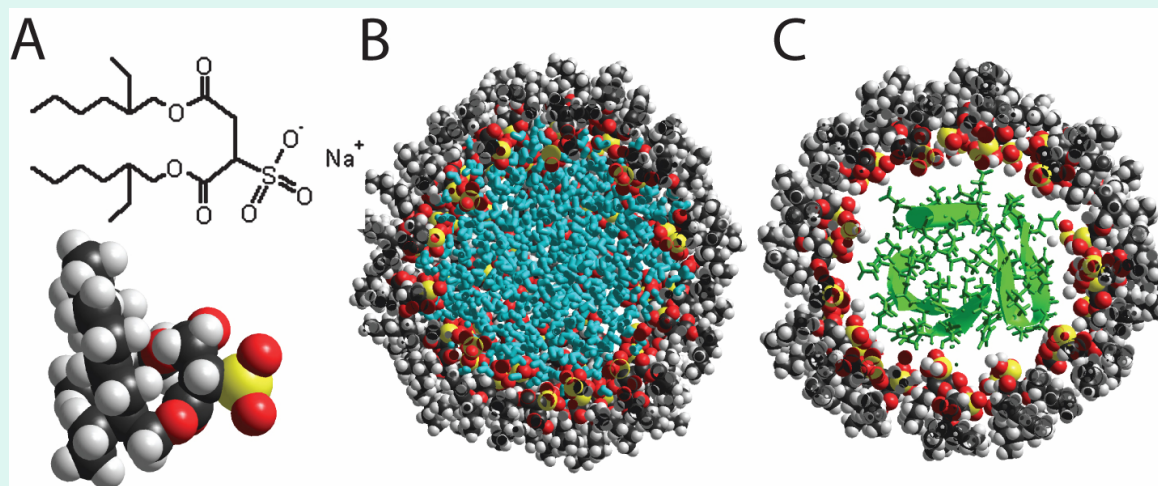
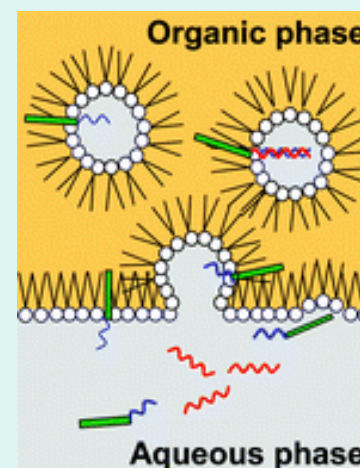
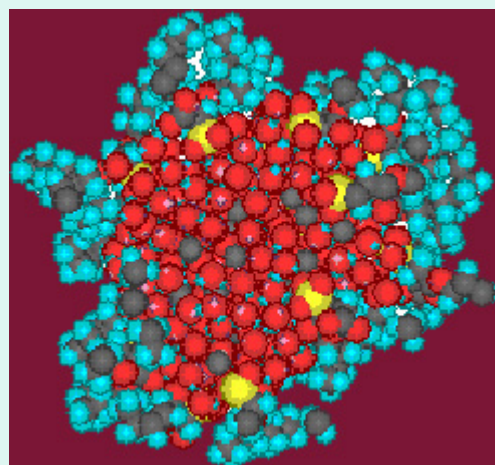




EXTRACTIA CU MICELE INVERSE



EXTRACTIA CU MICELE INVERSE

- **Extracția clasică L - L** realizează distribuția biomoleculelor între o fază apoasă și o fază organică distinctă;
- **Extracția în SAB** 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).

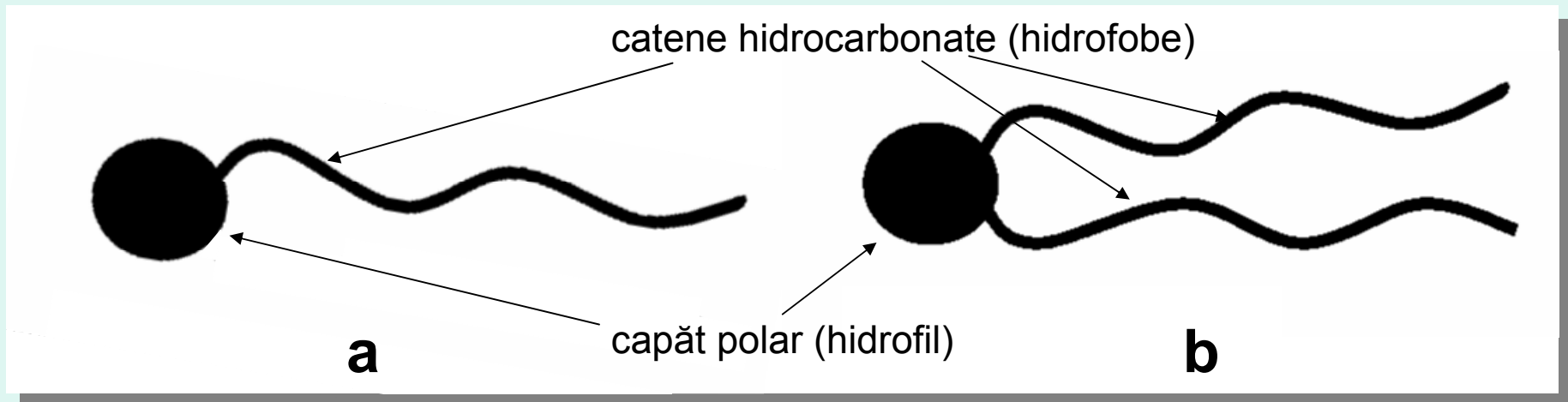


EXTRACTIA CU MICELE INVERSE

- Micele 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.

Formarea și proprietățile micelilor inverse

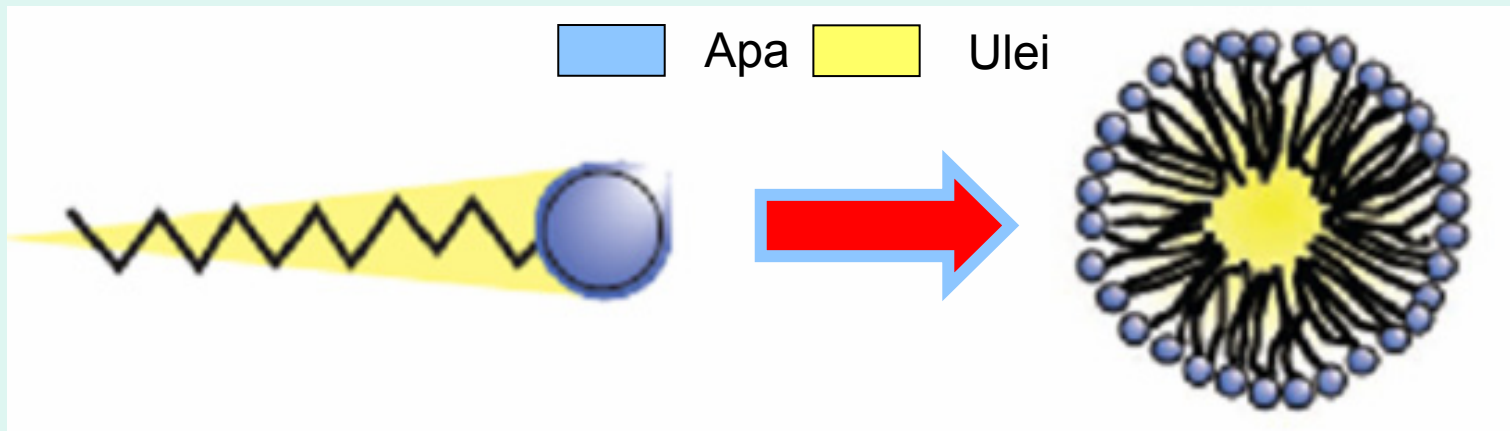
- **Surfactanții** = molecule constituite din:
 - un „cap” polar hidrofil (atras de apă)
 - o „coadă” hidrofobă - o catenă hidrocarbonată (atrasă de ulei)
- In contact cu apa, partile hidrofobe ale surfactantului tind să se asocieze astfel încât contactul cu apa să fie minim



Formarea și proprietățile micelilor inverse

- **Surfactantul:**

- capăt polar voluminos + catenă hidrofobă redusă, de formă conică,
- moleculele tind să se asocieze sferic, cu catenele formând un miez interior, înconjurat de o suprafață exterioară alcătuită din capetele polare = **micelă normală**.



Formarea și proprietățile micelilor inverse

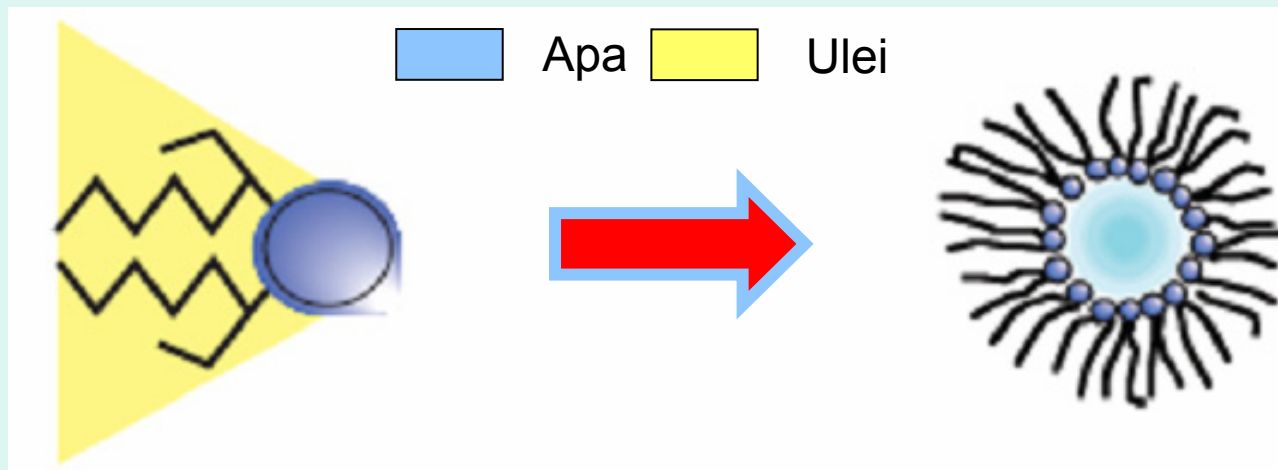
- La concentrații reduse de surfactant micela normală este **sferică**, cu un diametru dictat de lungimea catenei hidrocarbonate și de mărimea capătului polar.
- **Sistemul este dinamic** = moleculele implicate în formarea micelilor părăsesc agregatul, fiind înlocuite de altele care se mișcă liber în volumul fazei apoase.
- În câteva microsecunde înlocuirea tuturor moleculelor de surfactant dintr-o micelă este completă, iar forma sferică a micelii normale se păstrează întotdeauna.



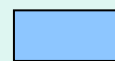
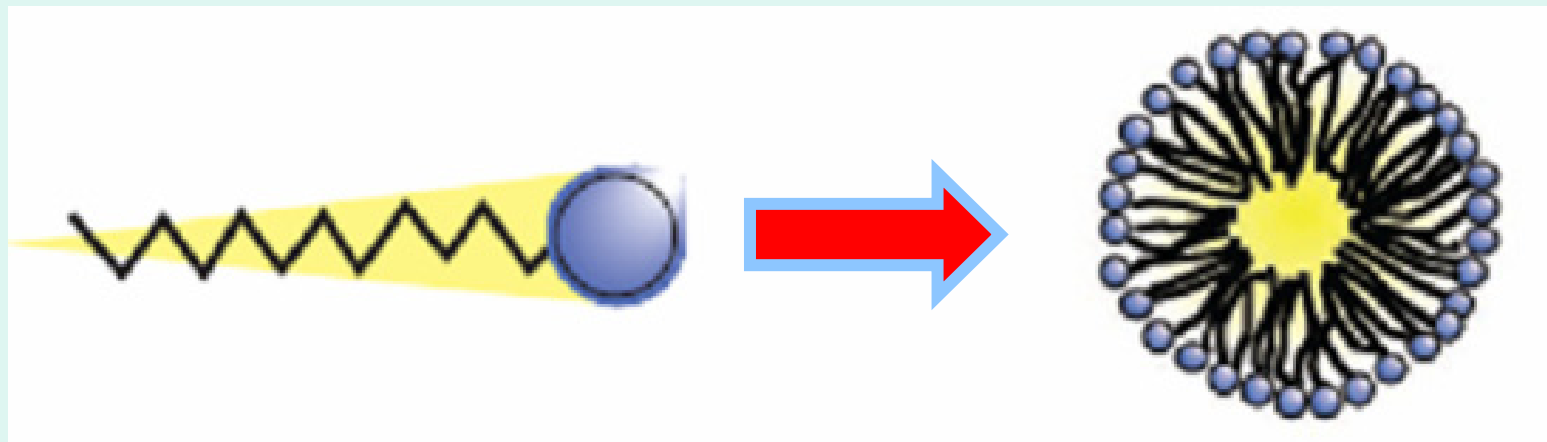
Formarea și proprietățile micelilor inverse

- **Molecula de surfactant:**

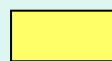
- un capăt polar mic
- o catenă hidrocarbonată voluminoasă, ramificată (semănând cu un dop de șampanie)
- moleculele se asociază într-un agregat sferic în care miezul este format din capetele polare și suprafața externă din catenele hidrofobe, agregat numit **micelă inversă** [microemulsie de tip A/U]



Formarea și proprietățile micelilor inverse

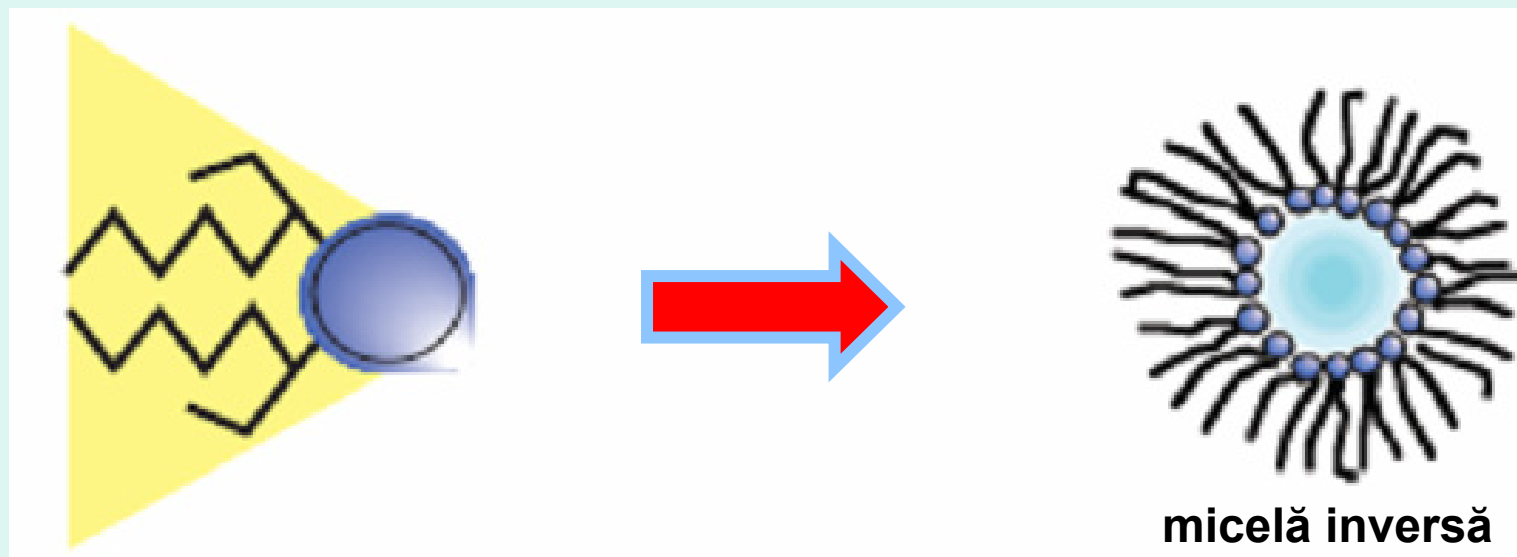


Apa



Ulei

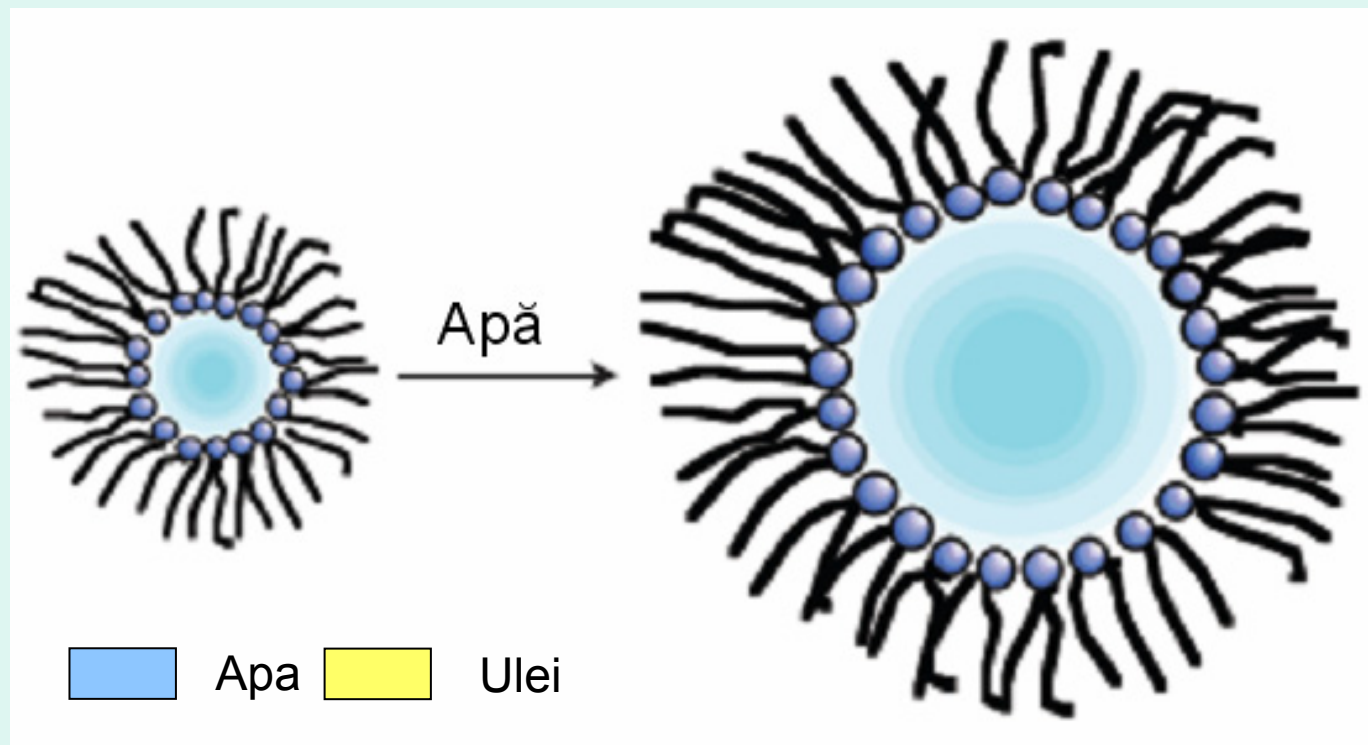
micelă normală

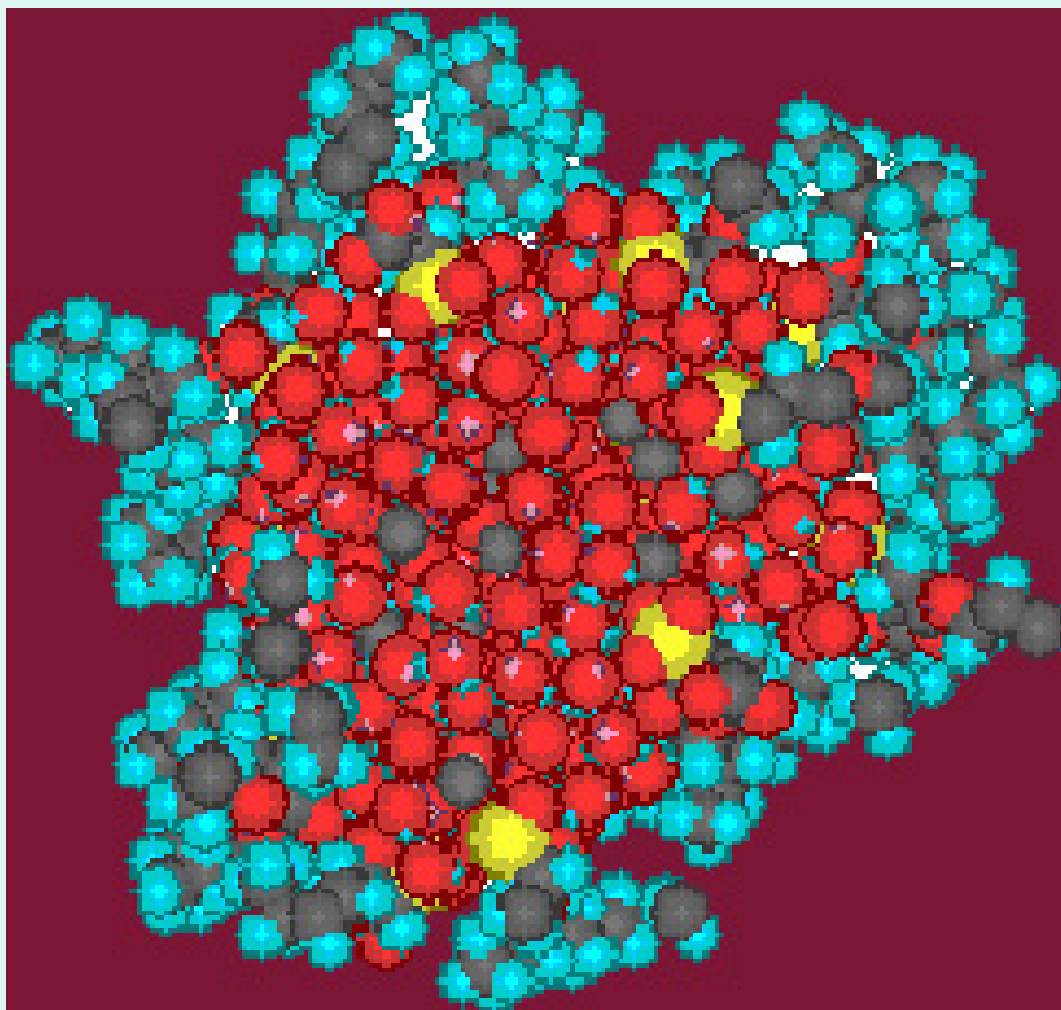


micelă inversă

Formarea și proprietățile micelilor inverse

- Spre deosebire de micellele normale, mărimea micelilor inverse crește liniar cu cantitatea de apă adăugată în sistem:





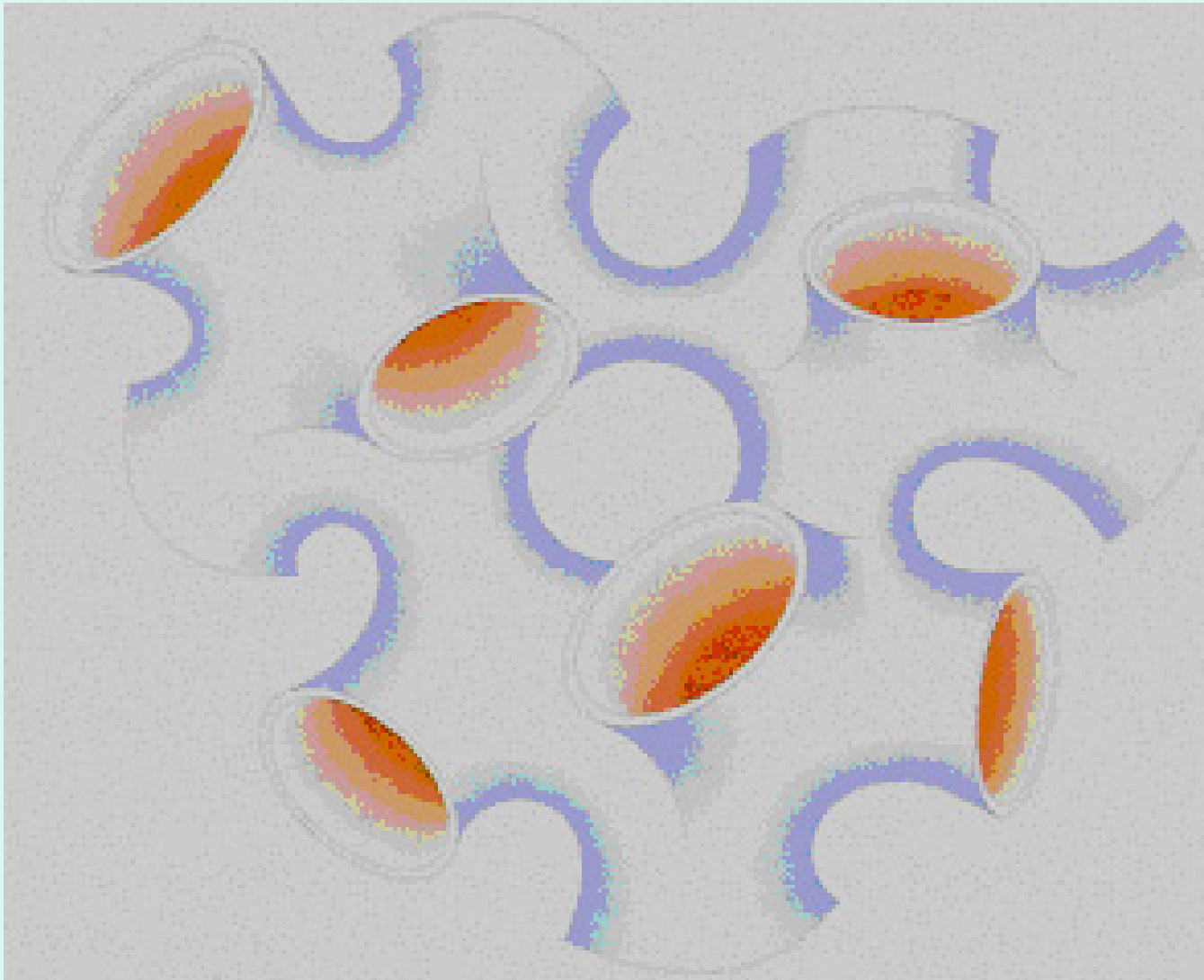
AOT Reverse Micelle, $[H_2O]/[AOT] = 7.5$

Formarea și proprietățile micelilor inverse

- 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.
- 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.



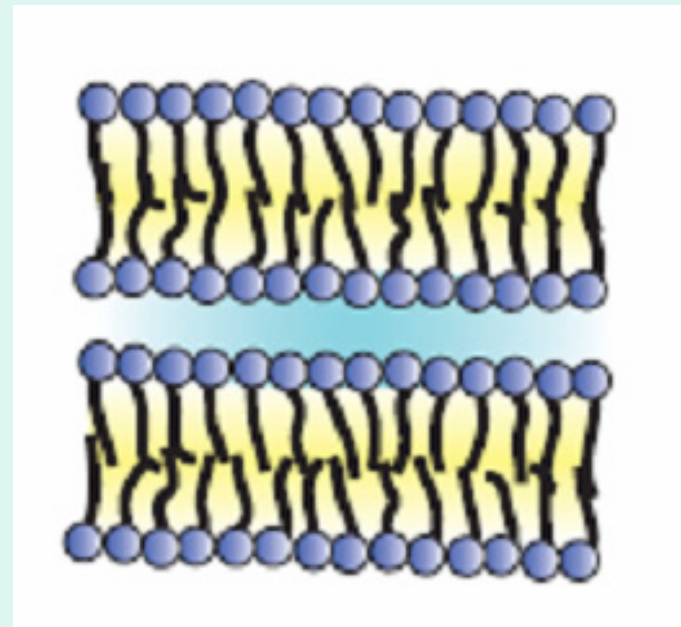
Structură bicontinuă



 Apa
 Ulei

Formarea și proprietățile micelilor inverse

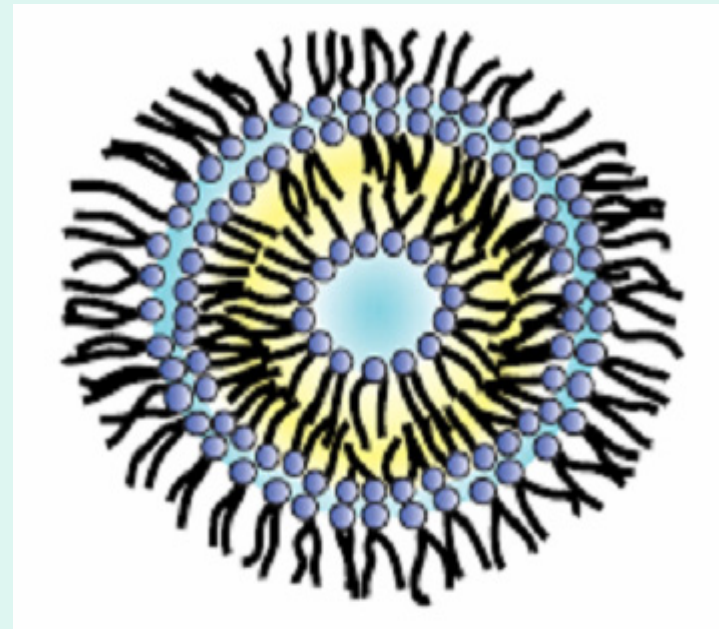
- La adăugare de apă, moleculele de surfactant se reorganizează sub forma unui **film plan** sau **lamelar**, sistemul devenind opalescent și birefringent.

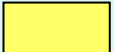


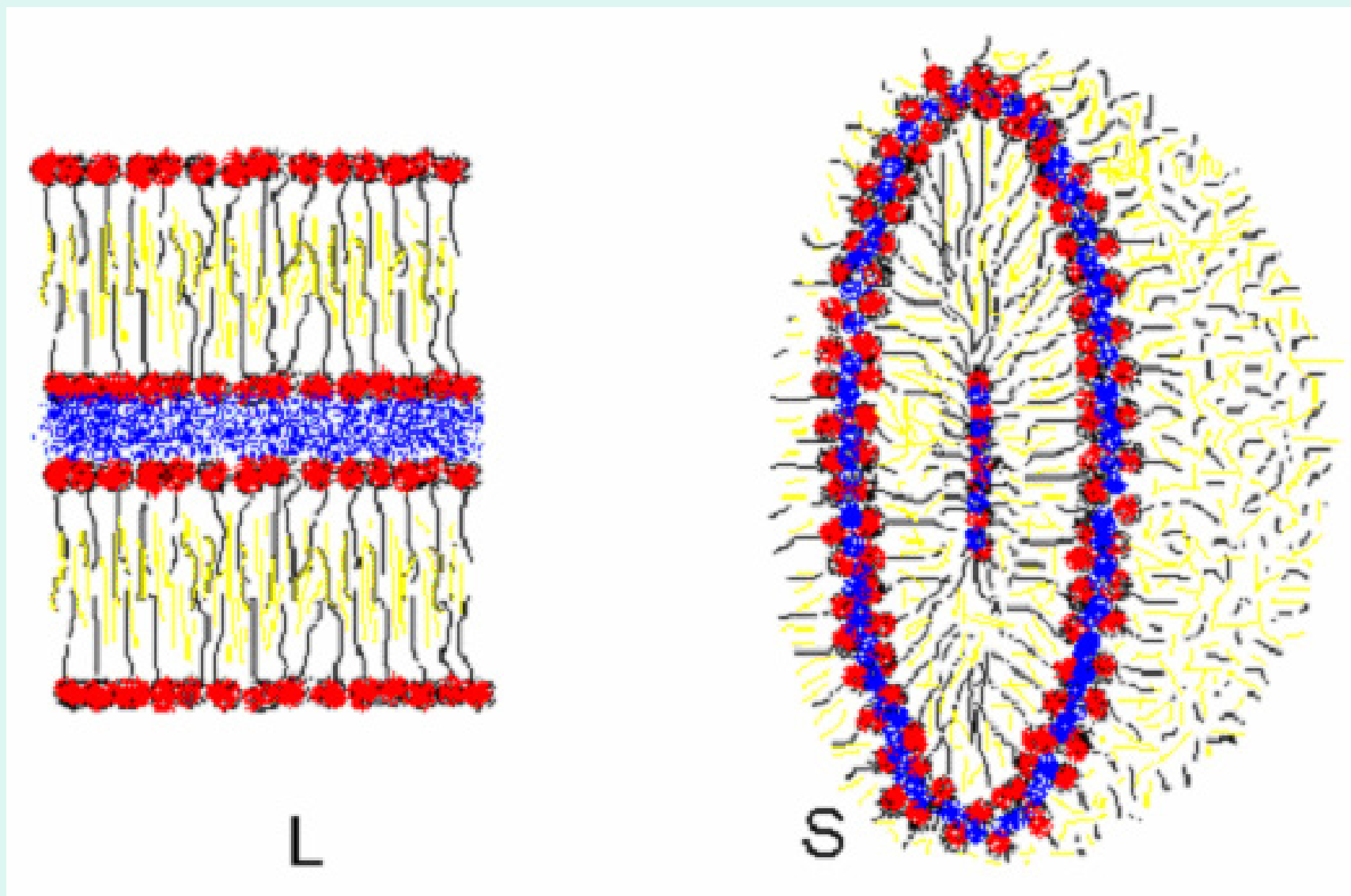
 Apa  Ulei

Formarea și proprietățile micelilor inverse

- Se poate forma o emulsie stabilă și din „supra-agregate” în sisteme conținând doi surfactanți funcționalizați, capabili să formeze legături puternice între ei.
- Surfactanții se organizează într-o fază de formă lamelară care nu mai este plană ci spațială, de forma unei cepe, formă numită și **sferulită**.



 Apa  Ulei



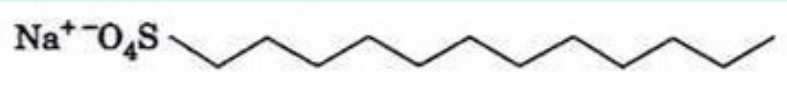
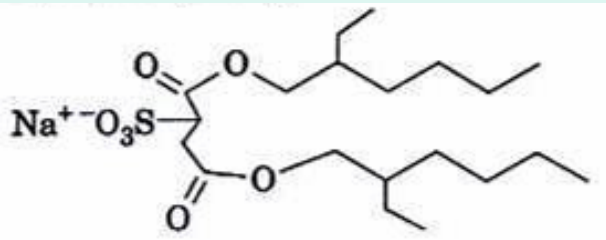
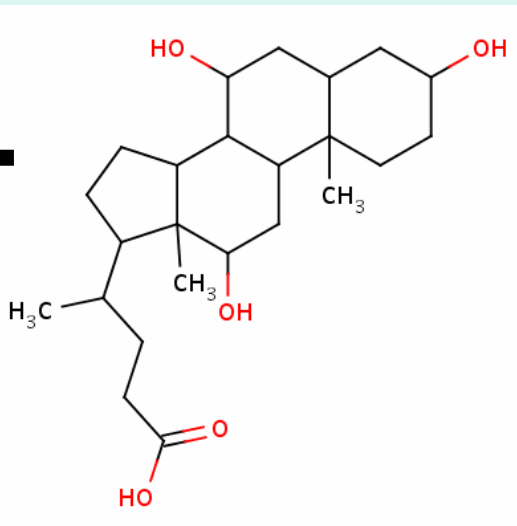
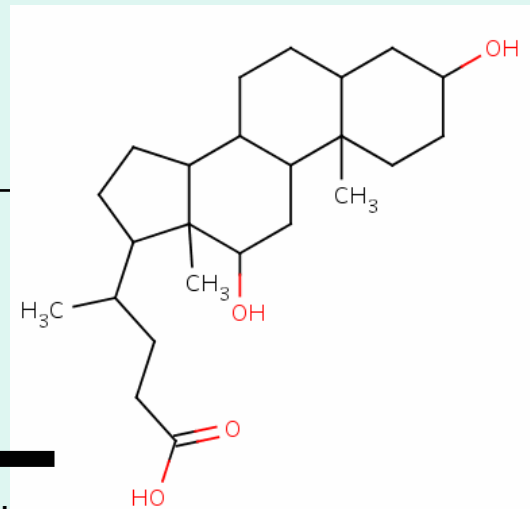
■ Apa ■ Ulei

Surfactanți

- Se clasifică în funcție de sarcina capătului hidrofil existentă după disocierea în apă:
 - surfactanți neionici,
 - surfactanți ionici:
 - anionici,
 - cationici,
 - amfiionici.
- Surfactanții trebuie să fie compatibili cu sistemele biochimice în care acționează.
- Numeroși surfactanți formează micle inverse în medii nepolare, cei mai mulți dintre ei necesitând însă și prezența unui co-surfactant.



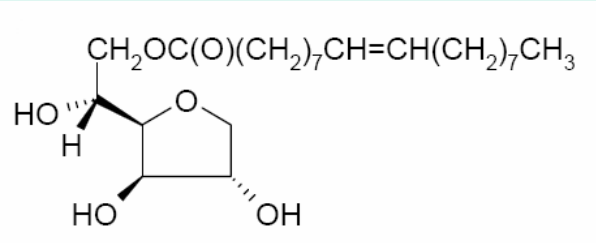
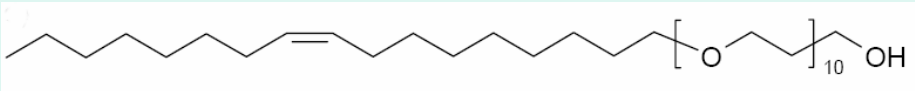
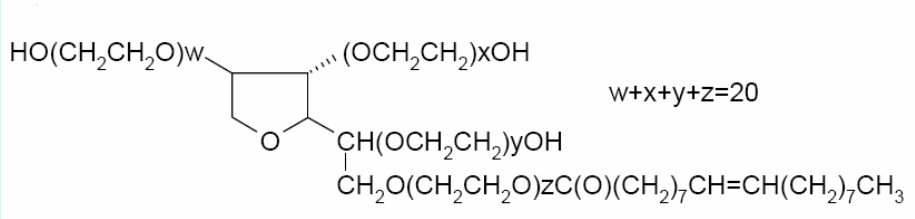
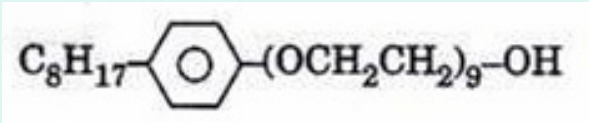
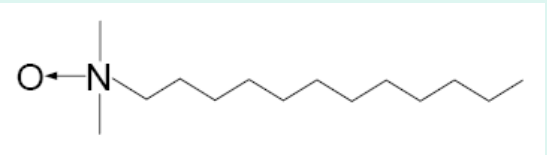
Surfactanți frecvent utilizați în extracția cu micle inverse

Tip	Denumire	Denumire comercială	Formulă chimică
anionic	dodecilsulfat de sodiu	SDS	
anionic	bis(2-etil-hexil) sulfosuccinat de sodiu	AOT	
anionic	acid cholic sare de sodiu		 
anionic	acid deoxicholic sare de sodiu		

Surfactanți frecvent utilizați în extracția cu micle inverse

Tip	Denumire	Denumire comercială	Formulă chimică
anionic	N-lauril sarcosin sare de sodiu		
cationic	bromură de cetiltrimetil-amoniu	CTAB	
cationic	clorură de trioctilmetil-amoniu	TOMAC	
amfiionic	1,2-dioctanoic- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocholină		

Surfactanți frecvent utilizați în extracția cu micle inverse

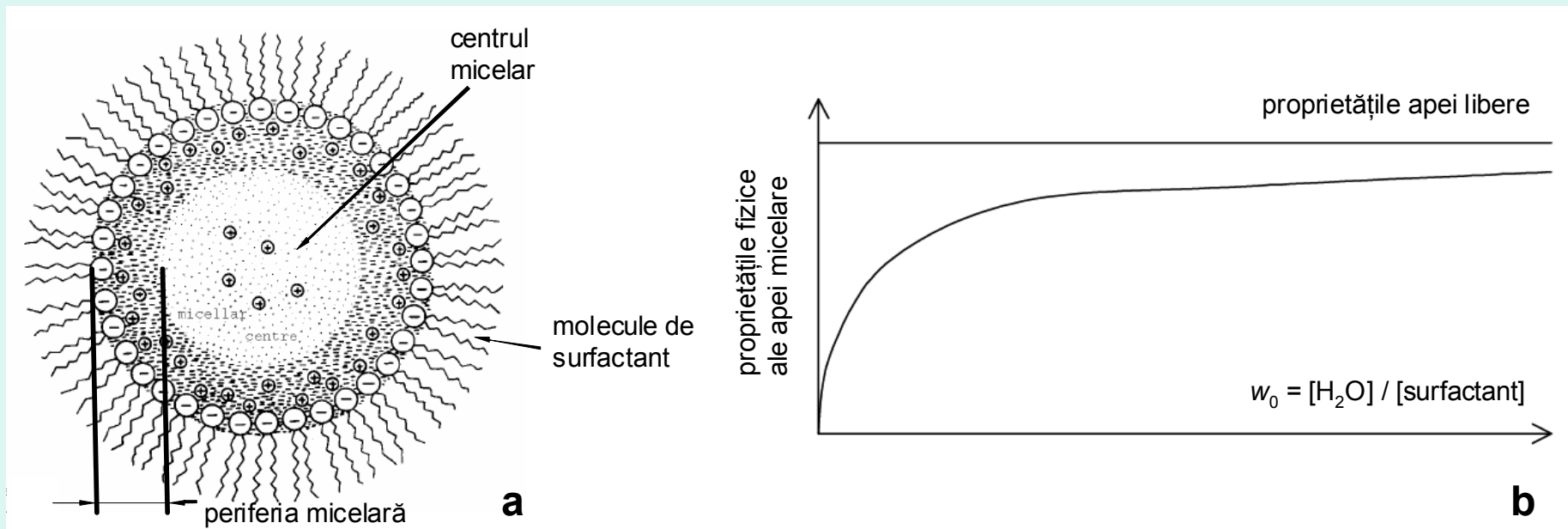
Tip	Denumire	Denumire comercială	Formulă chimică
neionic	monooleat de sorbitan	Span 80	
neionic	oleil poli(10) oxietilen eter	Brij 96	
neionic	monooleat de poli(20) oxietilen sorbitan		
neionic		Triton X - 100	
neionic	laurildimetil-aminooxid		

Formarea și proprietățile micelilor inverse

- 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 micelilor 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 apă liberă:
 - în micellele inverse formate de AOT:
 - până la $w_0 = 6 \div 8$ apa este legată de capetele hidrofile ale surfactantului;
 - la valori $w_0 > 6 \div 8$ apa se comportă ca și apă liberă



Formarea și proprietățile micelilor inverse



Proprietățile apei înglobate în miclele inverse:

a – schema unei micle inverse de AOT;

b – variația proprietăților fizice ale apei în miclele inverse

Formarea și proprietățile micelilor inverse

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

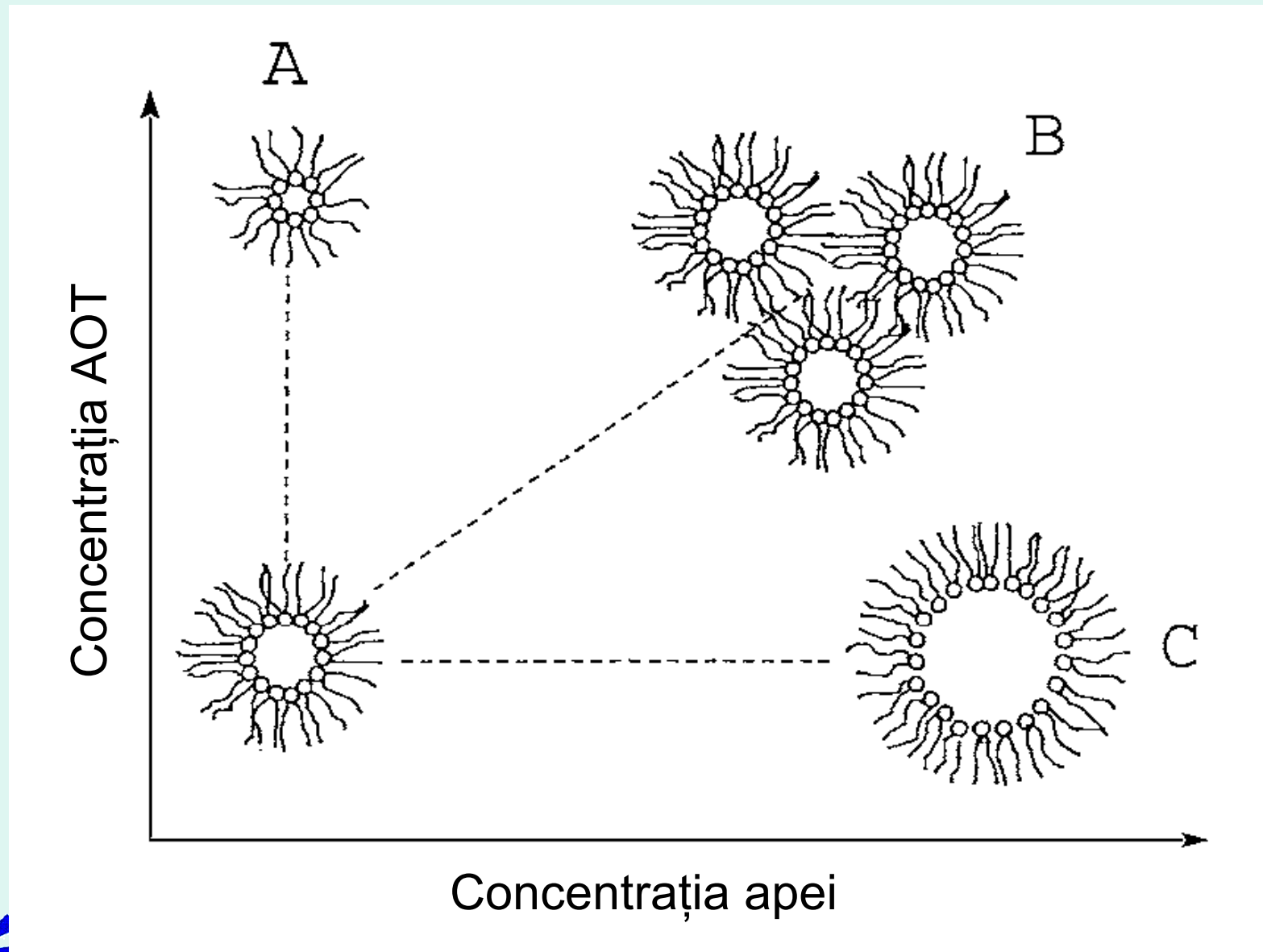


Formarea și proprietățile micелеlor inverse

- Micelele inverse de AOT:
 - își măresc diametrul la creșterea concentrației de apă, dacă concentrația AOT rămâne constantă (**C**);
 - la conținut de apă constant, creșterea concentrației de AOT conduce la micșorarea diametrului micелеlor inverse (**A**);
 - dacă atât concentrația apei, cât și concentrația AOT cresc în același raport, mărimea micелеlor rămâne aproximativ constantă, mărindu-se doar numărul acestora (**B**).



Formarea și proprietățile micelilor inverse



Formarea și proprietățile micelilor inverse

- 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.
- Aceste sisteme sunt foarte dinamice: amestecând o soluție de micele inverse de diametru mare cu o soluție de micele inverse de diametru mic, în câteva secunde se obține o soluție conținând micele inverse având un diametru intermediar.



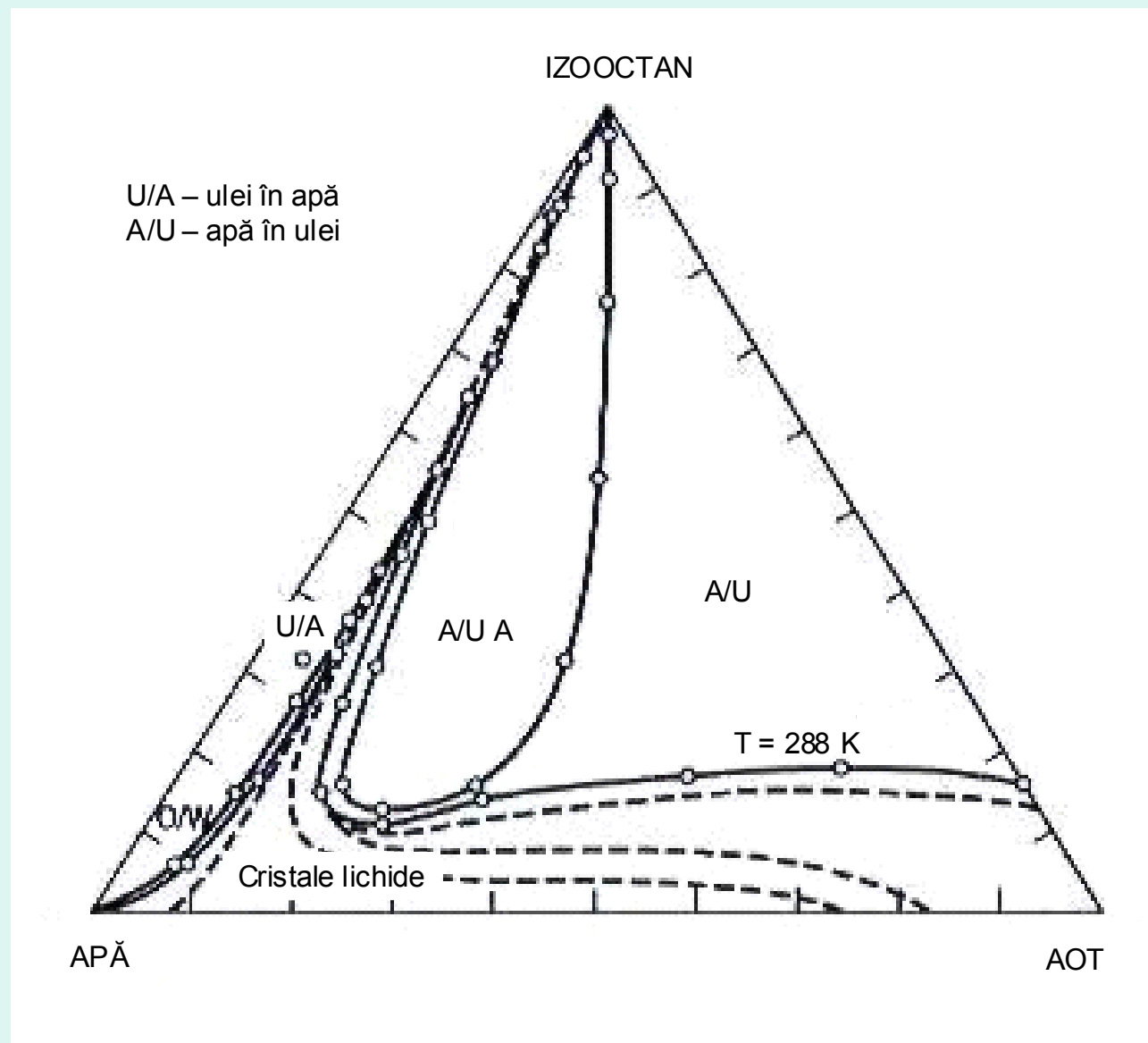
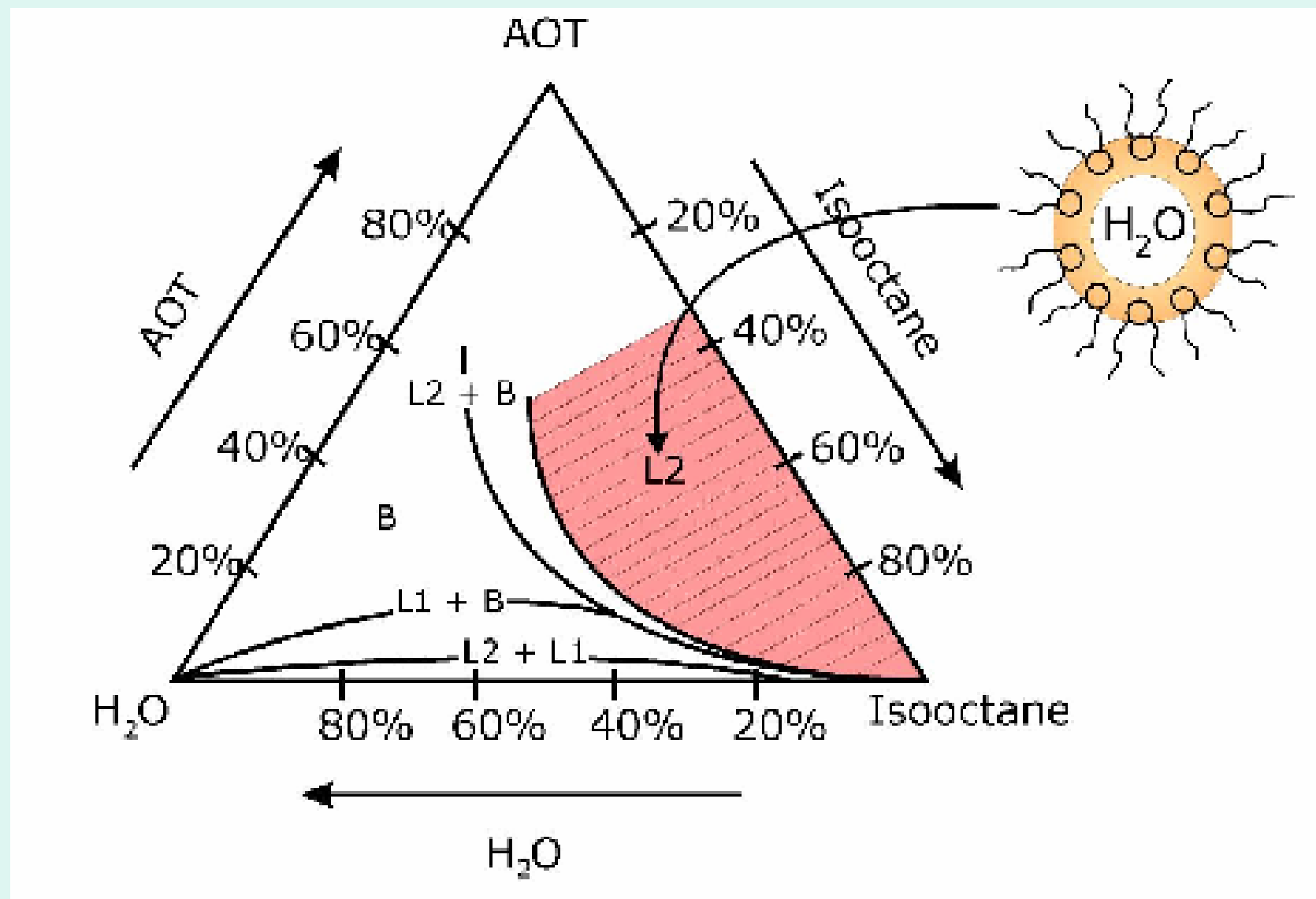


Diagrama sistemului ternar apă – AOT – izooctan la 15 °C



Formarea și proprietățile micelilor inverse

- Datorită polarității mediului lichid din interiorul micelii inverse, aici se pot solubiliza compuși polari ca **aminoacizi, enzime, proteine**, compuși care sunt insolubili sau instabili în solvenți organici obișnuiți.
- Dimensiunile micelilor inverse pot depinde de natura compusului dizolvat în faza apoasă internă:
 - micelile inverse de AOT în hexan ($w_0 = 6$) care conțin ADN au un diametru de 100 - 150 nm,
 - aceleași miceli, dar fără ADN încorporat, au doar 10 nm în diametru.

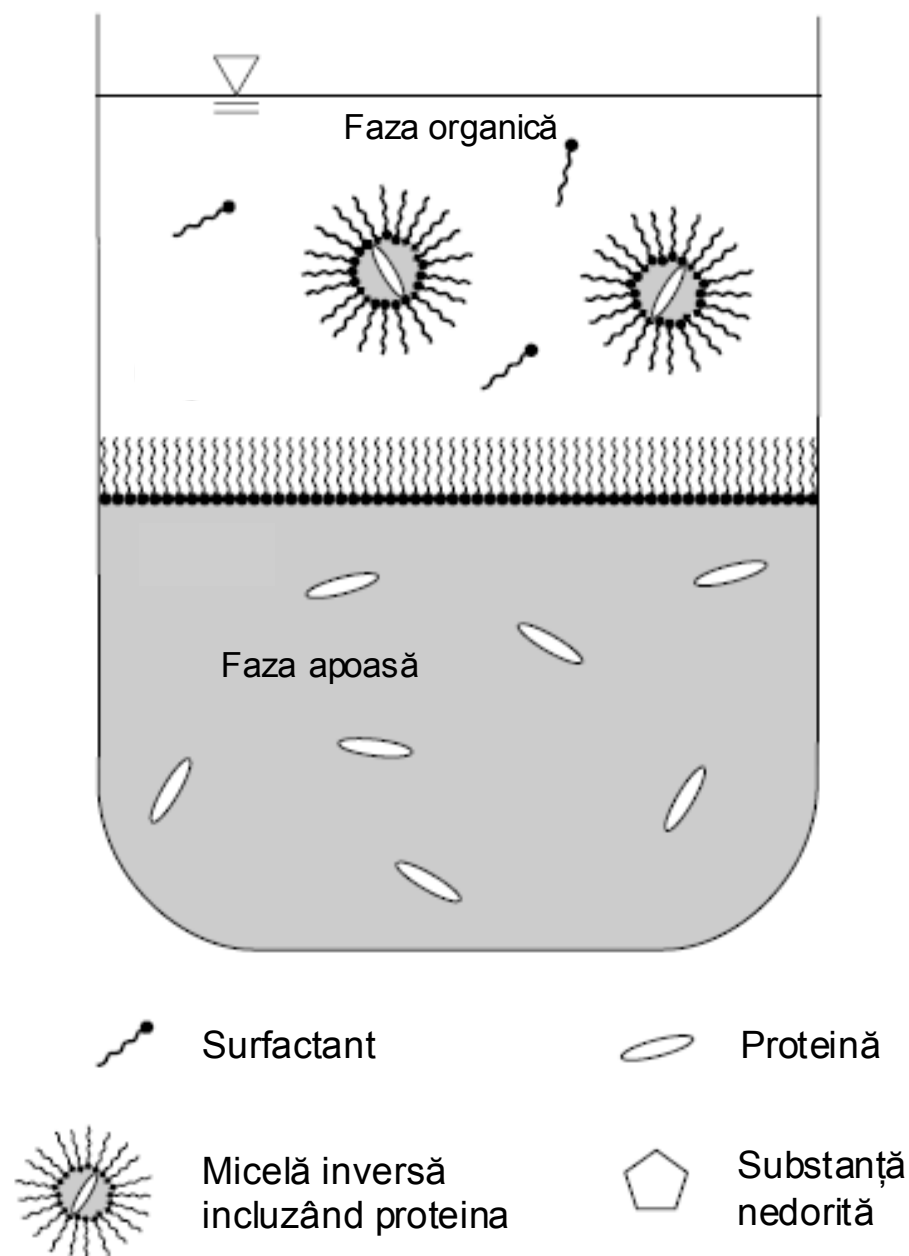


Mecanismul extracției în micle inverse

- Miclele inverse au capacitatea de a extrage biomoleculele în apa 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.
- Solventul organic permite organizarea micelilor inverse și separarea apei din faza internă de volumul de apă din faza din care se extrag componentii doriți.



Principiul procesului de extracție



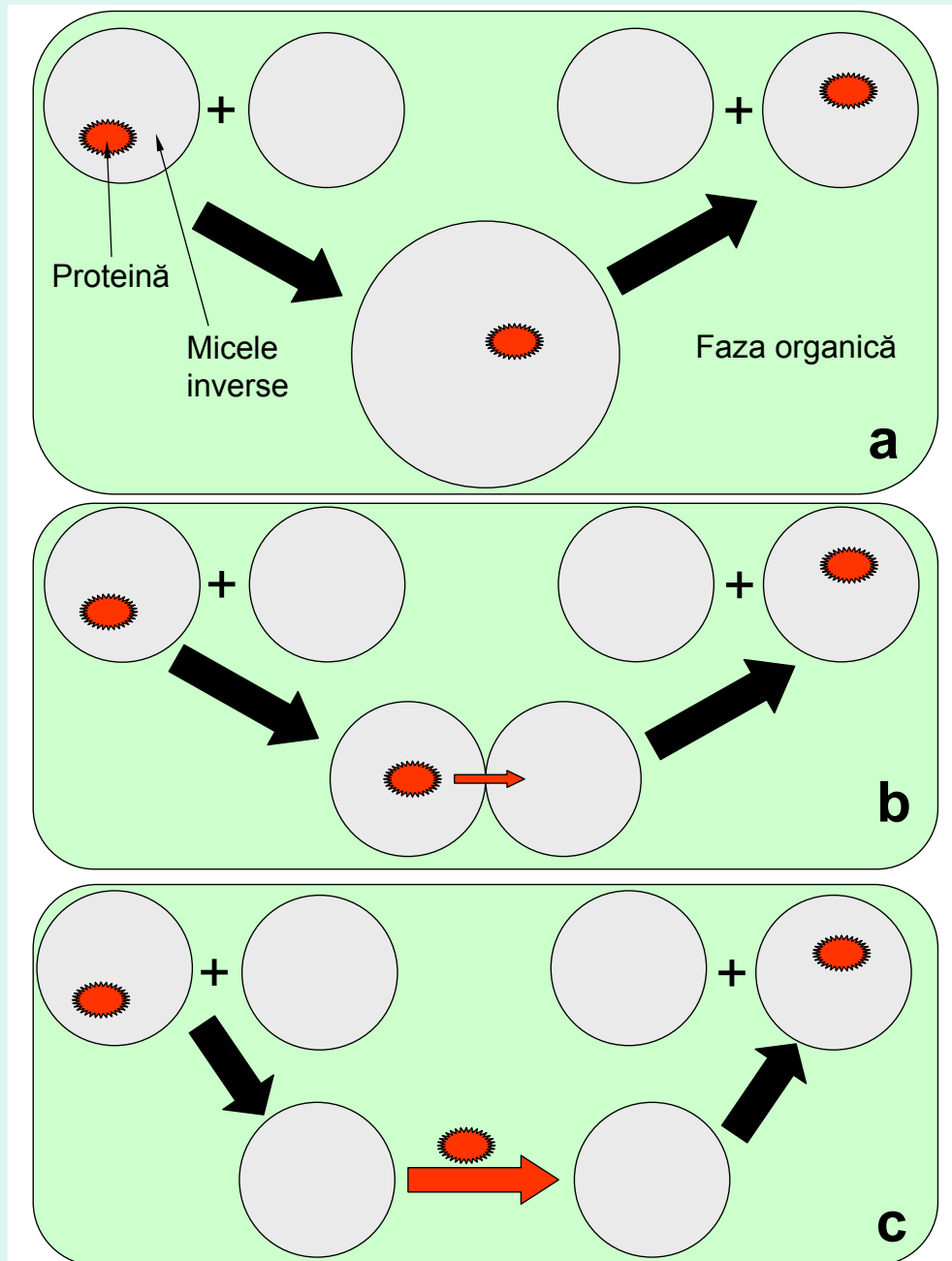
Mecanismul extracției în micle inverse

- Electroliții și proteinele solubilizate în faza apoasă internă pot fi schimbate între miclele inverse, pentru acest tip de transfer fiind propuse trei mecanisme posibile:
 - fuziunea tranzitorie a două micle inverse;
 - difuziunea moleculelor solutului prin stratul dublu de surfactant format la punctul de contact dintre două micle inverse care nu fuzionează;
 - migrarea solutului prin faza organică dintre două micle inverse.



Mecanismul extracției în micle inverse

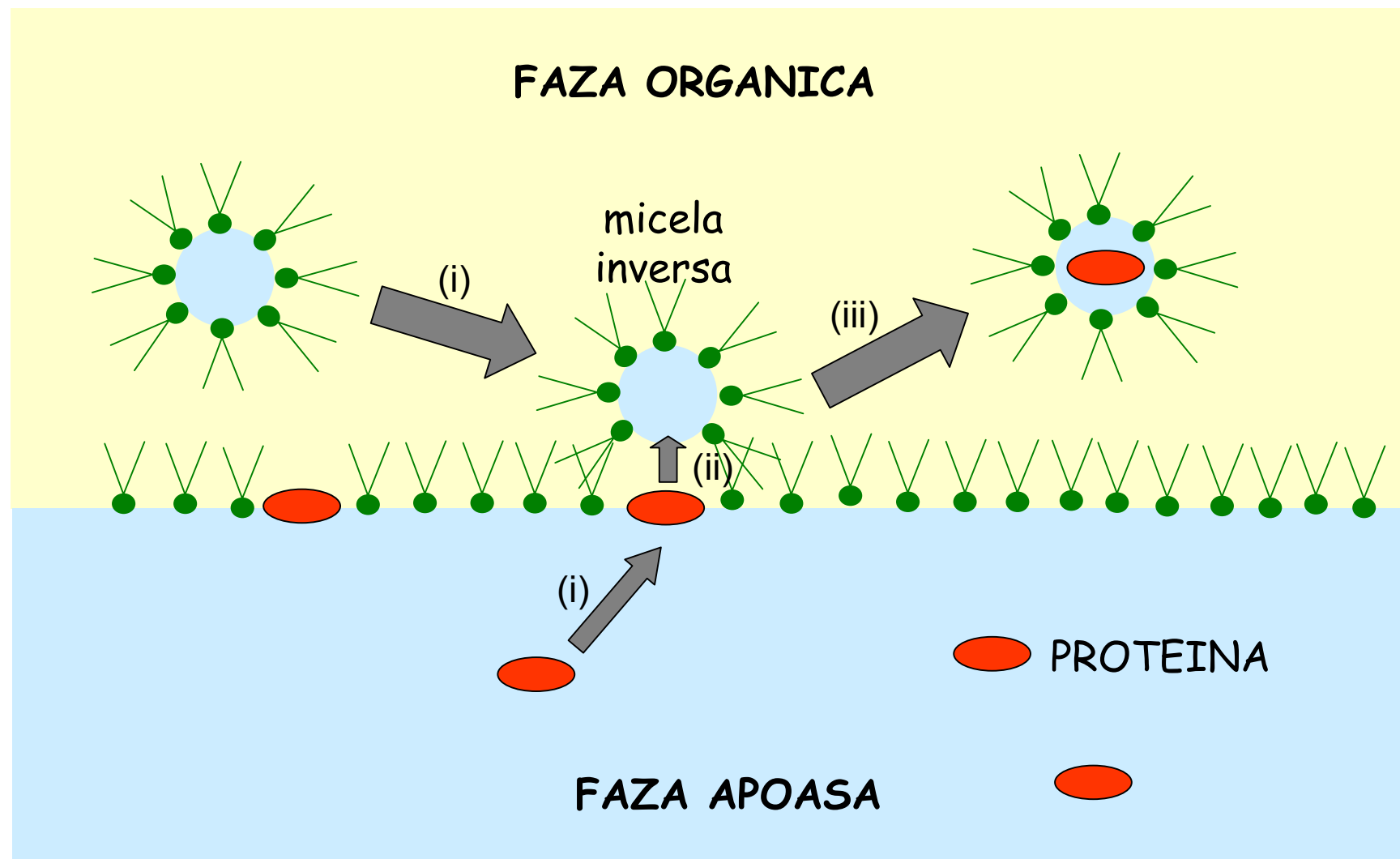
- fuziune tranzitorie
- difuziunea moleculelor solutului
- migrarea solutului



Mecanismul extracției în micle inverse

- 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 miclei inverse din faza organică către interfață;
 - (ii) includerea solutului în micela inversă la interfață;
 - (iii) difuzia miclelor inverse în volumul fazei organice.





Factorii care influențează transferul biomoleculelor în miclele inverse

- Principalii factori care influențează repartiția biomoleculelor între faza apoasă externă și faza apoasă internă din miclele inverse:
 - pH-ul,
 - tăria ionică,
 - tipul electrolitului din faza apoasă,
 - tipul și natura surfactantului,
 - tipul solventului organic.
- Repartiția proteinelor și aminoacizilor în miclele 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 miclelor inverse ca molecule gazdă (*host*) și de dimensiunile biomoleculelor, ca molecule oaspete (*guest*).



pH-ul

- Determină sarcina netă a proteinelor,
- Trebuie să confere proteinei o sarcină netă de semn opus sarcinii capătului polar al surfactantului, a. î. să apară o atracție electrostatică între suprafața proteinei și capătul polar hidrofил de la suprafața internă a micelilor inverse.
- Forța motoare a transferului proteinelor = diferența de potențial.
- Diferența $pH_{\text{mediu}} - pI_{\text{proteina}} = 1 \div 2 \rightarrow$
 - eficiența extracției să fie ridicată,
 - denaturarea să fie minimă.
- Pt. surfactanții anionici, $pH < pI$
- Pt. surfactanții cationici, $pH > pI$.

Tăria ionică

- 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 miclei inverse.
- Dacă raza miclei inverse devine mai mică decât raza agregatului proteic extracția nu mai poate avea loc.

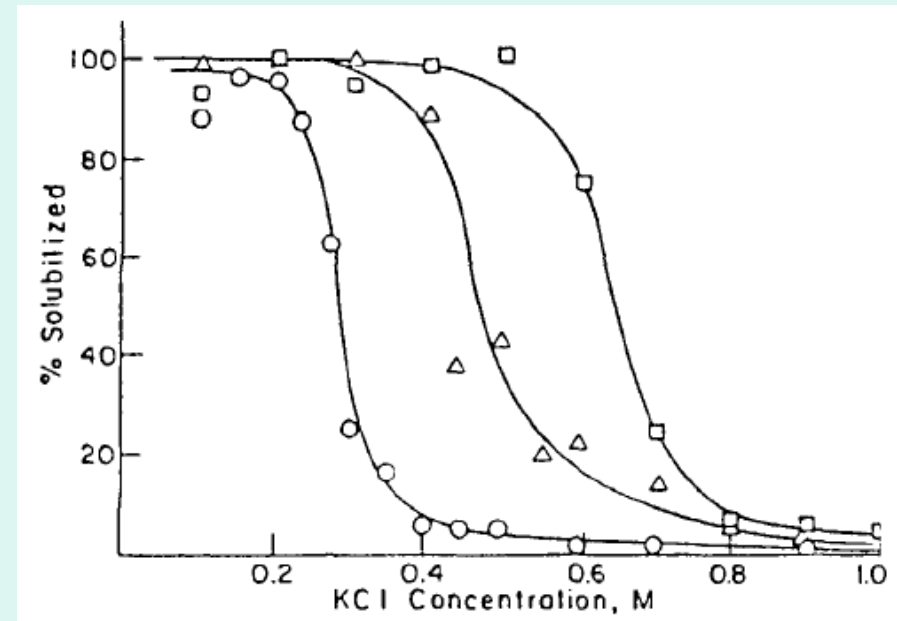
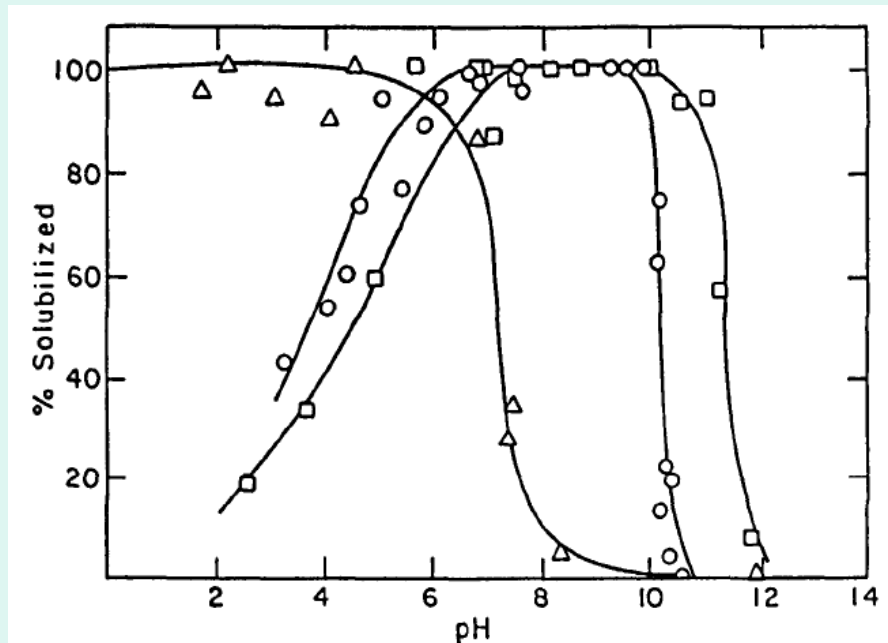


Tăria ionică

- Studii efectuate cu diverse săruri (NaCl, NaSCN, Na_2CO_3 , KCl, CsCl, BaCl_2) 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.
- Alt efect al creșterii tăriei ionice = determina ionii să migreze înspre microfaza apoasă din interiorul miclei 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:



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.

Concentrația surfactantului

- Afectează atât transferul proteinei în faza de micle inverse, cât și reextracția acesteia.
- 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.

Co-surfactanții

- Sunt substanțe care favorizează dizolvarea surfactantului în faza organică și stabilizează micellele inverse formate
- Deoarece surfactanții cationici formează micelle inverse foarte mici ($w_0 < 3$), prezența co-surfactanților este imperios necesară.
- Surfactanții anionici formează micelle inverse mari ($w_0 = 20 \div 115$), astfel încât adăugarea de co-surfactanți nu este obligatorie.
- Co-surfactanții uzuali sunt alcoolii alifatici cu catenă liniară $C_4 - C_{10}$ și alcoolul benzilic.



Raportul volumic V_{aq}/V_{org}

- 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, 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.

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.
- Extracția tripsinei:
 - gradul de extracție este ridicat (circa 70%) în cazul utilizării kerosenului drept solvent,
 - scade la jumătate (circa 35%) când se utilizează ca solvent ciclohexanul.
 - Se poate explica acest lucru prin aceea că solventul este capabil de a denatura forma și structura micelilor inverse.

Alți factori

- **Caracterul hidrofob sau hidrofil** al biomoleculelor extrase influențează, de asemenea, procesul. De exemplu, aminoacizii cu structură hidrofilă sunt încorporați în interiorul micelilor inverse, pe când cei hidrofobi la interfața acestora.
- **Temperatura**, care influențează proprietățile fizico-chimice ale micelilor inverse, are un rol important în special în procesele de reextracție a biomoleculelor.



Reextracția din miclele inverse

- **Reextracția (extracția inversă)** = operația prin care biomoleculele înglobate în microfaza apoasă internă din miclelele 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.

Reextracția din miclele inverse

- Pentru reextracția proteinelor din faza de micelă inversă au fost studiate și propuse mai multe procedee:
 - modificarea pH-ului
 - modificarea temperaturii
 - utilizarea unor particule adsorbante de silice care rețin proteinele, apa și compușii tensioactivi din faza miclelelor inverse
 - utilizarea zeoliților pentru deshidratarea fazei de miclele inverse
 - distrugerea fazei de miclele inverse și eliberarea proteinelor prin adăugarea unor cantități ridicate de solvent organic (acetat de etil)
 - 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

Reextracția din miclele inverse

- Reextracția proteinelor este afectată de **valoarea pH-ului** și de **concentrația sărurilor** în soluția de alimentare și în soluția utilizată pentru reextracție.
- 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.
- Sarcina proteinei trebuie să fie aceeași cu cea a capătului polar al surfactantului pentru a se permite eliberarea proteinei din micela inversă.
- Deși modificarea pH-ului este foarte eficientă pentru reextracție, aceasta poate cauza și degradarea moleculelor proteice, respectiv pierderea activității enzimelor extrase.

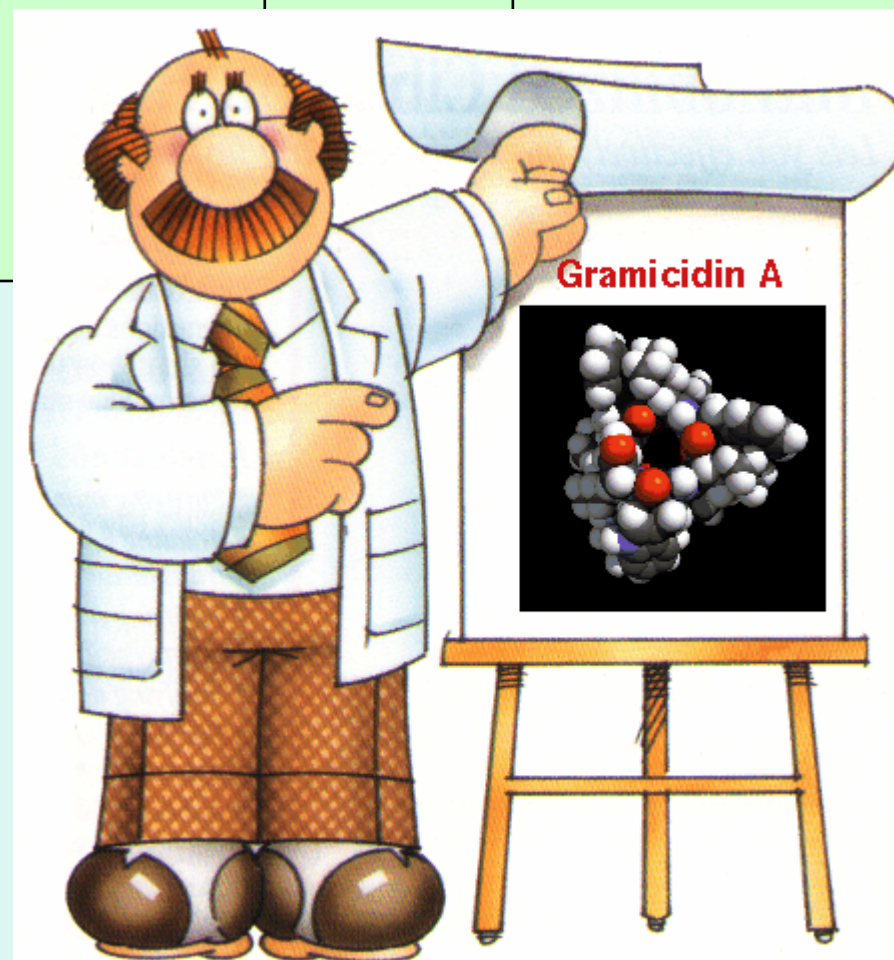


Reextracția din micle inverse

- **Temperatura** are o influență puternică asupra proprietăților micelilor inverse. Eficiența reextracției poate fi îmbunătățită prin creșterea temperaturii.
- Mărirea temperaturii duce la creșterea raportului w_0 , în final ajungându-se la distrugerea micelilor inverse, cu formarea unei faze apoase distincte în care sunt concentrate majoritatea biomoleculelor extrase. Această fază este separată apoi prin centrifugare.
- La creșterea temperaturii se produce inactivarea termică a enzimelor;
- Temperatura la care se realizează procesul de reextracție = un compromis între:
 - cantitatea de proteină recuperată
 - activitatea sa enzimatică.
- Pentru majoritatea enzimelor, domeniul optim al temperaturilor de reextracție este cuprins între **30 – 38 °C**, la peste 40 °C observându-se o scădere accentuată a activității enzimatice.

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



Reextracția din miclele inverse

Comparativ cu celelalte metode, reextracția prin modificarea temperaturii este deocamdată cea mai eficientă modalitate de recuperare a biomoleculelor.

Comparație între două procedee de reextracție a α -amilazei

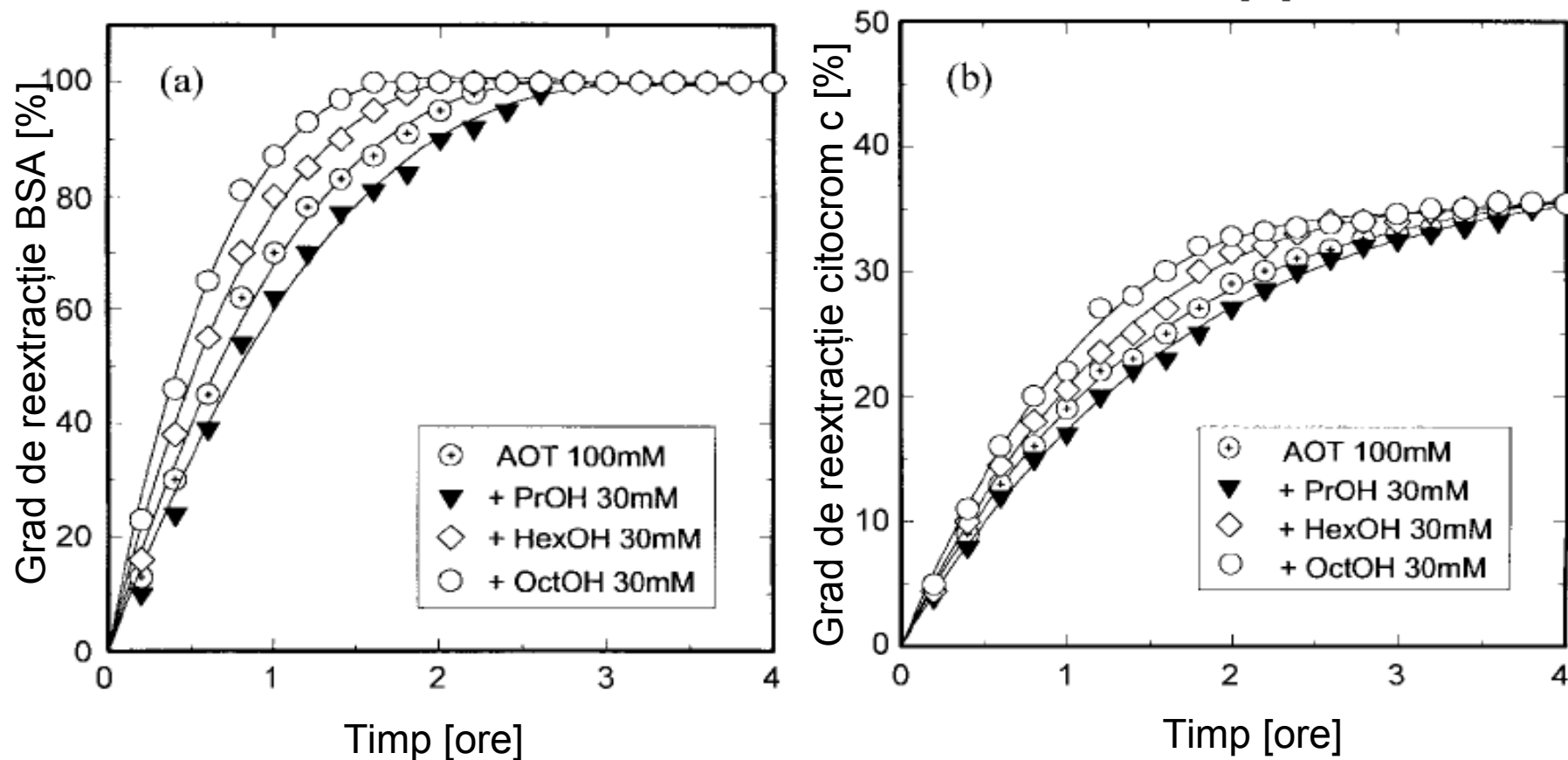
Caracteristicile procesului	Reextracție	
	fără creșterea temperaturii	cu creșterea temperaturii
Activitate inițială [%]	100	100
Pierderi la extracție [%]	3	12
Eficiență totală [%]	30 - 50	73
Factor de concentrare al soluției finale	10	2000



Reextracția din micle inverse

- Cercetări recente iau în calcul facilitarea procesului de reextracție prin utilizarea la formarea miclelor inverse a co-surfactanților, în vederea unui control mai bun al proprietăților și structurii acestora.
- Alcoolii având proprietăți amfifile ar putea fi buni agenți de modificare ai miclelor inverse.
- *Amfifil - atât caracter hidrofil datorită grupării - OH, cât și caracter hidrofob datorită catenei alifatic*

Efectul adaosului de co-surfactant în miclele inverse de AOT/i-octan asupra gradului de reextracție al BSA (a) și citocromului c (b)



La concentrații egale de co-surfactant, efectul accelerator scade în ordinea: octanol (octOH) > hexanol (HexOH) > AOT fără co-surfactant > propanol (PrOH)

Reextracția din miclele inverse

- Etapa determinantă de viteză a procesului de reextracție este procesul de desolubilizarea a proteinei la interfață, proces descris de ecuația:

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

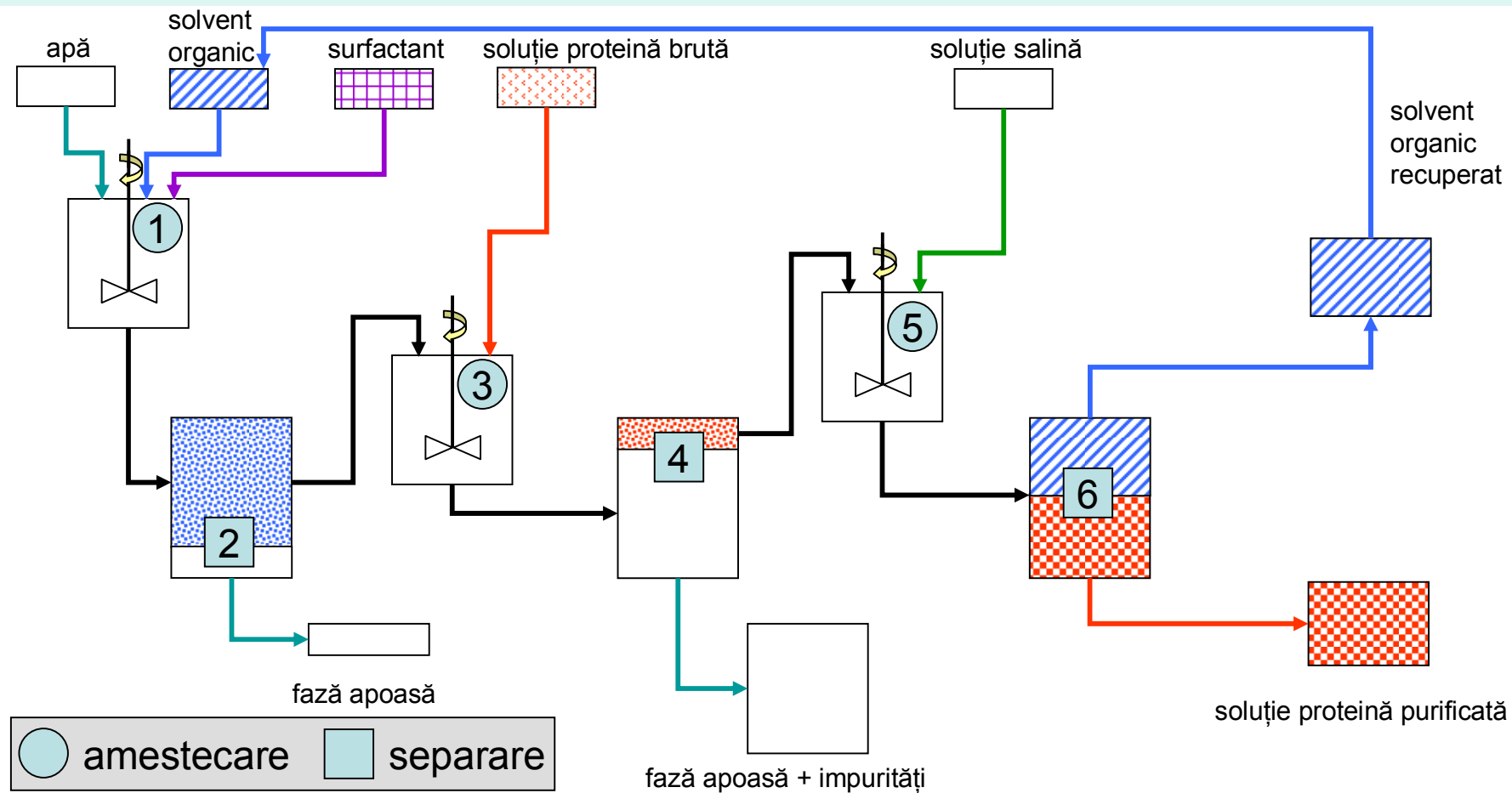
- în care:
 - K_R - constanta de viteză a procesului de reextracție,
 - $K_N = (C_{aq}^*) / (C_{org}^*)$ - constanta de distribuție la echilibru,
 - τ - durata procesului,
 - C_{org}^0 - concentrația inițială a proteinei în faza organică,
 - C_{aq} - concentrația actuală a proteinei în faza apoasă.



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 miculelor inverse,
 - **reextracția** (extracția inversă) - procesul prin care biomoleculele sunt stripate din interiorul miculelor inverse într-o nouă fază apoasă.
- Pe lângă aceste procese principale, în tehnologia extracției cu micle inverse mai intervin și alte etape:





Schema de principiu a procesului tehnologic de extracție cu miclele inverse:

1 – prepararea microemulsiei; 2 – separarea microemulsiei; 3 – extracția directă;
4 – separarea fazelor; 5 – reextracția (striparea biomoleculelor); 6 – separarea fazelor și recuperarea solventului

Procesul tehnologic de extracție cu miclele inverse

- Într-o primă etapă are loc formarea microemulsiei de miclele 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 miclelele inverse.
- Microemulsia este separată de faza apoasă în exces și trecută în procesul de extracție.

Procesul tehnologic de extracție cu miclele inverse

- Extracția se poate realiza principal în două moduri:
 - (i) prin amestecarea fazei organice care conține miclelele 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 miclele inverse în solvent organic.
- 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.
- Avantajul tensiunii interfaciale mici = timpul de contact redus necesar realizării transferului proteinei în interiorul miclelor inverse.



Procesul tehnologic de extracție cu miclele inverse

- După extracție → separarea fazelor prin decantare gravitațională sau prin centrifugare la viteză mică.
- Faza organică, conținând proteina încapsulată în miclelele inverse este trimisă la reextracție.
- În urma reextracției miclelele inverse sunt distruse, formându-se o fază apoasă care conține proteina purificată. Această fază se separă de faza organică prin decantare gravitațională sau centrifugală.
- Faza organică este recirculată în etapa de preparare a microemulsiei, iar faza apoasă este prelucrată în vederea recuperării proteinei.
- **PROBLEME:** pierderile de surfactant în faza apoasă rezultată la prepararea microemulsiei și în faza apoasă în care este reextrasă proteina. Datorită acestui fapt este necesară utilizarea de surfactant proaspăt, fapt care duce la creșterea costului separării.

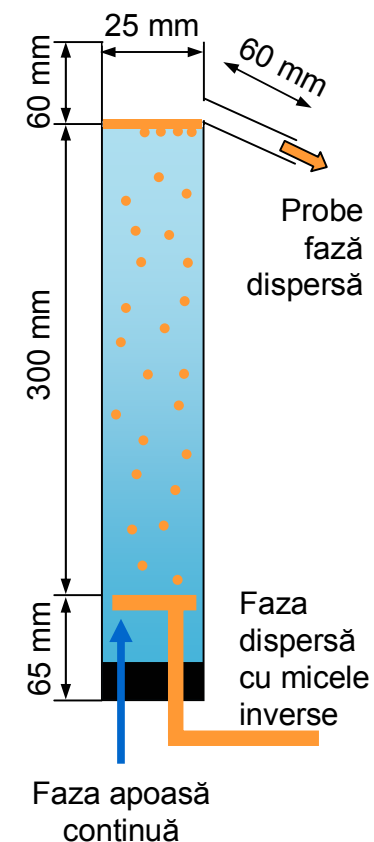
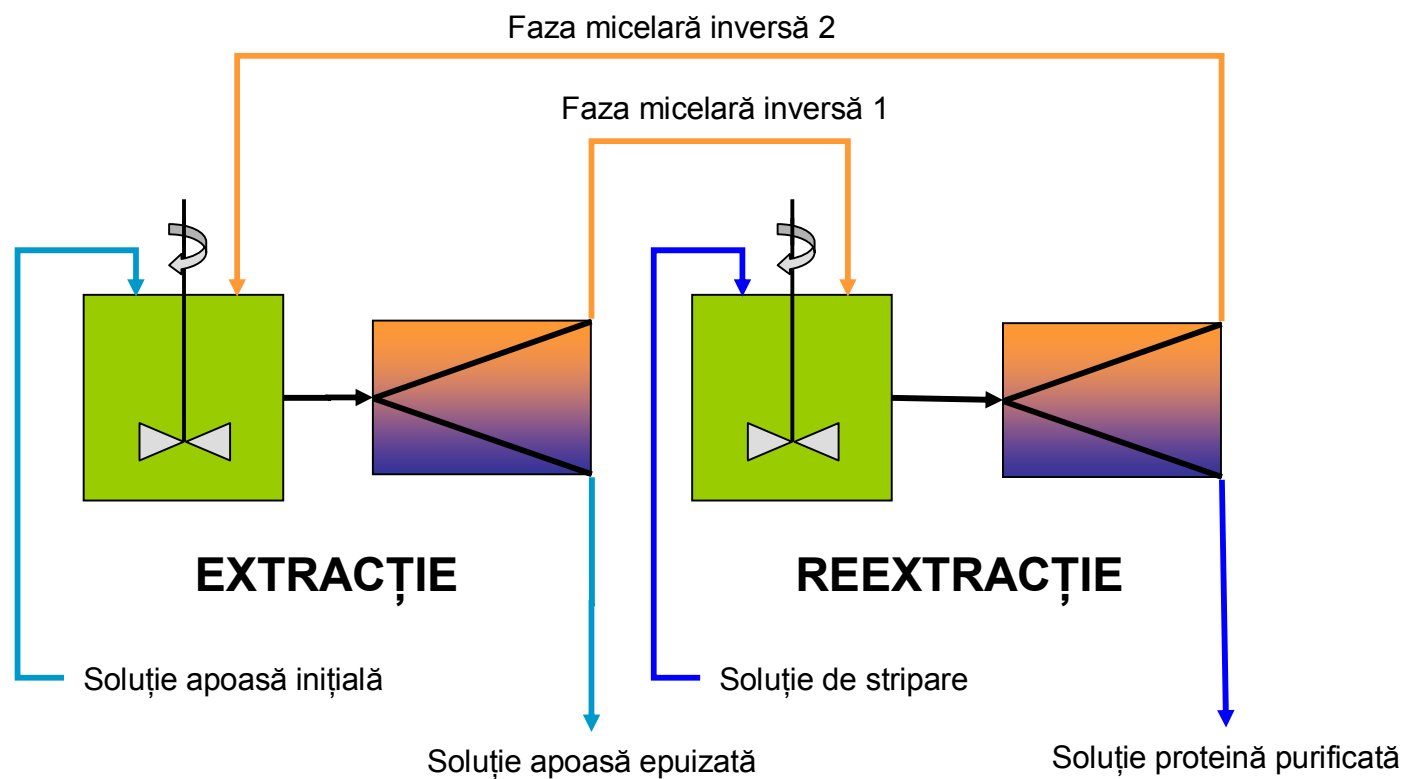


Procesul tehnologic de extracție cu micle inverse

- Procesul poate fi realizat în regim:
 - discontinuu,
 - 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.
- De asemenea, au mai fost utilizate:
 - celule cu agitare,
 - celule rotative de difuzie.



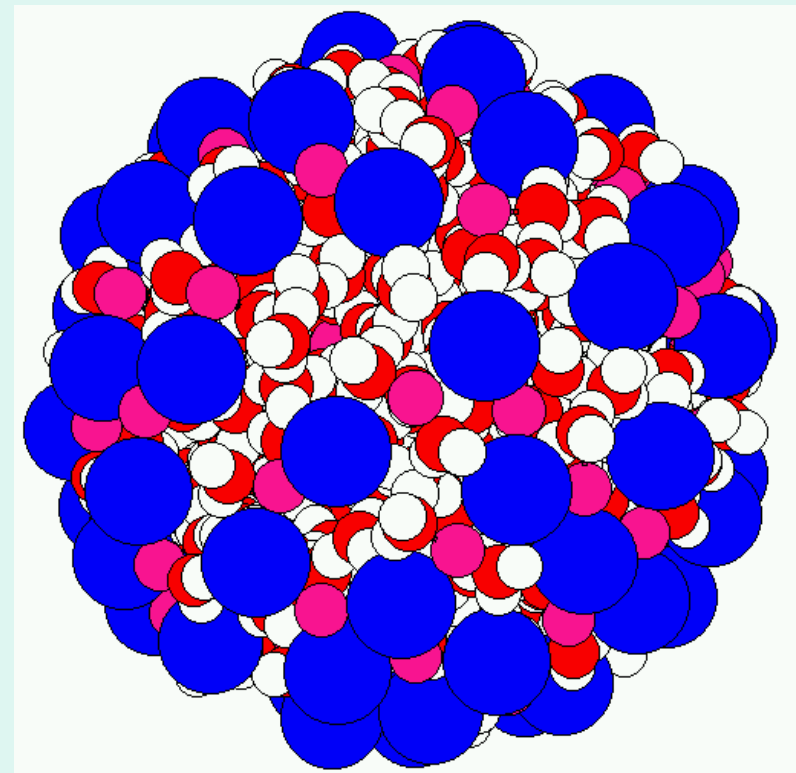
Instalație de extracție continuă cu două unități agitator/decantor



Coloană cu pulverizare

Aplicații ale extracției cu micle inverse

- Până în prezent s-a demonstrat posibilitatea utilizării extracției cu micle inverse pentru recuperarea unor produse de biosinteză intra- și extracelulare:
 - proteine,
 - peptide,
 - acizi nucleici,
 - acizi organici,
 - antibiotice,
 - steroizi.



Aplicații ale extracției cu micle inverse

- Procesul de extracție cu micle inverse nu este încă aplicat la scară industrială:
 - dificultatea reextracției proteinelor în faza apoasă,
 - imposibilitatea reutilizării micelilor inverse datorită pierderilor importante de surfactant în faza apoasă,
 - 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.



Extracția cu micle inverse în prezența masei celulare

- Separarea α -amilazei:
 - din lichide de fermentație filtrate,
 - din lichide cu un conținut de cca. 1% biomasă umedă
- conduce la rezultate identice: prezența masei celulare nu influențează în mod semnificativ procesul de extracție.
- Concluzii similare au fost trase și în cazul separării inulinazei din *Kluyveromyces marxianus*.



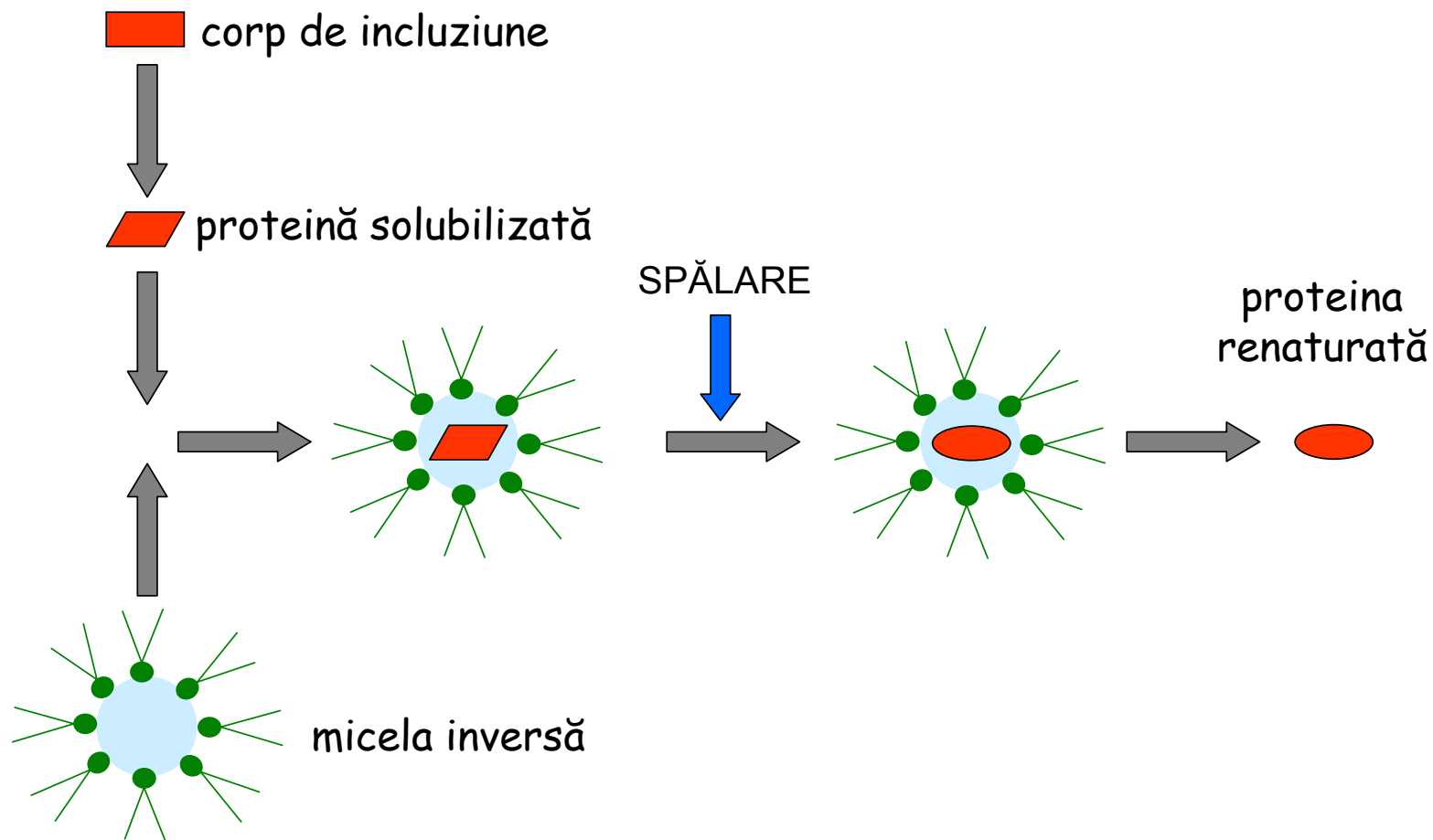
Extracția cu micle inverse în prezența masei celulare

- 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.



Izolarea și renaturarea proteinelor

- În cazul proteinelor intracelulare conținute în corpui de incluziune, micellele inverse pot fi folosite cu succes în izolarea și „reîmpachetarea” corectă (renaturarea) proteinelor denaturate:



Sinteza proteinelor în micle inverse

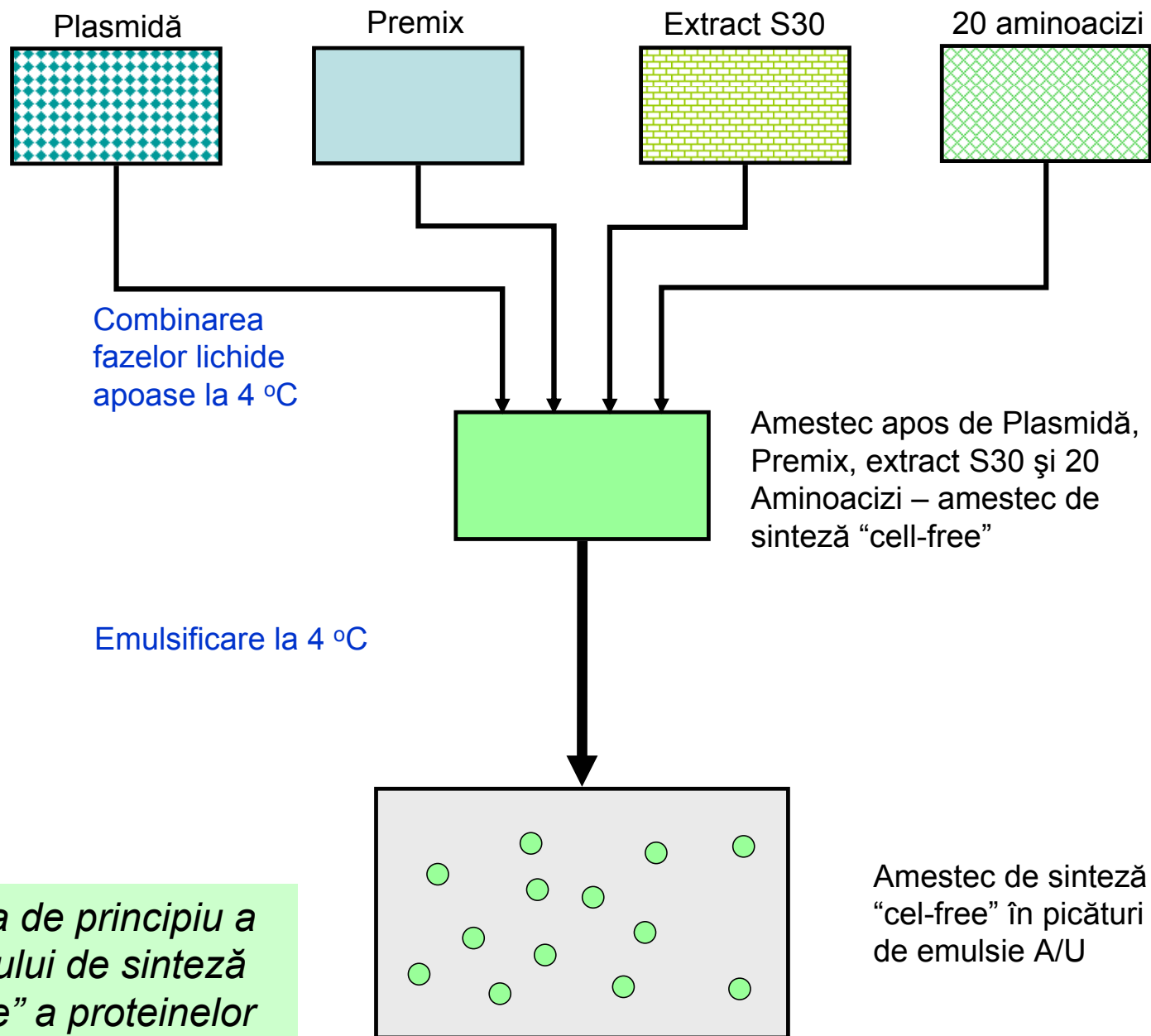
- Sinteza proteinelor *in vitro*, în absența celulelor (*cell free protein synthesis*) se poate realiza:
 - pe cale chimică,
 - pe cale enzimatică,
- fiecare metodă având avantaje și dezavantaje.
- Întrucât miclele inverse, prin însăși natura lor, prezintă o compartimentare obligatorie, ele ar putea reprezenta un mediu potrivit pentru sinteza *in vitro* a proteinelor.

Sinteza proteinelor în micle inverse

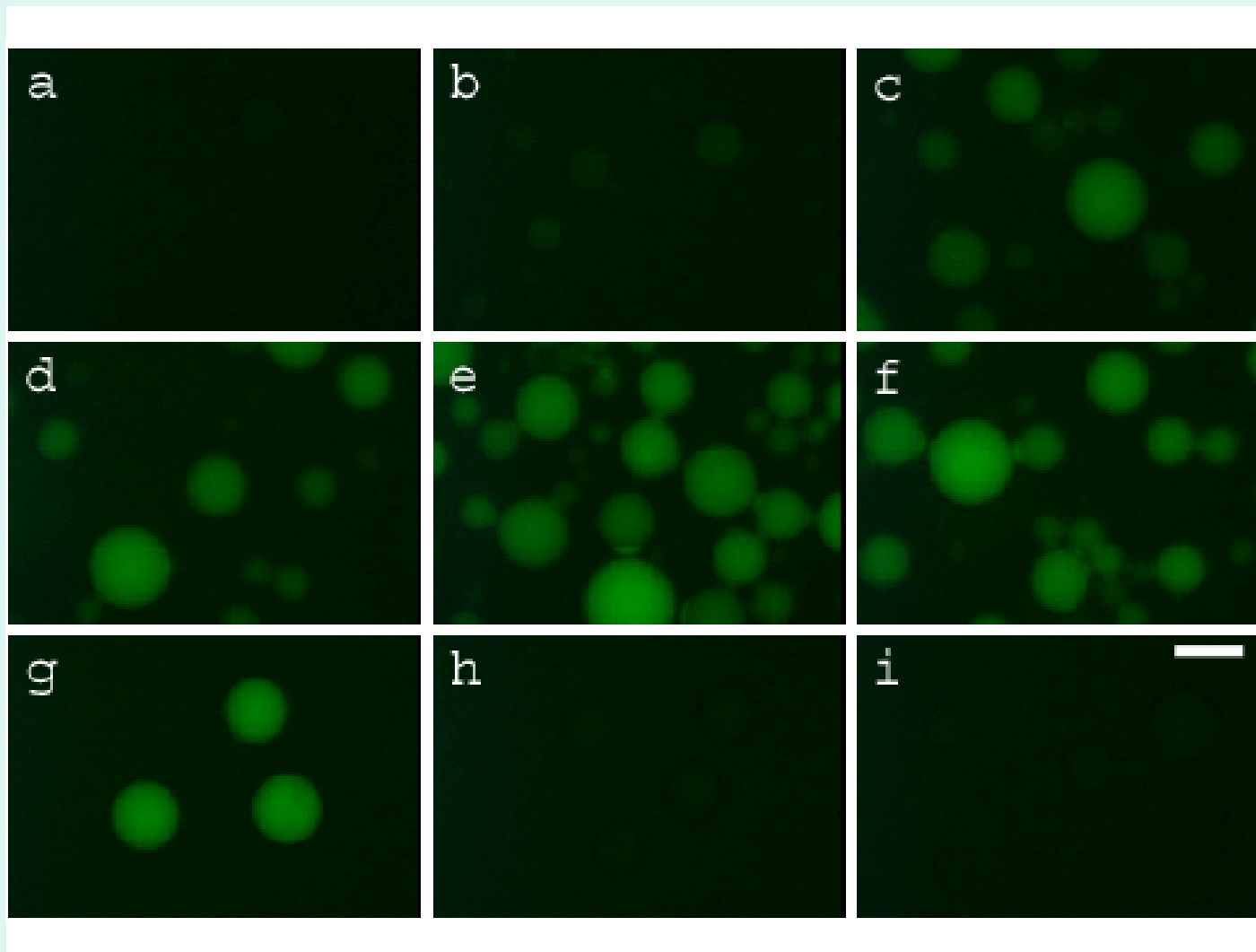
- Este semnalată:
 - sinteza *in vitro* a interleucinei umane 2 [proteină scurtă, o secvență de 156 aminoacizi], în micle inverse de Brij 96 în ciclohexan,
 - sinteza *in vivo* a β -galactozidazei în plasmidă recoltată din *E. coli* și micle inverse de Tween 85 în palmitat de *i*-propil.
- În cazul sintezei unor proteine mai voluminoase [proteina albastră fluorescentă - BFP, proteina îmbunătățită verde fluorescentă - EGFP], prezența miculelor inverse are un efect advers asupra randamentului în proteină.
- Una dintre explicații este secvența mai mare de aminoacizi (238) necesară sintezei EGFP.
- BFP - Blue Fluorescent Protein;
- EGFP - Enhanced Green Fluorescent Protein;



- 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.



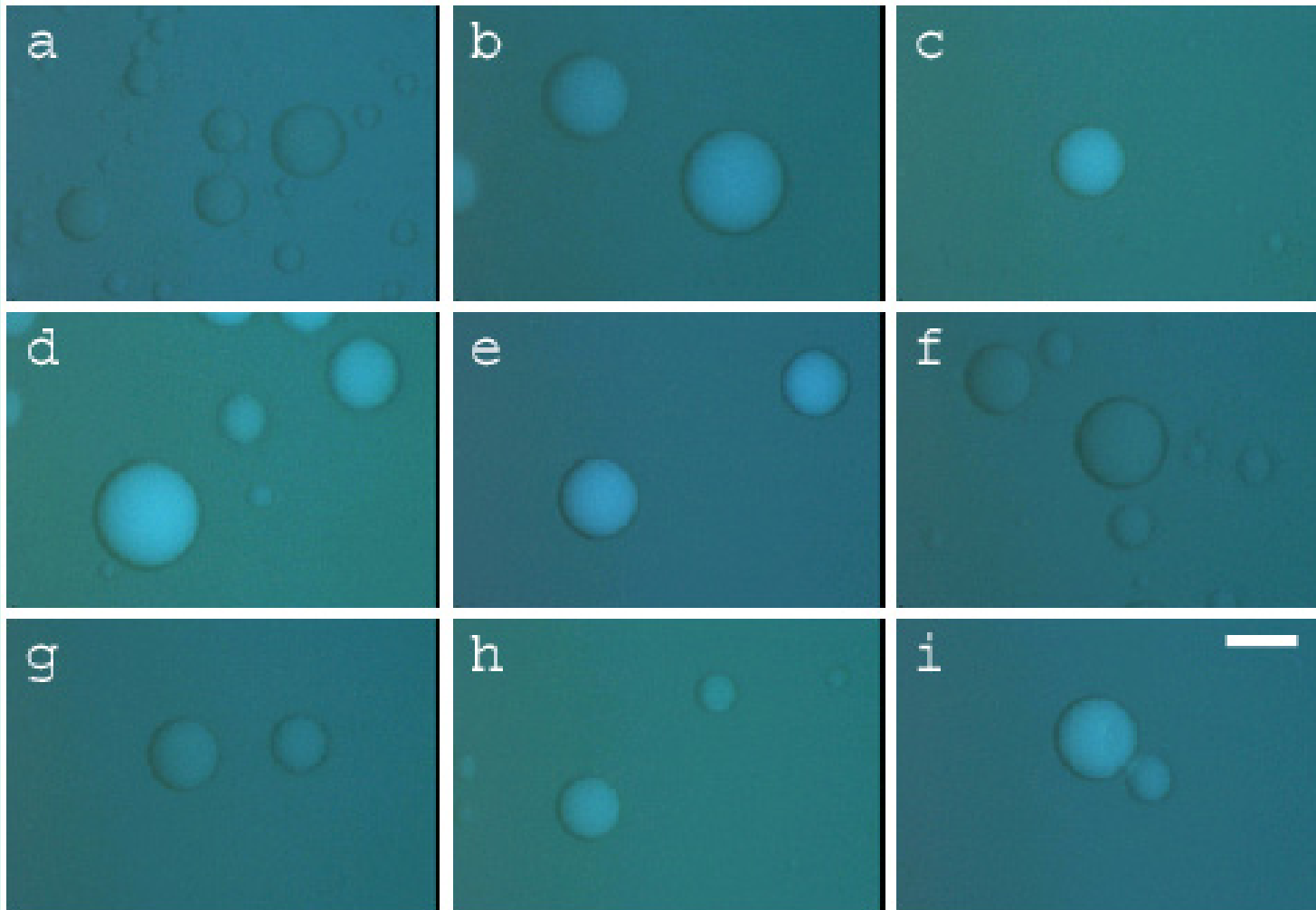
Schema de principiu a procesului de sinteză „cel-free” a proteinelor în emulsii de tip A/U



Sinteza „cell-free” a EGCP în emulsie A/U cu 0,45% vol Span 80; 0,05% vol Tween 80; preparare la 4 °C, incubare la 37 °C:

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 μm



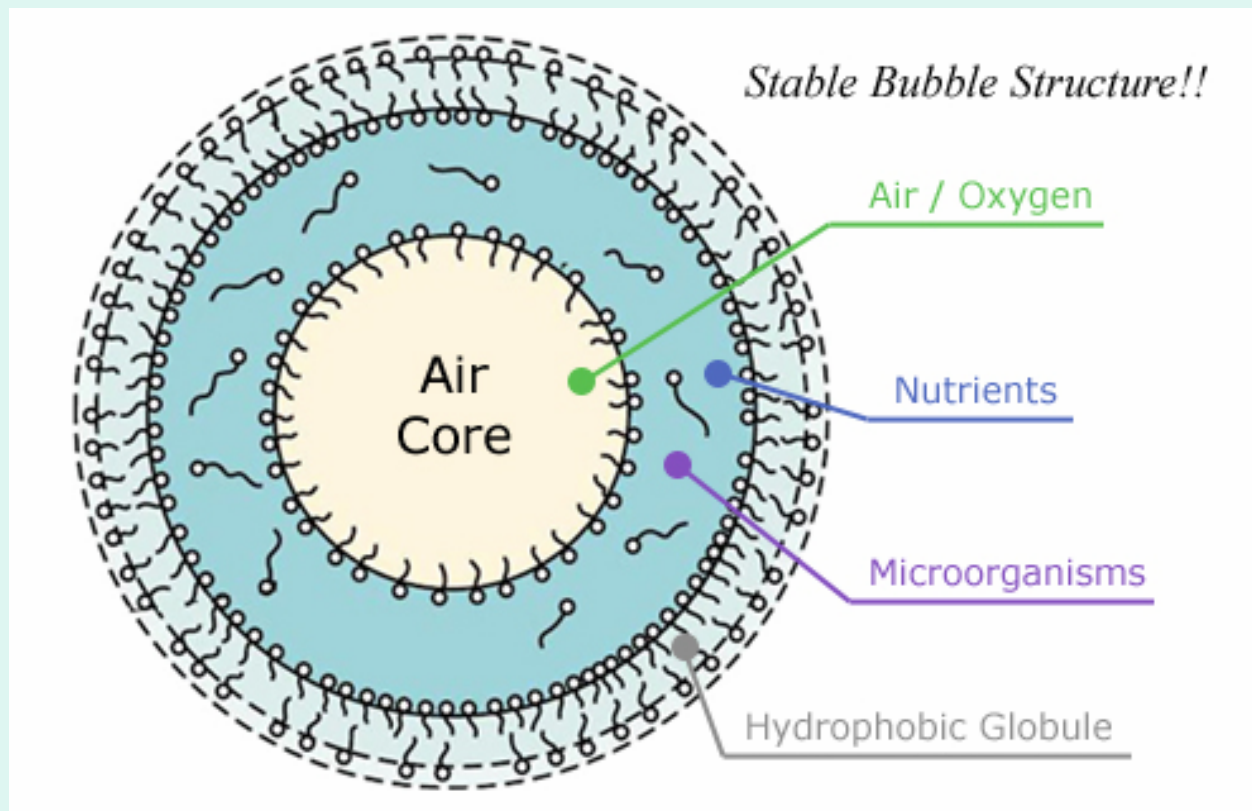
Sinteza „cell-free” a BFP în emulsie A/U cu 0,45% vol Span 80; 0,05% vol Tween 80; preparare la 4 °C, incubare la 37 °C:

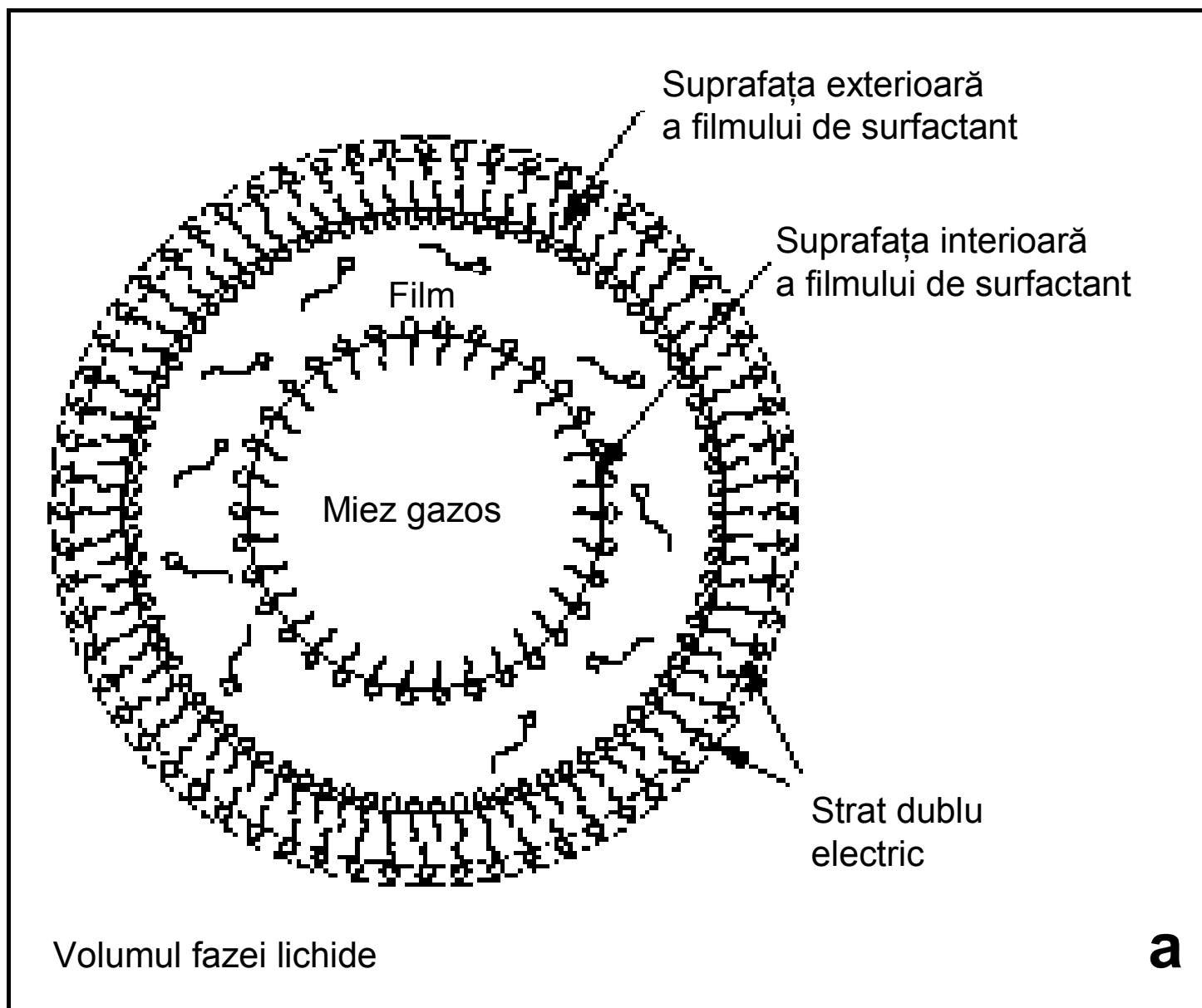
a – 15 min; b – 1,25 h; c – 3,25 h; d – 5 h; e – 23 h; Control negativ: f – 30 min; g – 1,5 h; h – 5,25 h. Bara reprezintă 50 μ m

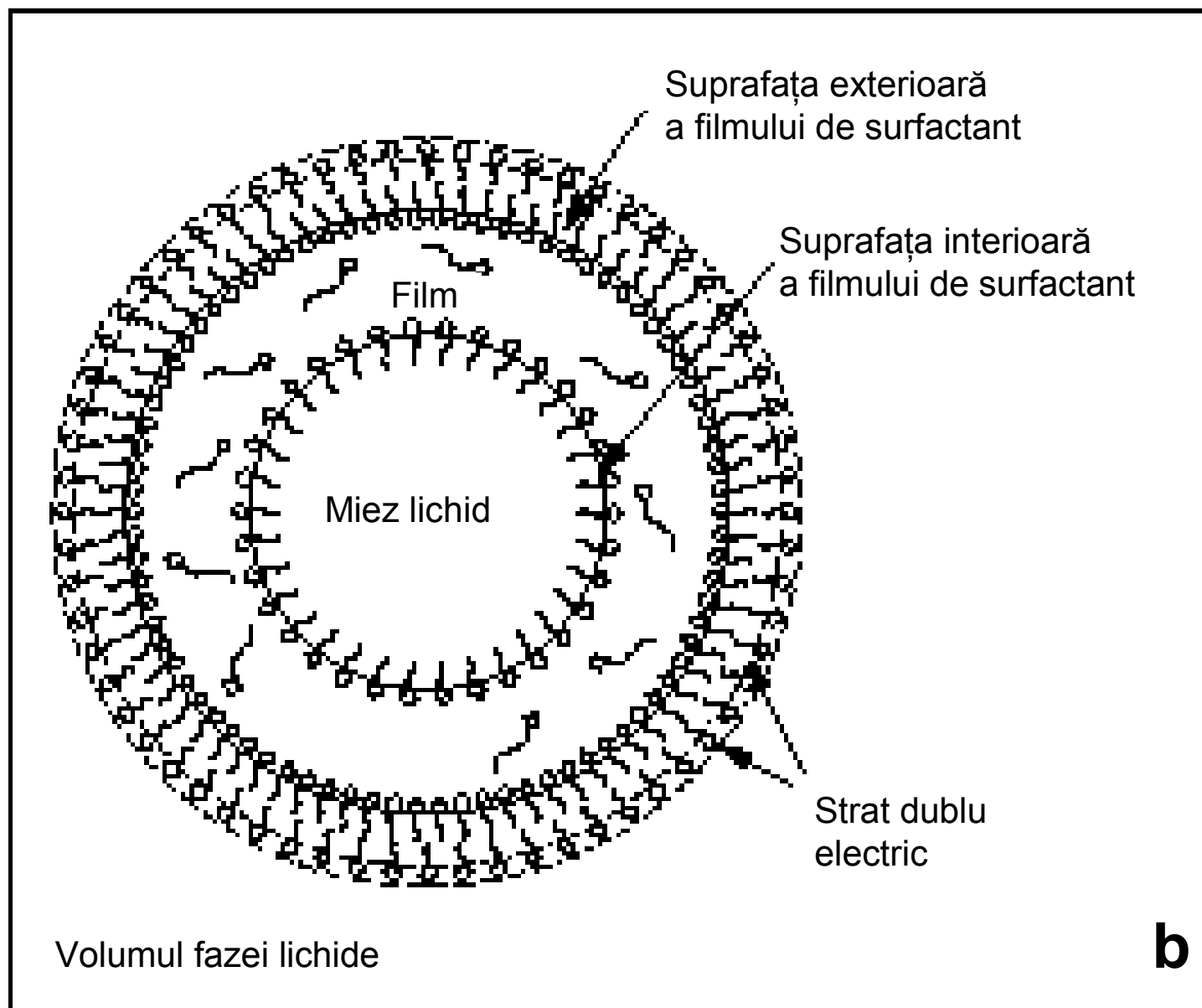
EXTRACTIA CU AFRONI

EXTRACTIA CU AFRONI

- Afronii sunt unități distincte de fluid, încapsulate prin intermediul unui film subțire de surfactant („balonaș de săpun”), într-un alt fluid.

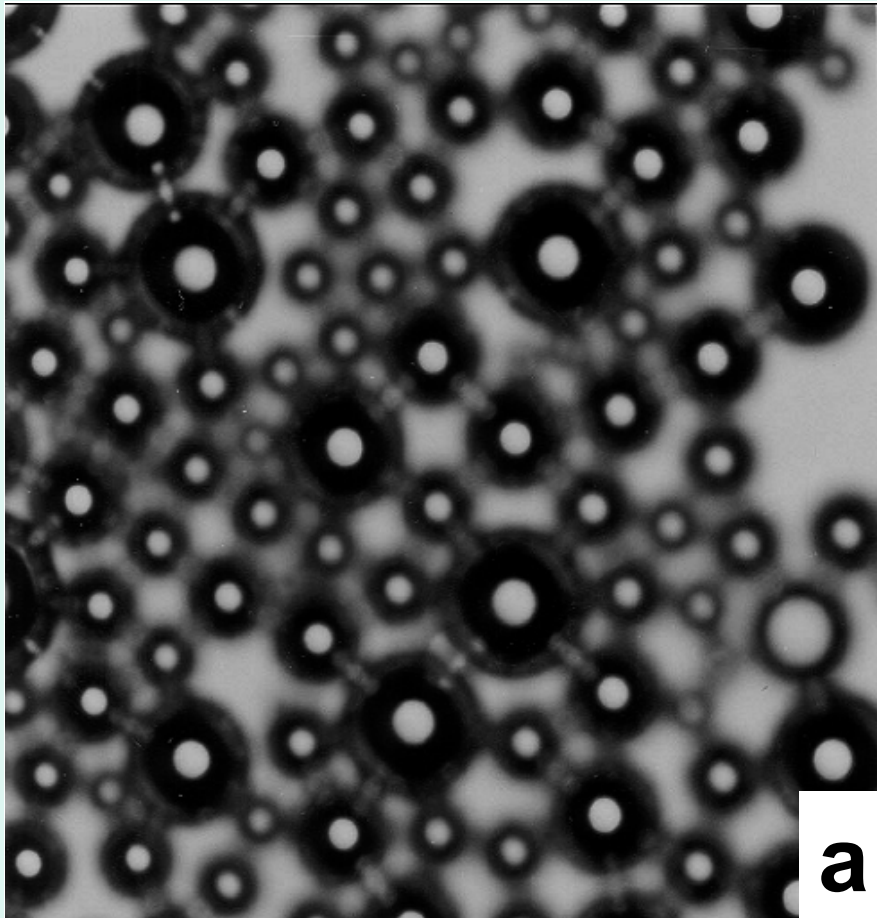




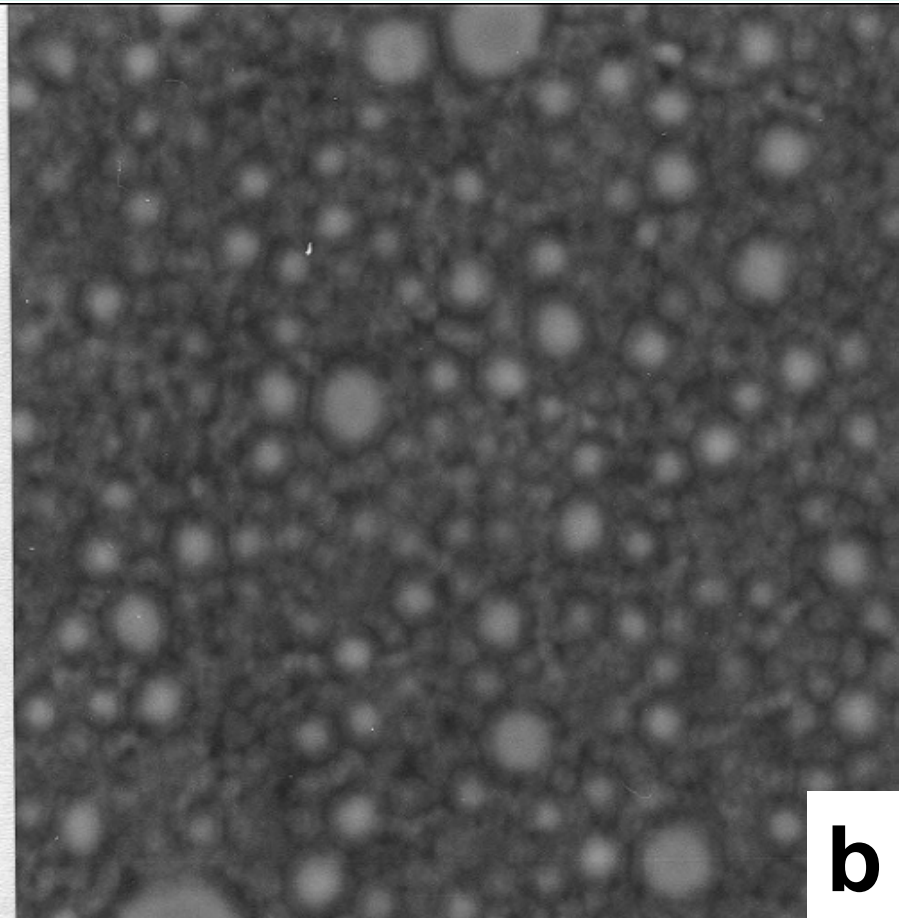


25 – 150 μm

0,1 – 50 μm



a



b

Microfotografii ale unor afroni

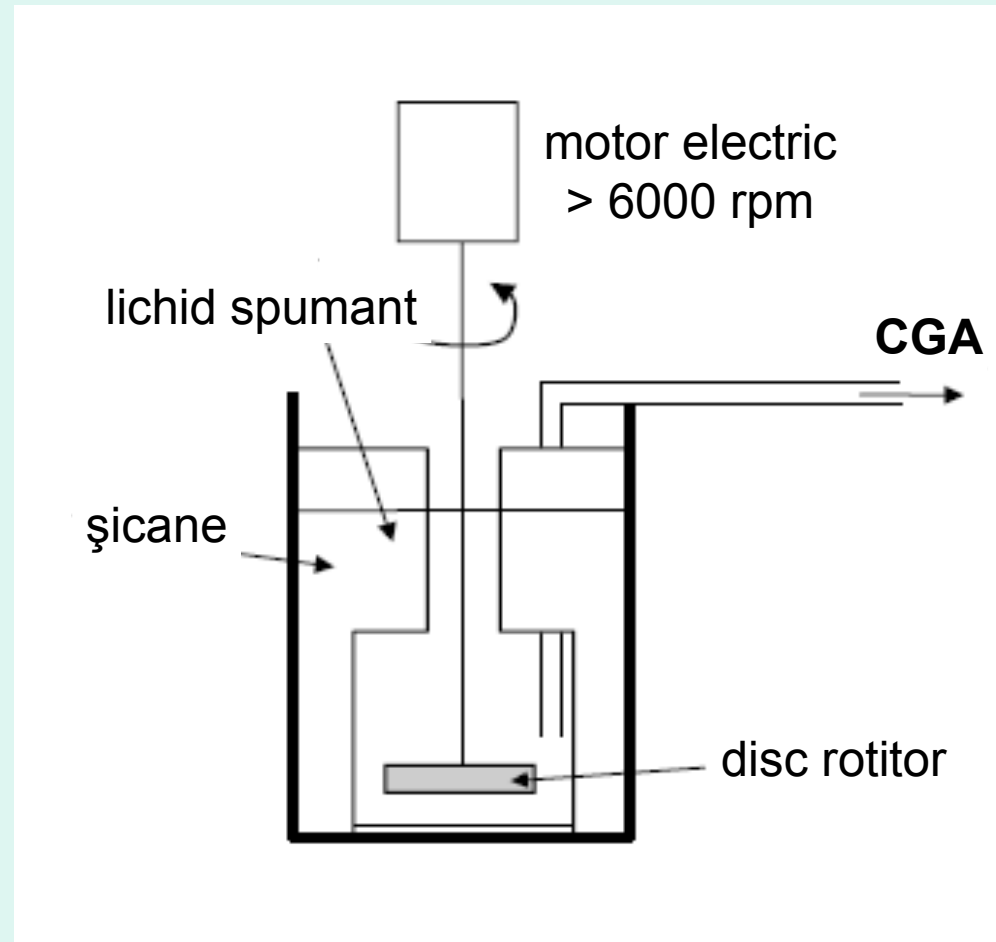
a – CGA din soluție de HTAB (bromură de hexadeciltrimetilamoniu – $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr}$); b – CLA din kerosen

Afroni coloidali gazosi - CGA

- Se obțin prin agitare energetică (5000 - 10000 rpm) la temperatura camerei a unei soluții de surfactant.
- 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 aforilor 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 aforilor.
- Stabilitatea maximă se obține în soluții de NaCl 0,002 - 0,05 mM.



Afroni coloidali gazosi - CGA



Dispozitiv pentru obținerea CGA

Afroni coloidali gazosi - CGA

- 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.

Aplicația
Remediarea solurilor contaminate cu hidrocarburi
Epurarea apelor contaminate cu metale
Epurarea apelor contaminate cu coloranți
Extragerea minereurilor prin flotație
Îndepărtarea algelor din apele poluate
Curățirea nisipului îmbibat cu țiței
Flotația celulelor de drojdii
Separarea proteinelor

Afroni coloidali gazosi - CGA

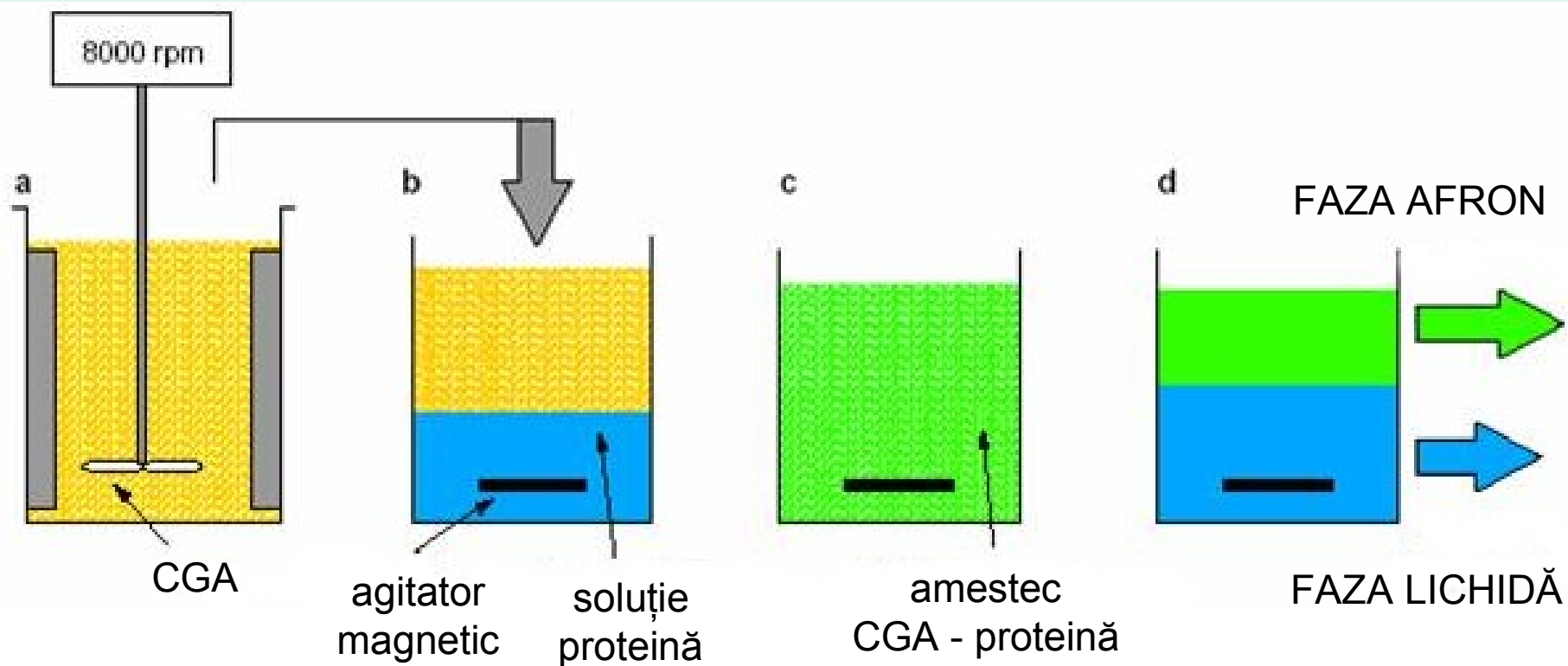
- Separarea proteinelor se poate realiza prin utilizarea unor CGA preparați din diverși surfactanți.
- CGA proveniți din AOT se pot utiliza la separarea:
 - lizozimei,
 - ribonucleazei,
 - proteinelor din zer [s-a separat din zer β -lactoglobulina, gradul maxim de separare (86%) obținându-se la pH =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



Afroni coloidali gazosi - CGA

- La scară de laborator, procesul de separare a proteinelor cu ajutorul CGA implică următoarele etape:
 - prepararea CGA utilizând un dispozitiv similar celui prezentat anterior,
 - amestecarea CGA cu soluția care conține proteina,
 - transferul proteinei în faza de afron,
 - separarea fazei de afron,
 - recuperarea proteinei din faza de afron.





Separarea proteinelor cu ajutorul CGA:

*a – prepararea CGA; b – adăugarea CGA la soluția de proteină;
c – amestecarea fazelor; d – separarea fazelor*

Afroni coloidal gazosi - CGA

- La contactul proteinelor cu afronii, 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.



EXTRACTIA CU AFRONI

- 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.
- 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.

