sau de diagnostic din celule de mamifere, (2) atingerea unor concentrații ridicate de celule în fermentatoarele continue prin recircularea celulelor, (3) tratarea biologică a apelor uzate sau a deșeurilor, (4) producerea berii, (5) studiul diverselor tipuri de celule implicate în răspunsul imunologic, (6) recoltarea celulelor obținute în micropurtători sau în culturi celulare în suspensie [22].

Utilizarea sedimentării gravitaționale în separarea celulelor prezintă o serie de aspecte particulare, și anume:

- Sedimentarea ca proces de separare este o tehnică blândă. Acest lucru este important în biologia celulară, când capacitățile funcționale ale celulelor izolate nu trebuie alterate în timpul separării.
- Se pretează foarte bine la manipularea aseptică. Echipamentele sunt ușor de asamblat, curățat și sterilizat.
- Din punct de vedere practic, sedimentarea „neajutată” poate fi prea lentă dacă vitezele de sedimentare sunt mici. La scară industrială, durata prea mare a procesului poate periclita creșterea microbiană sau poate accelera degradări enzimatiche nedorite.
- În forma ei cea mai simplă, sedimentarea gravitațională poate fi cea mai ieftină tehnică de separare a celulelor.
- Este o operație simplă și fezabilă. Spre deosebire de centrifugare, de ex., nu necesită o pregătire specială a personalului de exploatare.

Ca regulă generală, sedimentarea gravitațională poate fi utilizată pentru separare dacă diametrul celulelor depășește 1 μm . La dimensiuni mai mici ale particulelor trebuie avute în vedere alte opțiuni: centrifugare, ultracentrifugare, filtrare, separare membranară.

Capitolul 2 – Separarea masei celulare de lichidul de fermentație

Câțiva factori mai importanți influențează sedimentarea gravitațională a celulelor într-o fază lichidă, și anume:

- diferența dintre densitatea celulei (ρ_c) și densitatea mediului lichid înconjurător (ρ_l);
- densitatea fazei lichide (ρ_l);
- mărimea, forma și concentrația celulelor;
- viscozitatea fazei lichide (μ_l).

Legătura dintre acești factori este dată de expresia vitezei de sedimentare în regim laminar ($Re < 1$), cunoscută și ca legea lui Stokes modificată:

$$v_0 = \frac{1}{18} \cdot \frac{(\rho_c - \rho_l)}{\mu_l} \cdot d_c^2 \cdot g \quad (2.1)$$

În care d_c reprezintă diametrul celulelor, iar g accelerația gravitațională, ceilalți termeni având semnificația prezentată anterior. Pentru mărirea vitezei de sedimentare se poate acționa prin mărirea diferenței de densitate între celule și faza lichidă, prin creșterea mărimii particulelor care sedimentează (floculare, coagulare, agregare), sau prin micșorarea viscozității fazei lichide.

În multe separări la scară industrială, viteza de sedimentare a celulelor este prea scăzută, datorită faptului că celulele biologice și agregatele celulare au densități mici. Deoarece viteza de sedimentare este direct proporțională cu diferența de densitate între celule și faza lichidă, modificarea densității fazei lichide poate accelera separarea. Dacă, de ex., avem de separat un amestec de două tipuri de celule având densități diferite ($1,05 \text{ g/cm}^3$ și $1,1 \text{ g/cm}^3$), prin mărirea densității fazei lichide (care se poate realiza prin adăos de ficoll, ser bovin fetal, albumină) se mărește raportul dintre vitezele relative de sedimentare ale celor două tipuri de celule, ducând la îmbunătățirea separării (fig. 2.3). Pornind de la această observație se poate utiliza un gradient de densitate în faza lichidă în care are loc sedimentarea, realizându-se așa-numita „sedimentare izocinetică”.

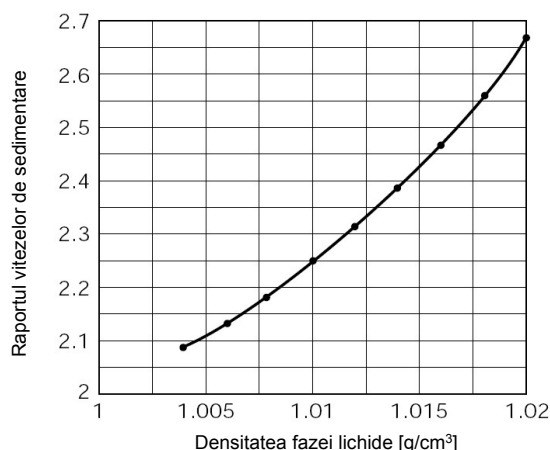


Figura 2.3. Efectul densității fazei lichide asupra raportului vitezelor de sedimentare

Tabelul 2.2. Distanța parcursă în timp de 1 h de o particulă sferică ($\rho_c = 2,0 \text{ g/cm}^3$) printr-un lichid ($\rho_l = 1,0 \text{ g/cm}^3$) la 298 K

Raza particulei [nm]	Distanța parcursă
0,1	0,08 nm
1,0	8 nm
10	0,8 μm
100	80 μm
1000	8 mm

În tab. 2.2 s-a calculat distanța ipotetic parcursă într-o oră de o celulă sferică cu densitatea de $2,0 \text{ g/cm}^3$ care sedimentează într-un lichid de densitate $1,0 \text{ g/cm}^3$. Datele

din tab. 2.3 oferă o idee asupra dimensiunilor tipice ale diverselor tipuri de celule întâlnite în practică.

Tabelul 2.3. Dimensiuni tipice ale unor celule

Tipul de celulă	Dimensiuni [nm]
Virusi bacterieni	0,08
Bacterii	0,1 – 2,5
Celule de drojdie	2 – 10
Globule roșii umane (eritrocite)	6 – 8
Globule albe umane (leucocite)	8 – 12
Fungii filamentoase	10 – 40
Celule de ficat uman	30
Celule vegetale	10 – 100
Protozoare (paramecium, didinium)	100 – 200

Teoretic, viteza de sedimentare este direct proporțională cu pătratul diametrului celulelor. Orice mărire a diametrului agregatelor celulare va duce la creșterea considerabilă a vitezei de sedimentare. Creșterea reală nu este cea dată de legea lui Stokes, ci mai redusă: în cazul agregatelor celulare poroase de nămol activat s-a constatat o mărire a vitezei de sedimentare proporțională cu $d^{0,55}$ [23].

Viteza de sedimentare este invers proporțională cu viscozitatea fazei lichide. Întrucât viscozitatea nu variază liniar cu concentrația, o diluare cu 25 – 50% poate conduce la o descreștere mai mare a viscozității, ducând la creșterea vitezei de sedimentare. Dacă dimpotrivă se dorește încetinirea sedimentării celulelor, se pot adăuga în faza lichidă substanțe care măresc viscozitatea (de ex., soluții de 4% dextran cu masa moleculară medie de 500 kDa).

În aplicațiile industriale, sedimentarea gravitațională se realizează de regulă în rezervoare de sedimentare specifice. Acestea sunt prevăzute cu un racord de alimentare, un racord de evacuare sau de preaplin și un racord pentru evacuarea materialului sedimentat. Există și alte echipamente care pot fi foarte eficiente în anumite situații. Un astfel de echipament, care utilizează un dispozitiv înclinat, format din plăci paralele, este redat în fig. 2.4 [24]. Acest dispozitiv este utilizat pentru recircularea celulelor în procesele continue de cultură a celulelor sau de fermentare. Concepția aparatului permite nu numai obținerea unor densități ridicate de masă celulară în fermentator, ci și o modalitate eficientă de reținere selectivă a celulelor.

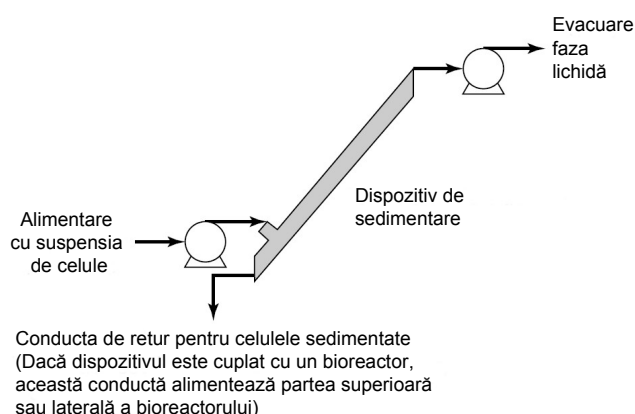


Figura 2.4. Dispozitiv înclinat pentru sedimentarea celulelor

2.3. SEPARAREA PRIN FILTRARE

În filtrare, particulele solide sunt separate din amestecul solid-fluid, forțând fluidul să treacă printr-un material sau strat filtrant care reține particulele solide. Solidele rămân pe filtru sub forma unei turte de filtrare, opunând o rezistență suplimentară procesului ulterior de filtrare.

2.3.1. Mecanismul filtrării

Ca operație unitară, filtrarea este rezultatul a trei procese elementare [25]: (1) **sedimentarea** – proces prin care particulele solide se depun pe stratul/suprafața filtrantă ca într-un decantor, (2) **cernerea** – sunt reținute acele particule solide care au dimensiuni mai mari decât dimensiunile porilor stratului/suprafeței filtrante, (3) **adsorbția** – particulele mai mici decât deschiderea porilor stratului/suprafeței filtrante sunt reținute prin forțe de suprafață în interiorul porilor, provocând colmatarea (înfundarea) filtrului. În funcție de proprietățile materialului filtrant, unul dintre aceste procese elementare poate deveni determinant în filtrare, astfel încât putem vorbi despre filtrare în adâncime, filtrare superficială, filtrare cu efect de sită [26].

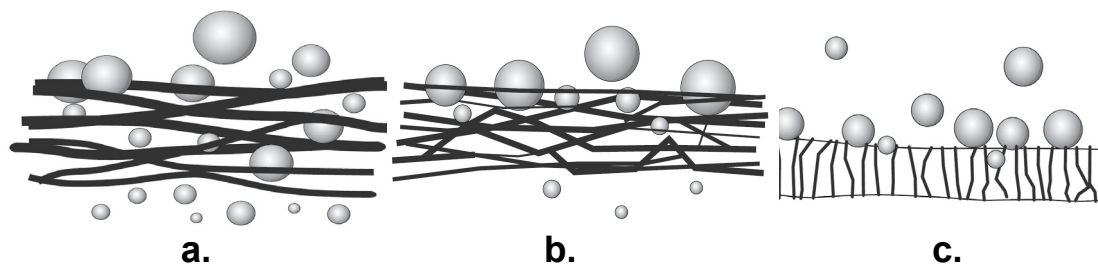


Figura 2.5. Tipuri de filtrare în conformitate cu mecanismul filtrării:
a – filtrare în adâncime; b – filtrare superficială; c – filtrare cu efect de sită

Filtrele în adâncime (fig. 2.5 a) sunt constituite din materiale fibroase, granulare sau sinterizate care produc o structură poroasă aleatoare. Când o suspensie traversează filtrul, particulele solide devin captive în structura tortuoasă a canalelor de curgere. Particulele sunt reținute prin adsorbție aleatoare și capturare mecanică în matricea materialului filtrant. Astfel de filtre se confecționează din bumbac, rayon, polipropilenă, celuloză sau fibră de sticlă.

Filtrele superficiale (fig. 2.5 b) sunt constituite din mai multe straturi suprapuse de sticlă sau microfibre polimerice. În timpul filtrării, particulele mai mari decât spațiile din matricea filtrului sunt reținute în special la suprafața filtrului. Particulele mai mici pot fi capturate în interiorul matricii. Particulele mari sunt reținute ca urmare a efectului de sitare, cele mici fiind reținute prin adsorbție aleatoare și capturare mecanică. Filtrele superficiale se confecționează din materiale polimerice, hârtie armată cu rășini sau cu fibră de sticlă.

Filtrele sită (fig. 2.5 c) au o matrice poroasă cu structură geometrică regulată, în care particulele sunt reținute ca urmare a efectului de cernere. Particulele mici și

microorganismele mai mari decât dimensiunile porilor sunt reținute la suprafață. Procesul de filtrare este absolut, întrucât nici o particulă mai mare decât diametrul porilor filtrului nu este lăsată să treacă. Astfel de filtre sunt membranele utilizate în separările submicronice și macromoleculare din biotehnologii. Structura materialului filtrant este mai rigidă, iar fabricarea acestor materiale este mai bine controlată decât în cazul altor tipuri de filtre.

Față de suprafața filtrantă faza fluidă poate curge perpendicular sau tangențial. La curgerea perpendiculară (fig. 2.6 b) particulele solide se depun pe suprafața filtrantă, grosimea stratului depus crește în timpul filtrării, opunând o rezistență din ce în ce mai mare la curgere. La un moment dat rezistența stratului de precipitate depus este atât de mare încât filtrarea devine neeconomică și este necesară îndepărtarea particulelor depuse, curățirea și regenerarea suprafeței filtrante. Această modalitate de filtrare este întâlnită în majoritatea echipamentelor clasice de filtrare și se numește „filtrare fără ieșire” (dead-end filtration). La curgerea tangențială (fig 2.6 a) fluidul care înaintază paralel cu suprafața filtrantă provoacă forfecări care limitează creșterea stratului de precipitat. Această modalitate de filtrare este întâlnită în procesele de separare prin membrane și se numește „filtrare în curent încrucișat” (cross flow filtration). O mică parte a fluidului alimentat traversează membrana, formând așa-numitul *filtrat* sau *permeat*; restul fluidului este reținut sub formă de *retenat* sau *concentrat*. Retenatul este recirculat peste membrană până când acesta îndeplinește condițiile cerute de concentrație [27].

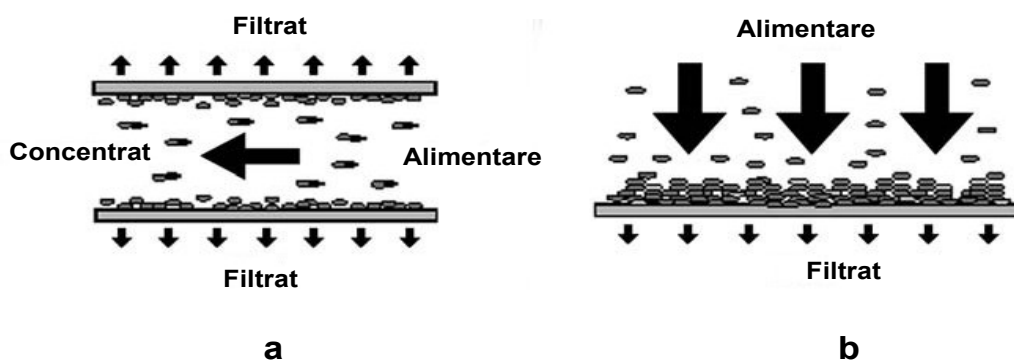


Figura 2.6. Reprezentarea schematică a filtrării:

- a – curgere tangențială pe suprafața filtrantă (cross-flow filtration)
- b – curgere perpendiculară pe suprafața filtrantă (dead-end filtration)

Ușurința filtrării depinde de proprietățile solidului și ale fluidului; separarea prin filtrare a solidelor cristaline necompresibile din lichide cu viscozitate redusă este o operație relativ simplă. Separarea prin filtrare a masei celulare de lichidele de fermentație este în schimb o operație dificilă, atât din cauza dimensiunilor reduse ale celulelor, cât și din cauza comportării nenumtoniene a lichidelor de fermentație. Factorul determinant îl reprezintă însă natura masei celulare; aceasta poate avea caracter fibros, mucilaginos sau de pastă. Majoritatea celulelor microbiene formează precipitate compresibile, a căror porozitate scade pe măsură ce filtrarea avansează.

2.3.2. Teoria filtrării. Posibilități de îmbunătățire a filtrării

Filtrarea este o operație care decurge în regim dinamic, nestaționar. Întrucât procesul de filtrare este influențat de un număr foarte mare de factori, o teorie a filtrării simplă și concomitent utilă din punct de vedere practic nu poate fi dezvoltată. Teoriile simple existente (teoria filtrului ideal, teoria filtrării prin stratul de precipitat, teoria filtrării prin stratul de precipitat cu luarea în considerare a suportului), completate cu determinări experimentale, servesc la proiectarea filtrelor și la conducerea rațională a filtrării.

În conformitate cu teoria filtrării prin stratul de precipitat cu luarea în considerare a suportului [25], în cazul filtrării la cădere de presiune constantă volumul specific de filtrat poate fi determinat pe baza ecuației:

$$V_s^2 + 2\alpha \cdot V_s = \beta \cdot t \quad (2.2)$$

în care V_s [m^3/m^2] este volumul de filtrat V [m^3] care în timpul t [s] trece printr-un m^2 de suprafață filtrantă, α este coeficientul de rezistență al materialului filtrant [m^2/s], iar β este coeficientul de rezistență al precipitatului [m^3/m^2]. Dacă rezistența materialului filtrant este mult mai mică decât rezistența stratului de precipitat, iar stratul de precipitat este incompresibil, ecuația (2.2) devine [4]:

$$V_s^2 = \left(\frac{V}{A} \right)^2 = \beta \cdot t = \frac{2 \cdot \Delta P}{\mu \cdot r \cdot C_s} \cdot t \quad (2.3)$$

în care V [m^3] este volumul de filtrat colectat în timpul t [s], A este aria suprafeței filtrante [m^2], ΔP este diferența de presiune de pe fețele filtrului [Pa], μ este viscozitatea fazei lichide [Pa.s], r este rezistența specifică a stratului de precipitat [m/kg], iar C_s este conținutul de fază solidă din suspensia supusă filtrării [kg/m^3].

Rezistența specifică a stratului de precipitat este independentă de ΔP dacă precipitatul este incompresibil. Pentru precipitate compresibile:

$$r = r' \cdot (\Delta P)^s \quad (2.4)$$

s reprezentând compresibilitatea precipitatului. Compresibilitatea are valoarea 0 pentru precipitate rigide, incompresibile și apropiată de 1 în cazul materialelor puternic compresibile, așa cum sunt cele rezultate la filtrarea lichidelor de fermentație. Rezistența specifică a stratului de precipitat este funcție de proprietățile particulelor din strat:

$$r = \frac{\varphi \cdot \sigma^2 \cdot (1 - \varepsilon)}{\varepsilon^3 \cdot \rho_p} \quad (2.5)$$

unde φ este factorul de formă al particulelor [adimensional], σ este suprafața specifică a particulelor [m^2/m^3], ε este porozitatea (fracția de goluri) a stratului de precipitat [m^3/m^3], iar ρ_p este densitatea particulelor [kg/m^3]. Pentru precipitatele compresibile, atât ε cât și φ sunt funcție de căderea de presiune prin strat.

Viteza filtrării este exprimată uzual prin debitul de filtrat colectat. Ecuația (2.3) pusă sub forma (2.6):

$$m_V = \frac{V}{t} = \frac{2 \cdot A^2 \cdot \Delta P}{\mu \cdot r \cdot C_s \cdot V} \text{ [m}^3\text{/s]} \quad (2.6)$$

ne arată că debitul de filtrat (m_V) este direct proporțional cu pătratul ariei suprafeței filtrante, și este invers proporțional cu rezistența specifică a stratului de precipitat, viscozitatea fazei lichide, volumul și concentrația suspensiei. Pe baza acestei ecuații se pot stabili o serie de măsuri care pot fi luate pentru îmbunătățirea procesului de filtrare al unei suspensii date [3]:

- *Creșterea ariei suprafeței filtrante, A.* Deși viteza de filtrare crește cu pătratul suprafeței filtrante, creșterea lui A necesită instalarea unor echipamente mai mari, mărindu-se astfel cheltuielile de investiții.
- *Creșterea valorii diferenței de presiune pe fețele filtrului, ΔP .* Soluția este valabilă numai în cazul precipitatelor necompresibile. În cazul precipitatelor compresibile sau a precipitatelor cristaline sub formă de ace sau plăci, creșterea ΔP va conduce la înrăutățirea filtrării. Pentru precipitatele compresibile (cum sunt marea majoritate a precipitatelor obținute din suspensii de masă celulară), este necesară reducerea compresibilității precipitatului, prin adăugare de adjuvanți de filtrare.
- *Reducerea masei precipitatului, $C_s = m_p/V$.* La filtrarea în filtre rotative continue, acest lucru se realizează prin reducerea grosimii stratului de precipitat depus pe tambur la fiecare rotație a acestuia și prin plasarea racletei care îndepărtează precipitatul cât mai aproape de tambur, astfel încât pe pânza filtrantă să rămână un strat de reziduu solid minim.
- *Reducerea viscozității fazei lichide, μ .* Dacă viscozitatea inițială a suspensiei este foarte ridicată, diluarea poate conduce la reducerea viscozității. Nu se recomandă reducerea viscozității prin mărirea temperaturii suspensiei, deoarece majoritatea lichidelor de fermentație nu suportă temperaturi ridicate fără o degradare termică a produselor.
- *Reducerea rezistenței specifice a stratului de precipitat, r .* Pe baza ecuației (2.5), mijloacele posibile de micșorare a valorii lui r sunt:
 - *Creșterea porozității, ε .* Porozitatea scade pe măsură ce are loc filtrarea celulelor. Reducerea acestui efect se poate realiza utilizând adjuvanți.
 - *Reducerea valorii factorului de formă, ϕ .* În cazul suspensiilor de micelii, morfologia celulelor se poate schimba modificând condițiile de fermentare.
 - *Reducerea suprafeței specifice a particulelor, σ .* Creșterea dimensiunilor medii ale particulelor și minimizarea variațiilor în mărimea particulelor conduce la scăderea lui σ . Acest efect se poate atinge prin schimbarea condițiilor de fermentare sau prin condiționarea suspensiei (adaosuri de floclanți și/sau coagulanți) înainte de filtrare.

2.3.3. Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare

Filtrarea lichidelor de fermentație care conțin masă celulară cu caracter fibros (culturi de funghi din clasele *Aspergillus* și *Penicillium*) este o operație relativ ușoară, miceliul necolmatând materialul filtrant și desprinzându-se ușor de pe acesta. La nivel

de operare industrială se recomandă filtrele rotative cu vid (filtrele Oliver), echipamente care conferă o suprafață mare de filtrare, posibilități de spălare a miceliului pe filtru pentru recuperarea avansată a produselor utile și în plus se pretează la automatizare [3, 4].

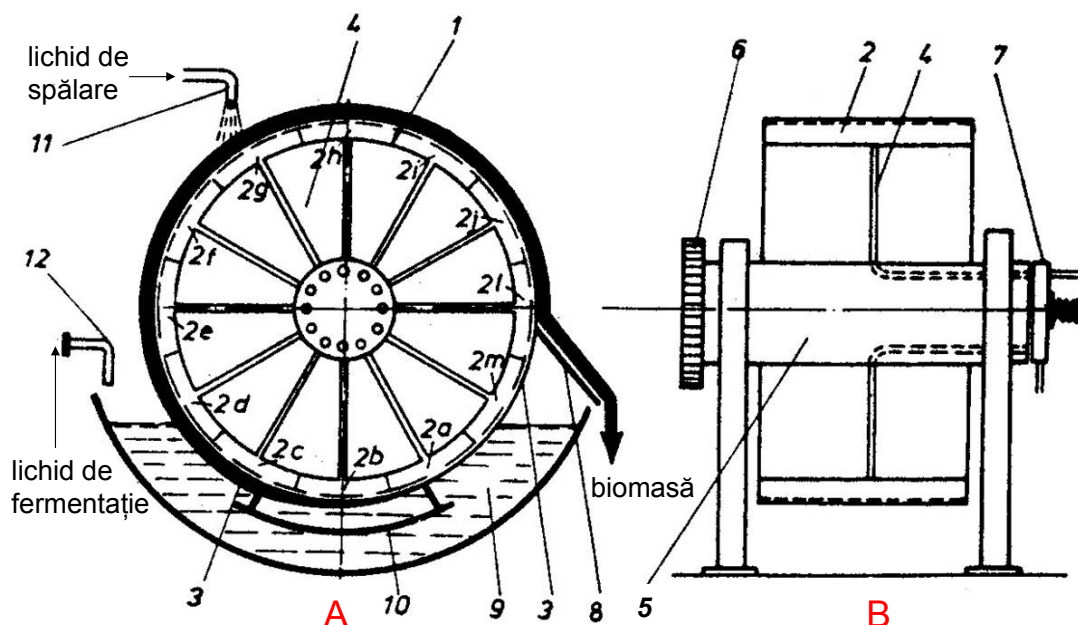


Figura 2.7. Filtru celular rotativ cu vid (Oliver)

A – secțiune transversală; B – secțiune longitudinală

1 – tambur rotativ; 2 – celule; 3 – material filtrant; 4 – tuburi de legătură între celule și capul de distribuție; 5 – arbore; 6 – roată dințată de acționare; 7 – cap de distribuție; 8 – racletă pentru desprinderea precipitatului; 9 – cuvă; 10 – agitator pendular; 11 – racord pentru alimentarea lichidului de spălare; 12 – racord pentru alimentarea lichidului de fermentație (suspensia de masă celulară).

Un filtru rotativ cu vid (fig. 2.7) este alcătuit dintr-un tambur rotativ (1) cu lungimea de 1 – 4,5 m și diametrul de 0,5 – 3 m, construit din 2 cilindri orizontali coaxiali. Tamburul se rotește lent (0,1 – 2 rpm) fiind pațial imersat într-o cuvă (9) în care este alimentat și agitat (10) lichidul de fermentație. Cilindrul exterior este perforat și acoperit cu material filtrant (3), iar spațiul dintre cilindri este împărțit, prin pereți radiați, în 6 – 12 celule etanșe (2) care funcționează succesiv și independent ca niște filtre nuce. Celulele sunt legate, prin intermediul unui cap de distribuție (7) și a tuburilor de legătură (4), de conductele de vid sau aer comprimat. Suprafața tamburului este împărțită în mai multe zone corespunzătoare operațiilor de filtrare (a – d), deshidratare (e, f), spălare (g), deshidratare după spălare (h – j), îndepărtare a stratului de miceliu (l) și regenerare a suprafeței filtrante (m). În timpul unei rotații a tamburului, fiecare celulă trece succesiv prin toate aceste zone. Capul de distribuție asigură crearea vacuumului în zonele de filtrare (a – d), spălare (g) și deshidratare (e, f, h – j) și insuflarea de aer comprimat în zonele de îndepărtare a miceliului de pe filtru (l) și dezobturare a porilor suprafeței filtrante (m). Tamburul (1) are un grad diferit de scufundare în lichidul de fermentație supus filtrării, în funcție de caracterul stratului filtrant și de necesitățile de spălare și uscare. În obținerea antibioticelor, de ex., se utilizează filtre a căror adâncime de scufundare a tamburului este de până la 50 % [28]. Dacă produsul util este localizat

numai în faza lichidă, spălarea masei celulare după filtrare nu este o operație dificilă. Debitul și amplasarea jeturilor de apă de spălare trebuie alese astfel încât să se evite diluarea excesivă a filtratului. Miceliul de pe materialul filtrant se îndepărtează cu ajutorul racletei (8).

Dintre dezavantajele filtrului celular rotativ cu vid se pot menționa:

- etanșarea defectuoasă a celor două discuri ale capului de distribuție;
- griparea suprafeței șlefuite a discurilor prin particole de solid scăpate în filtrat;
- spălarea insuficientă a biomasei, datorită depunerii sale într-un stat cu grosime inegală, sau prin apariția fisurilor în stratul de biomasă depus;
- eliminarea nesatisfăcătoare a apei în faza de desecare a precipitatului de biomasă;
- evacuarea defectuoasă a biomasei cu ajutorul racletei de desprindere.

Aceste deficiențe au fost eliminate prin construcția unor utilaje mai performante, cum ar fi filtrul Oliver perfecționat (fig. 2.8) [25]. Acesta utilizează un cap de distribuție care elimină frecările între suprafețele metalice. Suprafața și grosimea biomasei depuse pe filtru sunt uniformizate cu ajutorul unui dispozitiv cu rulouri care conduc o pânză cu rol de egalizare a grosimii, stoarcere și astupare a fisurilor în stratul de precipitat. În locul pânzei se poate folosi un rulo de presare, apa din precipitat fiind îndepărtată mai bine. Desprinderea precipitatului se poate face atât cu ajutorul racletei, cât și prin intermediul sforilor, lanțurilor sau a unor rulouri de preluare din cauciuc.

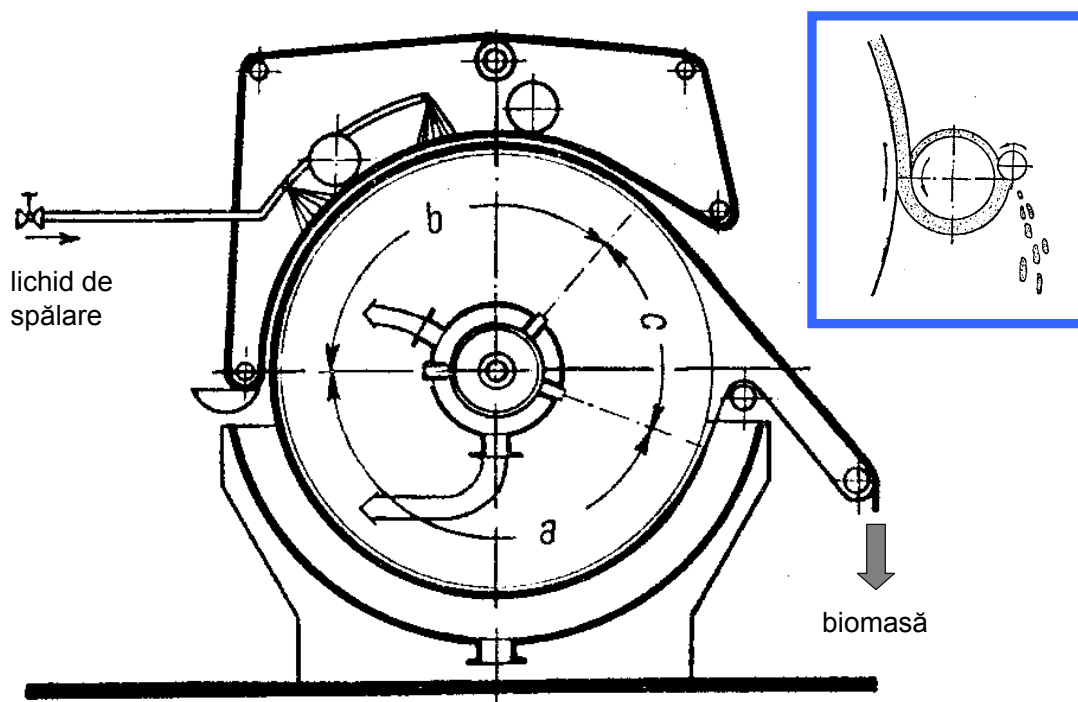


Figura 2.8. Filtru rotativ celular cu vid perfecționat

a – zonă de filtrare; b – zonă de spălare; c – zonă de desprindere a precipitatului.

În medalion: desprinderea precipitatului cu ajutorul ruloului de preluare

Dimensionarea filtrelor se bazează pe stabilirea suprafeței necesare de filtrare, A . În cazul filtrelor aflate curent în exploatare, aceasta variază între 5 și 40 m² [4, 25].

Capitolul 2 – Separarea masei celulare de lichidul de fermentație

Pentru o durată t a filtrării impuse, cunoscându-se forța motoare a filtrării (ΔP), caracteristicile suspensiei și ale precipitatului, aria filtrului în funcție de debitul de suspensie prelucrat se determină pe baza ecuației (2.3). Pentru precipitate compresibile, valoarea V_S obținută prin calcul se corectează prin înmulțire cu coeficienții K_1 și K_2 :

$$(V_S)_{corectat} = K_1 \cdot K_2 \cdot (V_S)_{calculat} \quad \text{unde: } K_1 = \sqrt{\frac{50}{C_S}}; \quad K_2 = \sqrt{\Delta P} \quad (2.7)$$

Pentru filtrele rotative continue, t reprezintă durata unui ciclu de filtrare, putându-se calcula cu relația:

$$t = \frac{1}{n} \cdot \frac{\Phi}{100} \quad [\text{s}] \quad (2.8)$$

în care n reprezintă turația filtrului (s^{-1}), iar Φ reprezintă gradul de scufundare al filtrului în mediul supus filtrării (%).

Viteza de filtrare se determină în funcție de volumul de filtrat obținut pe unitatea de suprafață de filtrare într-un ciclu de filtrare:

$$v_f = \frac{(V_S)_{corectat}}{t} \quad [\text{m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{s})] \quad (2.9)$$

Valorile vitezei de filtrare calculate în acest mod sunt apropiate de valorile experimentale prezentate în tab. 2.4 [4].

Tabelul 2.4. Viteza de filtrare a unor lichide de fermentație [4]

Lichid de fermentație (produs)	C_S [kg/m ³]	Caracteristicile filtratului		Tipul filtrului	v_f [L/(m ² ·h)]
		μ [Pa.s]	r [m/kg]		
<i>Penicillium</i> (peniciline G și V)	50	10,3	$3,1 \cdot 10^{11}$	filtru rotativ cu vid filtru rotativ cu strat adjuvant	238 - 256 1413 - 1848
<i>Streptomyces</i>	28	3,92	$1,6 \cdot 10^{14}$	filtru presă	12,5
<i>S. kanamyceticus</i> (kanamicina)				filtru rotativ cu strat adjuvant	87
<i>S. fradiae</i> (neomicina)				filtru rotativ cu strat adjuvant	130
<i>S. lincolnensis</i> (lincomicina)	18,5	9,8	$3,5 \cdot 10^{12}$	filtru presă filtru rotativ cu strat adjuvant	58 380
<i>Bacillus subtilis</i> (proteaze)				filtru rotativ cu strat adjuvant	109 - 435
Hidrolizat de drojdii				filtru rotativ cu strat adjuvant	304

Tabelul 2.5. Viteza de filtrare a lichidelor de fermentație a *P. Chrysogenum* ($\Delta P = 0,054 \text{ MPa}$, $\Phi = 40 \%$)

r [m/kg]	Viteza medie de filtrare, v_f [L/((m ² ·h)] la				
	$n = 1 \text{ rpm}$	$n = 2 \text{ rpm}$	$n = 3 \text{ rpm}$	$n = 4 \text{ rpm}$	$n = 5 \text{ rpm}$
$2 \cdot 10^{11}$	1140	740	617	530	407
$3 \cdot 10^{11}$	875	615	500	342	390
$5 \cdot 10^{11}$	606	432	356	306	375

În funcție de viteza de filtrare se determină turația optimă a tamburului, la diferite valori ale rezistenței precipitatului depus (r) și ale gradului de scufundare a filtrului în suspensie (Φ). În tab. 2.5 este prezentată dependența dintre viteza de filtrare, r și Φ pentru filtrarea lichidelor de fermentație ale *P. Chrysogenum*, la biosinteza penicilinelor G și V.

Pentru capacități de producție mici se pot utiliza și filtrele presă, care acumulează treptat biomasa și sunt deschise periodic pentru îndepărtarea precipitatului. Aceste filtre sunt operate în regim discontinuu și de regulă îndepărtarea precipitatului este operația cea mai costisitoare și mai greoaie, necesitând munca manuală. Recent au fost introduse în practică filtrele presurizate Larox, care funcționează în regim pseudocontinuu și se pretează la automatizare pe scară largă.

Un astfel de filtru este alcătuit din mai multe unități de filtrare identice (fig. 2.9), amplasate pe înălțime, prin care trece o bandă filtrantă fără sfârșit ghidată prin intermediul unor role de capăt. Fiecare unitate de filtrare este alcătuită din trei camere amplasate una peste alta. Camera superioară este separată de camera intermediară prin intermediul unei membrane elastice, în timp ce camera intermediară este separată de camera inferioară de către pânza filtrantă.

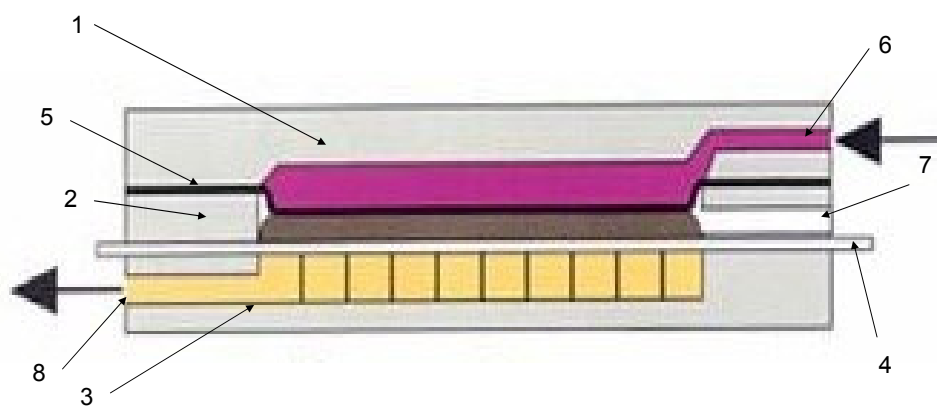


Figura 2.9. Unitate de filtrare a unui filtru presurizat Larox

1 – camera superioară; 2 – camera intermediară; 3 – camera inferioară; 4 – pânza filtrantă; 5 – membrană elastică; 6 – racord de alimentare cu apă sub presiune; 7 – racord de alimentare cu suspensie/apă de spălare/aer comprimat; 8 – racord de evacuare a filtratului.

În forma sa cea mai completă, procesul de filtrare decurge în șase etape succesive. Toate unitățile de filtrare lucrează simultan, fiecare dintre ele găsiindu-se în aceeași etapă a filtrării. În prima etapă, de filtrare propriu-zisă, se umple camera intermediară cu suspensia supusă filtrării. Sub acțiunea forței gravitaționale, faza solidă se depune pe banda filtrantă, iar lichidul trece prin aceasta, pătrunzând în camera inferioară, de unde este evacuat. În a doua etapă, de stoarcere a precipitatului, în camera superioară se introduce apă sub presiune. Aceasta deformează membrana elastică provocând stoarcerea mecanică a precipitatului aflat în camera intermediară. În a treia etapă, de spălare, în timp ce apa sub presiune este evacuată din camera superioară, în camera intermediară se introduce peste precipitat apă pentru spălarea precipitatului. Aceasta se poate colecta împreună cu filtratul sau separat. A patra etapă constă în

stoarcerea precipitatului spălat, prin pompare de apă sub presiune în camera superioară, deasupra membranei elastice. Etapa a cincea o reprezintă uscarea precipitatului. Pe măsură ce apa sub presiune părăsește camera superioară, în camera intermediară se introduce aer comprimat deasupra precipitatului. Aerul trece prin stratul depus pe filtru realizând uscarea. A șasea și ultima etapă este cea de descărcare a precipitatului. Toate unitățile de filtrare se deschid, iar pânza filtrantă execută o mișcare de deplasare fiind ghidată de rolele de capăt exterioare. La trecerea pânzei peste role, sub acțiunea forței gravitaționale, sau prin intermediul unor raclete, precipitatul se desprinde de pe pânză și cade pe un dispozitiv colector. Pânza filtrantă este spălată automat. După ce pânza filtrantă a avansat de la o unitate de filtrare la alta, unitățile se închid și se reia ciclul de filtrare. Etapele procesului de filtrare sunt redată în fig. 2.10. Principalele caracteristici ale acestor filtre sunt redată în tab. 2.6.

Tabelul 2.6. Caracteristici constructive ale filtrelor presurizate Larox [29]

	Caracteristica	Valoare
	Suprafață filtrantă	1,6 – 144 m ²
	Capacitate maximă	150 t/h substanță uscată
	Presiune de operare	max. 1,6 MPa
	Putere consumată:	
	- unități de 9,5 – 38 m ² - unități de 48 – 144 m ²	18,5 kW (5,5 – 15 kW pentru presare diafragme) 86 kW (diafragme acționate pneumatic)

Utilizarea filtrelor presurizate Larox în industria produselor de biosinteză a condus la realizarea de economii importante, în special prin creșterea gradului de recuperare al filtratului. S-au redus de asemenea cu până la 50% pierderile de miceliu, iar randamentele de recuperare au crescut de la 94 la 98 %, pe fondul scăderii costurilor de filtrare.

Separarea masei celulare din lichidele de fermentație ale bacteriilor, actinomicetelor, a hidrolizatorilor celulare se face mult mai dificil decât în cazul biomaselor fibroase. Aceasta se explică prin caracterul mucilaginos al masei celulare care obturează rapid porii materialelor filtrante. În același timp, trebuie remarcat dezavantajul creat de nestandardizarea mediilor de cultură, manifestat prin inconstanța de la o șarjă la alta a principalilor parametri care determină filtrabilitatea: conținutul de suspensii, viscozitatea, caracteristicile biomasei, conținutul de proteine, etc [4].

Întrucât încercările de separare a antibioticelor cu schimbători de ioni direct din suspensia celulară, utilizarea centrifugelor sau a filtrelor presă nu au dat rezultatele scontate, s-a ajuns la concluzia că rezolvarea problemei filtrării lichidelor de fermentație trebuie începută cu modificarea radicală a caracteristicilor de filtrabilitate a acestora, în scopul măririi vitezei de filtrare și a pierderilor de produse utile.

În scopul măririi vitezei de filtrare, lichidele de fermentație se supun unor tratamente preliminare termice, acide sau cu alți agenți chimici, în scopul coagulării moleculelor proteice și a agregării biomasei, cu sau fără adăugarea suplimentară a unor materiale cu rol de strat adjuvant (materiale poroase obținute din diferite roci vulcanice:

perlit, supercel, dicalit, sau din resturi ale exoscheletelor diatomitelor: kieselgur). Alegerea metodei de prelucrare preliminară este determinată de caracteristicile lichidului de fermentație, de natura produsului biosintetizat (stabilitate chimică și termică), precum și de caracteristicile precipitatelor formate.

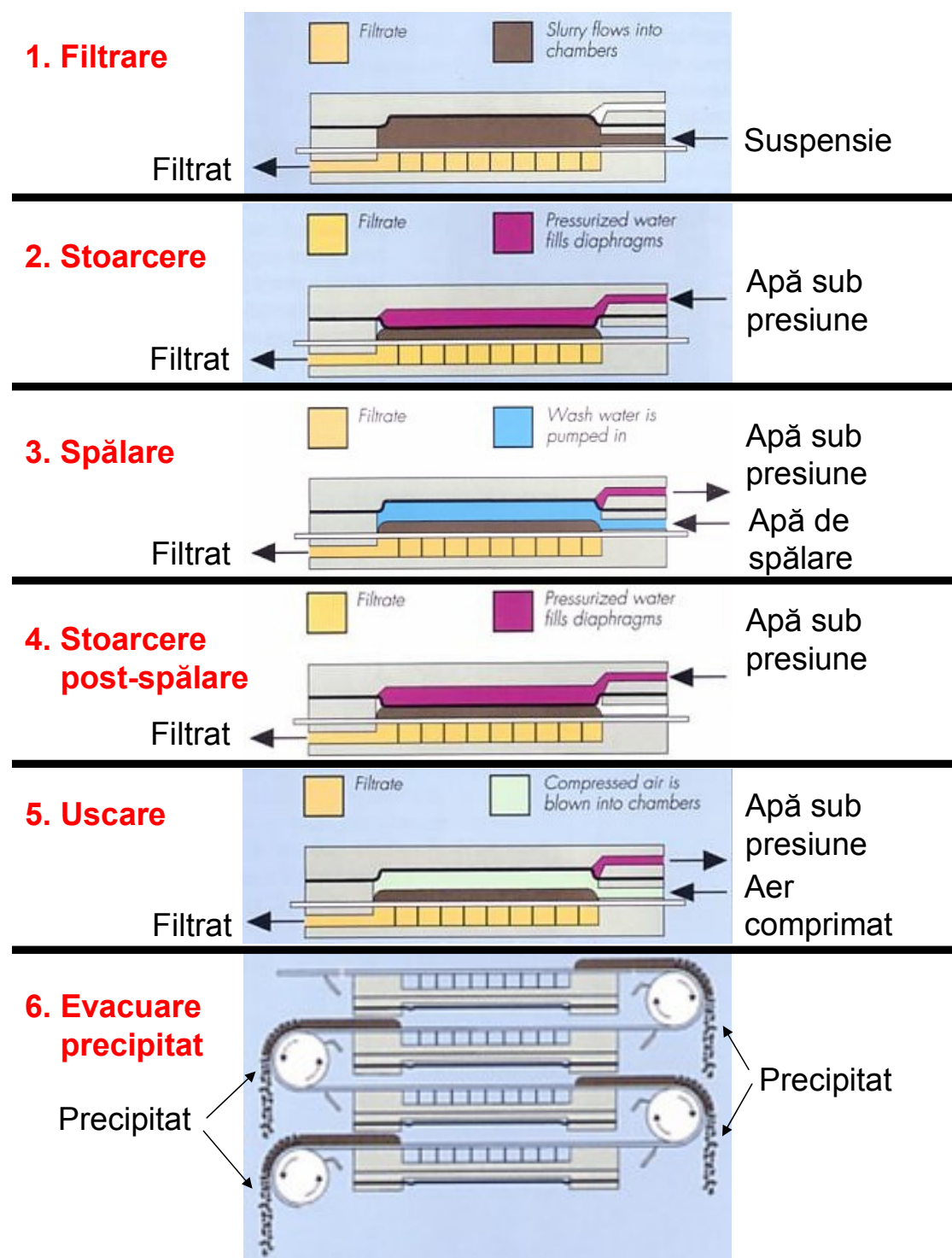


Figura 2.10. Etapele procesului de filtrare într-un filtru presurizat Larox

Adjuvanții de filtrare se pot adăuga fie înainte de filtrarea lichidului de fermentație, formând un strat care previne blocarea porilor materialului filtrant de către masa celulară fie prin amestecare directă cu lichidul de fermentație (fig. 2.11). Această ultimă metodă se recomandă doar dacă produsul util este extracelular. Adăosul de adjuvanți mărește costul filtrării, cantitatea minimă de adjuvant stabilindu-se experimental (fig. 2.12). Kieselgurul adsoarbe lichid, și ca urmare, dacă produsul util se găsește în faza lichidă, vor apărea pierderi suplimentare. Alt dezavantaj este acela că deși adjuvanții măresc viteza de filtrare, limpiditatea filtratului scade. Apar probleme suplimentare și cu depozitarea precipitatului: biomasa cu conținut de kieselgur, de ex., nu poate fi utilizată în hrana animalelor decât după îndepărtarea adjuvantului.

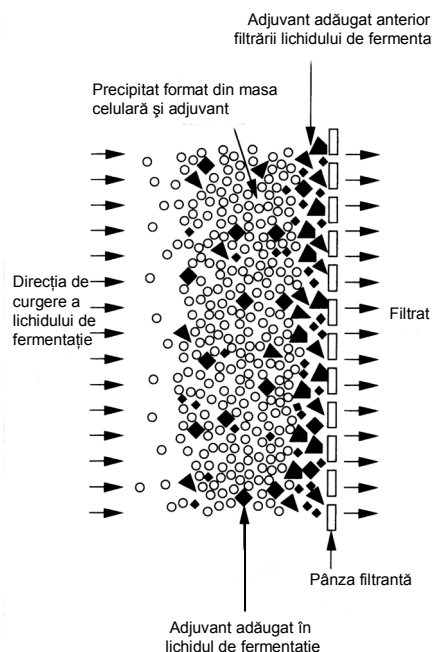


Figura 2.11. Utilizarea adjuvanților în filtrarea lichidelor de fermentație [3]

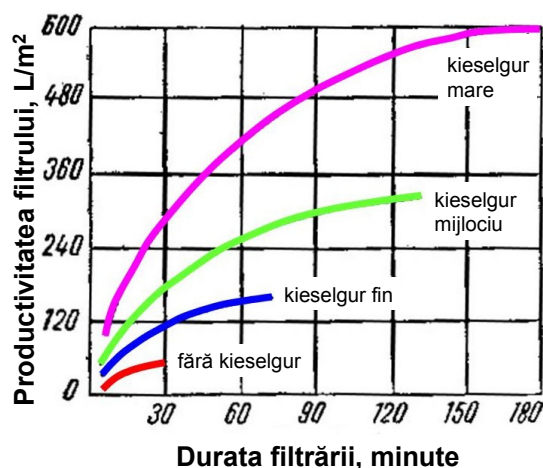


Figura 2.12. Efectul adaosului de kieselgur asupra productivității filtrării [25]

Prin coagulare, rezistența stratului depus și rezistența totală (rezistența stratului + rezistența materialului filtrant care are depunerile reținute în pori) se reduc semnificativ (cu circa 2 ordine de mărime: de la $10^{13} - 10^{14}$ la $10^{11} - 10^{12}$). Reducerea rezistențelor la filtrare a permis utilizarea filtrelor continue de tipul filtrelor rotative cu vid și cu strat adjuvant, a căror viteză de filtrare este de 100 – 300 L/(m².h) [4]. Un astfel de filtru este *filtrul cu reînnoirea suprafeței de filtrare*. Acesta este un filtru Oliver prevăzut cu un cuțit cu avansare micrometrică, care în timpul funcționării se deplasează îndepărtând biomasa depusă împreună cu stratul superficial de adjuvant.

Depunerea stratului de adjuvant (dicalit de calitate medie și grosieră) pe materialul filtrant (sită metalică cu ochiuri de 150 – 200 μm sau țesătură sintetică) se realizează înaintea începerii operației de filtrare a biomasei. În timpul depunerii adjuvantului, viteza de filtrare se reglează cu ajutorul vidului astfel încât în 45 – 60 min să se depună un strat gros de 20 – 100 mm. Apoi se reglează viteza de înaintare a cuțitului micrometric, care să corespundă unei deplasări de 0,15 – 0,45 mm în timpul

unei rotații complete a tamburului. În cuva filtrului se introduce lichidul de fermentație, în prealabil tratat chimic sau termic, și se filtrează până când pe suprafața tamburului rămâne un strat de adjuvant cu grosimea de 5 – 8 mm. Un ciclu de filtrare durează 6 – 24 h. Durata ciclului de filtrare se poate calcula cu relația:

$$t = \frac{h_i - h_f}{60 \cdot h \cdot n} \quad (2.10)$$

în care t este durata ciclului de filtrare [h], h_i și h_f sunt respectiv grosimea inițială și finală a stratului de adjuvant [mm], h este adâncimea pătrunderii cuțitului micrometric la o rotație a tamburului [mm], iar n este turația tamburului [rot/min].

Turația tamburului influențează semnificativ procesul de filtrare. O dublare a turației, de la 0,5 la 1,0 rot/min conduce la dublarea aproape a vitezei de filtrare. Cea mai importantă creștere a vitezei de filtrare pentru biomasele bacteriene și actinomicetice se produce la turații de 0,5 – 0,66 rot/min. La mărirea turației de la 0,66 la 1,0 rot/min, ritmul de creștere a vitezei de filtrare se diminuează, iar consumul de adjuvant crește cu 0,1%. Nu se recomandă creșterea turației peste 1,0 rot/min întrucât stratul de biomasă nu se deshidratează suficient, datorită micșorării duratei etapelor de uscare [4].

2.4. SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

Centrifugarea este o tehnică de lucru care permite realizarea unor procese de separare (sedimentare, filtrare, spargerea emulsiilor, extracție, etc.) într-un câmp de forțe centrifugal, procese care uneori sunt dificil sau chiar imposibil de realizat numai sub acțiunea gravitației. Acest capitol tratează numai procesele și aplicațiile referitoare la sedimentarea în câmp de forțe centrifugal.

În biotehnologii, centrifugarea are numeroase aplicații: separarea masei celulare din lichidele de fermentație, îndepărtarea resturilor celulare, colectarea precipitatelor, prepararea unor medii de fermentare, separarea diferitelor tipuri de celule, extracția diverșilor componenți (alcaloizi, arome, uleiuri esențiale din plante, antibiotice din lichidul de fermentație, steroizi, proteine), etc. Prima aplicație a separării centrifugale în industria alimentară a fost în procesul de smântânire a laptelui, iar în biotehnologie la recoltarea masei celulare în fabricarea drojdiei de panificație.

2.4.1. Bazele teoretice ale sedimentării în câmp de forțe centrifugal

Forța centrifugă, ca și gravitația este o forță masică. Dacă o particulă de masă m se rotește cu o viteză unghiulară ω la o rază r față de centrul de rotație, asupra acesteia se manifestă o forță centrifugă $F_C = m\omega^2 r$ orientată în direcție radială. Prin analogie cu expresia forței gravitaționale, $F_G = mg$, accelerația centrifugală este $\omega^2 r$. În centrifugele de sedimentare, $\omega^2 r \gg g$, astfel încât forțele gravitaționale se pot neglija. Raportul dintre forța centrifugă și forța gravitațională:

$$z = \frac{F_C}{F_G} = \frac{m \cdot \omega^2 \cdot r}{g} \quad (2.11)$$

denumit și factor de eficacitate, este utilizat deseori ca o măsură a puterii de separare a unei centrifuge.

Forța centrifugă este suficient de mare pentru a contracara forțele browniene de difuziune, care, în sedimentarea gravitațională, încetinesc sau chiar împiedică depunerea particulelor foarte fine. Deoarece eficiența separării este în principal afectată de comportarea celor mai mici particule din sistem, iar aceste particule au de obicei numere Reynolds mici (deplasarea lor fiind în domeniul curgerii viscoase), se poate considera că sedimentarea decurge în regim laminar, iar deplasarea acestor particule decurge în conformitate cu legea lui Stokes. În conformitate cu aceasta, viteza de sedimentare a particulelor sferice în câmp de forțe centrifugal este:

$$v_{0C} = \frac{1}{18} \cdot \frac{(\rho_c - \rho_l)}{\mu_l} \cdot d_c^2 \cdot \omega^2 \cdot r = \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho_c - \rho_l)}{\mu_l} \cdot d_c^2 \cdot (\pi \cdot n)^2 \cdot r \quad (2.12)$$

în care ρ_c , ρ_l , μ_l , d_c au aceleași semnificații ca și în ecuația (2.1), ω este viteza unghiulară a tamburului centrifugei [rad/s], r este distanța pe care o parcurge particula de la suprafața lichidului până la peretele tamburului, iar n este turația centrifugei [rot/s]. Comparând ecuațiile (2.1) și (2.12) se poate scrie că:

$$v_{0C} = v_{0G} \cdot \frac{\omega^2 \cdot r}{g} = v_{0G} \cdot z \quad (2.13)$$

adică viteza de sedimentare în câmp centrifugal este de z ori mai mare decât în câmp gravitațional. În centrifugele industriale, z variază între 300 și 16 000; pentru centrifuge mici de laborator z poate atinge și 500 000 [30].

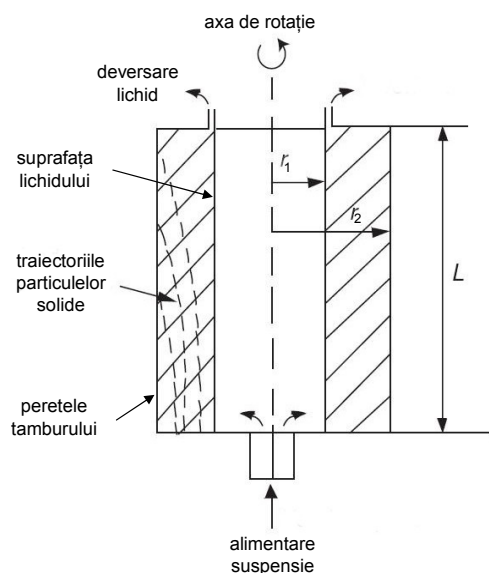


Figura 2.13. Separarea particulelor solide într-o centrifugă tubulară continuă

Sedimentarea are loc prin deplasarea particulei dinspre centrul de rotație către peretele tamburului (fig. 2.13). Creșterea vitezei de deplasare a particulei va îmbunătăți sedimentarea. Din ecuația (2.12) se poate observa că viteza particulei într-o centrifugă dată poate fi crescută prin:

- creșterea vitezei (ω) respectiv turației (n) centrifugei;
- creșterea diametrului particulei, d_c ;
- creșterea diferenței de densitate dintre particulă și lichid $\rho_c - \rho_l$;
- scăderea viscozității fazei lichide μ_l .

Durata sedimentării, respectiv timpul necesar ca o particulă să ajungă de la suprafața lichidului (r_1) până la peretele tamburului (r_2) se poate calcula prin integrarea expresiei vitezei

de sedimentare:

$$v_{0C} = \frac{dr}{dt} = \frac{1}{18} \cdot \frac{(\rho_c - \rho_l)}{\mu_l} \cdot d_c^2 \cdot \omega^2 \cdot r \Rightarrow \int_0^t dt = \frac{1}{18} \cdot \frac{(\rho_c - \rho_l)}{\mu_l} \cdot d_c^2 \cdot \omega^2 \int_{r_1}^{r_2} r \cdot dr \quad (2.14)$$

Integrând ecuația (2.14) se obține timpul necesar sedimentării particulelor de diametru d_c :

$$t = \frac{18\mu_l}{d_c^2 \cdot (\rho_c - \rho_l) \cdot \omega^2} \cdot \ln \frac{r_2}{r_1} \quad (2.15)$$

Cu cât particulele sunt mai mici, cu atât timpul necesar sedimentării lor este mai mare. Pentru atingerea duratei necesare sedimentării, centrifugele discontinue sunt operate un timp cel puțin egal cu durata sedimentării. În cazul centrifugelor continue, atingerea duratei necesare sedimentării, respectiv creșterea timpului, se face prin micșorarea debitului de alimentare cu suspensie. La un timp de sedimentare dat, se poate calcula diametrul minim al particulelor care sedimentează. Pentru centrifuge tubulare discontinue, diametrul minim al particulelor care sedimentează este:

$$d_m = \frac{3}{\omega} \sqrt{\frac{2\mu_l \cdot \ln \frac{r_2}{r_1}}{(\rho_c - \rho_l) \cdot t}} \quad (2.16)$$

iar pentru centrifuge tubulare continue:

$$d_m = \frac{3}{\omega} \sqrt{\frac{2\mu_l}{(\rho_c - \rho_l)} \cdot \frac{m_V}{L} \cdot \frac{\ln \frac{r_2}{r_1}}{\pi(r_2^2 - r_1^2)}} \quad (2.17)$$

în care m_V este debitul de alimentare cu suspensie [m^3/s], iar L este lungimea tamburului centrifugei [m].

Performanțele centrifugelor de diferite mărimi pot fi comparate prin intermediul *factorului sigma*, Σ , concept introdus de către Ambler în 1952 [31]. Ca sens fizic, Σ reprezintă aria transversală echivalentă a unui decantor gravitațional care ar produce același efect de sedimentare ca și centrifuga [3, 25]. Pentru centrifugele continue:

$$\Sigma = \frac{m_V}{2v_{0G}} \quad (2.18)$$

unde m_V este debitul de alimentare cu suspensie [m^3/s], iar v_{0G} este viteza de sedimentare în câmp gravitațional. Pentru mai multe centrifuge, de construcție asemenea, care separă aceeași suspensie ($v_{0G} = \text{constant}$):

$$\frac{m_{V1}}{\Sigma} = \frac{m_{V2}}{\Sigma} = \dots = 2v_{0G} = \text{const} \quad (2.19)$$

ecuație care servește pentru compararea centrifugelor și pentru transpunerea model – prototip; se recomandă ca scara de transpunere să nu fie mai mare de 2 [25].

Ecuațiile pentru evaluarea factorului sigma depind de tipul constructiv al centrifugei. Pentru centrifugele cu talere conice [31]:

$$\Sigma = \frac{2\pi \cdot \omega^2 \cdot (N-1)}{3g \cdot \tan \theta} \cdot (r_2^3 - r_1^3) \quad (2.20)$$

în care, pe lângă termenii definiți anterior, N reprezintă numărul de talere, r_2 și r_1 reprezintă respectiv raza exterioară și cea interioară a talerului [m], iar θ este unghiul la vârf al talerului conic.

Pentru centrifuge tubulare, ecuația (2.21) permite calculul factorului sigma cu o eroare de până la 4% [32, 33]:

$$\Sigma = \frac{\pi \cdot \omega^2 \cdot L}{g} \cdot (3r_2^2 + r_1^2) = \frac{2\pi \cdot \omega^2 \cdot L \cdot r^2}{g} \quad (2.21)$$

în care L este lungimea tamburului, r_1 este raza la suprafața lichidului, iar r_2 este raza peretelui interior al tamburului. Deoarece într-o centrifugă tubulară r_1 și r_2 au valori apropiate, se pot înlocui cu o rază medie r .

Pentru centrifugele decantoare continue cu transportor elicoidal se poate utiliza ecuația [34, 35]:

$$\Sigma = \frac{\pi \cdot \omega^2}{g} \left[L_1 \cdot \left(\frac{3}{2} r_2^2 + \frac{1}{2} r_1^2 \right) + L_2 \cdot \left(\frac{r_2^2 + 3r_2 r_1 + 4r_1^2}{4} \right) \right] \quad (2.22)$$

în care r_1 și r_2 reprezintă respectiv raza interioară a lichidului și raza interioară a tamburului, L_1 este lungimea părții cilindrice a tamburului, iar L_2 este lungimea părții conice a acestuia.

Tabelul 2.7. Factorul de eficiență ζ pentru diferite tipuri de centrifuge [36]

Tipul de centrifugă	Factorul de eficiență ζ [%]
Cu talere conice	45 – 73
Decantoare	54 – 67
Tubulară	90 – 98

curgerii în centrifugă asupra performanțelor centrifugelor. Date experimentale generalizate au permis stabilirea unor factori de eficiență (tab. 2.7) care corectează ecuația (2.18):

$$(m_V)_{real} = \zeta \cdot v_{0G} \cdot \Sigma \quad (2.23)$$

Întrucât ecuațiile (2.20) – (2.22) sunt valabile pentru condiții ideale de operare, utilizarea lor pentru compararea diferitelor echipamente trebuie întotdeauna însoțită și de teste experimentale, prin acestea evidențiindu-se influența formei și mărimii particulelor, a aglomerării particulelor, a distribuției neuniforme a

2.4.2. Tipuri de centrifuge utilizate în procesele de bioseparare

În funcție de forma constructivă a tamburului centrifugei și de modul de evacuare a fazei solide, există cinci tipuri principale de centrifuge de sedimentare (fig. 2.14) [35].

Centrifuga tubulară. Din ecuațiile (2.11) – (2.13) rezultă că factorul de eficacitate al centrifugelor crește cu raza rotorului și cu pătratul turației; pe de altă parte, solicitarea mecanică a peretelui crește cu pătratul razei și cu pătratul turației [25]. Ca urmare a acestor două rezultate, centrifugele cu eficacități înalte sunt caracterizate constructiv printr-un tambur cilindric cu diametru mic, care se rotește cu turație foarte mare. Rotorul tubular, antrenat la partea superioară de un electromotor, este închis la ambele capete (pentru centrifugele discontinue) sau deschis (pentru centrifugele continue – fig. 2.15). Rotorul este închis într-o manta de protecție, care asigură și alimentarea cu suspensie – la partea inferioară, precum și evacuarea produselor – la partea superioară. Lichidul evacuat este pompat printr-un disc distribuitor, pentru a evita formarea aerosolilor sau a spumei. Pentru îndepărtarea fazei solide acumulate la

periferie, centrifuga trebuie oprită și demontată. Diametrul tamburului poate ajunge până la 130 mm, putând reține până la 6 L de fază solidă. În modelele industriale, factorul de eficacitate poate ajunge până la 20 000 [37]. Aceste echipamente sunt utilizate frecvent în bioprocese, pentru separarea de vaccinuri, sânge, bacterii, etc.

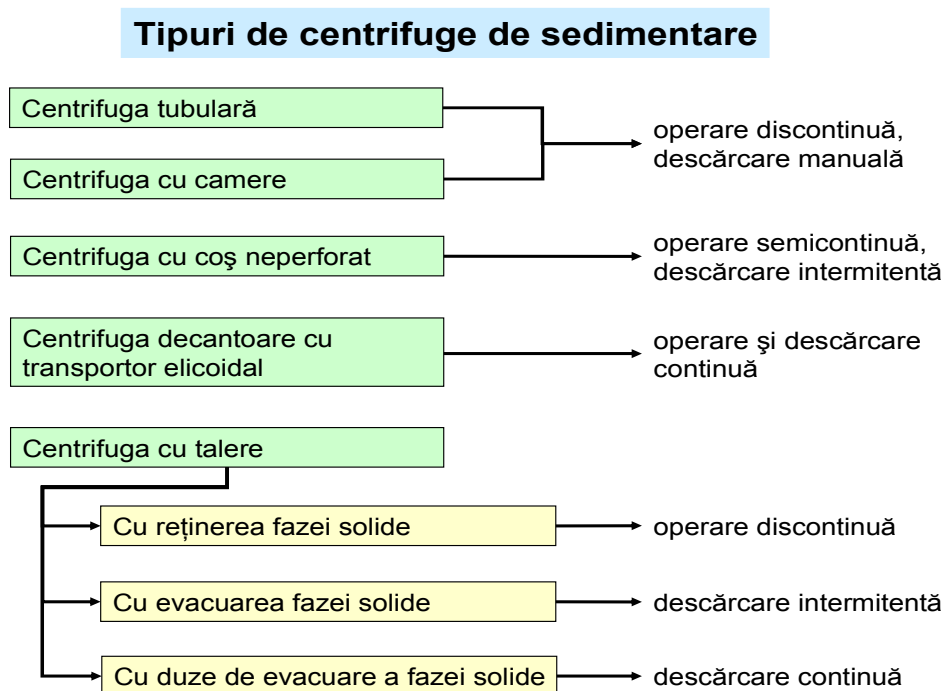


Figura 2.14. Clasificarea centrifugelor de sedimentare [35]

Centrifuga cu camere. Această centrifugă utilizează un tambur închis divizat în mai multe compartimente/camere (2 – 6) cilindrice verticale, pe care suspensia îi parcurge consecutiv. Ținând seama de razele camerelor, acestea au factorul de eficacitate crescător, de la interior spre exterior. Se poate realiza astfel o centrifugare fracționată, solidele de dimensiuni mari depunându-se în camerele interioare, iar cele fine în camerele exterioare. În fig. 2.16 este prezentată o astfel de centrifugă cu funcționare semicontinuă: alimentarea cu suspensie și evacuarea decantatului sunt continue, iar îndepărtarea sedimentului este discontinuă, necesitând dezasamblarea centrifugei. Decantatul este evacuat prin intermediul unei pompe centripete (dispozitiv cu pipe similar unei pompe centrifuge cu funcționare inversă: carcasa se rotește iar „rotorul” este staționar) care transformă energia cinetică a lichidului la evacuare în forță de presiune. Eficiența unei astfel de centrifuge este ridicată, datorită timpului de staționare ridicat al lichidului în utilaj. Curățirea este în schimb dificilă, fapt care limitează concentrația suspensiei inițiale la 4 – 5 % v/v fază solidă. Astfel de centrifuge lucrează la 4500 – 8500 rot/min, putând prelucra debite de 2,5 – 10 m³/h, la un diametru al tamburului de 335 – 615 mm, având o capacitate de reținere a solidelor de până la 75 L [35]. Unele modele includ canale de răcire în interiorul pereților tamburului, o manta de răcire exterioară și răcire a pompei centripete [37]. Sunt utilizate în special în industria alimentară pentru clarificare berii, vinului sau a sucurilor de fructe.

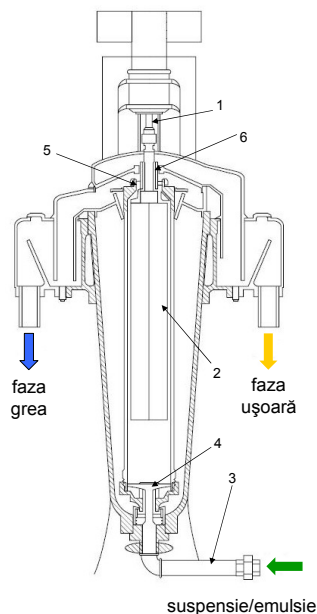


Figura 2.15. Centrifugă tubulară

1 – arbore; 2 – tambur tubular; 3 – alimentare cu emulsie/suspensie; 4 – disc distribuitor; 5 – evacuare fază grea; 6 – evacuare fază ușoară.

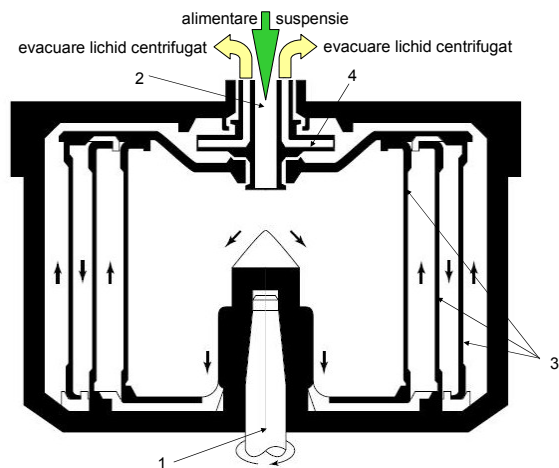


Figura 2.16. Centrifugă cu camere

1 – arbore; 2 – alimentare suspensie; 3 – pereți cilindrici formând camere; 4 – dispozitiv cu pipe pentru evacuarea lichidului centrifugat.

Centrifuga decantoare cu transportor elicoidal. Este echipată cu un tambur conic sau cilindro-conic orizontal având un raport *lungime : diametru* de 1,5 : 3,5. Tamburul conține un transportor elicoidal care se rotește în aceeași direcție, dar cu o viteză ușor diferită (5 – 100 rot/min). În aceste echipamente, forțele centrifuge sunt mai mici decât în alte tipuri constructive; la turații de 1600 – 6000 rot/min, factorul de eficacitate poate ajunge până la maximum 5000. Construcțiile speciale pot atinge un factor de eficacitate de până la 10 000 [37].

Centrifuga din fig. 2.17 b este alcătuită dintr-un tambur conic exterior și un tambur cilindric, coaxial, interior, împărțit în trei compartimente, dintre care cele două din stânga au găuri pe peretele lateral. Pe peretele exterior al tamburului cilindric este fixat un transportor elicoidal care se rotește solidar cu acesta, dar cu o turație ceva mai mică. Suspensia este alimentată printr-un tub axial în compartimentul din mijloc al tamburului cilindric și este separată, prin centrifugare, în două faze. Faza lichidă se adună la baza conului tamburului exterior, de unde deversează, prin deschiderile laterale, spre racordul de evacuare. Sedimentul este preluat de pe pereții tamburului conic de către transportorul elicoidal și este deplasat către vârful conului. În drumul său, sedimentul este spălat de către lichidul de spălare adus în compartimentul din stânga al tamburului interior. Lichidul de spălare se amestecă și iese împreună cu lichidul din suspensia inițială.

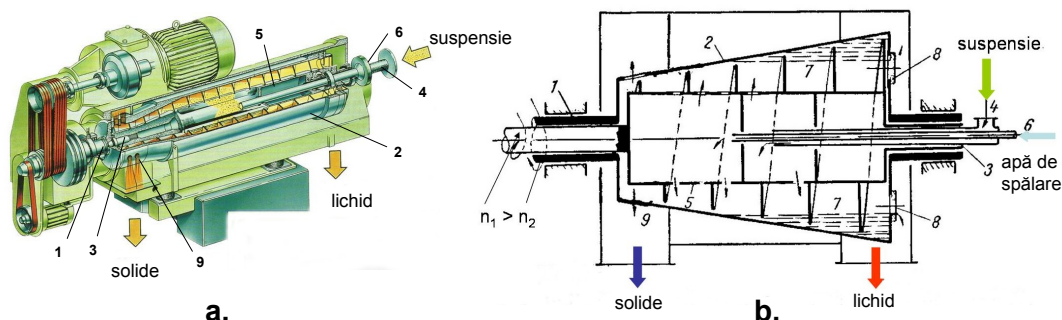


Figura 2.17. Centrifugă decantoare cu transportor elicoidal

a – cu tambur cilindro-conic; b – cu tambur conic.

1 – arbore tubular pentru rotirea tamburului exterior; 2 – tambur exterior (cilindro-conic sau conic); 3 – arbore tubular pentru rotirea tamburului cilindric interior; 4 – alimentarea suspensiei; 6 – intrarea apei de spălare; 7 – suprafața lichidului separat; 8 – deschideri reglabile pentru deversarea lichidului; 9 – deschideri pentru evacuarea sedimentului.

Centrifuga cu talere (separatorul cu talere) a fost concepută cu scopul de a micșora distanța parcursă de fazele suspensiilor sau emulsiilor. Prin table subțiri, de formă conică, se împarte volumul lichidului din centrifugă într-un număr mare de straturi conice, înăuntrul cărora se face separarea fazelor. Faza grea se îndreaptă spre exterior, ajunge la fața interioară a conului imediat superior pe care coboară spre periferia centrifugei și mai departe către dispozitivul de colectare și evacuare. Faza ușoară se îndreaptă spre centru, pe fața superioară a conului inferior și este condusă separat către un alt dispozitiv de colectare și evacuare (fig. 2.18). În timpul centrifugării, concentrația lichidului dintre talere variază continuu de la concentrație mică în faza ușoară (în apropierea părții centrale) la concentrație mare în fază grea (la periferie). Lichidul alimentat între discuri nu trebuie să deranjeze acest echilibru al concentrațiilor; pentru aceasta discurile au orificii mari de alimentare în dreptul locului unde concentrația inițială a emulsiei/suspensiei corespunde concentrației locale dintre discuri (practic locul orificiilor se plasează astfel încât faza care trebuie să rezulte în puritate mai mare să parcurgă o distanță mai mare între discuri).

Amestecul supus separării coboară prin tubul central și intră, de jos în sus, prin orificiile de alimentare din discuri în spațiul dintre acestea. După separare, faza ușoară este colectată lângă tubul central, iar faza grea la periferia tamburului. Pentru a evita curățirea frecventă a fazei solide, operație care necesită oprirea și demontarea, aceste centrifuge se utilizează la concentrații reduse de fază solidă (sub 1 % v/v). Capacitatea tipică de reținere de solide este de 5 – 20 L. Sunt utilizate pe scară largă pentru separarea grăsimilor din lapte.

Pentru suspensii cu conținut mai ridicat de fază solidă se folosesc centrifuge cu descărcare intermitentă sau continuă a fazei solide. Centrifuga cu descărcare intermitentă a solidelor (fig. 2.19 a) este prevăzută cu un număr de deschideri periferice închise cu valve. Deschiderea valvelor se face prin intermediul unui mecanism controlat fie de un temporizator, fie de un senzor al grosimii stratului de sediment. Astfel de echipamente sunt folosite pentru suspensii care conțin 2 – 6% v/v fază solidă, sau pentru suspensii în care faza solidă are tendința de sfărâmare sau dezagregare la solicitări prin forfecare mari. Sunt utilizate pentru limpezirea diferitelor sucuri și extracte alimentare.

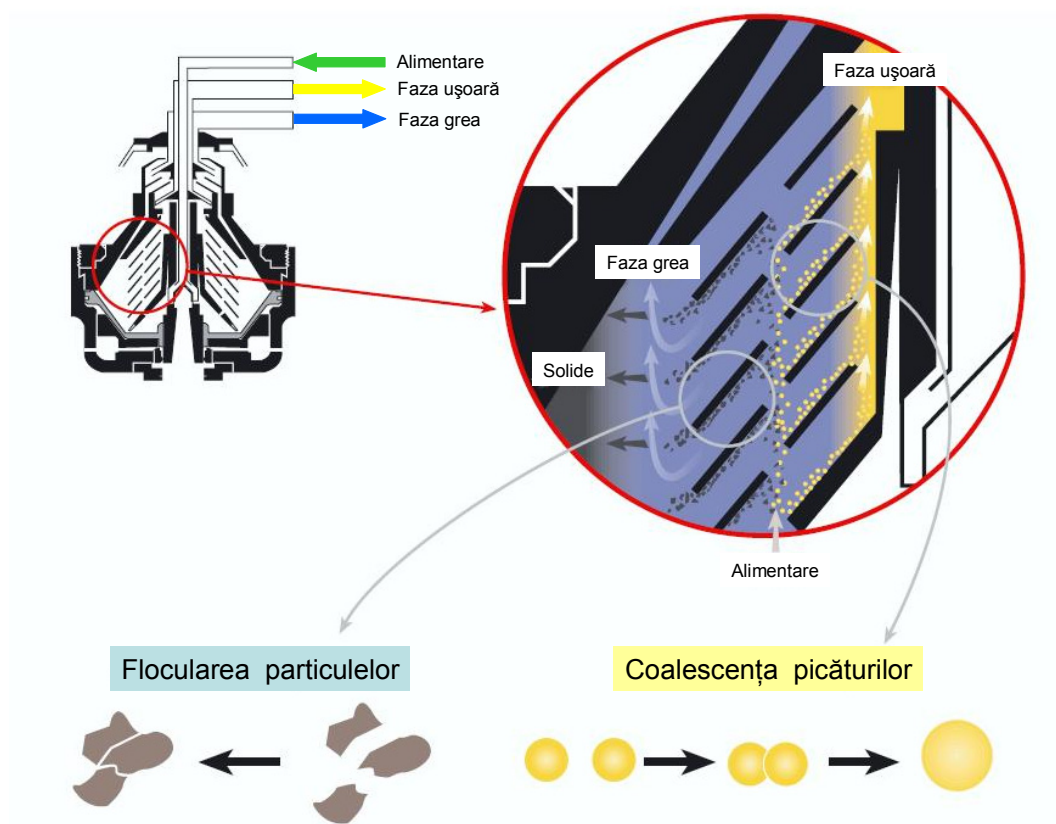


Figura 2.18. Centrifugă cu talere cu reținerea fazei solide

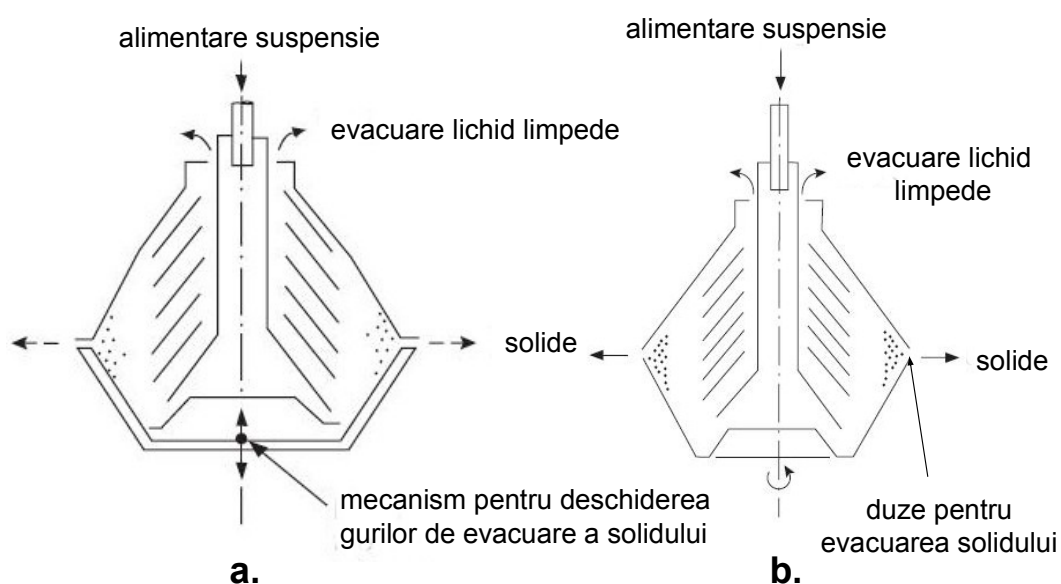


Figura 2.19. Centrifuge cu talere: a – cu descărcarea intermitentă a fazei solide; b – cu duze pentru descărcarea fazei solide.

Descărcarea continuă a fazei solide sub formă de nămol este posibilă prin intermediul unor duze de evacuare amplasate simetric la periferia diametrului maxim al tamburului (fig. 2.19 b). Numărul și dimensiunile acestor duze sunt corelate astfel încât să se evite înfundarea acumularea fazei solide și înfundarea, dar și pentru menținerea unei concentrații rezonabile a nămolului evacuat. Uzual o astfel de centrifugă are 12 – 24 duze cu deschiderea de 0,75 – 2 mm. Unele variante constructive permit recircularea parțială a nămolului evacuat, spălarea înainte de evacuare, etc. [35].

Centrifuga cu descărcare sub presiune a concentratului. Suspensiile de drojdii, bacterii, precum și unele precipitate proteice au o comportare pseudoplastică: viscozitatea aparentă scade cu creșterea vitezei de forfecare. Ca urmare a acestui fapt ele pot curge prin tuburi și canale chiar la concentrații ridicate. Concentratul adunat la periferia tamburului (fig. 2.20) este împins de presiunea lichidului de alimentare, prin intermediul unor duze, către pompa centripetă aflată la partea inferioară a rotorului. Aceasta preia concentratul și îl evacuează prin axul centrifugei. Aceste centrifuge sunt utilizabile numai pentru fluide pseudoplastice care nu mai au și alt fel de particule în componență.

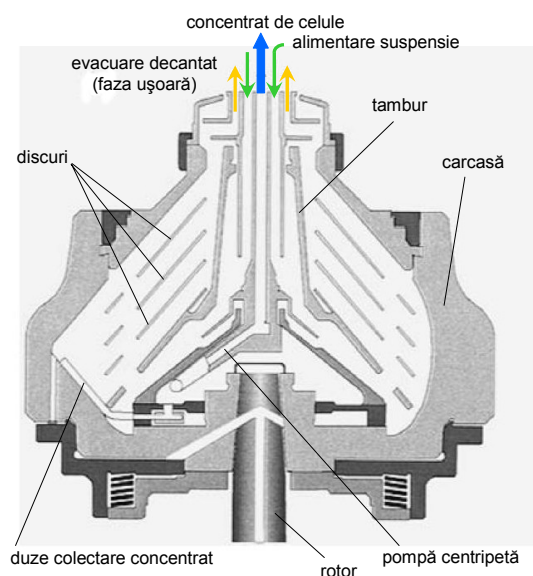


Figura 2.20. Centrifugă cu descărcare sub presiune a concentratului de celule

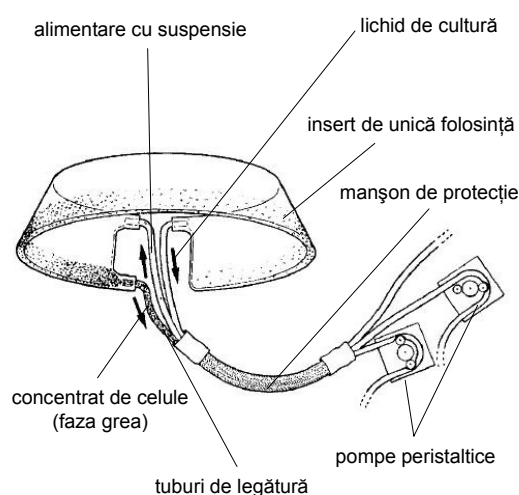


Figura 2.21. Insert de unică folosință utilizat în centrifugele Centritech

Centrifuga Centritech este prevăzută în rotor cu un insert din plastic de unică folosință (fig. 2.21), în care lichidul de alimentare este introdus la partea superioară, iar lichidul centrifugat iese pe la partea superioară a capătului opus al insertului. Faza grea (concentratul de celule) este evacuat intermitent prin ieșirea de la partea inferioară. Această centrifugă, cu un factor de separare de maximum 100 este utilizată pentru separarea celulelor animale din lichidul de cultură [38].

În tabelul 2.8 sunt prezentate caracteristicile principale ale centrifugelor utilizate în procesele de bioseparare.

Tabelul 2.8. Caracteristici ale separatoarelor centrifugale utilizate în biotehnologii

Tip	Descărcarea solidului*	Debit alimentare [L/h]	Conținut de solide [% vol.]	Debit solide [L/h]	Factor Σ [m ²]	Factor eficacitate z	Aspect solide**
Tubulară	M	20 – 7000	< 1	0	1400 – 4500	< 31000	PC
Cu camere	M	100 – 20000	< 5	0		< 9000	PC
Decantoare cu transportor elicoidal	C	20 – 120000	5 – 50	< 50000	400 – 25000	< 10000	NGS
Cu talere	M	20 – 100000	< 1	0	1000 – 300000	< 10000	PC
Cu talere, descărcare radială	I	20 – 100000	< 25	< 3000	1.000 – 170.000	< 14500	NGF
Cu talere, descărcare axială	I	1000 – 150000	< 15	< 1000	110000 – 220000	< 15000	NGF
Cu talere, descărcare cu duze	C	300 – 250000	2 – 30	3000 – 60000	35000 – 180.000	< 11000	NS
Cu talere, descărcare sub presiune***	C	1000 – 180000	4 – 30	150 – 40000	69000 – 180000	< 15000	NGF
Centritech****	I	5 – 100	< 1	< 15	na	< 100	NFS

(*) M – manual; I – intermitent; C – continuu;

(**) PC – pastă consistentă; NGS – nămol gros semisolid; NGF – nămol gros fluid; NS – nămol subțire; NFS – nămol foarte subțire;

(***) Numai pentru cremă de agregate monocelulare;

(****) Numai pentru celule animale.

2.4.3. Aplicații ale separării centrifugale în biotehnologii

Cea mai importantă utilizare a centrifugelor în biotehnologii este recoltarea celulelor, indiferent dacă produsul este extracelular, intracelular sau este chiar celula însăși (fig. 2.22). În aval de recoltare, numărul aplicațiilor centrifugelor crește. Ele se pot utiliza pentru clasare (sortare după dimensiuni), deshidratare, extracție lichid – lichid, recuperarea precipitatelor. Aplicațiile prezentate mai jos nu sunt exhaustive, fiind date doar cu titlu exemplificativ; practic există nenumărate variante de procese de separare în aval de bioreactor care implică și tehnici de centrifugare.

2.4.3.1. Separarea drojdiilor

Concentrarea drojdiei de panificație s-a numărat printre primele aplicații ale centrifugelor cu talere. La ora actuală se utilizează centrifuge cu descărcare prin duze, sub presiune, a cremei de drojdie. Debitul vehiculate sunt printre cele mai mari din biotehnologii, până la 150 m³/h lichid de fermentație, cu până la 25 % v/v celule de drojdie. Drojdia este apoi spălată pentru creșterea duratei de viață. Raportul m_V/Σ (ec. 2.19) este de circa $2 \cdot 10^{-7}$ m/s, la o reducere de 99,9% a numărului de celule.

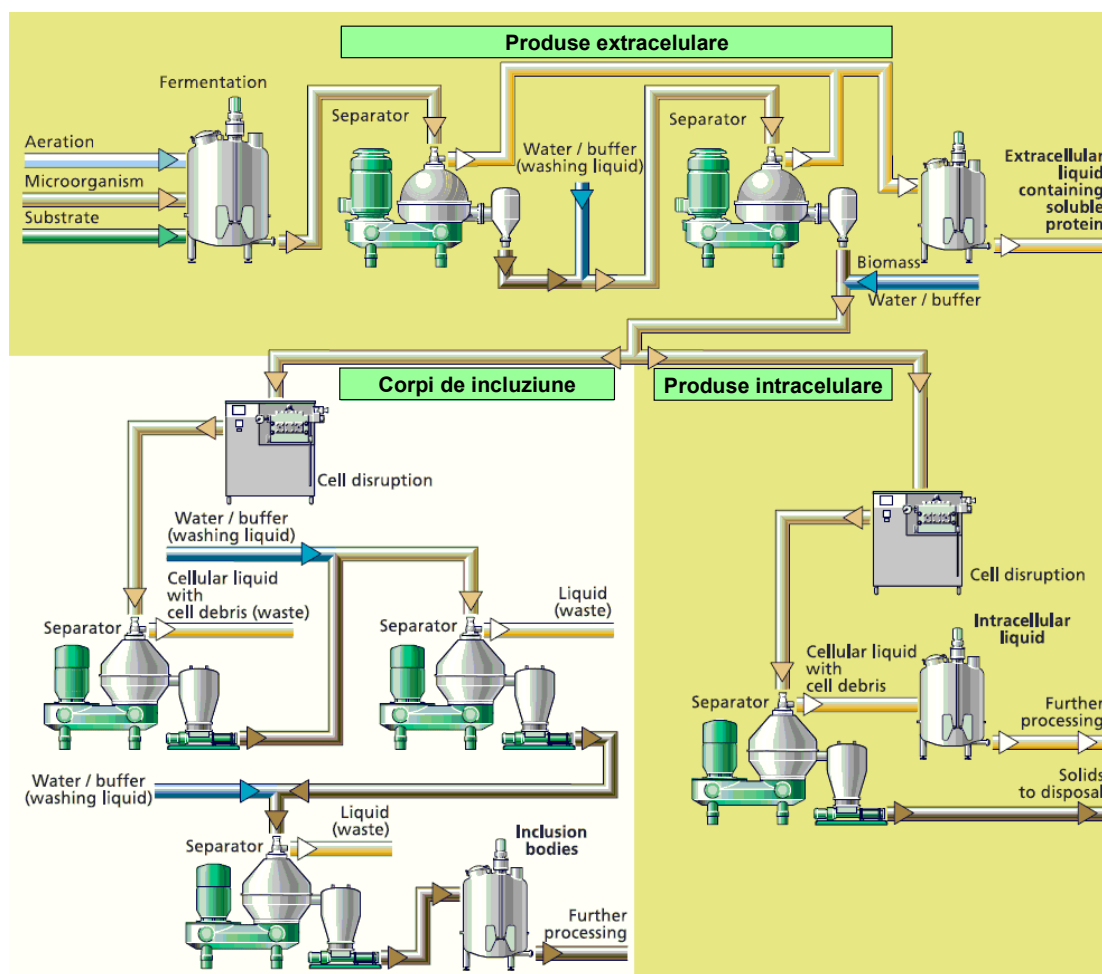


Figura 2.22. Utilizarea separatoarelor centrifugale pentru recoltarea celulelor

În fabricile de bere, centrifugele sunt utilizate în mai multe etape ale procesului tehnologic. După fermentare, berea tânără conține până la $80 \cdot 10^6$ celule/mL (2% v/v), pentru clarificarea ei fiind folosite centrifuge cu talere cu descărcare radială a fazei solide, prevăzute cu dispozitive speciale de evacuare, pentru evitarea contactului cu atmosfera. Debitul vehiculate sunt de circa $75 \text{ m}^3/\text{h}$. Înainte de filtrarea finală a berii, conținutul de masă celulară al acesteia este mai redus, putându-se utiliza centrifuge cu capacități mai mici de reținere a fazei solide (fig. 2.23). Forma dispozitivului de intrare permite o accelerare treptată blândă, care favorizează separarea proteinelor sensibile

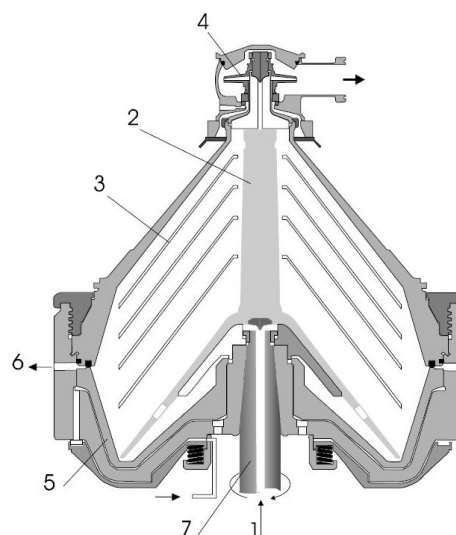


Figura 2.23. Centrifugă din industria berii
1 – alimentare lichid; 2 – distribuitor de accelerare; 3 – talere; 4 – pompă centripetă; 5 – fund culisant; 6 – orificii evacuare solide; 7 – arbore.

la forfecare. Tamburul are o singură ieșire pentru faza lichidă, la partea superioară, printr-o pompă centripetă încorporată. Solidele sunt evacuate radial. Scopul primar fiind cel al îndepărtării celulelor, raportul m_v/Σ este de circa $5 \cdot 10^{-8}$ m/s. Debitul unor astfel de centrifuge, utilizate și în vinificație la limpezirea mustului înainte de fermentație și la limpezirea finală a vinului, este de până la 45 m³/h. Acest tip de centrifuge, în construcție septică, poate fi utilizat și în tehnologia ADN recombinat [37].

2.4.3.2. Separarea bacteriilor

În biotehnologiile moderne, pentru recoltarea bacteriilor se utilizează centrifuge cu discuri, cu evacuare sub presiune a masei celulare sau centrifuge decantoare. Pentru microorganisme având dimensiuni de circa 1 μm se utilizează centrifuge cu descărcare axială. Dacă concentrația solidelor este mare, necesitând o frecvență de descărcare la mai puțin de 60 s, se utilizează centrifuge cu descărcare radială, mai costisitoare. Pentru suspensiile curate se poate utiliza centrifuga cu descărcare continuă sub presiune prezentată în fig. 2.20. O valoare tipică m_v/Σ pentru o recuperare de 99% a *E. Coli* K12 este de 10^{-8} m/s.

Celulele de *Corynebacterium*, de dimensiuni ceva mai mari, întâlnite în biosinteza aminoacizilor, pot fi separate în centrifuge cu duze de descărcare sub presiune a solidelor, iar miceliile de *Actinomyces* se pot recolta cu centrifuge cu descărcare radială. Ca și în centrifugele cu duze, celulele sunt spălate, cel mai adesea în două trepte, pentru îmbunătățirea randamentului.

Sunt cazuri când diluarea și reseparatora nu este posibilă datorită fragilității celulelor, care s-ar putea rupe, compromițând astfel etapele ulterioare de prelucrare. Pentru evitarea scăderii randamentului, celulele trebuie recoltate la o umiditate minimă. În aceste condiții se pretează utilizarea centrifugelor decantoare. Valorile Σ scăzute ale acestor echipamente fac obligatorie flocularea celulelor înainte de recoltare. Adaosul de polimeri conduce la o eficiență a separării de 98 – 99% la rapoarte m_v/Σ de $3 \cdot 10^{-7}$ pentru un lichid de fermentație cu un conținut de 12 – 15 % v/v *Bacillus subtilis* lipsit de spori. Conținutul de substanță uscată (SU) al concentratului este de 27 – 28 % la $z = 3200$. Rezultatul este comparabil cu al centrifugelor cu duze sau cu descărcare intermitentă a fazei solide care dau concentrate cu circa 15% masă bacteriană.

Capacitatea centrifugelor decantoare de a obține produse cu un conținut ridicat de SU este utilizată pentru concentrarea fazei solide provenite de la centrifugele cu duze sau de la unitățile de ultrafiltrare a lichidelor de fermentație de la biosinteza aminoacizilor sau antibioticelor. Avantajul constă în îmbunătățirea randamentelor și reducerea costurilor cu depozitarea deșeurilor.

În cazul producției de proteine monocelulare din hidrocarburi sau derivați ai acestora, bacteriile sunt preconcentrate până la circa 6% SU în centrifuge cu duze de mare capacitate, iar apoi sunt floculate. Biomasa este apoi deshidratată până la circa 30% SU în centrifuge decantoare, după care este granulată și apoi uscată. Faza lichidă rezultată din centrifuga decantoare este limpezită în separatoare de mare viteză și trimisă la sterilizare împreună cu lichidul limpede din faza de preconcentrare. De la sterilizare lichidul este recirculat în fermentator [39].

2.4.3.3. Separarea celulelor animale

În comparație cu alte tipuri de celule, celulele animale au o viteză de creștere mai redusă, sunt susceptibile la infecții prin numeroși viruși, și, datorită cvasiabsenței peretelui celular, sunt mult mai fragile și deci sensibile la prelucrarea prin procedeele convenționale.

Rolul centrifugării în biotehnologia celulelor animale este în primul rând acela de a separa fazele rezultate din bioreactor (fig. 2.24). Centrifugele sunt folosite fie pentru limpezirea masei de celule scoase din bioreactorul discontinuu, fie pentru reținerea masei celulare pentru prelucrare ulterioară, în cazul operării continue. Realizarea acestor operații depinde de faza în care se află produsul util (intra- sau extracelular).

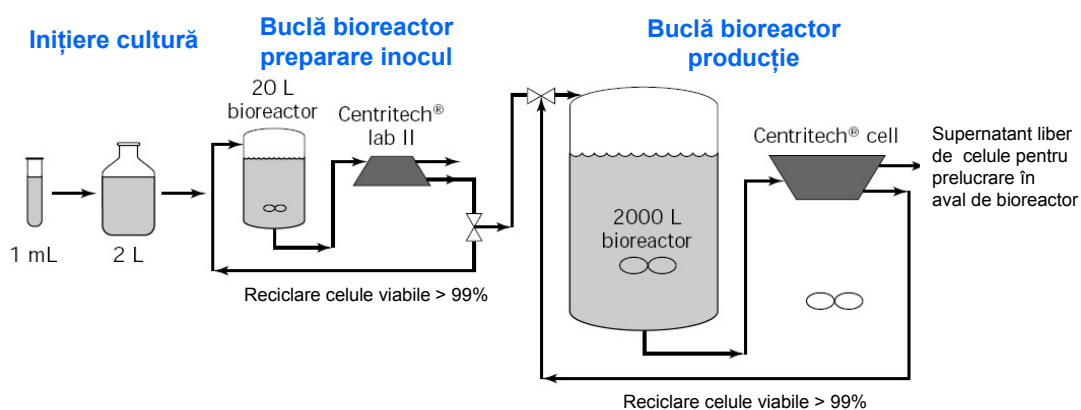


Figura 2.24. Sistem de centrifuge integrat în biotehnologia celulelor animale

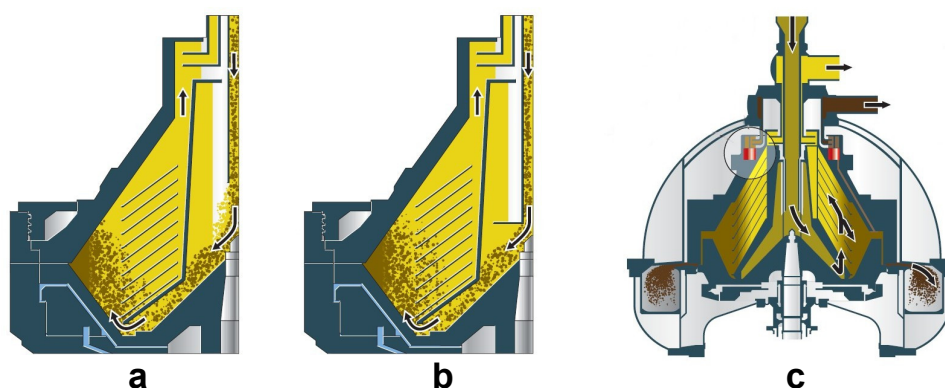


Figura 2.25. Centrifuge adaptate prelucrării celulelor animale: a – alimentare uzuală; b – alimentare hidroermetică; c – evacuare prin duze VisCon

Datorită fragilității acestor celule, centrifugele utilizate sunt adaptate special prelucrării acestora. Întrucât celulele animale sunt mai sensibile la forfecare decât bacteriile sau drojdiile, dispozitivele de alimentare cu suspensie de celule și cele de evacuarea masei celulare ale centrifugelor sunt modificate (fig. 2.25). Alimentarea se face printr-un dispozitiv hidroermetic care evită supunerea celulelor la forțe de

forfecare mari, prin alimentarea masei celulare sub nivelul de lichid existent deja în centrifugă. Față de separatoarele centrifugale convenționale cu duze pentru evacuarea solidelor, duzele VisCon patentate de Westfalia AG nu sunt amplasate la periferia tamburului, în zona cea mai depărtată de axa de rotație, ci pe o circumferință mai mică, înăuntrul tamburului. În această zonă, forțele de presiune sunt mai reduse, celulele fiind supuse unor forțe de forfecare mai mici.

Centrifugele utilizate pentru separarea celulelor animale au de regulă factori de eficacitate ridicați (până la 20 000), posibilități de curățire și sterilizare fără a fi necesară demontarea (CIP¹ și SIP²) și metode specifice pentru evacuarea materialului celular acumulat în tambur. Se utilizează echipamente cu capacități de prelucrare de 10 – 600 L/h (instalații de laborator și semipilot), dar și de 1 – 15 m³/h (instalații pilot și industriale) [40]. Se utilizează însă și centrifuge cu factori de eficacitate mici (250 – 300), cum sunt centrifugele Centritech, de ex.

Pentru separarea celulelor animale există și alte opțiuni în afară de centrifugare: filtrarea tangențială, filtrarea în filtre rotitoare, separarea în dispozitive înclinate de sedimentare, mai mult sau mai puțin dezavantajoase.

2.4.3.4. Separarea resturilor celulare

În cazurile în care produsele intracelulare nu formează corpi de incluziune, resturile celulare se îndepărtează, de regulă, imediat după dezagregarea celulelor. Separarea este dificilă, datorită faptului că prin dezagregare rezultă particule foarte fine, de 0,2 – 0,5 μm, și, în plus, viscozitatea sistemului este uzual ridicată. Diluarea suspensiei reduce viscozitatea, dar raportul m_V/Σ reprezintă doar 5 – 10% din valoarea pentru celule întregi. Este necesară utilizarea centrifugelor cu turații ridicate, cu evacuarea (continuă sau intermitentă) a solidelor. Acolo unde este posibil, se recomandă flocularea resturilor celulare, în acest mod raportul m_V/Σ putându-se mări cu cel puțin un ordin de mărime. De exemplu, prin flocularea resturilor celulare de drojdii cu borax, se pot îndepărta circa 80% din acestea într-o centrifugă decantoare (la nivel de instalație pilot), la o valoare m_V/Σ de $4 \cdot 10^{-4}$ m/s [37].

2.4.3.5. Recuperarea și spălarea corpurilor de incluziune

În cazul în care produsul activ intracelular formează corpi de incluziune, este preferabilă îndepărtarea resturilor celulare și a celorlați componenți celulari înainte de următoarea etapă de prelucrare. Corpuri de incluziune au o viteză de sedimentare mai ridicată decât resturile celulare, astfel încât într-o centrifugă de clasare corpuri de incluziune vor fi reținuți, în timp ce resturile celulare vor părăsi echipamentul odată cu faza lichidă (fig. 2.26). Există o interdependență puternică între metoda de omogenizare (numărul de treceri prin omogenizator, de ex. – vezi și capitolul următor) și distribuția după dimensiuni a particulelor rezultate pe de o parte și ușurința spălării corpurilor de incluziune pe de altă parte [41]. Există o valoare optimă a numărului de treceri.

¹ CIP – cleaning in place = curățire pe loc (fără demontare)

² SIP – sterilization in place = sterilizare pe loc (fără demontare)

Separarea prin clasare nu este totală, fiind necesară repetarea operației. Aceasta se face fie prin resuspendarea corpurilor de incluziune separați, în cazul operării discontinue, fie prin alimentarea continuă simultană a concentratului de corpi de incluziune și a apei într-un rezervor de alimentare prevăzut cu o bună amestecare, continuând operația până la obținerea purității dorite. Se utilizează centrifuge cu descărcare axială, sau mai bine radială a fazei solide, la un raport $m_V/\Sigma = (1\div 2) \cdot 10^{-8}$ m/s. În vederea reducerii consumurilor de reactivi în etapele următoare, separarea finală se face prin deshidratare, într-o centrifugă decantoare la $m_V/\Sigma = 2 \cdot 10^{-6}$ m/s [37].

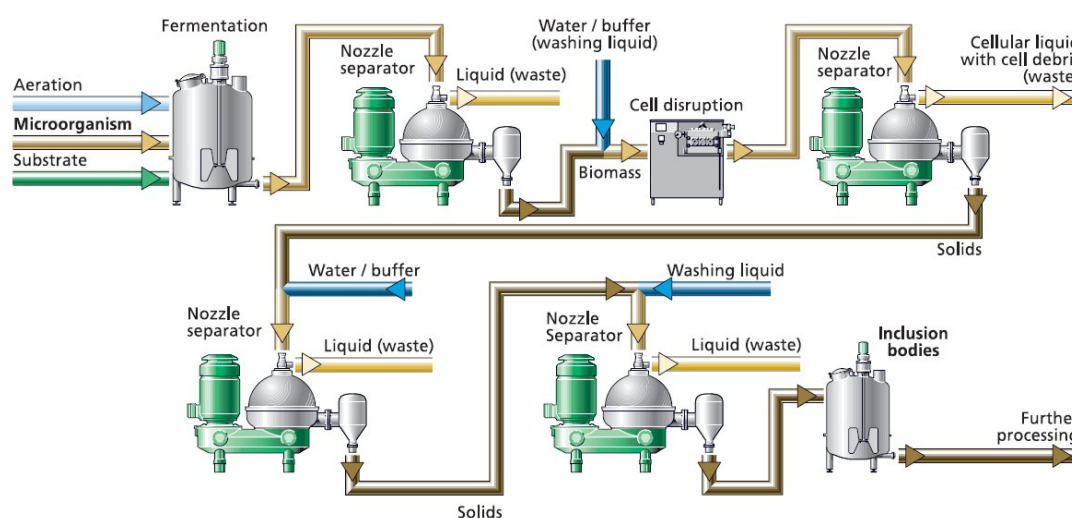


Figura 2.26. Separarea corpurilor de incluziune prin clasare centrifugală în procesul de obținere a hormonilor (insulina)

2.4.3.6. Fraționarea plasmei umane

Proteinele din plasma sanguină sunt separate prin procese fizice și chimice, bazate pe modificarea selectivă a trei parametri care afectează solubilitatea proteinelor în apă: temperatură, pH și concentrația alcoolului.

Sângele uman constă din faza roșie și plasma limpede. Faza roșie (cca. 40% din sânge) este separată cu centrifuge speciale direct în punga de colectare de la donator. Plasma rămasă este congelată și apoi trecută la fracționare. Doar 5% din plasmă este alcătuită din produși utili, restul fiind apă și electroliți (fig. 2.27). De aici pot fi extrași numeroși componenți valoroși. Îmediat după congelare, din crioprecipitatul rezultat se pot separa concentratul de Factor VIII și complexul protrombinic. Plasma rămasă este trecută la fracționare cu etanol prin procedeul Cohn (fig. 2.28), unde se recuperează prin precipitare fracțiunile individuale: fibrinogen, alfa, beta și gama globuline, albumine. După fracționare, proteinele se prelucrează cu metode specifice, înainte de a fi utilizate în diverse domenii: chirurgie, tratarea infecțiilor, reducerea deficitului proteic, malnutriție, etc.

Capitolul 2 – Separarea masei celulare de lichidul de fermentație

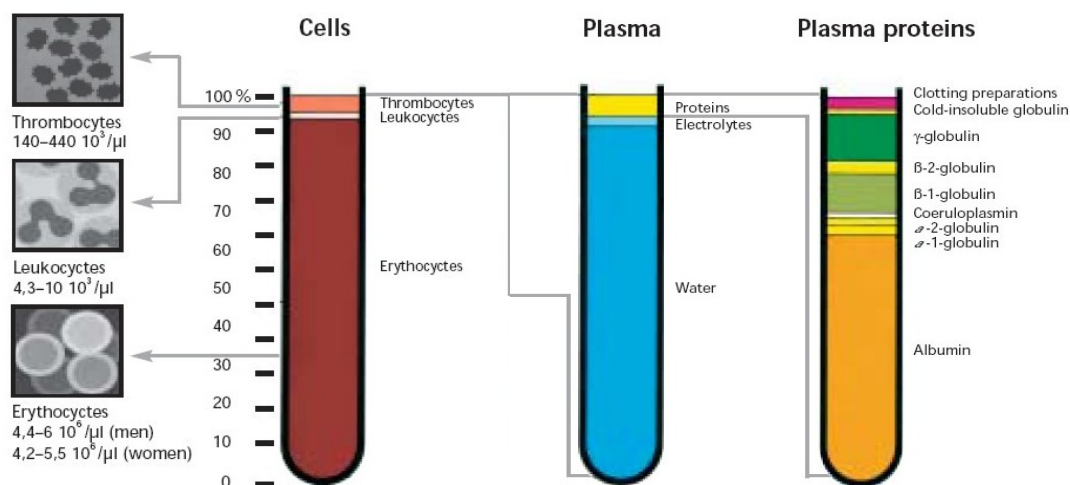


Figura 2.27. Compoziția sângelui uman

La fracționarea prin procedeul Cohn este necesară menținerea temperaturii în intervalul $-3 \div -6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pentru aceasta se folosesc centrifuge cu camere cu capacități între 60 – 1000 L/h, prevăzute cu răcire triplă: (1) răcirea directă a tamburului, pentru îndepărtarea căldurii generate de frecarea aerului de tamburul care se rotește; (2) răcirea părții superioare a carcasei pentru preluarea căldurii agentului de răcire care răcește tamburul; (3) răcirea capacului pentru îndepărtarea căldurii din partea superioară a tamburului și din inelul de etanșare (fig. 2.29). Soluția salină utilizată ca agent de răcire este alimentată la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cu acest sistem de răcire se poate asigura un control al temperaturii cu o precizie de $\pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

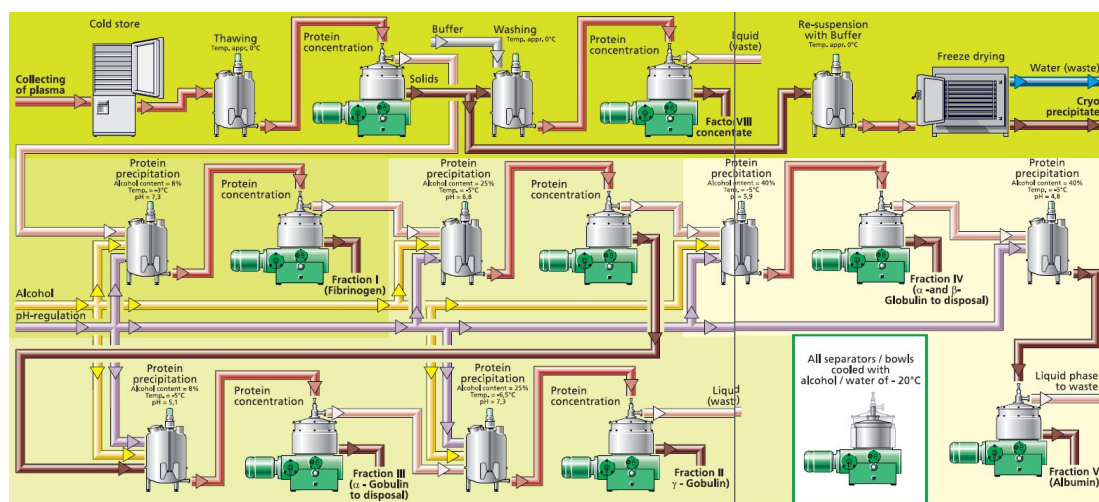


Figura 2.28. Fraționarea plasmăi sangvine prin procedeul Cohn

Una dintre noutățile apărute în fracționarea sângelui uman o reprezintă manipularea etanșă a solidelor. Un bun exemplu este hiperconcentratorul HyCon produs de Wesfalia AG, o centrifugă la care mecanismul de antrenare (motor și reductor) și

centrifuga propriu-zisă (tamburul și sistemul de evacuare a solidelor) sunt separate ermetic între ele prin inele de etanșare cu gaz și sunt amplasate în încăperi diferite, centrifuga propriu-zisă aflându-se într-o încăpere sterilă amplasată sub încăperea (nesterilă) în care se găsește antrenarea [42].

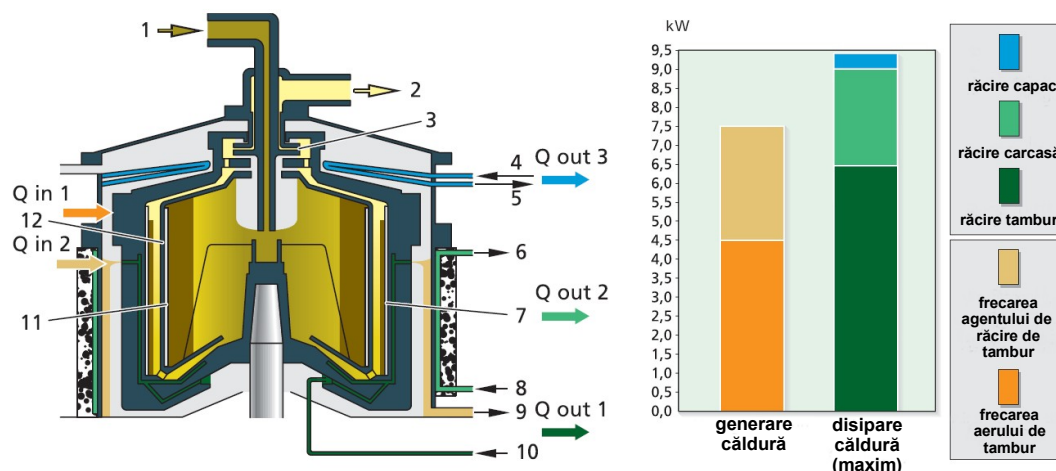


Figura 2.29. Centrifugă cu camere prevăzută cu circuite de răcire

Q_{in1} – căldură generată prin frecarea tamburului cu aerul; Q_{in2} – căldură generată prin frecarea lichidului de răcire de tambur; Q_{out1} – căldură preluată de agentul de răcire a tamburului; Q_{out2} – căldură preluată de agentul de răcire a carcasei; Q_{out3} – căldură preluată de agentul de răcire a capacului.

1 – alimentare centrifugă; 2 – evacuare lichid limpede; 3 – pompă centripetă; 4 – intrare agent de răcire capac; 5 – ieșire agent de răcire capac; 6 – ieșire agent de răcire carcasă; 7 – căptușeală exterioară demontabilă; 8 – intrare agent de răcire carcasă; 9 – ieșire agent de răcire tambur; 10 – intrare agent de răcire tambur; 11 – căptușeală interioară demontabilă; 12 – insert sub formă de clopot.

O altă perfecționare constă în răcirea tamburului centrifugei cu azot lichid, fapt care permite o mai bună îndepărtare a căldurii generate prin frecare, și un control mai bun al temperaturii.

2.5. Separarea prin microfiltrare

Microfiltrarea, ultrafiltrarea și osmoza inversă sunt procese de membrană înrudite, diferența dintre acestea fiind mărimea particulelor care pot fi reținute (fig. 2.30). Particulele solide aflate în suspensie reținute prin microfiltrare au dimensiuni cuprinse între 0,1 și 10 μm , în această categorie intrând o serie de viruși, bacterii, celule animale și vegetale.

Membranele pentru microfiltrare pot fi încadrate, în funcție de mecanismul filtrării (fig. 2.5), fie în categoria filtrelor în adâncime, fie în categoria filtrelor cu efect de sită. De obicei membranele de filtrare în adâncime se utilizează pentru filtrarea fără ieșire (dead-end filtration), acestea putând reține o cantitate mai mare de solide.

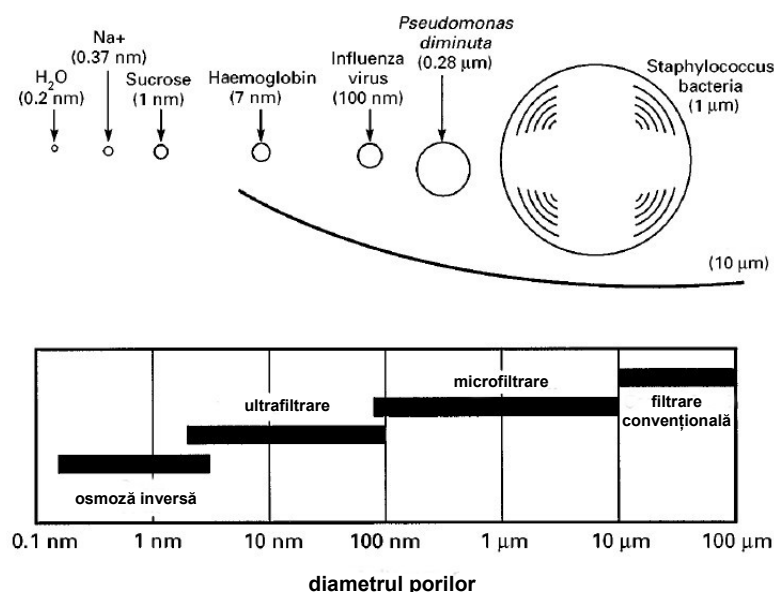


Figura 2.30. Mărimea particulelor reținute prin diferite procese de filtrare [43]

2.6. Centrifugare sau microfiltrare ?

După apariția microfiltrelor sterilizabile, utilizarea microfiltrării pentru separări lichid-solid în biotehnologii a devenit o alternativă viabilă. Ca regulă generală, pe măsură ce cresc dimensiunile particulelor și scara de operare, centrifugarea este mai avantajoasă decât microfiltrarea, și viceversa.

Dacă, de ex., pentru separarea *E. Coli* dintr-un bioreactor de 200 L, microfiltrarea este posibilă, decizia aplicării acestui procedeu de separare trebuie bine cântărită. Dacă se dorește ulterior transpunerea la o scară mai mare a procesului pot apărea probleme. Este mult mai convenabil să se păstreze aceeași tehnologie și la scară mai mare, chiar dacă aceasta nu este tocmai alegerea optimă. În multe cazuri, răspunsul la întrebarea din titlu îl reprezintă o combinație de filtre și centrifuge.

3. Dezagregarea masei celulare

După separarea masei de celulare de lichidul de fermentație, următoarea fază a procesului tehnologic depinde de locația produsului dorit. Dacă produsul dorit este excretat de către celule (etanol, acid citric, antibiotice), trebuie prelucrat lichidul de fermentație, biomasa fiind un produs secundar. Dacă produsul rămâne în interiorul celulelor (așa cum se întâmplă în cazul enzimelor, proteinelor recombinante, etc.), lichidul de fermentație va fi produsul secundar, iar masa celulară trebuie prelucrată în vederea recuperării produsului util dorit.

Pentru a izola produsele intracelulare este necesară distrugerea membranei și a pereților celulari, proces cunoscut drept dezagregarea celulelor (cell disruption). Procedeu utilizat pentru dezagregarea la scară industrială depinde de o serie de factori, ca: susceptibilitatea celulelor la rupere, caracteristicile de stabilitate ale produsului, ușurința extracției produsului din resturile celulare, viteza metodei, costurile asociate.

3.1. SUSCEPTIBILITATEA LA RUPERE A CELULELOR

Forma și rezistența celulelor depinde în primul rând de natura acestora. Celulele sunt caracterizate de o mare varietate de morfologii, structuri și mărimi, depinzând de vârstă și de condițiile de cultură. Bacteriile pot apărea sub formă de sfere, baghete, elici, filamente. Fungiile pot fi de tip micelar, pseudomicelar sau unicelular. Pereții celulari sunt responsabili de rezistența, rigiditatea și forma celulelor, aceștia reprezentând bariera majoră pentru punerea în libertate a produselor intracelulare. Cunoașterea structurii și compoziției pereților celulari este importantă în alegerea metodei de dezagregare adoptate.

3.1.1. Celule animale

Celulele animale sunt caracterizate de lipsa pereților celulari. Acestea prezintă doar o membrană celulară alcătuită dintr-un strat dublu de lipide, slab sprijinită de

citoschelet (fig. 3.1). Lipsa unui perete celular rigid permite dezvoltarea unei mari diversități de celule, țesuturi și organe. Tot această lipsă permite însă și o dezintegrare ușoară a unor astfel de celule. În plus, celulele animale fiind relativ mari (1 – 100 μm), sunt foarte vulnerabile la forfecare.

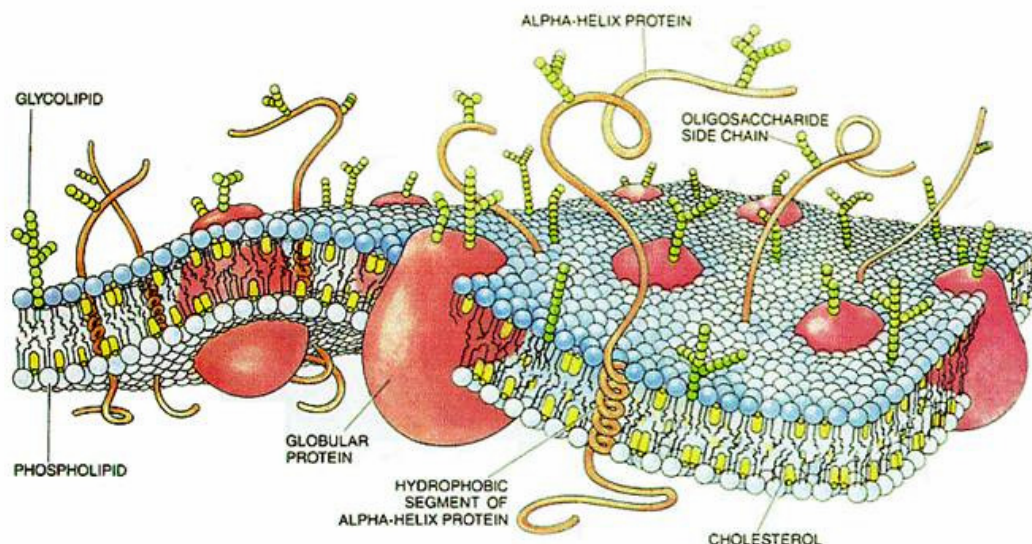


Figura 3.1. Membrana celulară [44]

3.1.2. Celule vegetale

Celulele vegetale au pereți constituiți din carbohidrați complecși insolubili (celuloză și hemiceluloze), lignină și ceară care înconjoară membrana plasmatică (fig. 3.2).

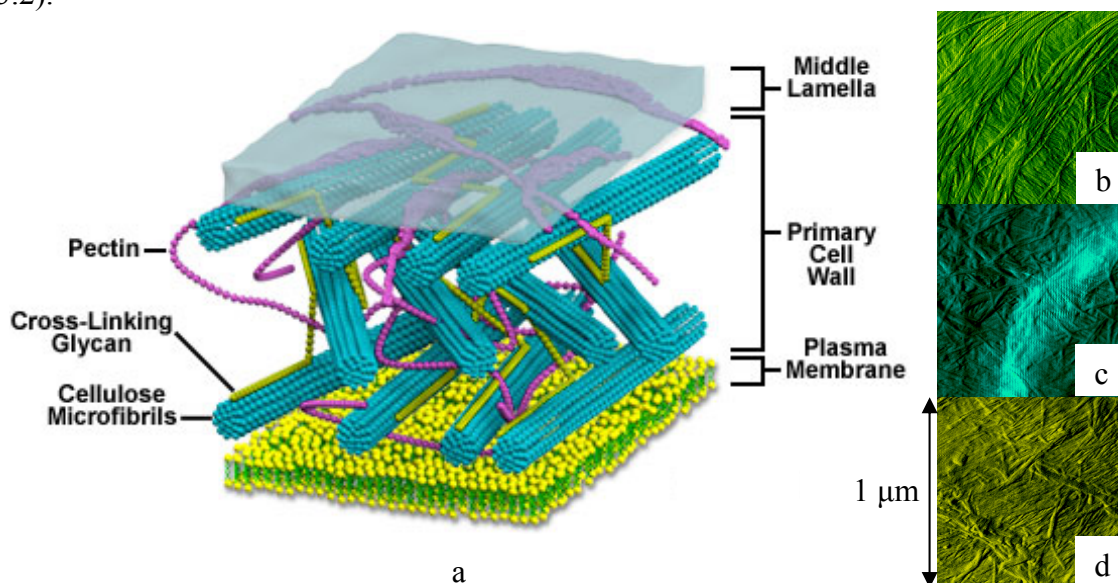


Figura 3.2. Pereți celulari vegetali [45]

a – structură; (b – d) – imagine microscopică a peretelui celular pentru: castan de apă (b), cartof (c), morcov (d)

Microfibrilele celulozice care acoperă membrana plasmatică într-o manieră întâmplătoare conferă acestor celule o oarecare protecție la forfecare. Dacă celulele sunt de dimensiuni mari, vulnerabilitatea lor la forfecare crește. Proteinele din aceste celule pot fi legate și inactivate de către compuși fenolici care fac parte din unitățile ligninice.

3.1.3. Fungii și drojdii

Ca și celulele mamiferelor, fungiile sunt eucariote cu ADN-ul organizat în cromozomi în interiorul nucleului. Peretele celular al fungiilor filamentoase și al drojdiilor este compus din circa 80 – 90% polizaharide (fig. 3.3). În fungiile filamentoase chitina este încrucișată cu glucani, în timp ce în fungiile inferioare și în drojdii există un amestec conținând manan și glucan. Fungiile mature nu au o structură discretă a peretelui celular.

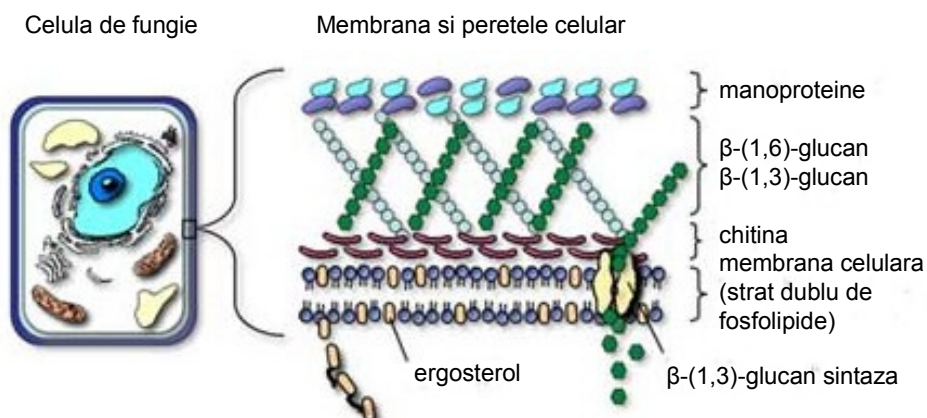


Figura 3.3. Structura peretelui celular al fungiilor [46]

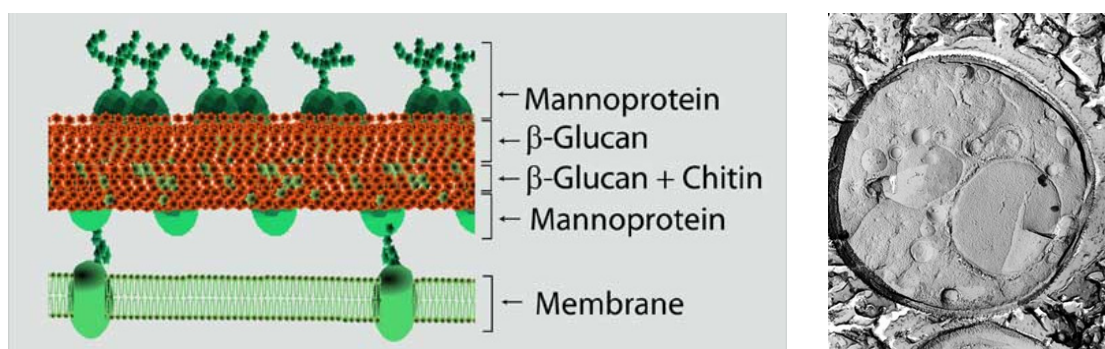


Figura 3.4. Structura peretelui celular al drojdiilor [47, 48]

3.1.4. Bacterii

Structura pereților celulari ai procariotelor este unică, mulți dintre compuși identificați în aceștia negăsindu-se altundeva în natură. Există două tipuri structurale de bază pentru pereții celulari care au fost studiate detaliat: cele ale bacteriilor Gram pozitive (fig. 3.5), respectiv Gram negative (fig. 3.6). Între cele două tipuri de pereți celulari există deosebiri majore. Celulele Gram pozitive apar netede la microscopia

electronică de baleiaj, având un singur strat de peptidoglucon, în timp ce cele Gram negative au o suprafață ondulantă, peretele celular fiind alcătuit din trei straturi (fig. 3.6).

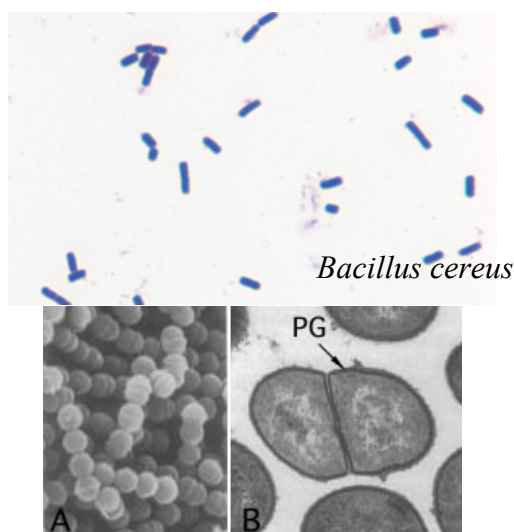


Figura 3.5. Bacterii Gram pozitive
A – streptococ B; B – strat unic de peptidoglucon

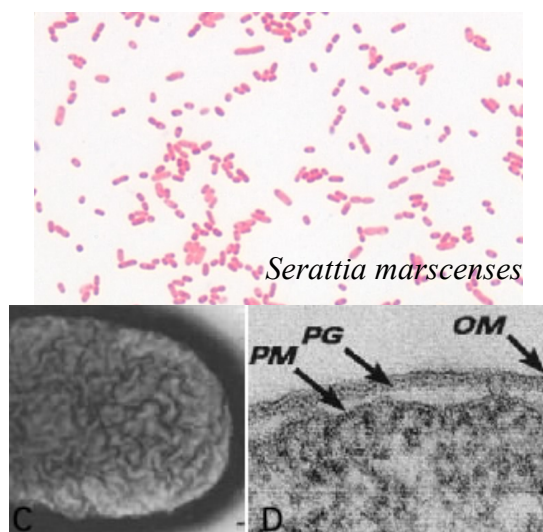


Figura 3.6. Bacterii Gram negative
C – E. Coli; D – strat triplu al peretelui celular

Celulele gram-negative prezintă un strat suplimentar în exterior. Peretele gram-positiv este mult mai gros decât cel gram-negativ. Ambele tipuri de pereți prezintă un element comun, peptidogluconul. Acesta este un strat gros și rigid compus din două straturi suprapuse de zaharuri, N-acetilglucozamină (NAG) și acid N-acetil muramic (NAM) legate între ele prin punți de aminoacizi. NAM este un component specific pereților celulelor bacteriene, nefiind identificat altundeva în natură. Structura schematică a pereților celulari este redată în fig. 3.7.

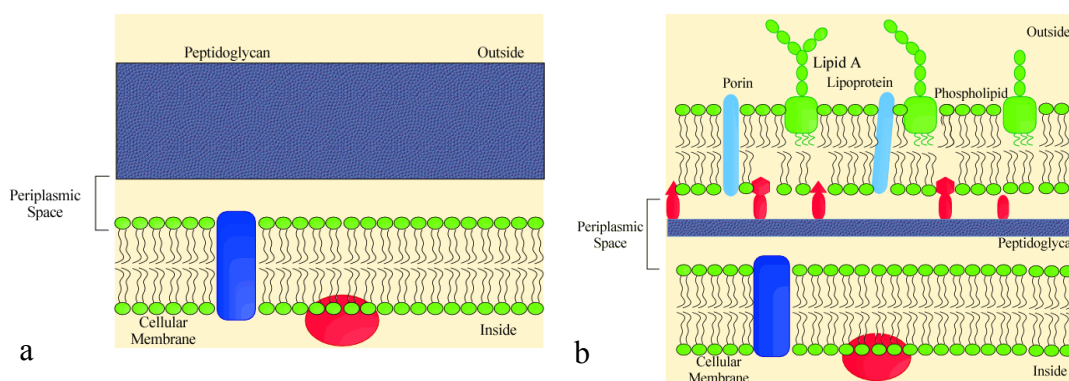


Figura 3.7. Structura peretelui celular:
a – bacterii gram-pozitive; b – bacterii gram-negative

Diferențele dintre pereții celulari ai bacteriilor gram-pozitive și gram-negative influențează hotărâtor comportarea acestor bacterii; implicat și condițiile de dezagregare necesare fiecărui tip de bacterii vor fi diferite. Tabelul 3.1 sumarizează diferențele dintre cele două tipuri de pereți celulari.

Tabelul 3.1. Proprietățile pereților celulari [49]

Proprietate	Gram Pozitiv	Gram Negativ
Grosimea peretelui, nm	20 – 80	10
Numărul de straturi al peretelui	1	2
Conținutul de peptidoglukan, %	Peste 50	10 – 20
Acid teihoic în perete	Da	Nu
Conținut de lipide și lipoproteine, %	0 – 3	58
Lipopolizaharide, %	0	13
Sensibilitate la penicilină	Da	Mai puțină
Digerat de lizozimă	Da	Puțin

Lizozima, utilizată frecvent pentru scindarea peptidogluconilor, folosită într-un mediu izotonic, va îndepărta peretele celular extern al bacteriilor gram-pozitive, eliberând conținutul spațiului periplasmatic. Datorită stratului de lipopolizaharide, bacteriile gram-negative sunt mai puțin susceptibile la lizozimă. Susceptibilitatea lor poate fi mărită în prezență de acid etilediaminotetraacetic (EDTA), care destabilizează structura lipopolizaharidelor.

3.2. METODE DE DEZAGREGARE A CELULELOR

Pentru dezagregarea celulelor, în scopul eliberării produselor intracelulare, se utilizează două categorii de metode: mecanice și nemecanice. Prin metodele mecanice, peretele celular este distrus în totalitate; metodele nemecanice realizează doar permeabilizarea pereților pentru anumiți produși, celula păstrându-și individualitatea (fig. 3.8).

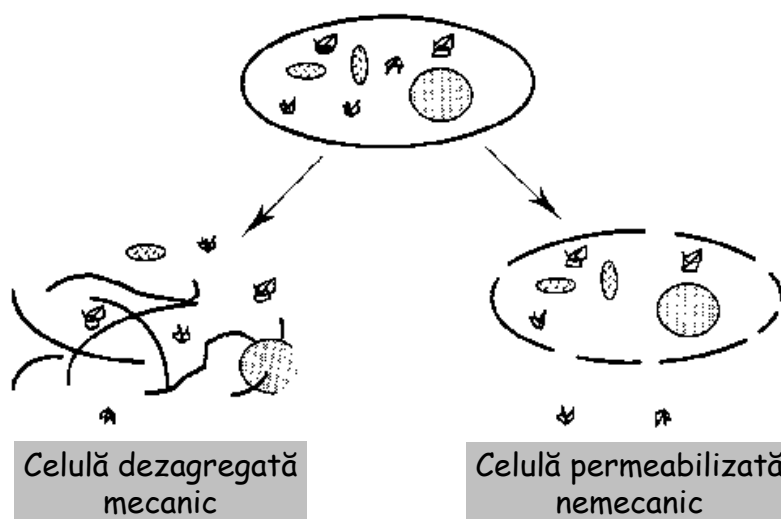


Figura 3.8. Dezagregarea mecanică și permeabilizarea nemecanică a celulelor

O clasificare mai detaliată a metodelor de dezagregare este prezentată în schema din fig. 3.9. Majoritatea metodelor sunt aplicabile la nivel de laborator sau pilot.

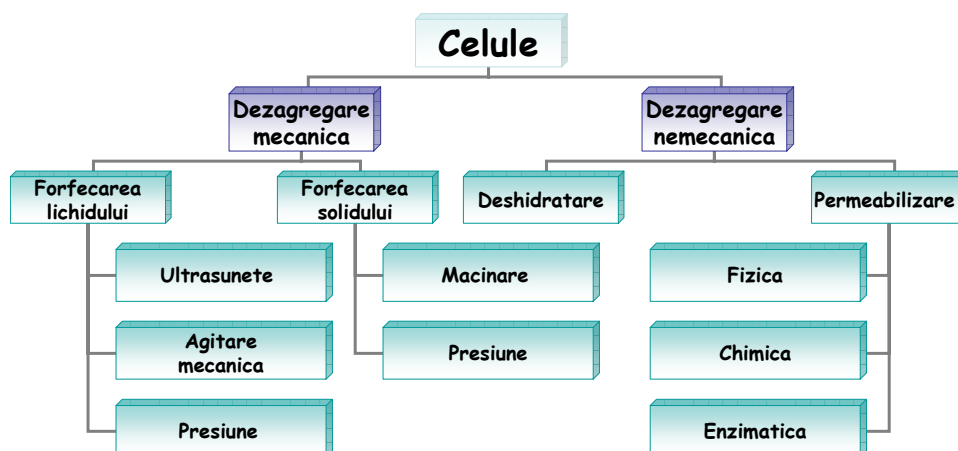


Figura 3.9. Clasificarea metodelor de dezagregare a celulelor

3.2.1. Metode mecanice de dezagregare a celulelor și țesuturilor

Această categorie de metode este larg utilizată, datorită productivității ridicate și a eficienței sporite. Principiul metodelor constă în aplicarea unor tensiuni de forfecare ridicate fie lichidului în care este dispersată masa celulară, fie masei celulare însăși. Întrucât o parte din energia mecanică introdusă în sistem este disipată sub formă de căldură, trebuie asigurată o răcire corespunzătoare a masei celulare pentru a evita degradarea produselor datorită încălzirii excesive.

3.2.1.1. Forfecarea lichidului cu ajutorul ultrasunetelor

Ultrasunetele cu frecvențe cuprinse între 20 – 50 kHz aplicate lichidelor produc fenomenul de „cavitație sonică”. În principiu, undele de înaltă frecvență sunt generate electronic, iar energia mecanică este transmisă lichidului prin intermediul unei sonde metalice care oscilează cu aceeași frecvență. Sonda este plasată în recipientul care conține masa celulară, iar oscilațiile de înaltă frecvență produc o presiune înaltă localizată care conduce la cavitație și impact. Unda de șoc formată conduce la dezagregarea celulelor. Dezagregarea depinde de alegerea corespunzătoare a parametrilor de lucru: pH, temperatură, tăria ionică a mediului.

Ultrasonarea dă bune rezultate la dezagregarea culturilor microbiene. Eliberarea proteinelor pare a fi proporțională cu consumul de putere și independentă de concentrația celulelor, iar dezagregarea celulelor crește exponențial cu timpul de expunere la ultrasunete. Cinetica procesului este descrisă de ecuația [50, 51]:

$$1 - X = \exp(-kt) \quad (3.1)$$

în care t este timpul de ultrasonare, iar X este fracția de proteine eliberate. Constanta de viteză k depinde de puterea ultrasunetelor după o relație de forma:

$$k \propto (W - W_0)^{0,9} \quad (3.2)$$

unde W este puterea acustică, iar W_0 reprezintă puterea de cavitație. Alte cercetări arată că între constanta de viteză și puterea acustică există o dependență liniară [51].

Întrucât generarea de căldură provoacă degradarea proteinelor, nu se recomandă folosirea pastelor celulare cu concentrații mai mari de 200 g/L, iar ultrasonarea se face în etape de maximum 30 de secunde, concomitent cu menținerea pe gheață a pastei celulare. Printre alte dezavantaje se poate menționa nivelul ridicat de zgomot în timpul procesării (este necesară protecția auditivă a personalului), randamentul variabil și generarea de radicali liberi care pot reacționa cu alte molecule.

Deși procesul se poate realiza în regim continuu, aplicabilitatea la scară industrială este limitată datorită consumurilor energetice ridicate și datorită faptului că ultrasunetele pot provoca denaturarea proteinelor și enzimelor [4].

3.2.1.2. Forfecarea lichidului prin agitare mecanică

Metoda este utilizată în special pentru dezagregarea țesuturilor, folosind mixere și blendere de diverse construcții, diferențiat pentru țesuturile „moi” (ficat, creier, glande endocrine) și pentru cele „tari” (mușchi cardiac). Utilizarea amestecătoarelor cu ansamblu rotor-stator (fig. 3.10) reprezintă o altă posibilitate de a provoca în lichid tensiuni de forfecare mari.

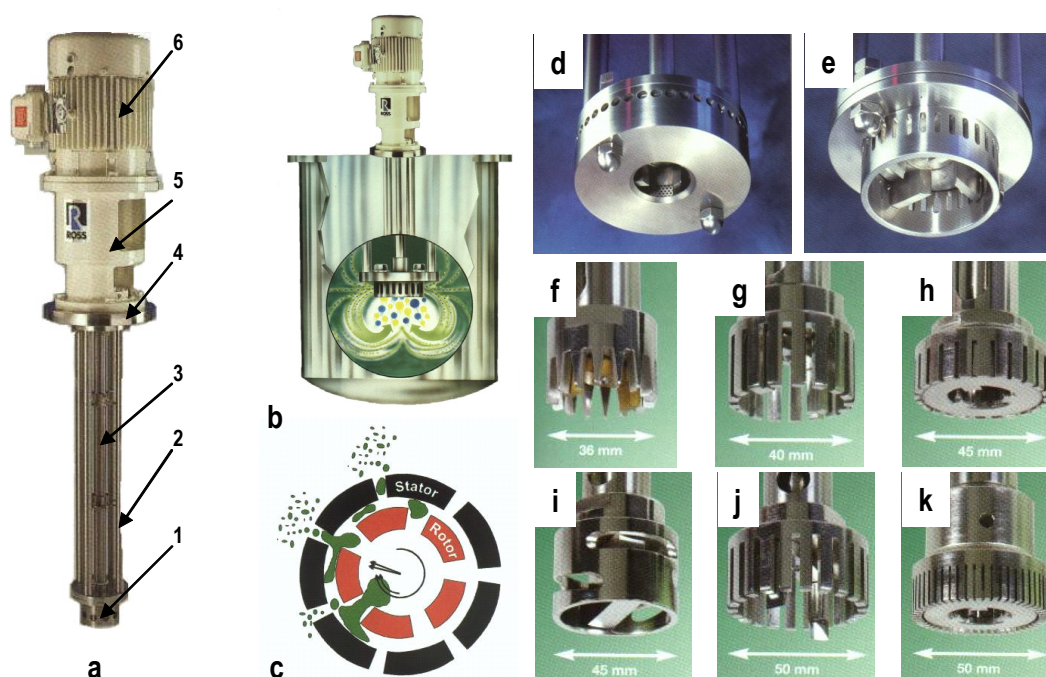


Figura 3.10. Agitatoare cu rotor și stator

a – vedere generală (1 – ansamblu rotor – stator; 2 – tijă susținere stator; 3 – ax rotor; 4 – flanșă de prindere pe recipient; 5 – cuplaj; 6 – motor de antrenare rotor); b – spectru de curgere în zona agitatorului; c – principiu de funcționare; d ... k – tipuri constructive de ansambluri rotor – stator.

3.2.1.3. Forfecarea lichidului prin presurizare

Dezagregarea se realizează forțând trecerea suspensiei de masă celulară la presiuni de 50 – 200 MPa printr-o valvă cu un orificiu îngust, după care urmează depresurizare bruscă, care induce în lichid o tensiune de forfecare capabilă de a distruge celulele. În plus, la ieșirea din valvă, celulele întâlnesc un inel de impact (fig. 3.11). Prin lovirea acestuia, precum și datorită schimbărilor bruște de direcție la trecerea prin valvă se completează procesul de dezagregare.

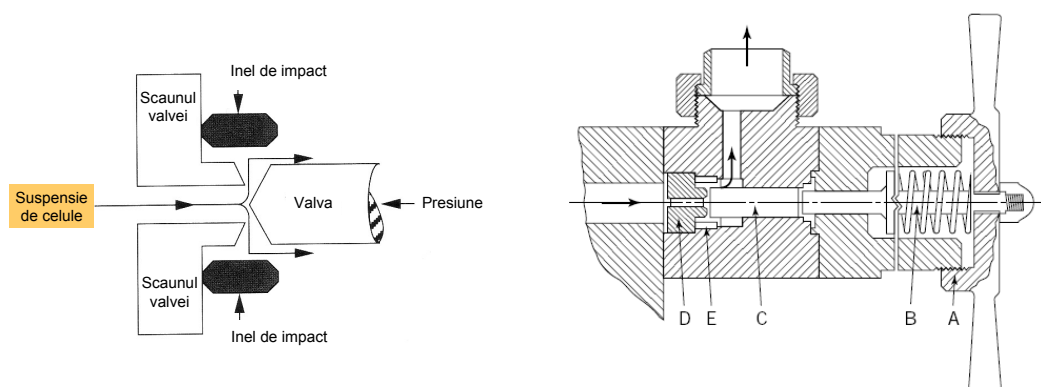


Figura 3.11. Valvă de descărcare: a – principiu de funcționare [3]; b – secțiune [52]

A – dispozitiv manual de reglare a presiunii de descărcare;
B – resort; C – valva; D – scaunul valvei; E – inel de impact.

Utilaje bazate pe astfel de dispozitive sunt utilizate pentru dezagregarea celulelor la scară industrială. Aceste utilaje sunt cunoscute sub diferite denumiri: omogenizator de înaltă presiune, omogenizator Manton-Gaulin, presă franceză. Datele experimentale arată că eficiența dezagregării depinde mai ales de presiunea de operare și de numărul de treceri al masei celulare prin aparat [3, 4, 53], dar și de configurația valvelor, de natura microorganismelor supuse dezagregării și de compoziția mediului pe care au fost cultivate microorganismele [4, 53, 54]. Pentru corelarea eficienței dezagregării cu parametrii de operare au fost propuse mai multe ecuații. Astfel, pentru distrugerea celulelor de *S. cerevisiae*, considerând că procesul de dezagregare decurge după o cinetică de ordinul I, cantitatea de produs intracelular eliberată poate fi calculată cu ecuația [55]:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = \ln\left(\frac{1}{1 - X}\right) = k \cdot N \cdot P^\alpha \quad (3.3)$$

în care R_m este cantitatea maximă de proteină care poate fi eliberată din celulă, R este cantitatea de proteină eliberată după N treceri succesive ale suspensiei de celule prin aparat, $X = R/R_m$ este fracția de celule dezagregate, k este constanta de viteză a procesului de dezagregare celulară (dependentă de temperatură), P este presiunea de lucru, α este un exponent care redă rezistența la dezintegrare a celulelor, dependent de tipul de organism și de condițiile de multiplicare. Pentru *E. coli*, $\alpha = 2,2$ [54], iar pentru *S. cerevisiae*, $\alpha = 2,9$ [55].

O analiză bazată pe teoria turbulenței propune ecuația [56]:

$$R = 1 - \exp \left\{ - \left[\frac{P - P_0}{z} \right]^\beta \right\} \quad (3.4)$$

în care R este cantitatea de proteină eliberată, P este presiunea de lucru, P_0 este presiunea de referință, z este o constantă, iar β este un parametru care depinde de concentrația celulelor.

Pentru dezagregarea *E. coli* într-un omogenizator de tip Microfluidizer (fig. 3.12), se propune ecuația:

$$\ln \left(\frac{1}{1 - X} \right) = k \cdot N^b \cdot P^\alpha \quad (3.5)$$

în care exponentul b depinde de concentrația celulelor și de viteza specifică de creștere a acestora [57].

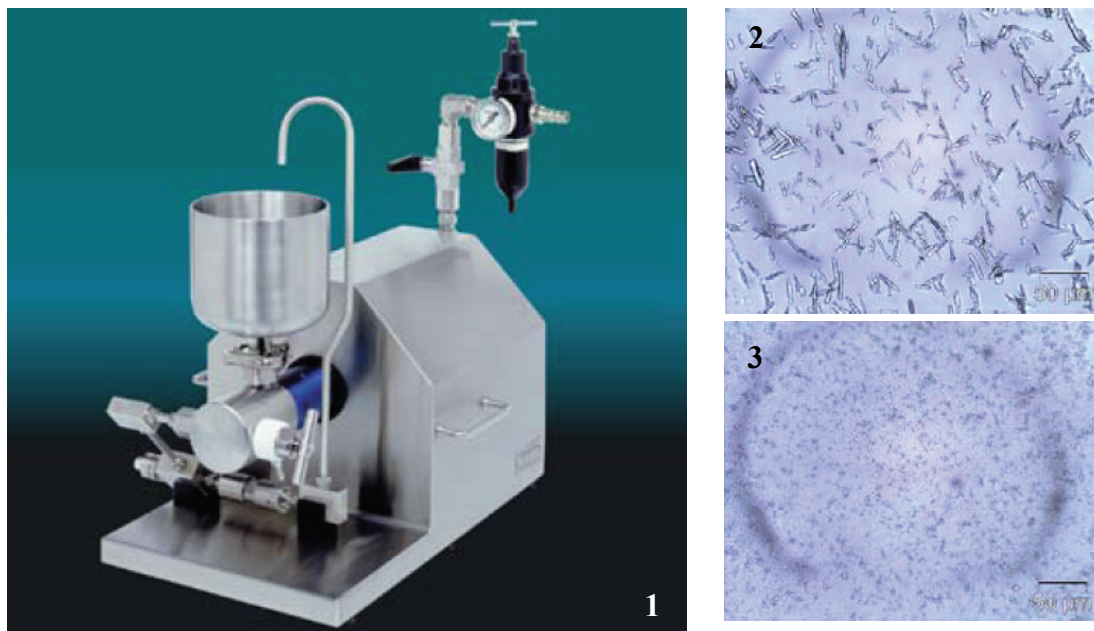


Figura 3.12. Omogenizator de înaltă presiune de tip Microfluidizer [58]

1 – omogenizator; 2 – micrografie celule înainte de prelucrare; 3 – micrografie celule după prelucrare

Ecuatiile 3.3 – 3.5 includ câte un termen care indică o dependență exponențială a gradului de dezagregare de temperatură. La fiecare creștere cu 10 MPa a căderii de presiune prin utilaj, temperatura crește cu 2 – 3 °C, în funcție și de concentrația celulelor [53]. Creșterea temperaturii, deși favorizează dezagregarea celulelor, nu este de dorit întrucât conduce la denaturarea produselor. De aceea, suspensia celulară trebuie răcită înainte și după trecerea prin omogenizator și nu trebuie lăsată să depășească temperatura de 30 °C. Sub această temperatură nu s-a sesizat pierderea activității enzimatică sau a solubilității proteinelor [59]. Răcirea se poate realiza fie cu azot răcit în prealabil, fie prin injectare de dioxid de carbon în interiorul valvei [4].

Un alt dispozitiv care permite obținerea unor tensiuni de forfecare ridicate în faza lichidă care conține suspensia de masă celulară este **moara coloidală**. Morile coloidale sunt similare din punct de vedere constructiv amestecătoarelor cu ansamblu rotor –

stator montate în flux. Deosebiriile constau în faptul că în morile coloidale cantitatea de fluid reținută în zona de lucru este mai mare, iar în fluid se introduce mai multă energie per trecere. De asemenea, morile coloidale sunt prevăzute cu un dispozitiv care permite reglarea distanței dintre rotor și stator, permițând astfel un control îmbunătățit al vitezelor de forfecare și al timpului de retenție a materialului prelucrat în moară. În fig. 3.13 este redată o moară coloidală verticală, moara coloidală *Premier*. Piesa esențială a morii este rotorul tronconic (1) care se rotește foarte rapid la distanță mică și reglabilă de carcasa (2). Principalele caracteristici ale acestei mori sunt redată în tab. 3.2 [60].

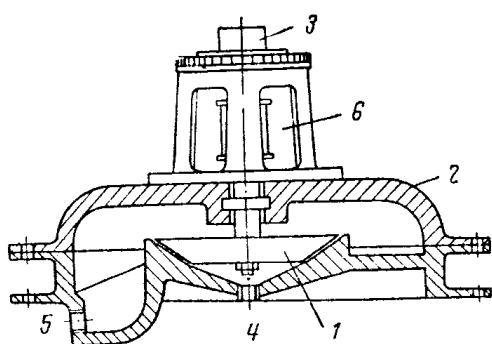


Figura 3.13. Moară coloidală verticală *Premier* [60]

1 – rotor; 2 – carcasă; 3 – șurub reglare distanță rotor – carcasă; 4 – alimentare; 5 – evacuare; 6 – roată de transmisie.

Tabelul 3.2. Caracteristici ale morilor coloidale *Premier* [60]

Caracteristica	Mori	
	industriale	mici
Diametru maxim rotor [mm]	150-400	75-100
Turație rotor [rot/min]	3600	7200-17000
Debit prelucrat [m ³ /h]	max. 6,8	0,023-0,70
Putere necesară [kW]	max. 75	-
Distanță minimă rotor-carcasă [mm]	0,04-1,0	

Moara coloidală W250HB (Chemineer, Inc.) poate funcționa în poziție orizontală (fig. 3.14), dar poate fi utilizată și în poziție verticală, prin adaptarea unui buncăr de alimentare cu conductă de recirculare și montarea morii propriu-zise pe un stativ vertical. Ansamblul rotor – stator poate fi cu suprafețe de lucru plane sau canelate. Principalele dezavantaje ale morilor coloidale sunt faptul că necesită o pompă suplimentară pentru alimentare (consum suplimentar de energie) și au debite limitate.

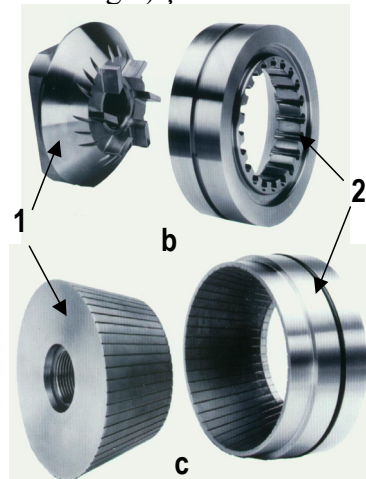
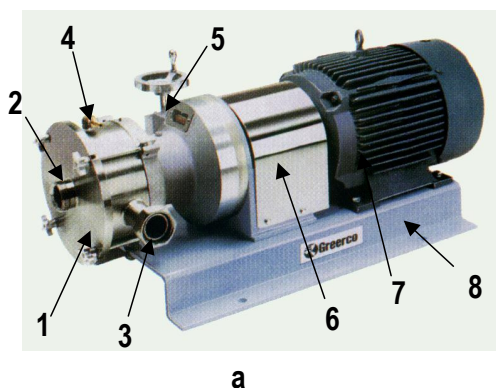


Figura 3.14. Moară coloidală W250HB (Chemineer, Inc.)

a – vedere de ansamblu: 1 – carcasa; 2 – alimentare; 3 – evacuare; 4 – racord pentru spălare; 5 – dispozitiv pentru reglarea distanței rotor-stator; 6 – cuplaj; 7 – motor de antrenare; 8 – batiu; b – ansamblu rotor (1) – stator (2) standard; c – ansamblu rotor (1) – stator (2) cu caneluri.

3.2.1.4. Forfecarea fazei solide prin măcinare

Forfecarea fazei solide prin măcinare se poate realiza în laborator în mojară cu pistil. Operația este manuală și laborioasă. Uneori, pentru facilitarea eliberării componentelor intracelulare, se adaugă la biomaterial alumină sau nisip. O altă metodă de laborator care nu necesită muncă manuală este cea care utilizează mese scuturătoare pe care materialul celular supus dezagregării este amplasat în flacoane conținând materiale abrazive.

Metoda cea mai convenabilă, atât la scară de laborator, cât și în instalațiile pilot sau industriale, este cea a măcinării în mori cu bile. Procedul constă în amestecarea la turații ridicate a suspensiei de biomasă cu bile confecționate din diferite materiale, distrugerea celulelor fiind cauzată atât de forțele de forfecare mari, cât și de coliziunea cu corpurile de măcinare sau cu pereții morii. Morile cu bile sunt disponibile în diferite configurații și capacități, de la mori discontinue de laborator cu capacitate de 40 mL, până la mori continue care pot prelucra până la 200 kg/h suspensii de drojdii sau până la 20 kg/h suspensii de masă celulară bacteriană.

În principiu, o moară cu bile este alcătuită dintr-o carcasă cilindrică orizontală sau verticală, în interiorul căreia se învârtă un agitator cu discuri dispuse concentric sau excentric. În carcasa în care s-au introdus în prealabil corpurile de măcinare (bilele), se introduce sub presiune pasta de celule care se supune dezagregării. Evacuarea pastei de celule se face printr-un dispozitiv prevăzut cu site, site vibratoare sau disc rotativ, cu rolul de a reține bilele în utilaj. Pentru prevenirea degradării termice a masei celulare, carcasa morii este prevăzută cu o manta prin care circulă un agent de răcire. Cea mai cunoscută construcție este moara cu bile Dyno-Mill, redată în fig. 3.15.

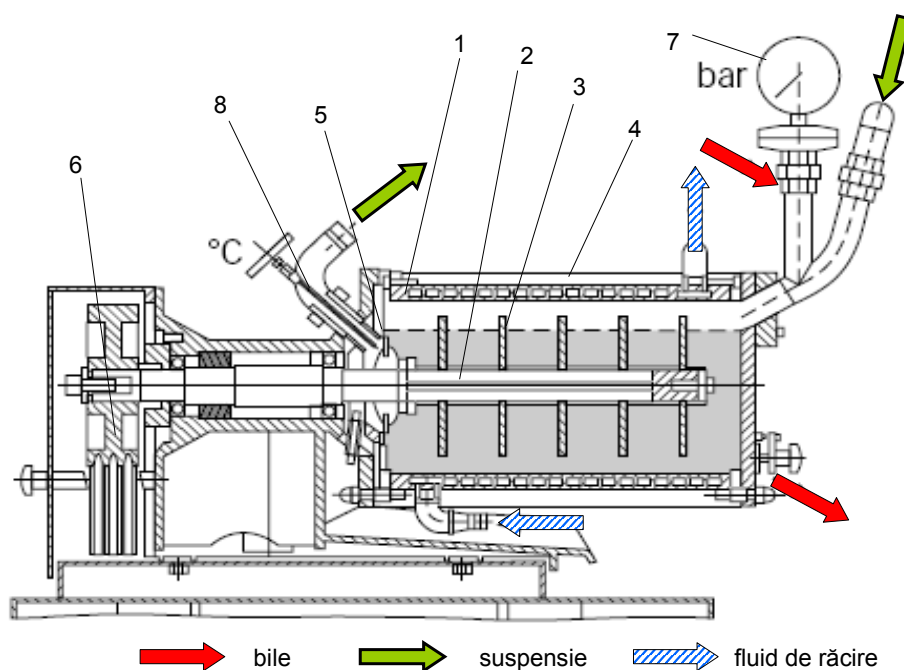


Figura 3.15. Moară cu bile Dyno-Mill [53]

1 – carcasa cilindrică; 2 – ax agitator; 3 – discuri; 4 – manta de răcire; 5 – dispozitiv de reținere a bilelor; 6 – antrenare ax agitator; 7 – manometru; 8 – termometru.

Bilele pot fi confecționate din sticlă, metal, ceramică, cu observația că există anumite restricții de folosire. De exemplu, în industria alimentară și farmaceutică nu este permisă utilizarea bilelor din sticlă cu conținut de plumb [4]. Prezența bilelor este esențială: în absența lor dezagregarea celulară nu are loc (fig. 3.16). După măcinare timp de 10 min într-o moară de tip GenoGrinder, celulele de drojdie rămân intacte (petele luminoase din fig. 3.16 a). După 5 min de măcinare în prezență de bile din sticlă cu diametrul de 0,4 mm, circa 30% din celule sunt dezagregate (petele întunecate din fig. 3.16 b). După alte 5 min de măcinare, aproape toate celulele au fost dezintegrate (fig. 3.16 c) [61].

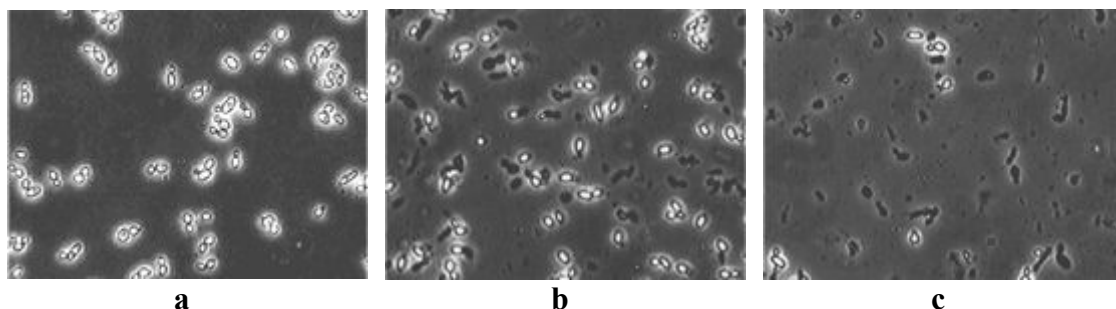


Figura 3.16. Influența bilelor asupra dezagregării celulelor de drojdie [61]

Pentru ca o moară cu bile să fie eficientă, aceasta trebuie să realizeze un grad de dezagregare celulară cât mai ridicat, cu un consum minim de energie. Acești doi parametrii cheie ai morilor cu bile sunt influențați de un număr foarte mare de factori, atât constructivi, cât și funcționali.

Mecanismul dezagregării este foarte complex, dezintegrarea celulelor apărând ca rezultat al forfecării atât a fazei lichide, cât și a fazei solide datorită impactului bilelor într-un câmp de turbulență intensă. Procesul poate fi descris satisfăcător de o ecuație cinetică de ordinul I, care pentru operarea în regim discontinuu, sau pentru operarea continuă în condițiile curgerii cu deplasare totală se scrie:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = \ln\left(\frac{1}{1 - X}\right) = k \cdot t \quad (3.6)$$

Deoarece la operarea continuă există un anumit grad de amestecare inversă, un model mai apropiat de realitate ar fi cel al n reactoare continue cu amestecare perfectă înseriate, caz în care ecuația cinetică se scrie:

$$\frac{R_m}{R_m - R} = \frac{1}{1 - X} = 1 + \left(\frac{k \cdot \theta}{n}\right)^n \quad (3.7)$$

În aceste ecuații R_m este cantitatea maximă de proteină care poate fi eliberată din celulă, R este cantitatea de proteină eliberată în timpul t , $X = R/R_m$ este fracția de celule dezagregate (conversia, gradul de dezintegrare), k este viteza specifică a procesului de dezagregare celulară, $\theta = V/Q$ este timpul mediu de staționare, V este volumul liber total al camerei de măcinare, iar Q este debitul suspensiei de celule prin moară [62].

Pe lângă caracteristicile constructive ale morii (volumul și geometria camerei de măcinare, numărul de discuri pe unitatea de volum de moară, geometria și materialul de construcție al discurilor), gradul de dezintegrare este influențat și de parametrii de

operare ai morii: viteza agitatorului, concentrația masei celulare, mărimea bilelor, concentrația bilelor, temperatura și debitul suspensiei [53].

Viteza agitatorului determină frecvența coliziunii bilelor și intensitatea forfecării; ca urmare, între anumite limite, viteza specifică a dezagregării celulare este direct proporțională cu viteza periferică a agitatorului [62]. Această viteză se recomandă să fie de 5 – 15 m/s; la valori mai mari crește puternic consumul de energie, se generează mai multă căldură, se accentuează eroziunea bilelor, iar produsele sensibile la forfecare se pot inactiva.

Concentrația masei celulare are o influență mai complexă asupra vitezei procesului. De exemplu, la dezagregarea *S. cerevisiae*, variația concentrației masei celulare între 4 – 20 % m/v nu influențează viteza procesului, confirmându-se astfel cinetica de ordin I. Alte cercetări au arătat că dezagregarea prezintă un maxim la concentrații celulare de 35 – 40% (masă umedă), după care scade, scăderea fiind mai pronunțată la viteze mici de agitare. Fenomenul este atribuit modificării comportării reologice a suspensiei la modificarea concentrației. Concentrația optimă variază de la caz la caz; trebuie ținut cont și de faptul că la concentrații scăzute ale suspensiei celulare cantitatea de căldură generată este mai mică, ceea ce este bine, însă consumul de putere pe unitatea de masă de celule prelucrate este mai mare, ceea ce reprezintă un dezavantaj. La concentrații scăzute (sub 5% solide) se observă o uzură avansată a morii și a bilelor. Drept urmare, optimul se determină experimental, situându-se între 30 – 60%, sau, mai frecvent, între 40 – 50% (masă umedă) [53].

Dimensiunile bilelor sunt dictate de mai multe considerente. De regulă, viteza de dezagregare crește cu scăderea diametrului bilelor, dar tendința de plutire a bilelor foarte mici și dificultățile privind reținerea acestora în moară limitează diametrul minim al bilelor utilizate la 0,2 mm în aplicațiile de laborator și la 0,4 mm în aplicațiile industriale în regim continuu [53]. La aceeași încărcare cu bile, există un diametru optim al bilelor care depinde de natura celulelor supuse dezagregării și de localizarea produsului dorit în interiorul celulei. Pentru dezagregarea celulelor vegetale, animale, a drojdiilor și a sporilor bacterieni, sunt recomandate bile din silice sau zircon având diametrul de 0,2 – 0,4 mm, în timp ce pentru dezagregarea mușcăiurilor și a fungiilor sunt recomandate bile din silice sau sticlă având diametrul de 0,8 – 1,0 mm [63]. Bilele cu diametru mai mare sunt preferate când produsul este localizat în regiunea periplasmică, în timp ce pentru produsele citoplasmice se utilizează bile de dimensiuni mai mici [64].

Fracția volumică a bilelor (volumul bilelor/volumul camerei de măcinare) influențează favorabil eliberarea proteinelor din celule. Fracția de bile recomandată este de 80 – 90%, limita superioară fiind în general impusă de consumul energetic ridicat și de dificultățile legate de îndepărtarea căldurii degajate în timpul măcinării.

Deși **temperatura** influențează în mod favorabil viteza dezagregării, căldura degajată în proces trebuie îndepărtată pentru a nu se produce denaturarea sau inactivarea produselor. Suspensia celulară este răcită atât la intrarea, cât și la ieșirea din moară, iar moara este prevăzută cu o manta prin care circulă un agent de răcire, astfel încât procesul să se desfășoare în intervalul de temperatură 5 – 40 °C. În cazul morilor de capacități mari (peste 20 L), răcirea prin manta nu este suficientă, fiind necesară vehicularea agentului de răcire și prin axul și discurile agitatorului [64].

Efectul debitului asupra vitezei procesului ar trebui să reflecte efectul timpului de staționare (θ) al masei celulare în interiorul camerei de măcinare. Dacă procesul decurge după o cinetică de ordin I, conversia la o singură trecere prin moară ar trebui să scadă cu creșterea debitului. Odată cu creșterea debitului, scade gradul de amestecare inversă (dispersia longitudinală), astfel încât conversia nu mai poate fi exprimată ca o funcție simplă de debitul masei celulare. Pe de altă parte, consumul specific de putere (pe unitatea de masă de suspensie prelucrată) scade puternic cu creșterea debitului. Din acest motiv se recomandă operarea morilor cu bile la debite mari, scăderea conversiei putând fi contracarată prin recircularea parțială a suspensiei prin camera de măcinare. Mai trebuie menționat faptul că prin creșterea timpului de staționare (scăderea debitului) viscozitatea suspensiei poate să scadă, întrucât forfecarea prelungită poate provoca degradarea ADN, a cărui structură este sensibilă la forfecare [65].

Alte studii [66] corelează gradul de dezintegrare cu consumul energetic specific, ajungând la concluzia că valorificarea maximă a energiei introduse în moară este atinsă pentru următoarea combinație de parametri: bile de dimensiuni reduse, concentrații de masă celulară medii spre ridicate, viteze de agitare scăzute spre medii. Aceste rezultate pot sta la baza transpunerii la scară a procesului de dezagregare celulară în mori cu bile. În cazul combinației de parametri: concentrații de masă celulară reduse, viteze de agitare ridicate, bile de dimensiuni mari, gradul de dezintegrare a fost corelat cu frecvența stării de tensiune (care este proporțională cu produsul dintre viteza de agitare și timpul de dezintegrare), iar corelația a fost verificată experimental.

Câteva valori orientative ale consumului energetic specific pentru dezagregarea unor microorganisme sunt redată în tab. 3.3.

Tabelul 3.3. Consumuri energetice specifice la dezagregarea unor microorganisme în mori cu bile [4]

Microorganism	Grad de dezintegrare [%]	Concentrația biomasei [% s.u.]	Consum energetic specific [J/g]
<i>Saccharomices cerevisiae</i>	40	13,5	180
	42	13,5	800
	65	13,5	430
	80	6,0	1960
	80	11,0	900
	80	16,0	900
	85	10 – 20	930
	95	17,0	720 – 790
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	95	17,0	720 – 790
<i>Candida utilis</i>	85 – 90	17,0	930 – 1190

3.2.1.5. Forfecarea fazei solide prin presurizare

Faza solidă este formată din pasta celulară în prealabil înghețată. Prin extrudarea acestei paste printr-un orificiu îngust, la presiuni de până la 550 MPa, se realizează dezagregarea celulelor. Datorită forțelor de forfecare ridicate care apar la trecerea prin orificiu, efectului abraziv al cristalelor de gheață, modificării dimensiunilor cristalelor de gheață, comportării viscoplastice la curgerea suspensiei prin orificiu, are loc o distrugere avansată a masei celulare. În plus, prin extrudarea pastei congelate se

conservă calitățile biologice ale produselor intracelulare obținute [4]. Productivitatea metodei este influențată de temperatură, de natura și concentrația pastei celulare.

Pentru realizarea practică a procesului sunt cunoscute două dispozitive: presa Hughes și presa X. Aceste echipamente generează presiuni de 150 – 230 MPa. În timp ce presa Hughes poate fi utilizată doar la scară de laborator în regim discontinuu, presa X poate fi operată semicontinuu și se pretează la transpunere la scară pentru nivele pilot și industriale [64].

3.2.2. Metode nemecanice de dezagregare a celulelor și țesuturilor

Metodele nemecanice de dezagregare implică fie deshidratarea, fie liza (permeabilizarea) fizică, chimică sau enzimatică (fig. 3.9) a pereților celulari. Spre deosebire de metodele mecanice, metodele nemecanice nu distrug complet peretele celular, ci doar îl permeabilizează, permițând difuzia în exteriorul celulei a anumitor componenți. Deși metodele nemecanice au consumuri energetice inferioare metodelor mecanice de dezagregare a masei celulare, majoritatea lor sunt dezvoltate și aplicate la nivel de laborator sau, cel mult, de pilot.

3.2.2.1. Dezagregarea celulelor prin deshidratare

Îndepărtarea apei din celulă provoacă deteriorarea membranei citoplasmice, crescându-i astfel permeabilitatea. Deshidratarea se poate realiza prin liofilizare, uscare prin pulverizare, uscare în aer sau uscare sub vacuum. Îndepărtarea apei se poate realiza și prin adăugarea la materialul celular a unui solvent cu afinitate mare pentru apă: etanol, metanol sau acetonă.

Deshidratarea prezintă dezavantajul că poate cauza denaturarea unor molecule proteice sau a altor componenți intracelulari utili [4].

3.2.2.2. Permeabilizarea celulelor prin metode fizice

Metodele fizice de permeabilizare au o eficiență relativ redusă, chiar după un număr mare de cicluri. Principalele metode utilizate sunt: tratarea termică, înghețarea – dezghețarea, decompresia explozivă și șocul osmotik.

Tratarea termică este utilizabilă doar în cazul produselor rezistente la temperatură, de exemplu în extracția enzimelor termostabile din bacterii. Viteza autolizei scade cu temperatura, în funcție și de tipul de organism utilizat.

Înghețarea – dezghețarea este o tehnică în care suspensia de celule este înghețată într-o baie răcită cu un amestec de CO₂ solid (zăpadă carbonică) și etanol, iar apoi este dezghețată la temperatura camerei [67]. Repetând de mai multe ori ciclul de îngheț – dezgheț, membranele celulare sunt distruse de către cristalele ascuțite de gheață care încep să crească din interiorul celulei. Durata procesului este destul de mare, iar unii componenți intracelulari pot fi sensibili la astfel de tratamente. Procedul poate fi aplicat anumitor celule microbiene și eucariote din care se eliberează proteinele

periplasmice și intracelulare. Procesul este influențat de natura celulelor, temperatura finală de congelare, precum și de viteza proceselor de încălzire și de răcire. Trebuie menționat faptul că multe organisme sunt rezistente la un astfel de tratament datorită acumulării intracelulare a unor compuși care previn înghețarea.

Decompresia explozivă („bomba celulară”) necesită mai întâi saturarea masei celulare cu azot sau alt gaz inert. Procesul decurge la presiuni ridicate, de până la 175 MPa. Prin depresurizare bruscă, gazul dizolvat în interiorul celulelor este eliberat rapid, bulele de gaz formate provocând ruperea pereților celulari și a membranelor. Pentru a preveni denaturarea proteinelor spumarea trebuie redusă la minimum. Procesul poate fi aplicat doar celulelor ușor de dezagregat, cum sunt celulele animale. *E. coli*, drojdiile, fungiile și sporii nu pot fi dezagregate corespunzător prin această metodă [68].

Șocul osmotic apare ca urmare a modificării rapide a concentrației sărurilor din mediu. Mecanismul distrugerii are la bază capacitatea celulelor de a echilibra rapid concentrația lor internă cu cea a mediului extern, prin osmoză. De exemplu, celulele sunt incubate timp de 30 min într-o soluție cu presiune osmotică ridicată (20% zaharoză, de. ex.), după care sunt centrifugate și resuspendate în apă. Pătrunderea rapidă a apei în celulă (pentru echilibrarea concentrației interne de zaharoză – 20% cu cea externă – 0%) produce o presiune hidrostatică (șoc osmotic) care produce liza celulară [4, 67]. Deși insuficient pentru distrugerea celulei, șocul osmotic poate elibera anumite proteine, sau poate fi o metodă de intensificare a procesului de autoliză. Metoda este utilizabilă pentru celule vegetale, animale, precum și pentru unele bacterii Gram negative.

3.2.2.2. Permeabilizarea celulelor prin metode chimice

Permeabilizarea sau liza chimică este utilizată atât pentru distrugerea pereților celulari, cât și pentru extracția unor componenți intracelulari. Principalul dezavantaj al lizei chimice este introducerea în sistem a unor substanțe care ulterior trebuie îndepărtate, mărindu-se astfel costurile de producție. Un alt dezavantaj îl reprezintă timpul îndelungat necesar realizării procesului.

Tratarea cu solvenți organici (toluen, eter, fenil-etil alcool, dimetilsulfoxid, metanol, etc.) conduce la formarea de canale prin membrana celulară [67]. O parte din acești solvenți pot crea probleme la separarea produselor eliberate, iar unii dintre ei sunt toxici [4].

Compușii tensioactivi (detergenți ionici – dodecilsulfat de sodiu și neionici – Triton X-100), utilizați ca atare sau în combinație cu agenți haotropici (clorură de guanidină, uree) sunt eficienți pentru eliberarea enzimelor legate de membrana celulară. Acțiunea detergenților este puternic influențată de pH și de temperatură. Detergenții ionici sunt mai eficienți, însă pot determina și denaturarea moleculelor proteice eliberate. Alte dezavantaje legate de utilizarea detergenților sunt spumarea, precipitarea, costul ridicat al detergenților neionici, precum și dificultatea îndepărtării din produsul final [4, 64, 67].

Bazele pot fi utilizate ca agenți ieftini de extragere a enzimelor intracelulare stabile la pH > 11, fără distrugerea peretelui celular. Metoda poate fi utilizată și la scară

industrială. O pretratare alcalină a celulelor slăbește rezistența peretelui celular, facilitând dezagregarea mecanică cu consumuri energetice mai reduse [69].

Acizii realizează cel mai rapid hidroliza componentelor care alcătuiesc pereții celulari (6 – 12 h). Deși randamentele hidrolizei acide sunt ridicate, se produc pierderi în proteine, vitamine și compuși aromatici [4].

Alți compuși utilizați în liza chimică sunt sărurile, zaharurile, esterii acetici, compuși care induc plasmoliza, extrăgând materialul intracelular, în general fără denaturarea acestuia. Antibioticele pot fi de asemenea utilizate pentru distrugerea membranei celulare a unor microorganisme [4].

În general, atunci când se urmărește transpunerea la scară a procesului de dezagregare celulară, adăugarea de agenți chimici trebuie evitată, în special în producția substanțelor proteice, în principal pentru a nu încălca excesiv costurile, atât cu chimicalele propriu-zise, cât și cu cheltuielile de îndepărtare a acestora.

3.2.2.2. Permeabilizarea celulelor prin metode enzimatică

Distrugerea pereților celulari cu ajutorul enzimelor devine o tehnică din ce în ce mai atractivă, datorită avantajelor pe care le prezintă: (i) selectivitate ridicată pentru un anumit produs (cu efecte benefice în izolarea și purificarea produsului); (ii) o viteză ridicată și un randament crescut în produsul eliberat; (iii) deteriorare minimă a produsului eliberat; (iv) posibilitatea utilizării unor condiții blânde de temperatură și pH; (v) absența producerii de resturi celulare.

Aplicarea **lizei enzimatică** necesită în prealabil selectarea enzimei sau sistemului enzimatic care să corespundă scopului propus și stabilirea condițiilor în care liza este eficientă [4]. Mai mult decât orice altă tehnică, liza enzimatică necesită o bună înțelegere a detaliilor structurii fizico-chimice a pereților celulari. Nici o enzimă nu este capabilă să degradeze complet pereții celulari, datorită compoziției complexe a acestora. Așa cum s-a mai arătat, componentul de bază al structurii pereților celulelor bacteriene este peptidoglicanul. În cazul bacteriilor gram-pozitive, o singură enzimă poate liza celula, dar un amestec de enzime (glucozidaze și peptidaze) acționând sinergetic pot ajuta liza peptidoglicanului. În cazul bacteriilor gram-negative este necesară o pretratare cu un agent tensioactiv pentru îndepărtarea membranei exterioare.

Tabelul 3.4. Enzime importante în degradarea pereților celulelor microbiene [53]

Organismul	Enzima
Bacterii	Glicozidaze
	Acetilmuramoid-L-alanil amidaze
	Peptidaze
Fungii, drojdii	β -(1,3)-glucanaze
	β -(1,6)-glucanaze
	Mananaze
	Chitinaze
Alge	Proteaze
	Celulaze

În tab. 3.4 sunt prezentate principalele enzime care pot ataca membrana celulară a diverselor microorganisme. Majoritatea enzimelor litice sunt active și asupra pereților celulelor moarte (liliofilizate sau termolizate).

Principala constrângere în utilizarea lizei enzimaticice este dată de costul ridicat al enzimelor litice. Singura enzimă litică disponibilă la scară comercială este lizozima extrasă din albușul ouălor de găină. Aceasta a fost frecvent utilizată în liza unor bacterii gram-pozitive, la o viteză de $5 \cdot 10^4$ UI/(kg.h) raportat la substanța uscată [64]. Aceeași enzimă este utilizată și pentru liza *E. coli*, cunoscută drept o bacterie cu pereți celulari duri [67].

Pe lângă costul ridicat al enzimelor litice, o altă problemă, cea a impurificării produsului, face ca liza enzimatică să fie încă utilizată cu reținere. De exemplu, enzimele derivate din ouă pot provoca probleme dacă urme din acestea rămân în proteinele purificate utilizate în scop terapeutic, știut fiind faptul că unele persoane sunt alergice la ouă [64, 67]. Enzimele extrase din drojdii sau din sistemul digestiv al gasteropodelor nu pot fi utilizate în procese transpuse la scară întrucât sunt amestecuri de enzime [67]. Impurificarea produsului ar putea fi evitată prin folosirea de enzime litice imobilizate pe un suport macromolecular [4, 70, 71].

La fel ca și alte procedee de dezagregare nemecanice, liza enzimatică este un proces lent, dar combinată cu alte metode se pot obține grade ridicate de dezagregare la viteze convenabile. Astfel, dezagregarea *C. utilis* în omogenizatoare de înaltă presiune a fost îmbunătățită prin tratarea prealabilă a celulelor cu zimolază [65]. Celule de *Bacillus cereus* pretratate cu 0,5 g celozil¹/g celule umede la pH = 5,5 și 30 °C au fost dezagregate în proporție de 98% la o singură trecere printr-un omogenizator Manton-Gaulin la 70 MPa. Celulele netratate au fost dezagregate doar în proporție de 40% în aceleași condiții de lucru. Același tratament enzimatic a facilitat dezagregarea și în mori cu bile [72].

Un caz particular al lizei enzimaticice este **autoliza**, proces în care celulele își produc singure enzimele litice. Ca proces de autodigerare, autoliza este un proces foarte lent, care are loc într-o perioadă de ordinul zilelor, ceea ce reprezintă un inconvenient major. Datorită acestui fapt, autoliza nu este o metodă uzuală pentru dezagregarea celulelor. Autoliza drojdiilor, proces realizat la scară industrială pentru obținerea autolizatorilor de drojdie, necesită 12 – 24 h la 45 – 50 °C [4]. Procesul poate fi accelerat prin uscarea sau înghețarea – dezghețarea prealabilă a celulelor. Alte metode de inducere a autolizei sunt plasmoliza cu ajutorul surfactanților, solvenților organici (toluen sau butanol), compușilor tiolici. Procesul de autoliză este influențat și de valoarea pH-ului, componența și concentrația mediului de cultură, stadiul de dezvoltare a microorganismului.

Enzimele autolitice sunt importante pentru creșterea și multiplicarea celulelor, dar odată ce sunt dereglate, ele atacă peptidoglukanul peretelui celular bacterian. Există experimentări în care, prin inginerie genetică, fie li s-a inhibat microorganismelor capacitatea de a-și sintetiza peretele celular, fie li s-a introdus informația genetică pentru producerea de enzime litice [73].

¹ Celozil – enzimă litică produsă de *Streptomyces coelicolor*

3.3. INFLUENȚA DEZAGREGĂRII ASUPRA PROCESELOR ULTERIOARE DE SEPARARE

Așa cum s-a arătat și în paragraful 2.4.3.4, separarea resturilor celulare este o operație dificilă, datorită dimensiunilor reduse ale particulelor și a viscozității ridicate a sistemului. Dezagregarea mecanică sau tratamentele litice produc resturi celulare de dimensiuni uneori sub 0,1 μm , foarte dificil de separat. La astfel de dimensiuni, filtrarea și centrifugarea sunt puțin eficiente.

Centrifugarea poate fi utilizată pentru separarea resturilor celulare mai mari de 0,5 μm . Sub această valoare, în medii viscoase în special, separarea prin centrifugare nu poate fi realizată decât eventual după o floculare prealabilă a resturilor celulare [74].

Filtrarea cu adjuvant în filtre celulare rotative este o metodă utilizată pentru separarea resturilor celulare de drojdii [53].

Microfiltrarea în curent încrucișat are avantajul că previne formarea stratului de precipitat și nu necesită adjuvanți costisitori. Dificultățile care apar sunt legate de murdărirea membranelor și de apariția polarizării de concentrație, care contribuie la scăderea rapidă a fluxului de permeat și limitează concentrația resturilor celulare în retenat. Pe lângă aceste dezavantaje operaționale trebuie ținut cont de faptul că poate avea loc adsorbția puternică a proteinelor pe resturile celulare, fenomenul depinzând de concentrație, temperatură, pH și tărie ionică.

Extracția în sisteme bifazice apoase este o metodă atractivă pentru separarea celulelor și resturilor celulare din soluțiile de proteine, dar este costisitoare și recuperarea reactanților este dificilă.

Alegerea metodelor de dezagregare, dar și a condițiilor de realizare a dezagregării reprezintă o provocare: cantitatea de proteine intracelulare eliberată crește cu creșterea gradului de mărunțire al resturilor celulare [75], în schimb, pe măsură ce dimensiunile resturilor celulare se micșorează, separarea lor devine din ce în ce mai dificilă [76]. Particulele submicronice trec ușor în supernatant după centrifugare, întârzie precipitarea fracționată și au tendința de a colmata coloanele cromatografice sau membranele utilizate în procesele ulterioare de separare [74, 76].

Dimensiunile fragmentelor celulare rezultate la dezagregare depind și de metoda de dezagregare folosită, precum și de parametrii procesului. Într-un studiu comparativ a fost observată comportarea resturilor celulare de *E. coli* obținute într-o moară cu bile, respectiv într-un omogenizator de înaltă presiune [77]. Deși nu s-au observat diferențe semnificative în ceea ce privește randamentul în proteine și viteza de eliberare a acestora, caracteristicile resturilor celulare (distribuția după mărime, separabilitatea prin centrifugare și filtrare în adâncime) au fost diferite în cele două procedee de dezagregare utilizate. Timpul mediu de staționare a suspensiei celulare în moara cu bile nu afectează semnificativ distribuția după mărime a resturilor celulare; în omogenizatorul de înaltă presiune, cu creșterea numărului de treceri prin aparat, spectrul dimensional al resturilor celulare se lărgeste.

În cazul celulelor de drojdii, s-a stabilit că presiunea minimă la care are loc dezagregarea celulelor într-un omogenizator de înaltă presiune este de 11,5 MPa [78], iar dimensiunile resturilor celulare depind de condițiile de multiplicare [59].

În multe cazuri s-a constatat că o pretratare a masei celulare cu agenți haotropici și detergenți, conduce la obținerea unor resturi celulare de dimensiuni mai mari decât în absența tratării. Pretratarea este realizată și în scopul evitării degradării produselor labile eliberate din celule. Astfel, la suspensia de celule se pot adăuga inhibitori de proteaze (pentru a proteja proteinele eliberate), antioxidanți (pentru evitarea oxidării punților disulfidice), substanțe tampon (pentru menținerea pH-ului în intervalul dorit). De toate aceste adaosuri trebuie ținut cont în etapele ulterioare de izolare, separare și purificare.

Dezvoltarea tehnologiei ADN recombinat a permis obținerea unui mare număr de proteine terapeutice sub formă de corpi de incluziune în citoplasma unor bacterii, în special *E. coli*. Acești corpi de incluziune sunt agregate amorfe de proteine, constând în polipeptide pliate „greșit” (frecvent denaturate), cu dimensiuni mari (0,8 – 1,5 μm) și densități mai ridicate ($\sim 1,2 - 1,35 \text{ kg/L}$) decât restul materialului celular. Pentru solubilizarea lor în apă este necesară utilizarea de detergenți sau de agenți haotropi [79]. Procedura standard de purificare a proteinelor din corpii de incluziune începe cu izolarea acestora din materialul rămas în urma dezagregării masei celulare. Dezagregarea cea mai bună se obține în omogenizatoare de înaltă presiune. Corpii de incluziune se separă prin centrifugare timp de 5 – 10 min în centrifuge de clasare cu $z = 5 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$, când produsele solubile și resturile celulare ușoare trec în supernatant (vezi și paragraful 2.4.3.5) [79, 80]. O alternativă de separare este filtrarea membranară în curent încrucișat [81]. Corpii de incluziune astfel separați sunt apoi spălați fie cu o soluție diluată de detergenți, fie cu un agent haotropic (uree sau clorhidrat de guanidină). Deseori se adaugă agenți reducători (dithiothreitol, β -mercaptoetanol) pentru ruperea punților disulfidice incorecte. Proteina astfel solubilizată și redusă este pregătită pentru purificare și repliere.

4. Separarea prin extracție

Extracția este procesul prin care unul sau mai mulți componenți dintr-un amestec lichid omogen sau dintr-un amestec solid se separă, total sau parțial, pe baza diferenței de solubilitate a acestora în unul sau mai mulți solvenți. Dacă amestecul inițial supus separării este lichid, operația prin care se realizează separarea poartă denumirea de *extracție lichid – lichid*. Dacă amestecul de separat este în fază solidă, operația de separare se numește *extracție lichid – solid* [4, 82, 83], spălare extractivă, percolare sau lixiviere [84, 85]. În literatura de limbă engleză termenii încetățeniți pentru cele două operații unitare sunt respectiv *liquid – liquid extraction* și *leaching* [86, 87]. Recomandările IUPAC¹ prevăd utilizarea termenului de *distribuție lichid – lichid* (*liquid – liquid distribution*) [88]. Dacă extracția se realizează numai prin interacțiuni de natură fizică între componentul care se extrage (solut) și solventul/solvenții de extracție discutăm despre *extracție fizică*, iar dacă între solut și extractant intervin și reacții chimice discutăm despre *extracție reactivă* [4, 89].

Agenții de extracție (solvenții) clasici se găsesc în stare lichidă, dar astăzi se utilizează pe scară din ce în ce mai largă solvenți la parametri critici sau deasupra acestora, când nu se mai poate face distincția dintre starea de lichid și cea de gaz, caz în care vorbim despre *extracția cu fluide supercritice* (FSC). Alte modalități de realizare a extracției în procesele de bioseparare (dar nu numai) implică utilizarea diverselor tipuri de membrane lichide (*extracția prin membrane lichide* sau *pertracția*), a fazelor apoase nemiscibile între ele (*extracția în sisteme apoase bifazice – SAB*) sau a microemulsiilor (*extracția prin micle inverse*).

Întrucât bazele teoretice ale procesului de extracție, calculul procesului, echipamentele tipice utilizate și criteriile de alegere a acestora au fost discutate pe larg în cadrul cursului de *Operații Unitare*, în acest capitol se va insista doar asupra acelor aspecte specifice utilizării proceselor de extracție în separarea compușilor obținuți prin biosinteză, sau a celor extrași din produse naturale (microbiene, vegetale, animale).

¹ IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) - Uniunea Internațională pentru Chimie Pură și Aplicată

4.1. EXTRAȚIA FIZICĂ LICHID – LICHID

4.1.1. Aspecte generale privind extracția lichid – lichid

Se consideră o soluție binară, omogenă, formată dintr-un dizolvant inițial A și un solut B. Din această soluție, solutul B se poate separa cu ajutorul unui alt solvent S dacă: (i) S și A sunt total nemiscibili (cazul ideal) sau parțial miscibili; (ii) B este solubil în S; (iii) la echilibru, concentrația solutului B în solventul S (Y_B) este mai mare decât concentrația aceluiași solut B în solventul inițial A (X_B):

$$Y_B > X_B \quad (4.1)$$

După amestecarea soluției de B în A cu solventul S și după sedimentarea amestecului, se formează două straturi: un strat de *extract* (B dizolvat în S, cu eventuale urme de A) și un strat de *rafinat* (component majoritar A, cu mai puțin B dizolvat, eventual cu urme de S), care pot fi separate pe baza diferenței de densitate (fig. 4.1). Solutul B, solubil atât în A cât și în S se repartizează între cei doi solvenți după un *coeficient de distribuție* (de partiție, de repartiție):

$$K_N = \frac{Y_B}{X_B} = \frac{\text{conc. solutului B în faza de EXTRACT}}{\text{conc. solutului B în faza de RAFINAT}} \quad (4.2)$$

coeficient care, pentru sistemele ideale, respectă legea de repartiție a lui Nernst (fig. 4.2) [90]. La valori supraunitare ale coeficientului de distribuție solutul trece preponderent în extract, în timp ce la valori subunitare ale acestuia, rămâne preponderent în rafinat. Pentru $K_N = 1$, solutul B se repartizează în mod egal între cei doi solvenți A și S, separarea prin extracție nefiind posibilă. Pentru scopuri practice, se consideră posibilă separarea prin extracție L – L atunci când $K_N > 3$.

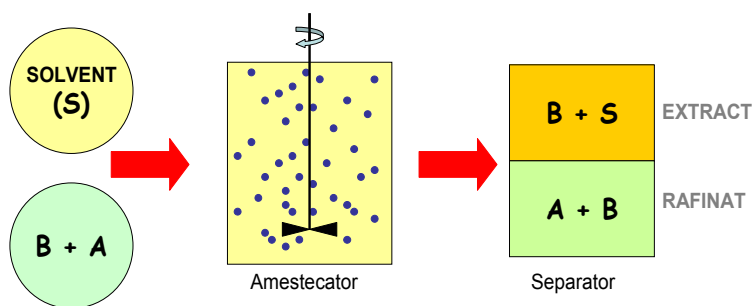


Figura 4.1. Schema de principiu a extracției fizice lichid – lichid

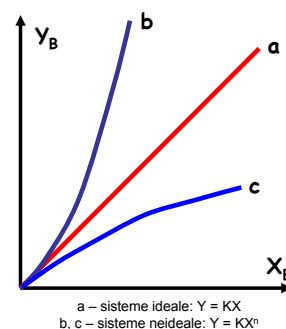


Figura 4.2. Relație de echilibru într-un sistem cu solvenți nemiscibili

Pentru realizarea extracției L – L este necesară parcurgerea următoarelor etape: (i) contactarea soluției inițiale (A + B) cu solventul S (amestecarea), (ii) solubilizarea și difuzia solutului B în solventul S (transferul de masă al solutului), (iii) separarea celor două faze: extractul (E) și rafinatul (R), (iv) recuperarea solventului din extract (uzual prin distilare); (v) desolventarea rafinatului (prin distilare sau stripare).

Ca operație unitară, extracția L – L este preferată distilării atunci când: (i) volatilitatea relativă a componentelor amestecului de separat este apropiată de unitate; (ii) componentul volatil este în concentrație mare sau are căldură de vaporizare mare (apa, de ex.); (iii) temperatura la care s-ar face rectificarea este mare; (iv) substanțele de separat sunt termolabile. Pe acest din urmă considerent s-a impus extracția L – L în separarea antibioticelor, încă din perioada în care procesul încă nu era bine fundamentat din punct de vedere teoretic.

Viteza procesului de extracție, exprimată prin cantitatea (M) sau fluxul (J) de solut transferat:

$$M = K \cdot A \cdot \Delta C \cdot t \quad (4.3)$$

$$J = K \cdot A \cdot \Delta C \quad (4.4)$$

depinde de coeficienții de transfer de masă ai solutului în fiecare fază (dependență redată prin expresia coeficientului global de transfer de masă, K), de aria interfacială de contact între cele două faze lichide (A), precum și de forța motrice a procesului (diferența concentrației solutului între soluția inițială și solvent, ΔC). Pentru accelerarea transferului solutului, deci pentru mărirea vitezei de extracție, se poate mări valoarea coeficientului de transfer K (reducerea grosimii straturilor limită prin creșterea turbulenței sau prin contactarea fazelor în microcanale), se poate mări aria interfacială A (dispersia unei faze în cealaltă sub forma unor picături de dimensiuni cât mai mici), sau se poate mări potențialul transferului, lucrând în condiții cât mai depărtate de cele de echilibru, prin adăugarea unor cantități proaspete de solvent (realizarea procesului în contracurent, în trepte, sau cu reflux de solvent).

4.1.2. Aspecte particulare ale extracției lichid – lichid în bioprocese

Printre metodele de separare și purificare utilizate în biotehnologii, metodele de extracție lichid – lichid sunt utilizate frecvent, datorită faptului că aceste metode (i) sunt bine cunoscute și testate industrial cu succes în alte aplicații, (ii) sunt adesea ieftine, (iii) se pretează la transpunerea la scară mare, în unități cu funcționare continuă [91]. Extracția L – L este utilizată în special pentru separarea din mediul de cultură a unor metaboliți (alcooli, acizi carboxilici, aminoacizi, antibiotice) [92, 93], pentru prepararea unor produse farmaceutice izolate din compuși naturali sau obținute prin sinteză parțială (sulfamide, fenobarbital, antihistaminice, cortizon, estrogeni, alcaloizi), pentru rafinarea grăsimilor vegetale și animale (procedeul Solexol de extracție cu propan, extracția cu furfural), pentru extracția proteinelor din pește, extracția vitaminelor A și D din uleiul de ficat de pește, extracția vitaminei E din uleiurile vegetale [94]. Pe măsură ce scara de operare se mărește, extracția L – L devine din ce în ce mai atractivă datorită pe de o parte faptului că problemele referitoare la transpunerea la scară sunt cunoscute și multe dintre ele rezolvate, iar pe de altă parte datorită costurilor de investiții și exploatare mult mai scăzute comparativ cu alte metode de bioseparare, cum ar fi cromatografia de lichide.

4.1.2.1. Solvenți de extracție

Un solvent ideal trebuie să fie selectiv, nemiscibil cu materia primă, ieftin și ușor de recuperat, netoxic, neinflamabil și necoroziv. El nu trebuie să reacționeze ireversibil cu solutul. Viscositatea sa trebuie să fie scăzută: astfel consumurile energetice pentru vehiculare vor fi mai reduse și, în plus, o valoare mică a viscozității influențează favorabil coeficienții de transfer de căldură și de masă. O diferență de densitate cât mai mare între solvent și materia primă îmbunătățește dispersia și mărește viteza de deplasare a picăturilor, favorizând astfel transferul de masă. Tensiunea interfacială trebuie să aibă o valoare optimă: la valori prea mari, deși se ușurează separarea fazelor se îngreunează dispersia, în timp ce la valori prea mici există pericolul formării unor emulsii stabile între materia primă și solvent, emulsii greu de separat.

Solvenții utilizați în bioprocese trebuie în plus să nu denatureze biomoleculele extrase (peptide, proteine etc.). Ca regulă generală, cu cât biomoleculele sunt mai mari, cu atât mai complexă este structura lor spațială și cu atât mai mare este riscul de denaturare. Drept urmare, peptidele mari și proteinele nu se pretează la extracția clasică cu solvenți organici, ele separându-se prin extracție în sisteme apoase bifazice.

Pentru extracția produselor de biosinteză polare se utilizează alcooli, esteri, cetone, iar pentru extracția celor nepolare eter de petrol, diclormetan, diclorețan etc. În cazul solvenților din prima categorie, principala problemă este solubilitatea lor relativ ridicată în mediul apos. Creșterea masei moleculare a acestor compuși reduce solubilitatea lor în apă, dar mărește tendința de formare a unor emulsii stabile cu aceasta [4].

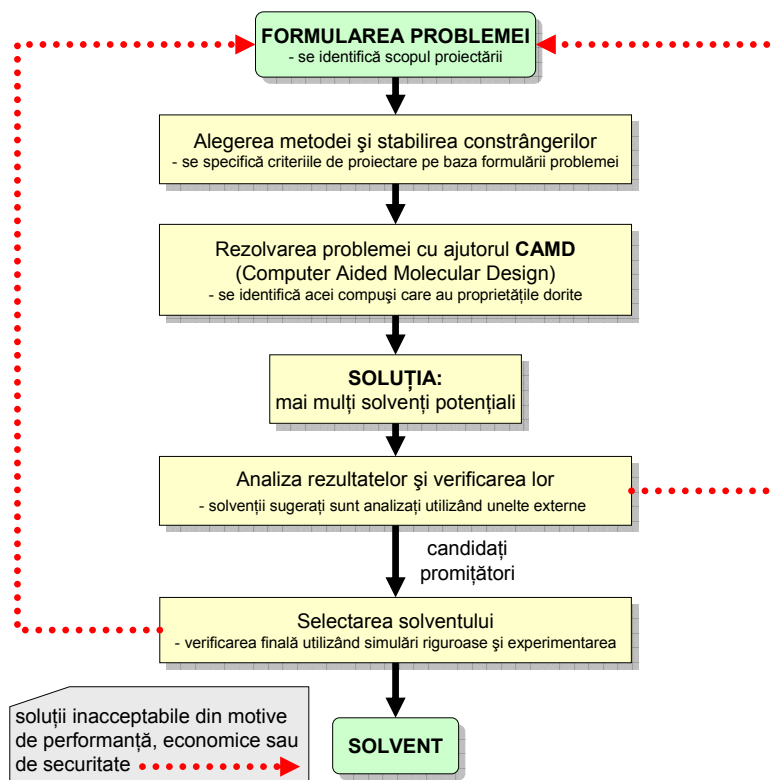


Figura 4.3. Algoritm pentru selectarea solvenților [99]

Alegerea solventului potrivit este etapa cheie în conceperea și proiectarea unui proces de extracție. Solventul selectat trebuie să se apropie cât mai mult de profilul solventului ideal, în acest fel realizându-se gradul dorit de separare într-un număr minim de etape și, evident, cu costuri minime. La ora actuală există programe de calculator care permit alegerea solventului potrivit dintr-o bază de date [95 – 99]. Alegerea solventului se realizează printr-o abordare în mai multe etape. Mai întâi se formulează problema: CE trebuie separat, DIN CE amestec se efectuează separarea, CARE este țelul final al separării (puritatea extractului, conținutul final de solut în rafinat etc.). Odată formulată problema, se alege metoda de rezolvare și se precizează eventualele constrângeri la care este supus sistemul. Utilizând un program de tip CAMD¹ se obține o listă a unor solvenți fezabili, aranjați în ordine după anumite criterii date. Cei mai potriviți solvenți sunt apoi analizați individual în termeni de performanță, eficacitate, eficiență, impact de mediu, economicitate etc. Dacă nu se găsește nici un solvent potrivit, se revine în formularea problemei relaxând anumite constrângeri sau lărgind domeniul anumitor proprietăți țintă (presiune de vapori, tensiune superficială, punct de fierbere etc.) (fig. 4.3). În acest mod, selectarea solvenților devine o problemă de proiectare care necesită o soluționare de tip încercare – eroare.

4.1.2.2. Echipamente de extracție

Extractoarele utilizate la nivel industrial trebuie să satisfacă într-o cât mai mare măsură, următoarele deziderate: (i) eficacitate de separare cât mai mare; (ii) producție specifică (pe m³) cât mai mare; (iii) consum minim de energie mecanică și termică (inclusiv cea pentru recuperarea solventului); (iv) cost redus de investiție și exploatare; (v) adaptabilitate la condiții variate de lucru. Eficacitatea mare a extractoarelor se poate realiza prin intensificarea transferului de masă într-o unitate de extracție și prin repetarea de un număr mare de ori a acestei unități. Intensificarea transferului se obține prin mărirea celor trei factori ai ecuației (4.4).

Extractoarele pot fi clasificate după mai multe criterii:

- în funcție de modul de contactare a fazelor:
 - extractoare cu contact în trepte,
 - extractoare cu contactare diferențială.
- în funcție de criteriul unităților de extracție:
 - extractoare cu unități distincte de extracție,
 - extractoare continue în contracurent.
- în funcție de modul de amestecare:
 - extractoare fără agitare,
 - extractoare cu agitare mecanică,
 - extractoare pulsate,
 - extractoare centrifugale.

O clasificare a principalelor tipuri de extractoare comerciale este prezentată în fig. 4.4.

¹ CAMD – Computer Aided Molecular Design – proiectare moleculară asistată de calculator

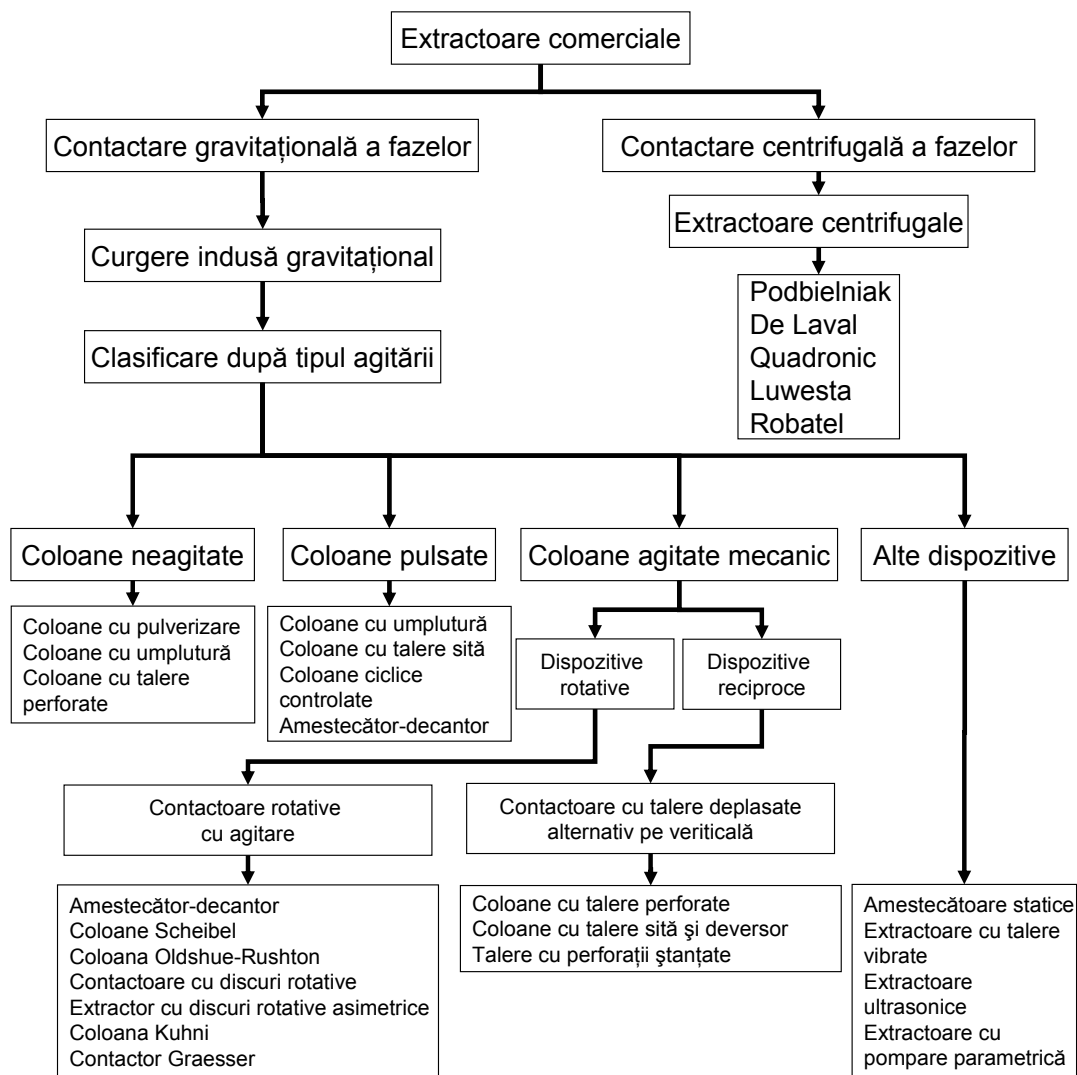


Figura 4.4. Clasificarea extractoarelor comerciale [100]

Extractoarele utilizate în bioprocese trebuie să asigure separarea unor produse ușor degradabile, ca urmare ele trebuie să asigure viteze mari de transfer de masă în condițiile unor timpi de contact și de separare a fazelor foarte scurți. Extractoarele comerciale care corespund acestor exigențe sunt extractoarele centrifugale, extractoarele rotative cu agitare și extractoarele cu talere deplasate alternativ pe verticală [100].

4.1.2.2.1. Extractoare centrifugale

Extractoarele centrifugale sunt caracterizate de faptul că timpul de contactare a fazelor este scurt, permit prelucrarea unor amestecuri având o diferență mică de densitate între faze și care emulsionează ușor, necesită un spațiu redus pentru amplasare. Dezavantajele principale sunt legate de costul ridicat al acestora precum și de întreținerea mai pretențioasă decât la alte categorii de extractoare [100]. Din punct de vedere constructiv se împart în două categorii principale: extractoare cu ax orizontal și extractoare cu ax vertical.

Extractorul Podbielniak (fig. 4.5) a fost primul extractor centrifugal folosit la scară industrială, fiind introdus în practică în anii 1950 [101]. Extractorul este format dintr-o foaie metalică înfășurată în spirală în jurul unui arbore care se rotește cu 2000 – 5000 rot/min. Introducerea și evacuarea celor două faze se realizează axial. Faza ușoară se trimite la periferia spiralei, iar faza grea se deplasează către axul extractorului. Constructiv și funcțional, acest extractor poate fi considerat drept o coloană cu talere perforate înfășurată în jurul unui arbore cilindric. Câmpul de forțe centrifuge duce la reducerea înălțimii echivalente a unei trepte teoretice (IETT), precum și a timpului de contact între faze. Datorită câmpului de forțe centrifugale și diferenței de densitate are loc o curgere radială, în contracurent, a celor două faze. Productivitatea acestor extractoare este de 2,5 – 10 m³ [4], dar poate ajunge și până la 98 m³/h [100].

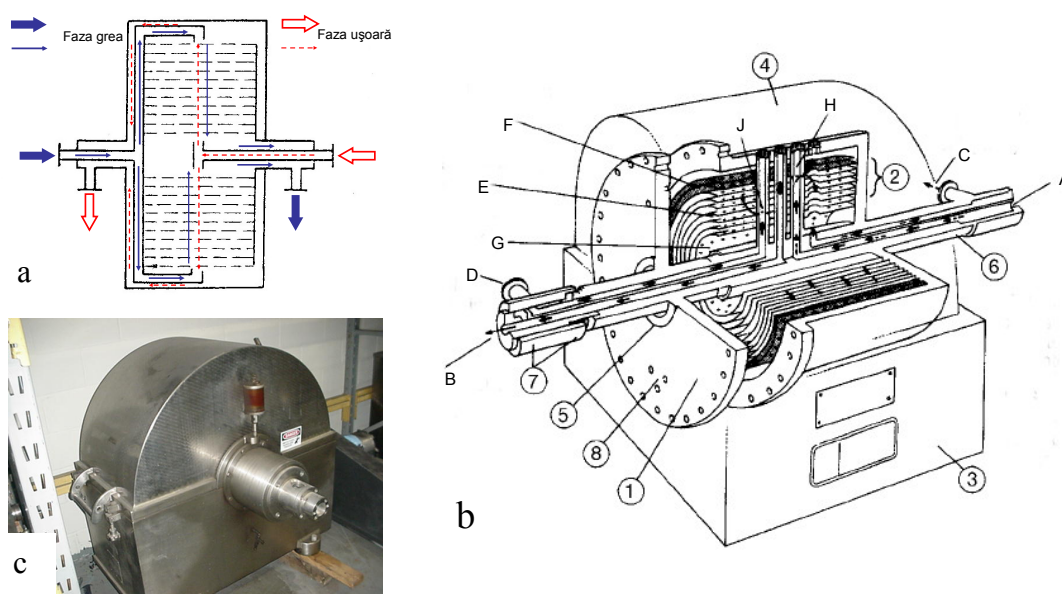


Figura 4.5. Extractor Podbielniak

a – principiu de funcționare; b – secțiune; c – extractor pilot.

A – intrare fază ușoară; B – ieșire fază grea; C – ieșire fază ușoară; D – intrare fază grea; E – zonă de contact reglabilă; F, G – zone de separare reglabilă; J, H – conducte de alimentare cu lichide; 1 – capac lateral demontabil; 2 – site perforate concentrice; 3 – suport; 4 – carcasa rotor; 5 – lagăre; 6 – arbore; 7 – etanșare; 8 – racorduri pentru curățire.

Extractorul Luwesta (fig. 4.6) este constituit dintr-o succesiune de regiuni de amestecare – separare, cu circulația fazelor în contracurent. Extractorul se construiește cu două sau trei trepte, fiecare treaptă fiind prevăzută cu discuri de amestecare și conuri de separare. Fazele se introduc și se evacuează prin axul central, amestecarea având loc la trecerea prin orificiile axului, în fiecare treaptă. Solventul proaspăt se introduce în treapta inferioară, iar soluția inițială în treapta superioară. Amestecul de lichide se separă sub acțiunea forței centrifuge, iar apoi lichidele trec prin orificii diferite în ax, de unde sunt din nou distribuite în trepte diferite [102]. Au avantajul unor productivități ridicate (1,25 – 120 m³/h într-o singură treaptă), al unui timp de contact scurt (câteva secunde) și al necesarului redus de solvent. Pe lângă dezavantajele comune extractoarelor centrifugale, mai prezintă dezavantajul apariției la periferia cilindrului rotativ a unor presiuni locale de peste 10 MPa, care modifică diagrama fazelor și

diagrama de echilibru, cu efecte directe asupra numărului de trepte de contact necesare obținerii a gradului de separare dorit [4].

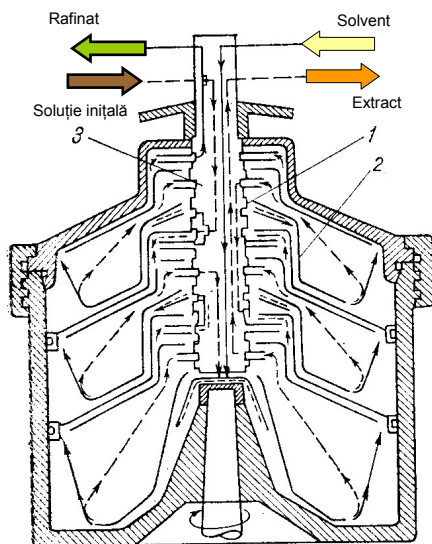


Figura 4.6. *Extractor Luwesta* [102]
1 – discuri de amestecare; 2 – conuri de separare; 3 – ax central.

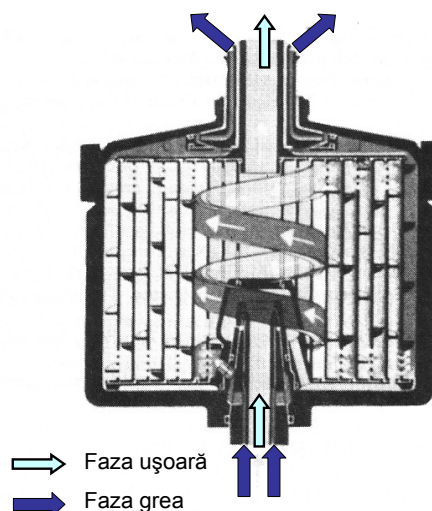


Figura 4.7. *Extractor Alfa-Laval* [87]

Extractorul Alfa-Laval (fig. 4.7) este un extractor cu ax vertical, în care ambele faze sunt alimentate sub presiune, la baza utilajului. Rotorul este format dintr-o serie de cilindri concentrați, prevăzuți cu aripioare elicoidale, care formează o serie de treceri sub formă de spirale. Faza ușoară este dirijată spre periferie, de unde curge spiralat spre ax, circulând în contracurent cu faza grea introdusă lângă axul central. Datorită curgerii în spirală, lichidele parcurg un traseu lung de circa 25 m [87]. Extractoarele Alfa-Laval lucrează la debite de alimentare de 5 – 9 m³/h, raportul dintre faza apoasă și solvent fiind cuprins între 3:1 și 5:1, ajungând chiar până la 8:1 în cazul extracției penicilinei G, care se extrage în proporție de 96 – 98% [4].

Extracția se poate realiza în câmp de forțe centrifugale și în separatoare centrifugale cu discuri. Contactarea fazelor se poate realiza utilizând amestecătoare centrifugale de sine stătătoare sau integrate în partea superioară a separatorului centrifugal. În cazul **amestecătoarelor centrifugale** (fig. 4.8), fazele care trebuie contactate sunt pompate împreună într-un tambur rotativ de amestecare, unde sunt accelerate centrifugal spre periferie, de unde amestecul este preluat de o pompă centripetă, în canalele căreia are loc amestecarea intensă a fazelor. Caracteristicile amestecării pot fi reglate prin modificarea turației electromotorului de antrenare a amestecătorului, mărirea picăturilor și gradul de turbulență variind cu viteza de rotație.

Amestecătorul centrifugal poate fi încorporat în **separatorul centrifugal cu discuri** (fig. 4.9), cu avantajul unei construcții mai compacte [103]. Amestecul de separat este alimentat prin racordul (1). Solventul proaspăt sau extractul din treapta anterioară (în cazul extracției în trepte în contracurent) alimentat prin racordul (4) se amestecă cu rafinatul în pompa centripetă (5). Extractul limpede este evacuat prin

racordul (2), iar rafinatul prin racordul (3). Amestecarea fazelor sub acțiunea forței centrifuge are loc în camera de distribuție a tamburului centrifugei (6).

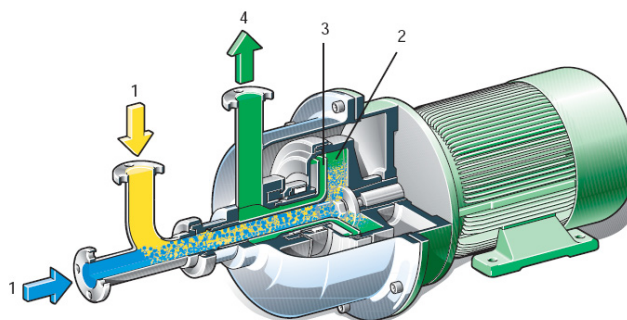


Figura 4.8. Amestecător centrifugal Westfalia

1 – alimentare cu soluție inițială și solvent; 2 – tambur de amestecare; 3 – pompă centripetă; 4 – evacuare amestec de lichide.

Amestecătorul centrifugal poate fi cuplat și cu un separator centrifugal prevăzut cu dispozitiv de autocurățire a fazei solide (fig. 4.10), caz în care se poate realiza extracția din suspensii conținând până la 7% v/v fază solidă [104].

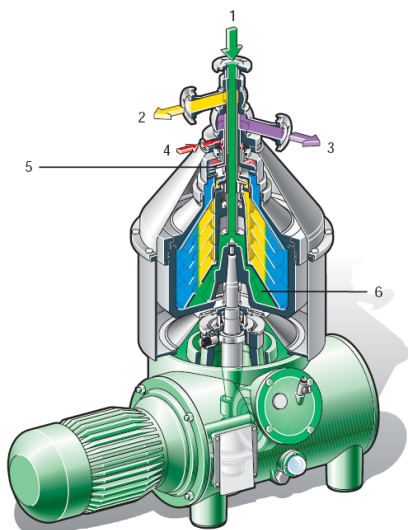


Figura 4.9. Extractor centrifugal Westfalia cu amestecător încorporat

1 – alimentare; 2 – evacuare fază ușoară; 3 – evacuare rafinată; 4 – solvent proaspăt sau extract de la unitatea anterioară; 5 – pompă centripetă; 6 – camera de distribuție a tamburului centrifugei.

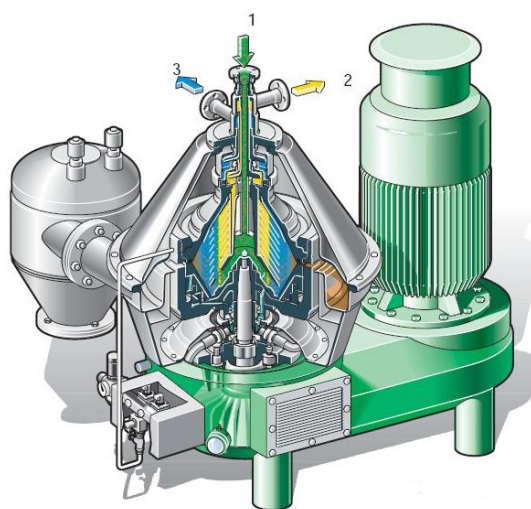


Figura 4.10. Extractor centrifugal Westfalia pentru suspensii, cu dispozitiv de autocurățire a fazei solide

1 – alimentare suspensie + solvent; 2 – evacuare fază ușoară; 3 – evacuare fază grea.

În contextul tendinței actuale de integrare a proceselor, de reducere a numărului de operații prin folosirea unor echipamente complexe în care să se realizeze mai multe etape ale procesului tehnologic (reacție + separare), a fost conceput **extractorul-decantor Westfalia**, utilizat în extracția antibioticelor din lichidele de fermentație, fără filtrarea prealabilă a biomasei penicilinelor (fig. 4.11).

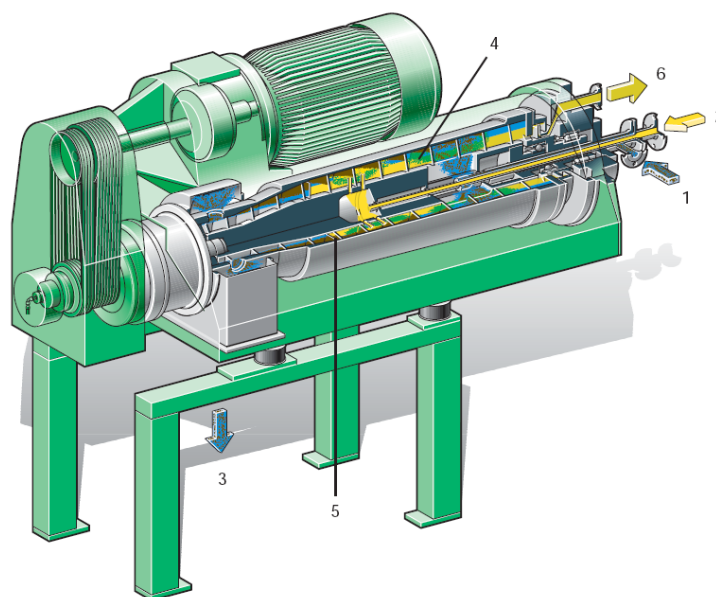


Figura 4.11. Extractor-decantor Westfalia [104]

1 – alimentare cu suspensie (lichid de fermentație + miceliu); 2 – alimentare cu solvent; 3 – evacuare rafinat; 4 – zonă de extracție în contracurent; 5 – disc separator; 6 – pompă centripetă pentru evacuarea extractului.

Extractorul-decantor în contracurent este o centrifugă decantoare orizontală cu tambur cilindro-conic prevăzut cu un transportor elicoidal care se rotește cu o viteză mai mică cu 32 rot/min decât tamburul. Suspensia alimentată prin racordul (1) pătrunde în transportorul elicoidal printr-o serie de fante de distribuție practicate în acesta. Aici intră în zona de extracție (4), curgând în contracurent cu solventul alimentat prin racordul (2). Rafinatul este descărcat gravitațional la capătul conic al tamburului, prin racordul (3). Faza solidă este preluată de către transportor și descărcată gravitațional împreună cu rafinatul. Solventul se deplasează către capătul cilindric al tamburului, fiind descărcat sub presiune prin intermediul pompei centripete (6) [104]. Tamburul are o lungime de 0,75 m și un diametru de 0,22 m, turația sa fiind de 5000 rot/min. Debitul de alimentare cu lichid de fermentație este de 1,3 – 2 m³/h, realizându-se un grad de extracție a antibioticelor de 97 – 98% [4].

Contactorul centrifugal CINC (fig. 4.12) are o construcție originală care îi permite utilizarea ca unitate de extracție [105]. În principiu seamănă cu centrifuga tubulară, deosebindu-se însă de aceasta prin faptul că are două racorduri de intrare (unul pentru soluția inițială și altul pentru solvent). Amestecarea fazelor și extracția au loc în spațiul inelar dintre rotor și carcasă, spațiu caracterizat printr-o curgere particulară, de tip Taylor – Couette. Acest tip de curgere intensifică transferul de masă, datorită reducerii dispersiei axiale, prin formarea de vârtejuri Taylor [106, 107]. Separarea fazelor are loc în interiorul rotorului, la fel ca într-o centrifugă tubulară obișnuită. Prin conectarea mai multor astfel de unități se poate realiza procesul de extracție în mai multe trepte, în contracurent. Astfel de unități, cu factor de eficacitate $z = 100 - 1000$ se construiesc pentru capacități de prelucrare între 0,1 și 136 m³/h, cele special destinate bioseparărilor fiind în construcție sanitară (oțel inoxidabil sau Hastelloy) și prevăzute cu sistem CIP [105, 108].

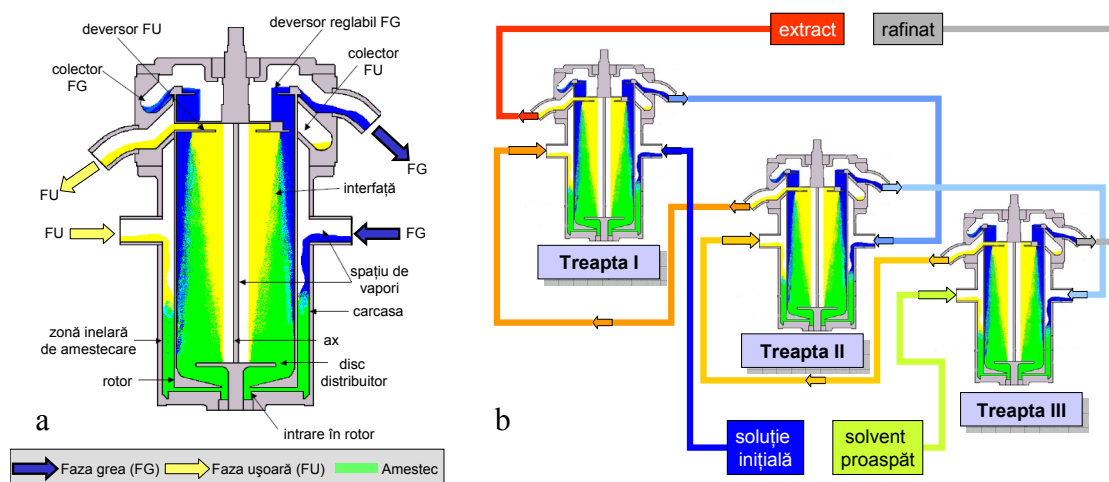


Figura 4.12. Contactor centrifugal CINC

a – schemă constructivă și funcțională; b – instalație de extracție în trei trepte în contracurent

4.1.2.2.2. Extractoare rotative cu agitare

Deși utilizate pe larg în procesele de extracție cu solvenți, aceste dispozitive sunt mai puțin utilizate în procesele de bioseparare. În fig. 4.13 sunt prezentate principalele extractoare rotative de tip coloană, cu agitare mecanică.

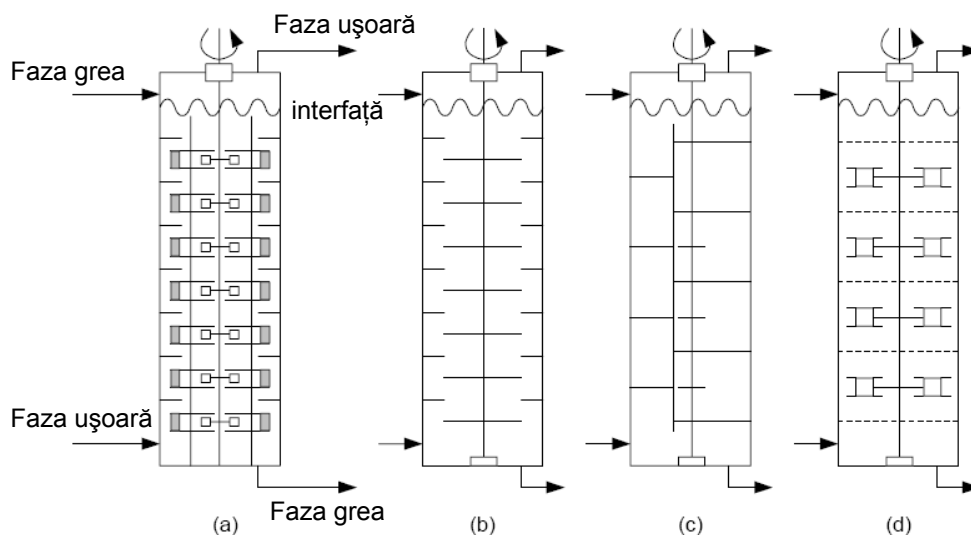


Figura 4.13. Extractoare rotative cu agitare

a – coloană Scheibel; b – contactor cu discuri rotative; c – contactor cu discuri rotative asimetrice; d – coloană Kühni

Coloana Scheibel este prevăzută alternativ cu agitatoare cu două pale montate pe un ax, și cu compartimente neagitate care servesc drept zone de separare, fiind prevăzute cu site metalice deschise pentru îmbunătățirea coalescenței. Prezența sitelor

implică utilizarea unor faze lichide lipsite de impurități solide (miceliu, masă celulară), restrângându-se astfel aria de aplicare a acestui echipament în procesele de bioseparare [109]. Alte construcții utilizează șicane orizontale cu sau fără site, sau agitatoare de tip impeler [100].

Contactorul cu discuri rotative (CDR), are montate în interiorul coloanei mai multe șicane inelare apropiate, între care se rotesc discurile amplasate simetric pe un ax central. Diametrul discurilor este mai mic decât deschiderea șicanelor inelare. CDR folosește acțiunea de forfecare a discurilor în mișcare rapidă de rotație pentru dispersia fazelor. Construcția are o secțiune liberă mare, ceea ce este avantajos pentru prelucrarea unor debite mari, dar aduce dezavantajul amestecării inverse a fazelor. O variantă a acestui echipament este **coloana Oldshue – Rushton**, în care discurile rotative sunt înlocuite cu agitatoare tip turbină [87, 100].

Contactorul cu discuri rotative asimetrice (CDRA) este o perfecționare a CDR, arborele cu discuri fiind montat excentric față de axul coloanei. Zonele de amestecare sunt separate de cele de sedimentare prin intermediul unei șicane verticale. În acest fel se evită amestecarea inversă caracteristică CDR [100]. Datorită divizării coloanei, capacitatea CDRA este mai mică decât cea a CDR [110].

Extractorul Kühni este bazat pe principii similare coloanelor Scheibel. Axul central este prevăzut cu agitatoare tip turbină, turbinele fiind separate între ele prin intermediul unor discuri perforate (statoare). Curgerea axială se suprapune peste cele radiale, creându-se o curgere de tip vortex. Performanțele acestor coloane se pot optimiza prin modificarea diametrului turbinelor și a ariei libere a discurilor perforate [87, 100, 102].

4.1.2.2.3. Extractoare cu talere pulsate

În aceste echipamente dispersia fazelor se realizează prin deplasarea alternativă pe verticală sau prin vibrarea talerelor în coloană (fig. 4.14). Față de coloanele pulsate, în care energia este indusă fazei lichide și nu amenajărilor interne, consumul energetic este mai scăzut la același efect de amestecare și dispersie uniformă a fazelor [100].

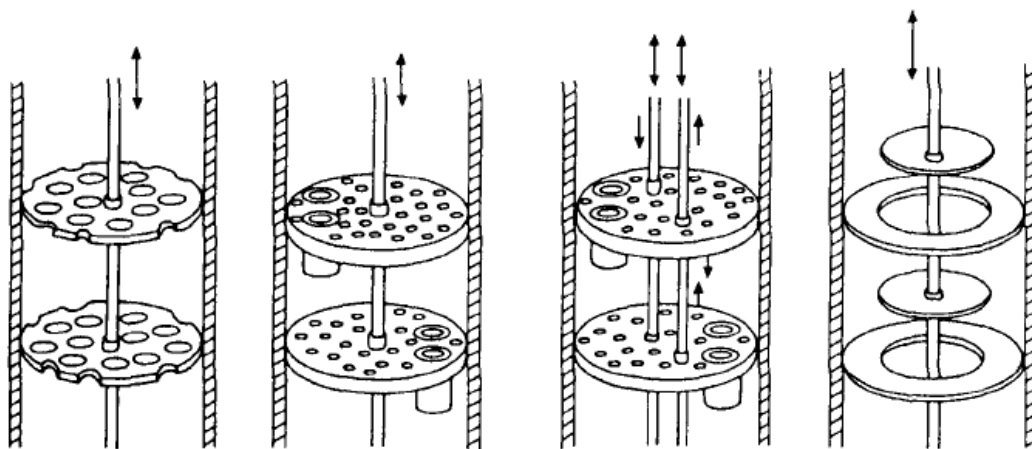


Figura 4.14. Tipuri de talere utilizate în coloanele cu talere pulsate [111]

Extractorul Karr (fig. 4.15) este unul dintre cele mai cunoscute din această categorie. Coloana de extracție este prevăzută în interior cu o serie de talere perforate și de șicane, amplasate alternativ. Pachetul de talere este rigidizat pe circumferință cu ajutorul unor tiranți și este susținut de un ax central. Acest ax este acționat cu ajutorul unui mecanism amplasat la partea superioară a coloanei, mecanism care conferă axului și implicit pachetului de talere o mișcare verticală alternativă cu amplitudine mică și frecvență mare.

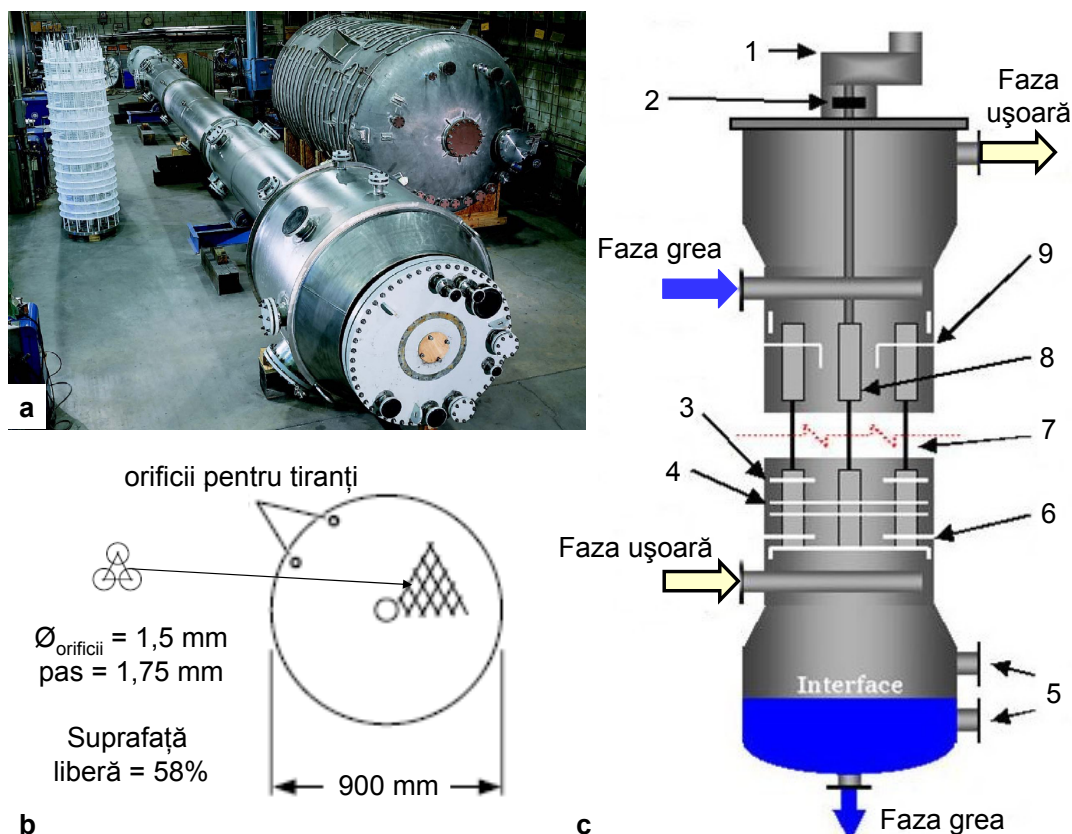


Figura 4.15. Extractor Karr [86]

a – extractor în curs de asamblare; b – detalii talere; c – schemă de principiu.

1 – ansamblu acționare talere; 2 – etanșare; 3 – șicană metalică; 4 – taler perforat; 5 – dispozitiv de control interfață; 6 – șicană din teflon; 7 – tiranți și distanțieri; 8 – ax central și distanțieri; 9 – placă superioară.

Coloanele Karr și-au găsit aplicarea în special în industria farmaceutică, în petrochimie și în tratarea apelor reziduale. La ora actuală se construiesc astfel de extractoare de până la 1,5 m diametru [86, 111]. Datorită suprafeței libere ridicate a talerelor (58%) poate fi utilizat pentru extracția bioproduselor direct din mediul de cultură, fără o prealabilă separare a masei celulare [109].

4.1.2.2.4. Alte echipamente de extracție

La ora actuală, procesele industriale de extracție L – L sunt caracterizate de o eficacitate crescută, cuplată cu o valoare redusă a capacității de reținere și cu valori IETT

cât mai mici. În coloanele de extracție de acest tip sunt folosite diverse echipamente mecanice care asigură un grad ridicat de dispersie a unei faze în cealaltă. Într-o serie de procese, în general procese de bioseparare (extracția antibioticelor, vitaminelor, hormonilor, proteinelor etc.), utilizarea unei agitări „agresive”, impusă de condițiile hidrodinamice din acest tip de aparate, afectează structura sau caracteristicile produselor obținute. De asemenea, timpul de contact prea îndelungat al solvenților cu produsele extrase pot induce modificări calitative nepermise atât în solut cât și în solvent. În aceste condiții este necesară minimizarea timpului de staționare al fazei disperse în aparatele de extracție. Un astfel de deziderat poate fi atins în coloanele de extracție cu rotoare cilindrice care, în ciuda capacității de prelucrare reduse, au avantajul unei eficacități mărite, datorită regimului de curgere asigurat. În spațiul inelar îngust dintre rotoare, sau dintre rotor și stator, datorită vitezei diferite de mișcare a pereților cilindrici, curgerea este de tip Couette – Taylor. Cele două fluide se stratifică, iar la interfață apar vârtejurile Taylor, prin intermediul cărora se asigură un transfer de masă foarte intens (fig. 4.16). Extractorul poate funcționa în poziție orizontală sau verticală (fig. 4.17), putând fi echipat cu unul sau două rotoare cilindrice [87, 106, 107].

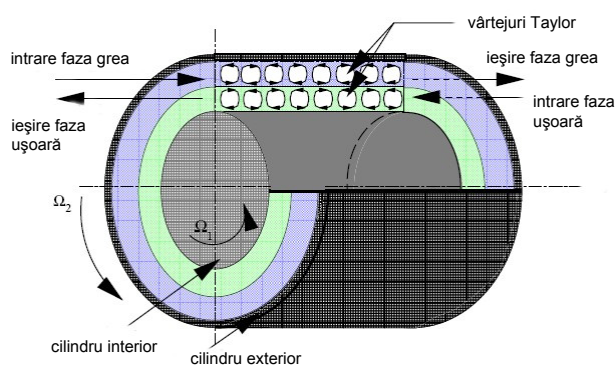


Figura 4.16. Schema de principiu a unui extractor Taylor – Couette bifazic [107]

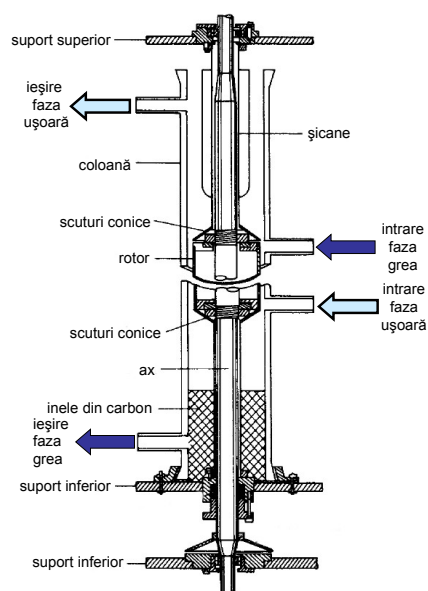


Figura 4.17. Extractor cu un rotor cilindric vertical [87]

4.1.3. Aplicații ale extracției fizice lichid – lichid în bioprocese

Extracția fizică lichid – lichid are relativ puține aplicații în bioprocese, datorită incompatibilității solvenților organici clasici cu produsele de biosinteză. După cum reiese din tab. 4.1, majoritatea acizilor carboxilici și aminoacizilor au valori extrem de reduse ale coeficienților de distribuție în solvenți organici, extracția lor nefiind posibilă în acest sistem, ci doar ca extracție reactivă. Doar antibioticele se pretează la extracția cu solvenți organici, metoda fiind aplicată la scară industrială.

Tabelul 4.1. Coeficienți de distribuție ai unor biocompuși în solvenți organici
[112, 113]

Categoria	Solut	Solvent	K_N	Observații
Acizi carboxilici	Acid propanoic	<i>n</i> -hexan	0,05	25 °C
		ciclohexan	0,06	
		MIBC*	2,15	
		ciclohexanonă	3,30	
		<i>n</i> -butanol	3,20	
	Acid lactic	MIBC	0,14	
		<i>n</i> -butanol	0,73	
		izobutanol	0,66	
	Acid piruvic	dietileter	0,16	
	Acid succinic	dietileter	0,15	
		MIBC	0,19	
	Acid fumaric	<i>n</i> -butanol	1,20	
		izobutanol	0,96	
		dietileter	1,50	
		MIBC	1,40	
		<i>n</i> -butanol	3,30	
	Acid maleic	izobutanol	4,60	
		dietileter	0,15	
	Acid malic	MIBC	0,21	
		izobutanol	0,92	
		dietileter	0,02	
	Acid itaconic	MIBC	0,04	
		izobutanol	0,36	
		dietileter	0,35	
		MIBC	0,55	
	Acid tartric	izobutanol	1,80	
		dietileter	0,003	
		MIBC	0,02	
	Acid citric	<i>n</i> -butanol	0,16	
		dietileter	0,009	
		MIBC	0,09	
		<i>n</i> -butanol	0,29	
		izobutanol	0,30	
Aminoacizi	Glicină	<i>n</i> -butanol	0,01	25 °C
	Alanină		0,02	
	Lizină		0,20	
	Acid glutamic		0,07	
	Acid α -aminobutiric		0,02	
	Acid α -aminocaproic		0,30	
Antibiotice	Celesticetină	<i>n</i> -butanol	110	pH = 4,2
	Cicloheximidă	diclormetan	23	
	Eritromicină	acetat de amil	120	
	Limcomicină	<i>n</i> -butanol	0,17	
	Gramicidină	benzen	0,6	
	Novobiocină	cloroform - metanol	17	pH = 7,0 pH = 10,5 pH = 4,0 pH = 6,0 pH = 4,0 pH = 6,0
		acetat de butil	100	
	Penicilină F	acetat de amil	0,01	
			32	
	Penicilină K	acetat de amil	0,06	
			12	
			0,10	

* MIBC – metil-izobutil-cetonă

4.1.3.1. Extracția antibioticelor

Separarea prin extracție L – L a antibioticelor se face, de regulă, după separarea masei celulare, dar există și procedee care permit extracția lor din lichidul de fermentare nefiltrat sau din biomasă. Extractul este purificat ulterior prin reextracție, precipitare, cromatografie de schimb ionic, cristalizare [92]. Dacă antibioticul este slab acid, având un pK scăzut, pH-ul utilizat în extracție trebuie scăzut până sub valoarea pK, pentru a obține antibioticul în formă acidă nedisociată. Dacă însă antibioticul este slab bazic, cu pK ridicat, valoarea pH-ului trebuie crescută în timpul extracției peste valoarea pK, în vederea obținerii antibioticului în formă bazică nedisociată. Dacă solubilitatea în apă a antibioticului este foarte ridicată, lichidul de fermentație se saturează cu o sare (uzual sulfat de potasiu), care provoacă cristalizarea prin salefieri a antibioticului, ușurând extracția acestuia [92].

Valoarea pH-ului influențează puternic atât coeficientul de distribuție, cât și gradul de extracție. Pentru exemplificare, în tab. 4.2 se prezintă variația coeficientului de distribuție al penicilinei G între apă și diverși solvenți organici la diverse valori pH, iar în tab. 4.3 gradul de extracție al penicilinelor în acetat de butil în funcție de valoarea pH-ului fazei apoase [4].

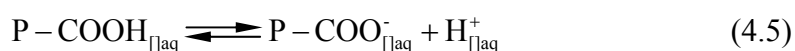
Tabelul 4.2. Coeficienți de distribuție ai penicilinei G în sisteme apă – solvent organic la 0 °C [4]

Solvent	Valoarea coeficientului de distribuție, K_N	
	pH = 0	pH = 4
Metil-etil-cetonă	180	19
Dimetilciclohexan	160	15
Metilciclohexan	80	7
Ciclohexan	62	4
Furfurilacetat	44	4
Metil- <i>i</i> -butil-cetonă	33	3
Dimetilftalat	30	2,7
Acetat de amil	20	1,8
Dietiloxalat	20	1,8

Tabelul 4.3. Gradul de extracție al unor peniciline și precursori de biosinteză ai acestora în acetat de butil [4]

Compus	Gradul de extracție [%]				
	pH = 2	pH = 3	pH = 4	pH = 5	pH = 6
Penicilina G	98	95	75	21	10
Penicilina F	100	100	97	89	39
Penicilina K	100	100	80	62	12
Acid fenilacetic	98	98	96	89	39

Dacă extracția antibioticelor se face cu un solvent nepolar, cum este acetatul de butil, gradul de extracție va fi maxim numai dacă antibioticele se găsesc în soluția apoasă supusă extracției sub formă nedisociată. În faza apoasă, penicilinele disociază datorită grupării carboxilice conform echilibrului:



în care $pK_a = 2,75$ pentru penicilina G și $pK_a = 2,70$ pentru penicilina V. Ca urmare, pentru a exista în stare nedisociată, pH-ul fazei apoase din care se realizează extracția va trebui să fie mai mic de 2,7. Pentru grade de extracție maxime, valoarea pH trebuie să scadă sub 2 (tab. 4.3). În medii puternic acide însă, viteza de dezactivare a penicilinelor este foarte ridicată: la pH = 1,5 și 35 °C timpul de inactivare al penicilinei G este de numai 4 minute. Ca urmare, pH-ul utilizat la extracție reprezintă un compromis între stabilitatea penicilinei și valoarea gradului de extracție, respectiv a coeficientului de distribuție [114]. Pentru minimizarea timpului de menținere a penicilinei la pH scăzut, contactarea fazei apoase cu solventul de extracție se face înainte de acidulare, iar amestecul de lichid de fermentație-solvent este amestecat cu soluția de H_2SO_4 4 – 6% în amestecătoare *in-line*, de mare eficiență. Tot pentru stabilizarea penicilinelor extracția decurge la temperaturi scăzute (0 – 3 °C), în extractoare cu timp de contact scurt între faze (extractoare Podbielniak). După separarea fazelor, pentru stabilizarea produsului, se neutralizează urmele de acid antrenate în faza organică prin adăugare de soluție apoasă de fosfat de potasiu, carbonat sau acetat de sodiu sau potasiu, până la atingerea pH = 6, când penicilina este reextrasă și stabilizată sub formă de sare în soluția apoasă [4, 94, 115]. Purificarea se poate realiza printr-o nouă extracție la pH = 2 – 2,5 urmată de neutralizare cu fosfat de potasiu 2% până la pH = 6. Solventul epuizat este recirculat la extracție, împreună cu solventul recuperat din rafinat prin distilare. Impuritățile organice coextrase împreună cu penicilina sunt îndepărtate prin adsorbție pe cărbune activ. O schemă de principiu a acestui procedeu de fabricație este redată în fig. 4.18 [115].

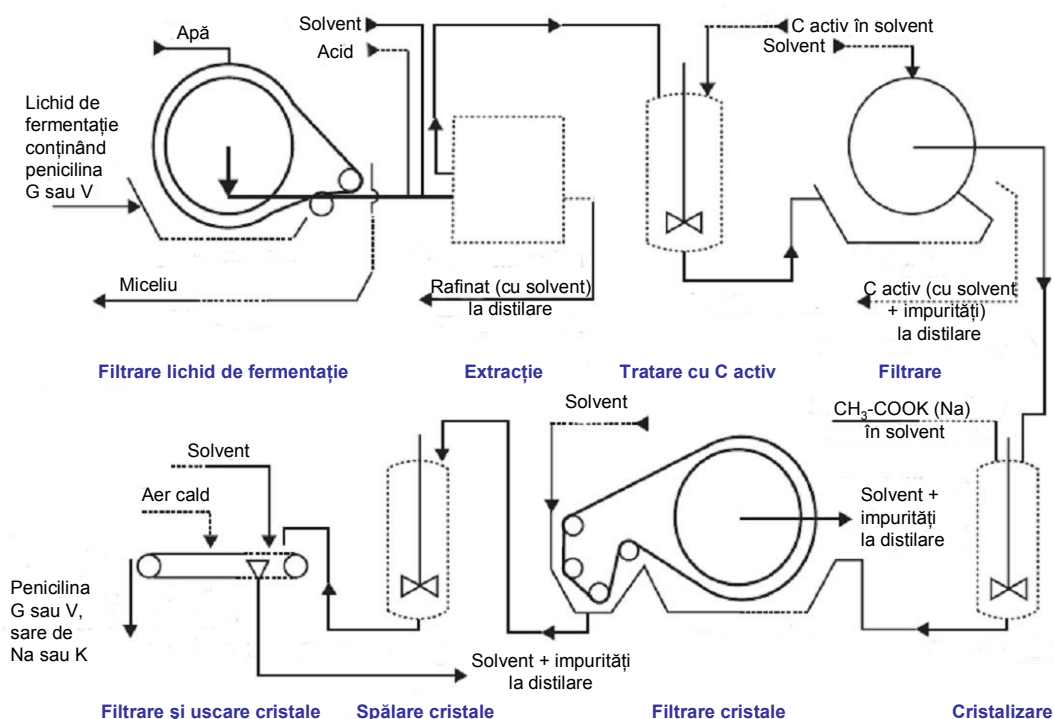


Figura 4.18. Schema de principiu a instalației de extracție și purificare a penicilinelor [115]

4.1.3.2. Extracția alcoolilor

Etanolul și butanolul sunt cei mai importanți alcooli obținuți prin fermentație din materii prime regenerabile. Una din problemele cu care se confruntă producerea fermentativă a etanolului este aceea a inhibării activității drojdiilor când concentrația etanolului în lichidul de fermentație depășește 12% masice. Datorită acestui fapt concentrația etanolului obținut prin fermentație nu depășește 5 – 10% vol [92]. Din lichidul de fermentație, calea clasică de recuperare a etanolului este distilarea. În comparație cu aceasta, extracția cu solvenți implică cheltuieli de investiții mai mari cu circa 60% [116]. Totuși, îndepărtarea prin extracție a etanolului în timpul fermentației ar permite creșterea randamentului în alcool. Cercetările sunt îndreptate spre *fermentarea extractivă in situ* [117, 118]. Solventul utilizat trebuie să prezinte un coeficient de distribuție ridicat pentru etanol, să nu formeze emulsii stabile care să îngreuneze extracția, să nu aibă efecte adverse asupra masei celulare. În literatură sunt menționați drept posibili solvenți dodecanolul, *i*-alcooli superiori, *n*-alcooli superiori, tributilfosfat, dibutilftalat, dodecan, fluorocarbură, *i*-acizi carboxilici superiori [92], sisteme apoase bifazice [119]. O instalație de fermentare extractivă *in-situ* este redată în fig. 4.19 [115]. Lichidul de fermentație este scos din bioreactor și trecut printr-o instalație de ultrafiltrare. Retenatul cu masă celulară de la ultrafiltrare este recirculat în bioreactor, iar permeatul este trecut în coloana de extracție, unde circulă în contracurent cu solventul. Rafinatul de la extracție este trecut printr-o coloană cu cărbune activ care are rolul de a reține urmele de solvent, după care este recirculat în bioreactor [120].

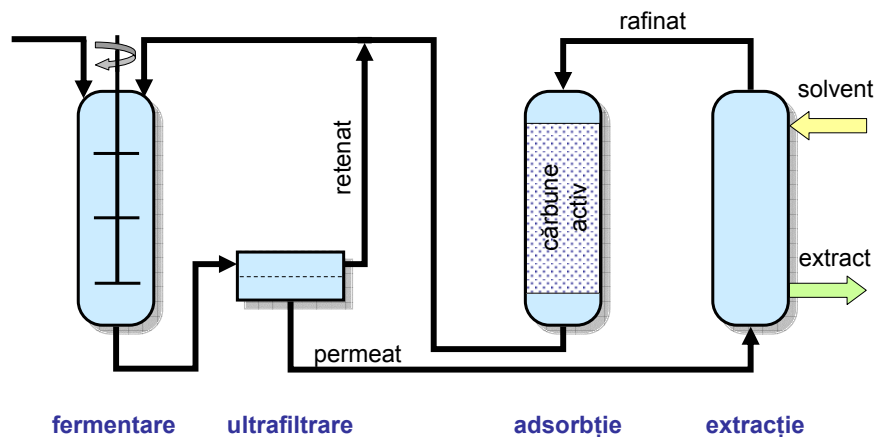


Figura 4.19. Instalație de fermentare extractivă *in-situ* [115]

4.1.3.3. Extracția acizilor carboxilici

Acizii organici obținuți prin fermentație pot fi separați și prin extracție, un studiu arătând că în calitate de agenți de extracție pot fi utilizați compuși organici conținând legături C=O, P=O, sau amine alifactice cu masă moleculară mare [113].

La fabricarea **acidului acetic** din materii prime petroliere se formează alături de produsul dorit și cantități semnificative de acizi formic și propionic. Un procedeu dezvoltat de Distiller's Company, procedeu care poate fi utilizat și pentru prelucrarea

acidului acetic obținut prin fermentare, folosește pentru separarea acidului acetic din masa de reacție apoasă extracția cu acetat de *i*-amil. În acest solvent acidul acetic este extras aproape integral, împreună cu o anumită cantitate de apă. Extractul este deshidratat prin distilare azeotropă, utilizând același solvent ca antrenant pentru apă. Rafinatul apos de la extracție, care conține mici cantități de acid acetic și de solvent, este stripat în vederea recuperării solventului și acidului, după care este descărcat [94, 115]. Analiza economică arată că introducerea etapei de extracție aduce economii importante în costurile de investiții și de exploatare (tab. 4.4) [121].

Tabelul 4.4. *Comparație între procesele de deshidratare a acidului acetic [121]*

Proces	Cheltuieli de capital	Consum de abur	Cheltuieli de exploatare
Distilare azeotropă	100 %	100 %	100 %
Extracție cu solvenți și distilare azeotropă	40 – 50 %	20 – 42 %	50 %

Acidul citric se obține pe scară largă prin fermentația mediilor conținând melasă, glucoză sau zaharoză, utilizând culturi de *Aspergillus niger*. Lichidul de fermentație rezultat conține un amestec de acizi organici (citric, aconitic, succinic, malic, fumaric) în care acidul citric reprezintă 80 – 95% [2]. Din acest amestec acidul citric se separă prin precipitare cu ioni Ca^{2+} . Citratul de calciu obținut este filtrat, spălat, tratat cu acid sulfuric. Soluția de acid citric separată prin filtrare de sulfatul de calciu solid este apoi trecută la purificare (adsorbție pe cărbune activ, schimbători de ioni), concentrare prin evaporare, cristalizare, filtrare, uscare [2, 115]. Procedul Lurgi de fabricare evită formarea deșeurilor de sulfat de calciu. După separarea lichidului de fermentație de masa celulară prin filtrare la vid, în faza lichidă se adaugă un agent de precipitare (~1 L/t acid citric monohidrat de puritate farmaceutică) pentru îndepărtarea proteinelor și a altor compuși organici. Precipitatul format se îndepărtează prin filtrare membranară, soluția de acid citric fiind apoi purificată prin adsorbție pe cărbune activ, schimb ionic și concentrată prin evaporare. Din soluția concentrată acidul citric este cristalizat, centrifugat, uscat și ambalat [122]. Acidul citric de fermentație poate fi separat și cu ajutorul extracției L – L, folosind ca agenți de extracție amine cu masă moleculară mare (extracție reactivă) sau extractanți organofosforici. Solventul ales trebuie să aibă un coeficient de distribuție bun pentru acidul citric, dar mai mic de 10, pentru a permite reextracția ușoară cu apă, precum și o tendință redusă de emulsionare. Reextracția trebuie realizată cu apă și nu cu soluții bazice, pentru a evita formarea citraților, fapt care ar anula avantajele extracției cu solvenți comparativ cu procedeul clasic de precipitare. Extracția cu tri-*n*-butilfosfat (TBP) dizolvat în Shellsol A este puternic dependentă de temperatură (fig. 4.20), un proces eficient realizându-se prin extracție la 22 °C, urmată de stripare cu apă la 60 °C [123].

Acidul butiric, cu utilizări în industria alimentară, farmaceutică și parfumerie se poate obține prin fermentare, însă aplicabilitatea procedurii este restrânsă datorită concentrațiilor reduse obținute (20 – 30 g/L) și datorită formării simultane a acidului acetic [124]. Acidul butiric stă la baza unor medicamente utilizate pentru tratamentul cancerului colorectal și al hemoglobinopatiilor [25] și este de dorit ca în astfel de aplicații să fie utilizat un compus obținut din produse naturale. Din amestecul de reacție acidul butiric poate fi extras cu decanol [126].

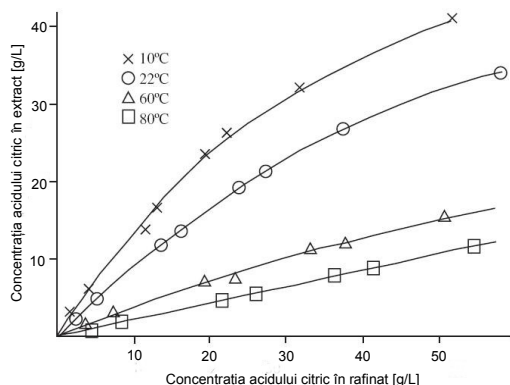


Figura 4.20. Izoterme de extracție a acidului citric cu TBP [123]

Acidul lactic utilizat ca aditiv alimentar se obține prin fermentare folosind glucoza ca substrat. Din mediul de cultură acesta se poate recupera prin extracție cu izopropileter [94], însă mult mai eficientă este extracția reactivă a acestuia.

Acizii carboxilici aromatici nu se obțin prin fermentare, întrucât ei sunt rareori sintetizați de către micro-organisme. **Acidul salicilic** reprezintă o excepție, el fiind sintetizat de către *Pseudomonas aeruginosa* prin bio-transformarea naftalinei [92]. Din lichidul de cultură acest aminoacid

poate fi extras cu xilen, cu sau fără adaos de amine [91].

4.2. EXTRAȚIA ÎN SISTEME APOASE BIFAZICE

Cu toate avantajele extracției cu solvenți față de alte metode de separare, utilizarea sa este limitată la extracția unor componente biologice cu structură simplă și stabilitate relativ ridicată. Moleculele de natură proteică sunt polare, iar solubilitatea lor în solvenți organici nepolari este redusă. În plus, solvenții organici pot provoca denaturări ale substanțelor proteice în timpul extracției. Datorită acestui fapt, pentru separarea din faza apoasă a proteinelor prin extracție lichid – lichid, este necesară găsirea unui solvent care, spre deosebire de solvenții organici uzuali, să aibă capacitate mare de solubilizare pentru proteine, să nu le denatureze și să producă o tensiune interfacială scăzută. Deoarece solventul care corespunde cel mai bine acestor deziderate este chiar apa, singura problemă care rămânea de rezolvat era găsirea lacunei de miscibilitate, respectiv a zonei în care un sistem apos devine eterogen, apărând două faze nemiscibile între ele.

Primele sisteme apoase eterogene au fost observate încă din 1896 de către Beijerinck [127], în cercetările efectuate asupra unor soluții apoase de gelatină și agar, iar mai recent de către Albertsson [128], care a pus în evidență coexistența fazelor apoase nemiscibile între care se pot partiționa macromolecule și diverse particule.

4.2.1. Formarea sistemelor apoase bifazice

Sistemele apoase bifazice (SAB) se pot utiliza în procesele de separare a proteinelor prin extracție L – L. Tehnica se bazează pe incompatibilitatea a doi polimeri hidrofilii diferiți la dizolvarea lor într-un solvent uzual cum este apa, sau pe incompatibilitatea dintre un polimer hidrofil și o sare anorganică.

Lacunele de miscibilitate pot apărea în diferite sisteme apoase; acestea se bazează pe interacțiuni polimer – polimer, polimer – sare, sau pe termoseparare. Un caz aparte îl reprezintă extracția bazată pe afinitate, care poate fi privită și ca un proces de extracție reactivă [129].

Majoritatea polimerilor hidrofilii, naturali sau sintetici, sunt solubili în apă. La concentrații scăzute ale polimerilor în soluția apoasă, sistemul este omogen. La o anumită concentrație a polimerilor, strict determinată și măsurabilă prin metode turbidimetrice, se produce separarea fazelor. Valorile concentrațiilor la care sistemul devine eterogen depinde de masa moleculară a polimerilor, scăzând cu creșterea acesteia. Cel mai cunoscut și studiat sistem pe bază de polimeri este cel bazat pe polietilenglicol (PEG) și dextran (fig. 4.21).

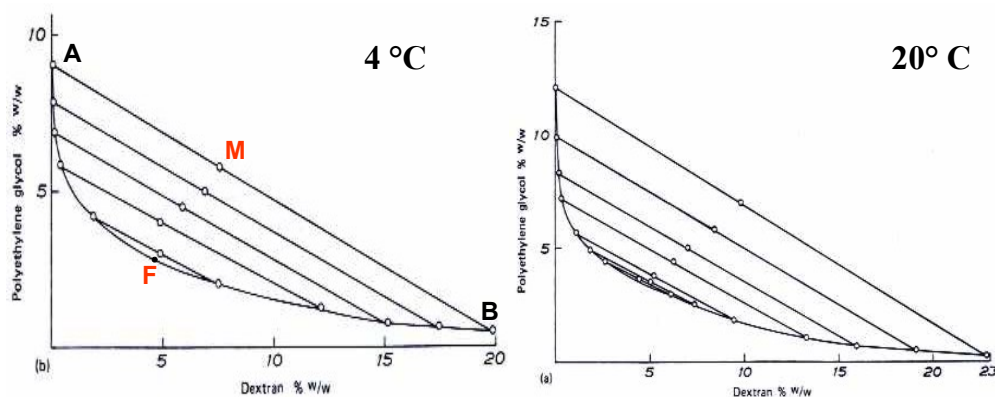


Figura 4.21. Diagrama de echilibru a sistemului PEG / Dextran la 4 și 20 °C [128]

Curba care trece prin punctele AFB poartă denumirea de *curbă binodală*. Orice punct situat sub această curbă reprezintă o soluție omogenă de PEG și dextran în apă. Punctele situate pe această curbă reprezintă rapoartele concentrațiilor de PEG, respectiv dextran, la care se produce separarea fazelor. Deasupra curbei binodale sistemul este bifazic, fiind format din două faze apoase nemiscibile: o fază apoasă superioară, „faza ușoară”, bogată în PEG și o fază apoasă inferioară, „faza grea”, bogată în dextran. În punctul M, de exemplu, sistemul la echilibru este format din faza ușoară superioară, de compoziție corespunzătoare punctului A și din faza grea inferioară de compoziție corespunzătoare punctului B. Dreapta care unește punctele A și B poartă denumirea de *linie de legătură* sau *conodă*. Toate amestecurile eterogene obținute pentru proporții între concentrațiile PEG și dextranului situate pe aceeași conodă vor avea aceeași compoziție a fazelor, diferind doar prin volumele ocupate de aceste faze. Raportul volumelor fazelor formate se poate exprima prin raportul dintre distanțele de la punctul corespunzător la extremitățile conodei:

$$\frac{V_{sup}}{V_{inf}} = \frac{\overline{MB}}{\overline{MA}} \quad (4.6)$$

în care V_{sup} și V_{inf} reprezintă volumele fazei superioare, respectiv inferioare. Punctul F este așa-numitul *punct critic*, în care conoda este reprezentată de un singur punct pe curba binodală. În acest punct, adăugarea unei cantități infinitezimale de apă conduce la formarea a două faze apoase nemiscibile, de volum și compoziție identice. Ca urmare, orice component adăugat va avea un coeficient de distribuție $K_N = 1$, coeficientul de distribuție reprezentând raportul dintre concentrația componentului în faza superioară, $C_{i, sup}$ și concentrația componentului în faza inferioară, $C_{i, inf}$ [129]:

$$K_N = \frac{C_{i, sup}}{C_{i, inf}} \quad (4.7)$$

Capitolul 4 – Separarea prin extracție

Cu creșterea lungimii conodei, compoziția fazelor la echilibru devine din ce în ce mai diferită, iar coeficientul de distribuție se modifică în mod corespunzător, permițând realizarea separărilor.

SAB pot fi obținute și prin amestecarea, în anumite proporții, a polimerilor cu electroliți (fig. 4.22), acestea fiind uneori mai performante decât SAB care conțin numai polimeri [4]. Cele mai utilizate SAB sunt redate în tab. 4.5 [4].

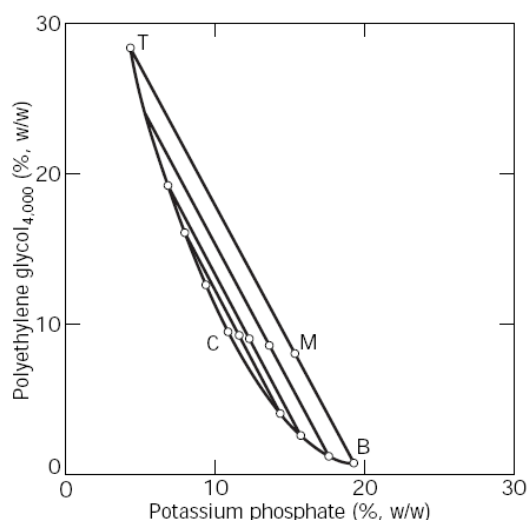


Figura 4.22. Diagrama de echilibru a sistemului PEG 4000 / Fosfat de potasiu [128]

Tabelul 4.5. SAB frecvent utilizate [4]

Polietilenglicol	Alcool polivinilic Polivinilpirolidonă Dextran
Polipropilenglicol	Metoxi-polietilenglicol Polietilenglicol Alcool polivinilic Polivinilpirolidonă Hidroxi-propildextran Dextran
Alcool polivinilic	Metilceluloză Hidroxi-propildextran Dextran
Metilceluloză	Hidroxi-propildextran Dextran
Etil-hidroxiceluloză	Dextran
Hidroxi-propildextran	Dextran
Polipropilenglicol	K ₃ PO ₄
Metoxi-polietilenglicol	K ₃ PO ₄
Polietilenglicol	K ₃ PO ₄ , MgSO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₄ , formiat de Na (K), tartrat de Na (K)
Polivinilpirolidonă	K ₃ PO ₄

Pe lângă sistemele polimer – polimer și polimer – sare există și alte alternative de SAB. O dezvoltare recentă o constituie utilizarea detergenților neionici cu grupări hidrofile oxietilenice. La temperaturi scăzute există o singură fază, formată din lichidul de fermentație și miclele de detergent, detergentul interacționând mai ales cu proteinele hidrofobe. La creșterea temperaturii peste o anumită valoare (dependentă de sistem), apare turbiditatea care indică apariția unei faze noi. Această temperatură mai este numită și „punct de tulburare” (cloud point). Valoarea sa depinde în special de numărul mediu al grupărilor oxietilenice din detergent. De exemplu, un detergent C12EO5 are punctul de tulburare la 23 – 25 °C. Separarea fazelor, datorată hidratării reversibile a grupărilor polare de la extremitățile moleculei conduce la formarea unei faze îmbogățite în detergent și a uneia săracite în detergent. Miclele suferă un proces de agregare în structuri laminate având proteina hidrofobă într-o așa-numită fază coacervată cu un conținut de 70 – 80% apă [130]. Procesul este redat schematic în fig. 4.23. Un proces similar este și extracția cu micle inverse, discutată în subcapitolul 4.3. Anumiți copolimeri polietilenă (PE) – polipropilenoxid (PPO) prezintă de asemenea proprietatea de deshidratare reversibilă a grupărilor oxidice într-un domeniu atractiv de temperatură [131-133]. Inițial se folosește un SAB de tip polimer – polimer pentru trecerea proteinei

în faza bogată în copolimer PE/PPO. După această primă separare, soluția de de copolimer este încălzită deasupra punctului de tulburare, ceea ce duce la separarea fazelor și trecerea aproape integrală a proteinei în faza săracă în polimer.

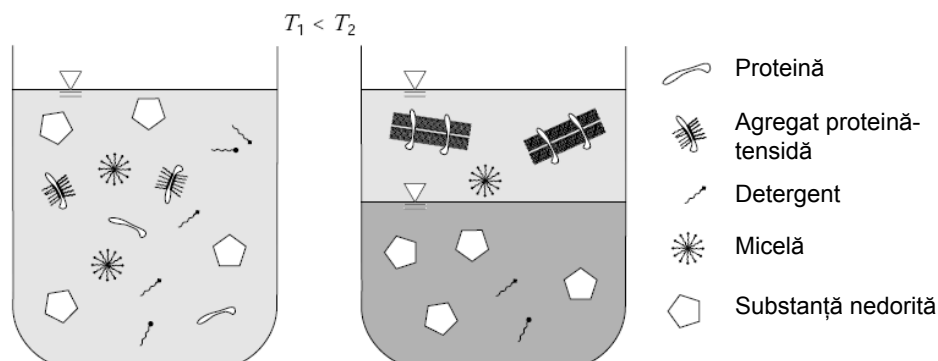


Figura 4.23. Soluția apoasă de detergent sub și peste punctul de tulburare [129]

4.2.2. Mecanismul extracției biopolimerilor

Extracția biopolimerilor se realizează datorită interacțiunilor de tip van der Waals create între molecula proteică și polimerul hidrofil sau între grupările proteinelor, cu solubilizarea acestora într-o anumită fază [4].

Un sistem de extracție este proiectat astfel încât proteina dorită să treacă în faza superioară (PEG, de ex.), iar materialul care trebuie îndepărtat, inclusiv celulele și resturile celulare, să treacă în faza inferioară (sare sau dextran). Puterea de separare a unui sistem este caracterizată de gradul de extracție (Y) și de factorul de separare (F), dependenți de raportul volumelor fazelor (R) și de coeficientul de distribuție (K_N). Gradul de extracție în faza superioară este definit prin relația:

$$Y_{\text{sup}} = \frac{n_{\text{sup}}}{n_{\text{sup}} + n_{\text{inf}}} = \frac{1}{1 + \left[\frac{V_{\text{inf}}}{V_{\text{sup}}} \cdot \frac{1}{K_N} \right]} \quad (4.8)$$

în care n este numărul de moli de proteină dorită în volumul fazei superioare (V_{sup}), respectiv inferioare (V_{inf}). Factorul de separare este definit ca produs între coeficientul de distribuție și raportul volumelor fazelor:

$$F = K_N \cdot R = K_N \cdot \frac{V_{\text{sup}}}{V_{\text{inf}}} \quad (4.9)$$

Valorile Y , K_N și R se influențează reciproc. De regulă, Y_{sup} crește la creșterea lui K_N la $R = \text{ct.}$, sau la creșterea lui R la $K_N = \text{ct.}$ (fig. 4.24). Coeficientul de distribuție K_N nu depinde de concentrația proteinei i (c_i), atâta timp cât concentrația c_i este mult mai redusă decât concentrația polimerilor și atâta timp cât nu are loc formarea unor complecși. După Bronstedt, există o corelație exponențială între K_N și aria suprafeței (masa moleculară) a proteinei i :

$$\ln K_N = \frac{\alpha \cdot A_i}{k \cdot T} \quad (4.10)$$

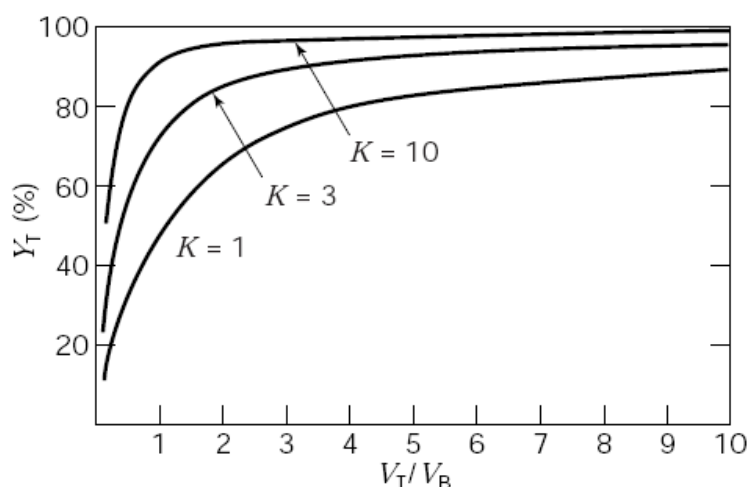


Figura 4.24. Interdependența dintre gradul de extracție (Y_{sup}), coeficientul de distribuție (K_N) și raportul volumic al fazelor (R) [134]

unde α este un factor dependent de potențialul chimic, A_i este suprafața disponibilă de interacțiune, k este constanta lui Boltzmann, iar T este temperatura absolută (K). Astfel, celulele și resturile celulare vor prezenta, chiar la valori α mici, un coeficient de distribuție tinzând spre zero într-o fază și spre infinit în cealaltă fază, datorită valorii ridicate a suprafeței disponibile de interacțiune; metaboliții prezintă valori K_N aproximativ unitare, iar proteinele au valori K_N cuprinse între 0,1 și 10. Pe baza dependenței date de ecuația (4.10) s-au putut izola antigenii de suprafață ai hepatitei B (având mase moleculare de $1.10^6 - 2.10^6$ Da) ca vaccin produs din culturi de drojdii recombinante [135].

Principalii factori care influențează valoarea constantei de distribuție sunt: componenții care formează cele două faze, respectiv natura, concentrația și masa moleculară a polimerilor, tipul și concentrația ionilor din sistem, pH-ul, temperatura, adaosul de alți componenți (agenți haotropici, de ex.), concentrația celulelor și a resturilor celulare [4, 129, 136].

Solubilizarea proteinelor este dictată de **hidrofobicitatea** polimerilor existenți în soluția apoasă. Aceasta crește în ordinea [4]:

dextran sulfat < carboxi-metildextran < dextran < hidroxi-propildextran <
metilceluloză < alcool polivinilic < polietilenglicol < polipropilenglicol

Hidrofobicitatea unui polimer este cu atât mai mare cu cât masa sa moleculară este mai mare. Datorită acestor lucruri, în sistemul PEG – dextran sau PEG – sare poate fi crescută concentrația proteinei în faza superioară prin utilizarea unui PEG cu masă moleculară medie mică. Concomitent, distribuția masei moleculare a polimerului controlează hidrofobicitatea relativă a celor două faze, respectiv gradul de extracție.

Datorită migrării ionilor din fazele apoase se stabilește un, potențial electric de o parte și de alta a interfeței de separare, acesta influențând hotărâtor distribuția macromoleculelor cu sarcină electrică (proteine, acizi nucleici). O modificare minoră a **concentrației** sau **tăriei ionice** poate conduce la modificări majore ale coeficientului de distribuție, așa cum rezultă și din fig. 4.25.

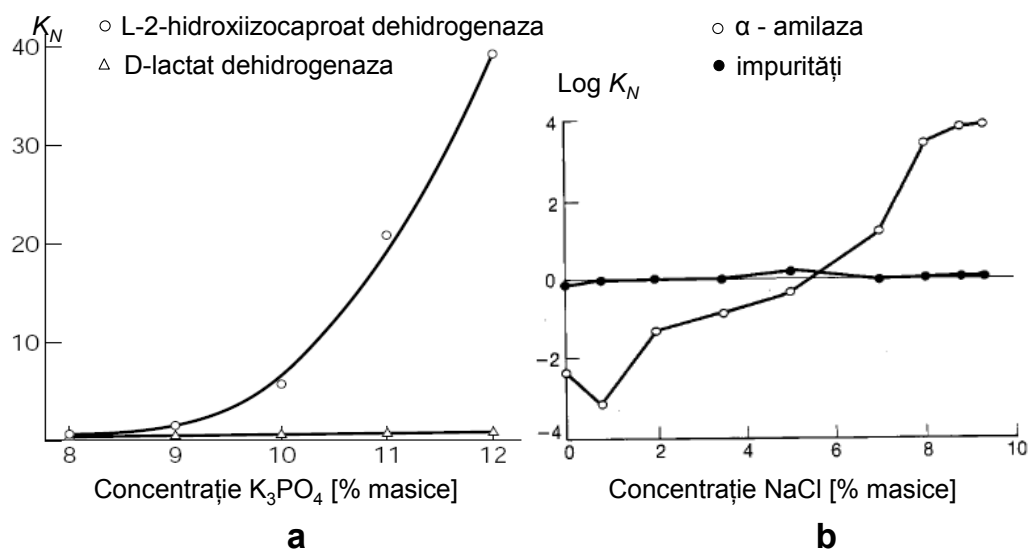


Figura 4.25. Influența compoziției și a tăriei ionice a mediului asupra coeficientului de distribuție: a – partiția enzimelor în funcție de concentrația fosfatului de potasiu [137]; b – partiția α -amilazei în funcție de concentrația clorurii de sodiu [136]

Concentrația proteinelor nu manifestă nici un efect asupra repartiției acestora între cele două faze doar în domeniul concentrațiilor foarte reduse (sub 1 g/L), această limită depinzând de tipul proteinei [4].

Valoarea pH-ului controlează disocierea grupărilor ionizabile ale proteinelor și, implicit distribuția acestora între cele două faze. Odată cu variația pH-ului se produc modificări în disocierea ionilor polivalenți (PO_4^{3+}), ceea ce va afecta potențialul electric dintre faze, respectiv distribuția proteinelor. În sistemele PEG – sare, de ex., s-au constatat variații de 2 – 3 ordine de mărime ale K_N pentru intervale înguste de pH (fig. 4.26).

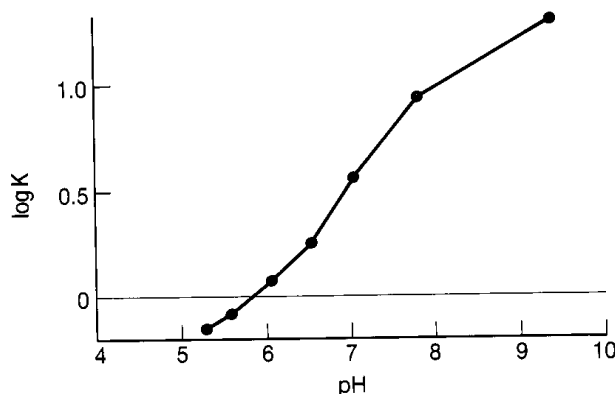


Figura 4.26. Distribuția α -amilazei pure în sisteme apoase bifazice PEG 4000 (10% masice) – fosfat (11,5% masice) în funcție de pH [136]

Afinitatea biospecifică dintre moleculele proteice și anumiți liganzi (liganzi de afinitate) atașați unuia dintre polimeri poate fi utilizată pentru îmbunătățirea separării. Ca liganzi de afinitate se utilizează coloranți, acizi grași, glutatation etc. [91, 136, 138]. Rezultate deosebite au dat și ionii complecși de Cu(II)-iminodiacetat în sisteme PEG –

Capitolul 4 – Separarea prin extracție

dextran sau PEG – sare [139, 140]. Pentru extracția unui antibiotic glicopeptidic, vancomicina, a fost utilizat drept ligand de afinitate D-alanil-D-alanina în sisteme PEG 8000 – dextran și PEG 8000 – K_3PO_4 [141].

Sensibilitatea coeficienților de distribuție la **variația temperaturii** este redusă. Temperatura modifică forma diagramelor de echilibru de faze (fig. 4.21). La scăderea temperaturii, separarea fazelor decurge la concentrații mai scăzute de polimer în sistemele PEG – dextran, ceea ce înseamnă un consum mai redus de polimeri, și la temperaturi mai ridicate în sistemele PEG – sare, ducând la creșterea consumului de polimer. Temperatura modifică de asemenea distribuția biomoleculelor (tab. 4.6), o temperatură mai scăzută conducând la o mai bună separare a proteinelor între ele. În conformitate cu ecuația (4.10), scăderea temperaturii conduce la creșterea coeficientului de distribuție [142]. Scăderea temperaturii conduce însă la creșterea viscozității. Utilizarea polimerilor hidrofilii îmbunătățește stabilitatea enzimelor, astfel încât extracția poate avea loc la temperatura camerei cu o pierdere minimă a bioactivității. Răcirea SAB nu este necesară decât în cazul în care sunt implicate proteine foarte fragile [91].

Tabelul 4.6. Coeficientul de distribuție al lizozimei și catalazei în diverse SAB [143]

Temp. [°C]	K_N lizozimă	K_N catalază	Factor de separare	SAB
4	0,54	0,046	11,7	12,2 % Dextran 10 8,4 % PEG 4000
25	0,44	0,063	7,0	
40	0,85	0,174	4,9	
4	0,35	0,014	25	10,0 % Dextran 10 5,6 % PEG 20000
25	0,31	0,016	19,4	
40	0,53	0,020	26,5	
4	0,65	0,22	3,0	11,3 – 11,5 % Dextran 500 7,9 % PEG 4000
25	0,47	0,21	2,2	
40	0,98	0,43	2,3	
4	0,58	0,052	11,2	10,3 % Dextran 500 7,65 % PEG 20000
25	0,36	0,042	8,6	
40	0,72	0,068	10,6	

4.2.3. Proiectarea procesului de extracție în sisteme apoase bifazice

Proiectarea unui proces de extracție în SAB implică mai multe etape, și anume: (i) stabilirea caracteristicilor moleculelor proteice care trebuiesc separate; (ii) selectarea mai multor SAB capabile de a realiza separarea componentului dorit; (iii) alegerea dintre acestea a sistemului de extracție adecvat, în funcție de influența diverșilor factori (natura soluției proteice inițiale, tărie ionică, pH, temperatură etc); (iv) stabilirea schemei de flux a procesului de extracție necesare pentru obținerea purității dorite, în condițiile eliminării compușilor cu activitate concurentă (enzime care pot transforma un substrat într-un mod nedorit, de ex.).

Un component oarecare i din soluția inițială va trece în faza superioară sau în cea inferioară, după cum coeficientul de distribuție $K_{N,i}$ este supraunitar sau subunitar (ec. 4.7). Dacă $K_{N,i} \geq 3$, compusul i poate fi extras într-o singură treaptă. Când $K_{N,i}$ este scăzut, gradul de extracție în una din faze poate fi mărit utilizând un volum mai mare din solventul cu afinitate mai mare pentru componentul respectiv:

$$Y_{i,\text{sup}} = \frac{V_{\text{sup}} \cdot C_{i,\text{sup}}}{V_0 \cdot C_{i,0}} = \frac{V_{\text{sup}} \cdot C_{i,\text{sup}}}{V_{\text{sup}} \cdot C_{i,\text{sup}} + V_{\text{inf}} \cdot C_{i,\text{inf}}} \quad (4.11)$$

în care, pe lângă notațiile anterioare, V_0 – volumul inițial al fazei care conține componentul i , $C_{i,0}$ – concentrația componentului i în faza inițială. Analog:

$$Y_{i,\text{inf}} = \frac{V_{\text{inf}} \cdot C_{i,\text{inf}}}{V_0 \cdot C_{i,0}} = \frac{V_{\text{inf}} \cdot C_{i,\text{inf}}}{V_{\text{sup}} \cdot C_{i,\text{sup}} + V_{\text{inf}} \cdot C_{i,\text{inf}}} \quad (4.12)$$

Gradul maxim de recuperare al componentului i în fiecare fază într-o unitate teoretică de extracție, rezultă din ecuațiile (4.11) și (4.12), împărțind atât numărătorul cât și numitorul fracției cu $C_{i,\text{sup}}$, respectiv cu $C_{i,\text{inf}}$:

$$(Y_{i,\text{sup}})_{\text{max}} = \frac{V_{\text{sup}}}{V_{\text{sup}} + \frac{V_{\text{inf}}}{K_{N,i}}} \quad (Y_{i,\text{inf}})_{\text{max}} = \frac{V_{\text{inf}}}{V_{\text{sup}} \cdot K_{N,i} + V_{\text{inf}}} \quad (4.13)$$

Schema generală de separare prin extracție cu SAB a unui amestec obținut prin distrugerea celulelor este redată în fig. 4.27.

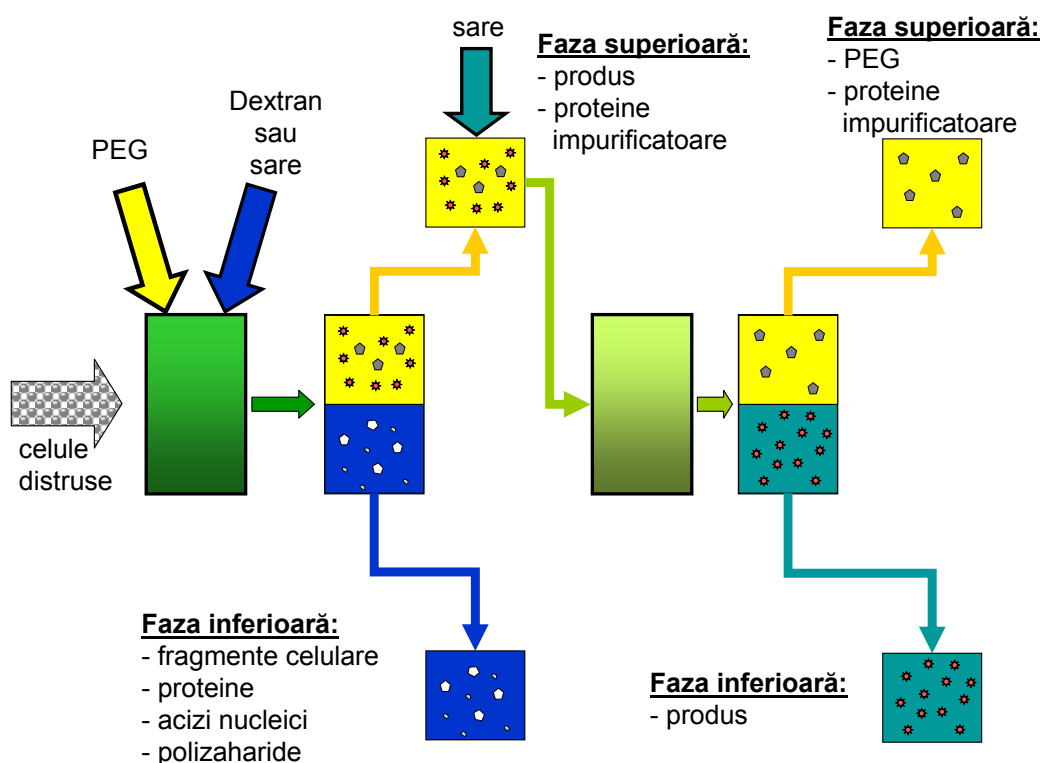


Figura 4.27. Schema generală a procesului de extracție selectivă a moleculelor proteice din lichidul intracelular

În general, atingerea unor purități dorite se realizează prin 2 – 4 etape succesive de separare (tab. 4.7). Componentii secundari ai soluției inițiale (proteine, acizi nucleici, polizaharide) sunt separați prin extracție fie în faza sării (dacă sunt hidrofilii), fie în faza polimerului (dacă sunt hidrofobi). În cazul în care, după prima etapă de extracție, în faza superioară se găsește o cantitate însemnată de componenți secundari alături de produsul

Capitolul 4 – Separarea prin extracție

util, această fază se supune unei noi extracții cu o soluție concentrată de săruri. În final, moleculele proteice pot fi recuperate din soluția de săruri prin ultrafiltrare sau diafiltrare [4].

Tabelul 4.7. Izolarea și purificarea enzimelor cu SAB [144, 145]

Enzima	Organismul	Număr de etape	Factor de purificare global	Grad de extracție global [%]
Pullulanază	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	4	6,3	70
Glucozizomerază	<i>Streptomyces</i>	1	2,5	86
Fumarază	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	2	22	70
Aspartază	<i>E. coli</i>	3	18	82
Penicilinacilază		3	12	75
Glucozdehidrogenază	<i>Bacillus megaterium</i>	3	33	83
Leucindehidrogenază	<i>Bacillus sphaericus</i>	2	3,1	87
Leucindehidrogenază	<i>Bacillus cereus</i>	2	2,4	89
Formiatdehidrogenază	<i>Candida boidinii</i>	4	3,8	70
D-Lactatdehidrogenază	<i>Lactobacillus confusus</i>	2	1,9	91
L-Hidroxi-izocaproatdehidrogenază		3	20	66

4.2.4. Aplicații ale extracției în sisteme apoase bifazice

Extracția în SAB are numeroase aplicații în separarea celulelor, organelor celulare, proteinelor, acizilor nucleici, enzimelor intracelulare etc., atât la scară de laborator, dar și la scară pilot sau industrială. O listă a biomoleculelor purificate la scară pilot și industrială prin extracție în SAB este redată în tab. 4.7 – 4.8.

Tablelul 4.8. Biomolecule purificate la scară industrială prin extracție în SAB [138]

Acil-arilamidază	Formiatdehidrogenază	Izopropanoldehidrogenază
Alcooldehidrogenază	β -Galactozidază	NADkinază
α -Amilază	Glucos-6-fosfatdehidrogenază	Fosfofructokinază
Aspartat β -decarboxilază	α -Glucosidază	Fosfolipază
a/b Proteine clorofilene	Hexakinază	Fosforilază
Cromatofori	D-2-Hidroxi-izocaproatdehidrogenază	Hibrid proteină stafilococă A – β -galactozidază
Formaldehiddehidrogenază	Izoleucil-tRNA sintetază	Proteine din zer

Extracția în SAB utilizează aceleași principii ca și extracția fizică L – L clasică. În consecință, se pot utiliza aceleași echipamente pentru amestecarea și separarea fazelor. Diferența rezidă în proprietățile diferite ale SAB în comparație cu cele ale sistemelor clasice (fază apoasă – fază organică) întâlnite în extracția fizică L – L, cea mai notabilă diferență fiind tensiunea interfacială extraordinar de scăzută (tab. 4.9).

Tabelul 4.9. Proprietăți fizice ale SAB [134]

Compoziția sistemului	$\Delta\rho$ [kg/m ³]	μ_{sup} [mPa.s]	μ_{inf} [mPa.s]	μ_{disp} [mPa.s]	σ [mN/m]	Ref. bibl.
9 % PEG 4000, 2 % dextran T-500	1010	3,0	94	3,4	-	[146]
7 % PEG 4000, 1,25 % dextran brut	1046	2,7	2000	4,0	-	[146]
16 % PEG 4000, 13 % fosfat	1085	12	2,1	-	1,25	[147]

În aplicațiile la scară mare, cele mai utilizate SAB sunt PEG – dextran – apă și PEG – sare – apă, datorită aplicabilității cvasigenerale, viscozității și diferenței de densitate acceptabile. În plus sunt netoxice și biodegradabile, fiind certificate de către farmacopeele din cele mai multe țări [138]. Un dezavantaj ar fi costul ridicat al dextranului purificat (de ordinul sutelor de dolari pe kg). Reducerea costurilor se poate face prin înlocuire cu dextran brut, dextran brut hidrolizat sau amidon hidroxipropilic [138, 142]. Dextranul brut conduce la o soluție cu viscozitate mai ridicată, în timp ce dextranul hidrolizat reduce viscozitatea soluției [142].

4.2.5. Procesul tehnologic de extracție în sisteme apoase bifazice

În general, pentru purificarea proteinelor intracelulare, după fazele de dezagregare a celulelor, adăugarea componentelor SAB (PEG, dextran, fosfat etc.) și ajustarea pH-ului, are loc amestecarea suspensiei pentru atingerea echilibrului de faze. Amestecarea se poate realiza fie în vase cu agitare prevăzute cu șicane, fie în amestecătoare statice [148]. Necesarul de energie este scăzut datorită tensiunii interfaciale reduse, iar echilibrul este atins foarte rapid, în circa 30 s, dacă amestecarea asigură un regim de curgere turbulent [149]. Separarea fazelor se poate face gravitațional sau centrifugal. Se recomandă separarea centrifugală în cazul viscozității ridicate a sistemului, sau în cazul diferențelor mici de densitate dintre faze [134]. Centrifugarea are avantajul suplimentar al unor randamente mai ridicate, știut fiind faptul că la accelerații mari antrenarea resturilor celulare este mai scăzută.

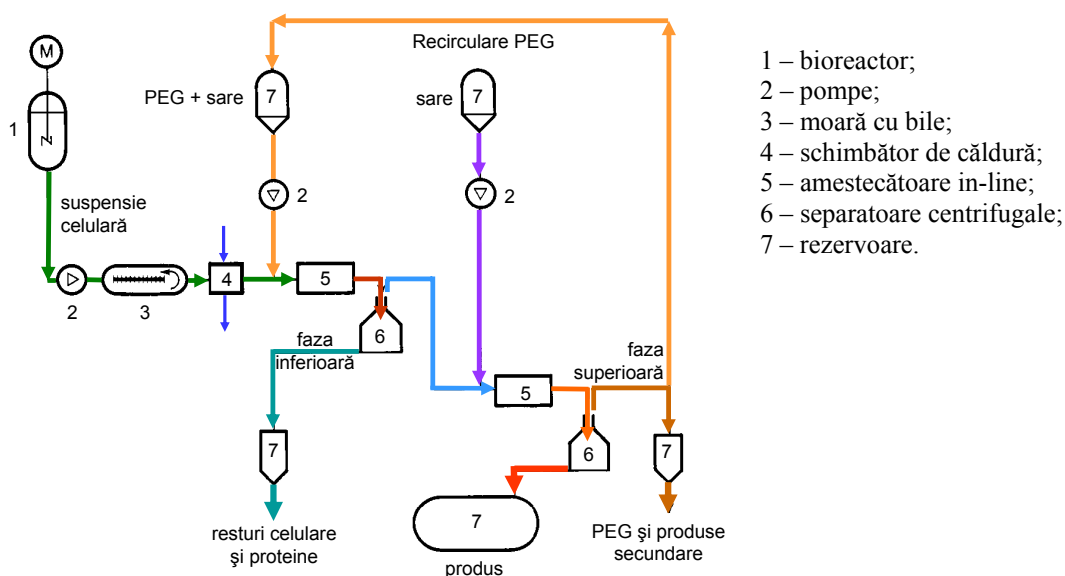


Figura 4.28. Schema procesului tehnologic de extracție a proteinelor intracelulare în sisteme apoase bifazice [134]

După separarea inițială, la faza superioară se adaugă o sare, pentru a genera un nou sistem bifazic, în care proteina de interes să se găsească în faza inferioară (fig. 4.27). Pe lângă această tehnică, proteina din faza de polimer poate fi separată prin centrifugare, adsorbție, ultrafiltrare sau electroforeză [150]. În procesele la scară mare,

concentrarea și condiționarea produsului din faza inferioară a sistemului bifazic secundar se realizează prin ultrafiltrare sau diafiltrare, faza superioară fiind recirculată [134, 151]. De asemenea, în anumite condiții, din faza inferioară a sistemului bifazic secundar, proteina poate fi recuperată prin cromatografie de interacțiune hidrofobă [129]. Un proces tehnologic tipic de extracție a unei proteine în SAB este redat în fig. 4.28.

Extracția în SAB se realizează de obicei în șarje, însă poate fi mai economică realizarea ei în flux continuu. În general există trei posibilități de prelucrare în regim continuu (fig. 4.29): extracția în echicurent, extracția în contracurent și extracția în curent încrucișat, fiecare dintre ele prezentând avantaje și dezavantaje (tab. 4.10). Pentru capacități mari de producție, extracția în contracurent oferă un randament mai ridicat, la un consum minim de chimicale [148].

Tabelul 4.10. Avantaje și dezavantaje ale modurilor de contactare în extracția continuă în SAB [129]

Contactare	Potrivit pentru	Consumuri	Randament	Factor de purificare
Echicurent	K_N scăzut	ca la curent încrucișat	mediu	mediu
Curent încrucișat	K_N ridicat	ca la echicurent	cel mai scăzut	cel mai ridicat
Contracurent	K_N scăzut	cele mai scăzute	cel mai ridicat	cel mai scăzut

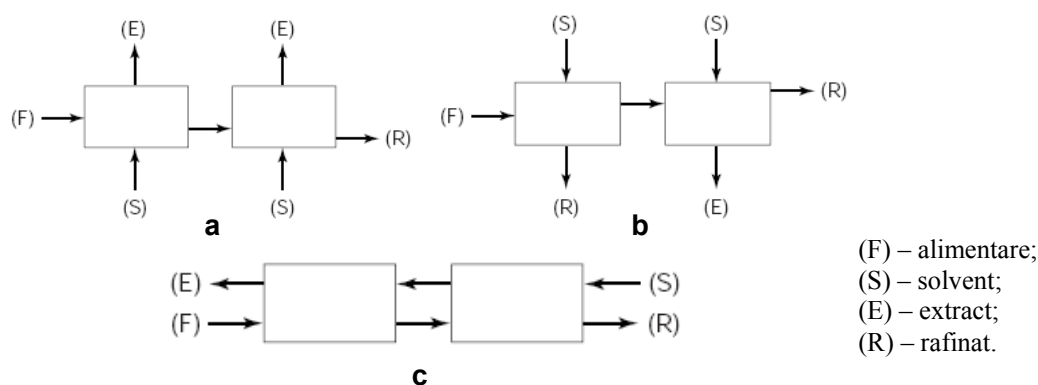


Figura 4.29. Modalități de contactare a fazelor în extracția în SAB:
a – echicurent; b – curent încrucișat; c – contracurent.

Pentru o purificare avansată a biomoleculelor extrase este necesară realizarea extracției în mai multe trepte. Nu toate echipamentele de extracție L – L sunt potrivite extracției cu SAB, mai ales atunci când proprietățile celor două faze sunt prea asemănătoare, ori când tensiunea interfacială este prea redusă. Pentru extracția în trepte cu SAB au fost testate baterii de amestecătoare – decantoare, coloane Kühni [152], extractoare centrifugale Podbielniak [153], coloane cu pulverizare [154, 155], coloane cu talere sită [156], coloane cu umplutură [157], toate putând fi exploatate cu succes cu luarea unor măsuri de precauție împotriva înneccării. Rezultate bune s-au obținut și cu extractorul Graesser în separarea α -lactalbuminei din zer cu SAB PEG – sare [158]. Acest extractor, format dintr-un rotor orizontal prevăzut cu cupe (de unde și denumirea de „contactor în ploaie cu găleți”¹) care se rotește lent în interiorul unui tambur

¹ Raining bucket contactor – denumirea alternativă în limba engleză a extractorului Graesser

alimentat pe la extremități cu fazele supuse extracției (fig. 4.30). Este singurul extractor care dispersează atât faza ușoară în faza grea, cât și faza grea în faza ușoară [86, 87]. Pentru prevenirea înnețării s-a redus viteza de rotație de la 20 rot/min la 2 – 5 rot/min și s-a inversat sensul de rotație al rotorului cu cupe, reducându-se astfel și intensitatea amestecării [159].

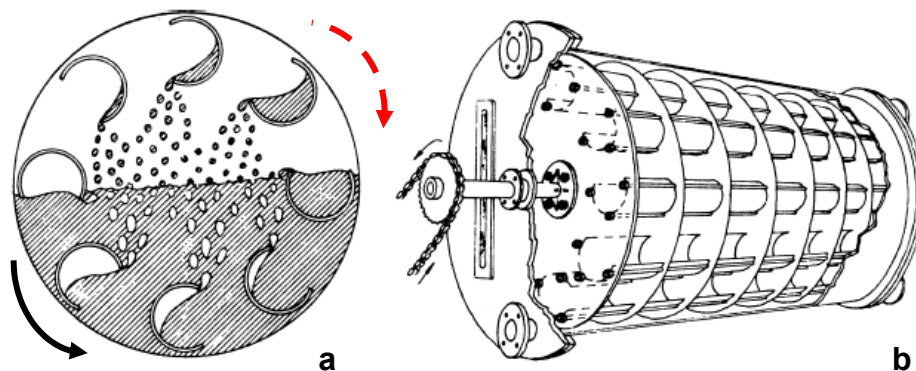


Figura 4.30. Extractor Graesser (actualmente RTL SA Londra) [160]

a – secțiune transversală; b – vedere interioară.

→ sensul normal de rotație; — — — → sensul de rotație la extracția în SAB.

4.2.6. Recuperarea chimicalelor și reducerea costurilor

Pentru a reduce costurile ridicate cu reactivii și cu depozitarea deșeurilor se recomandă reciclarea sau recircularea materialelor auxiliare. Recuperarea polimerilor după extracția biomoleculelor este o etapă importantă atât la scară de laborator, cât și în instalația industrială. Posibilitatea de a recupera și recircula ușor polimerii utilizați ar face mult mai atractivă extracția cu SAB în instalații de mare capacitate [161].

În literatură sunt menționate câteva modalități de recuperare a polimerilor și sărurilor utilizate în extracția cu SAB. Astfel, din fluxurile lipsite de fază solidă fosfatul poate fi recuperat prin cristalizare la 6 °C [134]. Pentru recircularea PEG s-a propus extracția lui cu cloroform [161], dar mult mai viabilă s-a dovedit însă reextracția salină a proteinelor din faza bogată în PEG (fig. 4.28), cu formarea astfel a unei soluții reciclabile de PEG liberă de proteină [134, 162]. Tot pentru separarea PEG de enzimele extrase se propun ultrafiltrarea, dializa, sau reținerea enzimei pe un adsorbant adecvat [163]. A fost demonstrată posibilitatea recirculării detergenților [164] prin extracție cu alcooli alifatici inferiori (fig. 4.31), precum și posibilitatea recuperării sărurilor [165] prin exploatarea lacunelor de miscibilitate în sistemele ternare apă – sare – alcooli alifatici inferiori (fig. 4.32). În acest din urmă caz, amestecul de alcool (etanol) și fază bogată în sare este trimis într-un evaporator unde este concentrat în vederea îndepărtării și reciclării etanolului. Soluția de sare este concentrată, la nevoie, într-un al doilea evaporator, de unde este apoi recirculată în procesul de extracție a proteinelor. Majoritatea apei evaporate poate fi de asemenea reciclată [166]. Mai recent s-a demonstrat formarea SAB în condiții normale (25 °C și presiune atmosferică) între PEG 2000, respectiv PEG 4000 și carbamatul de amoniu. Carbamatul fiind volatil, poate fi recuperat din sistemul de extracție și recirculat sub formă de amoniac și dioxid de carbon [167].

În principiu, chimicalele auxiliare (PEG, săruri, detergenți etc.) introduse în procesul de extracție cu SAB pot fi recuperate și recirculate în proporție de peste 90%, conducând la un proces cu costuri rezonabile și acceptabil din punct de vedere al problemelor de mediu.

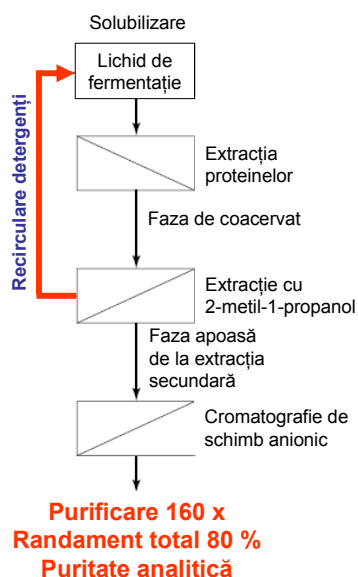


Figura 4.31. Schema de flux a extracției colesteroxidazei utilizând SAB bazate pe detergenți [164]

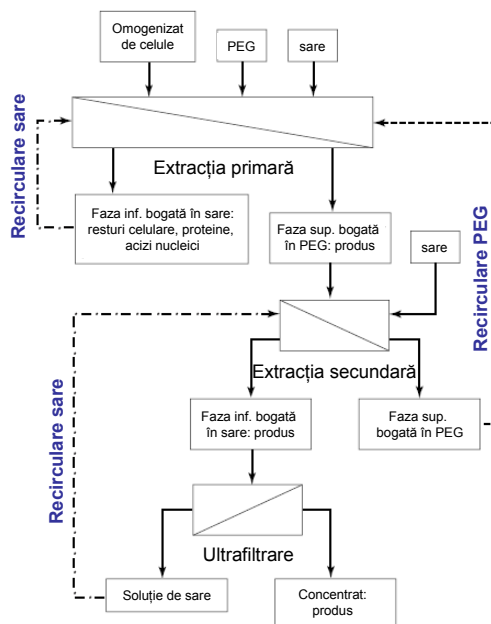


Figura 4.32. Schema de flux a extracției cu SABPEG – sare, cu recircularea extractanților [165]

4.2.7. Transpunerea la scară a extracției în sisteme apoase bifazice

Unul dintre avantajele extracției în SAB îl reprezintă ușurința transunerii la scară a procesului, prin simpla creștere proporțională a cantității ingredientelor utilizate [144, 145, 168]. Echipamentele industriale de separare centrifugală existente pe piață pot fi selecționate utilizând conceptul Σ (vezi subcap. 2.4.1). Numai în perioada 1982 – 1995 au fost transpuse la scară industrială 27 de procese, marea majoritate utilizând sisteme PEG – sare, pentru separarea și purificarea enzimelor, antigenului hepatitei B, interferonului, lactalbuminelor, lactoglobulinelor, hemoglobinei, precum și a altor proteine terapeutice active [129]. Scara de operare a acestor procese variază de la 24 kg celule prelucrate / șarjă până la 50 m³ material celular prelucrat / șarjă [169]. Există instalații cu capacități de 500 kg drojdii / 24 h în care procesul de extracție a enzimelor este asistat de calculator [170], procesul putând fi realizat în șarje sau continuu, prin extracție în contracurent [171]. În fig. 4.33 sunt prezentate rezultatele obținute în transpunerea la scară a separării și purificării formiatdehidrogenazei obținute din *Candida boidinii* în SAB PEG – K₃PO₄. Transpunerea la scară la un factor de aproape 4.10⁴ a patru etape diferite de separare nu a influențat semnificativ gradul de separare realizat [144].

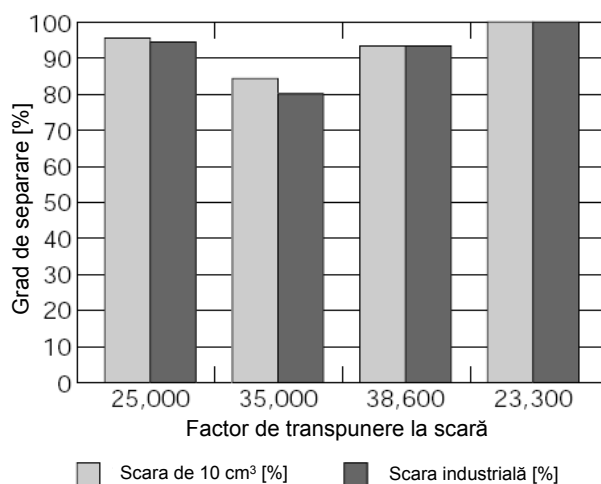


Figura 4.33. Transpunerea la scară a diferitelor etape de izolare și purificare a formatdehidrogenazei din *Candida boidinii* [144]

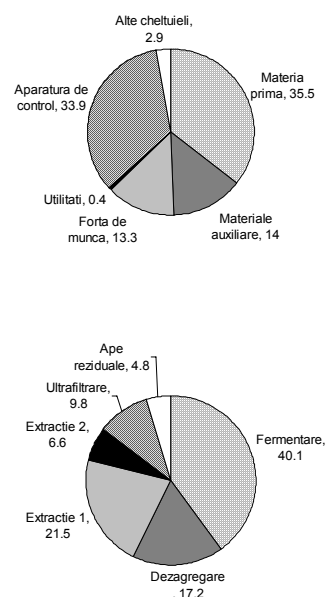


Figura 4.34. Structura costurilor de fabricație a fumarazei din *Brevibacterium ammoniagenes* [172]

4.2.8. Aspecte economice ale extracției în sisteme apoase bifazice

Costurile recuperării și concentrării biomoleculelor prin extracție în SAB depind în mod hotărâtor de sistemul utilizat, de scara de operare, dar și de alți factori.

La separarea și purificarea fumarazei obținute din *Brevibacterium ammoniagenes* printr-un proces discontinuu în șarje a 100 kg, gradul global de extracție utilizând SAB PEG – K₃PO₄ în două trepte a fost de 70% [172]. Structura costurilor este redată în fig. 4.34. Calculul costurilor a fost efectuat pe baza relației:

$$C_T = \frac{1,13C_M + 2,6C_L + 1,13C_E + 0,13C_I}{Y} \quad (4.14)$$

în care C_T sunt costurile totale, C_M – costurile cu materialele, C_L – costurile cu forța de muncă, C_E – costurile energetice, C_I – costurile de investiții, Y – gradul de extracție.

Separarea și purificarea fumarazei obținute din *Saccharomyces cerevisiae* a fost de asemenea analizată din punct de vedere al costurilor, comparându-se extracția discontinuă cu extracția continuă în curent încrucișat, cu și fără reciclarea chimicalelor [148]. Datele obținute sunt redate în tab. 4.11. Estimarea costurilor s-a făcut cu relația:

$$C_T = 1,13C_M + 2,6C_L + 1,13C_U + 1,6C_I \quad (4.15)$$

în care C_T sunt costurile totale, C_M – costurile cu materialele, C_L – costurile cu forța de muncă, C_U – costurile cu utilitățile, C_I – costurile de investiții.

Se poate constata o importantă reducere a costurilor cu materialele: 24% în procesul continuu și 43% în procesul discontinuu. Reducerile totale ale costurilor sunt

Capitolul 4 – Separarea prin extracție

însă mai modeste (14% în procesul continuu și 5% în cel discontinuu) datorită ponderii mari a costurilor cu forța de muncă.

Tabelul 4.11. Evaluarea costurilor în producția fumarazei din *S. cerevisiae* [148]

Costuri ¹	Fără recirculare		Cu recirculare		Modificare ² [%]	
	Disc.	Cont.	Disc.	Cont.	Disc.	Cont.
Cu materiale	2,48 ³	2,48	1,41	1,89	-43	-24
Cu forța de muncă	1,34	1,00	1,66	0,91	24	-8
Cu investițiile	0,14	0,18	0,14	0,23	0	28
Cu utilitățile	0,015	0,018	0,016	0,02	8	19
Costuri totale	6,5	5,69	6,19	4,88	-5	-14

¹ – Valori preluate din [162]

² – Valori exprimate în % de modificare comparând procesul discontinuu (Disc.) respectiv continuu (Cont.) în variantele cu și fără recuperarea și recircularea chimicalelor

³ – Valori relative, bazate pe ec. (4.15). Concentrația biomasei în procesul discontinuu a fost de 25% v/v, iar în procesul continuu de 20% v/v.

Extracția în SAB este o tehnică cu consumuri energetice scăzute, și investiții minime, necesitând însă cheltuieli mari cu forța de muncă și cu materialele. Costurile materialelor pot fi reduse semnificativ printr-o alegere corespunzătoare a rapoartelor volumice ale fazelor, prin introducerea de noi SAB și în special prin perfecționarea proceselor de recuperare – recirculare [166]. Durata procesului poate fi sensibil redusă prin utilizarea separării centrifugale; aceasta nu numai că duce la obținerea unor randamente superioare, ci și la obținerea unor produse calitativ superioare, datorită absenței unei degradări proteolitice semnificative [173, 174].

Aspectele economice ale extracției în SAB folosind liganzi de afinitate au fost de asemenea analizate, constatându-se puternica dependență a costurilor totale ale extracției de costul inițial și reciclabilitatea liganzilor de afinitate utilizați [175, 176].

Pentru o evaluare economică corectă, este important de știut că extracția în SAB este o tehnologie integrativă, permițând îndepărtarea solidelor și creșterea activității specifice a produselor într-o singură etapă. În plus, produsul poate fi separat de acizii nucleici cu masă moleculară mică și poate fi concentrat, îmbunătățindu-se astfel performanța următoarelor etape de separare. Pentru exemplificare, în fig. 4.35 este redată schema de principiu a obținerii α -amilazei din *Bacillus sp.* prin tehnologia convențională și prin extracția în SAB. Extracția în SAB s-a realizat la scară mare (capacitate de 50 m³). Față de procesul convențional, procesul utilizând extracția în SAB necesită mai puține etape, randamentul global fiind de 80% la extracția într-o singură treaptă și de 95% la extracția în două trepte, față de numai 70% prin procedeul convențional. Costurile se reduc cu 35% la extracția într-o singură treaptă și cu 50% la extracția în două trepte [169].

Deși nouă și relativ puțin utilizată în practica industrială, extracția în SAB este o tehnică importantă pentru izolarea și separarea moleculelor proteice. Numărul mare de cercetări în domeniu (mii de articole publicate), numărul crescut de aplicații brevetate și implementate la nivel pilot și industrial, corelate cu creșterea mărimii producției de proteine terapeutice vor face din această tehnică o alternativă atractivă în biotehnologiile industriale, mai ales dacă se rezolvă tehnico-economic problema recuperării și recirculării eficiente a chimicalelor de proces.

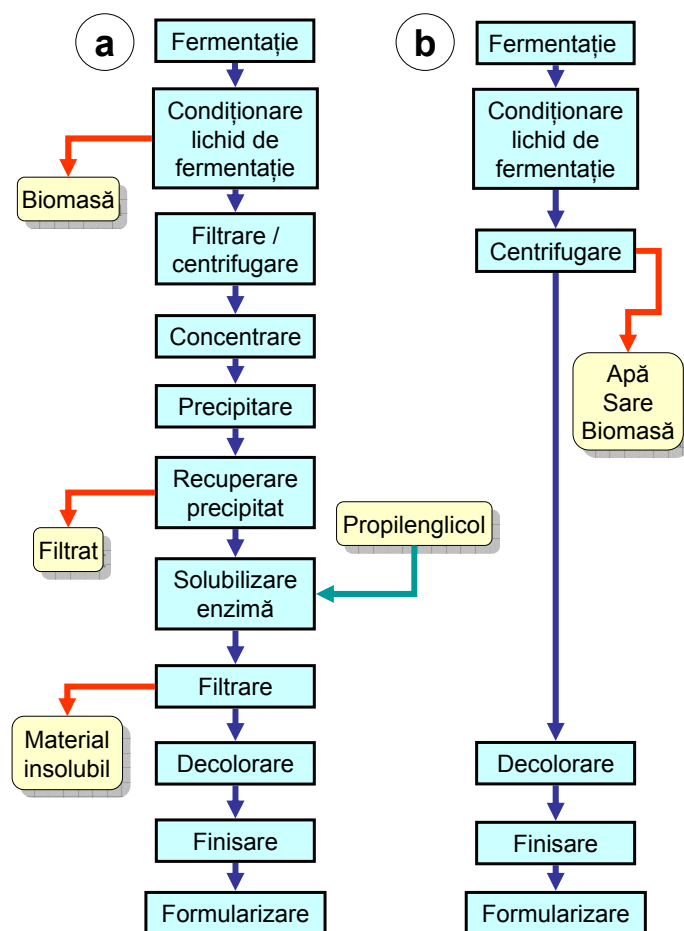


Figura 4.35. Obținerea α-amilazei din *Bacillus* sp.:
a – procedeul convențional; b - procedeul prin extracție în SAB [169]

4.3. EXTRAȚIA CU MICELE INVERSE

Dacă extracția clasică L – L realizează distribuția biomoleculelor între o fază apoasă și o fază organică distinctă, iar extracția în sisteme apoase bifazice realizează distribuția biomoleculelor între două faze apoase distincte, extracția cu micle inverse implică trecerea biomoleculelor din faza apoasă inițială într-o fază organică distinctă prin intermediul unei microemulsii de tip apă-în-ulei (A/U). Această microemulsie este formată din așa-numitele micle inverse: asociații sferice de molecule de compuși tensioactivi (surfactanți) care încorporează un mediu apos și care se găsesc dispersate într-un solvent nepolar. Utilizarea sistemelor micelare inverse este relativ recentă, primele studii sistematice asupra acestor sisteme fiind efectuate la sfârșitul anilor 1980 [177 - 182].

4.3.1. Formarea și proprietățile micelilor inverse

Surfactanții sunt molecule constituite dintr-un „cap” polar hidrofil (atras de apă) și o „coadă” hidrofobă – o catenă hidrocarbonată (atrasă de ulei) – fig. 4.36. Adăugarea în

apă a unui astfel de surfactant forțează lanțurile hidrocarbonate hidrofobe să se asocieze astfel încât să minimizeze contactul cu moleculele de apă. Asocierea moleculelor de surfactant conduce la formarea unor agregate de diverse forme (fig. 4.37) [183]. Forma surfactantului joacă un rol important în formarea agregatelor. Dacă apa solubilizează în mod egal atât capătul polar cât și catena hidrocarbonată, agregatele nu se mai formează.

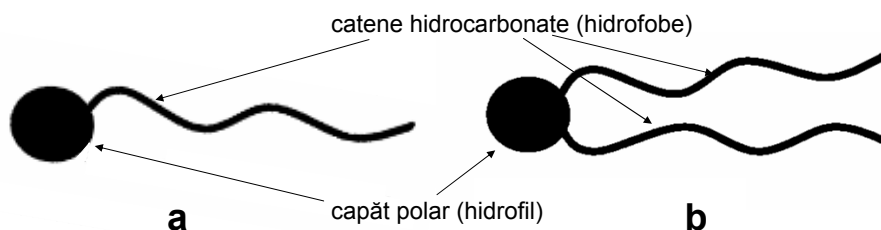


Figura 4.36. Reprezentarea schematică a unui surfactant:
a – cu o singură catenă hidrofobă; b – cu două catene hidrofobe.

Dacă molecula de surfactant are un capăt polar voluminos și o catenă hidrofobă redusă, de formă conică (fig. 4.37 a), moleculele tind să se asocieze într-un agregat sferic, cu catenele formând un miez interior, înconjurat de o suprafață exterioară alcătuită din capetele polare. O astfel de asociație este o micelă normală (fig. 4.37 b). La concentrații reduse de surfactant micela normală este sferică, cu un diametru dictat de lungimea catenei hidrocarbonate și de mărimea capătului polar. Sistemul este dinamic, în sensul că moleculele implicate în formarea micelilor părăsesc agregatul, fiind înlocuite de altele care se mișcă liber în volumul fazei apoase. În câteva microsecunde înlocuirea tuturor moleculelor de surfactant dintr-o micelă este completă, iar forma sferică amicei normale se păstrează întotdeauna. Dacă molecula de surfactant are un capăt polar mic și o catenă hidrocarbonată voluminoasă, ramificată (semănând cu un dop de șampanie – fig. 4.37 c), moleculele se asociază într-un agregat sferic în care miezul este format din capetele polare și suprafața externă din catenele hidrofobe, agregat numit micelă inversă (fig. 4.37 d) [181] sau microemulsie de tip A/U. Spre deosebire de micelile normale, mărimea micelilor inverse crește liniar cu cantitatea de apă adăugată în sistem [178]. În sistemele care conțin cantități mari atât de „ulei” cât și de „apă”, forma și dimensiunile agregatelor se modifică, cu formarea de canale cilindrice interconectate, conținând faza apoasă în interior (fig. 4.37 e). În aceste sisteme, spațiul este divizat în două volume distincte de apă și ulei, separate de stratul de surfactant care formează o suprafață continuă în formă de șea. Structura devine astfel dublu-continuă (bicontinuă) atât în apă cât și în ulei. La adăugare de apă, moleculele de surfactant se reorganizează sub forma unui film plan sau lamelar (fig. 4.37 f), sistemul devenind opalescent și birefringent. Recent s-a demonstrat că se poate forma o emulsie stabilă și din „supra-agregate” în sisteme conținând doi surfactanți funcționalizați, capabili să formeze legături puternice între ei [184]. Surfactanții se organizează într-o fază de formă lamelară care nu mai este plană ci spațială, de forma unei cepe (fig. 4.37 g), formă numită și sferulită.

Formarea tuturor acestor structuri este explicată prin factorii geometrici specifici moleculelor de surfactant [183, 185], fiind valabilă doar pentru soluții diluate. La creșterea concentrației de surfactant structurile se modifică și se complică [186].

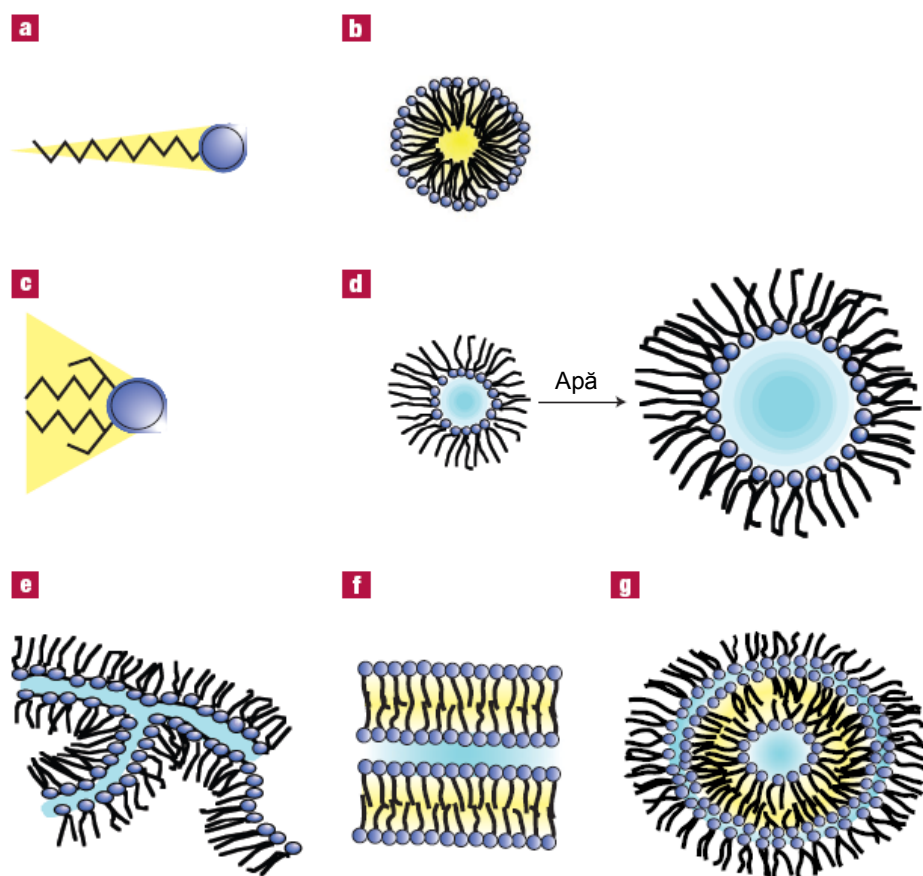
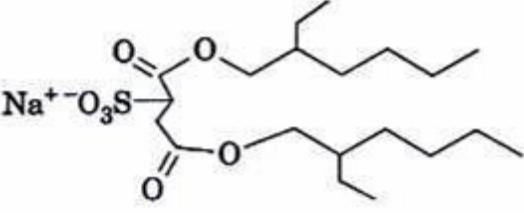
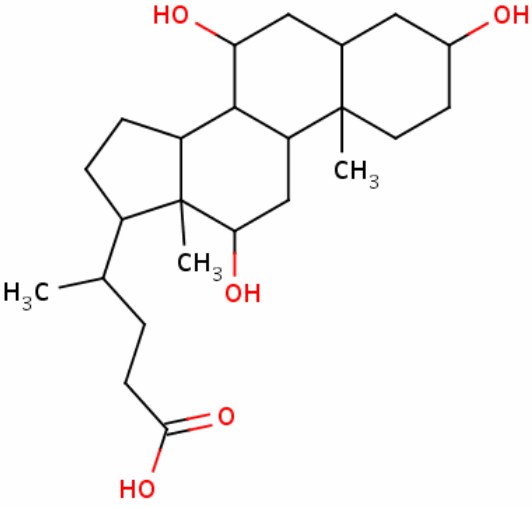
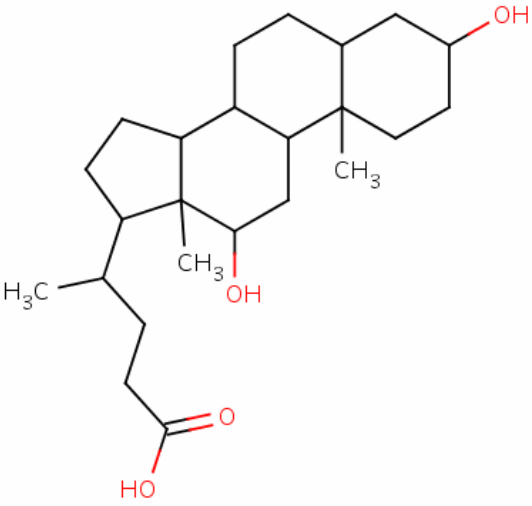
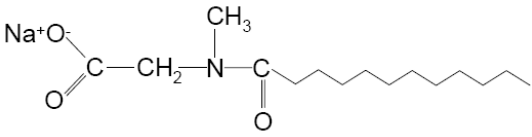


Figura 4.37. Forme de agregate rezultate prin organizarea moleculelor de surfactant în soluțiile coloidale: a – surfactant de formă conică; b – micelă normală; c – surfactant de formă „dop de șampanie”; d – micelă inversă cu conținut variabil de apă; e – cilindri interconectați; f – fază lamelară plană; g – fază lamelară spațială (sferulită sau „ceapă”) [186]

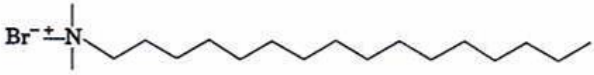
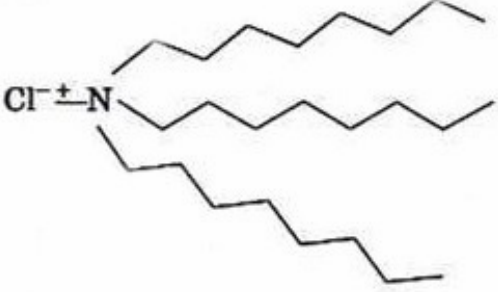
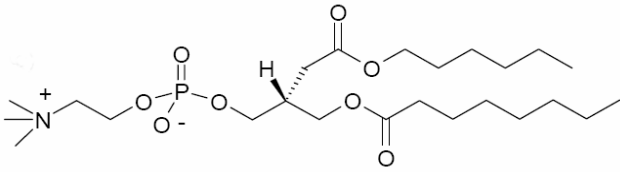
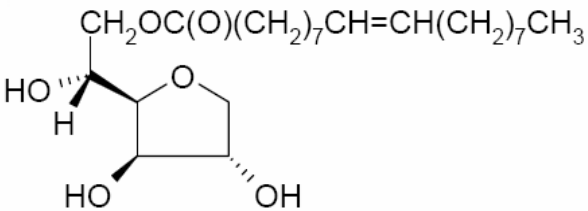
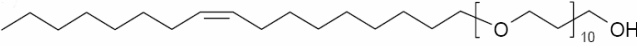
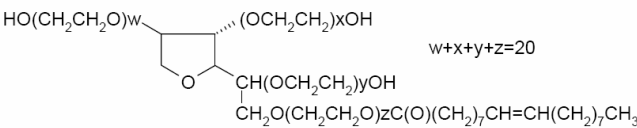
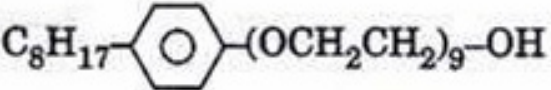
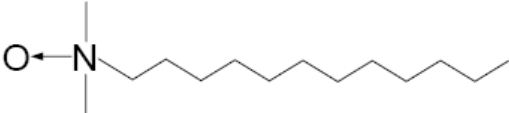
Surfactanții se clasifică de regulă în funcție de sarcina capătului hidrofil existentă după disocierea în apă. În acest sens există surfactanți neionici și surfactanți ionici, care la rândul lor pot fi anionici, cationici, sau amfiionici. Cei mai importanți surfactanți utilizați în extracția cu micle inverse sunt prezentați în tab. 4.12. De menționat că acești compuși trebuie să fie compatibili cu sistemele biochimice în care acționează.

Sunt cunoscuți numeroși surfactanți care formează micle inverse în medii nepolare, cei mai mulți dintre ei necesitând însă și prezența unui co-surfactant. Unul dintre puținii surfactanți care poate forma micle inverse fără co-surfactant este bis(2-etilhexil) sulfosuccinatul de sodiu, cunoscut mai mult sub denumirea de AOT [177]. Surfactantul amfiionic 1,2-dioctanoic-*sn*-glicerol-3-fosfocholină formează micle inverse doar în prezența alcoolilor alifatici drept co-surfactanți [187].

Tabelul 4.12. Surfactanți frecvent utilizați în extracția cu micle inverse

Tip	Denumire	Denumire comercială	Formulă chimică
anionic	dodecilsulfat de sodiu	SDS	$\text{Na}^+ \text{O}_4\text{S}$ 
anionic	bis(2-etil-hexil) sulfosuccinat de sodiu	AOT	$\text{Na}^+ \text{O}_3\text{S}$ 
anionic	acid cholic sare de sodiu		
anionic	acid deoxicholic sare de sodiu		
anionic	N-lauril sarcosin sare de sodiu		$\text{Na}^+ \text{O}^-$ 

TEHNICI DE SEPARARE ȘI CONCENTRARE ÎN BIOTEHNOLOGII

cationic	bromură de cetiltrimetil-amoniu	CTAB	
cationic	clorură de trioctilmetil-amoniu	TOMAC	
amfiionic	1,2-dioctanoic-sn-glicero-3-fosfocholină		
neionic	monooleat de sorbitan	Span 80	
neionic	oleil poli(10)oxietilen eter	Brij 96	
neionic	monooleat de poli(20)oxietilen sorbitan		
neionic		Triton X-100	
neionic	laurildimetil-aminoxid		

Interacțiunea dintre micellele inverse și apă prezintă o importanță deosebită. Datorită miezului polar ele pot îngloba apă, „dizolvând-o” în solvenții organici nepolari. Raportul molar apă – surfactant (w_0) influențează puternic proprietățile micellelor inverse. Apa din interiorul micellei inverse este parțial legată de capetele hidrofile ale surfactantului; numai peste anumite valori w_0 aceasta se comportă ca și apa liberă (fig. 4.38). De exemplu, în micellele inverse formate de AOT, până la $w_0 = 6 \div 8$ apa este legată de capetele hidrofile ale surfactantului; de abia la valori $w_0 > 6 \div 8$ apa se comportă ca și apa liberă [177, 180].

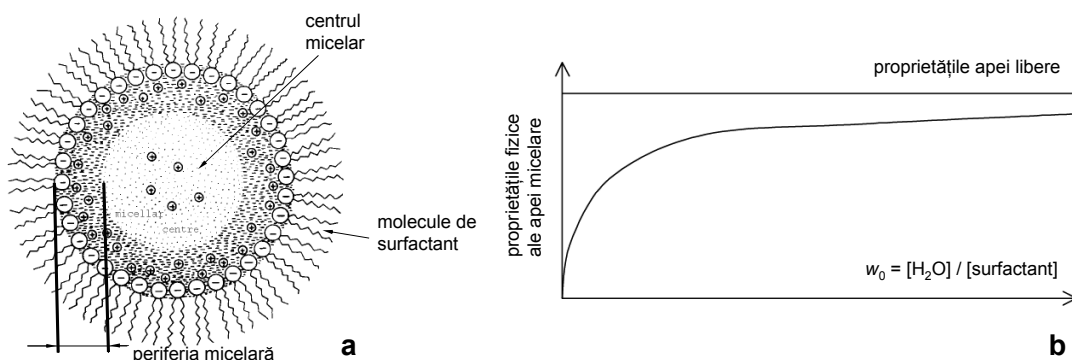


Figura 4.38. Proprietățile apei înglobate în micle inverse:
a – schema unei micle inverse de AOT [189]; b – variația proprietăților fizice ale apei în micle inverse [190]

Micelele inverse au, de regulă, diametrul între 2 și 20 nm [188]. Dimensiunile micelilor inverse formate de AOT depind de temperatură și de conținutul de apă înglobat, respectiv de raportul molar apă surfactant [177]. Ele variază, la temperatura camerei, între 2 nm ($w_0 = 0$) și 15 nm ($w_0 = 60$).

Micelele inverse de AOT își măresc diametrul la creșterea concentrației de apă, dacă concentrația AOT rămâne constantă. La conținut de apă constant, creșterea concentrației de AOT conduce la micșorarea diametrului micelilor inverse. Dacă atât concentrația apei, cât și concentrația AOT cresc în același raport, mărimea micelilor rămâne aproximativ constantă, mărindu-se doar numărul acestora (fig. 4.39).

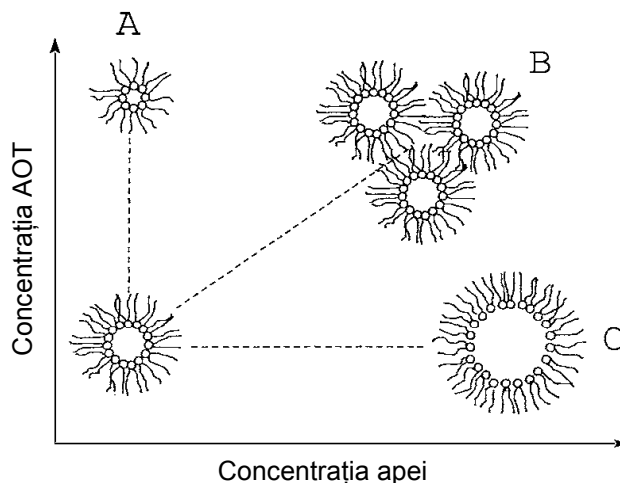


Figura 4.39. Efectul conținutului de apă și al concentrației surfactantului asupra micelilor inverse de AOT: A – crește concentrația AOT; B – crește concentrația apei și concentrația AOT în același raport; C – crește concentrația apei [177]

Micelele inverse sunt dispersate uniform în solvenții organici nepolari, formând sisteme omogene, stabile termodinamic. Practic apa este dizolvată sub formă de micropicături, stabilizate interfacial de surfactant, în mediul organic nepolar [191]. Aceste sisteme sunt foarte dinamice: amestecând o soluție de micle inverse de diametru mare cu o soluție de micle inverse de diametru mic, în câteva secunde se obține o soluție conținând micle inverse având un diametru intermediar [192].

În fig. 4.40 este redată diagrama de echilibru a unui sistem ternar apă – AOT – izooctan la temperatura de 15 °C. Se pot remarca pe diagramă: domeniul emulsiilor U/A, domeniul cristalele lichide, domeniul emulsiilor A/U.A, precum și domeniul microemulsiilor A/U.

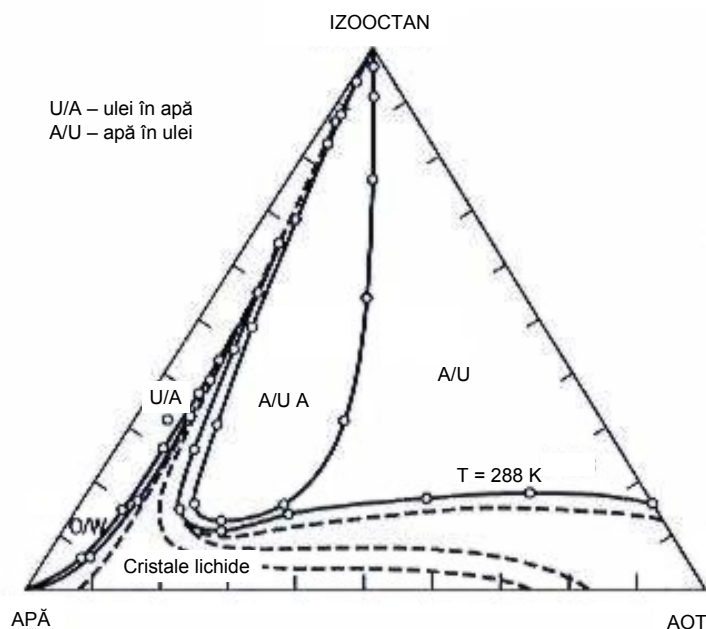


Figura 4.40. Diagrama sistemului ternar apă – AOT – izooctan la 15 °C

Datorită polarității mediului lichid din interiorul miclei inverse, aici se pot solubiliza compuși polari ca aminoacizi, enzime, proteine, compuși care sunt insolubili sau instabili în solvenți organici obișnuiți [193]. Este interesant de notat că dimensiunile miclelor inverse pot depinde de natura compusului dizolvat în faza apoasă internă. Astfel, miclele inverse de AOT în hexan ($w_0 = 6$) care conțin ADN au un diametru de 100 – 150 nm, în timp ce aceleași micle, dar fără ADN încorporat, au doar 10 nm în diametru [194].

4.3.2. Mecanismul extracției în micle inverse

Miclele inverse au capacitatea de a extrage biomoleculele în apă din faza internă dispersată într-un solvent organic (hexan, izooctan etc.). Capacitatea de extracție depinde de punctul izoelectric (pI) al proteinelor, respectiv de pH-ul și tăria ionică a soluției din care se realizează extracția. Principiul procesului de extracție este redat în fig. 4.41. Solventul organic permite organizarea miclelor inverse și separarea apei din faza internă de volumul de apă din fază din care se extrag componentii doriți.

Electroliții și proteinele solubilizate în faza apoasă internă pot fi schimbate între miclele inverse, pentru acest tip de transfer fiind propuse trei mecanisme posibile [180, 192, 195]. Un prim mecanism implică fuziunea tranzitorie a două micle inverse într-o „picătură dimeră” cu viață foarte scurtă. În timpul existenței picăturii dimere, are loc redistribuția solutului prin difuzie, după care picătura dimeră se desparte formând două

micle inverse (fig. 4.42 a). Al doilea mecanism implică difuziunea moleculelor solutului prin stratul dublu de surfactant format la punctul de contact dintre două micle inverse care nu fuzionează (fig. 4.42 b), în timp ce al treilea mecanism implică migrarea solutului prin faza organică dintre două micle inverse (fig. 4.42 c).

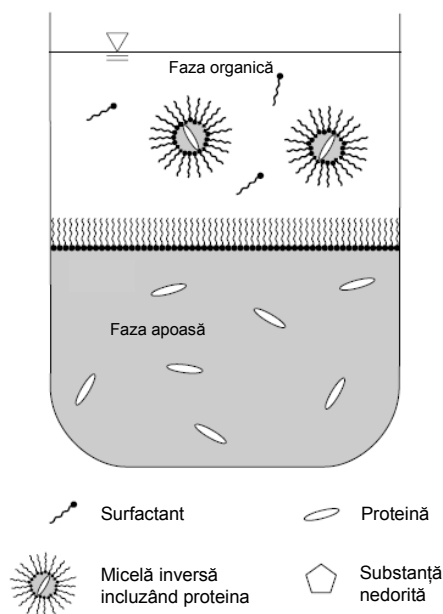


Figura 4.41. Schema de principiu a extracției în micle inverse [129]

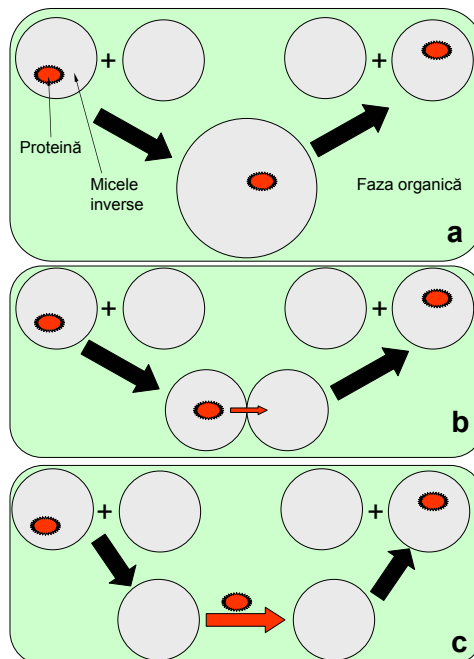


Figura 4.42. Mecanisme posibile de transfer a solutului între miclele inverse [196]

Procesul global de transfer de masă interfazic prin care solutul trece din faza apoasă în faza de micelă inversă este rezultatul a trei procese elementare, fiecare dintre ele putând fi determinant de viteză: (i) difuzia solutului (proteinei) din faza apoasă către interfața dintre faza apoasă și faza organică, respectiv difuzia micelii inverse din faza organică către interfață; (ii) includerea solutului în micela inversă la interfață; (iii) difuzia micelilor inverse în volumul fazei organice (fig. 4.43).

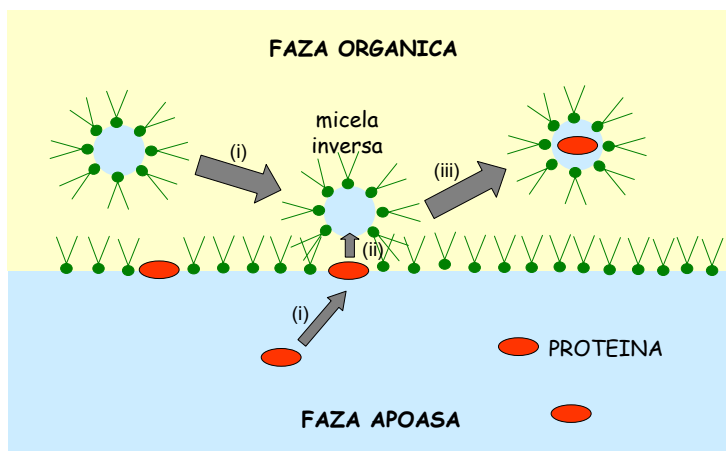


Figura 4.43. Mecanismul transferului interfazic al proteinelor din faza apoasă în faza organică prin intermediul micelilor inverse [136]

4.3.3. Factorii care influențează transferul biomoleculelor în micellele inverse

Principalii factori care influențează repartiția biomoleculelor între faza apoasă externă și faza apoasă internă din micellele inverse sunt pH-ul, tăria ionică, tipul electrolitului din faza apoasă, tipul și natura surfactantului, tipul solventului organic. Repartiția proteinelor și aminoacizilor în micellele inverse este controlată de interacțiunile electrostatice dintre moleculele încărcate electric și părțile hidrofile ale surfactanților, dar și de unele fenomene de respingere în funcție de mărime, care depind de dimensiunile relative ale micelilor inverse ca molecule gazdă (*host*) și de dimensiunile biomoleculelor, ca molecule oaspete (*guest*) [89].

Valoarea pH-ului determină sarcina netă a proteinelor, aceasta trebuind să confere proteinei o sarcină netă de semn opus sarcinii capătului polar al surfactantului, astfel încât să apară o atracție electrostatică între suprafața proteinei și capătul polar hidrofil de la suprafața internă a micelilor inverse. Forța motoare a procesului de transfer a proteinelor este diferența de potențial. Experimental s-a constatat că diferența dintre pH-ul mediului și pI-ul proteinei trebuie să fie cuprinsă între 1 și 2 pentru ca eficiența extracției să fie ridicată, iar denaturarea să fie minimă [193, 197-199]. În cazul utilizării surfactanților anionici, pH-ul trebuie să fie mai mic decât pI-ul, iar în cazul surfactanților cationici, pH-ul trebuie să fie mai mare decât pI-ul [200, 201].

Tăria ionică joacă un rol important în procesele de solubilizare. Concentrații mari de săruri în faza apoasă externă ecranează interacțiunile electrostatice între proteine și capătul polar al surfactantului, reducând forța motoare disponibilă pentru solubilizarea proteinelor. Creșterea tăriei ionice face ca interacțiunile repulsive dintre capetele polare încărcate electric ale surfactanților să se micșoreze, micșorându-se astfel raza micellei inverse. Dacă raza micellei inverse devine mai mică decât raza agregatului proteic extracția nu mai poate avea loc. Studii efectuate cu diverse săruri (NaCl, NaSCN, Na₂CO₃, KCl, CsCl, BaCl₂) indică o puternică reducere a cantității de apă înglobate în micela inversă; la o creștere a concentrației de NaCl de 0,6 M, de ex., raportul molar w_0 scade de la 50 la 15 [191, 198]. Un alt efect al creșterii tăriei ionice este acela de a determina ionii să migreze înspre microfaza apoasă din interiorul micellei inverse, obligând astfel proteinele să migreze din această zonă.

Prin modificarea controlată a pH-ului și a tăriei ionice se poate realiza separarea unor proteine în funcție de mărimea acestora [193, 202, 203]. Efectul pH-ului și al tăriei ionice a soluției asupra gradului de solubilizare al unor molecule în micelle inverse este ilustrat în fig. 4.44.

Efectul de ecranare a interacțiunilor electrostatice proteină – surfactant este influențat și de **mărimea ionilor** din sistem [199, 204, 205]. Ionii K⁺, mai voluminoși decât ionii Na⁺, ecranează mai puternic, reducând solubilizarea ribonucleazei A și a taumatulinului în micellele inverse [191]. Cantitatea de apă înglobată în micellele inverse nu este influențată de anionul sării, dar depinde puternic de cationul acesteia. Cationii din faza apoasă sunt interschimbabili cu contraionii surfactantului, fapt care duce la modificarea dramatică a conținutului de apă din microfaza apoasă internă [191].

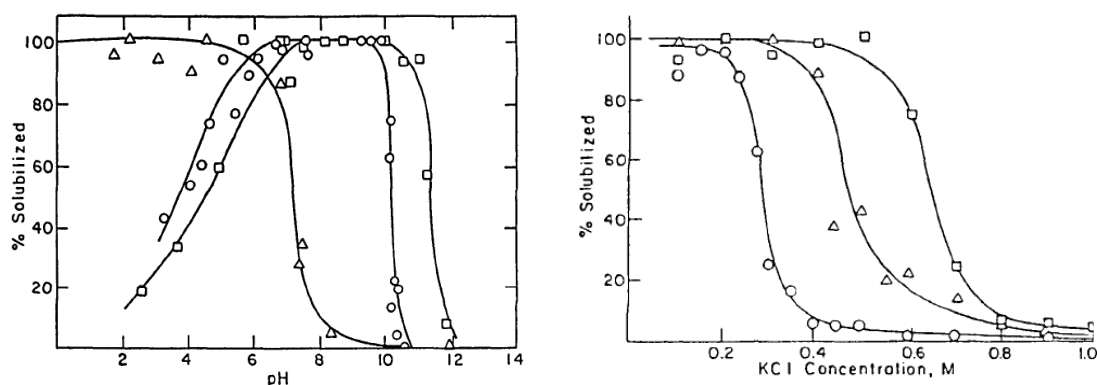


Figura 4.44. Efectul pH-ului și al tăriei ionice a soluției asupra solubilizării unor biomolecule: (○) – citocrom C; (□) – lizozima; (Δ) – ribonucleaza A; a – sistem AOT – izooctan cu 0,1 M KCl; b – sistem AOT – izooctan fără control de pH [203]

Concentrația surfactantului afectează atât transferul proteinei în faza de micle inverse, cât și reextracția acestora. O concentrație ridicată de surfactant poate întârzia procesul de reextracție. Proteinele cu masă moleculară mică pot fi extrase mai ușor decât cele voluminoase, utilizând concentrații reduse de surfactant [206].

Co-surfactanții sunt substanțe care favorizează dizolvarea surfactantului în faza organică și stabilizează miclele inverse formate [198], dar mecanismul acțiunii acestora nu este încă pe deplin elucidat [207]. Deoarece surfactanții cationici formează micle inverse foarte mici ($w_0 < 3$), prezența co-surfactanților este imperios necesară [193]. Surfactanții anionici formează micle inverse mari ($w_0 = 20 \div 115$), astfel încât adăugarea de co-surfactanți nu este obligatorie [208, 209]. Co-surfactanții uzuali sunt alcoolii alifatici cu catenă liniară $C_4 - C_{10}$ și alcoolul benzilic [180, 197, 206, 210, 211].

Cu cât **raportul volumic** dintre faza apoasă (V_{aq}) și faza organică (V_{org}) este mai redus, cu atât procesul devine mai economic, iar bioproductul este obținut într-o formă mai concentrată. Creșterea raportului volumic conduce la scăderea gradului de extracție. O creștere a raportului fazic de la 1 la 5 duce la o scădere de numai 5% a gradului de extracție pentru peroxidază [212], în timp ce creșterea raportului fazic de la 1 la 4 duce la scăderea gradului de extracție de la 87% la 63% în cazul inulinazei [193].

Natura și tipul solventului pot influența transferul biomoleculelor din faza apoasă în faza organică. Solvenții utilizați nu trebuie să fie miscibili cu apa. Solvenții uzuali utilizați în extracția cu micle inverse sunt hidrocarburi alifatice (*n*-octan, *i*-octan, heptan, ciclohexan) sau aromatice (benzen), amestecuri de hidrocarburi (kerosen), cloroform [180, 213]. Într-un studiu referitor la extracția tripsinei s-a constatat că gradul de extracție este ridicat (circa 70%) în cazul utilizării kerosenului drept solvent, dar scade la jumătate (circa 35%) când se utilizează ca solvent ciclohexanul [213]. Unii autori [209] explică acest lucru prin aceea că solventul este capabil de a denatura forma și structura miclelor inverse.

Caracterul hidrofob sau hidrofil al biomoleculelor extrase influențează, de asemenea, procesul. De exemplu, aminoacizii cu structură hidrofilă sunt încorporați în interiorul miclelor inverse, pe când cei hidrofobi la interfața acestora [4].

Temperatura, care influențează proprietățile fizico-chimice ale miclelor inverse, are un rol important în special în procesele de reextracție a biomoleculelor.

4.3.4. Reextracția din miclele inverse

Reextracția sau extracția inversă este operația prin care biomoleculele înglobate în microfaza apoasă internă din miclele inverse sunt trecute din nou în volumul unei faze apoase. Procesul de reextracție este lent și dificil de realizat fără pierderea semnificativă a activității bioprodusului separat, fiind unul dintre principalele impedimente care nu au permis deocamdată implementarea extracției cu miclele inverse la nivel industrial.

Pentru reextracția proteinelor din faza de micelă inversă au fost studiate și propuse mai multe procedee, printre care se numără modificarea pH-ului [136, 214], a temperaturii [193, 204, 215 - 217], utilizarea unor particule adsorbante de silice care rețin proteinele, apa și compușii tensioactivi din faza miclelor inverse [218], utilizarea zeoliților pentru deshidratarea fazei de miclele inverse [4], distrugerea fazei de miclele inverse și eliberarea proteinelor prin adăugarea unor cantități ridicate de solvent organic (acetat de etil) [219, 220], adăugarea unor soluții care conțin ioni de Ca^{2+} (CaCl_2) sau K^+ (KCl), care înlocuiesc ionii Na^+ din structura surfactantului și formează un complex hidrofob cu acesta [136, 221].

Reextracția proteinelor este afectată de **valoarea pH-ului** și de **concentrația sărurilor** în soluția de alimentare și în soluția utilizată pentru reextracție [214]. Este de dorit ca tăria ionică a soluției în care se face reextracția să fie cât mai mare, iar pH-ul să fie similar cu valoarea pI a proteinei care trebuie purificată [197]. Sarcina proteinei trebuie să fie aceeași cu cea a capătului polar al surfactantului pentru a se permite eliberarea proteinei din micela inversă. De ex., pentru reextracția α -amilazei dintr-o fază cu miclele inverse de AOT în *i*-octan s-a folosit o soluție apoasă conținând 0,5 M NaCl și soluție tampon acid acetic – acetat de sodiu. Separarea fazelor după reextracție s-a realizat prin centrifugare [222]. Deși modificarea pH-ului este foarte eficientă pentru reextracție, aceasta poate cauza și degradarea moleculelor proteice, respectiv pierderea activității enzimelor extrase.

Temperatura are o influență puternică asupra proprietăților miclelor inverse. Eficiența reextracției poate fi îmbunătățită prin creșterea temperaturii. Creșteri importante ale gradului de recuperare al enzimelor cu creșterea temperaturii de reextracție au fost observate în cazul α -amilazei [215], α -chimotripsinei [204], glucoamilazei [217], inulinazei [193] etc. Majoritatea studiilor efectuate arată că mărirea temperaturii duce la creșterea raportului w_0 , în final ajungându-se la distrugerea miclelor inverse, cu formarea unei faze apoase distincte în care sunt concentrate majoritatea biomoleculelor extrase. Această fază este separată apoi prin centrifugare [4].

Deoarece la creșterea temperaturii se produce inactivarea termică a enzimelor, temperatura la care se realizează procesul de reextracție reprezintă un compromis între cantitatea de proteină recuperată și activitatea sa enzimatică. Pentru majoritatea enzimelor, domeniul optim al temperaturilor de reextracție este cuprins între 30 – 38 °C (tab. 4.13), la peste 40 °C observându-se o scădere accentuată a activității enzimatice.

Tabelul 4.13. Temperaturi de reextracție optime pentru păstrarea activității enzimatice

Enzima	α -amilază	glucoamilază	inulinază	α -chimotripsină
Temperatura de reextracție corespunzătoare activității enzimatice maxime [°C]	32	35	37	38
Referința bibliografică	[216]	[217]	[193]	[204]

Capitolul 4 – Separarea prin extracție

Comparativ cu celelalte metode, reextracția prin modificarea temperaturii este deocamdată cea mai eficientă modalitate de recuperare a biomoleculelor, așa cum reiese și din datele prezentate în tab. 4.14.

Tabelul 4.14. Comparație între două procedee de reextracție a α -amilazei [4]

Caracteristicile procesului	Reextracție	
	fără creșterea temperaturii	cu creșterea temperaturii
Activitate inițială [%]	100	100
Pierderi la extracție [%]	3	12
Eficiență totală [%]	30 – 50	73
Factor de concentrare al soluției finale	10	2000

Cercetări mai recente iau în calcul facilitarea procesului de reextracție prin utilizarea la formarea micelilor inverse a co-surfactanților, în vederea unui control mai bun al proprietăților și structurii acestora [223 - 226]. Alcoolii având proprietăți amfifile¹ ar putea fi buni agenți de modificare ai micelilor inverse. Un studiu efectuat pentru reextracția albuminei din ser bovin (BSA) și a citocromului c din micelle inverse de AOT/*i*-octan a pus în evidență faptul că prezența unor cantități mici de alcooli alifatici drept co-surfactanți poate accelera procesul de reextracție, existând o dependență clară între viteza de reextracție și lungimea catenei alifactice a alcoolului [227]. La concentrații egale de co-surfactant, efectul accelerator scade în ordinea (fig. 4.45):

octanol (octOH) > hexanol (HexOH) > AOT fără co-surfactant > propanol (PrOH)

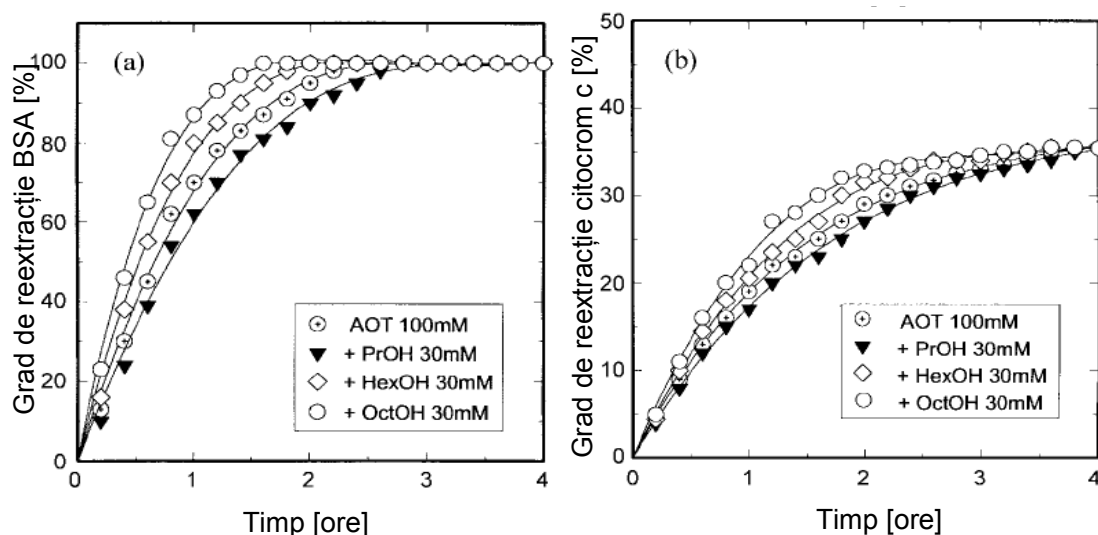


Figura 4.45. Efectul adaosului de co-surfactant în micellele inverse de AOT/*i*-octan asupra gradului de reextracție al BSA (a) și citocromului c (b) [227]

Mai multe studii cinetice [228 - 231] arată că etapa determinantă de viteză a procesului de reextracție este procesul de desolubilizarea a proteinei la interfață, proces descris de ecuația [227]:

¹ Amfifil - atât caracter hidrofil datorită grupării –OH, cât și caracter hidrofob datorită catenei alifactice

$$K_R \cdot \tau = \frac{1}{1 + K_N} \cdot \ln \left[1 - \frac{(1 + K_N) \cdot C_{aq}}{C_{org}^0} \right] \quad (4.16)$$

în care: K_R – constanta de viteză a procesului de reextracție, $K_N = (C_{aq}^*)/(C_{org}^*)$ – constanta de distribuție la echilibru, τ – durata procesului, C_{org}^0 – concentrația inițială a proteinei în faza organică, C_{aq} – concentrația actuală a proteinei în faza apoasă.

4.3.5. Procesul tehnologic de extracție cu micle inverse

Etapele principale ale procesului tehnologic de extracție cu micle inverse sunt extracția propriu-zisă (extracția directă) – procesul prin care biomoleculele sunt transferate din faza apoasă inițială în microfaza apoasă din interiorul micelilor inverse, și reextracția (extracția inversă) – procesul prin care biomoleculele sunt stripate din interiorul micelilor inverse într-o nouă fază apoasă. Pe lângă aceste procese principale, în tehnologia extracției cu micle inverse mai intervin și alte etape, așa cum reiese din schema de flux redată în fig. 4.46.

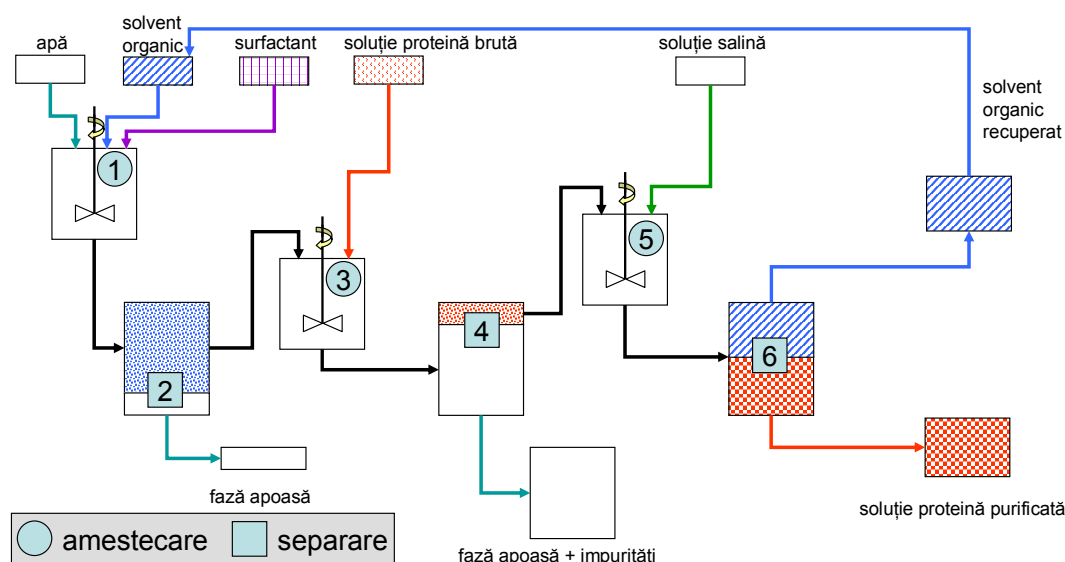


Figura 4.46. Schema de principiu a procesului tehnologic de extracție cu micle inverse: 1 – prepararea microemulsiei; 2 – separarea microemulsiei; 3 – extracția directă; 4 – separarea fazelor; 5 – reextracția (striparea biomoleculelor); 6 – separarea fazelor și recuperarea solventului

Într-o primă etapă are loc formarea microemulsiei de micle inverse dispersate în solvent organic. În acest sens se prepară un amestec de solvent organic, surfactant și apă, într-o proporție care să asigure valoarea concentrației micelare critice (CMC), respectiv a concentrației minime de surfactant la care se formează miclele inverse. Microemulsia este separată de faza apoasă în exces și trecută în procesul de extracție. Extracția se poate realiza principial în două moduri: (i) prin amestecarea fazei organice care conține miclele inverse cu faza apoasă care conține proteina și impuritățile hidrosolubile rezultate în urma dezagregării masei celulare (glucide, lipide, acizi nucleici etc.); (ii) prin suspendarea pulberii de proteină brută în microemulsia de micle

inverse în solvent organic [136]. Transferul proteinei în faza micelară inversă este facilitat printr-o agitare blândă, având în vedere tensiunea interfacială foarte mică din sistem: 1 – 2 mN/m față de 8 – 50 mN/m în sistemele clasice de extracție cu solvenți organici [232]. Avantajul tensiunii interfaciale mici este timpul de contact redus necesar realizării transferului proteinei în interiorul micelilor inverse. După extracție se realizează separarea fazelor prin decantare gravitațională sau prin centrifugare la viteză mică. Faza organică, conținând proteina încapsulată în micellele inverse este trimisă la reextracție, care se poate realiza prin una din metodele prezentate în paragraful 4.3.4. În urma reextracției micellele inverse sunt distruse, formându-se o fază apoasă care conține proteina purificată. Aastă fază apoasă este separată de faza organică pe baza diferenței de densitate, prin decantare gravitațională sau centrifugală. Faza organică este recirculată în etapa de preparare a microemulsiei, iar faza apoasă este prelucrată în vederea recuperării proteinei. Una din problemele întâmpinate o reprezintă pierderile de surfactant în faza apoasă rezultată la prepararea microemulsiei și în faza apoasă în care este reextrasă proteina [222]. Datorită acestui fapt este necesară utilizarea de surfactant proaspăt, fapt care duce la creșterea costului separării.

Procesul poate fi realizat în regim discontinuu sau continuu. Pentru extracția discontinuă a α -amilazei s-au folosit flacoane de 50 mL închise etanș, agitate timp de 2 min la 250 rot/min pentru realizarea extracției și centrifugate timp de 5 min la 3500 rot/min pentru separarea fazelor [211]. De asemenea, au mai fost utilizate celule cu agitare [228, 233] și celule rotative de difuzie [234].

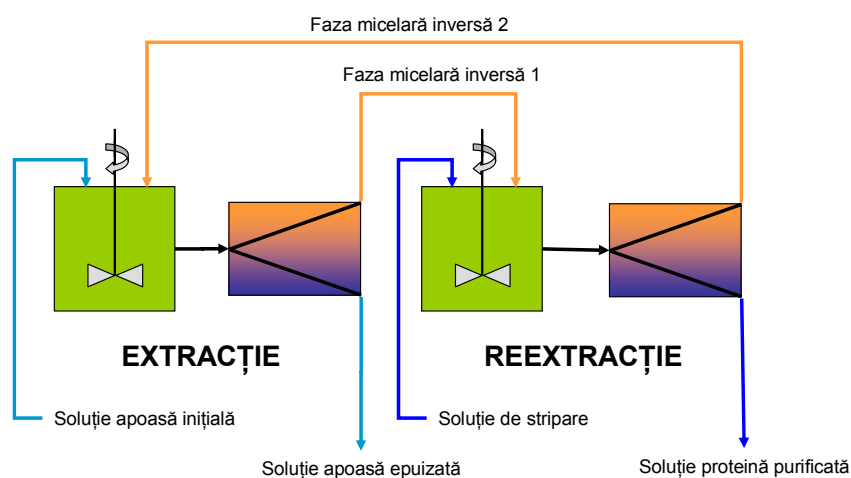


Figura 4.47. Instalație de extracție continuă cu două unități agitator/decantor [222]

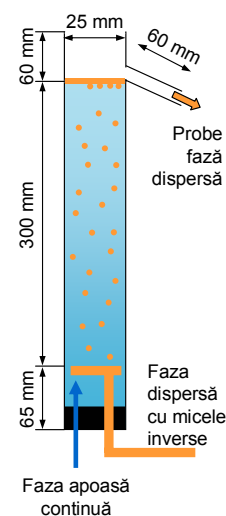


Figura 4.48. Coloană cu pulverizare [232]

Cu toate că extracția continuă este un proces eficient și cu un număr redus de etape de purificare a biomoleculelor, datele din literatură asupra acestui subiect sunt relativ sărace. Este relatată utilizarea a două unități de extracție agitator/decantor pentru separarea α -amilazei din soluții apoase cu micelle inverse de TOMAC (fig. 4.47) [222], utilizarea unui contactor cu discuri rotative perforate pentru separarea cutinazei pure recombinată cu micelle inverse de AOT [235], a unei coloane cu pulverizare pentru recuperarea proteinelor intracelulare din *Candida utilis* [236], a extractorului Graesser

pentru separarea lizozimei din albușul de ou cu micle inverse AOT în *i*-octan și AOT/TOMAC/*i*-octan [237]. O coloană cu pulverizare operată în regim semicontinuu (faza continuă stagnantă, faza dispersă alimentată continuu) cu micle inverse de AOT în *i*-octan este redată în fig. 4.48 [232]. Comparativ cu alte echipamente, aceste coloane sunt caracterizate prin simplitate constructivă, costuri mici de operare și flexibilitate în exploatare [238].

Procesul de extracție cu micle inverse este eficient și selectiv, posibil de realizat în sistem continuu, cu consumuri reduse de energie, ușor de transpus la scară. La transpunerea la scară a procesului de extracție cu micle inverse de BDBAC¹ a α -amilazei din lichid de fermentație filtrat, de la 10 mL la 2 L, în vase prevăzute cu șicane și cu agitatoare cu brațe, se observă o scădere cu 15 – 20 % a activității enzimatică [198]. Rezultate similare s-au obținut și la transpunerea la scară a extracției inulinazei de la 10 mL la 5 L, constatându-se o scădere a activității enzimatică de la 90 la 77 % [197]. Denaturarea enzimelor este explicată fie prin timpul mai lung necesar separării la scară mare, fie prin micșorarea vitezei de transfer datorită complexării enzimei cu surfactantul existent în faza apoasă [198].

4.3.6. Aplicații ale extracției cu micle inverse

Din studiile efectuate până în prezent s-a demonstrat posibilitatea utilizării procesului de extracție cu micle inverse pentru recuperarea unor produse de biosinteză intra- și extracelulare: proteine, peptide, acizi nucleici, acizi organici, antibiotice, steroizi. Cu toate că procesul de extracție cu micle inverse a fost intens cercetat, aplicarea sa la scară industrială se lasă încă așteptată [239, 240], principalele motive ale neimplementării fiind pe de o parte dificultatea reextracției proteinelor în faza apoasă și pe de altă parte imposibilitatea reutilizării micelilor inverse datorită pierderilor importante de surfactant în faza apoasă.

O altă problemă, care conduce la reducerea randamentului global al procesului de extracție, este prezența în soluțiile apoase reale rezultate la dezagregarea masei celulare a unor compuși impurificatori (acizi nucleici, zaharuri, peptide etc.) a căror comportare este puțin cunoscută; au fost raportate însă fenomene de denaturare și precipitare la interfață în cazul extracției cu micle inverse din soluții obținute în urma dezagregării masei celulare de *Saccharomyces cerevisiae* [241].

4.3.6.1. Extracția cu micle inverse în prezența masei celulare

Studii efectuate pentru separarea α -amilazei din lichide de fermentație filtrate, respectiv cu un conținut de cca. 1% biomasă umedă au condus la rezultate identice, prezența masei celulare neinfluențând în mod semnificativ procesul de extracție [198]. Concluzii similare au fost trase și în cazul separării inulinazei din *Kluyveromyces marxianus* [197]. În ambele situații, după separarea prin centrifugare a fazelor, celulele s-au găsit în faza organică, sub forma unui strat între faza organică și cea apoasă. Acest strat, care ar putea îngreuna procesul de extracție la scară industrială, rezultă probabil datorită adsorbției moleculelor de surfactant pe suprafața celulelor încărcată cu sarcini

¹ BDBAC – abreviere pentru clorura de (*n*-benzil-*n*-dodecil-*n*-bis(2-hidroxietil)amoniu

electrice contrare, prin interacțiuni electrostatice sau prin formarea unor perechi de ioni [198]. În exemplele menționate, nu a fost raportată liza celulelor, deși alte studii indică liza celulelor în prezența surfactanților. Astfel, este menționată liza celulelor de *Acetobacter vinelandii* într-un mediu de micle inverse conținând drept surfactant CTAB [242]. Din celulele de *Candida utilis* s-au extras direct proteinele intracelulare folosindu-se ca surfactanți SDS, CTAB sau Triton X-100 cuplat cu un agent reducător [243]. Cu sau fără liza celulelor, cu sau fără partiția masei celulare între faze, este posibilă extracția micelară inversă direct din lichidul de fermentație, fără o separare prealabilă a masei celulare. Eliminarea etapei de separare a masei celulare în procesul de prelucrare în aval de bioreactor este un alt argument pentru utilizarea extracției cu micle inverse la scară industrială.

4.3.6.2. Izolarea și renaturarea proteinelor

În cazul proteinelor intracelulare conținute în corpuri de incluziune, miclele inverse pot fi folosite cu succes în izolarea și „reîmpachetarea” corectă (renaturarea) proteinelor denaturate, principiul procesului fiind redat în fig. 4.49.

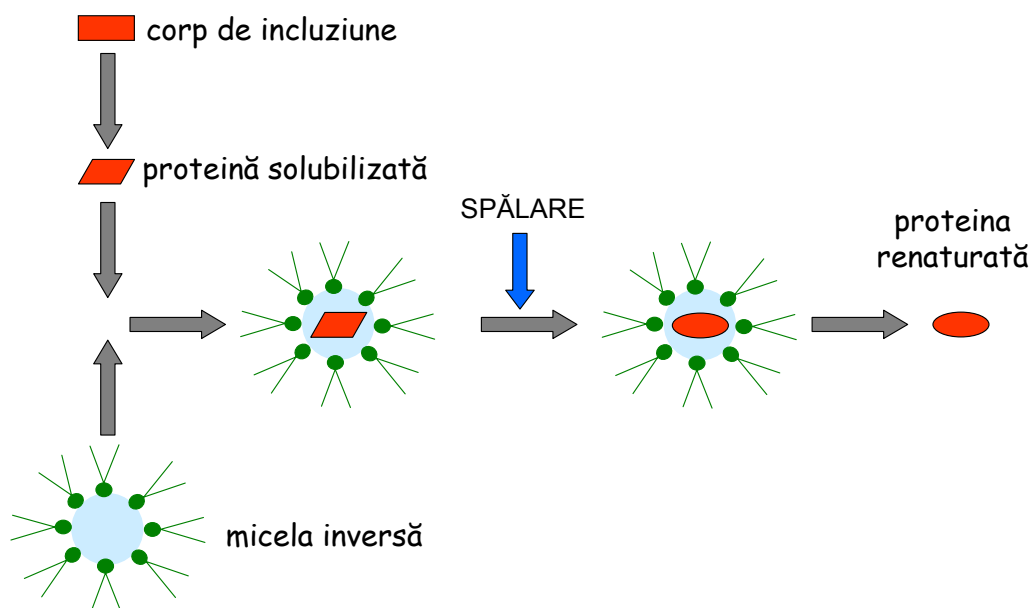


Figura 4.49. Schema de principiu a renaturării proteinelor în micle inverse [136]

Dacă gradul de renaturare în cazul ribonucleazei A, de natură hidrofilă, a fost de 100%, metoda s-a dovedit a fi necorespunzătoare pentru renaturarea interferonului γ , a cărui natură hidrofobă conduce la conglomerarea sa în timpul procesului de extracție [244, 245].

4.3.6.3. Sinteza proteinelor în micle inverse

Sinteza proteinelor *in vitro*, în absența celulelor (*cell free protein synthesis*) se poate realiza fie pe cale chimică, fie pe cale enzimatică, fiecare metodă având avantaje

și dezavantaje [246]. Întrucât micellele inverse, prin însăși natura lor, prezintă o compartimentare obligatorie, ele ar putea reprezenta un mediu potrivit pentru sinteza *in vitro* a proteinelor. Este semnalată sinteza *in vitro* a interleucinei umane 2, o proteină scurtă, formată dintr-o secvență de 156 aminoacizi, în micelle inverse de Brij 96 în ciclohexan [247], precum și sinteza *in vivo* a β -galactozidazei în plasmidă recoltată din *E. coli* și micelle inverse de Tween 85 în palmitat de *i*-propil [248].

În cazul sintezei unor proteine mai voluminoase, cum ar fi, de exemplu proteina albastră fluorescentă (BFP¹) sau proteina îmbunătățită verde fluorescentă (EGFP²), prezența micellelor inverse are un efect advers asupra randamentului în proteină – fig. 4.50, 4.51. Una dintre explicații este secvența mai mare de aminoacizi (238) necesară sintezei EGFP [196].

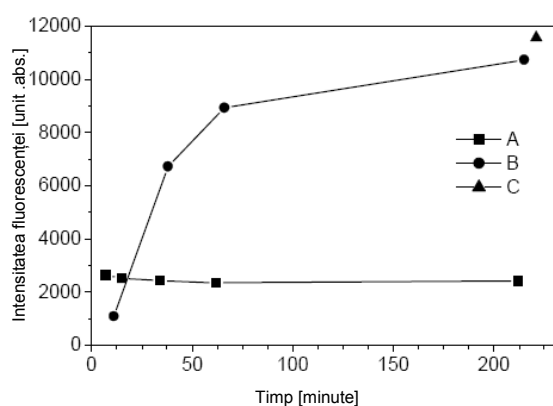


Figura 4.50. Sinteza „cell free” a EGFP la 23 °C [196]

A – în micelle inverse cu 140 mM Brij 96 / ciclohexan și 1,8 % vol soluție apoasă; B – în apă; C – EGFP formată în apă în 3,5 h a fost adăugată la micelle inverse cu 140 mM Brij 96 / ciclohexan și 1,8 % vol soluție apoasă

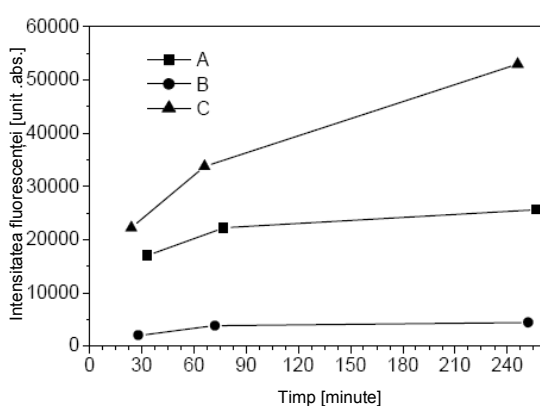


Figura 4.51. Sinteza „cell free” a EGFP la 37 °C în prezența: [196]

A – 29 mM Brij 96; B – 29 mM AOT; C – în absența surfactanților

Pentru sinteza EGFP se recomandă utilizarea unor compartimente mai mari, cum sunt, de ex., emulsiile A/U. O astfel de emulsie, formată din 4,5% vol. Span 80, 0,5% vol. Tween 80, 5% soluție apoasă în ulei mineral, a fost utilizată pentru prima dată în sinteza „cell-free” a proteinelor [249, 250]. În fig. 4.52 este redată schema de principiu a procesului de sinteză a proteinelor în emulsii A/U. În cazul proteinelor fluorescente, micrografiile pun în evidență cantitatea de proteină formată prin intensitatea fluorescenței probei (fig. 4.53, 4.54).

¹ BFP – Blue Fluorescent Protein;

² EGFP – Enhanced Green Fluorescent Protein;

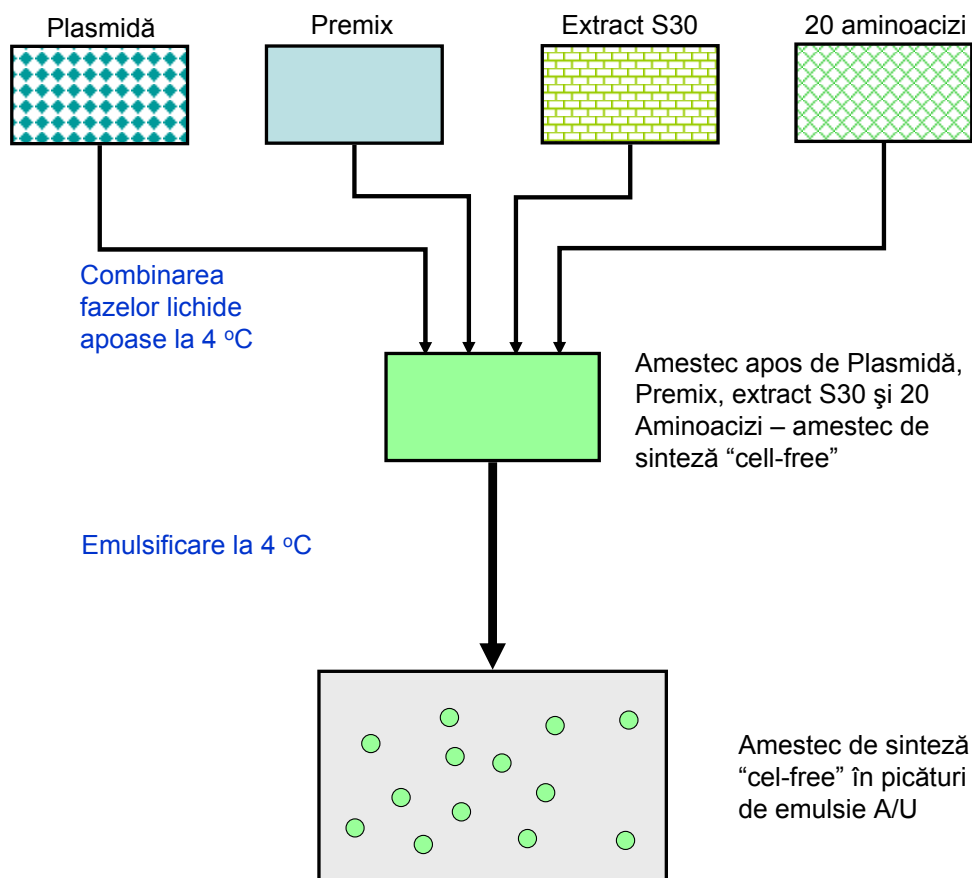


Figura 4.52. Schema de principiu a procesului de sinteză „cel-free” a proteinelor în emulsii de tip A/U [196]

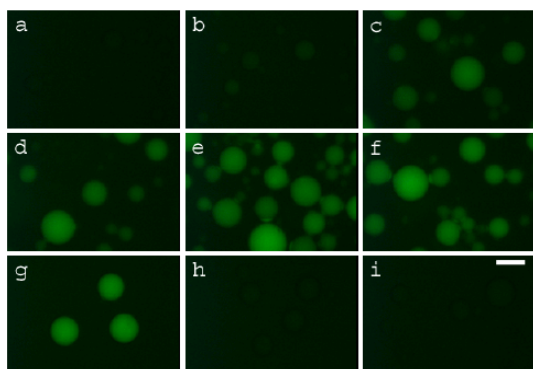


Figura 4.53. Sinteza „cell-free” a EGFP în emulsie A/U cu 0,45% vol Span 80; 0,05% vol Tween 80; preparare la 4 °C, incubare la 37 °C [196]

a – 0 min; b – 11 min; c – 23 min; d – 32 min; e – 44 min; f – 57 min; g – 21 h; Control negativ: h – 0 min; i – 21 h. Bara reprezintă 50 μ m

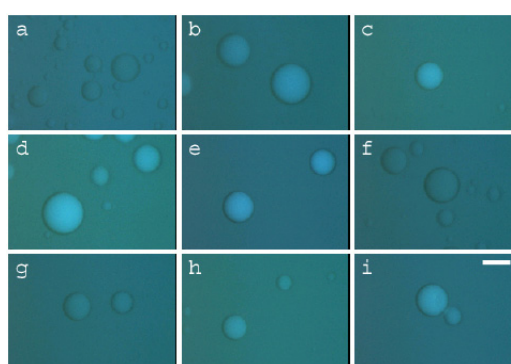
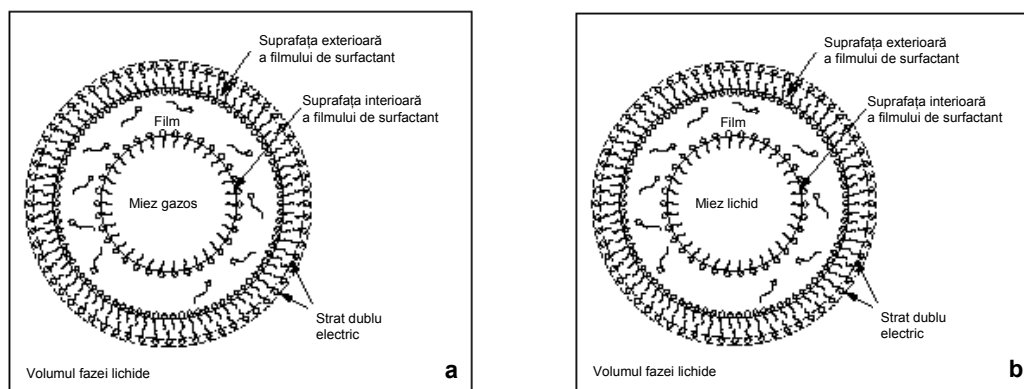


Figura 4.54. Sinteza „cell-free” a BFP în emulsie A/U cu 0,45% vol Span 80; 0,05% vol Tween 80; preparare la 4 °C, incubare la 37 °C [196]

a – 15 min; b – 1,25 h; c – 3,25 h; d – 5 h; e – 23 h; Control negativ: f – 30 min; g – 1,5 h; h – 5,25 h. Bara reprezintă 50 μ m

4.4. EXTRAȚIA CU AFRONI

Afronii sunt unități distincte de fluid, încapsulate prin intermediul unui film subțire de surfactant („balonaș de săpun”), într-un alt fluid [251]. Reprezentarea schematică a unui afon este redată în fig. 4.55.



a – Afon coloidal gazos (CGA)

b – Afon coloidal lichid (CLA)

Figura 4.55. Reprezentarea schematică a aforonilor coloidal

Diametrul mediu al aforonilor coloidal gazoși (CGA) este de 25 – 150 μm , în timp ce diametrul mediu al aforonilor coloidal lichizi (CLA) este de 0,1 – 50 μm (Fig. 4.56). Atât CGA cât și CLA prezintă o serie de proprietăți deosebite, dintre care se remarcă stabilitatea extraordinară și proprietățile coloidale. CGA nu prezintă coalescență și pot fi pompați la fel ca apa. CLA preparați în mod corespunzător pot fi depozitați timp de câțiva ani în recipiente bine închise, fără o deteriorare vizibilă. De asemenea, CLA pot forma dispersii stabile în apă [252].

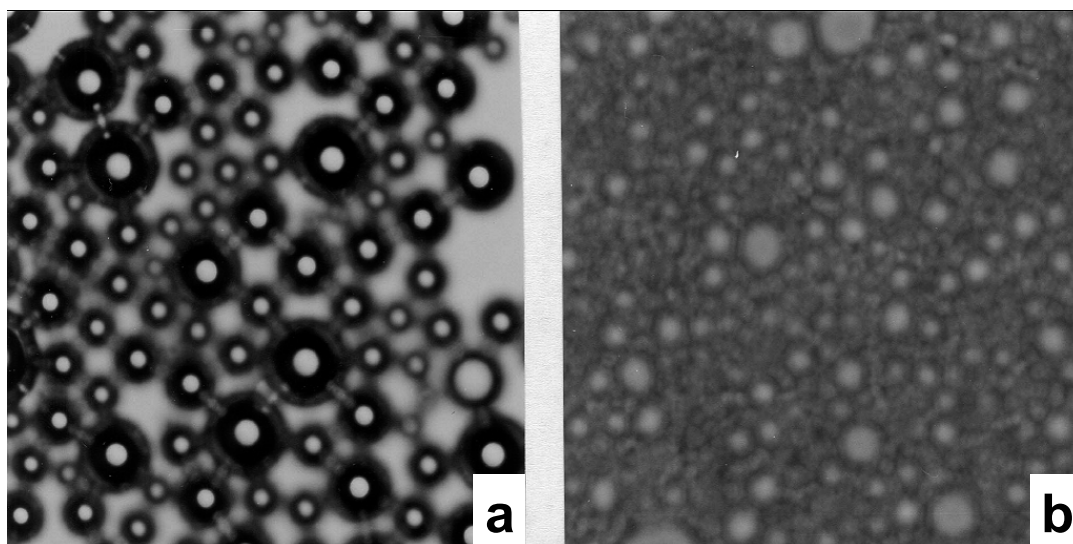


Figura 4.56. Microfotografii ale unor afori [253]

a – CGA din soluție de HTAB (bromură de hexadeciltrimetilamoniu – $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr}$);

b – CLA din kerosen

Afronii coloidal gazoși (CGA) se pot obține prin agitare energetică la temperatura camerei a unei soluții de surfactant. Procesul decurge într-un recipient prevăzut cu 2 – 4 șicane amplasate simetric și având înălțimea mult mai mare decât nivelul soluției din recipient, agitare soluției realizându-se cu ajutorul unui disc rotitor antrenat de un motor electric având turația de 5000 – 10000 rpm (fig. 4.57). După câteva minute de agitare se obțin CGA care se separă ridicându-se la suprafața soluției. Acești CGA pot avea o porozitate (fracție de goluri) de până la 70%, uzual de peste 50%. Bulele de gaz încapsulate sunt stabile și prezintă un spectru îngust și reproductibil al diametrelor. Stabilitatea afromilor este condiționată de concentrația surfactantului, care trebuie să fie mai mare decât concentrația micelară critică. În cazul utilizării surfactanților ionici, tăria ionică a soluției este hotărâtoare pentru stabilitatea afromilor. Stabilitatea maximă se obține în soluții de NaCl 0,002 – 0,05 mM [254].

Majoritatea aplicațiilor CGA se bazează pe o serie de proprietăți ale acestora, cum ar fi: (i) suprafața interfacială mare; (ii) posibilitatea de a adsorbi particule la interfața microbulelor; (iii) stabilitatea [255]. Dintre aplicațiile posibile ale CGA se pot enumera: procesele de separare, recuperarea țiteiului, stingerea incendiilor, sinteza materialelor, fermentarea și bioreactoarele. O serie de utilizări ale CGA sunt sintetizate în tab. 4.15.

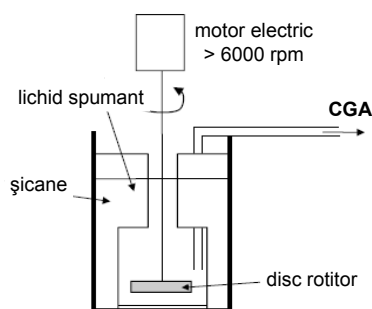


Figura 4.57. Dispozitiv pentru obținerea CGA

Tabelul 4.15. Aplicații ale CGA

Aplicația	Ref.
Remediarea solurilor contaminate cu hidrocarburi	[256 – 258]
Epurarea apelor contaminate cu metale	[259 – 261]
Epurarea apelor contaminate cu coloranți	[253, 262, 263]
Extragerea minereurilor prin flotație	[264]
Îndepărtarea algelor din apele poluate	[252]
Curățirea nisipului îmbibat cu țitei	[257]
Flotația celulelor de drojdii	[265, 266]
Separarea proteinelor	[267 – 271]

Separarea proteinelor se poate realiza prin utilizarea unor CGA preparați din diverși surfactanți. Astfel, CGA proveniți din AOT se pot utiliza la separarea lizozimei, ribonucleazei, proteinelor din zer, iar CGA din Triton X114 pentru separarea enzimelor recombinante din bulionul de cultură. Pentru separarea proteinelor din zer se pot utiliza și CGA din CTAB sau Tween [272]. Folosind CGA preparați dintr-o soluție de AOT, s-a separat din zer β -lactoglobulina, gradul maxim de separare (86%) obținându-se la pH = 8 [273].

La scară de laborator, procesul de separare a proteinelor cu ajutorul CGA implică următoarele etape (fig. 4.58): prepararea CGA utilizând un dispozitiv similar celui din fig. 4.57, amestecarea CGA cu soluția care conține proteina, transferul proteinei în faza de afron, separarea fazei de afron și recuperarea proteinei din aceasta. La contactul proteinelor cu afromii, acestea se adsorb pe surfactant prin forțe electrostatice și/sau hidrofobe. Este posibilă formarea unui complex între surfactant și proteină prin neutralizarea sarcinilor electrice, fapt care conduce la precipitarea proteinei. Faza de

afron se separă ușor de faza lichidă, datorită faptului că având un volum liber mare (~50%), are densitate mică și se ridică la suprafața fazei lichide.

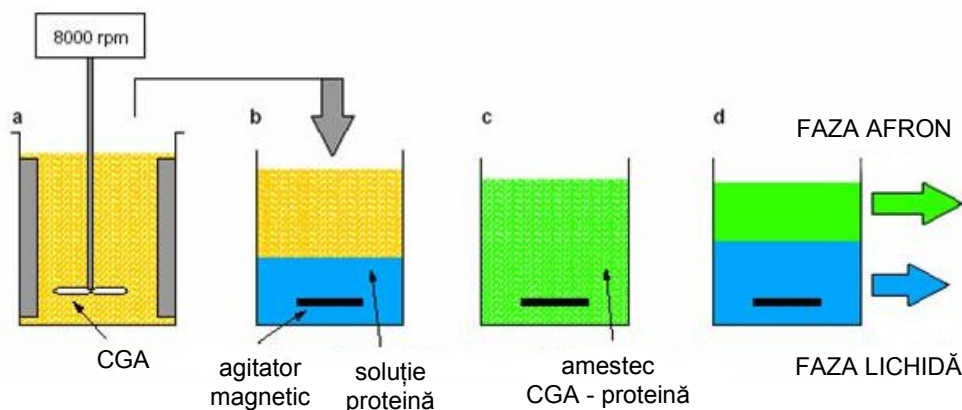


Figura 4.58. Separarea proteinelor cu ajutorul CGA [274]
*a – prepararea CGA; b – adăugarea CGA la soluția de proteină;
 c – amestecarea fazelor; d – separarea fazelor*

Deocamdată nu există aplicații la scară industrială ale separării cu afroni, mai fiind încă de elucidat anumite aspecte ale mecanismului și selectivității separării. De asemenea, nu au fost încă studiate aspectele referitoare la transpunerea la scară a procesului. Există și cercetări referitoare la comportarea reologică și la transferul termic al afronilor coloidal gazoși [275]. Utilizarea la scară industrială a separării cu afroni este atractivă, deoarece scade numărul etapelor necesare separării unui anumit bioprodus. Astfel, prin extracția cu afroni s-ar putea înlocui secvența de operații: centrifugare – filtrare – extracție – cromatografie.

4.5. EXTRAȚIA REACTIVĂ

După cum indică și denumirea procedurii, extracția reactivă implică existența unei reacții chimice între solutul care trebuie extras și solvent sau unul dintre componentii acestuia. Dacă în extracția fizică L – L este necesară utilizarea unor solvenți a căror solubilitate reciprocă cu solventul inițial să fie cât mai mică și care să prezinte selectivitate ridicată și inerție chimică față de solut (pentru diminuarea pierderilor la recuperare), în extracția reactivă este necesară adăugarea în solvent a unui agent de extracție (extractant) capabil să reacționeze reversibil cu solutul, formând un compus miscibil cu solventul (fig. 4.59). În acest mod se poate mări fie capacitatea de reținere a solventului, fie selectivitatea separării.

Conform reprezentării din fig. 4.59, procesul de extracție reactivă comportă mai multe etape. Într-o primă etapă, la soluția de solut inițial (**B**) în solventul inițial (**A**) se adaugă solvent (**S**) împreună cu agent de extracție (**X**). Agentul de extracție **X** reacționează reversibil cu **B**, formând un compus **BX** solubil în **S**:



După separarea fazelor, în rafinat mai rămân urme de **B** dizolvat în solventul inițial **A**. Extractul obținut, care conține compusul rezultat în urma reacției dintre solutul **B** și extractantul **X**, este trecut la etapa de reextracție (stripare), în vederea eliberării solutului **B** și regenerării extractantului **X**. În prezența agentului de stripare **M** are loc reacția de descompunere a lui **BX**:



Solutul **B** este ulterior recuperat din faza de rafinat de la reextracție. Extractul, format din solventul **S** și extractantul regenerat **X** este recirculat la etapa de extracție reactivă.

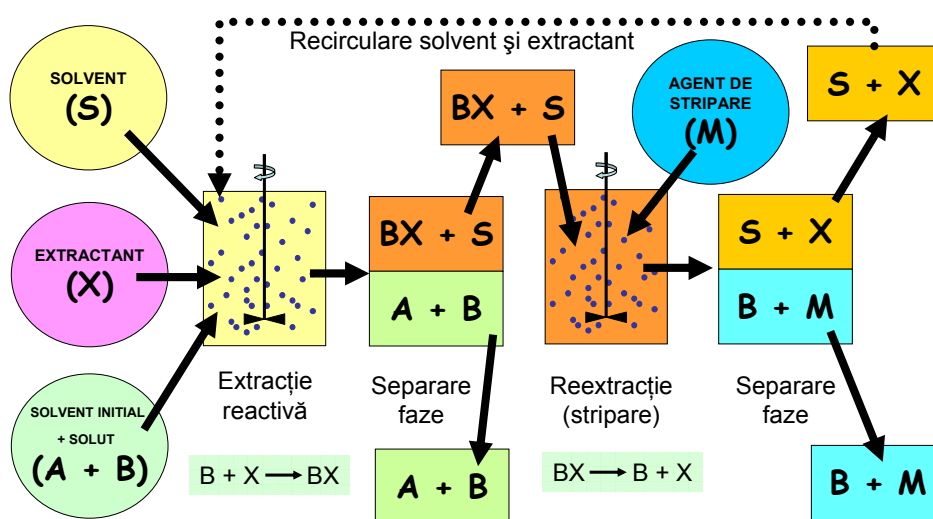


Figura 4.59. Schema de principiu a procesului de extracție reactivă

Inițial, extracția reactivă a fost utilizată pentru separarea unor compuși anorganici, aplicarea la scară industrială fiind impulsionată de cercetările referitoare la extracția din minereuri a uraniului folosit în energia nucleară. Ulterior, au fost puse la punct procedee de recuperare și a altor metale: beriliu, wolfram, vanadiu, zirconiu, hafniu, lantanoide, metale platinice etc. [276]. După 1960, studiile asupra extracției reactive s-au orientat într-o măsură din ce în ce mai mare, spre stabilirea condițiilor de separare a compușilor de biosinteză: acizi organici, aminoacizi, antibiotice [4].

4.5.1. Mecanismul extracției reactive

În ipoteza în care solubilitatea reciprocă a solventilor **A** și **S** este nulă, procesul de extracție reactivă constă în următoarele etape (fig. 4.60.a):

- difuzia extractantului **X** din volumul fazei organice către interfață;
- difuzia solutului **B** din volumul fazei apoase către interfață;
- reacția (4.17) între solut și extractant la interfață;
- difuzia produsului reacției (4.17) de la interfață către volumul fazei organice.

În mod similar, reextracția (striparea) va implica următoarele etape (fig. 4.60.b):

- difuzia compusului solut – extractant (**BX**) din volumul fazei organice către interfață;

- descompunerea compusului BX la interfață conform reacției (4.18);
- difuzia solutului B de la interfață către volumul fazei apoase;
- difuzia extractantului X de la interfață către volumul fazei organice.

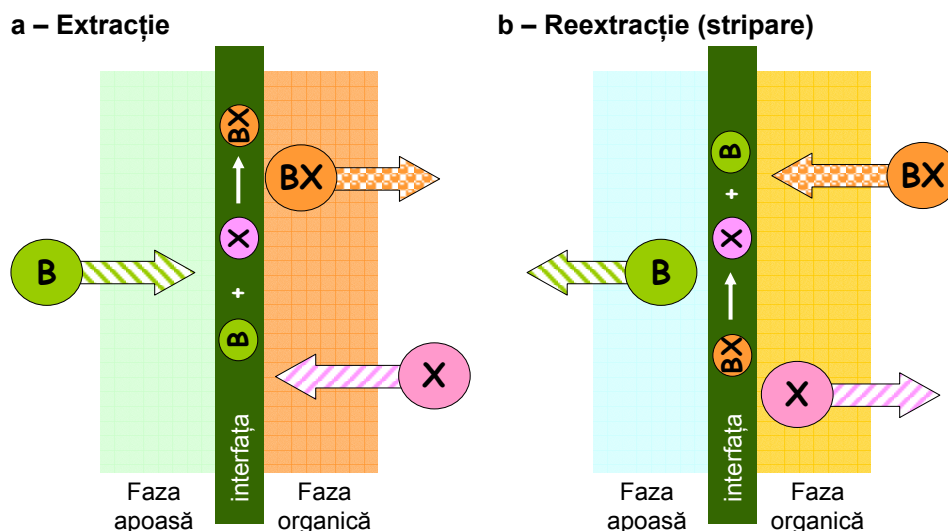


Figura 4.60. Mecanismul extracției reactive (a) și al reextracției (b)

În anumite cazuri, în funcție de solubilitatea componentelor sistemului de extracție în cealaltă fază, locul de desfășurare al reacției (4.17) dintre solutul B și extractantul X poate fi situat fie la interfață, fie în faza apoasă, fie în faza organică. Viteza procesului global de extracție reactivă este dictată de viteza celui mai lent proces elementar: difuzia solutului B către interfață, difuzia extractantului X către interfață sau reacția chimică (4.17). Dacă unul din procesele de difuziune are viteza mult mai mică decât viteza reacției chimice, acela va fi procesul limitativ (determinant de viteză), iar procesul este controlat difuzional. Dacă dimpotrivă, reacția chimică este lentă, viteza reacției fiind mult mai mică decât viteza proceselor elementare de difuziune, determinantă de viteză va fi reacția (4.17), procesul global fiind controlat cinetic. Când vitezele proceselor elementare sunt comparabile ca ordin de mărime, procesul global decurge după un model cinetic combinat transfer de masă – reacție chimică. Procesul elementar limitativ depinde de condițiile de operare: dacă procesul este controlat difuzional, prin intensificarea agitării masei de reacție se poate mări viteza difuziunii, astfel încât procesul să devină controlat cinetic (fig. 4.61).

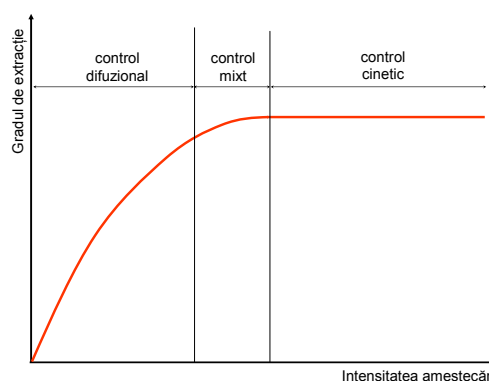


Figura 4.61. Modificarea procesului determinant de viteză în extracția reactivă

Pentru descrierea matematică a procesului de extracție reactivă există numeroase modele. Unul dintre acestea este modelul Wang – Langemann (1994) [277], cunoscut și drept modelul nestăionar al celor două filme [89]. Deși nu este un model nou, el

combină într-un mod original o serie de ipoteze specifice modelelor clasice de transfer: modelul celor două filme al lui Whitman (1923), modelul Lewis – Whitman (1924), modelul reînnoirii suprafeței al lui Higbie (1935), modelul reînnoirii întâmplătoare a suprafeței al lui Danckwerts (1951) [90]. Modelul a fost folosit pentru a descrie un proces de transfer de masă nestaționar în două straturi limită, de o parte și de alta a interfeței, în prezența unei reacții ireversibile de ordin I. Ipotezele modelului sunt următoarele:

- între cele două faze lichide există o interfață a cărei arie medie poate fi cunoscută sau estimată, chiar și experimental;
- există două straturi limită, laminare de ambele părți ale interfeței, având grosimile δ_1 și δ_2 în cele două faze;
- în straturile limită difuziunea are loc prin mecanism molecular;
- în a doua fază are loc o reacție ireversibilă de ordin I;
- concentrațiile din volumul celor două faze lichide nu variază în timp; la interfață se consideră întotdeauna echilibrul descris de legea lui Henry.

Pe baza acestor ipoteze, ecuațiile modelului de transfer de masă sunt:

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2} \quad \text{pentru} \quad -\delta_1 < x < 0 \quad (4.19)$$

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 C_2}{\partial x^2} - k_R \cdot C_2 \quad \text{pentru} \quad 0 < x < \delta_2 \quad (4.20)$$

cu următoarele condiții la limită și condiții inițiale:

$$\begin{aligned} C_1 &= C_{1,V} \quad \text{pentru} \quad x = -\delta_1, \quad t > 0 \\ C_1 &= K_N \cdot C_2 \quad \text{pentru} \quad x = 0, \quad t > 0 \\ D_1 \frac{\partial C_1}{\partial x} &= D_2 \frac{\partial C_2}{\partial x} \quad \text{pentru} \quad x = 0, \quad t > 0 \\ C_2 &= C_{2,V} \quad \text{pentru} \quad x = \delta_2, \quad t > 0 \\ C_1 &= C_{1,V} \quad \text{pentru} \quad t = 0 \\ C_2 &= C_{2,V} \quad \text{pentru} \quad t = 0 \end{aligned} \quad (4.21)$$

în care:

C – concentrația componentului transferat [$\text{kmol} \cdot \text{m}^{-3}$];

D – difuzivitatea [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$];

k_R – constanta vitezei de reacție [s^{-1}];

K_N – coeficientul de distribuție al speciei transferate între cele două faze;

t – timpul [s];

x – coordonata în direcția transferului de masă;

δ – grosimea stratului limită [m].

Indici: 1 – faza 1; 2 – faza 2; V – volumul fazei lichide.

Rezolvând ecuațiile (4.19 – 4.20) cu condițiile la limită (4.21) se obține profilul de concentrație în fiecare strat limită. Din profilurile de concentrație obținute se poate calcula fluxul instantaneu de transfer de masă:

$$N(t) = -D_1 \frac{\partial C_1}{\partial x} \Big|_{x=0} \quad (4.22)$$

În ipoteza că interfața se rupe parțial și aleatoriu, refăcându-se în același timp, iar durata medie de viață a turbioanelor la interfață este dată de legea de distribuție a lui Danckwerts:

$$\Psi(t) = s \cdot e^{-st} \quad (4.23)$$

se poate calcula fluxul mediu de component transferat:

$$\bar{N} = \int_0^{\infty} s \cdot N(t) \cdot e^{-st} dt \quad (4.24)$$

Rezolvarea integralei (4.24) conduce la o expresie a debitului mediu de component transferat în funcție de un timp adimensional caracteristic, θ :

$$\theta = \frac{1}{\delta_1} \sqrt{\frac{D_1}{s}} \quad (4.25)$$

În ecuațiile (4.23 – 4.25), s reprezintă viteza de reînnoire a suprafeței [s^{-1}].

În cazul general (regim nestăionar și reacție chimică), expresia fluxului mediu de component transferat are doi termeni, primul reprezentând debitul transferat în condiții staționare, iar al doilea reprezentând contribuția transferului nestăionar datorat turbulenței la interfață. Dacă $\theta \rightarrow \infty$ termenul nestăionar dispare și relația de calcul a debitului mediu de component transferat devine:

$$\bar{N} = \frac{\alpha_2 \cdot D_1 \cdot (C_{1,V} \cdot \cosh \alpha_2 - K_N \cdot C_{2,V})}{\alpha_2 \cdot \delta_1 \cdot \cosh \alpha_2 + K_N \cdot D_r^2 \cdot \sinh \alpha_2} \quad (4.26)$$

în care:

$$\alpha_2 = \delta_2 \cdot \sqrt{\frac{k_R}{D_2}} \quad (4.27) \quad \text{și} \quad D_r = \sqrt{\frac{D_1}{D_2}} \quad (4.28)$$

Un alt caz particular este cel în care nu are loc reacția chimică ($k_R = 0$), caz în care $\bar{N}$ se reduce la expresia:

$$\bar{N} = \frac{C_{1,V} - K_N \cdot C_{2,V}}{\frac{\delta_1}{D_1} + K_N \cdot \frac{\delta_2}{D_2}} \quad (4.29)$$

expresie identică cu cea obținută de Lewis și Whitman [278] prin aplicarea teoriei celor două filme în cazul transferului de masă interfazic.

Modelul Wang – Langemann arată că profilurile concentrațiilor în cele două faze precum și fluxul mediu de component transferat depind de trei parametri: grosimea straturilor limită (δ_1 , δ_2), viteza de reînnoire a suprafeței (s). Acești parametri depind în general de hidrodinamica sistemului, în unele cazuri putând fi determinați pe cale experimentală. Întrucât sunt puține reacții chimice în sisteme L – L care decurg după o cinetică de ordin I (în majoritatea cazurilor de extracție reactivă întâlnindu-se reacții de ordin fracționar), modelul descris anterior, precum și altele similare, prezintă mai mult importanța teoretică, ele neputând fi aplicate în proiectare.

4.5.2. Agenți de extracție

Alegerea agentului potrivit pentru extracția reactivă este hotărâtoare pentru realizarea cu succes a separării. Pentru combinația solvent-extractant există două categorii de criterii de selectare. În prima categorie intră criteriile care sunt esențiale pentru separare, cum ar fi selectivitatea, recuperabilitatea, diferența de densitate față de rafinat. Criteriile din cea de-a doua categorie nu sunt hotărâtoare, dar pot îmbunătăți separarea și/sau o pot face mai eficientă din punct de vedere economic. Unele proprietăți ale solventului (extractantului) pot fi contradictorii, caz în care trebuie aleasă o soluție de compromis [279].

Selectivitatea. Un factor de separare ridicat permite realizarea extracției într-un număr mai redus de trepte. Purity extractului sau a rafinatului pot fi îmbunătățite prin creșterea cantității de solvent utilizate. Dacă alimentarea este un amestec complex din care trebuie separați mai mulți componenți, selectivitatea de grup devine o caracteristică importantă.

Capacitatea de extracție. O valoare ridicată a coeficientului de distribuție între faze indică o capacitate ridicată a solventului pentru solut și permite utilizarea unor rapoarte mai reduse solvent/alimentare. Întrucât acest parametru este funcție de temperatură, un gradient termic aplicat procesului de extracție poate conduce la creșterea capacității de extracție. Creșterea temperaturii poate conduce însă la scăderea selectivității. Adăugarea unor componenți cum ar fi antisolvenții, poate modifica valoarea coeficientului de distribuție. De cele mai multe ori este necesară realizarea unui compromis între selectivitate și capacitatea de extracție. Utilizarea refluxului de rafinat sau de extract poate îmbunătăți puritatea, fie a rafinatului, fie a extractului. Un factor sensibil îl reprezintă valoarea pH-ului la care se realizează extracția, respectiv striparea. În cazul unor separări dificile, se utilizează un gradient de pH în zona de concentrare, pentru optimizarea refluxului [280].

Recuperabilitatea solventului. Solventul trebuie să poată fi recuperat cât mai ușor. Dacă în extracția fizică L – L recuperarea se realizează prin distilare sau distilare urmată de stripare, în extracția reactivă recuperarea se realizează fie prin modificarea pH-ului, fie prin modificarea tăriei ionice, ambele ducând la descompunerea compusului format între solut și extractant. Cu alte cuvinte, se aleg acele condiții de pH și tărie ionică, care favorizează deplasarea echilibrului reacției (4.18) spre dreapta.

Densitatea. Diferența de densitate dintre extract și rafinat trebuie să fie suficient de mare (minimum 150 kg.m^{-3}) pentru a ușura separarea fazelor prin decantare. O diferență de densitate mai mare permite creșterea capacității utilajelor. La diferențe de densitate mici între faze sunt necesare extractoare centrifugale costisitoare.

Viscozitatea și punctul de topire. O viscozitate prea ridicată reduce eficiența transferului de masă și provoacă dificultăți la vehiculare și dispersie. O viscozitate scăzută permite o sedimentare rapidă și o capacitate mai mare (uzual faza mai viscoasă este faza dispersă). Temperatura de realizare a procesului este de regulă determinată de viscozitate. Este de preferat ca punctul de topire al solventului să fie mai scăzut decât temperatura mediului înconjurător, pentru a ușura manipularea sa.

Solubilitatea. Solubilitatea reciprocă a solventului de extracție cu solventul inițial din care se realizează extracția reactivă trebuie să fie cât mai scăzută. În caz contrar,

este necesară o etapă suplimentară de separare pentru recuperarea solventului din rafinat.

Tensiunea interfacială. O tensiune interfacială ridicată permite o sedimentare rapidă datorită coalescenței facile a picăturilor de fază dispersă, permițând astfel creșterea capacității instalației de extracție. O tensiune interfacială scăzută facilitează dispersia fazelor, cu obținerea unei arii mari a interfeței, fapt care conduce la creșterea eficienței separării. În acest caz însă va fi necesar un volum mai mare de utilaj pentru separarea fazelor. O tensiune interfacială mult prea scăzută accentuează tendința de formare a emulsiilor.

Faza dispersă. Amenajările interne ale coloanelor de extracție nu trebuie să fie udate de către faza dispersă, fapt care ar conduce la scăderea capacității coloanei. Adeseori transferul de masă de la faza continuă către faza dispersă îmbunătățește coalescența picăturilor; în picături mari, eficiența transferului de masă este mai redusă.

Toxicitatea și inflamabilitatea. Pentru procesarea produselor alimentare sunt acceptați doar solvenții netoxici. În general, orice pericol asociat cu solventul va necesita măsuri de siguranță suplimentare. În consecință, solvenții organici alifatici sunt preferabili celor aromatici.

Corozivitatea. Utilizarea unor solvenți corozivi conduce la creșterea costului echipamentelor, care vor trebui confecționate din materiale anticorozive. De asemenea, astfel de solvenți pot necesita prelucrări costisitoare înainte sau după utilizare.

Stabilitatea termică și chimică. Este importantă având în vedere necesitatea reciclării solventului. În special acesta trebuie să fie rezistent la descompunere în timpul recuperării, în coloanele de stripare, de ex. Uneori sunt necesare măsuri suplimentare pentru a preveni degradarea solvenților. De exemplu, în cazul furfuralului, este necesară limitarea temperaturii, operarea într-o atmosferă protectoare de azot și deaerarea alimentării.

Disponibilitate și cost. Solventul trebuie să fie ușor disponibil. Nu contează atât prețul solventului, cât costurile anuale datorate pierderilor inevitabile de solvent în timpul operării.

Impactul asupra mediului ambiant. Solventul nu trebuie doar să fie compatibil cu procesele de prelucrare din amonte și din aval de extracție, ci și cu mediul ambiant (pierderi minime prin evaporare, solubilizare și antrenare).

În general, cerințele impuse extracției reactive sunt similare cu cele impuse extracției fizice L – L. Viscositatea fazei organice trebuie să fie sub $2 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$, punctul de fierbere între $150 - 250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, iar densitatea între $750 - 900 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Punctul de aprindere trebuie să fie cu cel puțin 25 K mai ridicat decât temperatura de operare, fiind recomandată o valoare de peste $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$. La aceeași masă moleculară, solvenții aromatici sunt mai polari, deci mai solubili în apă, decât cei alifatici. Prețul mai ridicat și toxicitatea mai mare a solvenților aromatici, face ca în practica industrială să fie preferați solvenții alifatici. Degradarea solventului este de regulă neglijabilă în comparație cu degradarea extractantului. Extractantul se poate degrada chimic, termic sau prin radiații. De asemenea el poate fi otrăvit prin complexare ireversibilă cu solutul extras. De exemplu, în hidrometalurgie, la interfața dintre stratul apos și cel organic apare și se concentrează o fază cu conținut de substanțe de natură minerală sau biologică, fază care reduce transferul de masă și scade eficiența extracției. Această fază

apare datorită precipitării substanțelor dizolvate și coloidale (în special silice) la tensiuni de forfecare mari. Fenomenul este favorizat de prezența acizilor humici [281].

Principalele clase de agenți de extracție care se utilizează pentru separarea produselor de biosinteză sunt derivații organofosforici, aminele cu masă moleculară ridicată și compuși macrociclici de tip eteri-coroană sau derivați ai calixarenelor.

4.5.2.1. Derivați organofosforici

Derivații organofosforici sunt cunoscuți pentru capacitatea lor de a realiza extracția cu viteze și randamente ridicate. Aceștia sunt folosiți fie individual, fie în amestec cu alți extractanți (extracție reactivă sinergetică) pentru separarea metalelor, a compușilor anorganici, a compușilor organici.

În funcție de structura chimică, derivații organofosforici pot fi: acizi organofosforici, esteri neutri ai acidului fosforic, acizi fosfonici, acizi fosfinici, fosfinoxizi. Toți acești extractanți au la bază acidul ortofosforic, grupările OH ale acestuia fiind substituie parțial sau total cu radicali organici (fig. 4.62). O prezentare a agenților de extracție organofosforici comerciali este redată în tab. 4.16.

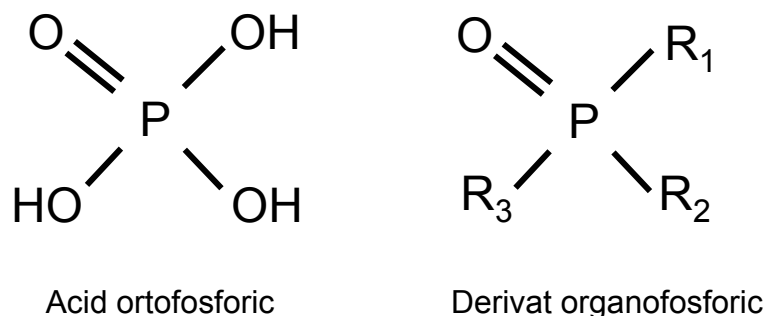
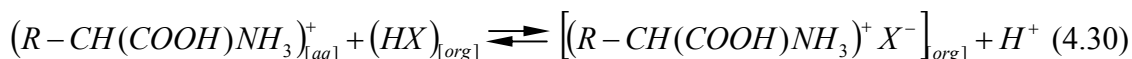


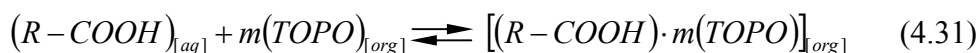
Figura 4.62. Structura generală a extractanților organofosforici

Structura chimică a agenților de extracție determină mecanismul reacțiilor implicate în extracția reactivă. Astfel, extracția cu acizi organofosforici decurge prin intermediul schimbului ionic, în timp ce extracția cu esteri neutri sau fosfinoxizi decurge prin formarea unor specii solvate [4].

Schimbul ionic implică existența solutului din faza apoasă sub formă cationică, la interfață stabilindu-se echilibrul:



indicii [aq] și [org] referindu-se respectiv la faza apoasă și la cea organică. În cazul formării speciilor solvate, la interfață se stabilește echilibrul:



Tabelul 4.16. Agenți de extracție organofosforici comerciali [4, 276, 282]

Clasa	Structură	Denumire	
		științifică	comercială
Acizi organofosforici	$R_1 = R_2 = -OH$ $R_3 = C_4H_9CH(C_2H_5)CH_2O-$	acid mono-(2-etilhexil) fosforic	MEHPA
	$R_1 = -OH$ $R_2 = R_3 = C_4H_9CH(C_2H_5)CH_2O-$	acid di-(2-etilhexil) fosforic	DEHPA
	$R_1 = -OH$ $R_2 = R_3 = p-CH_3(CH_2)_6C_6H_5O-$	acid di- <i>p</i> -octilfenil fosforic	OPPA
Esteri neutri ai acidului fosforic	$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3(CH_2)_3O-$	tri- <i>n</i> -butilfosfat	TBP
	$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3(CH_2)_7O-$	tri- <i>n</i> -octilfosfat	TOP
Acizi organofosfonici	$R_1 = -OH$ $R_2 = C_4H_9CH(C_2H_5)CH_2-$ $R_3 = C_4H_9CH(C_2H_5)CH_2O-$	ester mono-(2-etilhexil) al acidului mono-(2-etilhexil) fosforic	PC88A (P-507)
Acizi organofosfinici	$R_1 = -OH$ $R_2 = R_3 = C_4H_9CH(C_2H_5)CH_2-$	acid di-(2-etilhexil) fosfinic	P-229
	$R_1 = -OH$ $R_2 = R_3 = CH_3(CH_2)_3CH_2CH(CH_3)CH_2-$	acid di(2,4,4 trimetilpentil) fosfinic	CYANEX 272
Fosfinoxizi	$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3(CH_2)_7-$	tri- <i>n</i> -octilfosfinoxid	TOPO (CYANEX 921)
	$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3(CH_2)_5-$	tri- <i>n</i> -hexilfosfinoxid	THPO

4.5.2.2. Amine cu masă moleculară ridicată

Aminele alifaticе cu catenă lungă și sărurile acestora sunt utilizate pe scară largă ca extractanți pentru metale, acizi minerali, acizi carboxilici, aminoacizi, antibiotice etc. din următoarele motive:

- performanțe superioare comparativ cu alți extractanți;
- posibilitatea separării unei game largi de compuși chimici;
- similaritatea dintre mecanismul reacțiilor implicate cu cel al reacțiilor care au loc la separarea pe schimbători de ioni; datorită acestui fapt se poate prevedea comportarea sistemului de extracție.

Din punct de vedere al structurii chimice, extractanții de tip aminic se clasifică după numărul atomilor de hidrogen substituiți cu radicali organici în: amine primare, amine secundare, amine terțiare, săruri cuaternare de amoniu. După natura radicalului hidrocarbonat, aminele pot fi alifaticе (cu catenă normală sau ramificată) sau aromatice. O clasificare a agenților de extracție comerciali pe bază de amine este redată în tab. 4.17.

Pentru ca o amină să poată fi utilizată în extracția reactivă, ea trebuie să îndeplinească cumulativ următoarele condiții [4, 283]: (i) să aibă o capacitate ridicată de extracție; (ii) să aibă o hidrofobicitate ridicată; (iii) să fie ușor solubilă în solvenți organici; (iv) să formeze cu solutul compuși puternic hidrofobi; (v) să permită o separare rapidă a fazelor, respectiv să aibă o tendință de emulsionare cât mai redusă; (vi) să fie stabile din punct de vedere chimic, în special la radiații și agenți oxidanți, pentru a putea fi regenerate și reutilizate în cât mai multe cicluri de extracție.

Tabelul 4.17. Agenți de extracție comerciali de tip aminic [4, 276, 282]

Clasa	Structură	Denumire	
		științifică	comercială
Amine primare RNH_2	$R = CH_3(CH_2)_6CH_2-$	<i>n</i> -octilamină	
	$R = CH_3(CH_2)_8CH_2-$	<i>n</i> -decilamină	
	$R = CH_3(CH_2)_{10}CH_2-$	<i>n</i> -dodecilamină	
	$R = (CH_3)_3C(CH_2C(CH_3)_2)_4-$	trialchil-metilamină	Primene JMT
Amine secundare R_1R_2NH	$R_1 = R_2 = CH_3(CH_2)_6CH_2-$	di- <i>n</i> -octilamină	
	$R_1 = C_9H_{19}CH=CHCH_2-$ $R_2 = CH_3C(CH_3)_2(CH_2C(CH_3)_2)_2-$	<i>n</i> -lauril-trialchil-metilamină	Amberlite LA-1
	$R_1 = CH_3(CH_2)_{11}-$ $R_2 = CH_3C(CH_3)_2(CH_2C(CH_3)_2)_2-$	<i>n</i> -dodecenil-trialchil-metilamină	Amberlite LA-2
	$R_1 = R_2 = CH_3(CH_2)_{12}-$	di- <i>n</i> -tridecilamină	Adogen 283
	$R_1 = R_2 = (CH_3)_2CH(CH_2)_7-$	di-2-metil-nonilamină	HOE F2562
	$R_1 = R_2 = CH_3(CH_2)_9-$	di- <i>n</i> -decilamină	DDA
	$R_1 = CH_3(CH_2)_7-$ $R_2 = C_5H_4N-$	<i>n</i> -octil-aminopiridină	
Amine terțiare $R_1R_2R_3N$	$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3(CH_2)_5-$	tri- <i>n</i> -hexilamină	THA
	$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3(CH_2)_7-$	tri- <i>n</i> -octilamină	TOA Alamine 300
	$R_1 = R_2 = R_3 = (CH_3)_2CH(CH_2)_5-$	tri- <i>i</i> -octilamină	Adogen 381 Alamine 308 Hostarex A 324
	$R_1, R_2, R_3 = \text{amestec } n \text{ } C_8 - C_{10}$		Alamine 336 Adogen 364 Hostarex A 327
	$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3(CH_2)_9-$	tri- <i>n</i> -decilamină	
	$R_1 = R_2 = R_3 = (CH_3)_2CH(CH_2)_7-$	tri- <i>i</i> -decilamină	Alamine 310
	$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3(CH_2)_{11}-$	tri- <i>n</i> -dodecilamină	Adogen 363 Alamine 304
	$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3(CH_2)_{12}-$	tri- <i>n</i> -tridecilamină	Adogen 383
	$R_1 = R_2 = CH_3-$ $R_3 = CH_3(CH_2)_7-$	dimetil- <i>n</i> -octil-amină	
	$R_1 = R_2 = R_3 = C_{28}H_{57}-$		Amberlite XE 204
	$R_1 = CH_3(CH_2)_7-$ $R_2 = CH_3(CH_2)_9-$ $R_3 = CH_3(CH_2)_{11}-$	<i>n</i> -octil- <i>n</i> -decil- <i>n</i> -dodecil-amină	Adogen 368
Săruri cuaternare de amoniu $R_1R_2R_3R_4N^+X^-$	$R_1 = CH_3-$ $R_2 = R_3 = R_4 = CH_3(CH_2)_7-$ $X^- = Cl^-$	clorură de metil-tri- <i>n</i> -octilamoniu	TOMAC Adogen 464
	$R_1 = CH_3-$ $R_2 = R_3 = R_4 = \text{amestec } n \text{ } C_8 - C_{10}$ $X^- = Cl^-$	clorură de metil-tri- <i>n</i> -($C_8 - C_{10}$) amoniu	Aliquat 336 Adogen 464 HOE S 2706

Datorită caracterului puternic bazic, conferit de gruparea aminică, acești extractanți fac parte din categoria anioniților lichizi. Extracția cu amine decurge fie prin procese de schimb anionic, fie prin asociere în faza organică, fie prin formare de perechi de ioni [284].

Capacitatea de extracție a aminelor și derivaților acestora crește odată cu creșterea masei moleculare. Ea depinde, de asemenea, și de configurația moleculei: compușii simetrici au o capacitate de extracție mai bună decât cei asimetrice, la aceeași masă moleculară. De asemenea, capacitatea de extracție se mărește prin substituirea unei catene alifatică cu o grupare aromatică [4].

Hidrofobicitatea aminelor este mai ridicată decât cea a sărurilor corespunzătoare, aminele fiind preferate sărurilor lor în procesele de extracție.

Solubilitatea în solvenți nepolari a aminelor primare crește cu creșterea lungimii catenei hidrocarbonate. Prezența unei a doua catene hidrocarbonate (în cazul aminelor secundare) duce la creșterea solubilității în solvenți nepolari și la scăderea solubilității în solvenți polari. Aminele terțiare cu catene hidrocarbonate lungi sunt practic insolubile în apă, dar sunt complet miscibile cu solvenții nepolari [283]. Solubilitatea sărurilor aminelor primare în solvenți organici scade cu reducerea polarității solventului, astfel încât în hidrocarburi alifatică acești derivați sunt foarte puțin solubili. Solubilitatea poate fi mărită prin adăugarea în solvent a unui alcool. Sărurile aminelor secundare și terțiare sunt mai solubile în solvenți organici decât sărurile aminelor primare, în special dacă solventul este perfect anhidru [4].

Bazicitatea maximă o prezintă aminele secundare, acestea fiind adecvate separării compușilor acizi [4]. Dacă în cazul aminelor primare și secundare bazicitatea variază puțin cu lungimea catenei hidrocarbonate, bazicitatea aminelor terțiare crește cu creșterea numărului de atomi de carbon din moleculă. Ordinea bazicității aminelor în solvenți organici polari este aceeași ca în soluție apoasă, putând fi atribuită unui efect de solvatare [283].

Tendința de emulsionare, cu formarea unor emulsii mai mult sau mai puțin stabile, reprezintă principalul dezavantaj al utilizării aminelor și sărurilor acestora în extracția reactivă. Întrucât aminele cu catenă lungă sunt agenți tensioactivi, emulsionarea poate fi evitată prin alegerea corespunzătoare a solventului, a concentrației extractantului, precum și prin modificarea parametrilor fazei apoase (pH, concentrația unor electroliți etc.) [4].

4.5.2.3. Compuși macrociclici

Compușii macrociclici utilizați ca extractanți fac parte din categoria eterilor-coroană (fig. 4.63) și a calixarenelor (fig. 4.64). Structurile macrociclice ale acestor compuși delimitează cavități intramoleculare de forme și dimensiuni diverse. Astfel, diametrul cavităților formate variază între 0,12 – 0,15 nm pentru eterii 14-coroană-4 și 0,34 – 0,43 nm pentru eterii-21-coroană-7 [285]. În aceste cavități pot fi reținute chimic specii ionice sau moleculare, formându-se complecși cu stabilitate ridicată, stabilitate care este determinată de raportul dintre mărimea ciclului și cea a speciei chimice extrase (fig. 4.65). Pentru accentuarea caracterului hidrofob sau pentru creșterea gradului de extracție, acestor extractanți le pot fi atașați diverși substituenți aromatici, carboxilici sau alchilici. Cel mai cunoscut extractant din această categorie este eterul dibenzo-18-coroană-6 (fig. 4.63.d), cunoscut sub denumirea comercială DBC 18 [276].

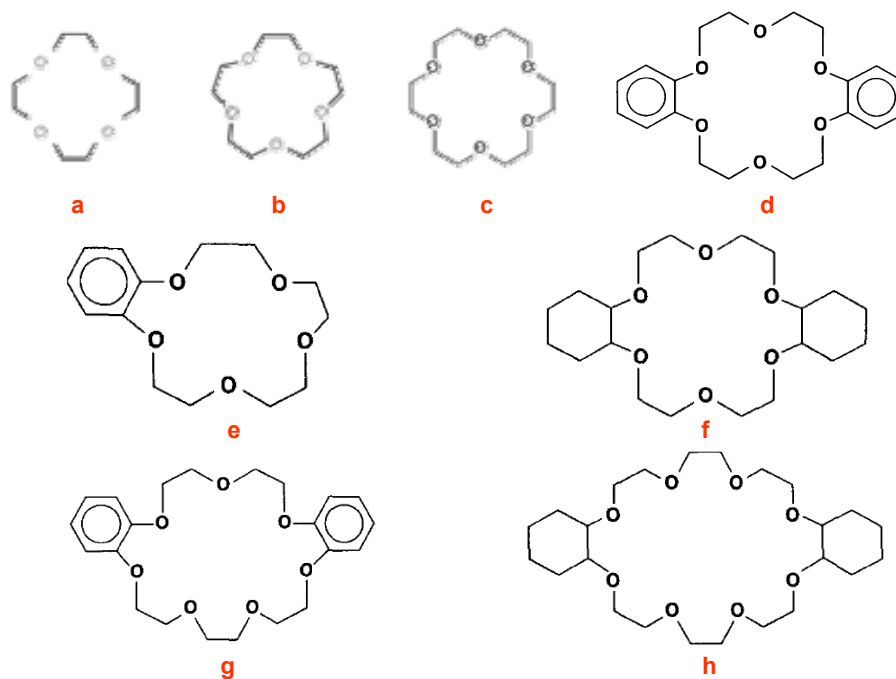


Figura 4.63. Eteri-coroană: *a* – 12-coroană-4; *b* – 15-coroană-5; *c* – 18-coroană-6; *d* – dibenzo-18-coroană-6; *e* – benzo-15-coroană-5; *f* – dicitlohexil-18-coroană-6; *g* – dibenzo-21-coroană-7; *h* – dicitlohexil-24-coroană-8 (neplanar)[285]

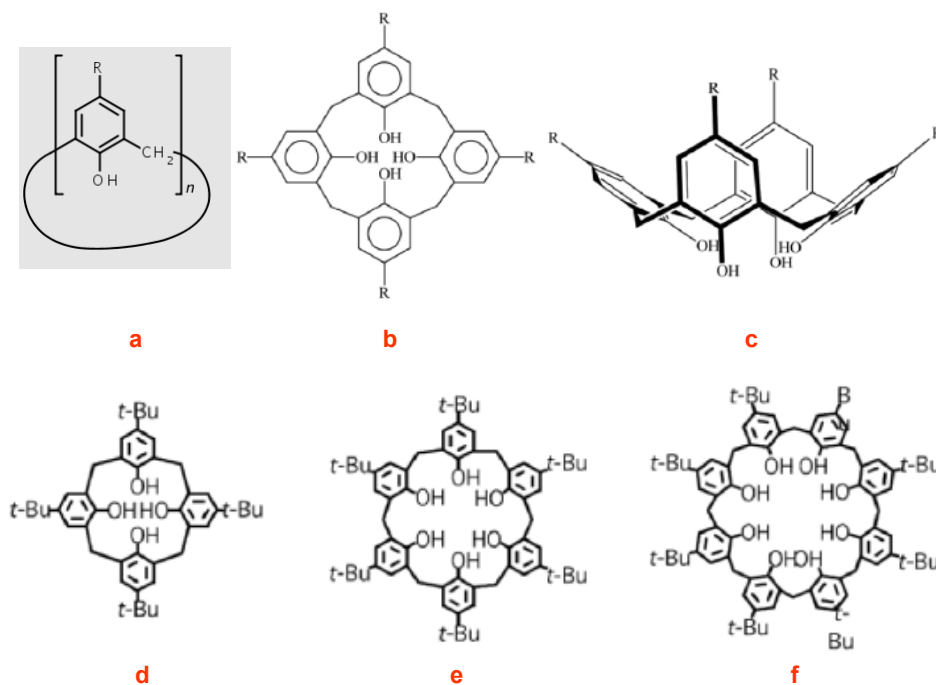


Figura 4.64. Calixarene: *a* – structură generală; *b* – calix[4]arene: reprezentare plană; *c* – calix[4]arene: reprezentare pseudo-tridimensională; *d* – para-terf-butilcalix[4]arenă; *e* - para-terf-butilcalix[6]arenă; *f* - para-terf-butilcalix[8]arenă [286]



Figura 4.65. Complecși ai compușilor macrociclici:

a – ion K^+ coordnat de eter-18-coroană-6 [287]; b – vas antic grecesc (calix), a cărui formă a inspirat denumirea calixarenelor [286]; c – moleculă de derivat benzenic coordnată de para-terț-butilcalix[5]arenă

Extractanții cu structură macrocică sunt utilizați la transportul printr-o membrană lichidă organică a diferitelor specii chimice între două faze apoase cu valori diferite ale pH-ului, proces care a avut ca model sistemele biologice. Astfel, unii ionofori naturali din categoria antibioticelor (monesina, lascalocidul, valinomicina, nigericina – fig. 4.66) au capacitatea de a transporta diverși cationi și anioni prin membranele celulare, în sensul sau împotriva gradientului de concentrație al speciilor ionice respective [4].

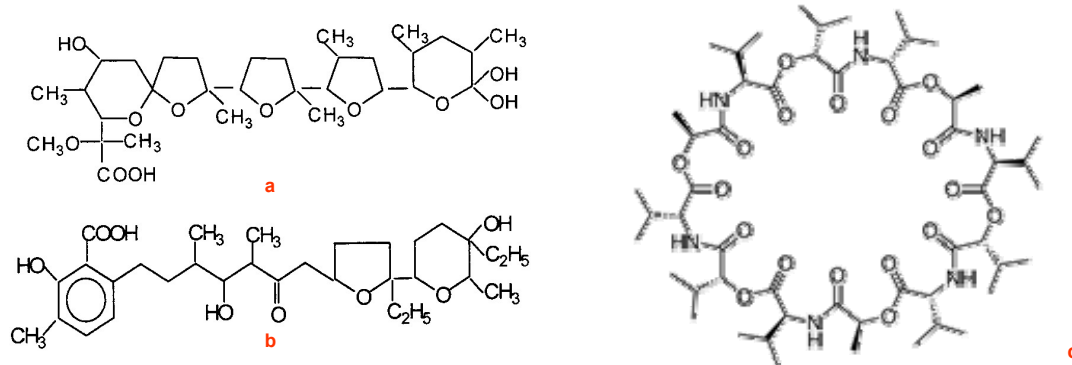


Figura 4.66. Ionofori naturali:

a – monesina [4]; b – lascalocidul [4]; c – valinomicina [288]

Dacă la extracția și transportul prin membrane lichide este menținută diferența de pH dintre soluțiile apoase, solutul poate fi transportat chiar împotriva gradientului său de concentrație.

Extractanții macrociclici sunt utilizați, de regulă, pentru separarea metalelor și aminoacizilor.

4.5.2.4. Sinergismul agenților de extracție

În anumite situații, capacitatea de extracție a unui amestec de extractanți este mai mare decât suma capacităților de extracție ale fiecărui extractant considerat separat [276]. Fenomenul, observat și studiat la începutul anilor 1960, poartă denumirea de **sinergism** și exprimă faptul, aparent paradoxal, că „întregul este mai mare decât suma tuturor părților componente”.

Extractanții care generează acest efect nu reacționează între ei, dar pot extrage separat solutul, sau pot forma cu acesta o combinație puternic hidrofoabă.

Extracția reactivă sinergică poate fi estimată cantitativ prin intermediul coeficientului sinergic (sau sinergetic), C_S :

$$C_S = \lg \frac{E_{AB}}{E_A + E_B} \quad (4.32)$$

în care E_A și E_B reprezintă coeficienții individuali de extracție ai solutului cu extractanții A și B, E_{AB} reprezintă coeficientul de extracție al solutului cu amestecul extractanților A și B:

$$E_{AB} = E_A + E_B + \Delta E_{AB} \quad (4.33)$$

iar ΔE_{AB} reprezintă un coeficient de amplificare. În funcție de valoarea acestui coeficient, extracția reactivă sinergică poate fi pozitivă ($\Delta E_{AB} > 0$) sau negativă ($\Delta E_{AB} < 0$).

Pentru extracția reactivă sinergică se folosesc, principal, patru tipuri de combinații între extractanți: (i) agent de chelatizare + ligand neutru; (ii) acid organofosforic + ligand neutru; (iii) doi extractanți neutri; (iv) doi extractanți cu caracter acid. Extractanții neutri utilizați recent sunt derivații compușilor de tip eter-coronă. Prima și ultima categorie de combinații sunt specifice extracției reactive a metalelor. Celelalte combinații pot fi aplicate atât la extracția metalelor, cât și pentru extracția acizilor minerali sau a compușilor organici [4].

Deși încă nu este pe deplin lămurit, mecanismul extracției sinergice implică formarea unui complex mixt care conține solutul și cei doi extractanți. Deși tipul reacțiilor care intervin în proces diferă de la un sistem de extracție la altul, efectul sinergic apare ca rezultat a două fenomene simultane: (i) modificarea capacității de extracție individuală a extractanților; (ii) modificarea structurii speciei moleculare extrase. Astfel, unul dintre extractanți complexează solutul, iar celălalt mărește hidrofobicitatea complexului format, în condițiile în care configurația structurală a extractanților nu generează împiedicări sterice.

Cu cât diferența de polaritate dintre extractanți este mai mare, cu atât efectul sinergic va fi mai puternic. Mărirea eficienței extracției prin folosirea a doi extractanți neutri cu valori foarte diferite ale constantei dielectrice s-ar putea explica prin aceea că derivatul cu polaritate mai redusă va solvata solutul, solubilizarea complexului format fiind favorizată de mărirea constantei dielectrice a solventului organic prin adăugarea solventului cu polaritate mai ridicată [4].

4.5.3. Echipamente pentru extracția reactivă

4.5.3.1. Instalații cu unități distincte amestecător - decantor

De regulă, procesele de extracție reactivă decurg în echipamente similare celor proiectate pentru extracția fizică L – L. Majoritatea instalațiilor folosesc unități individuale amestecător – decantor amplasate în cascadă (fig. 4.67), care permit reglarea individuală a pH-ului, stabilirea fazei disperse și a timpului de staționare, în funcție de cinetica transferului de masă și de hidrodinamica sistemului. Dezavantajul acestor instalații îl reprezintă forfecarea neuniformă în unitățile de amestecare, fapt care conduce la o distribuție largă a diametrului picăturilor fazei disperse. Datorită acestei neuniformități în dimensiunea picăturilor apar pierderi de solvent prin antrenare în rafinat, pierderi evidențiate prin scăderea eficienței de extracție. Un alt dezavantaj este zestia mare de solvent comparativ cu alte extractoare [279, 289, 290]. Unitățile individuale amestecător – decantor sunt preferate atunci când numărul treptelor de extracție este redus (1 – 2 trepte) și când debitele prelucrate sunt mari [279].

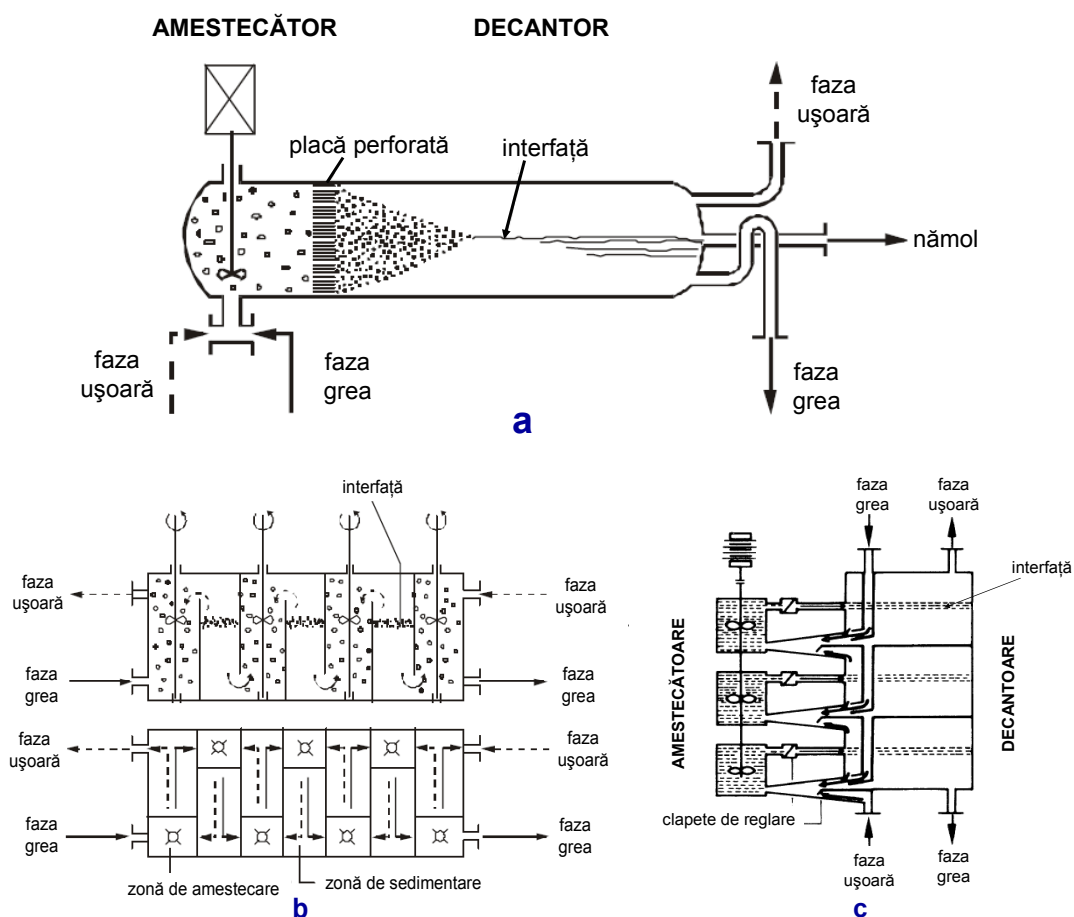


Figura 4.67. Instalație de extracție reactivă cu unități distincte amestecător – decantor (A – D): a – unitate cu o singură treaptă A – D [289]; b – cascadă orizontală de unități A – D [289]; c – cascadă verticală de unități A – D [290]

4.5.3.2. Extractoare tip coloană fără agitare mecanică

Când numărul treptelor de extracție este mai mare sunt preferate extractoarele de tip coloană. Acestea au avantajul unui necesar mai redus de solvent, pierderile de solvent sunt mai mici, iar spațiul necesar amplasării este de asemenea mai redus [279, 289]. Datorită timpului de staționare limitat, coloanele de extracție sunt utilizabile doar pentru procesele cu cinetică rapidă, când echilibrul se atinge în mai puțin de 1 minut [279].

Coloanele fără agitare (fig. 4.68) sunt simple; ele pot fi fără amenajări interioare (coloane cu pulverizare – fig. 4.68 a), cu umplutură (fig. 4.68 b) sau cu talere (fig. 4.68 c, d).

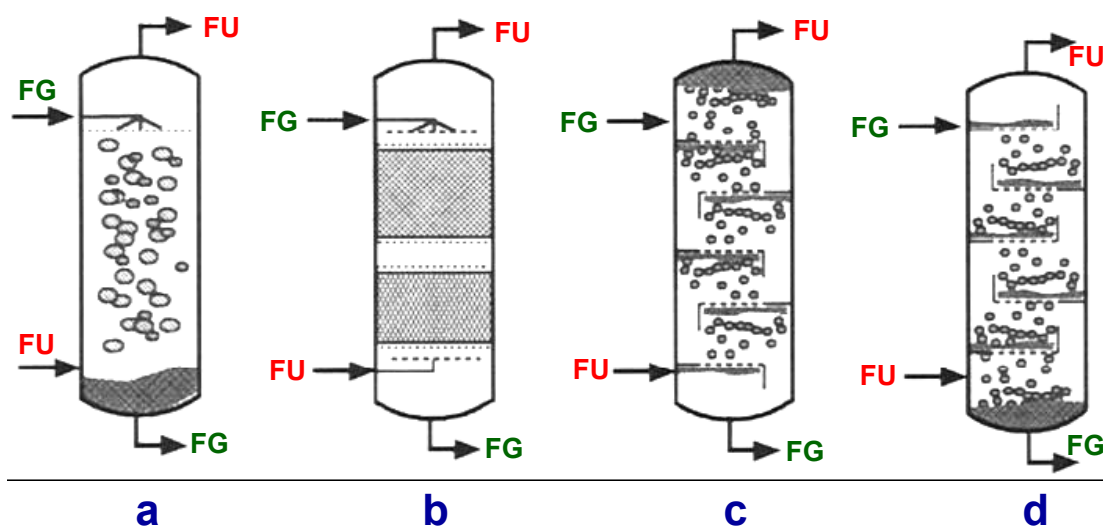


Figura 4.68. Extractoare tip coloană fără agitare mecanică: a – coloană cu pulverizare; b – coloană cu umplutură; c – coloană cu talere pentru dispersarea fazei ușoare; d – coloană cu talere pentru dispersarea fazei grele [279]
FG – faza grea; FU – faza ușoară

Coloana cu pulverizare, deși simplă și ieftină, are eficiența scăzută din cauza amestecării axiale puternice care apare în faza continuă datorită ascensiunii picăturilor prin aceasta. Pentru a contracara amestecarea axială, coloanele sunt prevăzute cu amenajări interioare, care au și rolul de a favoriza ruperea și coalescența picăturilor, îmbunătățindu-se astfel transferul de masă. De regulă se folosesc aceleași tipuri de umpluturi ca și în cazul distilării, cu toate că parametrii hidrodinamici sunt alții în cazul extracției. Performanțele extractorului cresc semnificativ când acesta este echipat cu corpuri de umplere cu suprafață specifică mare și fracție de goluri mică, sau cu umpluturi structurate [279].

4.5.3.3. Extractoare tip coloană cu agitare mecanică

În coloanele de extracție fără agitare, hidrodinamica dispersiei este controlată de către proprietățile fizice și de către debitele vehiculate prin coloană. Pentru o mai bună

flexibilitate în operare, este necesară decuplarea hidrodinamicii de debitul vehiculat. Acest lucru se realizează prin folosirea unor dispozitive de agitare mecanică (fig. 4.69).

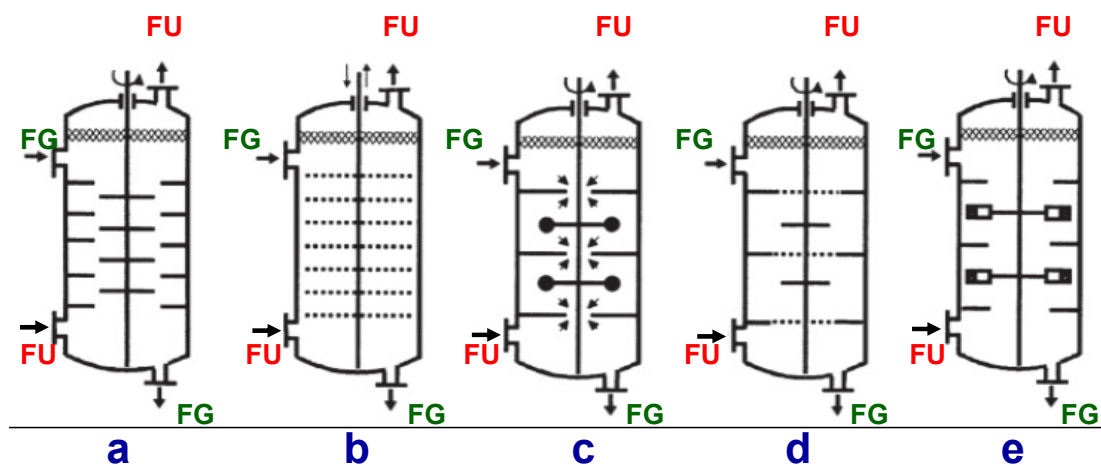


Figura 4.69. Extractoare tip coloană cu agitare mecanică [279]:

a – coloană cu discuri rotative; b – coloană Karr; c – coloană Oldshue-Rushton;
d – coloană Kühni; e – coloană Scheibel.

Agitarea mărește aria interfacială și viteza de rupere și coalescență a picăturilor, măbind eficiența transferului de masă în coloană. Prețul plătit este de regulă o ușoară scădere a capacității de producție și o proiectare, respectiv transpunere la scară, mai sofisticate. Majoritatea instalațiilor noi de extracție reactivă folosesc coloane cu agitare datorită flexibilității ridicate în operare: mărimea picăturilor se poate regla independent de debitele de alimentare, ceea ce duce la minimizarea pierderilor de solvent în condițiile menținerii eficienței.

4.5.3.4. Alte tipuri de extractoare

Extractoarele centrifugale se pretează la prelucrarea lichidelor cu particule solide de dimensiuni mici (lichide de fermentație, de ex.), cu capacitate de spumare ridicată și care necesită timpi de contact scurți. Pentru extracția reactivă a produselor de biosinteză se folosesc aceleași tipuri de extractoare centrifugale care au fost descrise în subcapitolul consacrat extracției fizice L – L (p. 78 – 83).

Extractoarele centrifugale prezintă avantajul unei bune separări a fazelor chiar în condițiile unei diferențe mici de densitate și la valori reduse ale tensiunii interfaciale. În centrifugele moderne în contracurent se pot atinge câteva trepte de echilibru într-un singur utilaj, ca rezultat al construcției interne a acestuia [291].

4.5.4. Extracția reactivă a produșilor de biosinteză

Până în prezent sunt cunoscute și aplicate cel puțin la nivel de laborator și pilot procedee de extracție reactivă din medii apoase a acizilor organici, aminoacizilor,

antibioticelor. Există cercetări intense pentru lărgirea domeniului de aplicabilitate al extracției reactive și la alte clase de compuși de biosinteză.

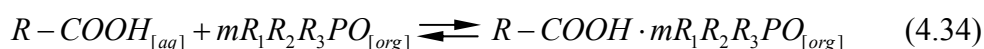
4.5.4.1. Extracția acizilor carboxilici

Acizii carboxilici sunt produse utilizate pe scară largă în industria chimică, farmaceutică și alimentară. Cu toate că obținerea lor pe cale fermentativă din resurse regenerabile este cunoscută de mai bine de un secol, marea majoritate a producției actuale de acizi carboxilici este bazată pe materii prime petroliere. Tehnologiile fermentative nu s-au impus încă datorită dificultății recuperării produselor finite.

Întrucât acizii carboxilici au valori extrem de reduse ale coeficienților de distribuție în solvenți organici (vezi tab. 4.1), nu este posibilă separarea lor prin extracție fizică L – L, ci numai prin extracție reactivă. Ca agenți de extracție se pot utiliza derivații organofosforici sau aminele cu masă moleculară mare [113].

4.5.4.1.1. Extracția acizilor carboxilici cu derivați organofosforici

La extracția acizilor carboxilici cu derivați organofosforici (esteri neutri sau fosfinoxizi) are loc solvatarea solutului din faza apoasă, respectiv stabilirea unor legături coordinative sau dipol-dipol între solut și extractant. La modul general, solvatarea poate fi descrisă de o ecuație de forma:



în care m reprezintă numărul de solvatare al acidului carboxilic. Constanta de echilibru (constanta de extracție) este dată de expresia:

$$K_{ex} = \frac{[R-COOH \cdot mR_1R_2R_3PO_{[org]}]}{[R-COOH_{[aq]}] \cdot [R_1R_2R_3PO_{[org]}]^m} \quad (4.35)$$

ea depinzând puternic de hidrofobicitatea acidului extras (tab. 4.18), dar și de bazicitatea extractantului. La extracția acizilor carboxilici din soluții apoase 0,1 M cu TBP nediluat la 25 °C, coeficienții de distribuție cresc în ordinea: acid tartric (0,6), acid malic (1,3), acid lactic (1,4), acid citric (2,0), acid maleic (3,6), acid succinic (5,7), acid propionic (8,4) [293, 294].

Tabelul 4.18. Constantele de echilibru la extracția unor acizi carboxilici cu TOPO dizolvat în hexan [295]

Acid carboxilic	K_{ex}	Acid carboxilic	K_{ex}
Acizi monocarboxilici		Acizi dicarboxilici	
Acid acetic	5,32	Acid succinic	21,2
Acid glicolic	0,67	Acid fumaric	174,5
Acid propionic	37,9	Acid malic	33,5
Acid lactic	1,19	Acid L-maleic	3,52
Acid piruvic	1,67	Acid itaconic	80,8
Acid butiric	51,9	Acid tartric	2,19
Acizi tricarboxilici			
Acid citric	19,61	Acid izocitric	32,7

Se poate concluziona că acizii monocarboxilici sunt mai ușor de extras decât cei dicarboxilici, iar prezența grupărilor OH în structura acidului micșorează puternic extractabilitatea acestuia [113].

În cazul derivaților organofosforici neutri, bazicitatea, respectiv eficiența extracției, cresc în ordinea [4]: tributilfosfat < dibutilfosfat < tributilfosfinoxid, respectiv cu creșterea numărului de legături directe C – P (tab. 4.19) [113].

Tabelul 4.19. Constantele de echilibru la extracția unor acizi carboxilici cu extractanți organofosforici [113]

Acid	Extractant	Solvent	T [°C]	Parametrii din ecuația (4.35)	
				K_{ex}	m
Propionic	TOPO	<i>n</i> -hexan	25	59,0	1
Succinic	TOPO	<i>n</i> -hexan	25	152,0	2
Malic	TBP	<i>n</i> -dodecan	20	0,11	2
Tartric	TBP	<i>n</i> -dodecan	20	0,04	2
Lactic	TBP	<i>n</i> -dodecan	20	0,26	-
Lactic	DEHPA	dietilbenzen	-	38,0	1
Citric	TBP	CCl ₄	25	0,04	3

Extracția reactivă a acizilor mono- și dicarboxilici cu TBP decurge cu randamente superioare extracției acizilor minerali, în condiții experimentale identice [295]. La extracția acizilor carboxilici cu TBP coeficientul de distribuție scade, inițial rapid, cu creșterea concentrației acidului în faza apoasă inițială (fig. 4.70). Efectul este mai pregnant la extracția cu soluții concentrate de TBP.

Utilizarea TBP prezintă și o serie de dezavantaje, cum ar fi viscozitatea ridicată și tendința de hidroliză în mediu acid la dibutilfosfat care este un puternic agent complexant [4].

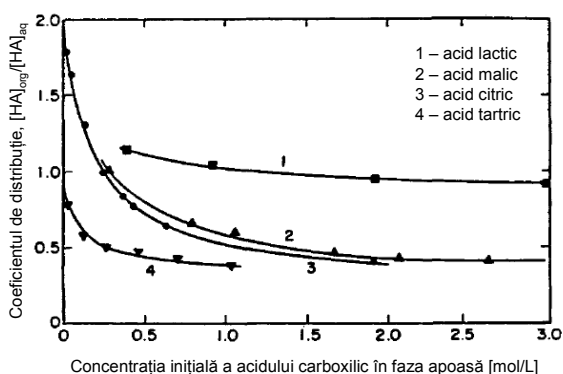


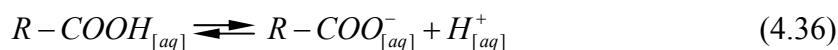
Figura 4.70. Distribuția acizilor carboxilici între apă și TBP nediluat în funcție de concentrația inițială a acidului în faza apoasă la echilibru la 20 °C [113]

4.5.4.1.2. Extracția acizilor carboxilici cu amine

În cazul extracției cu amine, mecanismul extracției depinde, printre altele, și de numărul grupărilor carboxilice din molecula acidului.

La extracția acizilor monocarboxilici cu un extractant aminic Q , în sistem se stabilesc următoarele echilibre succesive [296]:

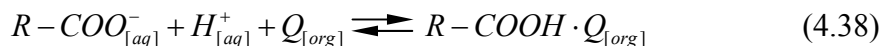
- disocierea acidului carboxilic în faza apoasă:



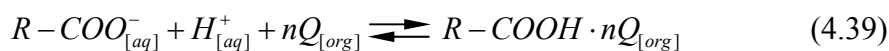
- extracția fizică a acidului carboxilic nedisociat:



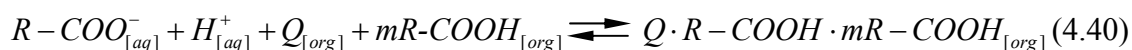
- extracția reactivă a acidului carboxilic prin formarea unui complex (o sare) cu amina la interfață:



- extracția reactivă cu formarea unor aducți aminici la interfață:



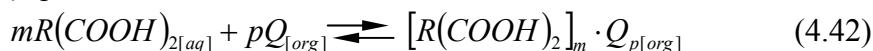
- extracția reactivă cu formarea unor aducți acizi la interfață:



- dimerizarea sării în faza organică:

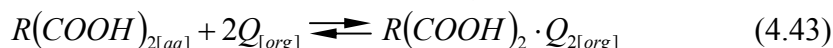


La extracția acizilor dicarboxilici au loc reacții similare, expresia generală a echilibrului la interfață putându-se scrie sub forma:



În funcție de raportul molar solut – extractant se disting trei tipuri de reacții interfaciale prin care decurge extracția reactivă:

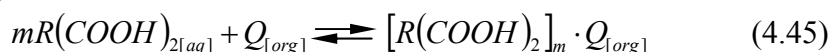
- la valori $m \ll p$ are loc formarea de săruri în faza organică:



- la valori $m \sim p$ la formarea complexului hidrofob solutul și extractantul vor participa în proporție echimoleculară:



- la valori $m \gg p$, există posibilitatea apariției celei de-a treia faze, o emulsie stabilă, cu un conținut ridicat de complecși acizi, insolubili atât în faza apoasă, cât și în faza organică:



În scopul separării rapide a emulsiei create de apariția celei de-a treia faze, în solventul organic se adaugă un modificador de fază (alcool alifatic cu catenă lungă, uzual n sau i -decanol), component care mărește solubilitatea complexului în faza de extract. Dacă solventul este nepolar, poate acționa el însuși ca modificador de fază [4].

În cazul acizilor policarboxilici sunt posibile aceleași reacții interfaciale ca și în cazul acizilor dicarboxilici. Dacă structura acizilor este voluminoasă, în faza organică se vor forma în special săruri de amoniu, prin legarea parțială sau totală a grupărilor carboxil de către extractanți [4].

Regenerarea extractantului și eliberarea solutului se realizează prin tratarea fazei organice cu o soluție apoasă bazică: NaOH, KOH, Na₂CO₃, K₂CO₃ etc.

Utilizarea unor săruri cuaternare de amoniu poate conduce la modificarea mecanismului reacției interfaciale, procesul decurgând prin schimb ionic:



Procesul de extracție reactivă a acizilor carboxilici cu amine, respectiv gradul de extracție, este influențat de numeroși factori, cei mai importanți fiind natura și concentrația extractantului, tipul diluantului, natura și concentrația inițială a acidului, temperatură, pH, precum și o serie de condiții de operare, cum ar fi durata și viteza agitării, durata separării fazelor, raportul fazic apos : organic etc. În cazul extracției cu săruri cuaternare de amoniu gradul de extracție depinde și de dimensiunea anionului organic, care controlează hidrofobicitatea complexului interfacial format.

Coeficienții de distribuție ai acizilor carboxilici între faza apoasă și faza organică cu conținut de amină depind de hidrofobicitatea acidului carboxilic, bazicitatea aminei, polaritatea solventului și concentrației inițiale a acidului în faza apoasă (tab. 4.20).

Tabelul 4.20. Coeficienți de distribuție (K_N) ai unor acizi carboxilici la extracția cu amine în diferiți solvenți organici [4]

Acid acetic			Acid citric		
Extractant	Solvent	K_N^*	Extractant	Solvent	K_N^*
Amberlite LA-1	Chevron 25	1,27 – 2,26	Alamine 336	<i>n</i> -hexan	0,2 – 2,9
	cloroform	4,48		parafine + MIBC	0,63 – 9,6
Amberlite LA-2	Chevron 25	3,82 – 4,48		toluen	1,4 – 10,8
	cloroform	9,86		acetat de etil	2,5 – 23,0
Adogen 283-D	2-heptanonă	3,46 – 9,65		MIBC	3,1 – 27,5
	cloroform	32,11		2-etilhexanol	2,1 – 70,0
Adogen 381	2-heptanonă	1,72		alcool <i>i</i> -amilic	2,7 – 87,8
	cloroform	7,79		<i>n</i> -butanol	3,1 – 168,3
Adogen 364	2-heptanonă	1,98	Tri-dodecilamină	toluen	0,55 – 6,0
	cloroform	9,69		MIBC	4,8 – 34,0
Adogen 368	2-heptanonă	1,83		cloroform	17,7 – 136
	cloroform	8,23		2-etilhexanol	31,7 – 177,0
Adogen 363	2-heptanonă	1,58	* - intervalul de valori corespunde reducerii concentrației inițiale a acidului în faza apoasă		
	cloroform	7,82			
Alamine 366	2-heptanonă	2,24			
	cloroform	9,68			
Metil-di-tridecil amina	metil- <i>i</i> -amil cetonă	3,54			

Modificarea valorilor coeficienților de distribuție ai unor acizi carboxilici la extracția cu săruri cuaternare de amoniu este redată în fig. 4.71 și 4.72. Se poate constata că valoarea K_N , deci și eficiența extracției crește cu creșterea numărului de atomi de carbon din molecula acidului, deci cu creșterea hidrofobicității acestuia, dar în mod paradoxal scade cu creșterea pH-ului soluției apoase. Acest lucru este pus pe seama modificării mecanismului de extracție în prezența sării cuaternare de amoniu [297].

Există numeroase cercetări care încearcă să elucideze multiplele aspecte ale extracției reactive a acizilor carboxilici cu amine cu masă moleculară mare. Majoritatea acestora sunt efectuate cu soluții sintetice de acizi carboxilici, având drept scop studierea fie a echilibrului în diverse sisteme, fie a cineticii extracției reactive. Alte studii se ocupă cu modelarea matematică a procesului, în vederea stabilirii unor modele utilizabile pentru optimizarea procesului sau pentru proiectarea echipamentelor de extracție.

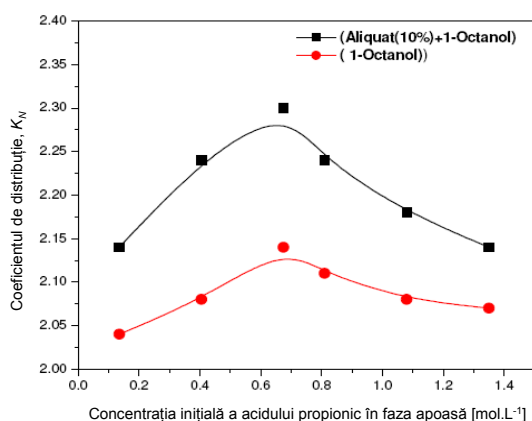


Figura 4.71. Variația coeficientului de distribuție al acidului propionic cu concentrația sa inițială în faza apoasă [298]

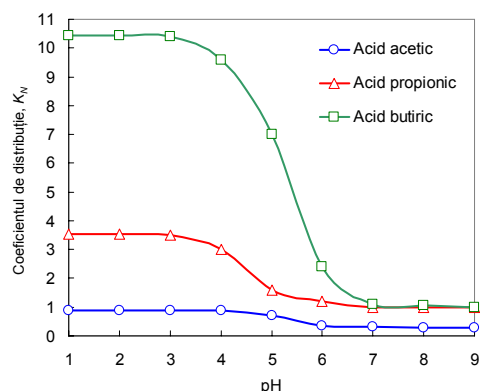


Figura 4.72. Variația coeficienților de distribuție ai unor acizi carboxilici cu pH-ul fazei apoase la extracția cu TOMAC [299]

Punerea în practică la nivel industrial a proceselor de extracție reactivă se lovește de două dificultăți majore: (i) procesele de fermentare conduc la obținerea unui amestec de acizi carboxilici care trebuie separați; (ii) în lichidul de fermentație, pe lângă acizii carboxilici se găsesc și alte produse secundare, nutrienți neconsumați, care îngreunează procesul de extracție.

În tab. 4.21 sunt prezentate comparativ rezultatele obținute la extracția reactivă a acidului lactic cu TOA în *i*-decanol din soluții sintetice, respectiv din lichid de fermentație [300]. Se poate constata că în cazul lichidului de fermentație, gradul de extracție a acidului lactic a fost de trei ori mai redus decât în cazul extracției din soluții sintetice.

Tabelul 4.21. Rezultate ale extracției acidului lactic cu TOA în *i*-decanol la 5 °C [300]

Parametrul	Extracție din:	
	soluții model	lichid de fermentație
pH inițial	2,50	2,50
pH la echilibru	3,83	5,27
% Acid lactic în faza apoasă inițial	2,45	2,27
% Acid lactic în faza apoasă la echilibru	0,24	1,61
% Acid lactic în faza organică la echilibru	4,92	1,54
Coeficient de distribuție, K_N	20,27	0,96
Randament de extracție, %	90,32	29,49

Întrucât structura compușilor formați între acizii carboxilici și aminele utilizate ca extractanți depinde atât de numărul grupărilor carboxilice din molecula acidului, cât și de raportul molar acid/amină utilizat la extracție există posibilitatea separării selective a acizilor carboxilici prin extracție reactivă. Dacă extracția decurge prin mecanismul formării perechilor ionice, separarea acizilor carboxilici este posibilă dacă valorile constantelor de aciditate ale acestora diferă cu cel puțin un ordin de mărime (respectiv valoarea pK_a diferă cu cel puțin o unitate) [301]. Valorile pK_a pentru acizii carboxilici întâlniți în procesele fermentative sunt redată în tab. 4.22.

Tabelul 4.22. Valorile constantelor de disociere, pK_a , ale unor acizi carboxilici la 25 °C [113]

Acidul	Structură	pK_a
Propionic (propanoic)	CH_3-CH_2-COOH	4,85
Lactic (2-hidroxi-propanoic)	$CH_3-CH(OH)-COOH$	3,86
Piruvic (2-oxo-propanoic)	$CH_3-CO-COOH$	2,49
Succinic (butandioic)	$HOOC-CH_2-CH_2-COOH$	4,20 ; 5,64
Fumaric (<i>trans</i> -butendioic)	$HOOC-CH=CH-COOH$	3,02 ; 4,38
Maleic (<i>cis</i> -butendioic)	$HOOC-CH=CH-COOH$	1,93 ; 6,14
Malic (hidroxi-butandioic)	$HOOC-CH_2-CH(OH)-COOH$	3,22 ; 4,70
Itaconic (2-metilen-butandioic)	$HOOC-CH_2-(C=CH_2)-COOH$	3,65 ; 5,13
Tartric (2,3-dihidroxi-butandioic)	$HOOC-CH(OH)-CH(OH)-COOH$	3,01 ; 4,38
Citric (2-hidroxi-propan-1:2:3-tricarboxilic)	$HOOC-CH_2-(C(OH)(COOH)-CH_2-COOH)$	3,13 ; 4,76 ; 6,40
Izocitric (1-hidroxi-propan-1:2:3-tricarboxilic)	$HOOC-CH_2-(CH-COOH)-CH(OH)-COOH$	3,29 ; 4,71 ; 6,40

La fermentația citrică, pe lângă acidul citric aflat în concentrație de aproximativ 50 g/L, în lichidul de fermentație mai există și acizii dicarboxilici malic și succinic (circa 4 g/L). La extracția cu Amberlite LA-2 în acetat de butil, reacția (4.39) duce la formarea unor aducți de tip $R(COOH)_2 \cdot Q_2$ în cazul acizilor succinic și malic, respectiv $R(COOH)_3 \cdot Q$ în cazul acidului citric. Dacă extractantul este deficitar stoichiometric față de conținutul total de acizi din lichidul de fermentație (raport molar acizi dicarboxilici : extractant = 1), gradul de extracție al acizilor malic și succinic este de 95%, în timp ce gradul de extracție al acidului citric este de numai 4%. Adăugarea 2-octanolului ca modificador de fază mărește și mai mult diferența dintre gradele de extracție ale celor două grupe de acizi [4].

Încercări similare, pe soluții sintetice de acid tartric (5 g/L), malic (2g/L) și citric (0,25 g/L), tot cu Amberlite LA-2 ca extractant și acetat de butil ca solvent, s-a reușit separare selectivă a acidului tartric de ceilalți acizi carboxilici (fig. 4.73). Metoda poate fi aplicată pentru recuperarea acidului tartric din produsele secundare rezultate în procesul de vinificație [302].

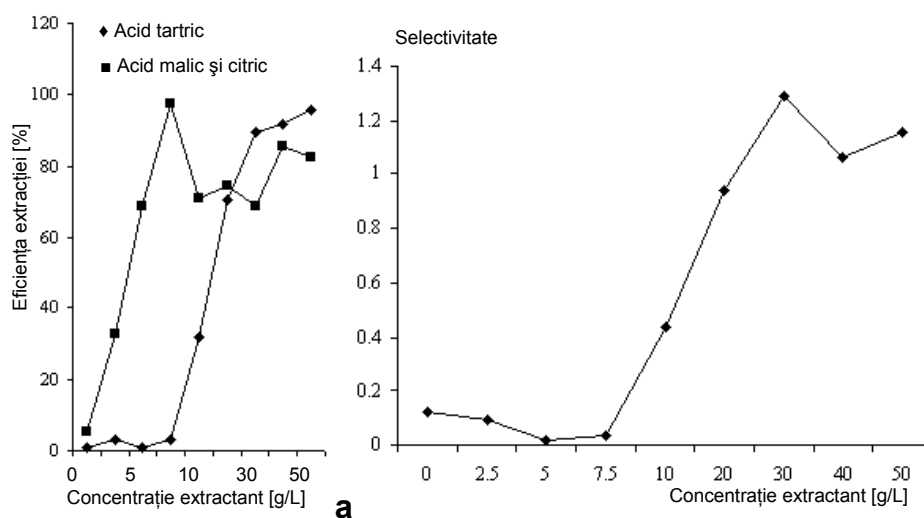


Figura 4.73. Variația gradului de extracție (a) și a selectivității (b) la extracția acizilor carboxilici cu Amberlite LA-2 în acetat de butil [303]

Capitolul 4 – Separarea prin extracție

La obținerea acidului lactic prin fermentare, în mediul de cultură se pot adăuga o serie de acizi organici, cu scopul creșterii productivității tulpinii. Acești acizi (citric, acetic) trebuie separați de acidul lactic din lichidul final de fermentație. A fost studiată extracția reactivă selectivă a acizilor acetic și lactic cu un extractant fosfinoxidici și aminici comerciali (Cyanex 923, respectiv Hostarex A 327) în acetat de butil și kerosen. Acidul citric a fost extras doar într-o proporție redusă (55% cu Cyanex 923, 75% cu Hostarex A 327). Reextracția s-a realizat cu HCl, procesul fiind selectiv pentru acidul lactic. Randamentul global de separare al acidului lactic a fost modest: 22% cu Cyanex 923, respectiv 37% cu Hostarex A 327 [304].

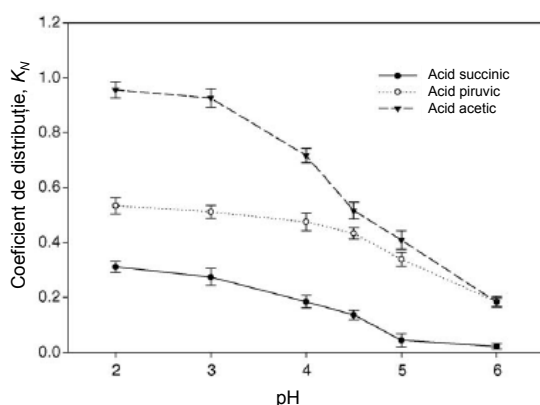


Figura 4.74. Efectul pH-ului asupra coeficientului de distribuție al acizilor carboxilici [308]

(extractant: 0,25 mol/kg TOA în 1-octanol la 25 °C; concentrația inițială a acizilor în lichidul de fermentație: acid succinic – 22,3 g/L; acid piruvic – 7,0 g/L, acid acetic – 1,8 g/L)

de distribuție al acidului succinic este sub 0,1 (fig. 4.74). În tab. 4.23 este prezentată compoziția fazei lichide în diverse etape ale procesului de extracție.

Extracția selectivă a acidului succinic din lichidul de fermentație care conține și alți acizi carboxilici se poate realiza cu eficiență și selectivitate ridicată folosind ca extractant TOA. Aceasta extrage cu precădere acizii acetic, piruvic și sărurile acestora [305, 306]. Recent a fost pus la punct un procedeu de recuperare a acidului succinic produs de un microorganism recombinant, *Mannheimia succiniciproducens*, prin extracție reactivă, distilare la vid și cristalizare. Procedul permite obținerea de acid succinic 99,76% puritate cu un randament global de 73,09% [307]. Separarea impurificatorilor (acid acetic, acid piruvic) se realizează prin extracție în mai multe etape cu TOA (0,25 mol/kg) în 1-octanol la pH = 5, când coeficientul

Tabelul 4.23. Evoluția compoziției fazei lichide în procesul de extracție [308]

Component	Lichidul de fermentație	După etapa de extracție		
		1	2	3
Acid succinic	32,2	34,8	35,2	35,6
Acid maleic	2,3	0,3	0,3	0,3
Acid acetic	2,6	1,6	1,4	1,1
Acid piruvic	10,1	8,0	7,1	6,6
Acid fumaric	1,2	0,1	0,1	0,1
Glucoză	49,4	53,6	54,3	54,9
Alte componente	2,2	1,7	1,6	1,4
Total SU	100,00	100,00	100,00	100,00

Notă: Compoziția este exprimată în procente masice de component raportat la total substanță uscată (SU)

Deși există numeroase eforturi pentru dezvoltarea tehnologiilor de extracție reactivă a acizilor carboxilici, fiind patentate zeci de variante, la scară industrială este certă aplicarea unui singur procedeu, extracția acidului citric cu o amină terțiară, urmată de reextracție cu apă la temperatură ridicată [309].

4.5.4.2. Extracția aminoacizilor

Aminoacizii, care sunt componenții structurali de bază ai proteinelor și enzimelor, se pot obține prin biosinteză sau prin hidroliza proteinelor. Ca și în cazul altor produse de biosinteză, problema dificilă o reprezintă separarea aminoacizilor din lichidul de fermentație sau din hidrolizatul proteic.

Cei 20 de aminoacizi esențiali, care se găsesc în proteinele naturale, pot fi clasificați în funcție de polaritatea radicalului R pe care sunt grefate grupările amino și carboxil în aminoacizi: (i) cu radical R alifatic nepolar; (ii) cu radical R aromatic; (iii) cu radical R polar, neutru electric; (iv) cu radical R polar, încărcat pozitiv; (v) cu radical R polar, încărcat negativ. În tab. 4.24 sunt prezentate câteva dintre proprietățile aminoacizilor esențiali [310].

Tabelul 4.24. Clasificarea și unele proprietăți ale aminoacizilor esențiali [310]

Aminoacid	Abreviere	Simbol	Valori pK_a			pI	Indice hidro- patic *
			pK_I (-COOH)	pK_2 (-NH ₃ ⁺)	pK_R (-R)		
(i) Cu radical R alifatic nepolar							
Glicină	Gly	G	2,34	9,0		5,97	-0,4
Alanină	Ala	A	2,34	9,69		6,01	1,8
Prolină	Pro	P	1,99	10,96		6,48	1,6
Valină	Val	V	2,32	9,62		5,97	4,2
Leucină	Leu	L	2,36	9,60		5,98	3,8
Izoleucină	Ile	I	2,36	9,68		6,02	4,5
Metionină	Met	M	2,28	9,21		5,74	1,9
(ii) Cu radical R aromatic							
Fenilalanină	Phe	F	1,83	9,13		5,48	2,8
Tirozină	Tyr	Y	2,20	9,11	10,07	5,66	-1,3
Triptofan	Trp	W	2,38	9,39		5,89	-0,9
(iii) Cu radical R polar, neutru electric							
Serină	Ser	S	2,21	9,15		5,68	-0,8
Treonină	Thr	T	2,11	9,62		5,87	-0,7
Cisteină	Cys	C	1,96	10,28	8,18	5,07	2,5
Asparagină	Asn	N	2,02	8,80		5,41	-3,5
Glutamină	Gln	Q	2,17	9,13		5,65	-3,5
(iv) Cu radical R polar, încărcat pozitiv							
Lizină	Lys	K	2,18	8,95	10,53	9,74	-3,9
Histidină	His	H	1,82	9,17	6,00	7,59	-3,2
Arginină	Arg	R	2,17	9,04	12,48	10,76	-4,5
(v) Cu radical R polar, încărcat negativ							
Aspartat	Asp	D	1,88	9,60	3,65	2,77	-3,5
Glutamat	Glu	E	2,19	9,67	4,25	3,22	-3,5

* - pe o scală care combină hidrofobicitatea și hidrofilicitatea grupărilor R; poate fi utilizat pentru măsurarea tendinței unui aminoacid de a trece într-un mediu apos (valori negative) sau unul hidrofob (valori pozitive)

Datorită structurii lor amfionice, aminoacizii se găsesc în soluție apoasă sub diferite forme ionice (cation, amfion, anion), în funcție de valoarea pH-ului (fig. 4.75). Extracția acestor compuși nu poate fi realizată decât prin utilizarea unor extractanți, cei

mai utilizați fiind derivații acizilor organofosforici [311], aminele cu masă moleculară mare [92, 301], eterii-coroană [312 - 314].

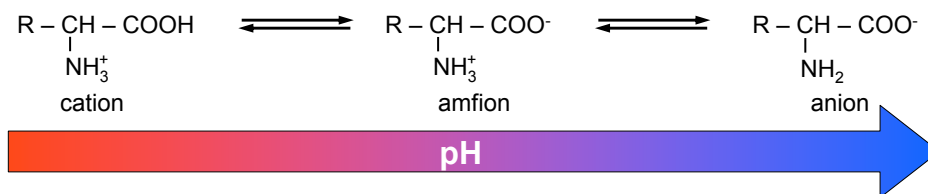
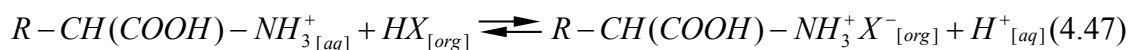


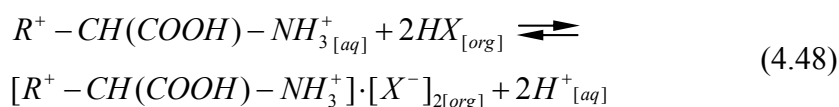
Figura 4.75. Structuri ionice ale aminoacizilor în funcție de pH-ul soluției apoase

4.5.4.2.1. Extracția aminoacizilor cu derivați organofosforici

La extracția aminoacizilor cu D2EHPA, în sistem se stabilește următorul echilibru interfacial, extracția decurgând prin schimb ionic [311]:



Dacă aminoacidul este bazic, la valori pH scăzute el există ca dianion, astfel încât echilibrul de extracție se poate scrie:



Separarea aminoacizilor cu D2EHPA este posibilă doar dacă aceștia se găsesc în faza apoasă în formă cationică. Acest lucru este posibil doar la valori pH mai mici decât valoarea pH-ului izoelectric. O valoare prea mică a pH-ului conduce însă la protonarea extractantului, acesta nemaiputând lega cationul aminoacidului. Ca urmare, va exista un domeniu optim de pH pentru extracția aminoacizilor. Acest domeniu, în care gradul de extracție este maxim, este redat, pentru câțiva aminoacizi, în diagramele din fig. 4.76.

În afară de valoarea pH-ului, extracția aminoacizilor este influențată și de concentrația extractantului, a substanțelor tensioactive existente în sistem, de intensitatea amestecării etc.

Atât în cazul biosintezei, cât și în cazul hidrolizei proteinelor, se obțin amestecuri de aminoacizi, a căror separare este mai dificilă. La biosinteza fenilalaninei se formează și triptofan, a cărui comportare este similară cu cea a fenilalaninei. Prezența triptofanului în masa de reacție determină reducerea coeficientului de distribuție al fenilalaninei, comparativ cu extracția din sisteme pure [4]. Cercetări experimentale au arătat că separarea selectivă a aminoacizilor din amestecuri, este posibilă doar pentru grupe de aminoacizi. Se pot separa aminoacizii în funcție de aciditatea acestora, prin extracție cu D2EHPA, la diverse valori ale pH-ului fazei apoase (fig.4.77). Întrucât gradul de extracție într-o singură treaptă este redus, este necesară utilizarea mai multor trepte de extracție (tab. 4.25).

În procesele de fabricare industrială a aminoacizilor, extracția reactivă nu s-a impus deocamdată. Sunt folosite cu precădere procesele de separare bazate pe schimb ionic (cromatografie de schimb ionic, cromatografie de excluziune) urmate de cristalizare [315].

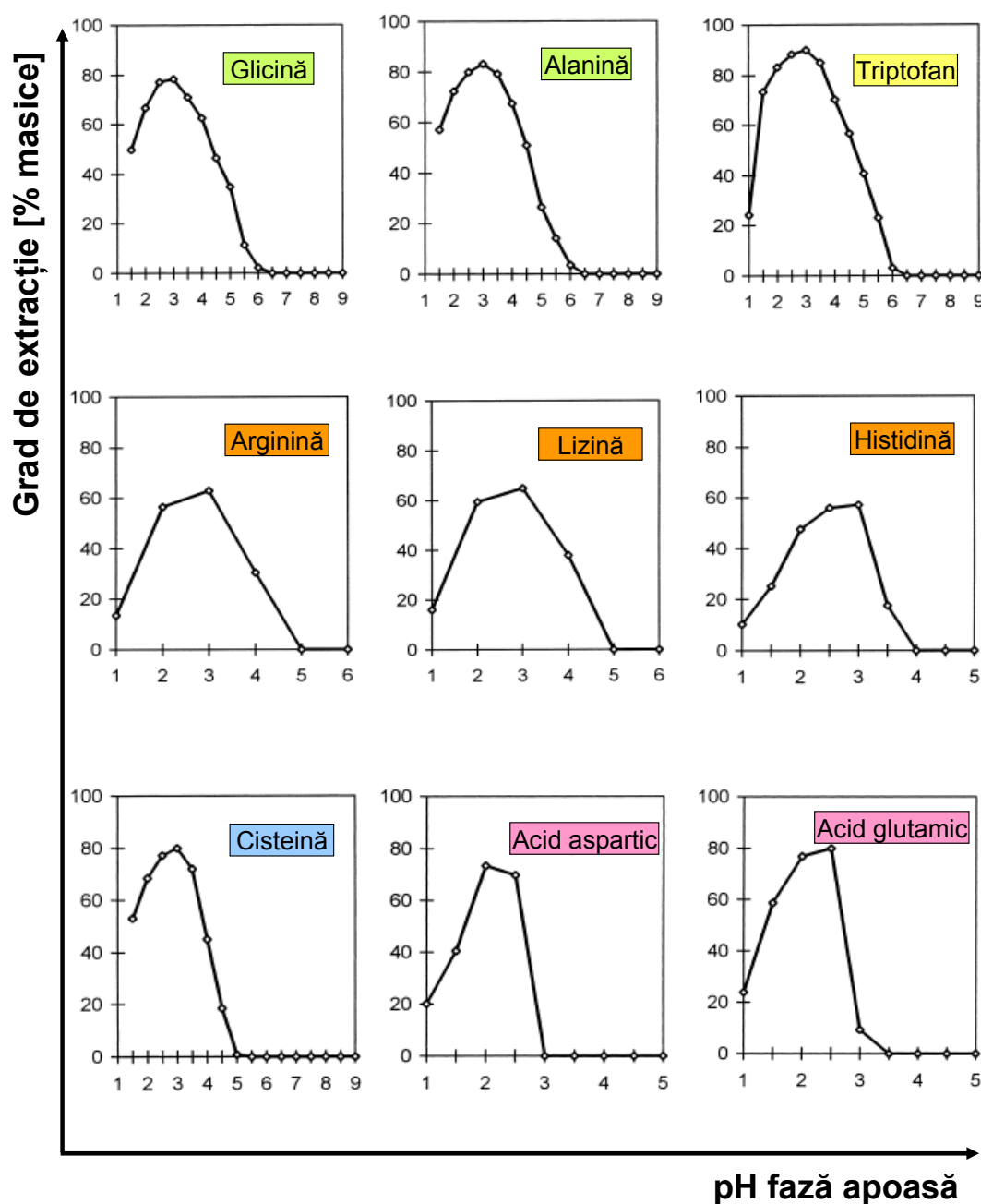


Figura 4.76. Efectul valorii pH-ului soluției apoase asupra gradului de extracție al aminoacizilor cu D2EHPA în acetat de butil [316]

Tabelul 4.25. Condiții de separare selectivă a unor grupe de aminoacizi din amestec prin extracție reactivă cu D2EHPA în acetat de butil [316]

Grupa de aminoacizi extrași	Interval de pH	Grad de extracție într-o treaptă [% masice]	Număr de trepte necesar
Aminoacizi neutri*	5,0 – 5,5	20 – 25	9
Aminoacizi bazici**	4,0 – 4,5	18 – 25	10
Histidină	3,0 – 3,5	40	5
Aminoacizi acizi	2,0 – 2,5	60 – 63	3

* - fără cisteină; ** - cu cisteină, fără histidină

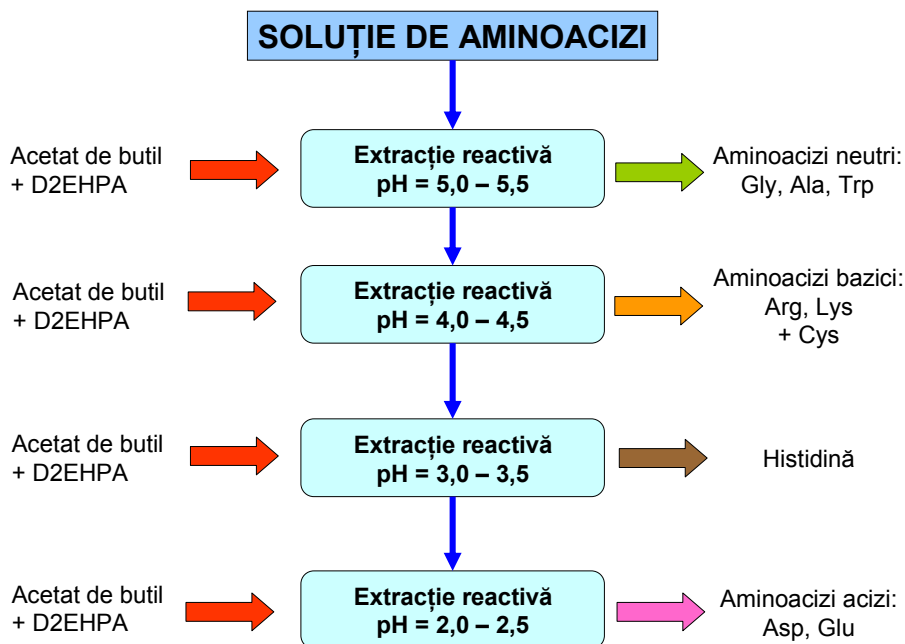


Figura 4.77. Schemă de principiu pentru extracția selectivă a aminoacizilor dintr-un amestec cu D2EHPA în acetat de butil [316]

Pentru o serie de extractanți acizi dizolvați în toluen, capacitatea de extracție scade în ordinea:

arginină > fenilalanină > alanină > glicină > acid aspartic

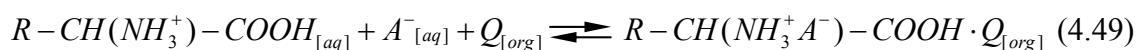
cu observația că la valori pH scăzute, la extracția cu D2EHPA și D2EHPA(S) se inversează ordinea între arginină și fenilalanină. Capacitatea de extracție a extractanților scade în ordinea:

DNNSA¹ > D2EHPA(S) > D2EHPA > Versatic 10

adică în ordinea inversă a valorilor constantelor lor de disociere, pK_a [317].

4.5.4.2.2. Extracția aminoacizilor cu amine

În cazul extracției cu amine, la interfață se formează perechi ionice hidrofobe, între aminoacidul protonat, un anion din faza apoasă și extractantul din faza organică:



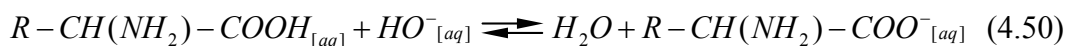
Pentru ca aminoacidul să fie protonat, trebuie ca pH-ul fazei apoase să fie mai mic decât pH-ul punctului izoelectric (pI) al aminoacidului respectiv.

Reextracția aminoacidului și regenerarea aminei se realizează prin tratarea fazei organice cu o soluție de carbonat de sodiu.

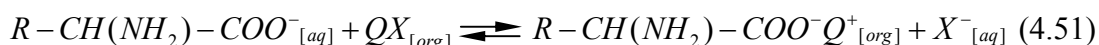
¹ DNNSA – acid dinonilnaftalensulfonic; D2EHPA(S) – acid di(2-etilhexil)monotiofosforic; D2EHPA – acid di(2-etilhexil)fosforic; Versatic 10 – acid neodecanoic, R₁R₂CH₃COOH

Când extracția are loc cu săruri de amoniu, aminoacidul trebuie să se găsească sub formă anionică. Acest lucru se întâmplă atunci când pH-ul fazei apoase este mai mare decât pH-ul punctului izoelectric (pI) al aminoacidului respectiv. În aceste condiții, în sistem se stabilesc următoarele echilibre:

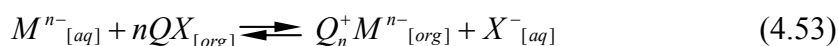
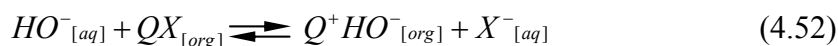
- disocierea aminoacidului în faza apoasă:



- extracția reactivă a anionului aminoacidului printr-o reacție de schimb ionic la interfață:



- coextracția anionului OH^- sau a altui anion mineral (clorură, sulfat, fosfat etc.) prezent în soluția apoasă:



Reextracția aminoacidului se realizează prin tratarea fazei organice cu o soluție apoasă de acid clorhidric.

Concentrația ionilor de hidrogen din faza apoasă este hotărâtoare pentru eficiența extracției, aceasta determinând forma ionică a aminoacidului. Astfel, acidul glutamic (pI = 3,22) poate fi extras cu amina secundară Amberlite LA-2 doar la pH < 3,22, în timp ce acidul aspartic (pI = 2,77) poate fi extras cu o sare cuaternară de amoniu doar la pH > 2,77. Se poate constata faptul că la pH = pI extracția aminoacizilor cu amine sau săruri cuaternare de amoniu nu este posibilă (fig. 4.78).

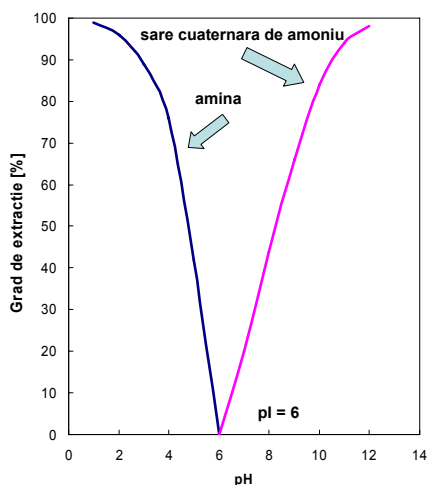


Figura 4.78. Influența pH-ului fazei apoase asupra gradului de extracție al aminoacizilor

La extracția aminoacizilor cu săruri cuaternare de amoniu, la valori ridicate ale pH-ului fazei apoase, este posibilă extracția în paralel a anionilor existenți în lichidul de fermentație (sulfat, fosfat, carbonat), lucru care poate duce la reducerea eficienței extracției. Chiar dacă acești anioni sunt îndepărtați din lichidul de fermentație anterior extracției, coextracția ionului OH^- nu poate fi evitată.

Pentru separarea aminoacizilor sau a sărurilor acestora din lichidul de fermentație se pot utiliza extractanți acido-bazici cuplați, așa-numiții extractanți ABC, alcătuiți dintr-un schimbător de cationi lichid (uzual un derivat organic al acidului fosforic) și un schimbător de anioni lichid (o amină cu masă moleculară mare), care acționează simultan. Acești agenți

de extracție, utilizați inițial pentru recuperarea unor săruri minerale ($MgCl_2$, $ZnSO_4$, $LiCl$ etc.) din soluții apoase [318, 319], au fost propuși ulterior și pentru recuperarea acizilor minerali tari [320] și a acizilor carboxilici [321].

De exemplu, valina se poate extrage dintr-o soluție apoasă având inițial 70 g/L aminoacid folosind ca extractant ABC un amestec conținând 0,5 mol/L Alamină 336, 0,5 mol/L D2EHPA și 30% octanol într-un solvent organic. Extracția se realizează la temperatura ambiantă, cu un raport $[aq] : [org] = 5 : 1$. După 7 trepte de extracție, gradul de recuperare al valinei este de peste 90%, obținându-se un extract organic cu 13,1 g/L valină. De aici aminoacidul se reextrage cu apă, la temperatură ambiantă, folosind un raport $[aq] : [org] = 1 : 2,3$. După 5 trepte de extracție, aminoacidul se extrage practic cantitativ, rezultând o soluție apoasă cu 30 g/L valină. În mod similar se pot extrage și alți aminoacizi, dar și săruri ale acestora, cum ar fi clorhidratul de lizină sau monoglutamatul de sodiu [322].

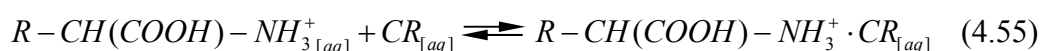
4.5.4.2.3. Extracția aminoacizilor cu eteri-coroană și calixarene

Eterii-coroană pot extrage aminoacizii din soluții apoase acide ($pH < pI$), în care aceștia se găsesc sub formă cationică. Procesul de extracție are loc prin mecanismul perechilor ionice [cationul aminoacidului se cuplează cu un contraion (A^-)] în conformitate cu următorul mecanism [4]:

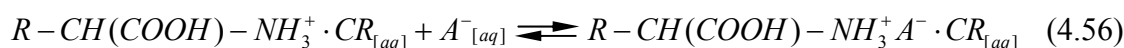
- transferul extractantului (eterul-coroană CR) în faza apoasă:



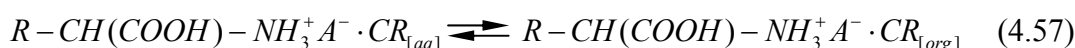
- reacția extractantului cu cationul aminoacidului, în faza apoasă:



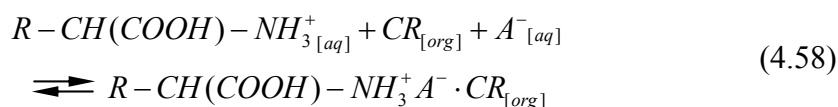
- reacția complexului cationic cu contraionul, în faza apoasă:



- transferul perechii ionice complex cationic – contraion în faza organică:



Acidul HA care trebuie să furnizeze contraionul A^- este ales astfel încât valoarea pK_a să fie apropiată de cea a aminoacidului. Procesul global de extracție poate fi descris de ecuația:



constanta de extracție fiind dată de expresia:

$$K_{ex} = \frac{[R-CH(COOH)-NH_3^+ A^- \cdot CR_{[org]}]}{[R-CH(COOH)-NH_3^+_{[aq]}] \cdot [A^-_{[aq]}] \cdot [CR_{[org]}]} \quad (4.59)$$

Pentru extracția unor aminoacizi cu eter 18-coroană-6 în 1,2-diclorețan, valorile K_{ex} sunt redată în tab. 4.26. Compoziția molară a complexului extras este de 1 : 1 : 1 (cation : extractant : anion). Constanta de extracție depinde de masa moleculară a aminoacidului (cu cât acesta este mai hidrofob, cu atât K_{ex} este mai mare); dependența nu este suficient de puternică pentru a realiza separarea selectivă a aminoacizilor. O separare selectivă se poate realiza prin modificarea pH-ului fazei apoase.

Tabelul 4.26. Constantele de extracție ale unor aminoacizi cu eter 18-coroană-6 în 1,2-diclorețan [4]

Aminoacid	$\lg K_{ex}$	Aminoacid	$\lg K_{ex}$
D,L – triptofan	5,01	L-izoleucină	4,90
L – leucină	5,78	L – valină	4,34
L – fenilalanină	5,12	L – α -alanină	4,34
L – metionină	4,62	L – cisteină	3,24

Tot din soluții apoase acide se pot extrage la temperatura camerei la pH = 1,5 – 4,0 triptofanul, glicina, alanina, leucina, iar la pH = 1,5 – 5,5 lizina și arginina, folosind ca extractant eterul dicitlohexil-18-coroană-6 dizolvat într-un lichid ionic, BmimPF₆ (hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazoliu). Eficiența extracției este de 92 – 96%, atât pentru aminoacizii hidrofilii, cât și pentru cei mai puțin hidrofilii. Raportul molar între aminoacid și eterul-coroană în complexul format este de 1:1 în cazul aminoacizilor monocarboxilici și de 1:2 în cazul aminoacizilor dicarboxilici. Procesul este influențat de Ph, concentrația aminoacizilor, concentrația eterului-coroană, precum și de raportul fazic [aq]:[org]. Sistemul de extracție a fost testat cu succes și pentru recuperarea aminoacizilor din lichidul de fermentație [323].

Pentru separarea unor produse de biosinteză au fost sintetizați extractanți din clasa polisiloxanilor pe care au fost grefați eteri-coroană. Acești derivați au fost utilizați pentru extracția selectivă a compușilor care conțin grupări aminice protonate, din amestecuri de amine secundare și terțiare (separarea norcodeinei) [4].

Derivații guanidinici biciclici cu grupare puternic hidrofobă silil-eter, pe care se grefează eteri-triaza-coroană, dizolvați în diclor metan prezintă o capacitate sporită de complexare și extracție pentru fenilalanină, triptofan, leucină și glicină, permițând separarea acestora de serină, lizină și acid glutamic (fig. 4.79) [324].

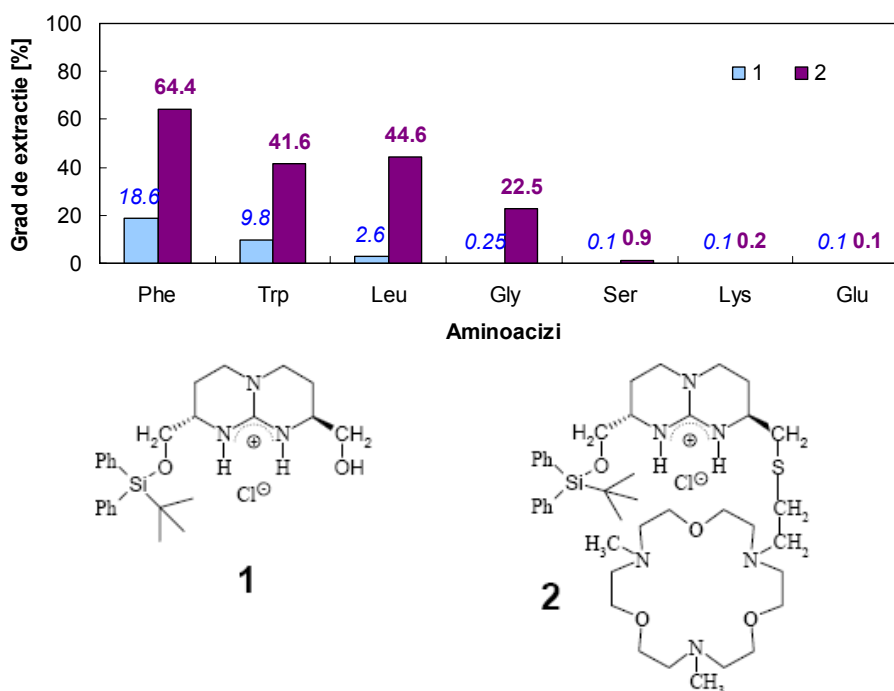


Figura 4.79. Extracția aminoacizilor cu derivați guanidinici [324]

Tot pentru extracția aminoacizilor nepolari au fost sintetizați extractanți alcătuiți din două subunități: una pe bază de eter-coroană pentru legarea ionului amoniu, alta pe bază de derivat de uree, pentru legarea grupării carboxil (fig. 4.80 a). Un astfel de extractant dizolvat în cloroform extrage aminoacizii nepolari în ordinea:



extracția aminoacizilor polari (Ser, Asp, His, Tyr) fiind practic neglijabilă în acest sistem [325].

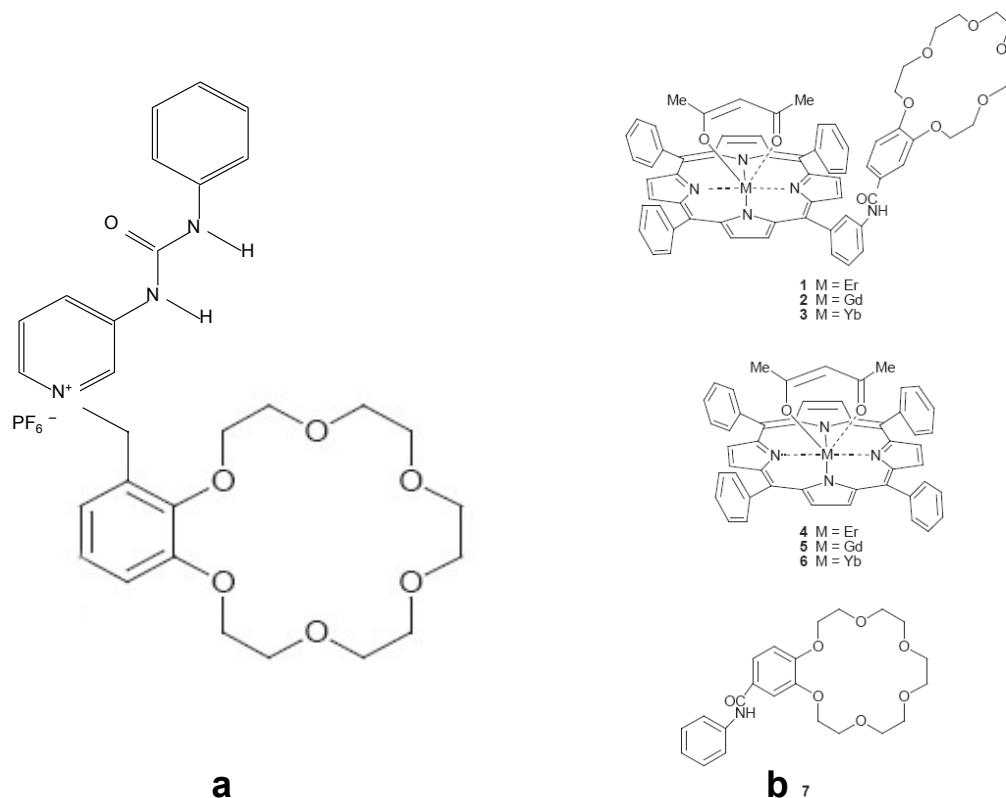


Figura 4.80. Extractanți sinergetici pentru aminoacizi nepolari:
a – pe bază de eter-coroană și derivat de uree [325]; *b* – pe bază de eter-coroană și porfirinați de lantanide [326]

Extractanți similari (fig. 4.80 b 1,2,3) au fost obținuți și din porfirinați ai lantanidelor (fig. 4.80 b 4,5,6) grefați pe derivați de eteri benzo-18-coroană-6 (fig. 4.80 b 7). Aceștia dizolvați în diclormetan pot extrage aminoacizii din soluții apoase neutre cu o eficiență dublă față de derivatul porfirinic simplu sau față de amestecul fizic derivat porfirinic – eter-coroană (fig. 4.81).

Studii recente au arătat că derivații calixarenelor sunt extractanți selectivi pentru aminoacizi și derivații acestora. Între cationul amoniu al aminoacidului și atomii de oxigen ai moleculei gazdă se realizează un complex 1:1 care trece apoi ușor în faza organică. Includerea moleculei – oaspete de aminoacid în cavitatea calixarenei provoacă asimetrizarea moleculei – gazdă. Pentru extracția unui ester al triptofanului s-a utilizat un derivat carboxilic al unei calix[6]arene, reextracția realizându-se într-o soluție apoasă acidă [327]. Calix[6]arenele au o capacitate de extracție superioară derivaților

organofosforici, cum ar fi D2EHPA, aceasta depinzând de structura calixarenei și de diametrul cavității acesteia, de numărul grupărilor carboxilice și de natura radicalului alchilic. Proprietățile moleculei – oaspete, hidrofobicitatea în mod special, influențează de asemenea procesul de extracție [328]. Calix[4]arenele și *p*-terț-butil-calix[4]arenele substituie cu fenil-etil-amină au proprietăți extractante pentru esterii metilici ai unor α -aminoacizi, cât și pentru unele α -amine chirale [329].

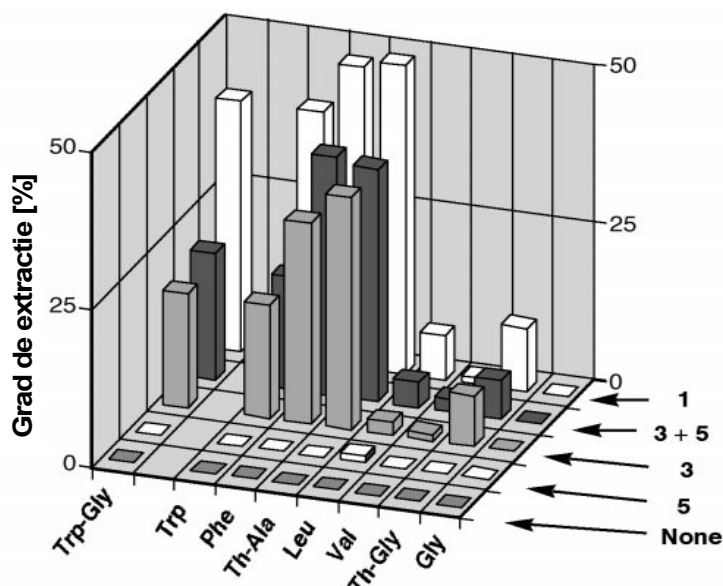


Figura 4.81. Extracția aminoacizilor cu extractanți sinergetici eter-coroană – porfirinat de lantanide [326]

Condiții de lucru: faza apoasă = 125 nmol aminoacid în 2,5 mL apă (pH = 5,9 – 6,2); faza organică = 125 nmol extractant în 10 mL CH₂Cl₂

4.5.4.3. Extracția antibioticelor

Așa cum s-a precizat în paragraful 4.1.3.1., separarea penicilinelor de biosinteză din lichidul de fermentație se realizează prin extracție fizică cu acetat de butil. Datorită polarității reduse a solventului, penicilina trebuie să se găsească în stare nedisociată, pentru ca gradul de extracție să fie maxim. Acest lucru se întâmplă la pH < 2, valoare la care viteza de inactivare a penicilinelor este foarte ridicată. În aceste condiții, extracția reactivă apare ca o soluție fiabilă de separare a penicilinelor și a antibioticelor β -lactamice în general. La extracția cu Amberlite LA-2, gradul de extracție al penicilinelor G și V este de 97

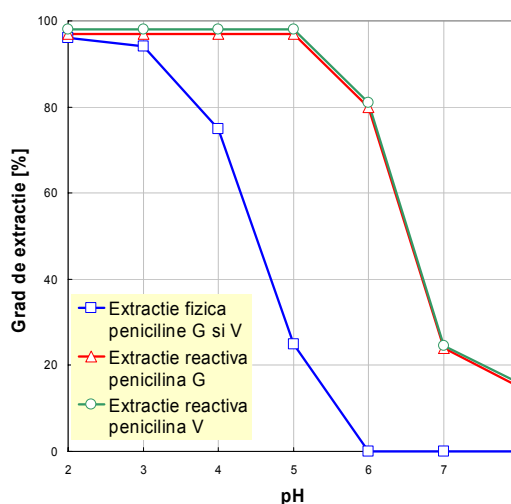
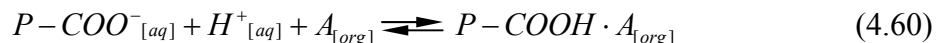


Figura 4.82. Influența valorii pH-ului fazei apoase asupra gradului de extracție al penicilinelor [4]

Capitolul 4 – Separarea prin extracție

– 98% chiar și la valori pH = 5 în faza apoasă (fig. 4.82). La acest pH, timpul de semiinactivare a penicilinei G este de 92 ore, pericolul degradării chimice fiind practic îndepărtat [4].

La extracția reactivă, la interfață, se stabilește următorul echilibru între penicilina din faza apoasă și amina din faza organică:



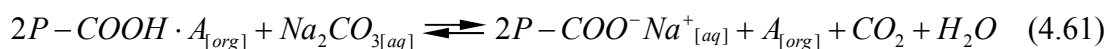
Din cauza structurii voluminoase pe care o au atât penicilinele, cât și extractantul, în complexul rezultat în urma reacției (4.60) ele se vor găsi în raport molar de 1:1 [4].

Extracția reactivă a penicinelor cu amine este influențată de valoarea pH-ului fazei apoase inițiale, concentrația inițială a extractantului, concentrația inițială a antibioticului, timpul de contact, raportul volumic [aq]:[org]. Gradul de extracție depinde puternic de structura antibioticului extras, în special datorită solubilității acestuia, așa cum reiese din tab. 4.27.

Tabelul 4.27. Gradul de extracție al unor antibiotice β -lactamice la extracția reactivă cu TOA în cloroform [33]

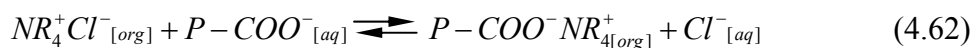
Antibiotic	Gradul de extracție [%]	
	0,01 mol/L TOA	0,1 mol/L TOA
Benzilpenicilina	92,0	92,1
Cloxacilina	96,8	96,2
Dicloxacilina	98,9	99,1
Ampicilina	23,1	71,3
Meticilina	94,6	98,5
Carbenicilina	84,4	66,8
Amoxicilina	0,5	1,4
Epilina	22,4	66,8
Bayercilina	98,3	97,6
Fenoximetilpenicilina	98,4	98,3
Clometacilina	97,8	98,8
Oxacilina	99,0	100

Reextracția se realizează în soluții apoase de carbonat sau fosfat de sodiu sau potasiu. La reextracția cu carbonat de sodiu, de ex., are loc următorul proces:



În general, reextracția decurge cu randamente mari și fără degradare antibioticelor la pH neutru. La reextracția penicilinei G, la valori pH = 7,2 – 7,5, pierderile totale de antibiotic, atât în etapa de extracție reactivă cu Amberlite LA-2, cât și în etapa de reextracție, nu au depășit 0,3% [331, 332]. Un agent de extracție mai performant s-a dovedit a fi DITDA (di-izo-tridecilamina) în butanol; gradul de extracție al penicilinei G este de 95% (la pH = 5), iar gradul de reextracție (la pH = 8,5) este aproape 100%. În plus, DITDA este de 20 de ori mai ieftin decât Amberlite LA-2 [301]. Întrucât acești extractanți aminici sunt toxici pentru celule, ei nu pot fi utilizați pentru extracția *in situ*.

La extracția reactivă a antibioticelor cu săruri cuaternare de amoniu, are loc la interfață o reacție de schimb ionic:



Reextracția se poate realiza cu o soluție apoasă de acid clorhidric:



În medii neutre, echilibrul reacției (4.62) este independent de pH. Această independență de pH are și o serie de inconveniente; dacă valoarea constantei de echilibru este mare, reextracția decurge dificil, ea neputând fi îmbunătățită prin modificarea pH-ului, ci numai printr-o reacție care să îndepărteze ionul $P-COO^-$ din sistem [301].

La extracția cu TOMAC în kerosen a mai multor antibiotice (teicoplanină, rifampicină, chitasamicină, penicilină G) s-a constatat că gradul de extracție crește cu creșterea pH-ului (la $pH > pK$) și că viteza extracției este cu circa două ordine de mărime mai mare decât viteza procesului de reextracție, în ambele cazuri determinantă de viteză fiind difuziunea prin faza organică. La concentrații mari de antibiotic sau de extractant, determinantă de viteză devine reacția care decurge la interfață [333].

La extracția antibioticelor din clasa cefalosporinelor cu Aliquat 336 în diverși solvenți s-a constatat că valorile constantei de echilibru ale reacției (4.62) se corelează bine cu hidrofobicitatea antibioticelor și cu dipol-momentul solvenților. Constanta de echilibru a reacției de reextracție a cefalosporinelor (4.63) este mai mare decât valorile aceleiași constante pentru co-extracția ionilor tampon, existând astfel posibilitatea separării selective a antibioticelor [334]. Cefalosporina C poate fi extrasă cu clorură de tri-*n*-octilamoniu în acetat de butil. Pentru a evita descompunerea antibioticului, reextracția se realizează cu o soluție tampon de carbonat [335].

Sărurile cuaternare de amoniu sunt extractanți mai eficienți pentru antibiotice decât aminele secundare sau terțiare. La extracția unor compuși cu structură tiazolidin- β -lactamică (acid olivanic, acid clavulanic, penicilină V, amoxicilină, acid fenoxiacetic), eficiența extracției crește în ordinea extractanților:

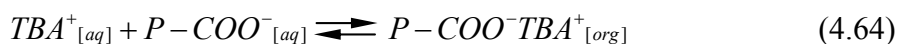
Amberlite LA-2 clorhidrat < Alamine 336 clorhidrat << Aliquat 336

și în ordinea solvenților:

1-butanol < tributilfosfat < hexan < dietileter < diclormetan < acetat de butil

Cel mai eficient sistem de extracție este format din Aliquat 336 în acetat de butil, gradul de extracție realizat fiind de peste 98,6 % [336]. Acest sistem de extracție s-a dovedit a fi foarte performant și pentru extracția acidului 6-aminopenicilanic, compus care reprezintă nucleul activ al tuturor penicilinelor substituie [337, 338].

O sare cuaternară de amoniu cu comportare aparte este sulfatul acid de tetrabutilamoniu ($TBAHSO_4$). Acest extractant este solubil în faza apoasă, echilibrul extracției reactive stabilindu-se în această fază:



Utilizând $TBAHSO_4$ există posibilitatea separării penicilinei V de acidul fenoxiacetic, un precursor al biosintezei acesteia (fig. 4.83), sau a altor antibiotice dintr-un amestec. Gradul de extracție al penicilinei V cu $TBAHSO_4$ variază foarte mult cu natura solventului (fig. 4.84).

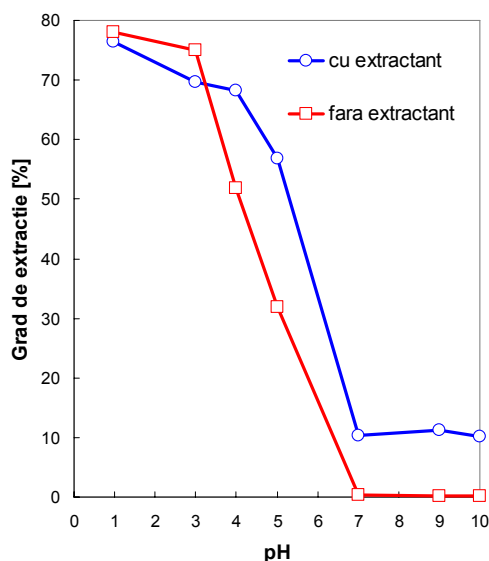


Figura 4.83. Influența pH-ului fazei apoase asupra gradului de extracție a acidului fenoxiacetic cu TBAHSO₄ în diclormetan [336]

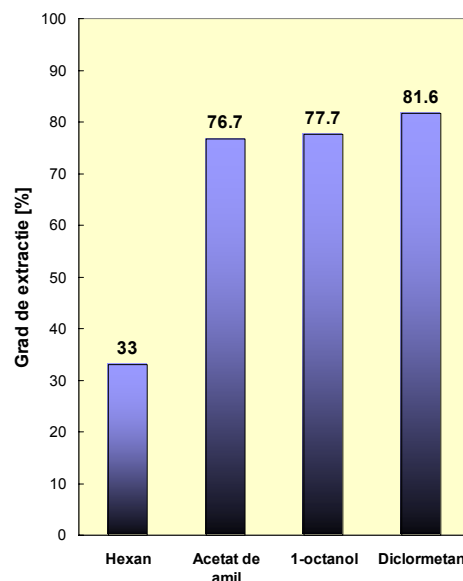


Figura 4.84. Influența solventului asupra gradului de extracție a penicilinei V cu TBAHSO₄ [336]

4.5.4.4. Alte aplicații ale extracției reactive

Deși deocamdată fără aplicații la nivel industrial, în literatura de specialitate sunt semnalate și alte aplicații ale extracției reactive pentru separarea unor compuși naturali sau obținuți prin biosinteză. De asemenea, extracția reactivă poate fi utilizată pentru îndepărtarea din apă a unor poluanți, cum ar fi, de exemplu, fenolii.

4.5.4.4.1. Extracția acizilor organici din produse naturale

Acidul gluconic se găsește în fructe, miere și vin, fiind utilizat ca aditiv alimentar și regulator de aciditate. În soluție apoasă se află în echilibru cu un ester ciclic, D-glucono- δ -lactona (fig. 4.85).

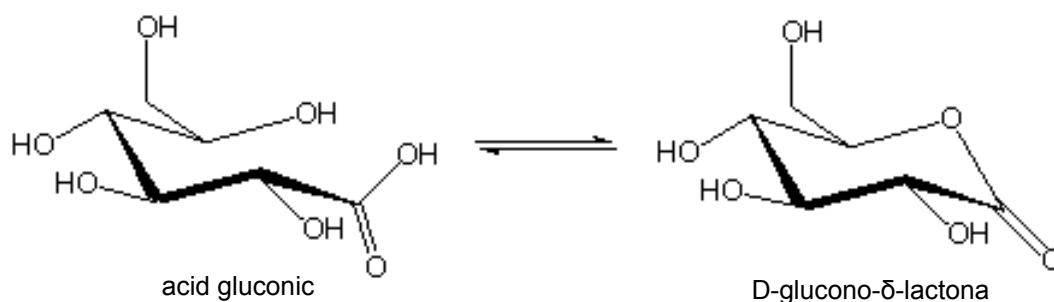


Figura 4.85. Echilibrul acid gluconic – glucono δ -lactona în fază apoasă [339]

Este un agent chelatizant puternic în mediu alcalin, în special pentru Ca^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} ; pe baza acestei proprietăți este utilizat ca ingredient în produsele de curățire, pentru îndepărtarea depunerilor anorganice [339].

La extracția acidului gluconic din soluții apoase cu Alamine 336 în diferiți solvenți, s-a constatat că gradul de extracție crește cu creșterea concentrației inițiale a aminei în faza organică, iar eficiența solvenților crește în ordinea:

ciclohexan < hexan < toluen < propanol < metil-izobutil-cetonă

Extracția are loc prin mecanismul formării perechilor de ioni, polaritatea solventului favorizând solvatarea complexului în faza organică [340].

Acidul cinamic este un compus natural derivat din fenilalanină, care se găsește în scorțișoară, rășina arborelui *Liquidambar*, balsamul de Peru, storax, untul de shea (*Vittellaria paradoxa*) etc. [341]. Poate fi obținut prin extracție din produse vegetale, prin sinteză chimică sau prin biosinteză [342, 343]. Este utilizat în obținerea aromatizantilor, a indigoului sintetic și a anumitor produse farmaceutice. Principala sa utilizare este însă în parfumerie, unde este folosit sub formă de esteri (metilic, etilic, benzilic) [343]. Dintre izomeri, izomerul *trans* (fig. 4.86) este cel care se întâlnește frecvent și care are cea mai ridicată activitate biologică.

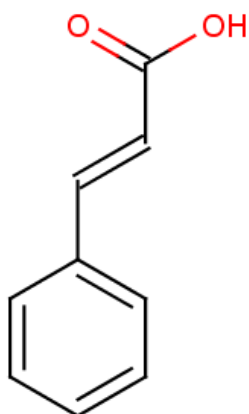


Figura 4.86. Structura acidului *trans*-cinamic

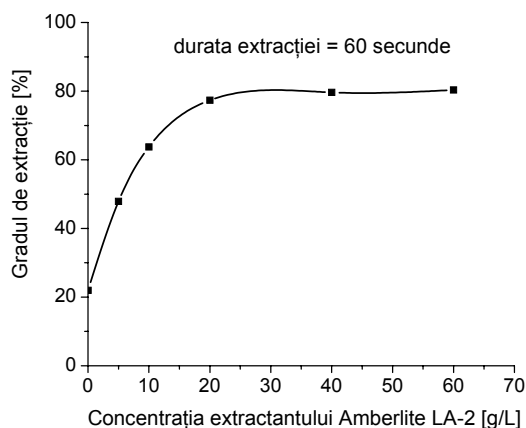


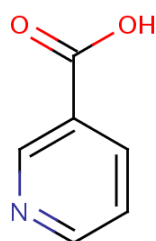
Figura 4.87. Influența concentrației extractantului asupra gradului de extracție a acidului cinamic [342]

Din soluții apoase, acidul cinamic poate fi extras cu Amberlite LA-2 în *n*-heptan, un solvent care nu este toxic pentru microorganismele implicate în biosinteză, existând astfel posibilitatea realizării extracției reactive *in situ*. Cercetările efectuate [342] au arătat că gradul de extracție crește cu creșterea concentrației inițiale a extractantului de la 0 la 25 g/L. La concentrații de extractant între 25 – 60 g/L, gradul de extracție rămâne constant (80%), pentru o concentrație inițială a acidului cinamic în faza apoasă de 0,2 g/L (fig. 4.87). Între amină și acid se formează un complex stoichiometric 1:1, reacția fiind foarte rapidă, determinante de viteză fiind procesele difuzionale.

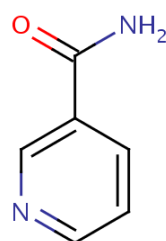
4.5.4.4.2. Extracția vitaminelor

Vitaminele sunt compuși organici esențiali care fie nu sunt sintetizați de către organismul uman sau animal, fie sunt produși doar în cantități insuficiente [344], având un rol vital în reglarea proceselor metabolice și a activității celulare. La separarea prin extracție reactivă se pretează vitaminele hidrosolubile, cu caracter acid. Acestea se comportă la extracție similar cu acizii carboxilici.

Vitamina B₃, cunoscută și ca vitamina PP, niacină, niacinamidă, hexaniacinat, corespunde compușilor nicotinamidă și acid nicotinic (fig. 4.88). Se găsește în diverse produse de origine vegetală și animală, cantități mari aflându-se în alunele de pământ prăjite (22,10 mg/100 g), orz (5,4 g/100 g), nap alb (5,40 g/100 g), semințele de floarea-soarelui (4,50 g/100 g), migdale (4,40 g/100 g), făină de grâu (4,3 g/100 g), orez (4,10 g/100 g) [345].



acid nicotinic



nicotinamidă

Figura 4.88. Componentii vitaminei B₃

Se poate obține prin oxidarea enzimatică a 5-etil-2-metilpiridinei sau prin hidroliza totală a 3-cianopiridinei, ambele procese decurgând sub acțiunea nitrilazei bacteriene. Peste 60% din producția mondială este destinată îmbunătățirii hranei păsărilor, porcinelor, rumegătoarelor, peștilor și animalelor de companie, restul utilizându-se în preparate multivitaminice, cereale pentru micul dejun, băuturi răcoritoare [346].

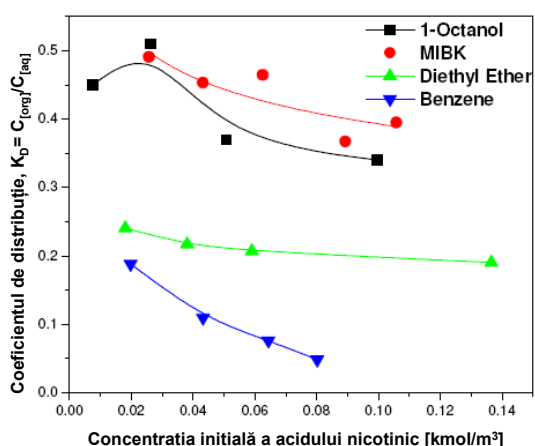


Figura 4.89. Distribuția acidului nicotinic între apă și diferiți solvenți organici [347]

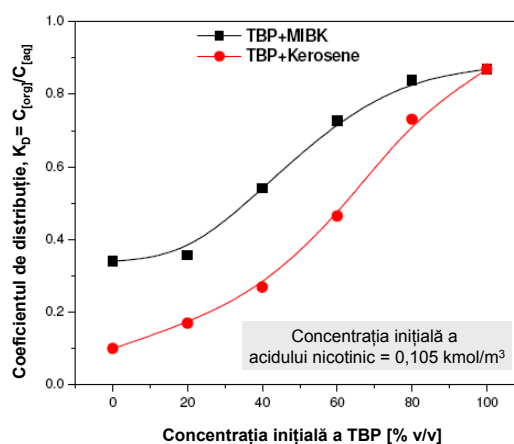


Figura 4.90. Influența concentrației inițiale a extractantului și a solventului asupra extracției acidului nicotinic [347]

Acidul nicotinic poate fi recuperat din faza apoasă fie prin extracție fizică, fie prin extracție reactivă. Extracția fizică decurge cu rezultate modeste, cei mai buni solvenți dovedindu-se 1-octanolul și metil-izobutil-cetona (fig. 4.89). Ca agent de extracție reactivă se poate utiliza TBP ca atare sau dizolvat în diferiți solvenți organici. Gradul maxim de extracție se obține cu TBP pur; cel mai indicat solvent pentru TBP este metil-izobutil-cetona (fig. 4.90). Solventul se regenerează prin stripare cu un volum redus de soluție alcalină [347].

Vitamina B₉ sau acidul folic a fost descoperită în anii 1930, fiind izolată din frunzele de spanac în 1941 și ulterior sintetizată în 1946 [345, 348, 349]. În structura acesteia și a celorlalți acizi folici există un rest pteridinic și un rest de acid glutamic grefate pe acidul *p*-aminobenzoic (fig. 4.91).

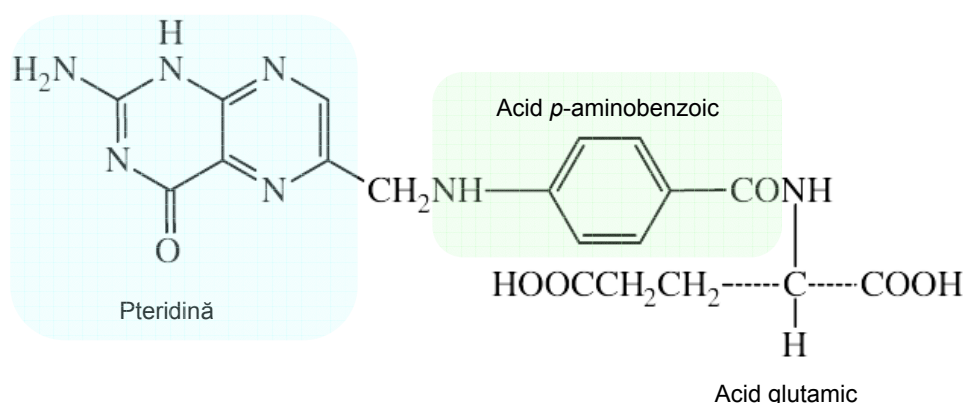


Figura 4.91. Structura acidului folic

Acidul folic este puțin solubil în apă (8,5 g/100 mL la 20 °C), stabil în mediu acid. Se distruge rapid în soluții neutre sau alcaline, în prezența căldurii, luminii și a compuşilor cu sulf. Deși se poate obține prin extracție din produse vegetale (frunze de spanac, cereale, lămâi etc.), animale (ficat), sau prin biosinteză cu ajutorul unor microorganisme modificate genetic, singura metodă economică de producție la scară industrială o reprezintă deocamdată sinteza chimică [350], cu toate că randamentul total nu depășește 40 – 50%, iar puritatea produsului este de 80% [345].

Separarea și purificarea acidului folic din lichidele de fermentație implică filtrarea biomasei și sorbția acidului pe anioniți, după o purificare prealabilă a filtratului prin tratamente termice și chimice. Eluția de pe schimbătorii de ioni se realizează cu soluții de NaOH în condiții blânde, stabilitatea produsului fiind maximă în intervalul de pH = 4 – 12 [345]. La separarea prin extracție reactivă, utilizarea aminei secundare Amberlite LA-2 permite obținerea unor valori ridicate ale gradului de extracție [351].

Vitamina C sau acidul ascorbic este una dintre cele mai cunoscute și mai studiate vitamine. Acidul ascorbic are doi enantiomeri, activitate biologică având doar izomerul levogir. Fiind un reducător puternic, se oxidează foarte rapid transformându-se în acid dehidroascorbic (fig. 4.92).

Deși microorganismele, plantele și majoritatea animalelor au capacitatea de a sintetiza vitamina C, primatele (inclusiv omul) și-au pierdut această abilitate [353]. Vitamina C, pe lângă rolul său important pe care îl are în nutriție, are și alte utilizări. Din totalul de peste 80.000 tone produse anual, circa o treime se utilizează în industria

farmaceutică (multivitamine, tablete, siropuri, comprimate efervescente etc.), restul utilizându-se în special în calitate de conservant în industria alimentară [354] sau în industria cosmetică [345].

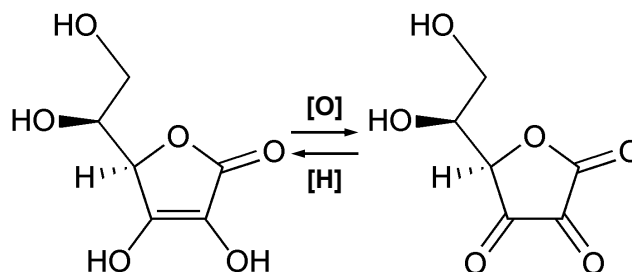
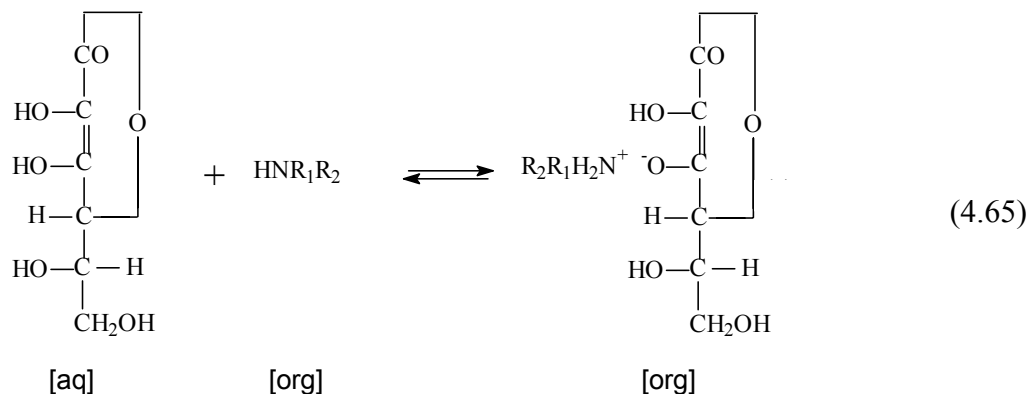


Figura 4.92. Forma redusă (stânga) și oxidată (dreapta) a acidului ascorbic [352]

Vitamina C se obține prin extracție din diferite materii prime vegetale, prin sinteză chimică, prin biosinteză sau prin procedee combinate de sinteză chimică și biosinteză [354]. Indiferent de metoda de obținere, separarea și purificarea necesită numeroase etape, care implică consumuri ridicate de materiale și energie. Soluția finală din care trebuie extras acidul ascorbic conține numeroase produse secundare, cel mai important dintre acestea fiind acidul 2-cetogluconic. În ciuda faptului că fiecare etapă a procesului decurge cu randamente de 90%, conversia globală a glucozei în acid ascorbic nu depășește 60% [354, 355].

Studiile efectuate arată că la extracția acidului ascorbic cu Amberlite LA-2 în acetat de butil separarea decurge prin intermediul unei reacții interfaciale de ordinul I între acid și extractant:



Procesul este controlat de concentrația extractantului în faza organică și de valoarea pH-ului fazei apoase. Un grad de extracție de 90% se obține la o concentrație inițială a extractantului de 160 g/L și un pH = 1 în faza apoasă inițială [356]. Gradul de extracție poate fi îmbunătățit cu 6 – 23% prin adăugarea unui modificador de fază (2-octanol), care mărește polaritatea solventului [357].

Modelarea matematică a procesului de extracție arată că eficiența extracției este influențată în proporție de 91,1% de către concentrația inițială a extractantului în faza organică și de către pH-ul fazei apoase, ceilalți factori (intensitatea amestecării, temperatura, raportul volumic al fazelor etc.) influențând procesul într-o mai mică măsură [358].

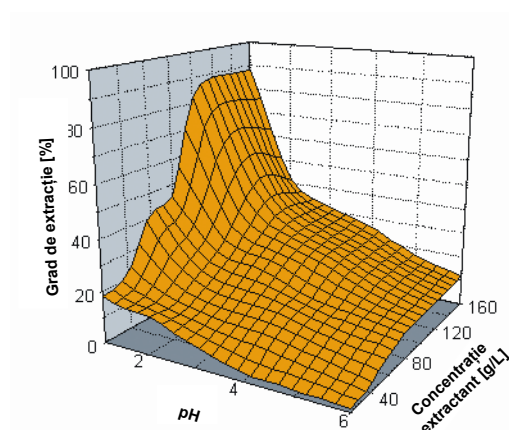


Figura 4.93. Influența pH-ului fazei apoase și a concentrației extractantului la extracția reactivă a acidului ascorbic cu Amberlite LA-2 în acetat de butil [358]

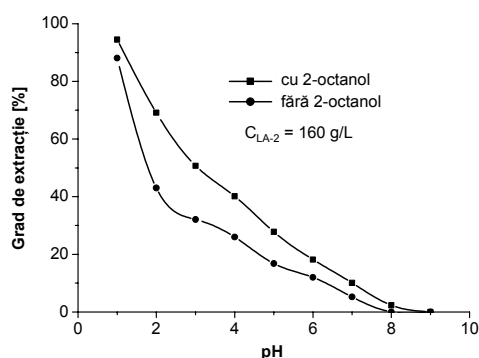


Figura 4.94. Influența adaosului de modificador de fază asupra gradului de extracție a acidului ascorbic cu Amberlite LA-2 în acetat de butil [356]

4.5.4.4.3. Extracția selectivă a enantiomerilor

Foarte mulți compuși organici cu activitate biologică posedă atomi de carbon asimetrici și implicit izomerie optică sau chiralitate. În marea majoritate a cazurilor, compușii extrași din surse naturale au aceeași chiralitate: majoritatea aminoacizilor esențiali sunt (L)-aminoacizi, majoritatea zaharurilor sunt (D)-glucide. La sinteza chimică a acestor compuși se obțin amestecuri racemice, amestecuri formate în proporții egale din cei doi enantiomeri.

Deși proprietățile fizice ale enantiomerilor sunt identice, exceptând direcția de rotație a planului luminii polarizate, activitatea lor biologică poate fi mult diferită. De exemplu, în cazul betablocantelor (propranolol, atenolol, metoprolol etc.) doar izomerul (S) este activ, având aceeași structură cu noradrenalina (fig. 4.95). Izomerul (R) este inactiv. Neproducând efecte secundare, acesta este doar un balast izomeric [359].

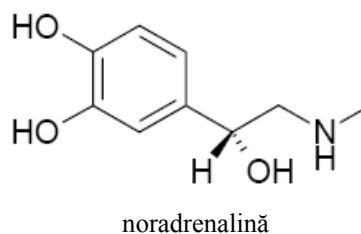
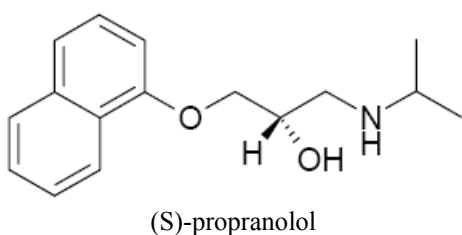


Figura 4.95. Structuri similare pentru betablocant și hormonul adrenergic

În alte cazuri, cei doi enantiomeri au reacții fiziologice diferite: unul dintre enantiomerii naproxenului este util în calmarea durerilor artritice, celălalt provoacă otrăvirea ficatului fără a avea un efect analgezic; (S)-limonenul are aromă de lămâie, în timp ce (R)-limonenul are aromă de portocală. Alte exemple sunt redată în fig. 4.96 [360, 361]. Datorită acestui comportament, separarea enantiomerilor reprezintă o necesitate, în special în aplicațiile farmaceutice, cosmetice, alimentare etc.

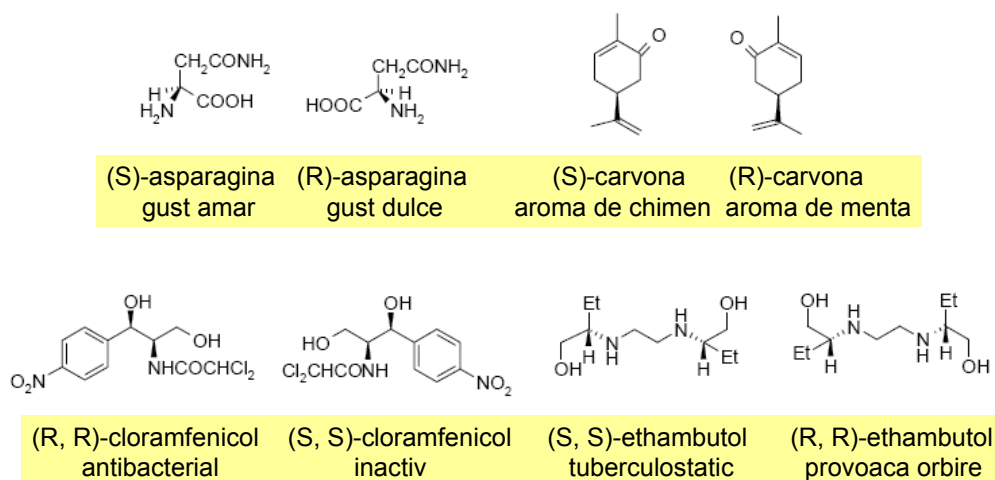


Figura 4.96. Reacții fiziologice diferite ale enantiomerilor

Separarea izomerilor optici dintr-un amestec racemic este dificilă, dat fiind faptul că proprietățile fizice ale enantiomerilor sunt identice. Cu excepția separării prin cristalizare, toate metodele de separare necesită prezența unui agent de separare chiral. O altă posibilitate o reprezintă separarea diastereoizomerilor: enantiomerii reacționează în prealabil cu un compus optic pur, rezultând diastereoizomeri. Aceștia, având proprietăți fizice diferite, pot fi separați prin diverse procedee (fig. 4.97).

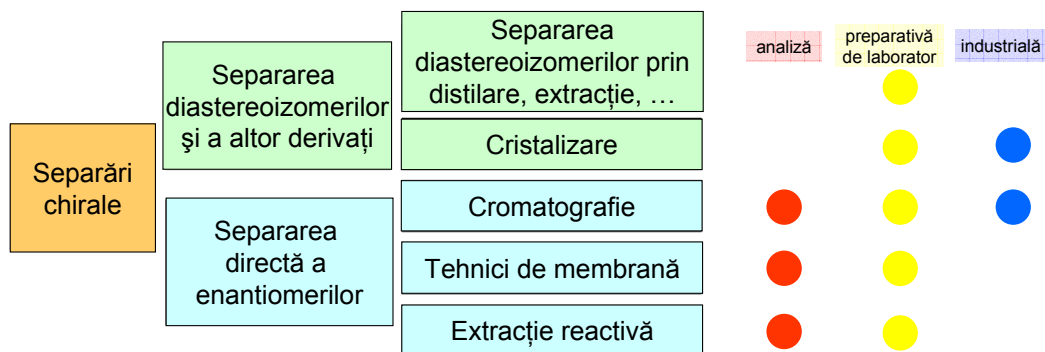


Figura 4.97. Principalele metode de separare a compușilor chirali și scara la care se aplică în prezent [359]

Extracția reactivă, ca metodă de separare a enantiomerilor, implică utilizarea a doi solvenți, un solvent de extracție și un solvent de spălare (fig. 4.98). Acest procedeu este cunoscut sub denumirea de **extracție fracționată**. Cei doi solvenți trebuie să fie nemiscibili, sau cu miscibilitate foarte redusă. Ei trebuie să aibă polaritate și densitate cât mai diferite, circulând prin extractor în contracurent, fiecare dintre ei extrăgând selectiv câte unul din componenții amestecului de separat. Dacă extractorul este un aparat tip coloană, cei doi solvenți se alimentează pe la capetele acestuia, iar amestecul de separat printr-un punct intermediar, care împarte coloana în două zone: o zonă situată deasupra punctului de alimentare, denumită **zonă de extracție** și o zonă situată dedesubtul alimentării, denumită **zonă de spălare** (fig. 4.99).

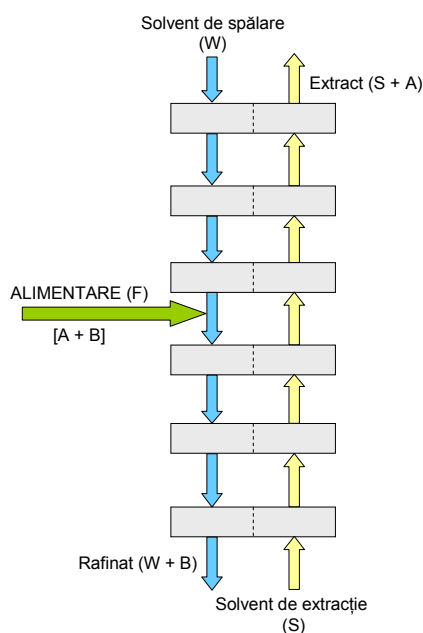


Figura 4.98. Schema de principiu a extracției fracționate

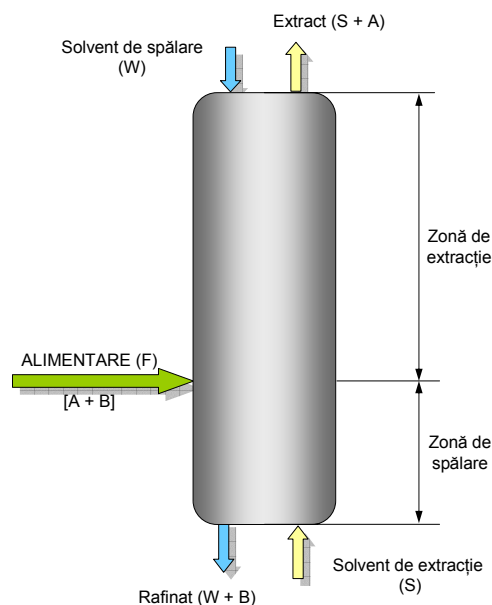


Figura 4.99. Coloană de extracție fracționată

La nivel de laborator se utilizează diverse echipamente, constând, de regulă din două unități independente, echivalente zonelor de extracție, respectiv de spălare. Frecvent utilizat este extractorul fracțional Takeuchi, compus din două coloane rotative din sticlă, înclinate (fig. 4.100). Echipamentele de laborator sunt caracterizate de dimensiunea redusă a acestora, numărul mare de trepte teoretice de extracție, timpul mare de staționare în aparat (2 – 24 h); toate acestea conduc la obținerea unor produse de puritate avansată, dar cu o productivitate foarte redusă (1 – 10 mg/h).

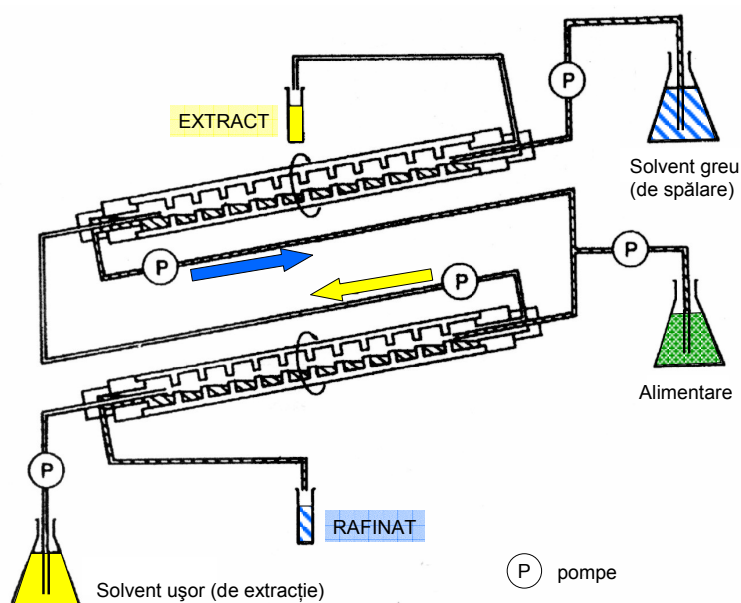
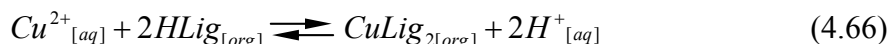


Figura 4.100. Extractor fracțional Takeuchi [362]

Pentru a se putea realiza separarea enantiomerilor prin extracție fracționată reactivă (FRET), unul dintre solvenți va trebui să conțină agentul de extracție enantioselectiv. Întrucât recunoașterea moleculelor chirale este mai selectivă într-un mediu hidrofob, solventul organic S este, de regulă, purtătorul extractantului [363].

Un sistem de extracție versatil, foarte studiat, este acela bazat pe alchil derivați de (L)-prolină sau (L)-hidroxiprolină. Acești compuși solubilizați în butanol, sunt capabili să extragă ionii de Cu(II) din faza apoasă, formând cu aceștia un complex chiral, având un raport Cu : Ligand = 1 : 2 (fig. 4.101) [364]. Reacția care are loc se poate scrie:



Complexul astfel format, CuLig_2 , are posibilitatea de a schimba unul din liganzii chirali cu un enantiomer al unui aminoacid existent în faza apoasă. Se formează astfel un complex mixt, ligandul chiral pus în libertate rămânând în faza organică, nefiind solubil în apă. Aminoacidul existent în faza apoasă, nedisociat, poate trece în faza organică, unde poate avea loc „capturarea” sa de către complexul cupric al (L)-(hidroxi)prolinei (fig. 4.102):



unde HD , HL reprezintă respectiv (D)-aminoacidul și (L)-aminoacidul, iar K_D și K_L reprezintă respectiv constantele de echilibru ale reacțiilor (4.69) și (4.70). Dacă $K_D \neq K_L$, reacția de schimb de liganzi este enantioselectivă. Unul dintre enantiomeri va fi extras în faza organică în cantitate mai mare, celălalt concentrându-se în faza apoasă. Repetându-se procedura, în final, după n trepte de extracție, faza organică, respectiv cea apoasă, vor conține câte un singur enantiomer, realizându-se astfel separarea.

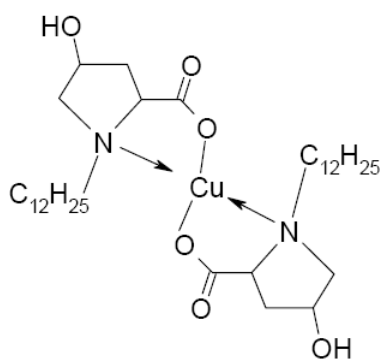


Figura 4.101. Structura chimică a complexului Cu(II) cu N-dodecil-(L)-hidroxiprolina

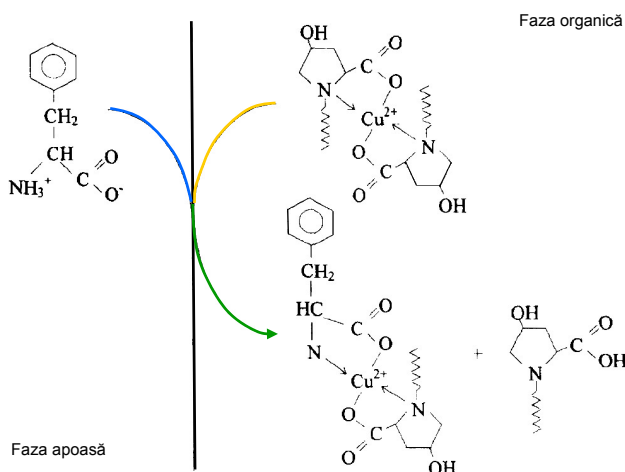


Figura 4.102. Extracția în faza organică a fenilalaninei de către Cu(II)- N-decil-(L)-hidroxiprolină [365]

Sistemul bazat pe complecși de Cu(II) N-alchil-(L)-(hidroxi)prolină în diverși alcoolii (*n*-butanol, *n*-amilalcool, *n*-octilalcool) a fost utilizat pentru separarea selectivă a enantiomerilor unor aminoacizi (leucina, izoleucina, norleucina, valina, norvalina, fenilalanina) [364, 365], acizi carboxilici (acid mandelic [366], acid α -ciclohexil-mandelic [367]), aminoalcooli (fenilglicinol, 2-amino-1-feniletanol, 2-aminobutanol, efedrină, norefedrină) [359, 368, 369], amine (feniletilamină, 2-aminopentan) [359, 368, 369] și chiar antibiotice [370]. Aceste sisteme au dezavantajul existenței în sistem a ionului amoniu (pentru reglarea pH-ului) și a ionilor de cupru, ioni care trebuie ulterior separați din faza apoasă în care se concentrează unul dintre enantiomeri [368].

Pentru separarea unor beta-blocante s-au utilizat sisteme bazate pe didodecil-(L)-tartrat și acid boric în sistemul cloroform – apă [371, 372], iar pentru aminoalcooli și amine s-au utilizat diferiți dialchiltartrați și tartrați alături de hexafluorofosfați în cloroform [373 – 375]. Deși versatilitatea sistemelor este bună, selectivitatea de numai 1,2 – 1,6 este prea redusă pentru aplicarea la scară industrială; în plus apare dezavantajul coextracției unui contra-ion puternic lipofil, $[PF_6]^-$.

Un alt sistem de extracție selectivă a enantiomerilor este cel bazat pe derivați de eteri-coroană. Sistemul a fost conceput inițial pentru separarea aminelor chirale prin HPLC/CSP¹ [376, 377]. Acești derivați de eteri-coroană conțin un rest fenolic a cărui grupare OH se află în interiorul coroanei, servind ca grupare de legătură pentru gruparea aminică. În poziția *para* se găsește o grupare 2,4-dinitrofenilazo, care pe lângă faptul că este o grupare cromoforă, conduce la creșterea capacității de legare a aminelor neutre și a aminoalcoolor [378]. Selectivitatea acestor derivați este influențată de aranjamentul substituenților pe inelul eterului-coroană: compușii având grupările C_6H_5- localizate lângă puntea de dietilenglicol (1 și 2 din fig. 4.103) sunt mai selectivi decât cei care au grupările C_6H_5- amplasate lângă gruparea fenolică (3 și 4 din fig. 4.103).

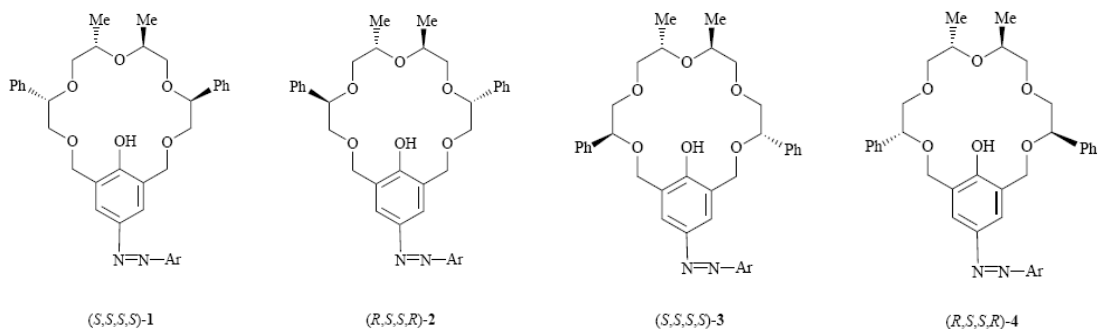


Figura 4.103. Derivați de eteri-coroană cu selectivitate chirală pentru amine și aminoalcooli [376]

În timp ce eterii coroană în conformație (S,S,S,S) s-au dovedit a fi selectivi pentru izomerii R ai compușilor: 2-aminopropan-1-ol, 2-amino-3-metilbutan-1-ol și 2-amino-2-feniletan-1-ol, eterii în conformație (R,S,S,R) s-au dovedit a fi selectivi pentru izomerii S ai aceluiași aminoalcooli. Această selectivitate poate fi explicată prin factorii sterici care pot sau nu favoriza includerea aminei în cavitatea eterului-coroană [376].

¹ HPLC/CSP – cromatografie de înaltă performanță pe fază chirală staționară

Un derivat piridinic de eter-coroană (fig. 4.104) a fost sintetizat și i-a fost testată selectivitatea pentru diferite amine și aminoalcooli chirali (fig. 4.105). Macrociclul chiral a prezentat o bună selectivitate pentru *sec*-butilamina (2), pentru compușii (3) – (5) a prezentat o selectivitate redusă, iar pentru (1) și (6) nu a fost enantioselectiv [379].

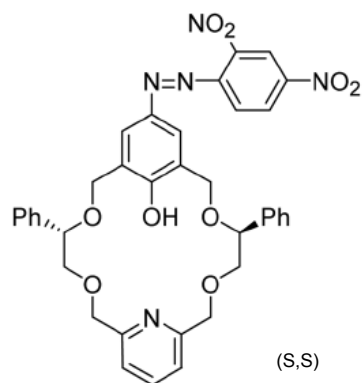


Figura 4.104. Eter azofenolic piridino-18-coroană-6

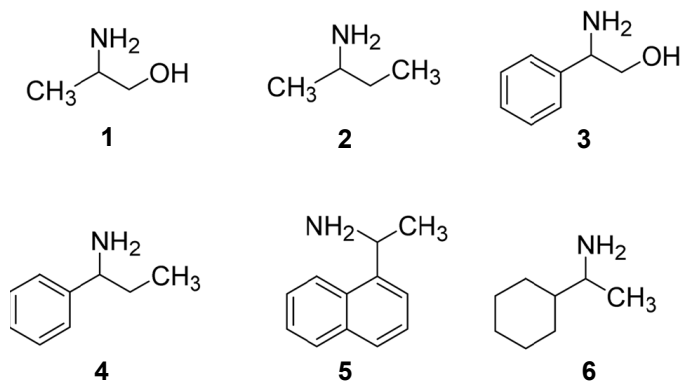


Figura 4.105. Compuși model pentru testarea enantioselectivității eterului azofenolic piridino-18-coroană-6 asupra aminelor primare chirale

Studii mai ample au fost efectuate cu eterul-coroană azofenolic prezentat în fig. 4.106 [359]. Acesta a fost testat ca extractant în diferiți solvenți, cei mai eficienți dovedindu-se diclormetanul și, într-o mai mică măsură, toluenul. Cu toate acestea, pentru aplicațiile la scară mai mare se recomandă utilizarea toluenului ca solvent, acesta fiind mai puțin dăunător mediului înconjurător decât diclormetanul. Drept compuși model de extras s-au folosit aminele și aminoalcoolii având o structură asemănătoare efedrinei (fig. 4.107).

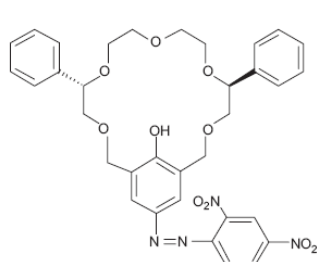


Figura 4.106. Eter azofenolic 18-coroană-6 [359]

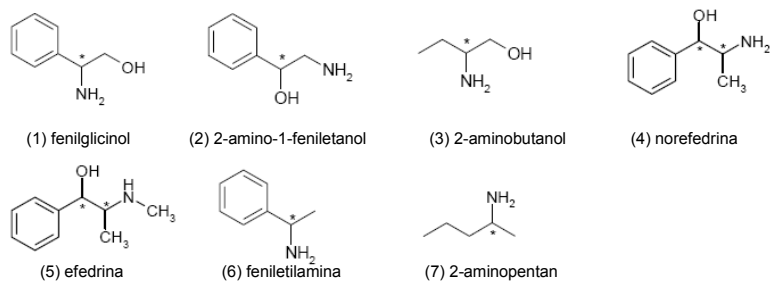


Figura 4.107. Compuși model pentru testarea enantioselectivității eterului azofenolic 18-coroană-6 asupra unor amine chirale de tip efedrinic [359]

S-a constatat că acest eter-coroană are o selectivitate bună (peste 1,7) pentru majoritatea compușilor testați (tab. 4.28), iar faptul că valorile coeficienților de distribuție sunt mari la concentrații relativ scăzute de extractant, permite utilizarea acestui compus în instalații de capacitate ridicată [368]. Faptul că 2-aminopentanolul nu a putut fi separat poate conduce la concluzia că pentru recunoașterea chirală este necesară prezența unei a doua grupări funcționale (fenil sau hidroxil) în molecula-țintă. De

asemenea, selectorul (eterul-coroană) ar putea fi enantioselectiv și pentru alte amine primare chirale, cu cel puțin încă o grupare funcțională în molecula lor: aminoacizi, aminalcooli, amine aromatice [359, 368].

Tabelul 4.28. Separarea chirală a unor aminoalcooli și amine prin extracție reactivă cu eter-coroană azofenolic (2 mMol/L) în diclor metan [368]

Enantiomer	T [°C]	pH	D ₁	D ₂	Selectivitate	Enantiomerul preferat
Fenilglicinol	25	9,0	4,0	0,8	5,0	R
2-Amino-1-feniletanol	5	10,0	5,6	4,2	1,3	R
Norefedrină	5	8,7	4,5	2,6	1,7	(+)
2-Aminobutanol	5	9,9	1,9	0,6	3,2	R
Feniletilamină	5	9,2	20,4	9,9	2,1	S
2-Aminopentan	5	9,9	6,2	6,0	1,0	–

D₁ – coeficientul de distribuție al enantiomerului cel mai puternic extras

D₂ – coeficientul de distribuție al enantiomerului cel mai slab extras

Studiile cinetice indica faptul că extracția aminoalcoolilor cu eteri-coroană azofenolici decurge în domeniul difuzional, reacția chimică nefiind etapa determinantă de viteză [369]. La extracția într-o singură treaptă, selectivitatea operațională este influențată în special de valoarea constantei de complexare dintre eterul-coroană și enantiomeri (care depinde de tipul solventului și de temperatură), precum și de concentrația extractantului. Raportul de distribuție al enantiomerilor între faza apoasă și cea organică este puternic influențat de pH [380].

Reextracția aminoalcoolilor din faza organică se poate realiza fie prin modificarea pH-ului (în cazul feniletilaminei), fie prin modificarea temperaturii (în cazul fenilglicinolului). Pentru modificarea pH-ului nu se recomandă utilizarea acizilor minerali, ci a dioxidului de carbon. O presiune parțială de circa 0,02 MPa a CO₂ este suficientă pentru reducerea pH-ului unei soluții cu 2 mMol/L feniletilamină până la valoarea 6. În aceste condiții are loc decomplexarea de eterul-coroană și trecerea aminei în faza apoasă, fenomen vizibil prin modificarea clară și rapidă a culorii fazei organice de la purpuriu închis la portocaliu [359, 380].

Flexibilitatea extracției reactive fracționate cu derivați azofenolici ai eterilor coroană a fost demonstrată la scară redusă într-un contactor cu membrană având circa două trepte teoretice de extracție atât în zona de extracție, cât și în zona de spălare (fig. 4.108).

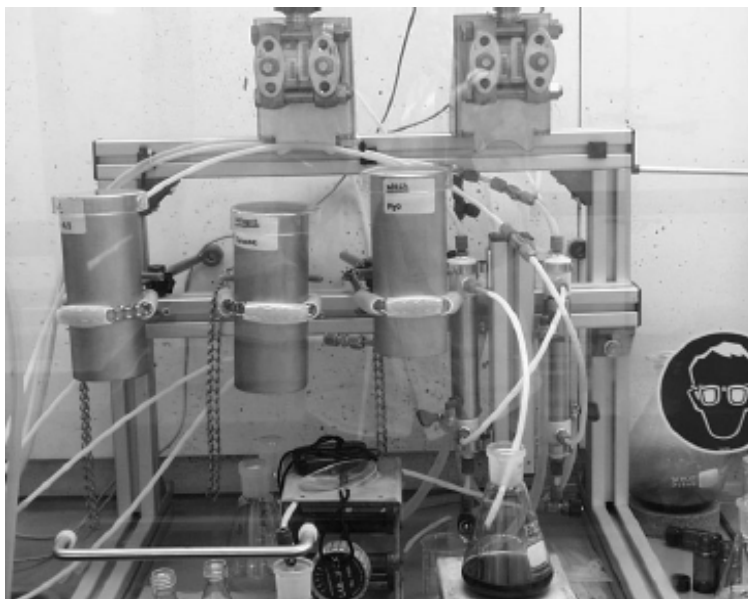


Figura 4.108. Instalație de extracție reactivă fracționată (FREX) de tip contactor cu membrană [381]

Bibliografie

1. U.S. Congress, Office of Technology Assessment: *Biotechnology in a Global Economy*, OTA-BA-494, Washington, DC, U.S. Government Printing Office, October **1991**
2. Jurcoane, Ș., Săsărman, E., Lupescu, I., Roșu, A., Berehoiu Tamba, R., Banu, A., Rădoi, F.: *Tratat de biotehnologie*, **1**, Ed. Tehnică, București, **2004**
3. Doran, P.M.: *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, London, **1995**
4. Cașcaval, D., Oniscu, C., Galaction, A.-I.: *Inginerie biochimică și biotehnologie*, **3** *Procese de separare*, Ed. Performantica, Iași, **2004**
5. Shuler, M.L.: *Bioprocess engineering* in: *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, **2** (Meyers, R.A. – ed.), Academic Press, Orlando, **1987**
6. Berruex, L.G., Freitag, R.: *Separation and Purification of Biochemicals* in: *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 3rd ed. (Meyers, R.A. – ed.), Academic Press, Orlando, **2001**
7. Harrison, R.G., Todd, P., Rudge, S.R., Petrides, D.P.: *Bioseparations Science and Engineering*, Oxford University Press, New York, **2003**
8. Petrides, D.P.: *Bioprocess Design*, <http://www.intelligen.com>, **2000**
9. Petrides, D.P., Cooney, C.L., Evans, L.B.: *An Introduction to Biochemical Process Design*, in: *Chemical Engineering Problems in Biotechnology* (Shuler, M.L. – ed.), **1**, American Institute of Chemical Engineers, **1989**, 351 – 372
10. www.lsbu.ac.uk/water/kosmos.html
11. <http://ron.proz.com/kudoz/1229225#2932486>
12. Hunter, R.J.: *Foundations of Colloid Science*, **1**, Clarendon Press, Oxford, **1987**
13. Calleja, G.B.: *Microbial Aggregation*, CRC Press, Boca Raton, **1984**
14. Bilanovic, D., Shelef, G., Sukenik, A.: *Biomass*, **1988**, **17**, 65 – 76
15. Boonaert, C.J.-P., Dupont-Gillain, C.C., Dengis, P.B., Dufrière, Y.F., Rouxhet, P.G.: *Cell Separation, Flocculation*, in: *Encyclopedia of Bioprocess Technology* (Flickinger, M.C., Drew, S.W. – eds.), **2**, Wiley Interscience, New York, **1999**
16. * * * *Degrémont Water Treatment Handbook*, 6th ed., **1**, Lavoisier Publishing, Paris, **1991**
17. Nakamura, J., Miyashiro, S., Hirose, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **1976**, **40**, 377 – 383
18. Kurane, R., Takeda, K., Suzuki, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, **50**, 2301 – 2307
19. Takagi, H., Kadowaki, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **1985**, **49**, 3151 – 3157
20. Agerkvist, I., Eriksson, L., Enfors, S.-O.: Selective flocculation with chitosan in *Escherichia coli* disintegrates: Effects of pH and nuclease treatment, *Enzyme Microb. Technol.*, **1990**, **12**(8), 584–590
21. Ferenci, T., Lee, K.-S.: Recovery of bacteria from growth media by starch-dependent floc formation, *Biotechnol. Bioeng.*, **1991**, **38**(3), 314 – 318
22. Sharma, B.P.: *Cell Separation, Sedimentation* in: *Encyclopedia of Bioprocess Technology* (Flickinger, M.C., Drew, S.W. – eds.), **2**, Wiley Interscience, New York, **1999**
23. Li, D.-H., Ganczarczyk, J.J.: *Water Res.*, **1987**, **21**, 257 – 262
24. Maia, A.B.R.A., Nelson, D.L.: Application of gravitational sedimentation to efficient cellular recycling in continuous alcoholic fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, **41**(3), 361 – 369
25. Bratu, E.A.: *Operații unitare în ingineria chimică*, **2**, Ed. Tehnică, București, **1984**
26. Kalyanpur, M.: *Membrane Separations*, in: *Encyclopedia of Bioprocess Technology* (Flickinger, M.C., Drew, S.W. – eds.), **3**, Wiley Interscience, New York, **1999**

Bibliografie

27. Levy, R.V., Jornitz, M.W.: *Types of Filtration* in: *Sterile Filtration* (Jornitz, M.W. – ed.), *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, **2006**, **98**, 1 – 26
28. Oniscu, C., *Tehnologia produselor de biosinteză*, Ed. Tehnică, București, **1978**
29. * * * *Advanced Filtration Technology*, Larox OY Company Brochure, Lappeenranta, **1993**
30. Hsu, H.-W.: *Separations by Centrifugal Phenomena*, John Wiley, New York, **1981**
31. Ambler, C.M.: The evaluation of centrifuge performance, *Chemical Engineering Progress*, **1952**, **48**, 150 – 158
32. Ambler, C.M.: *Centrifugation* in: *Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers* (Schweitzer, P.A. – ed.), 2nd ed., McGraw-Hill, New York, **1988**
33. Dahlstrom, D.A., et al: *Liquid-Solid Operations and Equipment* in: *Perry's Chemical Engineers' Handbook* (Perry, R.H., Green, D.W. – ed.): 7th ed., McGraw-Hill, New York, **1997**
34. Ambler, C.M.: *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, **1959**, **1**, 185 – 205
35. Svarovsky, L.: *Separation by centrifugal sedimentation* in: *Solid – Liquid Separation* (Svarovsky, L. – ed.), 4th ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, **2000**
36. Axelsson, H. in: *Comprehensive Biotechnology*, **2**: *The Principles of Biotechnology: Engineering Considerations* (Clooney, C.L., Humphrey, A.E. – ed.), Pergamon Press, Oxford, **1985**, 325 – 346
37. Axelsson, H.: *Cell Separation, Centrifugation*, in: *Encyclopedia of Bioprocess Technology* (Flickinger, M.C., Drew, S.W. – eds.), **2**, Wiley Interscience, New York, **1999**
38. Apeelman, S., Björling, T.: *Biotech. For. Eur.*, **1991**, **8**, 356 – 358
39. Mayer, M., Woernle, R.: *Chem.-Ing.-Tech.*, **1985**, **57**, 152 – 153
40. Hanle, D.D.: *Centrifuges, Animal Cells* in: *Encyclopedia of Bioprocess Technology* (Flickinger, M.C., Drew, S.W. – eds.), **2**, Wiley Interscience, New York, **1999**
41. Middelberg, P.J., O'Neill, B.K., Bogle, I.D.L.: *Trans. Inst. Chem. Eng.*, **1992**, **70**, 8 – 12
42. Westfalia Separator Industry: *Pharmaceutical Biotechnology. Components, Systems, Installations*, Brochure 9997-8203-010/0503 EN, disponibil la: <http://www.westfalia-separator.com/pdfs/9997-8203-010.pdf>
43. Baker, R.W.: *Membrane Separation* in: *Encyclopedia of Separation Science* (Wilson, I.D. – ed.), **1**, Academic Press, London, **2000**
44. http://www.ncnr.nist.gov/programs/reflect/rp/biology/cell_membrane.html
45. <http://microscopy.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>
46. http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.htm
47. http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Lysing_Enzymes.html
48. <http://www.leica-microsystems.com/WebSite/ImageGallery.nsf/>
49. http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=60
50. Doulah, M.S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **1977**, **19**, 649 – 660
51. Kuboi, R., Umakoshi, H., Takagi, N., Komasa, I.: Optimal disruption methods for the selective recovery of β -galactosidase from *Escherichia coli*, *J. Ferment. Bioeng.*, **1995**, **79**(4), 335 – 341
52. Hetherington, P.J., Follows, M., Dunnill, P., Lilly, M.D.: *Trans. Inst. Chem. Eng.*, **1971**, **49**, 142 – 148
53. Garcia, F.A.P.: *Cell Disruption and Lysis* in: *Encyclopedia of Bioprocess Technology* (Flickinger, M.C., Drew, S.W. – eds.), **2**, Wiley Interscience, New York, **1999**
54. Engler, C.R., Robinson, C.W.: Effects of organism type and growth conditions on cell disruption by impingement, *Biotechnol. Lett.*, **1981**, **3**, 83 – 88
55. Hetherington, P.J., Follows, M., Dunnill, P., Lilly, M.D.: Release of protein from bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial homogeniser, *Trans. Inst. Chem. Eng.*, **1971**, **49**, 142 – 148
56. Doulah, M.S., Hammond, T., Brookman, J.S.G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **1975**, **17**, 845 – 858
57. Sauer, T., Robinson, O.W., Glick, B.R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **1989**, **33**, 1330 – 1342
58. http://www.microfluidicscorp.com/pdf/tb_hc.pdf
59. Siddiqi, S.F., Bulmer, M., Shamlou, P.A., Titchener-Hooker, N.J.: The effects of fermentation conditions on yeast cell debris particle size distribution during high pressure homogenization, *Bioprocess Eng.*, **1995**, **14**(1), 1 – 8
60. Bratu, E.A.: *Operații unitare în ingineria chimică*, **1**, Ed. Tehnică, București, **1984**
61. <http://www.btc-bti.com/applications/yeasthomogenization.htm>
62. Limon-Lason, J., Hoare, M., Orsborn, C.B., Doyle, D.J., Dunnill, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **1979**, **21**, 745 – 774
63. http://www.btc-bti.com/product_literature/grindingmedia.htm
64. Chaplin, M., Bucke, C.: *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, **1990** (text abreviat, disponibil online la: <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/index.html> , postat 20.12.2004)
65. Baldwin, C.V., Robinson, C.W.: Enhanced disruption of *Candida utilis* using enzymatic pretreatment and high-pressure homogenization *Biotechnol. Bioeng.*, **1994**, **43**(1), 46 – 56
66. Bunge, F., Pietzsch, M., Müller, R., Syldatk, C.: Mechanical disruption of *Arthrobacter sp.* DSM 3747 in stirred ball mills for the release of hydantoin-cleaving enzymes, *Chem. Eng. Sci.*, **1992**, **47**(1), 225 – 232

67. Majors, R.E.: Sample Preparation for Large-Scale Protein Purification, *LCGC North America*, August 1, **2005**, disponibil la:
<http://neuro.healthcentersonline.mediwire.com/main/Default.aspx?P=Content&ArticleID=172950>
68. http://www.microfluidicscorp.com/cell_disruption/cell_disruption.html
69. Lee, C.H., Tsang, S.K., Urakabe, R., Rha, R.A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **1979**, **21**, 1 – 17
70. Ropars, M., Marchal, R., Pourquie, J., Vandecasteele, J.P.: Large scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass, *Bioresource. Technol.*, **1992**, **42**(2), 197 – 203
71. Petre, M., Zarnea, G., Adrian, P., Gheorghiu, E.: Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels, *Resource, Conversion and Recycling*, **1999**, **27**(2), 309 – 332
72. Vogels, G., Kula, M.-R.: Combination of enzymatic and/or thermal pretreatment with mechanical cell disintegration, *Chem. Eng. Sci.*, **1992**, **47**(1), 123 – 131
73. Dabora, R.L., Cooney, C.L.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **1990**, **43**, 11 – 30
74. Clarkson, A.I., Lefevre, P., Titchener-Hooker, N.J.: A study of process interactions between cell disruption and debris clarification stages in the recovery of yeast intracellular products, *Biotechnol. Prog.*, **1993**, **9**(5), 462 – 467
75. Keshavarz, E., Bonnerjea, J., Hoare, M., Dunnill, P.: Disruption of a fungal organism, *Rhizopus nigricans*, in a high-pressure homogenizer, *Enzyme Microb. Technol.*, **1990**, **12**(7), 494 – 498
76. Carlson, A., Signs, M., Liermann, L., Boor, R., Jem, K.J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, **48**, 303 – 315
77. Agerkvist, I., Enfors, S.-O.: Characterization of *E. coli* cell disintegrates from a bead mill and high pressure homogenizers, *Biotechnol. Bioeng.*, **1990**, **36**(11), 1083 – 1089
78. Siddiqi, S.F., Titchener-Hooker, N.J., Shamlou, P.A.: Simulation of particle size distribution changes occurring during high-pressure disruption of bakers' yeast, *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, **50**(2), 145 – 150
79. Mukhopadhyay, A.: Biotreatment, downstream processing and modeling, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **1997**, **56**, 61 – 109
80. Wong, H.H., O'Neill, B.K., Middelberg, A.P.J.: A mathematical model for *Escherichia coli* debris size reduction during high pressure homogenisation based on grinding theory, *Chemical Engineering Science*, **1997**, **52**(17), 2883 – 2890
81. Bailey S.M., Mragher, M.M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **1997**, **56**, 304 – 310
82. Kasatkin, A.G.: *Procese și aparate principale în tehnologia chimică*, ed a 2-a, Ed. Tehnică, București, **1963**
83. Bratu, E.A.: *Operații unitare în ingineria chimică*, **3**, Ed. Tehnică, București, **1985**
84. Dobre, T., Floarea, O.: *Separarea compușilor chimici din produse naturale*, Ed. Matrix Rom, București, **1997**
85. Stoica Guzun, A., Stroescu, M., Dobre, T., Floarea, O.: *Operații de transfer interfazic*, Ed. Matrix Rom, București, **2001**
86. Perry, R.H., Green, D.W. (ed.): *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 7th ed., McGraw-Hill, New York, **1997**
87. Richardson, J.F., Harker, J.H.: *Coulson and Richardson's Chemical Engineering*, **2**, 5th ed., *Particle Technology and Separation Processes*, Butterworth-Heinemann, Oxford, **2002**
88. Rydberg, J.: *Introduction to solvent extraction*, in *Principles and Practices of Solvent Extraction* (Rydberg, U., Musikas, C., Choppin, G.R. – eds.), Marcel Dekker, New York, **1992**
89. Stoica Guzun, A., Floarea, O., Dobre, T.: *Transfer de masă și reacție chimică la interfața lichid – lichid*, Ed. Matrix Rom, București, **2000**
90. Gavrilă, L.: *Fenomene de transfer*, **2**, *Transfer de căldură și de masă*, Ed. Alma Mater, Bacău, **2000**
91. Gu, T.: *Liquid – liquid partitioning methods for bioseparations*, in: *Handbook of Bioseparations* (Ahuja, A. – ed.), **2**, Academic Press, New York, **2000**
92. Schügerl, K.: *Solvent Extraction in Biotechnology: Recovery of Primary and Secondary Metabolites*, Springer-Verlag, Berlin, **1994**
93. Thornton, J.D.: *Science and Practice of Liquid – Liquid Extraction*, **2**, Oxford University Press, New York, **1992**
94. Lo, T.C., Baird, M.H.I.: *Solvent Extraction*, in: *Encyclopedia of Physical Science and Technology, Chemical Engineering*, (Meyers, R.A. – ed.), 3rd ed., Academic Press, Orlando, **1987**
95. Horvath, A.L.: *Molecular Design*, Elsevier, Amsterdam, **1992**
96. Seader, J.D., Henley, E.: *Separation Process Principles*, John Wiley, New York, **1998**
97. Mavriounioutis, M. (ed.): Special issue on design of chemical compounds, *Computers and Chemical Engineering Journal*, **1998**, **22**, 713
98. Harper, P., Gani, R., Kolar, P., Ishikawa, T.: Computer aided molecular design with combined molecular modeling and group contribution, *Fluid Phase Equilibria*, **1999**, **337**, 158 – 160
99. Harper, R.G.P.M., Hostrup, M.: *Solvent Based Separation* in: *Encyclopedia of Separation Science* (Wilson, I.D. – ed.), Academic Press, London, **2000**
100. Lo, T.C., Baird, M.H.I.: *Liquid – Liquid Extraction* in: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical technology*, 4th ed., **10**, Wiley Interscience, New York, **1994**
101. Barson, N., Beyer, G.H.: *Chem. Eng. Progr.*, **1953**, **49**, 243

Bibliografie

102. Tudose, R.Z., Ibănescu, I., Vasiliu, M., Stancu, A., Cristian, G., Lungu, M.: *Procese, operații, utilaje în industria chimică*, Ed. Didactică și Pedagogică, București, **1977**
103. Brunner, K.H.: *Separatoren und Dekanter für die kontinuierliche Extraktion*, 3rd ed., Westfalia Separator AG, Oelde, **1991**
104. Westfalia AG: *Extraction*, disponibil la: <http://www.westfalia-separator.com/pdfs/9997-7651-010.pdf>
105. Meikrantz, D.H., Meikrantz, S.B., St. George, M.: Continuous Liquid – Liquid Extraction via an Improved Centrifugal Contactor, *Symposium on Extraction Practice, AIChE Spring National Meeting*, March 8 – 12, **1998**
106. Trandafir, I.: *Studii în extracția lichid – lichid*, Teză de doctorat, Universitatea Tehnică “Gh. Asachi” Iași, **2003**
107. Baier, G.: *Liquid – Liquid Extraction Based on a New Flow Pattern: Two – Fluid Taylor – Couette Flow*, Ph.D. Dissertation, University of Wisconsin – Madison, May **1999**
108. Meikrantz, D.H., Macaluso, L.L., Flim, W.D., Heald, C.J., Mendoza, G., Meikrantz, S.B.: A New Annular Centrifugal Contactor for Pharmaceutical Processes, *Chemical Engineering Communications*, **2002**, 189(12), 1629 – 1639
109. Chisti, Y.: *Strategies in Downstream Processing*, in: *Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook*, 2 (Subramanian, G. – ed.), Wiley-VCH, New York, **1998**
110. Reissinger, K.-H., Schröter, J.: Selection Criteria for Liquid-Liquid Extractors, *Chem. Eng.*, November **1978**, 109 – 118
111. Baird, M.H.I., Rao, N.V.R., Prochazka, J., Sovova, H.: *Reciprocating-plate columns*, in: *Liquid – Liquid Extraction Equipment* (Godfrey, J.C., Slater, M.J. – eds.), Wiley Interscience, New York, **1994**
112. Belter, P.A., Cussler, E.L., Hu, W.-S.: *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology*, Wiley, New York, **1988**
113. Kertes, A.S., King, C.J.: Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids, *Biotechnology and Bioengineering*, **1986**, 28, 269 – 282
114. Reuben, B.G., Sjöberg, K.: *Chemotechnol.*, **1981**, 11, 315
115. Wennersten, R.: *Extraction of Organic Compounds* in: *Solvent Extraction Principles and Practice* (Rydberg, J., Cox, M., Musicas, C., Choppin, G.R. – eds.), 2nd ed., Marcel Dekker, New York, **2004**
116. Essien, D.E., Pyle, D.L.: *Fermentation ethanol recovery by solvent extraction* in: *Separations for Biotechnology* (Verrall, M.S., Hudson, M.J. – eds.), Ellis Horwood, Chichester, **1987**
117. Roffler, S.R., Blanch, H.W., Wilke, C.R.: In-situ extractive fermentation of acetone and butanol, *Biotechnology and Bioengineering*, **1988**, 31, 135-143
118. Weatherley, L.R.: *Some current developments and extraction techniques* in: *Science and Practice of Liquid-Liquid Extraction* (Thornton, J.D. – ed.), **2**, Oxford University Press, New York, **1992**
119. Mattiasson, B., Suominen, M., Andersson, E., Haggstrom, L., Albertsson, P.-Å., Hahn-Hägerdahl, B.: Solvent production by *Clostridium acetohutylicum* in aqueous two phase systems, *Enzyme Engineering*, **1982**, 6, 153 – 155
120. Wang, H.Y., Robinson, E.M., Lee, S.S.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **1981**, 11, 555 – 565
121. Lloyd-Jones, E.: *Chem Ind.*, **1967**, 1590
122. Lurgi Life Science Technologies GmbH: *Citric Acid by a Gypsum-free Process*, Technical Brochure 260e/5.00/10
123. Wennersten, R.J.: *Chem. Tech. Biotechnol.*, **1983**, 33, 85
124. Zigorvá, J., Šturdik, E.: Advances in Biotechnological Production of Butyric Acid, *J. Ind. Microbio. & Biotech.*, **2000**, 24, 153
125. Pouillart, P.R.: Role of butyric acid and its derivatives in the treatment of colorectal cancer and haemoglobinopathies, *Life Sciences*, **1998**, 63(20), 1739 – 1760
126. Kirbaşlar, Ş.I.: Liquid-Liquid Equilibria of the Water + Butyric Acid + Decanol Ternary System, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **2006**, 23(3), 365 – 374
127. Beijerinck, M.W.: Über eine Besonderheit der löslichen Stärke, *Zentralbl. Bakteriol.*, **1896**, 2, 697 – 699
128. Albertsson, P.A.: *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, John Wiley & Sons, New York, **1986**
129. Kula, M.-R., Selber, K.: *Protein Purification, Aqueous Liquid Extraction* in: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation* (Flickinger, M.C., Drew, S.W. – eds.), John Wiley Interscience, New York, **1999**
130. Terstappen, G.C., Ramelmeier, R.A., Kula, M.-R.: Protein partitioning in detergent-based aqueous two-phase systems, *J. Biotechnol.*, **1993**, 28(2-3), 263 – 275
131. Alred, P.A., Kozłowski, A., Harris, J.M., Tjerneld, F.: Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 659(2), 289 – 298
132. Johansson, H.-O., Karlsström, G., Mattiasson, B., Tjerneld, F.: *Bioseparation*, **1995**, 5, 269 – 279
133. Persson, J., Nyström, L., Ageland, H., Tjerneld, F.: Purification of recombinant apolipoprotein A-I^{Milano} expressed in *Escherichia coli* using aqueous two-phase extraction followed by temperature-induced phase separation, *J. Chromatogr. B*, **1998**, 711(1-2), 97 – 109
134. Hustedt, H., Kroner, K.H., Kula, M.-R. in: *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems* (Walter, H., Brooks, D.E., Fisher, D. – eds.), Academic Press, Orlando, **1985**, 529 – 587

135. Kubek, D.J. in: *Protein Purification Process Engineering*, (Harrison, R.G. – ed.), Marcel Dekker, New York, **1994**, 87 – 114
136. Asenjo, J.A., Chaudhuri, J.B.: *Innovative separation methods in bioprocessing* in: *Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries – Principles and Applications* (Grandison, A.S., Lewis, M.G. – eds.), Woodhead Publishing, Cambridge, **1996**
137. Schütte, H., Hummel, W., Kula, M.-R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1984**, **19**, 167 – 176
138. Diamond, A.D., Hsu, J.T.: Aqueous two-phase systems for biomolecule separation, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **1992**, **47**, 89 – 135
139. Wünschell, G.E., Naranjo, E., Arnold, F.: Aqueous two-phase metal affinity extraction of heme proteins, *Bioproc. Eng.*, **1990**, **5**(5), 199 – 202
140. Chung, B.H., Bailey, D., Arnold, F.H.: *Metal Affinity Partitioning* in: *Methods in Enzymology*, **228** (Walter, H., Johansson, G. – eds.), Academic Press, San Diego, **1994**, 167 – 179
141. Lee, C.K., Sandler, S.I.: Vancomycin partitioning in aqueous two-phase systems: effects of pH, salts, and an affinity ligand, *Biotechnol. Bioeng.*, **1990**, **35**(4), 408
142. Kula, M.-R.: Extraction and purification of enzymes using aqueous two-phase systems, *Appl. Biochem. Bioeng.*, **1979**, **2**, 71 – 95
143. Zaslavsky, B.Y.: *Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications*, Marcel Dekker, New York, **1995**
144. Kroner, K.H., Schütte, H., Stach, W., Kula, M.-R.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1982**, **32**, 130 – 137
145. Schütte, H., Kroner, K.H., Hummel, W., Kula, M.-R.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1983**, **413**, 270 – 282
146. Hart, R.A., Ogez, J.R., Builder, S.E.: *Bioseparation*, **1995**, **5**, 113 – 121
147. Kelley, B.D., Wang, D.I.C., Hatton, T.A.: Affinity-based reversed micellar protein extraction. I: Principles and protein-ligand systems, *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, **42**(10), 1199 – 1208
148. Papamichael, N., Hustedt, H.: *Enzyme Recovery by Continuous Crosscurrent Extraction* in: *Methods in Enzymology*, **228** (Walter, H., Johansson, G. – eds.), Academic Press, San Diego, **1994**, 573 – 584
149. Fauqueux, P.-F., Hustedt, H., Kula, M.-R.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1985**, **35B**, 51 – 59
150. Johansson, G.: *Recovery of Proteins and Phase-Forming Chemicals* in: *Methods in Enzymology*, **228** (Walter, H., Johansson, G. – eds.), Academic Press, San Diego, **1994**, 569 – 573
151. Minuth, T., Thömmes, J., Kula, M.-R.: Extraction of cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* using a nonionic surfactant-based aqueous two-phase system, *J. Biotechnol.*, **1995**, **38**(2), 151 – 164
152. Hustedt, H., Kroner, K.-H., Menge, U., Kula, M.-R.: *Enzyme Eng.*, **1988**, **5**, 45 – 47
153. Kula, M.-R., Kroner, K.H., Hustedt, H.: *Adv. Biochem. Eng.*, **1982**, **24**, 73 – 118
154. Jafarabad, K.R., Sawant, S.B., Joshi, J.B., Sikdar, S.K.: Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems. I: spray extraction columns, II: York-Scheibel extraction columns, *Chem. Eng. Science*, **1992**, **47**(1), 57 – 68, 69 – 73
155. Sawant, S.B., Joshi, J.B., Sikdar, S.K.: Hydrodynamics and mass transfer characteristics of spray column for two phase aqueous extraction, *Biotechnology and Bioengineering*, **1990**, **36**, 109
156. Bhawar, P.C.M., Pandit, A.B., Sawant, S.B., Joshi, J.B.: Enzyme mass transfer coefficient in a sieve plate extraction column, *The Chemical Engineering Journal*, **1994**, **55**, B1 – B17
157. Patil, T.A., Jafarabad, K.R., Sawant, S.B., Joshi, J.B.: Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two phase system using a packed extraction column, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **1991**, **69**, 548 – 556
158. Dos Reis Coimbra, J., Thömmes, J., Meirelles, A., Kula, M.-R.: *Bioseparation*, **1995**, **5**, 259 – 268
159. Dos Reis Coimbra, J., Thömmes, J., Kula, M.-R.: Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a Graesser contactor, *J. Chromatogr. A*, **1994**, **668**(1), 85 – 94
160. Couper, J.R., Penney, W.R., Fair, J.R., Walas, S.M.: *Chemical Process Equipment: Selection and Design*, 2nd ed., Gulf Professional Publishing, Burlington, **2005**
161. Carlsson, A.: Factors influencing the use of aqueous two-phase for protein purification, *Separation Science and Technology*, **1988**, **23**(8-9), 765
162. Papamichael, N., Börner, B., Hustedt, H.: Continuous aqueous phase extraction of proteins: automated processing and recycling of process chemicals, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1992**, **54**(1), 47 – 55
163. Kula, M.-R., Kroner, K.L., Hustedt, H.: Purification of enzymes by liquid-liquid extraction, *Advances in Biochemical Engineering*, **1982**, **24**, 73 – 118
164. Minuth, T., Thömmes, J., Kula, M.-R.: A closed concept for purification of the membrane-bound cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* by surfactant-based cloud-point extraction, organic-solvent extraction and anion-exchange chromatography, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1996**, **23**(2), 107 – 116
165. Greve, A., Kula, M.-R.: Cost structure and estimation for the recycling of salt in a protein extraction process, *Bioprocess Eng.*, **1991**, **6**(4), 173 – 177
166. Greve, A., Kula, M.-R.: Recycling of salt from the primary bottom phase of a protein extraction process, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1991**, **50**(1), 27 – 42
167. van Berlo, M., Luyben, K.C.A.M., van der Wielen, L.A.M.: Polyethylene glycol-salt aqueous two-phase systems with easily recyclable volatile salts, *Journal of Chromatography B*, **1998**, **711**(1-2), 61 – 68

Bibliografie

168. Hart, R.A., Lester, P.M., Riefsnyder, H., Ogez, J.R., Builder, S.E.: Large scale, in situ isolation of periplasmic IGF- from *E. coli*, *Bio/Technology*, **1994**, 12(11), 1113 – 1117
169. Kim, C.Y., Brewer, J.W., Brothers, C.E., Farver, T.F., Lee, E.K.: *3rd Chemical Cong. of North America*, Toronto, Canada, June 5 – 10, **1988**
170. Hustedt, H., Börner, B., Kroner, K.H., Papamichael, N.: *Biotechnol. Tech.*, **1987**, 1, 49 – 54
171. Hustedt, H., Papamichael, N.: *Enzyme Eng.*, **1988**, 2, 135 – 139
172. Kroner, K.H., Hustedt, H., Kula, M.-R.: *Process Biochem.*, **1984**, 19, 170 – 179
173. Hellebust, H., Veide, A., Enfors, S.: *J. Biotechnol.*, **1988**, 7, 185 – 198
174. Pulliam, T.R., Winston, S., Bentley, W.E.: Tryptophan regulated expression and aqueous two-phase separation of recombinant HIV-fusion peptides, *Enzyme and Microbial Technology*, **1997**, 20(1), 46 – 51
175. Johansson, G., Andersson, M.: *J. Chromatogr.*, **1984**, 303, 39
176. Cordes, A., Kula, M.-R.: Large-Scale Purification of Formate Dehydrogenase in: *Methods in Enzymology*, **228** (Walter, H., Johansson, G. – eds.), Academic Press, San Diego, **1994**, 600 – 617
177. Zulauf, M., Eicke, H.F.: Inverted Micelles and Microemulsions in the Ternary-System H₂O-Aerosol-OT-Isooctane as Studied by Photon Correlation Spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry*, **1979**, 4, 480 – 486
178. Pileni, M.P., Zemb, T., Petit, C.: Solubilization by reverse micelles: Solute localization and structure perturbation, *Chem. Phys. Lett.*, **1985**, 118, 414 – 420
179. Luisi, P.L.: Enzymes Hosted in Reverse Micelles in Hydrocarbon Solution, *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1985**, 6, 439 – 450
180. Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P., Robinson, B.H.: Reverse Micelles as Hosts for Proteins and Small Molecules, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1988**, 1, 209 – 246
181. Pileni, M.P. (ed.): *Reverse micelles*, Elsevier, Amsterdam, **1989**
182. Peng, Q., Luisi, P.L.: The Behavior of Proteases in Lecithin Reverse Micelles, *European Journal of Biochemistry*, **1990**, 188(2), 471 – 480
183. Evans, D.F., Mitchell, D.J., Ninham, B.W.: Oil, water and surfactant: properties and conjectured structure of simple microemulsions, *J. Phys. Chem.*, **1986**, 90, 2817 – 2825
184. André, P., Filankembo, A., Lisiecki, I., Petit, C., Gulik-Krzywicki, T., Ninham, B.W., Pileni, M.P.: Supra-aggregation: Microphase formation in complex fluids, *Adv. Mater.*, **2000**, 12(2), 119 – 123
185. Hyde, S. *et al.* – eds.: *The Language of Shape: The Role of Curvature in Condensed Matter: Physics, Chemistry and Biology*, Elsevier, Oxford, **1997**
186. Pileni, M.P.: The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals, *Nature Materials*, **2003**, 2, 145 – 150
187. Peng, Q.: *Biological Function and Conformation of Proteases in Reverse Micelles*, ETH Diss No. 9114, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, **1990**
188. Walde, P., Giuliani, A.M., Boicelli, C.A., Luisi, P.L.: Phospholipid-Based Reverse Micelles, *Chemistry and Physics of Lipids*, **1990**, 53, 265 – 288
189. El Seoud, O.A.: Acidities and Basicities in Reversed Micellar Systems in: *Reverse Micelles: Biological and Technological Relevance of Amphiphilic Structures in Apolar Media* (Luisi, P.L., Straub, B.E. – eds.), Plenum Press, New York, **1984**, 81 – 93
190. Higuchi, W.I., Misra, J.: Solubilization in Nonpolar Solvents - Influence of Chain Length of Solvent on Solubilization of Water by Diocryl Sodium Sulfosuccinate, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1962**, 51(5), 455 – 458
191. Rabie, H.R., Vera, J.H.: Generalized Water Uptake Modelling of Water-in-Oil Microemulsions. New experimental results for Aerosol-ot-Isooctane-water-salts systems, *Fluid Phase Equilibria*, **1996**, 122, 169 – 186
192. Fletcher, P.D.I., Howe, A.M., Robinson, B.H.: The Kinetics of Solubilise Exchange between Water Droplets of a Water-in-Oil Microemulsion, *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I*, **1987**, 83, 985 – 1006
193. Pessoa Jr, A., Vitolo, M.: Recovery of Inulinase Using BDBAC Reversed Micelles, *Proc. Biochem.*, **1998**, 33(3), 291 – 297
194. Hanley, A.B., Grinfeld, E., Baxter, R.L.: The Cleavage of Nucleic Acids in Reversed Micelles Using Site Specific Endonucleases, *Biocatalysis*, **1990**, 3, 253 – 258
195. Eicke, H.F., Shepherd, J.C.W., Steinemann, A.: Exchange of Solubilized Water and Aqueous-Electrolyte Solutions between Micelles in Apolar Media, *Journal of Colloid and Interface Science*, **1976**, 56(1), 168 – 176
196. Pietrini, A.V.: *Biochemical Reactions in Micro- and Nanocompartments*, ETH Diss No. 15216, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, **2003**
197. Pessoa Jr, A., Vitolo, M.: Separation of Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Reversed Micellar Extraction, *Biotechnol. Techn.*, **1997**, 11(6), 421 – 422
198. Krei, G., Meyer, U., Börner, B., Hustedt, H.: Extraction of α -Amylase Using BDBAC-Reversed Micelles, *Bioseparation*, **1995**, 5, 175 – 183
199. Andrews, B.A., Pyle, D.L., Asenjo, J.A.: Effect of pH and Ionic Strength on the Partitioning of Four Proteins in Reversed Micelle Systems, *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, 43(11), 1052 – 1058

200. Fletcher, P.D.I., Parrot, D.: The partitioning of proteins between water-in-oil microemulsions and conjugate aqueous phases, *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I*, **1988**, 84(4), 1131 – 1144
201. Krei, G.A., Hustedt, H.: Extraktion von Enzymen Mittels Reverser Mizelle, *Bio Engineering*, **1992**, 47(1), 99 – 111
202. Regalado, C., Asenjo, J.A., Pyle, D.L.: Studies on the Purification of Peroxidase from Horseradish Roots Using Reversed Micelles, *Enz. Microb. Technol.*, **1996**, 18(5), 332 – 339
203. Göklen, K.E., Hatton, T.A.: Liquid-liquid extraction of low-molecular weight proteins by selective solubilisation in reversed micelles, *Sep. Sci. Technol.*, **1987**, 22, 831 – 841
204. Marcozzi, G., Correa, N., Luisi, P.L., Caselli, M.: Protein Extraction by Reversed Micelles: a Study of the Factors Affecting the Forward and Backward Transfer of α -Chymotrypsin and its Activity, *Biotechnol. Bioeng.*, **1991**, 38(10), 1239 – 1246
205. Andrews, B.A., Haywood, K.: Effect of pH, Ion Type and Ionic Strength on Partitioning of Proteins in Reversed Micelle Systems, *J. Chromat. A*, **1994**, 668(1), 55 – 60
206. Pires, M.J., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S.: Liquid-Liquid Extraction of Proteins with Reversed Micelles, *Biotechnol. Prog.*, **1996**, 12(3), 290 – 301
207. Kilikian, B.V., Bastazin, M.R., Minami, N.M., Gonçalves, E.M.R., Pessoa Jr., A.: Liquid-liquid extraction by reversed micelles in biotechnological processes, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **2000**, 17(1), 29 – 38
208. Castro, M.J.M., Cabral, J.M.S.: Reversed Micelles in Biotechnological Processes, *Biotech. Adv.*, **1988**, 6, 151 – 167
209. Kadam, K.I.: Reversed Micelles as a Bioseparation Tool, *Enzyme Microb. Technol.*, **1986**, 8, 266 – 273
210. Chang, Q.L., Chen, J.Y.: Purification of Industrial α -amylase by Reversed Micellar Extraction, *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, 48, 745 – 748
211. Chang, Q.L., Chen, J.Y., Zhang, X.F., Zhao, N.M.: Effect of the Cosolvent Type on the Extraction of α -Amylase with Reversed Micelles: Circular Dichroism Study, *Enz. Microb. Technol.*, **1997**, 20, 87 – 92
212. Regalado, C., Asenjo, J.A., Pyle, D.L.: Protein Extraction by Reversed Micelles: Studies on the Recovery of Horseradish Peroxidase, *Biotechnol. Bioeng.*, **1994**, 44, 674 – 681
213. Chang, Q.L. and Chen, J.Y.: Reversed Micellar Extraction of Trypsin: Effect of Solvent on the Protein Transfer and Activity Recovery, *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, 46, 172 – 174
214. Shiomori, K., Kawano, Y., Kuboi, R., Komasa, I.: Effective Purification Method of Large Molecular Weight Proteins Using Conventional AOT Reversed Micelles, *J. Chem. Eng.*, **1995**
215. Dekker, M.: *Enzyme recovery using reversed micelles*, Ph.D. diss., Agricultural University of Wageningen, Department of Food Engineering, Wageningen, Netherlands, **1990**
216. Dekker, M., Koenen, P.H.M., van't Riet, K.: *Trans. I. Chem. Eng.*, **1991**, 69(C), 54
217. Forney, C.E., Glatz, C.E.: Extraction of Charged Fusion Proteins in Reversed Micelles: Comparison between Different Surfactant Systems, *Biotechnol. Prog.*, **1995**, 11, 260 – 264
218. Leser, M.E., Wei, G., Luisi, P.L., Maestro, M.: Application of reverse micelles for the extraction of proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1986**, 135, 629 – 635
219. Wolbert, R.B.G., Hilhorst, R., Voskuilen, G., Nachtegaal, H., Dekker, M., van't Riet K., Bijsterbosch, B.H.: Protein transfer from an aqueous phase into reversed micelles: the effect of protein size and charge distribution, *Eur. J. Biochem.*, **1989**, 184, 627 – 633
220. Carlson, A., Nagarajan, R.: *Biotechnol. Prog.*, **1992**, 8, 85
221. Hu, Z., Gulari, E.: Protein extraction using the sodium bis(2-ethylhexyl) phosphate (NaDEHP) reverse micellar system, *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, 50(2), 203 – 206
222. Dekker, M., van't Riet, K., Bijsterbosch, B.H., Fijneman, P., Hilhorst, R.: Mass transfer rate of protein extraction with reversed micelles, *Chem. Eng. J.*, **1986**, 33, B27 – B33
223. Kelley, B., Wang, D.C., Hatton, T.A.: Affinity-based reversed micellar protein extraction. II: Effect of cosurfactant tail length, *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, 42(10), 1209 – 1217
224. Sun, Y., Ichikawa, S., Sugiura, S., Furusaki, S.: Affinity extraction of proteins with a reversed micellar system composed of Cibacron Blue-modified lecithin, *Biotechnology and Bioengineering*, **1998**, 58(1), 58 – 64
225. Zhang, T., Lit, H., Chen, J.: *Biochem. Eng. J.*, **1999**, 4, 17 – 21
226. Hong, D.P., Lee, S.S., Kuboi, R.: Conformational transition and mass transfer in extraction of proteins by AOT-alcohol-isooctane reverse micellar systems, *J. Chromatography B*, **2000**, 743(1-2), 203 – 312
227. Lee, S.-S., Lee, B.-K., Choi, J.-S., Lee, J.-P.: Effect of Alcohol Addition on Back-Extraction of BSA and Cytochrome c Using AOT Reverse Micellar System, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2001**, 22(8), 897 – 902
228. Dekker, M., van't Riet, K., Bijsterbosch, B.H., Wolbert, R.B.G., Hilhorst, R.: Mass transfer rate of protein extraction with reversed micelles, *Chem. Eng. Sci.*, **1990**, 45(9), 2949 – 2957
229. Nishiki, T., Sato, A., Kataoka, T.: *Solv. Ext. in the Process Industries*, **1993**, 2, 840
230. Yamada, Y., Kuboi, R., Komasa, I.: Extraction of enzymes and their activities in AOT reverse micellar systems modified with nonionic surfactants, *J. Chem. Eng. Japan*, **1994**, 27(3), 404 – 409

Bibliografie

231. Nishiki, T., Muto, A., Kataoka, T., Kato, D.: Back extraction of proteins from reversed micellar to aqueous phase : Partitioning behaviour and enrichment, *Chemical Engineering Journal and The Biochemical Engineering Journal*, **1995**, 59(3), 297 – 301
232. Lye, G.J., Asenjo, J.A., Pyle, D.L.: Reverse micellar mass-transfer processes spray column extraction of lysozyme, *AIChE J.*, **1996**, 42(3), 713 – 726
233. Lye, G.J., Asenjo, J.A., Pyle, D.L.: Protein extraction using reverse micelles: Kinetics of protein partitioning, *Chem. Eng. Sci.*, **1994**, 49(19), 3195 – 3204
234. Albery, W.J., Choudhery, R.A., Atay, N.Z., Robinson, B.H.: Rotating diffusion cell studies of microemulsions kinetics, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **1987**, 83(8), 2407 – 2419
235. Carneiro-da-Cunha, M.G., Aires-Barros, M.R., Tambourgi, E.B., Cabral, J.M.S.: Recovery of a Recombinant Cutinase with Reversed Micelles in a Continuous Perforated Rotating Disc Contactor, *Biotechnol. Techn.*, **1994**, 8, 413 – 418
236. Han, D.H., Lee, S.J., Hong, W.H.: Separation of Intracellular Proteins from *Candida utilis* Using Reversed Micelles in a Spray Column, *Biotechnol. Techn.*, **1994**, 8, 105 – 110
237. Jarudilokkul, S., Stuckey, D.C.: Continuous forward and back extraction of lysozyme from egg white using reverse micelles, *Separation Science and Technology*, **2001**, 36(4), 657 – 669
238. Lo, T.C.: Commercial liquid-liquid extraction equipment in: *Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers* (Schweitzer, P.A. – ed.), McGraw-Hill, New York, **1988**
239. Kelley, B.D., Wang, D.I.C., Hatton, T.A.: Affinity-based reversed micellar protein extraction. I: Principles and protein-ligand systems *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, 42(10), 1199 – 1208
240. Pires, M.J., Cabral, J.M.S.: Liquid-liquid extraction of a recombinant protein with reverse micelles, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1994**, 61(3), 219 – 224
241. Chaudhuri, J.B.: *2nd Interlaken Conference on Advances in Purification of Recombinant Proteins*, Interlaken, Switzerland, March, **1991**
242. Giovenco, S., Verheggen, F., Laane, C.: Purification of intracellular enzymes from whole bacterial cells using reversed micelles, *Enz. Microb. Technol.*, **1987**, 9, 470 – 473
243. Han, D.H., Lee, Y.S., Hong, W.H., Direct Recovery of Intracellular Proteins from *Candida utilis* Using Reversed Micelles in Combination with a Reducing Agent, *Biotechnol. Techn.*, **1993**, 8, 545 – 550
244. Hagen, A.J., Hatton, T.A., Wang, D.I.C.: Protein refolding in reversed micelles, *Biotechnol. Bioeng.*, **1990**, 35(10), 955 – 965
245. Hagen, A.J., Hatton, T.A., Wang, D.I.C.: Protein refolding in reversed micelles: interactions of the protein with micelle components, *Biotechnol. Bioeng.*, **1990**, 35(10), 966 – 975
246. Guzmán, F., Barberis, S., Illanes, A.: Peptide synthesis: chemical or enzymatic, *Electronic Journal of Biotechnology*, **2007**, 10(2), 279 – 314, disponibil la: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue2/full/13/>
247. Nametkin, S.N., Kolosov, M.I., Ovodov, S.Y., Alexandrov, A.N., Levashov, A.V., Alakhov, V.Y., Kabanov, A.V.: Cell-Free Translation in Reversed Micelles, *FEBS Letters*, **1992**, 309(3), 330 – 332
248. Haering, G., Pessina, A., Meussdoerffer, F., Hochkoepller, S., Luisi, P.L.: Solubilization of Bacterial-Cells in Organic-Solvents via Reverse Micelles and Microemulsions, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1987**, 506, 337 – 344
249. Tawfik, D.S., Griffiths, A.D.: Man-Made Cell-Like Compartments for Molecular Evolution, *Nature Biotechnology*, **1998**, 16(7), 652 – 656
250. Griffiths, A.D., Tawfik, D.S.: Miniaturising the laboratory in emulsion droplets, *Trends in Biotechnology*, **2006**, 24(9), 395 – 402
251. Sebba, F.: *Sep. Sci. Technol.*, **1985**, 20, 331
252. Sebba, F.: *Foams and Biliquid Foams: Aphrons*, Wiley, New York, **1987**
253. Lee, D.W., Hong, W.H., Hwang, K.Y.: Removal of an Organic Dye from Water Using a Predispersed Solvent Extraction, *Separation Science and Technology*, **2000**, 35(12), 1951 – 1962
254. Kommalapati, R.R., Roy, D., Valsaraj, K.T., Constant, W.D.: Characterization of colloidal gas aphron suspensions generated from plant-based natural surfactant solutions, *Separation Science and Technology*, **1996**, 31, 2317 – 2333
255. Bredwell, M.D., Worden, R.M.: Mass transfer properties of microbubbles: 1. Experimental studies, *Biotechnology Progress*, **1998**, 14, 31 – 38
256. Kommalapati, R.R., Valsaraj, K.T., Constant, W.D., Roy, D.: Soil flushing using colloidal gas aphron suspensions generated from a plant-based surfactant, *Journal of Hazardous Materials*, **1998**, 60, 73 – 78
257. Roy, D., Valsaraj, K.T., Constant, W.D., Darji, M.: Removal of hazardous oily waste from a soil matrix using surfactants and colloidal gas aphron suspensions under different flow conditions, *Journal of Hazardous Materials*, **1994**, 38, 127 – 144
258. Jutaporn, P., Jarudilokkul, S., Vitaya, V.B: Removal of Pyrene in Pumice by Biodegradable Surfactant in the Forms of Colloidal Gas Aphron and Aqueous Solution, Paper 9-016 (P), *Proceedings of the 2nd Regional Conference on Energy Technology Towards a Clean Environment*, 12-14 February **2003**, Phuket, Thailand

259. Roy, D., Kommalapati, R.R., Valsaraj, K.T., Constant, W.D.: Soil flushing of residual transmission fluid: application of colloidal gas aphron suspensions and conventional surfactant solutions, *Water Research*, **1995**, 29, 589 – 595
260. Ciriello, S., Barnett, S.M., Deluise, F.J.: Removal of heavy-metals from aqueous-solutions using microgas dispersions, *Separation Science and Technology*, **1982**, 4, 521 – 534
261. Cabezon, L.M., Caballero, M., Diaz, J.M., Perezbustamante, J.A.: Multi-elemental separation and determination of some heavy-metals (Cu, Co, Cd, and Ni) in tap water and high salinity media by CGA (Colloidal Gas Aphron) coflotation, *Analysis*, **1991**, 4, 123 – 127
262. Roy, D., Valsaraj, K.T., Kottaisa, S.A.: Separation of organic-dyes from waste-water by using colloidal gas aphrons, *Separation Science and Technology*, **1992**, 27, 573 – 588
263. Basu, S., Malpani, P.R.: Removal of methyl orange and methylene blue dye from water using colloidal gas aphron – effect of processes parameters, *Separation Science and Technology*, **2001**, 36(13), 2997 – 3013
264. Cilliers, J.J., Bradshaw, D.J.: The flotation of fine pyrite using colloidal gas aphrons, *Minerals Engineering*, **1996**, 2, 235 – 241
265. Subramaniam, M.B., Blakebrough, N., Hashim, M.A.: Clarification of suspensions by colloidal gas aphrons, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **1990**, 48, 41 – 60
266. Hashim, M.A., Sengupta, B., Subramaniam, M.B.: Investigations of the flotation of yeast-cells by colloidal gas aphrons (CGA) dispersions, *Bioseparation*, **1995**, 5, 167 – 173
267. Jauregi, P., Varley, J., Gilmour, S.: Characterization of gas aphrons for subsequent use for protein recovery, *Chemical Engineering Journal*, **1997**, 65, 1 – 11
268. Jauregi, P., Varley, J.: Colloidal gas aphrons: A novel approach to protein recovery, *Biotechnology and Bioengineering*, **1998**, 59, 471 – 481
269. Noble, M., Brown, A., Jauregi, P., Kaul, A., Varley, J.: Protein recovery using gas-liquid dispersions, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **1998**, 711(1-2), 31 – 43
270. Amiri, M.C., Valsaraj, K.T.: Effect of gas transfer on separation of whey protein with aphron flotation, *Separation and Purification Technology*, **2004**, 35, 161 – 167
271. Jarudilokkul, S., Rungphetcharat, K., Boonamnuyvitaya, V.: Protein separation by colloidal gas aphrons using nonionic surfactant, *Separation and Purification Technology*, **2004**, 35, 23 – 29
272. Jauregi, P.: Recovery of value added food products using colloidal gas aphrons, SCI London, 30th March, **2006**
273. Fuda, E., Bhatia, D., Jauregi, P.: Selective separation of β -lactoglobulin from sweet whey using CGAs generated from the cationic surfactant CTAB, *Biotechnology and Bioengineering*, **2005**, 90(5), 532 – 542
274. Jauregi, P., Varley, J.: Colloidal gas aphrons: potential applications in biotechnology, *Trends in Biotechnology*, **1999**, 17, 389 – 395
275. Tseng, H., Pilon, L., Warrier, G.R.: Rheology and convective heat transfer of colloidal gas aphrons in horizontal mini-channels, *International Journal of Heat and Fluid Flow*, **2006**, 27, 298 – 310
276. Perescu, N.: *Chimia extracției cu solvenți și aplicații*, Ed. Academiei, București, **1985**
277. Wang, J., Langemann, H.: Unsteady two-film model for mass transfer accompanied by chemical reaction, *Chemical Engineering Science*, **1994**, 49(20), 3457 – 3463
278. Lewis, W.K., Whitman, W.G.: Principles of gas absorption, *Industrial Engineering Chemistry*, **1924**, 16, 1215
279. Bart, H.-J., Stevens, G.W.: *Reactive Solvent Extraction in: Ion Exchange and Solvent Extraction* (Marcus, Y., SenGupta, A.K., Marinski, J.A. – eds.), **17**, Marcel Dekker, New York, **2004**
280. Schäfer, J.P., Sluyts, D.: *VDI-Jahrbuch; VDI/GVC*, VDI-Verlag, Düsseldorf, **1996**, 285 – 295
281. Ritcey, G.M.: in *Value Adding Through Solvent Extraction* (Shallcross, D.C., Paimin, R., Prvcic, L.M. – eds.), The University of Melbourne, Melbourne, **1996**, 17 – 24
282. Cox, M.: *Solvent Extraction in Hydrometallurgy in: Solvent Extraction Principles and Practice* (Rydberg, J., Cox, M., Musicas, C., Choppin, G.R. – eds.), 2nd ed., Marcel Dekker, New York, **2004**
283. Jercan, E.: *Metode de separare în chimia analitică*, Ed. Tehnică, București, **1983**
284. Gavrilă, L.: *Elaborarea unor tehnologii de recuperare a nichelului sub formă de sulfat de nichel, clorură de nichel sau nichel metalic, din soluțiile provenite de la dezagregarea catalizatorilor uzați* – referat în cadrul tezei de doctorat, Universitatea Tehnică “Gh. Asachi” Iași, **1994**
285. Pedersen, C.J.: *The Discovery of Crown Ethers*, Nobel lecture, December 8, **1987**, disponibil la: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1987/pedersen-lecture.pdf
286. Gutsche, D.: *Calixarenes: a personal history*, in: *Calixarenes in the nanoworld* (Vicens, J., Harrowfield, J., Baklouti, L. – eds.), Springer, Dordrecht, **2007**, 1 – 20
287. * * * *Crown ether*, disponibil la: http://en.wikipedia.org/wiki/Crown_ether
288. * * * *Valinomycin*, disponibil la: <http://en.wikipedia.org/wiki/Valinomycin>
289. Gamse, T.: *Liquid Extraction and Solid – Liquid Extraction*, Graz University of Technology, **2002**, disponibil la: www.iq.uva.es/separacion/archivos/SkriptumExtraction.pdf
290. Halwachs, W.: *Reaktivextraktion*, Habilitationsschrift, Universität Hannover, **1981**, disponibil la: www.halwachs.de/solvent-extraction.htm
291. Sattler, K., Feindt, H.J.: *Thermal Separation Processes: Principles and Design*, VCH, Weinheim, **1995**

Bibliografie

292. Hano, T., Matsumoto, M., Ohtake, T., Sasaki, K., Hare, F., Kawano, Y.: Extraction equilibria of organic acids with tri-*n*-octylphosphineoxide, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **1990**, 23(6), 734 – 738
293. Pagel, H.A., McLafferty, F.W.: *Anal. Chem.*, **1948**, 20, 272
294. Pagel, H.A., Schwab, K.D.: *Anal. Chem.*, **1950**, 22, 1207
295. Marcus, Y., Kertes, A.S.: *Ion Exchange and Solvent Extraction of Metal Complexes*, Wiley-Interscience, London, **1969**
296. Putemans, M., Dryon, L., Massart, D.C.: *Analytica Chimica Acta*, **1984**, 161, 221
297. Lukhezo, M., Dunne, L.J., Reuben, B.G., Verrall, M.S.: Statistical mechanical treatment of reactive solvent extraction, *Chemical Physics*, **1997**, 220, 53 – 61
298. Kumar, S., Babu, B.V., Wasewar, K.L.: Recovery of Propionic Acid using Reactive Extraction, *Indian Chemical Engineering Congress, CHEMCON 2006*, 27 – 30 dec. **2006**, Ankleshwar, India, disponibil la: http://discovery.bits-pilani.ac.in/discipline/chemical/BVb/RE_SK_BVB_KLW_Chemcon-2006_FullPaper.pdf
299. Yang, S.-T., White, S.A., Hsu, S.-T.: Extraction of carboxylic acids with tertiary and quaternary amines: effect of pH, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1991**, 30(6), 1331 – 1335
300. Castiblanco, D.A., Martínez, M., Serrato, J.C., Bejarano, P.J.: Estudio de la extracción reactiva de ácido láctico con el sistema triocetilamina-isodecanol, *XXII Interamerican Congress of Chemical Engineering*, 1 – 4 oct. **2006**, Buenos Aires, Argentina, disponibil la: http://dpi.eq.uff.br/ciaiq_22/CD/formCrCongreso/papers/13a/13a_383.pdf
301. Schügerl, K.: Extraction of Primary and Secondary Metabolites, *Advanced in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, **2005**, 92, 1 – 48
302. Oniscu, C., Mereuță, A., Cașcaval, D., Duca, G.: Selective Separation of Organic Oxyacids from Aqueous Phase by Reactive Extraction, *Romanian Biotechnological Letters*, **2002**, 7(5), ediție electronică, disponibil la: <http://www.unibuc.ro/eBooks/biologie/RBL/Archive/2002/nr5/art8.htm>
303. Mereuță, A.: *Optimizarea tehnologiei de obținere a unor oxiacizi din deșeurile oenologice*, Teză de doctorat, Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, **2004**
304. von Frieling, P., Schügerl, K.: Recovery of lactic acid from aqueous model solutions and fermentation broths, *Process Biochemistry*, **1999**, 34(6-7), 685 – 696
305. Hong, Y.K., Hong, W.H., Chang, H.N.: Selective extraction of succinic acid from binary mixture of succinic acid and acetic acid, *Biotechnological Letters*, **2000**, 22, 871 – 874
306. Hong, Y.K., Hong, W.H.: Removal of acetic acid from aqueous solutions containing succinic acid and acetic acid by tri-*n*-octylamine, *Separation and Purification Technology*, **2005**, 42, 151 – 157
307. Song, H., Lee, S.Y.: Production of succinic acid by bacterial fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**, 39, 352 – 361
308. Huh, Y.S., Jun, Y.-S., Hong, Y.K., Song, H., Lee, S.Y., Hong, W.H.: Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*, *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 1461 – 1465
309. Baniel, A.M., European Patent, no. EP 49429, **1982**; *Chem. Abs.*, 97, 109557, **1982**
310. Nelson, D.L., Cox, M.M.: *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed., W.H. Freeman, **2004**
311. Itoh, M., Thien, M.P., Hatton, T.A., Wang, D.I.C.: A liquid emulsion membrane process for the separation of amino acids, *Biotechnol. Bioeng.*, **1990**, 35(9), 853 – 860
312. Shinkai, S., Inuzuka, K., Hara, K., Stone, T., Manabe, O.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1984**, 57, 2150
313. Shinkai, S., Minami, T., Araragi, Y., Manabe, O.: *J. Chem. Perkin Trans. II*, **1985**, 503
314. Mutihac, L., Mutihac, R., Constantinescu, T., Luca, C.: The transport of amino acids by 18-crown-6 through liquid membranes, *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry*, **1994**, 17(1), 45 – 51
315. Hermann, T.: Industrial production of amino acids by coryneform bacteria, *Journal of Biotechnology*, **2003**, 104, 155 – 172
316. Cașcaval, D., Oniscu, C., Galaction, A.-I.: Selective separation of amino acids by reactive extraction, *Biochemical Engineering Journal*, **2001**, 7(3), 171 – 176
317. Kelly, N.A., Lukhezo, M., Reuben, B.G., Dunne, L.J., Verrall, M.S.: Reactive solvent extraction of amino acids with cationic extractants, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **1998**, 72(4), 347 – 355
318. Eyal, A.M., Kogan, L., Bressler, E.: Extraction of metal salts by mixtures of water-immiscible amines and organic acids (acid-base couple extractants). I: A review of distribution and spectroscopic data and of proposed extraction mechanisms, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **1994**, 33(5), 1067 – 1075
319. Eyal, A.M., Kogan, L., Bressler, E.: Extraction of metal salts by mixtures of water-immiscible amines and organic acids (acid-base couple extractants). II: Theoretical treatment and analysis, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **1994**, 33(5), 1076 – 1085
320. Eyal, A.M.: Acid extraction by acid-base coupled extractants, *Solvent Extraction and Ion Exchange*, **1995**, 13, 31 – 93
321. Syzova, N., Eyal, A.M., Vitner, A., Hazan, B.: Extraction of dicarboxylic acids by ABC extractants, *Solvent Extraction and Ion Exchange*, **2004**, 22(1), 51 – 67

322. Eyal, A.M., Cohen-Sydov, N.: Process for the separation of amino acids and their salts from an aqueous solution, *US Patent 6171501*, **2001**
323. Smirnova, S., Torocheshnikova, I., Formanovsky, A., Pletnev, I.: Solvent extraction of amino acids into a room temperature ionic liquid with dicyclohexano-18-crown-6, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2004**, 378(5), 1369 – 1375
324. Metzger, A., Gloe, K., Stephan, H., Schmidtchen, F.P.: Molecular recognition and phase transfer of underivatized amino acids by a foldable artificial host, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61(6), 2051 – 2055
325. Jeong, K.-S., Park, T.-Y.: Complexation and transport of zwitterionic amino acids by an artificial receptor, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **1999**, 20(2), 129 – 131
326. Tsukube, H., Wada, M., Shinoda, S., Tamiaki, H.: Porphyrinatoerbium–crown ether conjugate for synergistic binding and chirality sensing of zwitterionic amino acids, *Chem. Commun.*, **1999**, 1007 – 1008
327. Oshima, T., Goto, M., Furusaki, S.: Extraction behavior of amino acids by calix[6]arene carboxylic acid derivatives, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **2002**, 43(1-2), 77 – 86
328. Oshima, T., Inoue, K., Uezu, K., Goto, M.: Dominant factors affecting extraction behavior of amino compounds by a calix[6]arene carboxylic acid derivative, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 509(2), 137 – 144
329. Tabakci, M., Tabakci, B., Yilmaz, M.: Design and synthesis of new chiral calix[4]arenes as liquid phase extraction agents for α -amino acid methylesters and chiral α -amines, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **2005**, 53(1-2), 51 – 56
330. Puttemans, M., Dryon, L., Massart, D.C.: *Anal. Chim. Acta*, **1984**, 161, 221
331. Likidis, Z., Schügerl, K.: *Bioprocess Engineering*, **1988**, 3(2), 79
332. Likidis, Z., Schügerl, K.: *Chemical Engineering Science*, **1988**, 43(1), 27
333. Wei, L.S.: *Reactive extraction of antibiotics: equilibrium and kinetic study*, Thesis, Faculty of Chemical and Natural Resource Engineering, University of Technology, Malaysia, **2005**
334. Bora, M.M., Dutta, N.N., Bhattacharya, K.G.: Extraction equilibria of Cephalosporin antibiotics with Aliquat 336, *Journal of Chemical and Engineering Data*, **2000**, 45(2), 399 – 403
335. Hano, T., Matsumoto, M., Ohtake, T., Hori, F.: Reactive extraction of Cephalosporin C, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **1992**, 25(3), 293 – 297
336. Harris, T.A.J., Khan, S., Reuben, B.G., Shokaya, T.: *Sep. Biotechnol.*, **2**, Elsevier, London, **1990**, 172
337. Bora, M.M., Ghosh, A.C., Dutta, N.N., Mathur, R.K.M.: Reactive extraction of 6-aminopenicillanic acid with Aliquat-366: Equilibrium and kinetics, *Canadian Journal of Chemical Engineering*, **1997**, 75(3), 520 – 526
338. Cașcaval, D., Oniscu, C., Galaction A.-I.: Separation of 6-Aminopenicillanic Acid by Reactive Extraction, *Romanian Biotechnological Letters*, **2002**, 7(5), 917 – 924
339. * * * *Gluconic acid*, disponibil la: http://en.wikipedia.org/wiki/Gluconic_acid
340. Inci, I.: Extraction of gluconic acid with organic solutions of Alamine 336, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **2002**, 16(4), 185 – 189
341. * * * *Cinnamic acid*, disponibil la: http://en.wikipedia.org/wiki/Cinnamic_acid
342. Cămăruț, M., Galaction, A.-I., Cașcaval, D.: Separation of *trans*-cinnamic acid by reactive extraction with Amberlite LA-2 in low-polar solvent. I. Mechanism of separation process, *Romanian Biotechnological Letters*, **2006**, 11(5), 2897 – 2903
343. Garbe, D.: *Cinnamic Acid* in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th ed., electronic release, Wiley Interscience, New York, **2002**
344. Folkers, K.: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **1969**, 39, 334
345. Galaction, A.-I., Cașcaval, D.: Metaboliți secundari cu aplicații farmaceutice, cosmetice și alimentare, Casa de Editură Venus, Iași, **2006**
346. Blum, R.: *Niacin (Nicotinic Acid, Nicotinamide)* in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th ed., electronic release, Wiley Interscience, New York, **2002**
347. Kumar, S., Wasewar, K.L.: Intensification of recovery of nicotinic acid using reactive extraction: Equilibrium study, 59th Indian Chemical Engineering Congress, Chemcon 2006, 27 – 30 Dec. **2006**, Bharuch-Ankleshwar, Gujarat, India
348. * * * *Folic Acid*, disponibil la: http://en.wikipedia.org/wiki/Folic_acid
349. Brody, T., Shane, B.: *Folic Acid* in: *Handbook of Vitamins*, 3rd ed. (Rucker, R.B., Suttie, J.W., McCormick, D.B., Machlin, L.G. – eds.), Marcel Dekker, New York, **2001**
350. Weimann, B.J., Hengartner, U., de Saizieu, A., Wehrli, C.: *Folic Acid* in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th ed., electronic release, Wiley Interscience, New York, **2002**
351. Galaction, A.-I., Blaga, A.-C., Cașcaval, D.: Kinetic study of folic acid reactive extraction, *Romanian Biotechnological Letters*, **2005**, 10(4), 2283 – 2290
352. * * * *Vitamin C*, disponibil la: http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C
353. Harris, R.J.: *Ascorbic Acid: Subcellular Biochemistry*, Springer, Berlin, **1996**
354. Oster, B., Fechtel, U.: *Vitamin C (L- Ascorbic Acid)* in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th ed., electronic release, Wiley Interscience, New York, **2002**
355. * * * BASF, *Annual Report*, **2003**, Appendix 4.2, 5.1.
356. Blaga, A.-C., Galaction, A.-I., Folescu, E., Cașcaval, D.: Separation of vitamin C by reactive extraction I. Mechanism and influencing factors, *Romanian Biotechnological Letters*, **2004**, 9(6), 1917 – 1924

Bibliografie

357. Blaga, A.-C., Galaction, A.-I., Cașcaval, D.: Kinetic study of vitamin C reactive extraction with Amberlite LA-2, *Bull. Inst. Pol. Iași*, **2005**, 50(3-4),
358. Blaga, A.-C., Galaction, A.-I., Cașcaval, D.: Separation of vitamin C by reactive extraction 2. Mathematical modeling of extraction process, *Romanian Biotechnological Letters*, **2004**, 9(6), 1939 – 1946
359. Steensma, M.: *Chiral separation of amino-alcohols and amines by fractional reactive extraction*, PhD Thesis, University of Twente, **2005**
360. Schmidt, K.F.: Mirror-image molecules: new techniques promise more potent drugs and pesticides - controlling the "handedness" of enantiomers, *Science News*, 29 Mai, **1993**
361. Guiu Rozas, E.: *Tunable chiral ligands for Ir and Rh hydrogenation processes. Synthesis of enantioamerically enriched amines*, PhD Thesis, Universitat Rovira i Virgili, **2003**
362. Takeuchi, T., Horikawa, R., Tanimura, T., Kabasawa, Y.: Resolution of DL-valine by countercurrent solvent extraction with continuous sample feeding, *Separation Science and Technology*, **1990**, 25(7-8), 941 – 951
363. Sheldon, R.A.: *Chirotechnology, Industrial synthesis of optically active compounds*, Marcel Dekker Inc., New York, **1993**
364. Takeuchi, T., Horikawa, R., Tanimura, T.: Enantioselective solvent extraction of neutral DL-amino acids in two-phase systems containing N-n-alkyl-L-proline derivatives and copper(II) ion, *Analytical Chemistry*, **1984**, 56, 1152 – 1155
365. Pickering, P.J., Chaudhuri, J.B.: Equilibrium and kinetic studies of the enantioselective complexation of (D/L)-phenylalanine with copper (II) N-decyl-(L)-hydroxiprolin, *Chemical Engineering Science*, **1997**, 52(3), 377 – 386
366. Nishizawa, H., Tahara, K., Hayashida, A., Abe, Y.: Continuous separation method with liquid particle extractor: enantioseparation of (±)-mandelic acid, *Anal. Sci.*, **1993**, 9(5), 611 – 615
367. Jiao, F., Huang, K., Yuan, X., Zhao, X., Yu, J.: Extraction and separation of racemic α -cyclohexyl-mandelic acid using chiral ligand as selector, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **2006**, 9(6), 1149 – 1153
368. Steensma, M., Kuipers, N.J.M., de Haan, A.B., Kwant, G.: Identification of enantioselective extractants for chiral separation of amines and aminoalcohols, *Chirality*, **2006**, 18(5), 314 – 328
369. Steensma, M., Kuipers, N.J.M., de Haan, A.B., Kwant, G.: Modelling and experimental evaluation of reaction kinetics in reactive extraction for chiral separation of amines, amino acids and amino-alcohols, *Chemical Engineering Science*, **2007**, 62(5), 1395 – 1407
370. Tang, K.-W., Chen, G.-B., Yi, J.-M., Zhang W.-Z.: Enantioselective separation of ofloxacin enantiomers by chiral ligand exchange, *Huaxue xuebao*, **2004**, 62(17), 1621 – 1625
371. Abe, Y., Shoji, T., Kobayashi, M., Qing, W., Asai, N., Nishizawa, H.: Enantioselective distribution of amino-alcohols in a liquid-liquid two-phase system containing dialkyl L-tartrate and boric acid, *Chem. Pharm. Bull.*, **1995**, 43(2), 262 – 265
372. Abe, Y., Shoji, T., Fukui, S., Sasamoto, M., Nishizawa, H.: Enantioseparation by dual-flow countercurrent extraction: its application to the enantioseparation of (6)propanolol, *Chem. Pharm. Bull.*, **1996**, 44(8), 1521 – 1524
373. Prelog, V., Stojanac, Z., Kovacevic, K.: Über die Enantiomerentrennung durch Verteilung zwischen flüssigen Phasen, *Helv. Chim. Acta.*, **1982**, 65(1), 377 – 384
374. Prelog, V., Mutak, S., Kovacevic, K.: Über die Enantiomerentrennung durch Verteilung zwischen flüssigen Phasen, 3. Mitteilung, Selektivität der lipophilen Weinsäureester für chirale Ammonium-Salze verschiedener Konstitution und Konfiguration, *Helv. Chim. Acta.*, **1983**, 66(7), 2279 – 2284
375. Prelog, V., Kovacevic, M., Egli, M.: Lipophilic tartaric acid esters as enantioselective ionophores, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1989**, 28, 1147 – 1152
376. Ogasahara, K., Hirose, K., Tobe, Y., Naemura, K.: Preparation of optically active azophenolic crown ethers containing 1-phenylethane-1,2-diol and 2,4-dimethyl-3-oxapentane-1,5-diol as a chiral subunit: temperature-dependent enantiomer selectivity in the complexation with chiral amines, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 3227 – 3236
377. Hirose, K., Nakamura, T., Nishioka, R., Ueshige, T., Tobe, Y.: Preparation and evaluation of novel chiral stationary phases covalently bound with chiral pseudo-18-crown-6 ethers, *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 1549 – 1551
378. Naemura, K., Nishikawa, Y., Fuji, J., Hirose, K., Tobe, Y.: *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 873
379. Kim, J., Song, S., Kim, J., Kim, T.H., Kim, H., Suh, H.: Synthesis of chiral azophenolic pyridino-18-crown-6 ether and its enantiomeric recognition toward chiral primary amines, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2006**, 27(10), 1577 – 1580
380. Steensma, M., Kuipers, N.J.M., de Haan, A.B., Kwant, G.: Influence of process parameters on extraction equilibria for the chiral separation of amines and amino-alcohols with a chiral crown ether, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2006**, 81(4), 588 – 597
381. Kuipers, N.J.M., Steensma, M., de Haan, A.B., Kwant, G.: Chiral separation of amines and aminoalcohols by fractional reactive extraction, *Chemie Ingenieur Technik*, **2006**, 78(9), 1378
- 382.