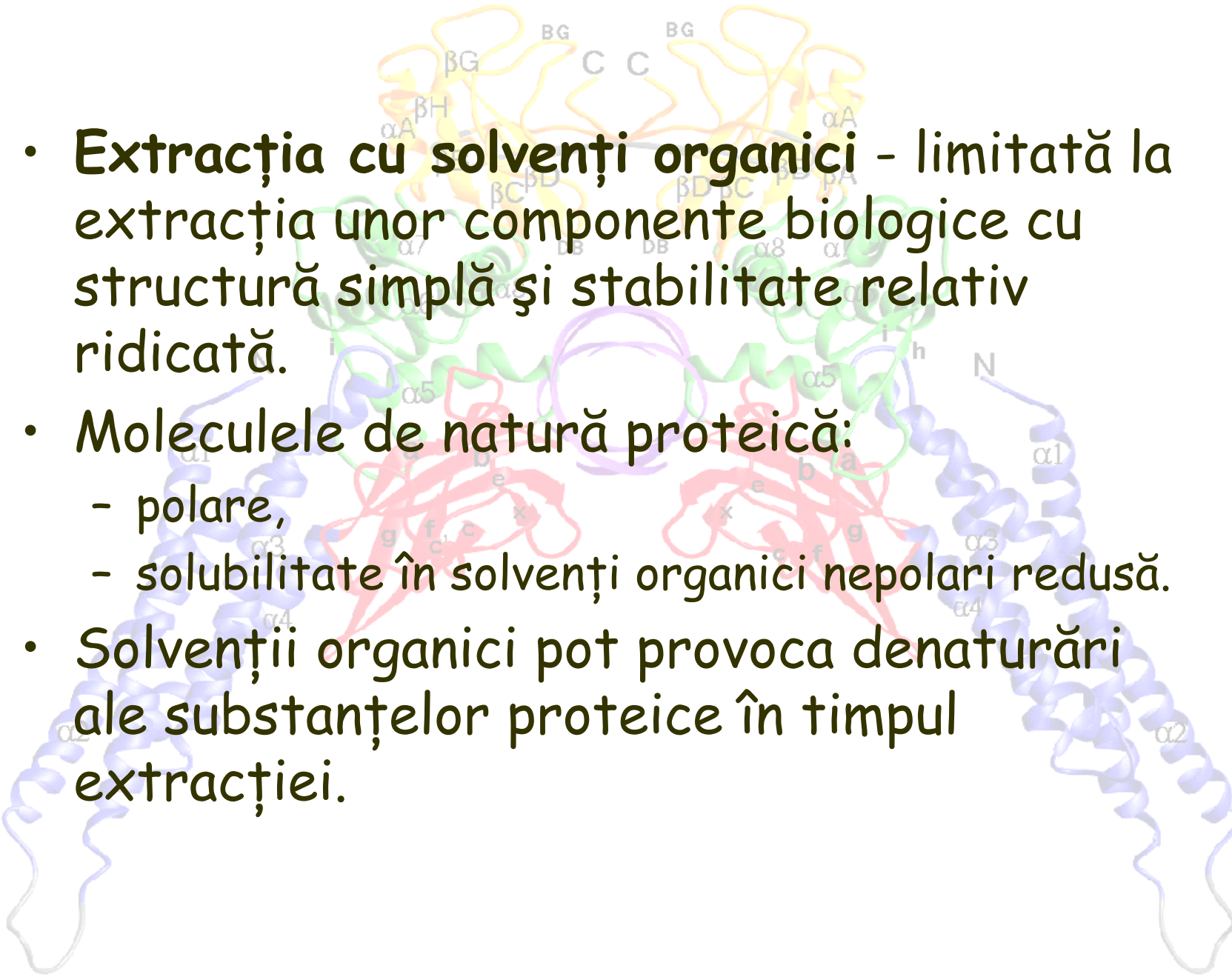


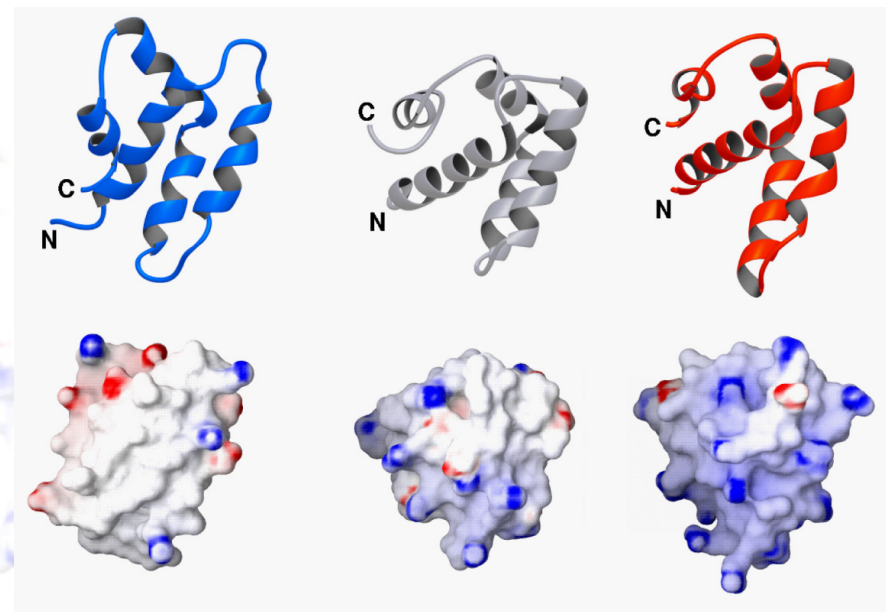
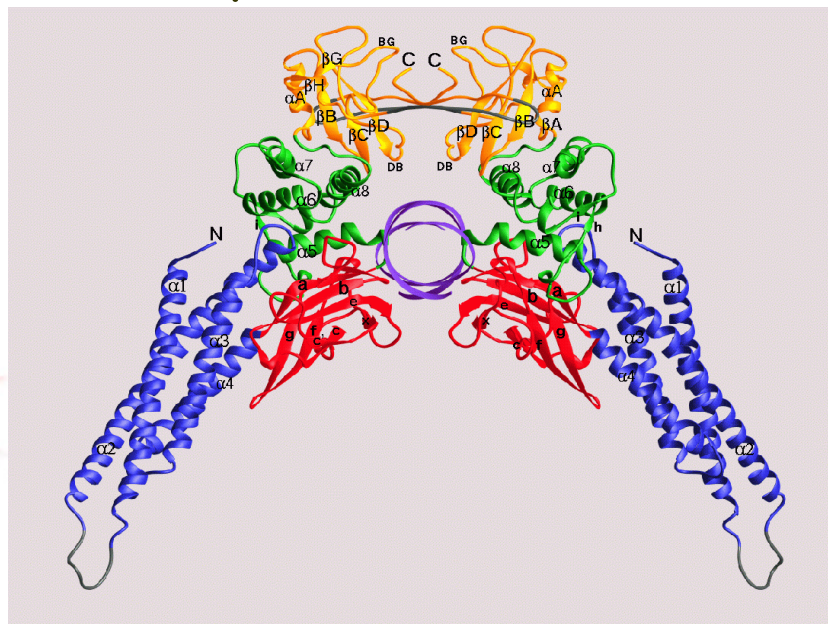


EXTRACȚIA ÎN SISTEME APOASE BIFAZICE

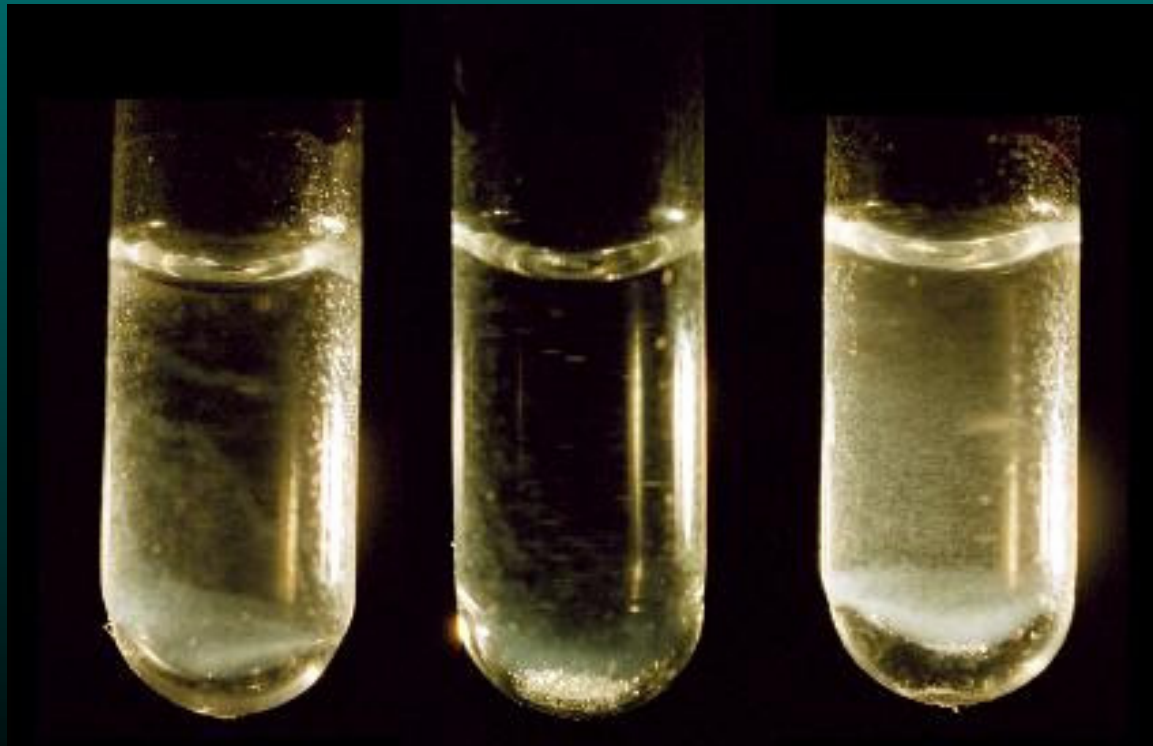


- 
- **Extracția cu solvenți organici** - limitată la extracția unor componente biologice cu structură simplă și stabilitate relativ ridicată.
 - **Moleculele de natură proteică:**
 - polare,
 - solubilitate în solvenți organici nepolari redusă.
 - Solvenții organici pot provoca denaturări ale substanțelor proteice în timpul extracției.

- Pentru separarea din faza apoasă a proteinelor prin extracție lichid - lichid, este necesar un solvent care:
 - să aibă capacitate mare de solubilizare pentru proteine,
 - să nu denatureze proteinele,
 - să producă o tensiune interfacială scăzută.



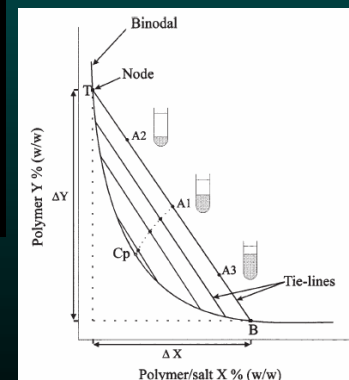
- Solventul care corespunde cel mai bine acestor deziderate este chiar **APA**,
- Problema:
 - de a găsi **lacuna de miscibilitate**: zona în care un sistem apos devine eterogen, apărând două faze nemiscibile între ele.



Formarea sistemelor apoase bifazice

bifazice

- Obținerea sistemelor apoase bifazice (SAB) se bazează pe:
 - incompatibilitatea a doi polimeri hidrofili diferiți la dizolvarea lor într-un solvent uzual cum este apa,
 - incompatibilitatea dintre un polimer hidrofил și o sare anorganică,
 - termoseparare.



- Majoritatea polimerilor hidrofilii, naturali sau sintetici, sunt solubili în apă.
- Conc. scăzute de polimeri în soluția apoasă = sistem omogen.
- Peste o anumită conc. a polimerilor, strict determinată și măsurabilă prin metode turbidimetrice, se produce separarea fazelor.
- Valorile concentrațiilor la care sistemul devine eterogen depind de masa moleculară a polimerilor, scăzând cu creșterea acesteia.



Sisteme apoase bifazice

• COMPONENT 1

- polietilenglicol (PEG)

POLIMER - POLIMER

- polietilenglicol (PEG)

POLIMER - SARE

• COMPONENT 2

- dextran
- alcool polivinilic (PVA)
- polivinilpirolidona
- ficoll

- fosfat de potasiu
- sulfat de amoniu
- sulfat de magneziu
- sulfat de sodiu



Alte sisteme apoase bifazice

• COMPONENT 1

- polipropilenglicol (PPG)

- ficoll

- metilceluloza

• COMPONENT 2

- dextran

- alcool polivinilic (PVA)

- polivinilpirolidona

- metoxipolietilenglicol

- fosfat de potasiu

- dextran

- dextran

- hidroxipropildextran

- polivinilpirolidona



Table 2
Sources and Available Molecular Weights of Some Polymers

Polymer	Molecular weights	Source
PEG	600, 1000, 1450, 3350, 8000, 10,000, 20,000	Sigma ^a , Union Carbide ^b , Merck ^c , Polysciences ^d
Dextran	10,000, 40,000, 70,000, 100,000–200,000, 500,000, 2,000,000	Pharmacia ^e , Sigma, Pfeifer & Langen ^f
Dextran-Sulfate	5,000, 8,000, 10,000, 500,000	Sigma
Ficoll	70,000, 400,000	Sigma, Pharmacia
Ucon	5000	Union Carbide
Methyl Cellulose	30,000, 80,000, 140,000	Sigma

^aSt. Louis, MO.

^bDanbury, CT.

^cDarmstadt, Germany.

^dWarrington, PA.

^eUppsala, Sweden.

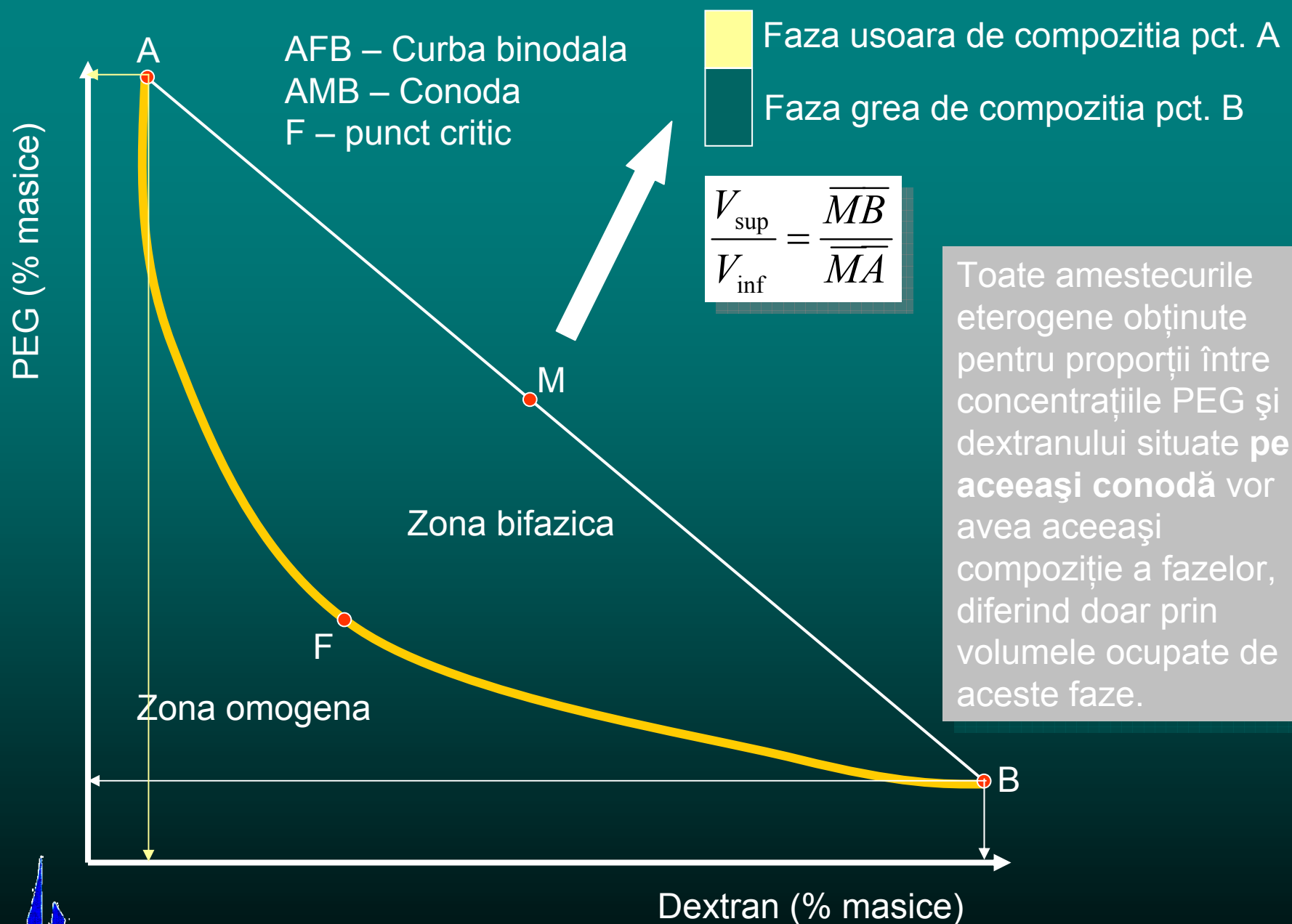
^fDormagen, Germany.

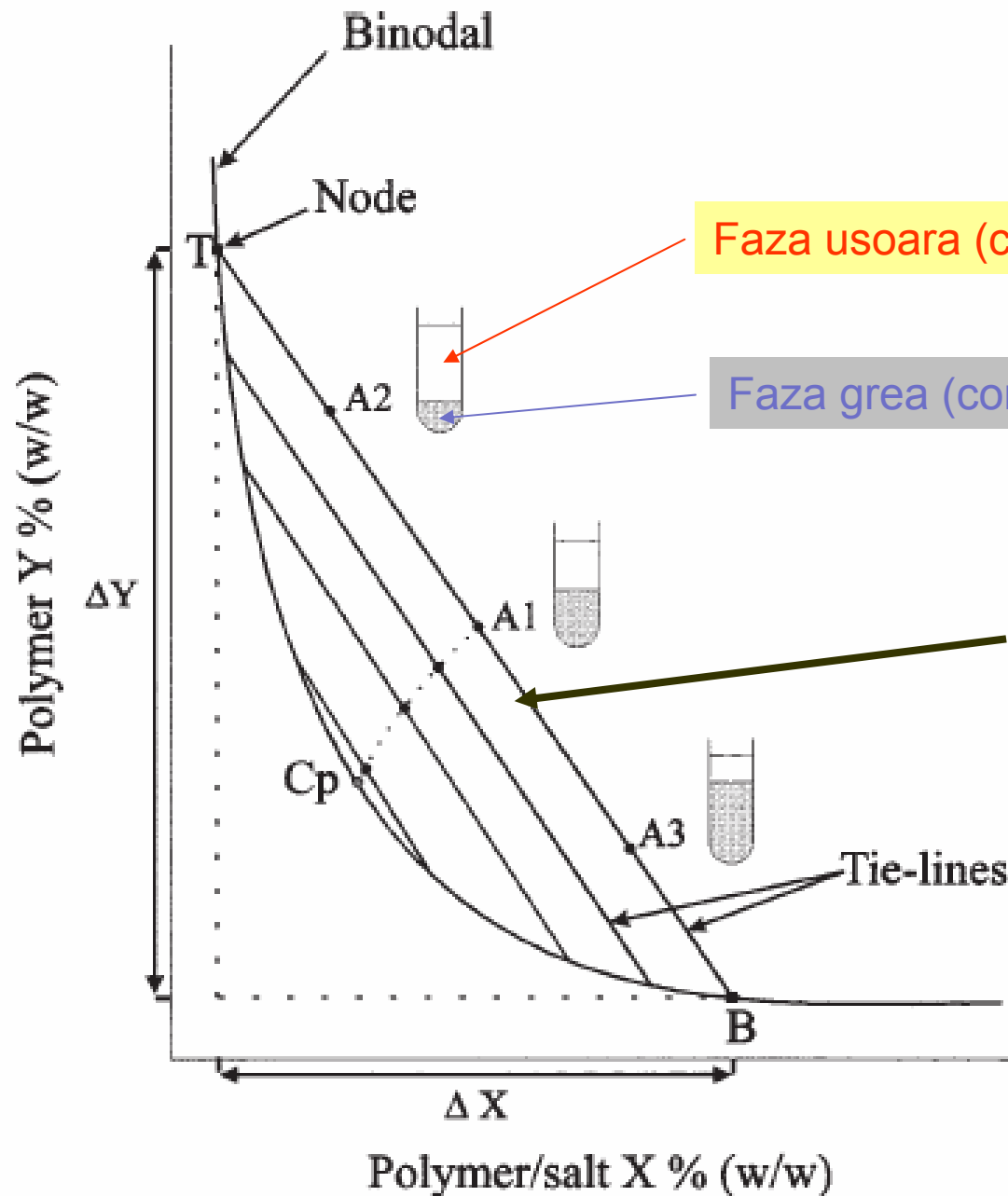


Table 3
Some Common Additives Used in Aqueous Two-Phase Extraction

Additive	Comments
NaCl	Changes partition coefficient; used in cross-partitioning experiments
Na ₂ SO ₄	Changes partition coefficient; used in cross-partitioning experiments
NaN ₃ , 5 mmol	Bactericide
Chloroacetamide 1%	Bactericide
Affinity ligands (PEG-red, Cibacron-blue, etc.)	Changes partition coefficient of target protein
Charged polymer	Changes partition coefficient and phase equilibrium







Faza usoara (compozitia pct. T)

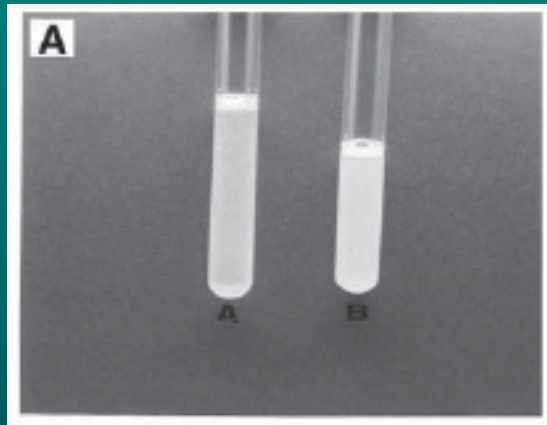
Faza grea (compozitia pct. B)

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.

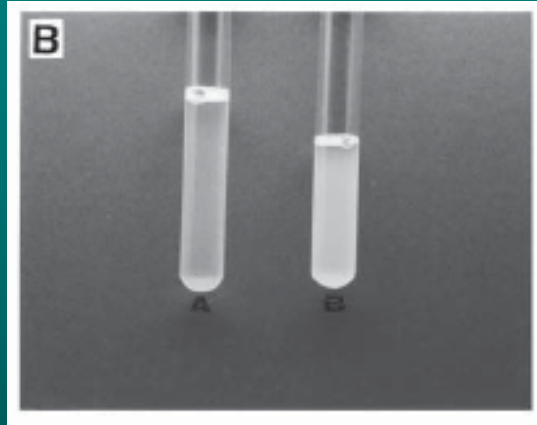


Sistemul A (apropiat de punctul critic): 5.0% PEG si 6.5% Dx
in tampon fosfat la pH = 7.0, 20 °C;

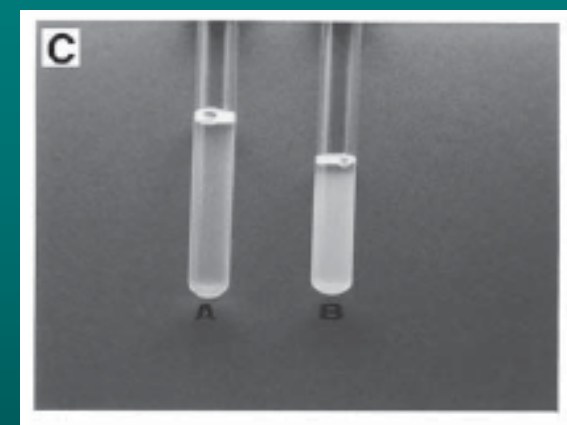
Sistemul B (departe de punctul critic): 6.2% PEG si 8.3% Dx,
in tampon fosfat la pH = 7.0, 20 °C;



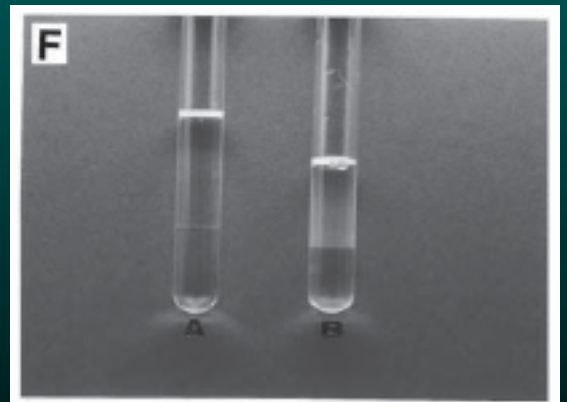
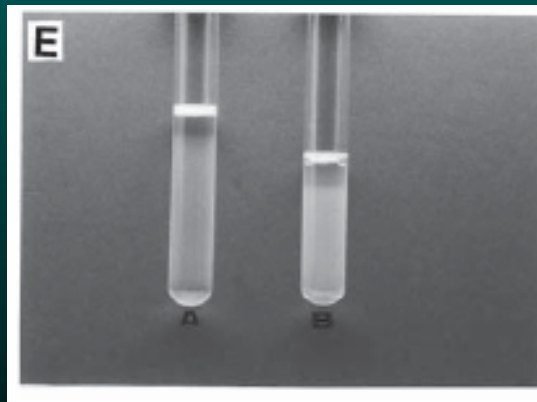
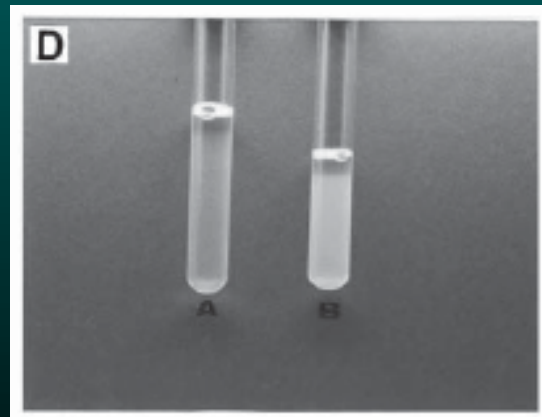
initial



dupa 1 minut



dupa 2 minute



dupa 30 minute



Diagrame de echilibru PEG - Dextran

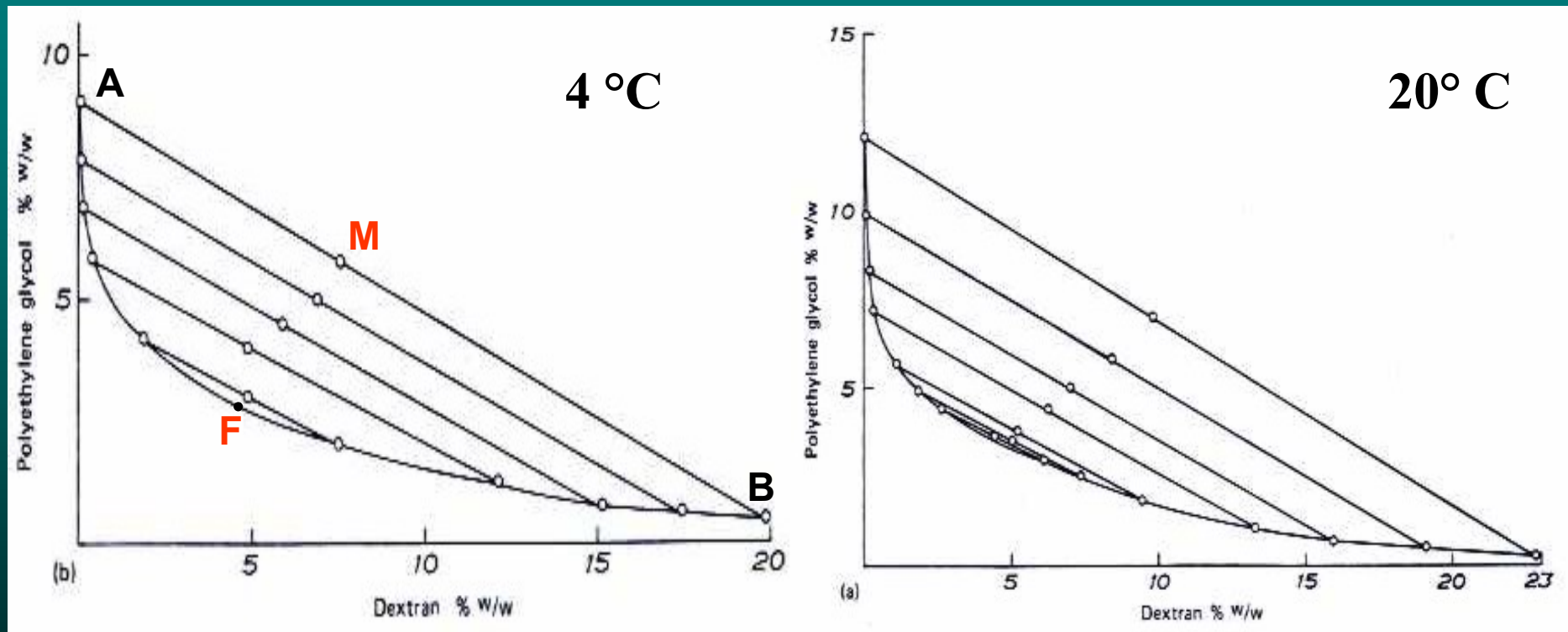
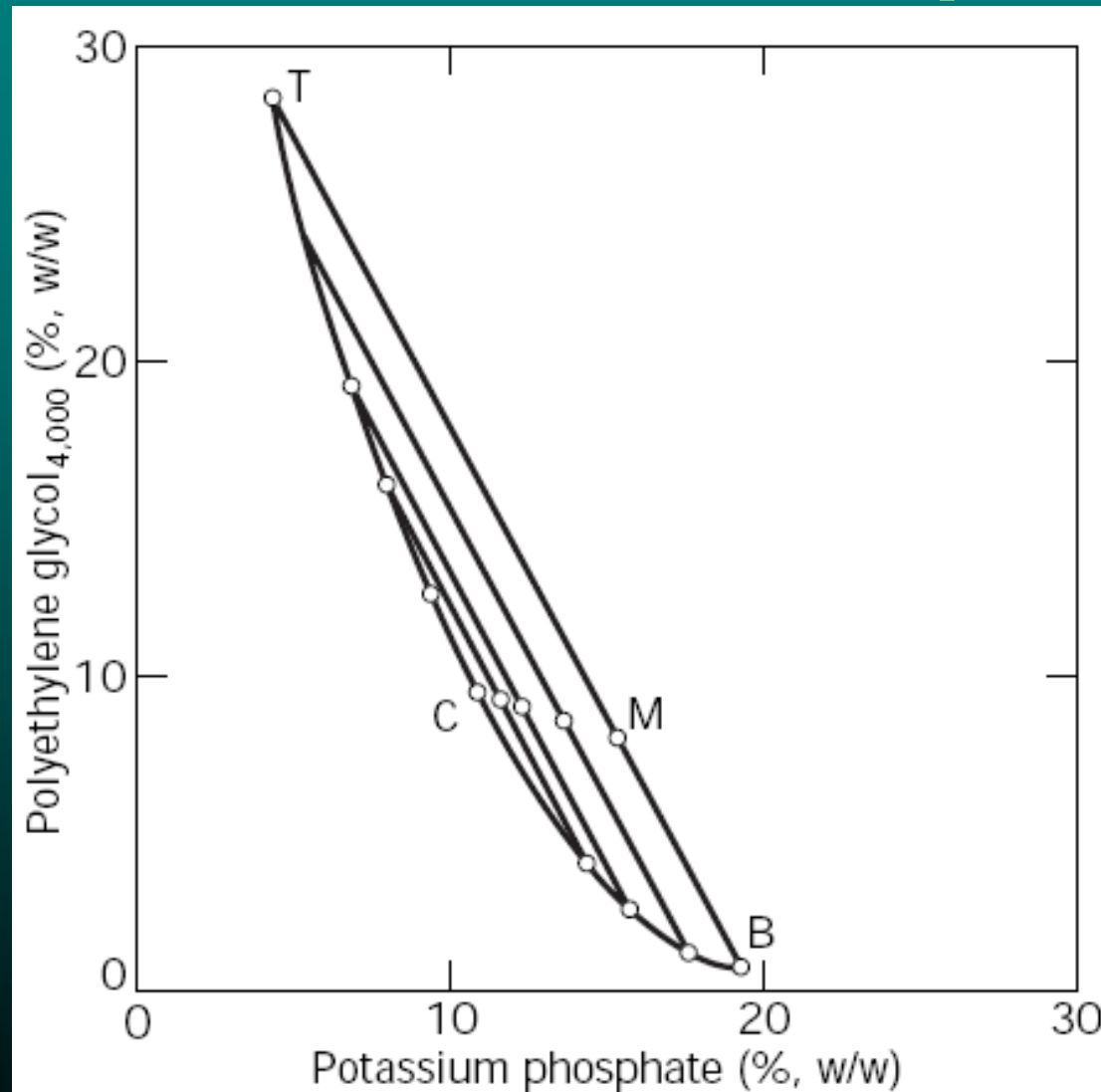


Diagrama de echilibru PEG 4000 – Fosfat de potasiu



Formarea SAB prin termoseparare

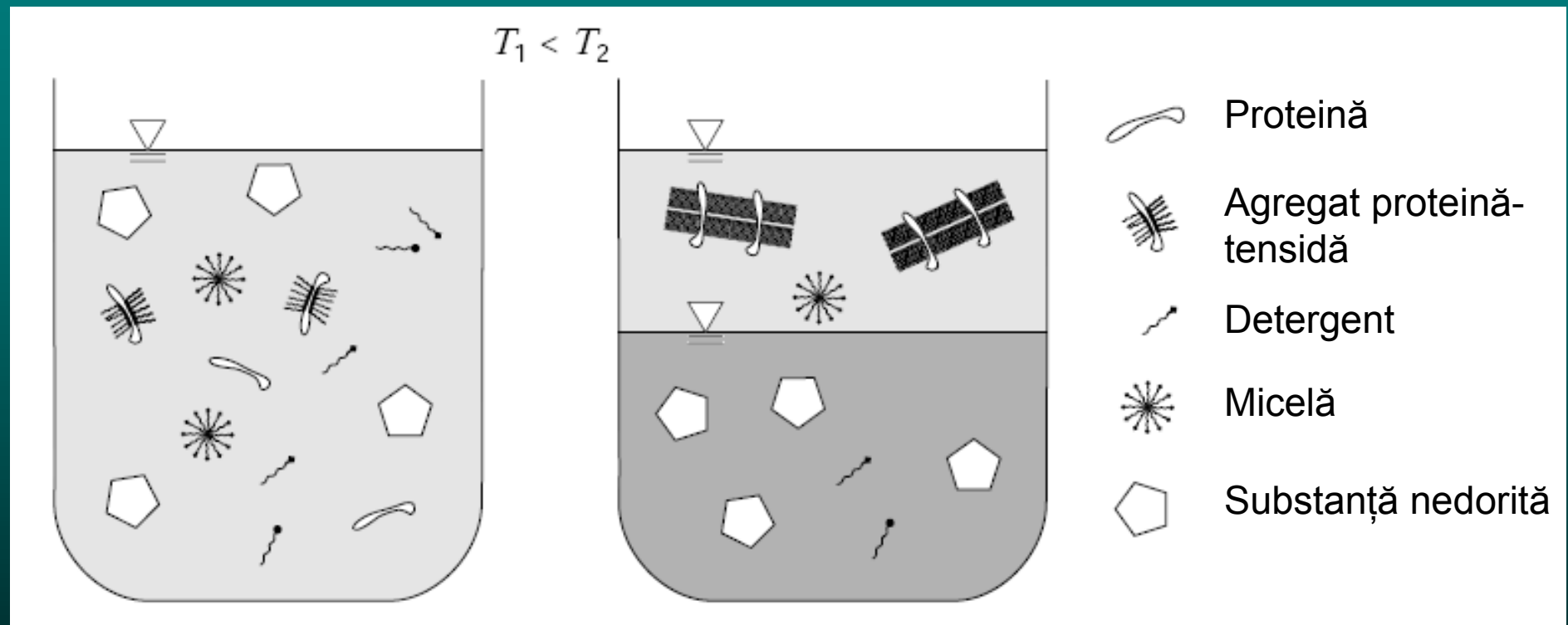
- Prin utilizarea detergenților neionici cu grupări hidrofile oxietilenice.
- La temp. scăzute = o singură fază: lichid de fermentație + micellele de detergent, (detergentul interacționează mai ales cu proteinele hidrofobe)
- La creșterea temp. peste o anumită valoare (dependentă de sistem), apare turbiditatea care indică apariția unei faze noi.
- Această temperatură = „**punct de tulburare**” (cloud point). Valoarea sa depinde în special de numărul mediu al grupărilor oxietilenice din detergent.
- De ex., un detergent $C_{12}EO_5$ are pct. tulb. la 23 - 25 °C.



- Separarea fazelor, datorată hidratării reversibile a grupărilor polare de la extremitățile moleculei → formarea a 2 faze:
 - faza îmbogățită în detergent;
 - faza sărăcită în detergent.
- Micelele suferă un proces de agregare în structuri laminate având proteina hidrofobă într-o "fază coacervată" cu 70 - 80% apă.



Soluția apoasă de detergent sub și peste punctul de tulburare



Mecanismul extracției biopolimerilor în SAB

- Extracția biopolimerilor = prin interacțiuni de tip van der Waals între:
 - molecula proteică și polimerul hidrofil;
 - grupările proteinelor, cu solubilizarea acestora într-o anumită fază.
- Un sistem de extracție este proiectat a.î.:
 - proteina dorită să treacă în faza superioară (PEG, de ex.),
 - 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)
 - factorul de separare (F),
- care sunt dependenți de:
 - raportul volumelor fazelor (R)
 - coeficientul de distribuție (K_N).



- **Gradul de extracție în faza superioară** este definit prin relația:

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

- n = numărul de moli de proteină dorită în volumul fazei superioare (V_{sup}), respectiv inferioare (V_{inf}).



- **Factorul de separare:**

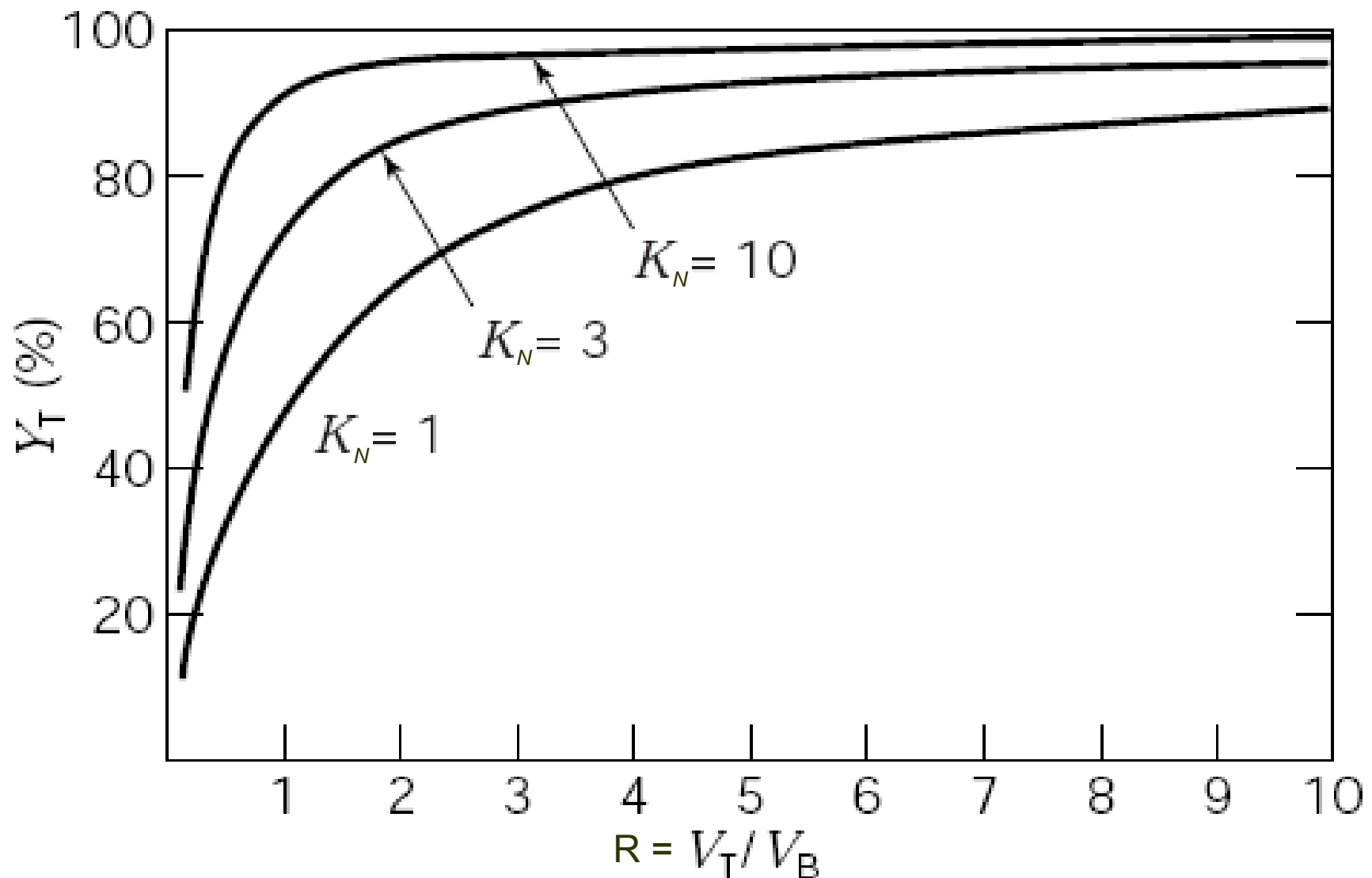
- produsul dintre coeficientul de distribuție și raportul volumelor fazelor:

$$F = K_N \cdot R = K_N \cdot \frac{V_{\text{sup}}}{V_{\text{inf}}}$$

- 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 $K_N = \text{ct.}$
- K_N nu depinde de concentrația proteinei $i(c_i)$, atâta timp cât:
 - concentrația c_i este mult mai redusă decât concentrația polimerilor
 - nu are loc formarea unor complexi.



Interdependența $Y_{sup} - K_N - R$



- există o corelație exponențială între K_N și aria suprafeței (masa moleculară) a proteinei i :

$$\ln K_N = \frac{\alpha \cdot A_i}{k \cdot T}$$

- α = factor dependent de potențialul chimic,
- A_i = suprafața disponibilă de interacțiune,
- k = constanta lui Boltzmann,
- T = 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 $K_N \approx 1$
- Proteinele au valori $K_N = 0,1 \div 10$.
- Pe baza dependenței date de ecuația anterioară s-au putut izola antigenii de suprafață ai hepatitei B (având mase moleculare de $1 \cdot 10^6 - 2 \cdot 10^6$ Da) ca vaccin produs din culturi de drojdii recombinante.



- 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



- Solubilizarea proteinelor este dictată de hidrofobicitatea polimerilor existenți în soluția apoasă, aceasta crescând în ordinea:

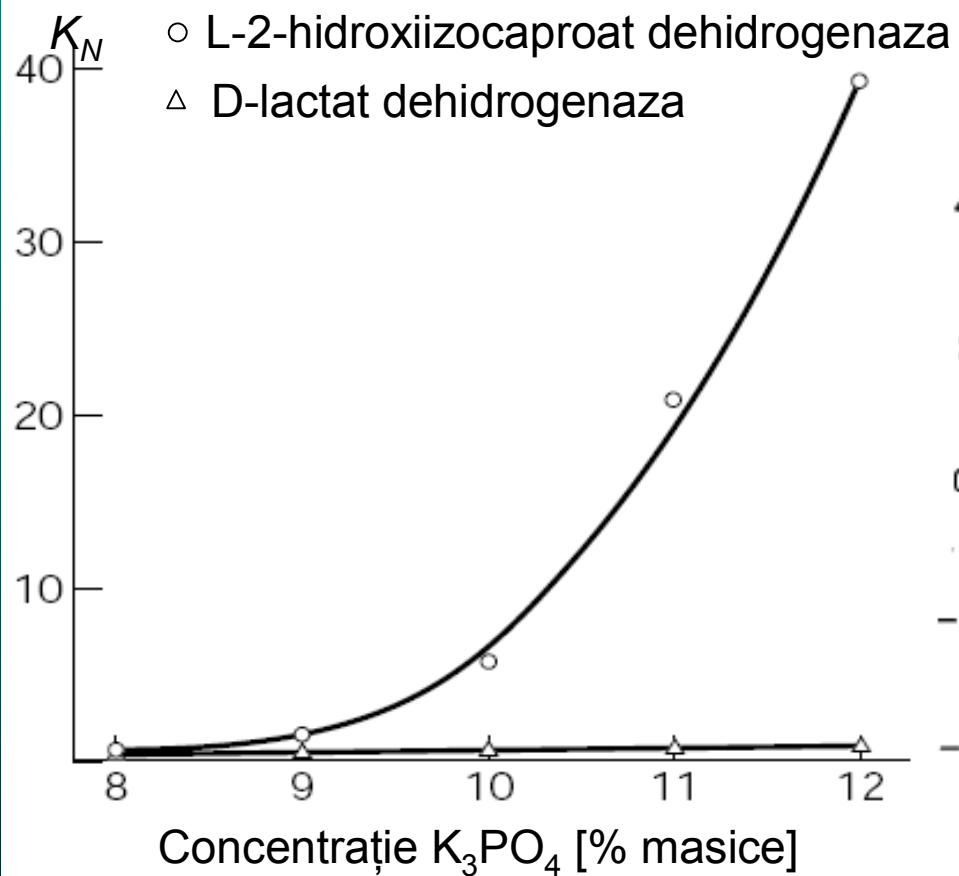
dextran sulfat < carboxi-metildextran < dextran < hidroxi-propildextran
< metilceluloză < alcool polivinilic < polietilenglicol < polipropilenglicol

- Hidrofobicitatea unui polimer este cu atât mai mare cu cât masa sa moleculară este mai mare.

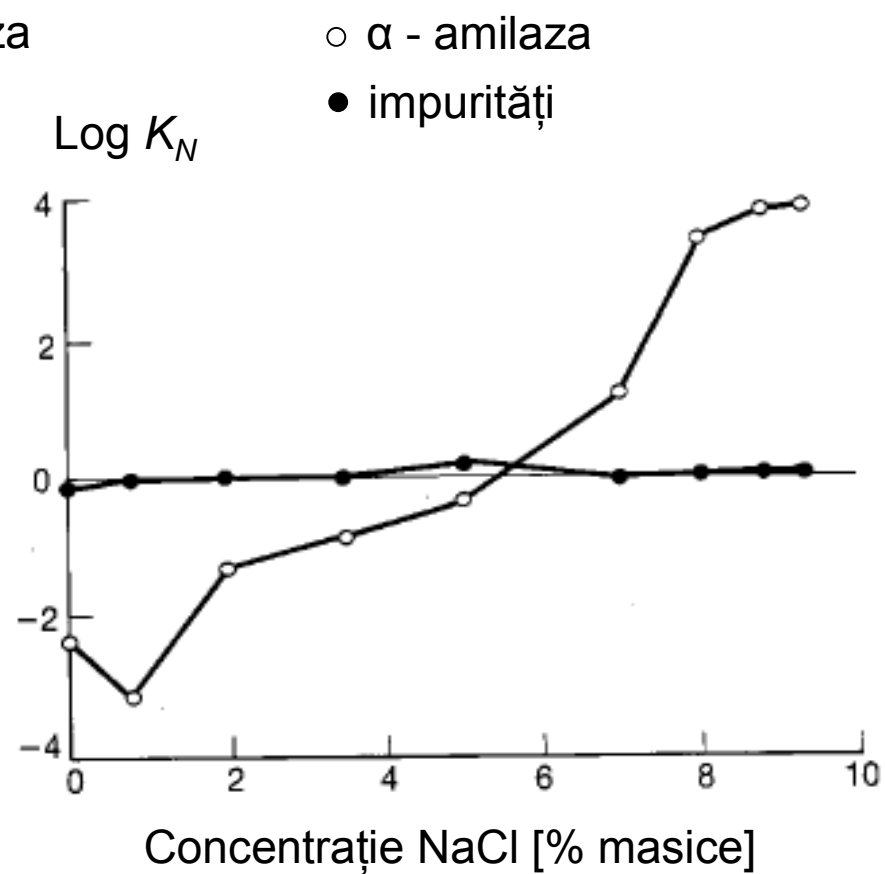


- Datorită migrării ionilor din fazele apoase se stabilește un potențial electric de o parte și de alta a interfeței de separare, acesta influențând hotărâtor distribuția macromoleculelor cu sarcină electrică (proteine, acizi nucleici).
- O modificare minoră a:
 - concentrației sau
 - tăriei ionicepoate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





a

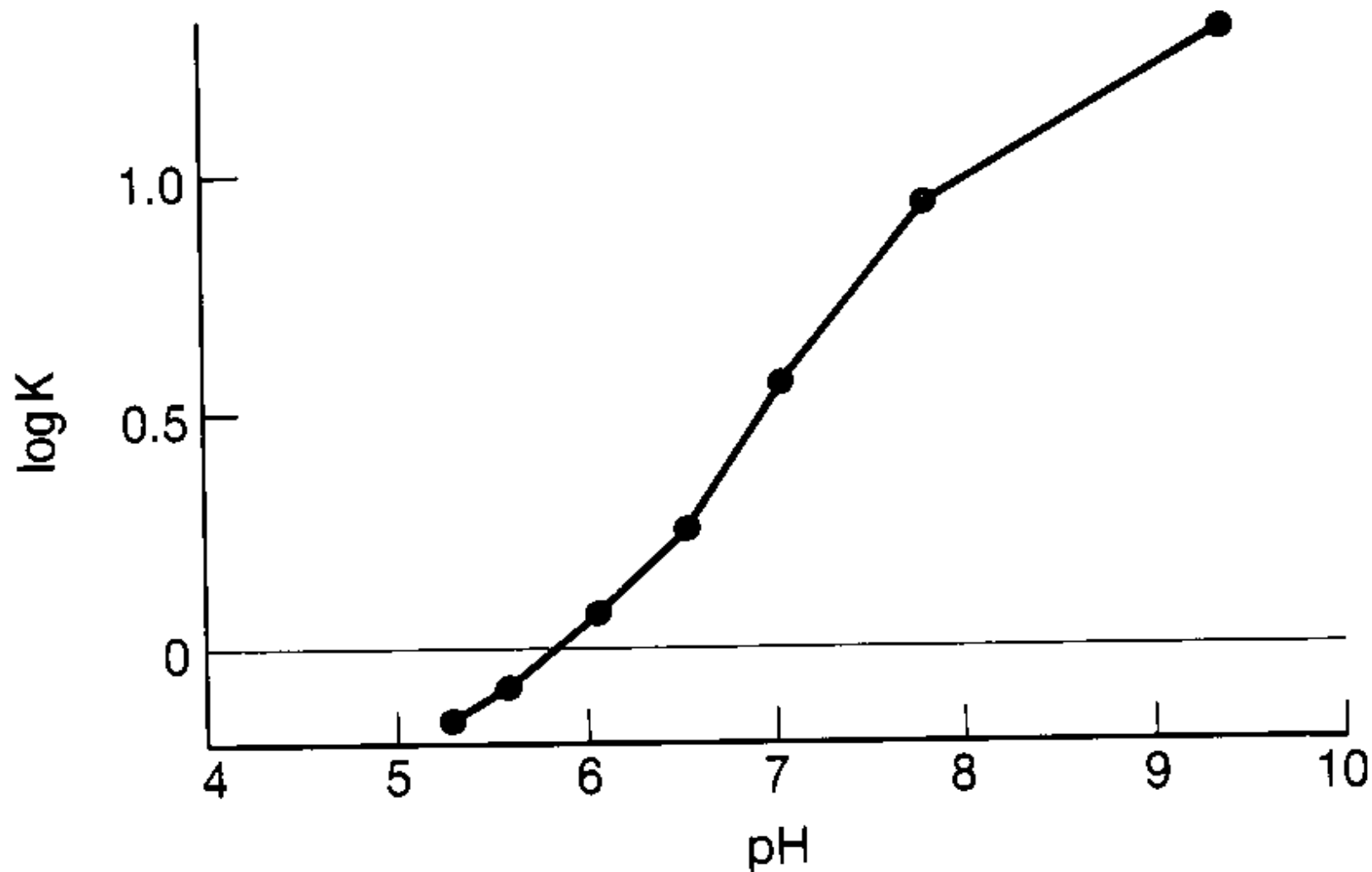


b



- **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.
- **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.



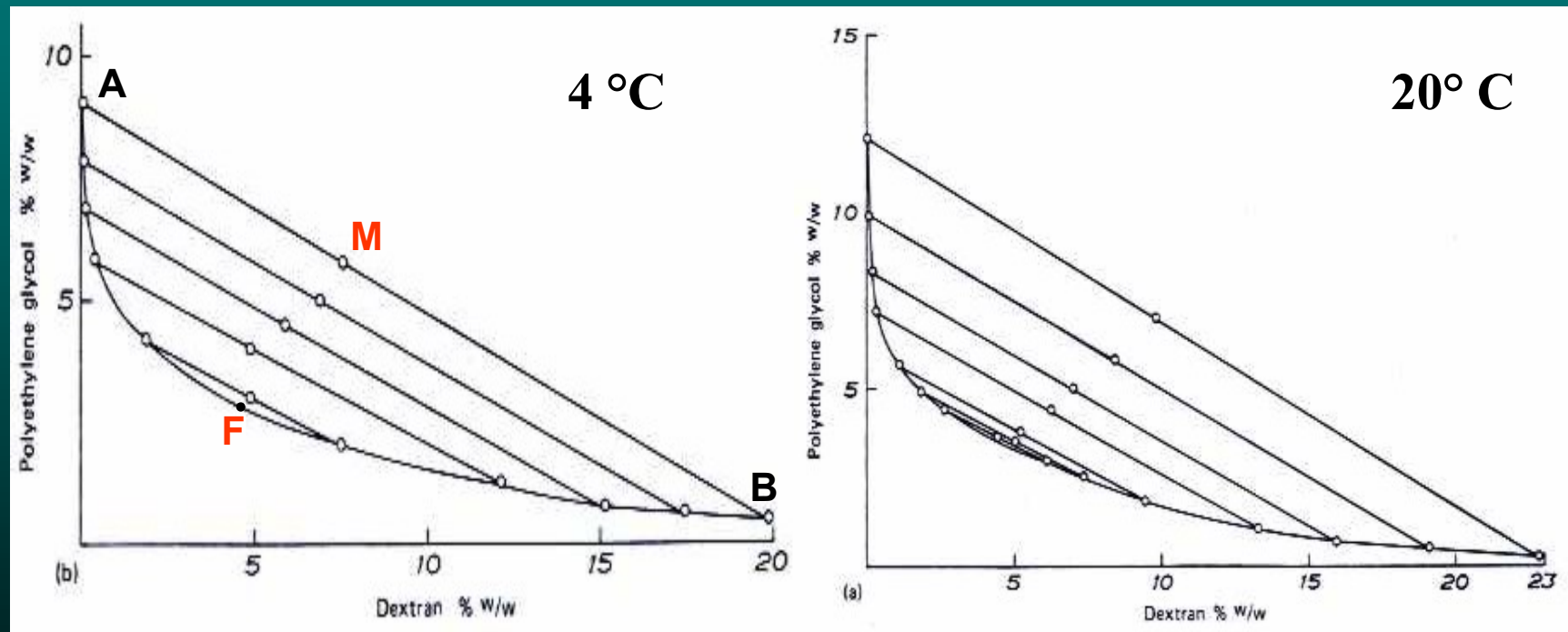


Distribuția α -amilazei pure în sisteme apoase bifazice PEG 4000 (10% m) – fosfat (11,5% m) în funcție de pH

- **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,
 - glutation,
 - ionii complecși de Cu(II)-iminodiacetat în sisteme PEG - dextran sau PEG - sare,
 - D-alanil-D-alanina în sisteme PEG 8000 - dextran și PEG 8000 - K_3PO_4 (**separarea vancomicinei**)



- Sensibilitatea coeficienților de distribuție la **variația temperaturii** este redusă.
 - Temperatura modifică forma diagramelor de echilibru de faze.



- Sensibilitatea coeficienților de distribuție la **variația temperaturii** este redusă.
 - Temperatura modifică distribuția biomoleculelor, o temperatură mai scăzută conducând la o mai bună separare a proteinelor între ele.

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	

Coeficientul de distribuție al lizozimei și catalazei în diverse SAB



Proiectarea procesului de extracție în SAB

- Proiectarea procesului de extracție în SAB implică:
 - (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.
- 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:

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



- Analog:

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

- unde:

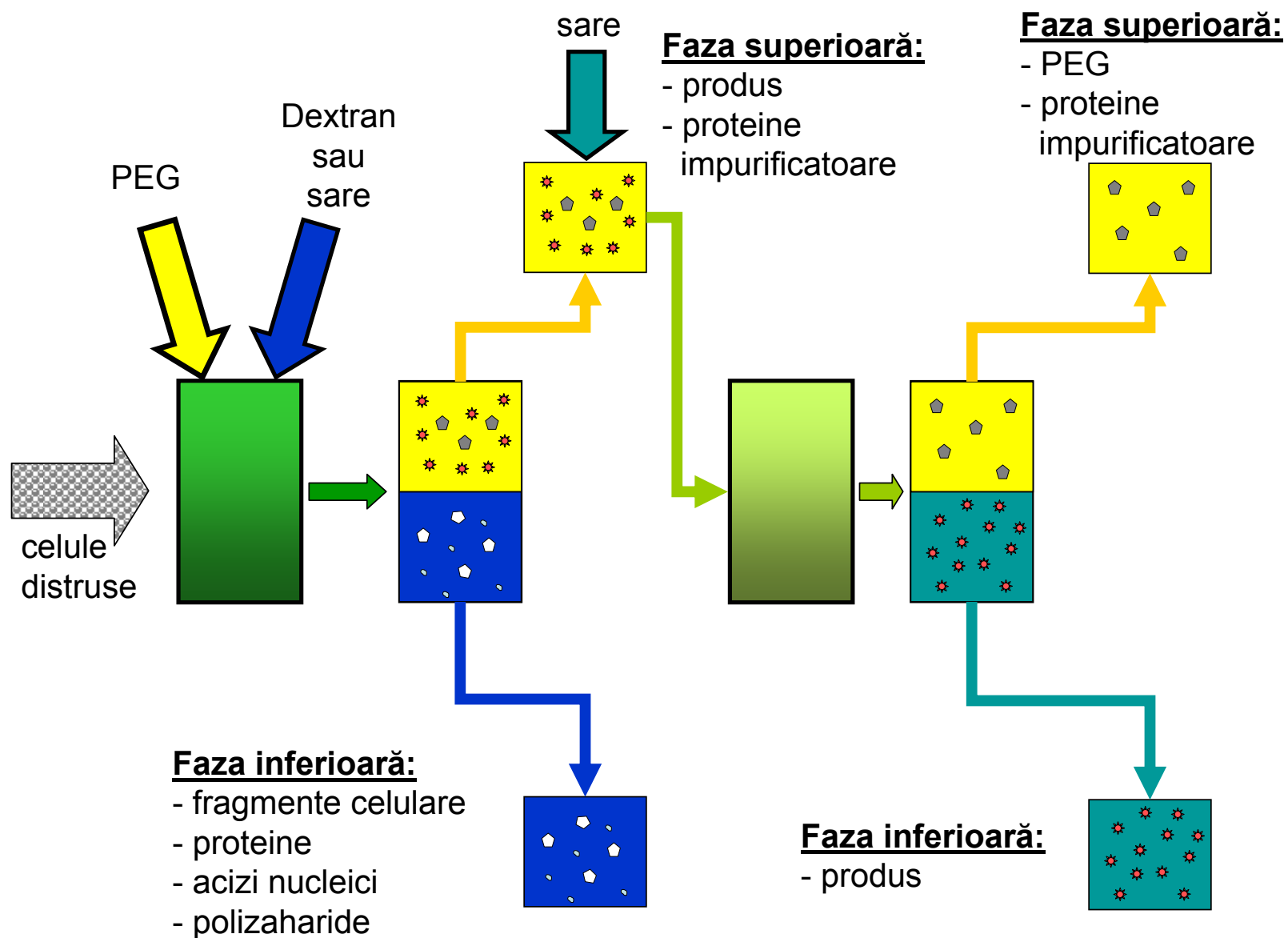
- V_0 - volumul inițial al fazei care conține componentul i ,
- $C_{i,0}$ - concentrația componentului i în faza inițială.



- **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 $C_{i,\text{inf}}$:

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





*Schema generală a procesului de extracție selectivă
a moleculelor proteice din lichidul intracelular*

Izolarea și purificarea enzimelor cu SAB

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



Biomolecule purificate la scară industrială prin extracție în SAB

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



- Extracția în SAB utilizează aceleași principii ca și extracția fizică L - L clasică.
- 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:



Proprietăți fizice ale SAB

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



- În aplicațiile la scară mare, cele mai utilizate SAB sunt:
 - PEG - dextran - apă
 - PEG - sare - apă,
- Avantaje:
 - aplicabilitate cvasigenerala,
 - viscozitate acceptabila
 - Diferența de densitate acceptabila.
 - În plus = netoxice și biodegradabile, fiind certificate de către farmacopeele din cele mai multe țări.
- Dezavantaj:
 - costul ridicat al dextranului purificat (de ordinul sutelor de dolari pe kg).
- Reducerea costurilor:
 - înlocuire cu dextran brut, dextran brut hidrolizat sau amidon hidroxipropilic.
 - Dextranul brut conduce la o soluție cu viscozitate mai ridicată, în timp ce dextranul hidrolizat reduce viscozitatea soluției.

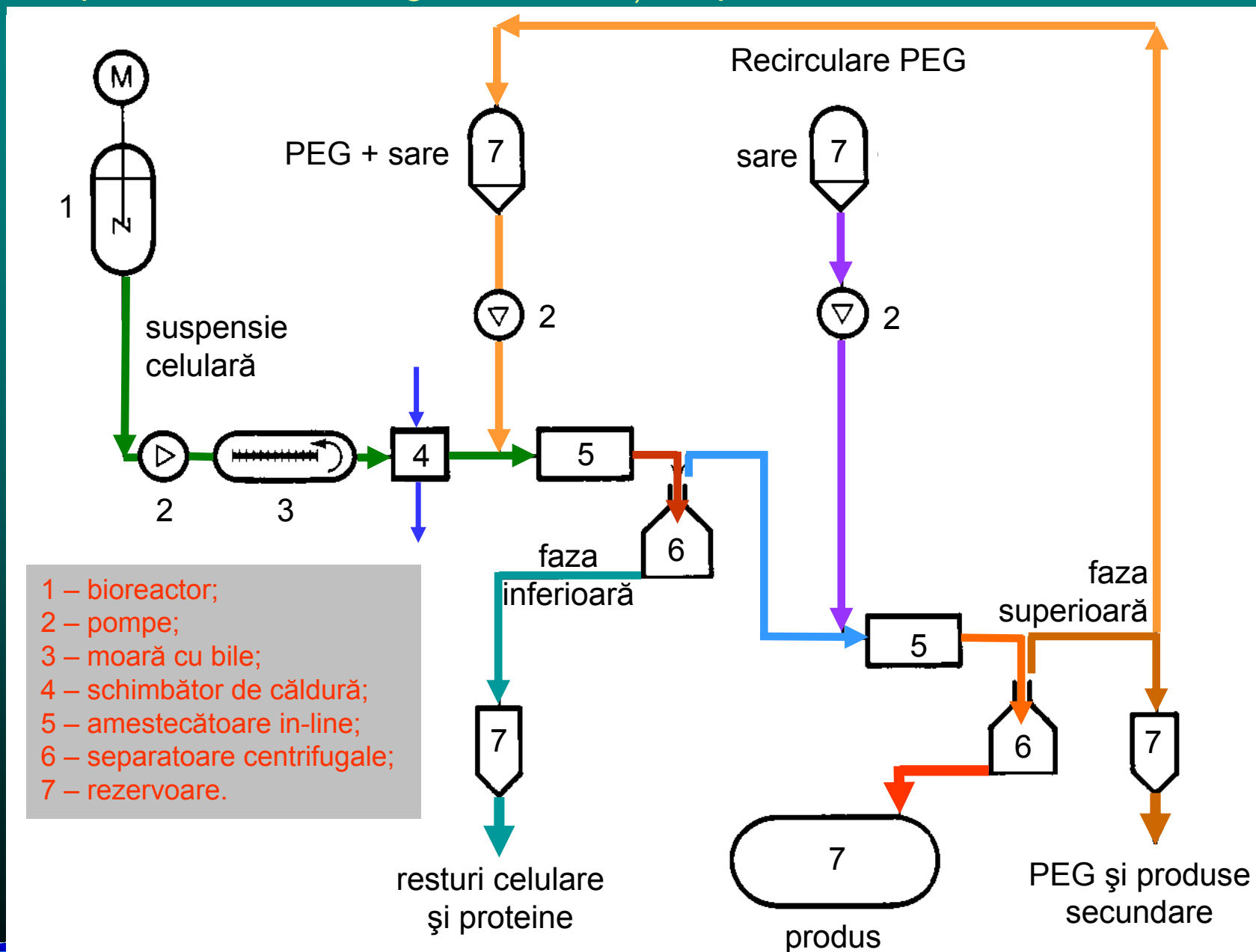


Procesul tehnologic de extracție în SAB

- Purificarea proteinelor intracelulare:
 - dezagregarea celulelor,
 - adăugarea componentilor SAB (PEG, dextran, fosfat etc.)
 - ajustarea pH-ului,
 - amestecarea suspensiei pentru atingerea echilibrului de faze.
Amestecarea se poate realiza fie în vase cu agitare prevăzute cu șicane, fie în amestecătoare statice. 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.
 - separarea fazelor = gravitațional sau centrifugal.
 - separarea centrifugală - la viscozitate ridicată a sistemului, sau în cazul diferențelor mici de densitate dintre faze.
 - Centrifugarea are avantajul suplimentar al unor randamente mai ridicate, la accelerații mari antrenarea resturilor celulare este mai scăzută.



Schema procesului tehnologic de extracție a proteinelor intracelulare în SAB



Procesul tehnologic de extracție în SAB

- 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.
- Proteina din faza de polimer mai poate fi separată prin:
 - centrifugare,
 - adsorbție,
 - ultrafiltrare,
 - electroforeză.
- 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;
 - prin cromatografie de interacțiune hidrofobă.



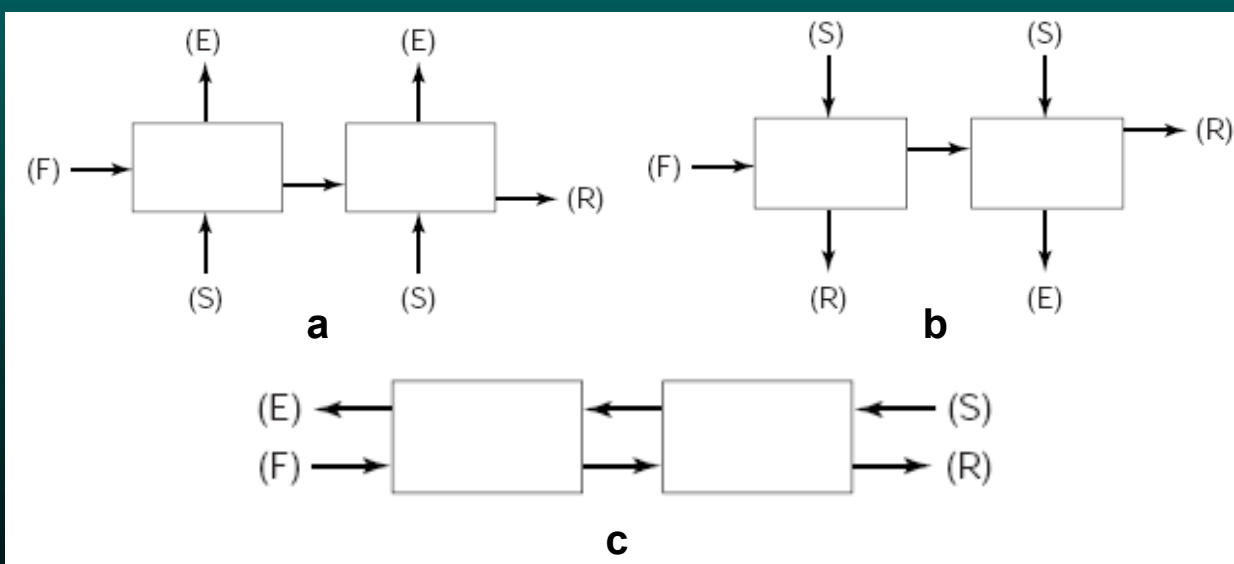
Procesul tehnologic de extracție în SAB

- Extracția în SAB se realizează:
 - în șarje (cel mai uzual)
 - în flux continuu (mai economic)
- Există 3 posibilități de prel. în flux continuu:
 - extracția în echicurent (a),
 - extracția în contracurent (c),
 - extracția în curent încrucișat (b).
- Pentru capacități mari de producție, extracția în contracurent oferă un randament mai ridicat, la un consum minim de chimicale.



Avantaje și dezavantaje ale modurilor de contactare în extracția continuă în SAB

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



(F) - alimentare;
 (S) - solvent;
 (E) - extract;
 (R) - rafinat.



Procesul tehnologic de extracție în SAB

- 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,
 - tensiunea interfacială este prea redusă.

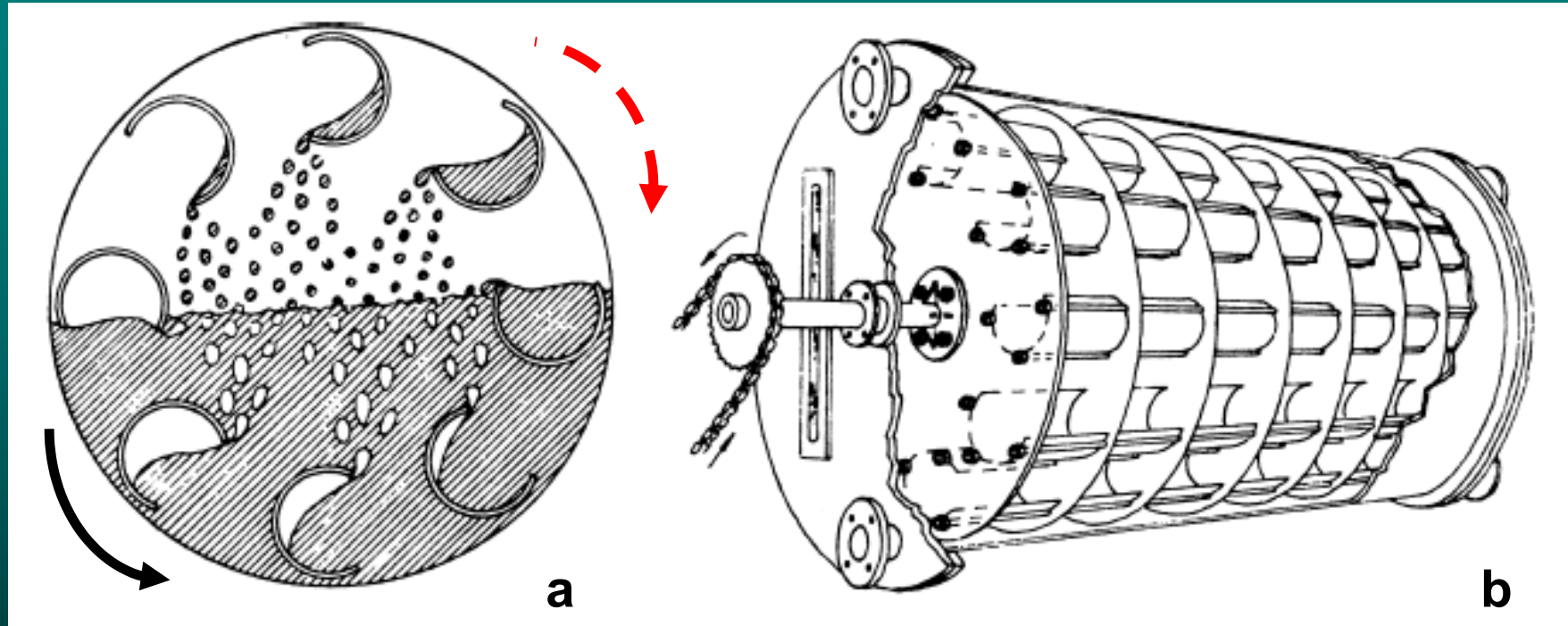


Procesul tehnologic de extracție în SAB

- Pentru extracția în trepte cu SAB au fost testate:
 - baterii de amestecătoare - decantoare,
 - coloane Kühni,
 - extractoare centrifugale Podbielniak,
 - coloane cu pulverizare,
 - coloane cu talere sită,
 - coloane cu umplură.
- Toate pot fi exploatate cu succes cu luarea unor măsuri de precauție împotriva înecării.
- Rezultate bune s-au obținut și cu **extractorul Graesser** în separarea α -lactalbuminei din zer cu SAB PEG - sare.



Extractor Graesser (actualmente RTL SA Londra)



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



Extractor Graesser

- Este format dintr-un rotor orizontal prevăzut cu cupe (de unde și denumirea de „contactor în ploaie cu găleți” - Raining bucket contactor) care se rotește lent în interiorul unui tambur alimentat pe la extremități cu fazele supuse extracției.
- Este singurul extractor care dispersează atât faza ușoară în faza grea, cât și faza grea în faza ușoară.
- 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.



Recuperarea chimicalelor și reducerea costurilor

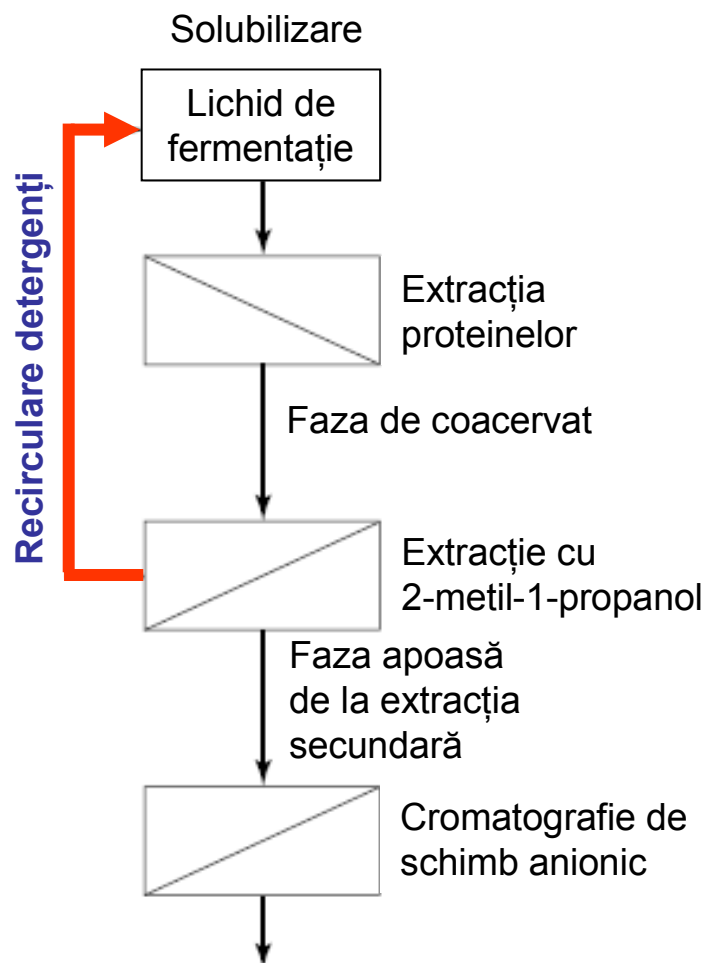
- Pentru a reduce costurile ridicate cu reactivii și cu depozitarea deșeurilor se recomandă **reciclarea** sau **recircularea** materialelor auxiliare.
- **Recuperarea polimerilor** după extracția biomoleculelor este o etapă importantă atât la scară de laborator, cât și în instalația industrială.
- Posibilitatea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



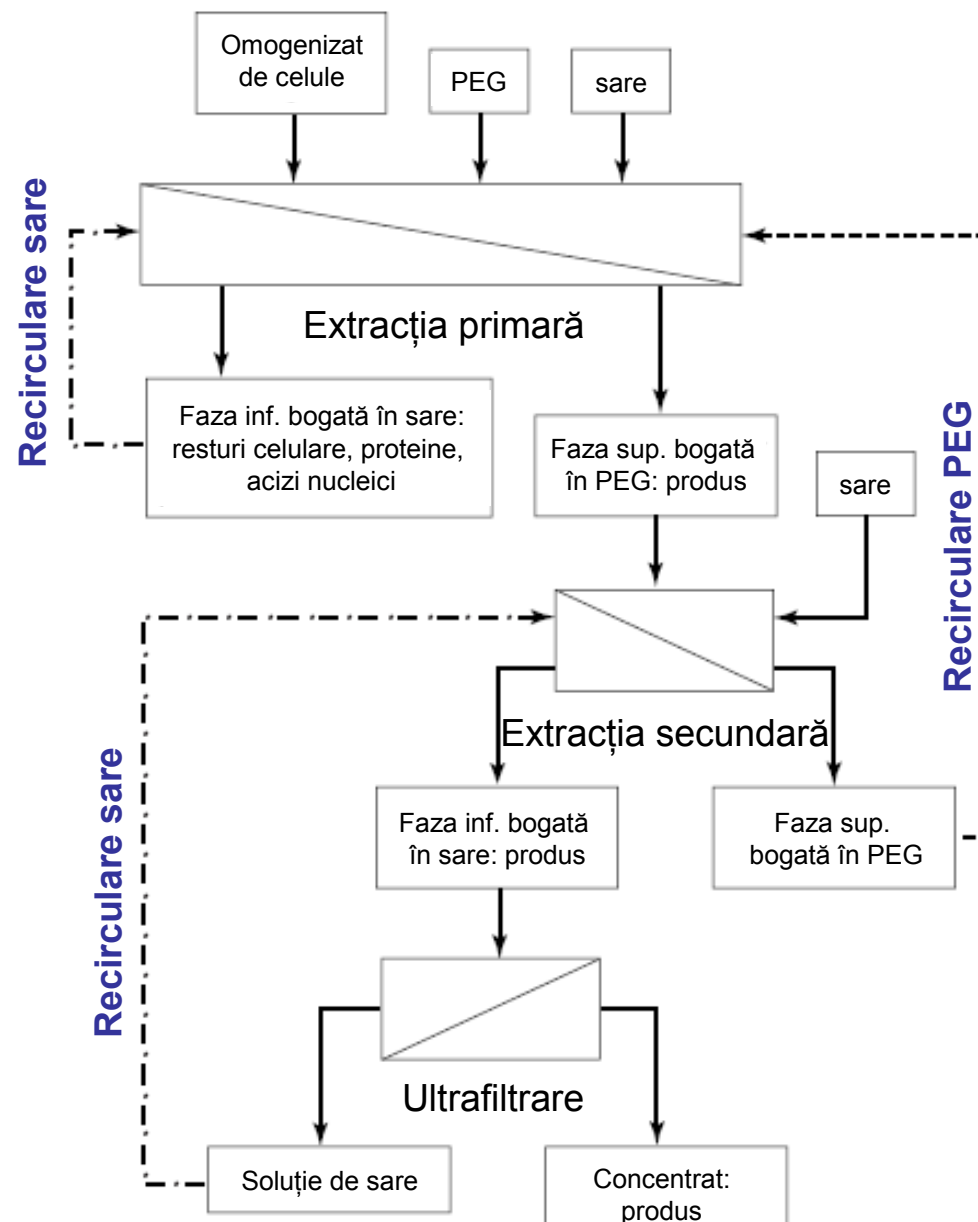
Modalități de recuperare a polimerilor și sărurilor utilizate în extracția cu SAB

- Din fluxurile lipsite de fază solidă fosfatul poate fi recuperat prin cristalizare la 6 °C.
- Pentru recircularea PEG s-a propus:
 - extracția cu cloroform,
 - reextracția salină a proteinelor din faza bogată în PEG, cu formarea unei soluții reciclabile de PEG liberă de proteină,
- Separarea PEG de enzimele extrase:
 - ultrafiltrarea, dializa, sau reținerea enzimei pe un adsorbant adecvat.
- Recircularea detergenților:
 - extracție cu alcooli alifatici inferiori
- Recuperarea sărurilor:
 - exploatarea lacunelor de miscibilitate în sistemele ternare apă - sare - alcooli alifatici inferiori
- 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 NH_3 și CO_2 .





Schema de flux a extracției colesteroloxidazei utilizând SAB bazate pe detergenți



Schema de flux a extracției cu SAB PEG – sare, cu recircularea extractanților

Transpunerea la scară a extracției în SAB

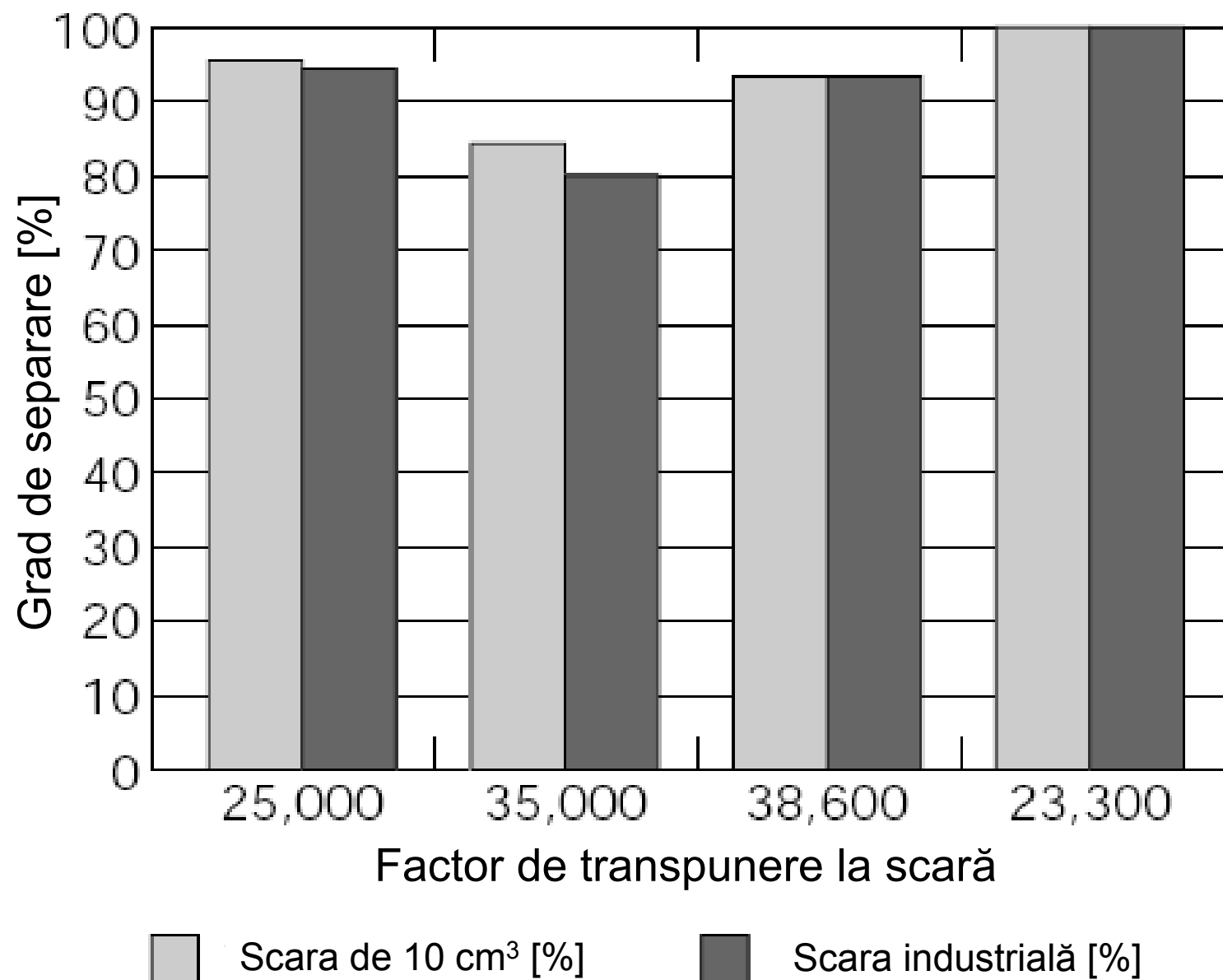
- Unul dintre avantajele extracției în SAB: ușurința transpunerii la scară a procesului, prin simpla creștere proporțională a cantității ingredientelor utilizate.
- Echipamentele industriale de separare centrifugală existente pe piață pot fi selecționate utilizând conceptul Σ (vezi *Centrifugarea*).



Transpunerea la scară a extracției în SAB

- Intre 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,
 - altor proteine terapeutice active.
- Scara de operare:
 - de la 24 kg celule prelucrate / șarjă până la 50 m³ material celular prelucrat / șarjă.





*Transpunerea la scară a diferitelor etape de izolare și purificare a formiatdehidrogenazei din **Candida boidinii***

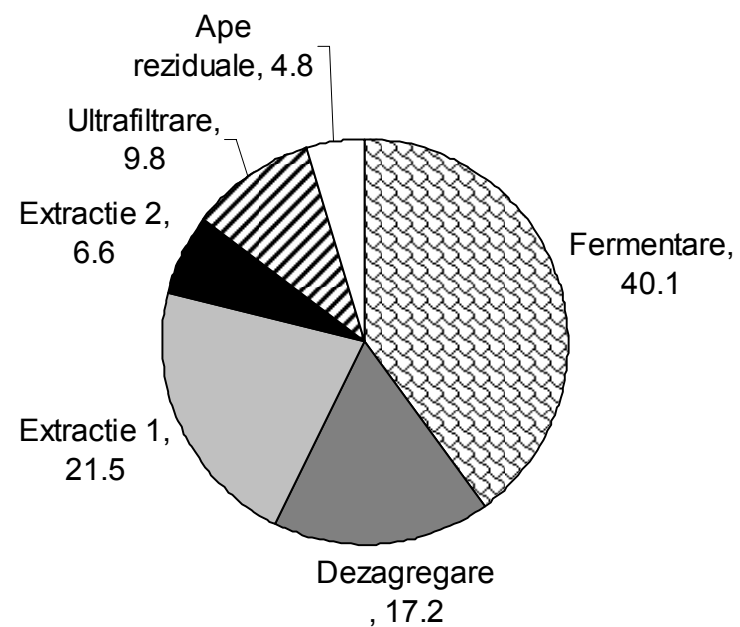
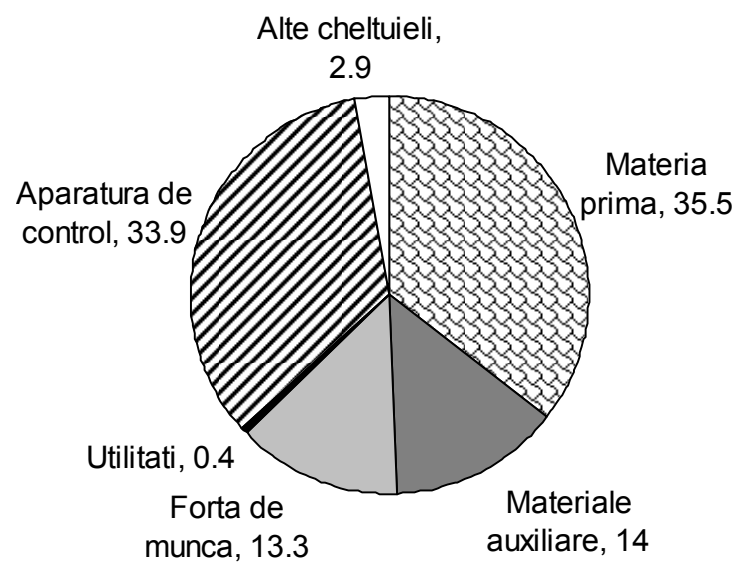
Aspecte economice ale extracției în SAB

- 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.

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

- C_T = 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





Structura costurilor de fabricație a fumarazei din *Brevibacterium ammoniagenes*



Evaluarea costurilor în producția fumarazei din *S. cerevisiae*

$$C_T = 1,13C_M + 2,6C_L + 1,13C_U + 1,6C_I$$

Costuri	Fără recirculare		Cu recirculare		Modificare [%]	
	Disc.	Cont.	Disc.	Cont.	Disc.	Cont.
Cu materiale	2,48	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



CONCLUZII

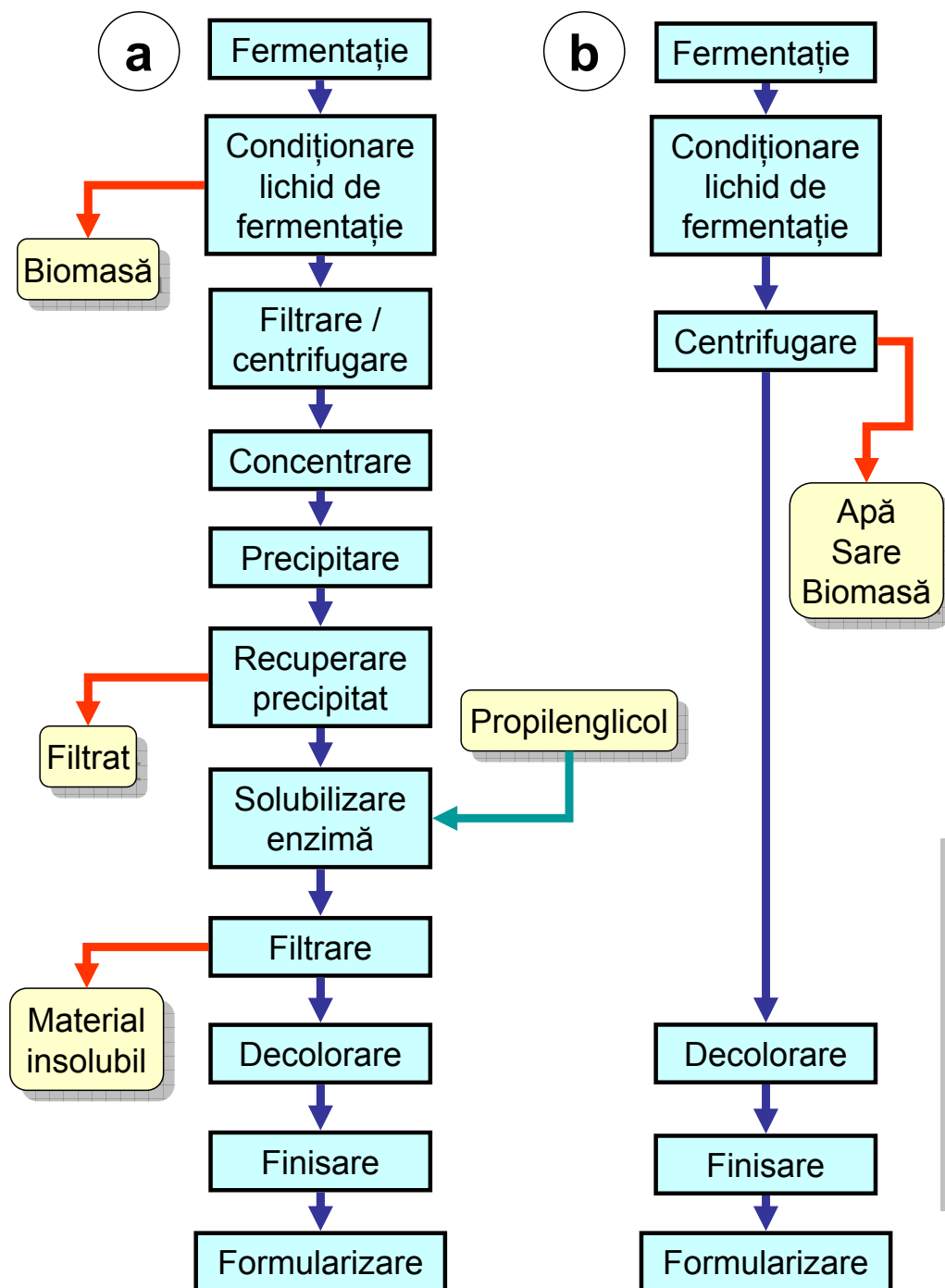
- Extracția în SAB:
 - consumuri energetice scăzute,
 - investiții minime,
 - cheltuieli mari cu forța de muncă
 - cheltuieli mari cu materialele.
- Reducerea costurilor materialelor:
 - alegerea corespunzătoare a rapoartelor volumice ale fazelor,
 - introducerea de noi SAB,
 - perfecționarea proceselor de recuperare - recirculare.
- Reducerea duratei procesului:
 - utilizarea separării centrifugale;
 - obținerea unor randamente superioare,
 - obținerea unor produse calitativ superioare, datorită absenței unei degradări proteolitice semnificative.



Extracția în SAB - tehnologie integrativă

- EX: Obținerea α -amilazei din *Bacillus sp.* prin tehnologia convențională și prin extracția în SAB.
- Față de procesul convențional:
 - Extracția în SAB necesită mai puține etape,
 - Randamentul global:
 - 80% la extracția într-o singură treaptă
 - 95% la extracția în două trepte,
 - numai 70% prin procedeul convențional.
 - Costurile se reduc cu:
 - 35% la extracția într-o singură treaptă,
 - 50% la extracția în două trepte.





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