



ZAKLJUČNI PROCESI V BIOTEHNOLOGIJI

Ločevanje topnih produktov –
koncentriranje

Ekstrakcija

Ekstrakcija kapljevina - kapljevina

- s pomočjo topila, ki se z osnovnim topilom (voda) ne meša, ekstrahiramo produkt iz raztopine – osnovana na različni porazdelitvi topljenca med dvema kapljevinama
- uporaba: za širok spekter produktov z različnimi fizikalno kemijskimi lastnostmi; najpogosteje izolacija lipofilnih produktov, temperaturno občutljivih produktov (antibiotiki, steroidi,...)
- najučinkovitejša ekstrakcija polarnih produktov (lahko spremenimo s predhodno ionsko izmenjavo), če jih lahko ponovno ekstrahiramo v vodno fazo; na ta način lahko produkt tudi očistimo nečistoč
- pogosto uporabljenih več stopenj ekstrakcije - v eni stopnji premajhen izkoristek

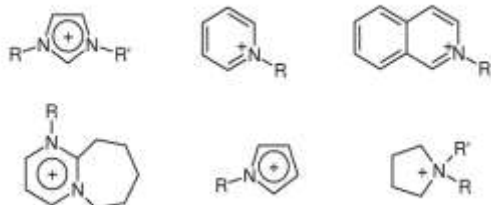
Topila v biotehnologiji

- Voda – najpogostejše, “naravno” topilo
- Organska topila (boljša topnost substratov): izbor odvisen od vpliva na encime oz. celice

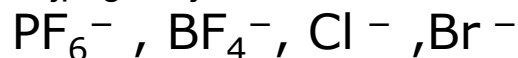
$\log P_{\text{oktanol/voda}}$	topnost v vodi	vpliv na encimsko aktivnost
-2,5 do 0	popolnoma	ni deaktivacije encima
0 do 2	delno	hitra deaktivacija encima (omejena uporaba)
2 do 4	slabo	encimska aktivnost pogosto nepredvidljiva (previdna uporaba)
> 4	se ne meša	zagotavlja visoke aktivnosti

- Ionske tekočine (ionic liquids): “zelena topila”
soli, tekoče pri sobni temperaturi (visoka tališča, nizek parni tlak, nevnetljive, nestrupene, lahko stabilizirajo encime)

najpogostejši kationi



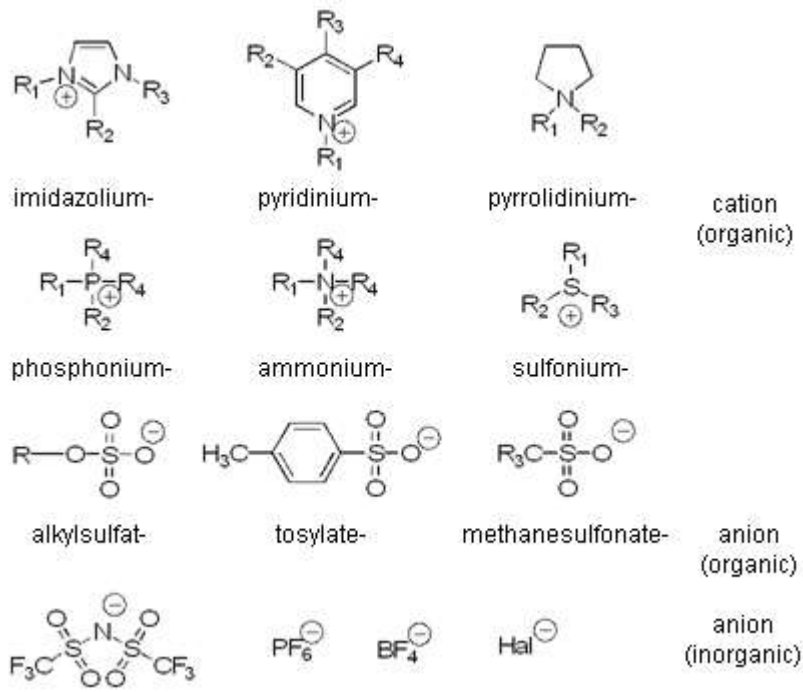
najpogostejši anioni



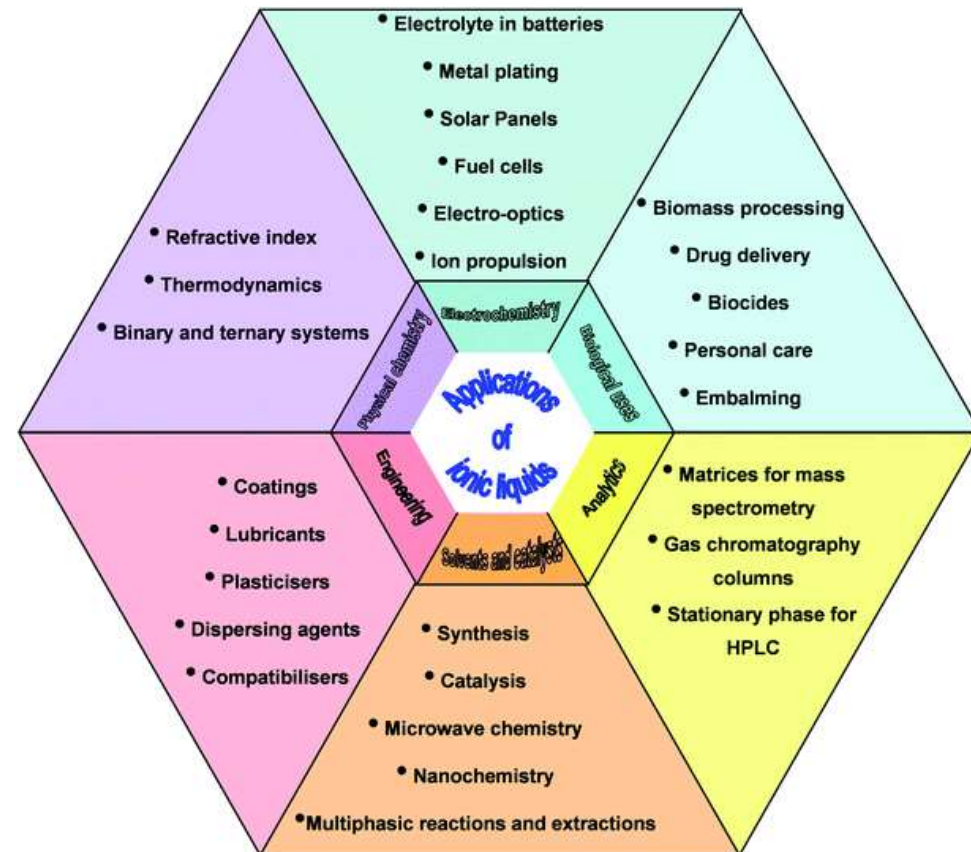


Ionske tekočine (ionic liquids)

○ Struktura:



○ Uporaba:



Evtektična topila – „zelena“ topila

Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids

Andrew P. Abbott,* David Boothby, Glen Capper, David L. Davies, and Raymond K. Rasheed

Contribution from the Chemistry Department, University of Leicester, Leicester, LE1 7RH, United Kingdom

J. AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 9142–9147

Received March 26, 2004; E-mail: andrew.abbott@le.ac.uk

Abstract: Deep Eutectic Solvents (DES) can be formed between a variety of quaternary ammonium salts and carboxylic acids. The physical properties are significantly affected by the structure of the carboxylic acid but the phase behavior of the mixtures can be simply modeled by taking account of the mole fraction of carboxylic acid in the mixture. The physical properties such as viscosity, conductivity, and surface tension of these DES are similar to ambient temperature ionic liquids and insight into the cause of these properties

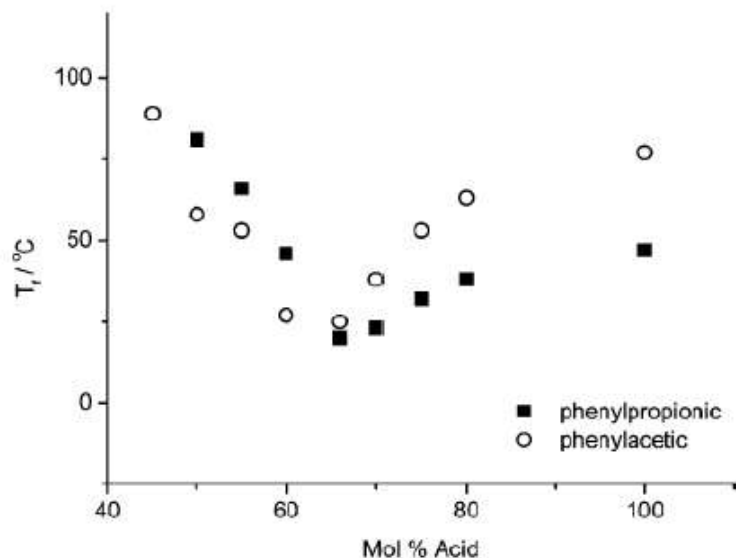


Figure 1. Freezing points of choline chloride with phenylpropionic and phenylacetic acids as a function of composition.

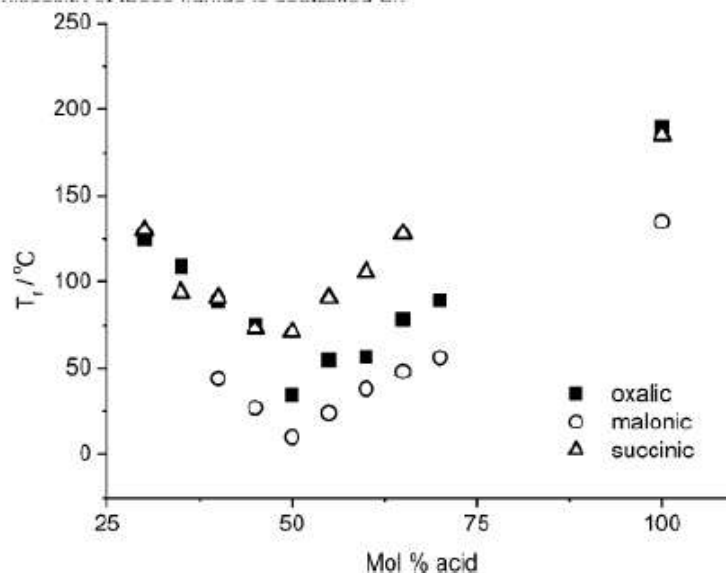
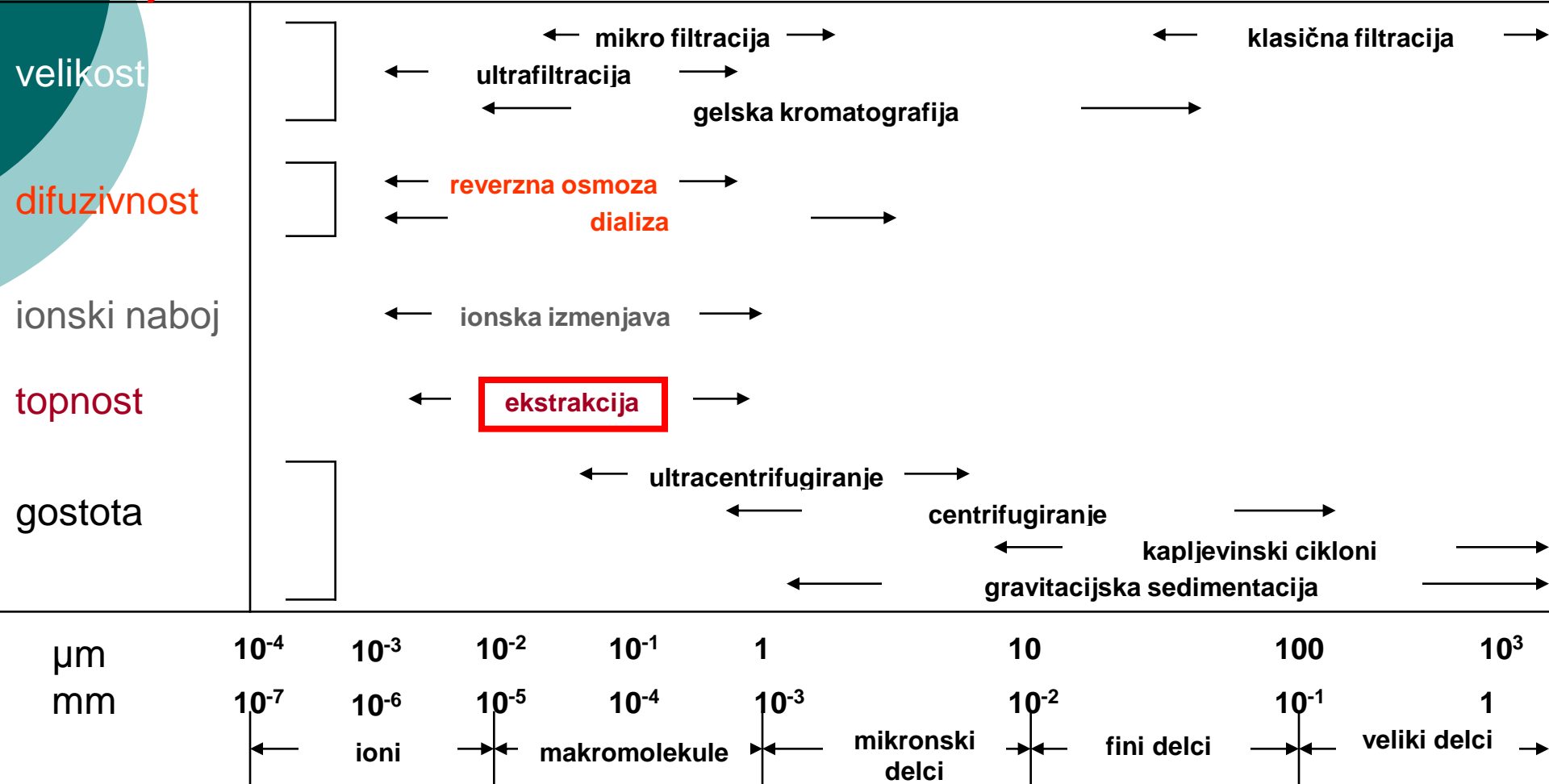


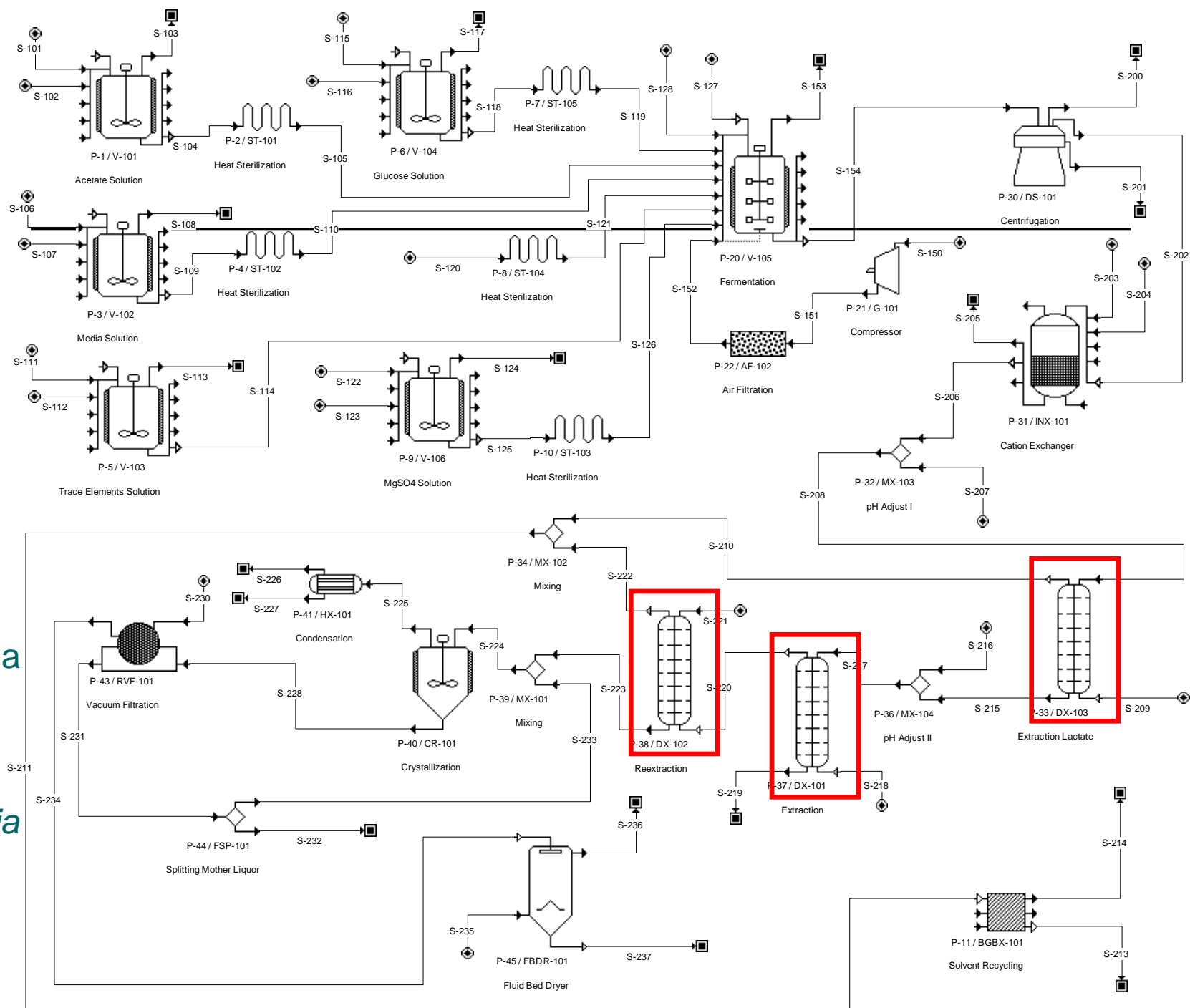
Figure 2. Freezing points of choline chloride with oxalic, malonic, and succinic acids as a function of composition.

Ločevanje glede na lastnosti snovi

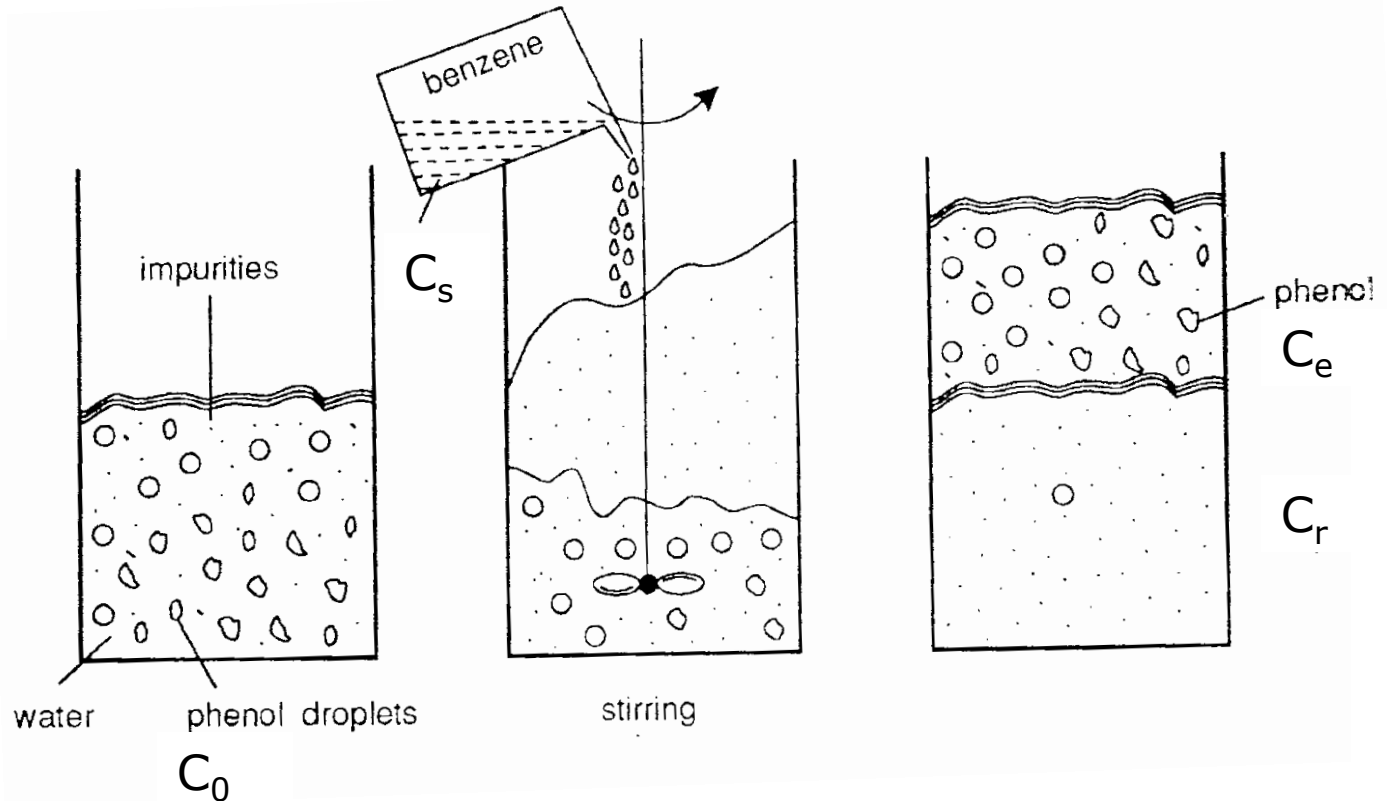
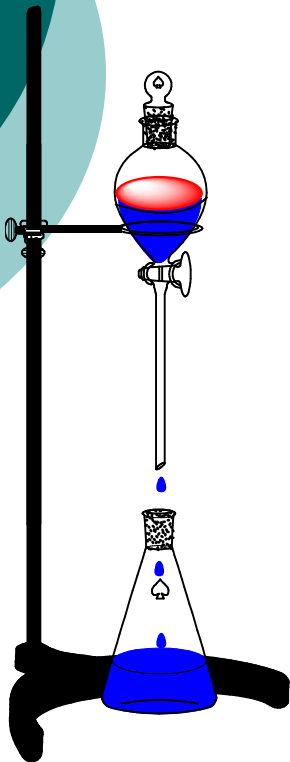
osnovni
parameter
ločevanja



Proizvodnja
piruvata s
celicami
bakterije
*Escherichia
coli*



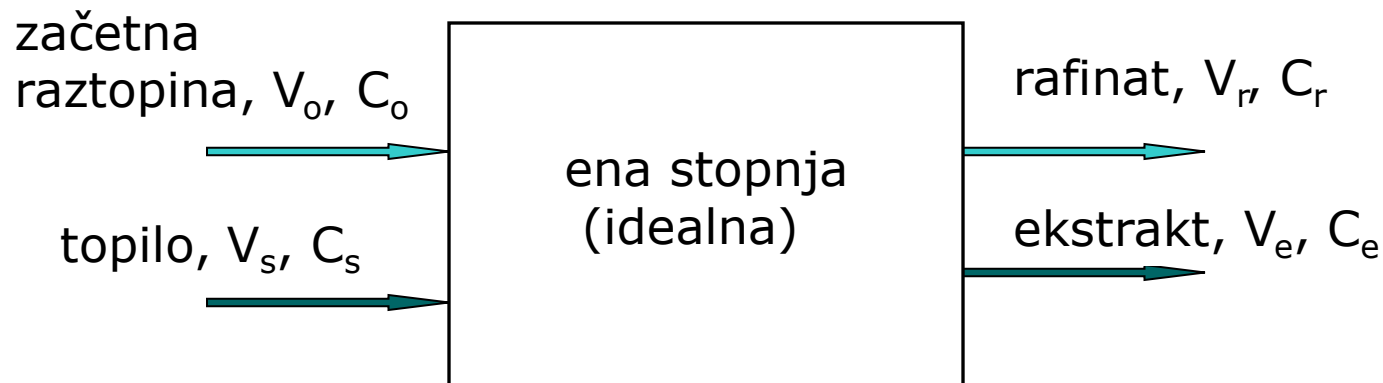
Enostopenjska šaržna ekstrakcija



topljenec iz začetne raztopine se porazdeli med fazama – odvisno od:

1. učinkovitosti prenosa snovi (**kinetika**) in
2. selektivnosti topila oz. ravnotežja (**termodinamika**)

Enostopenjska šaržna ekstrakcija



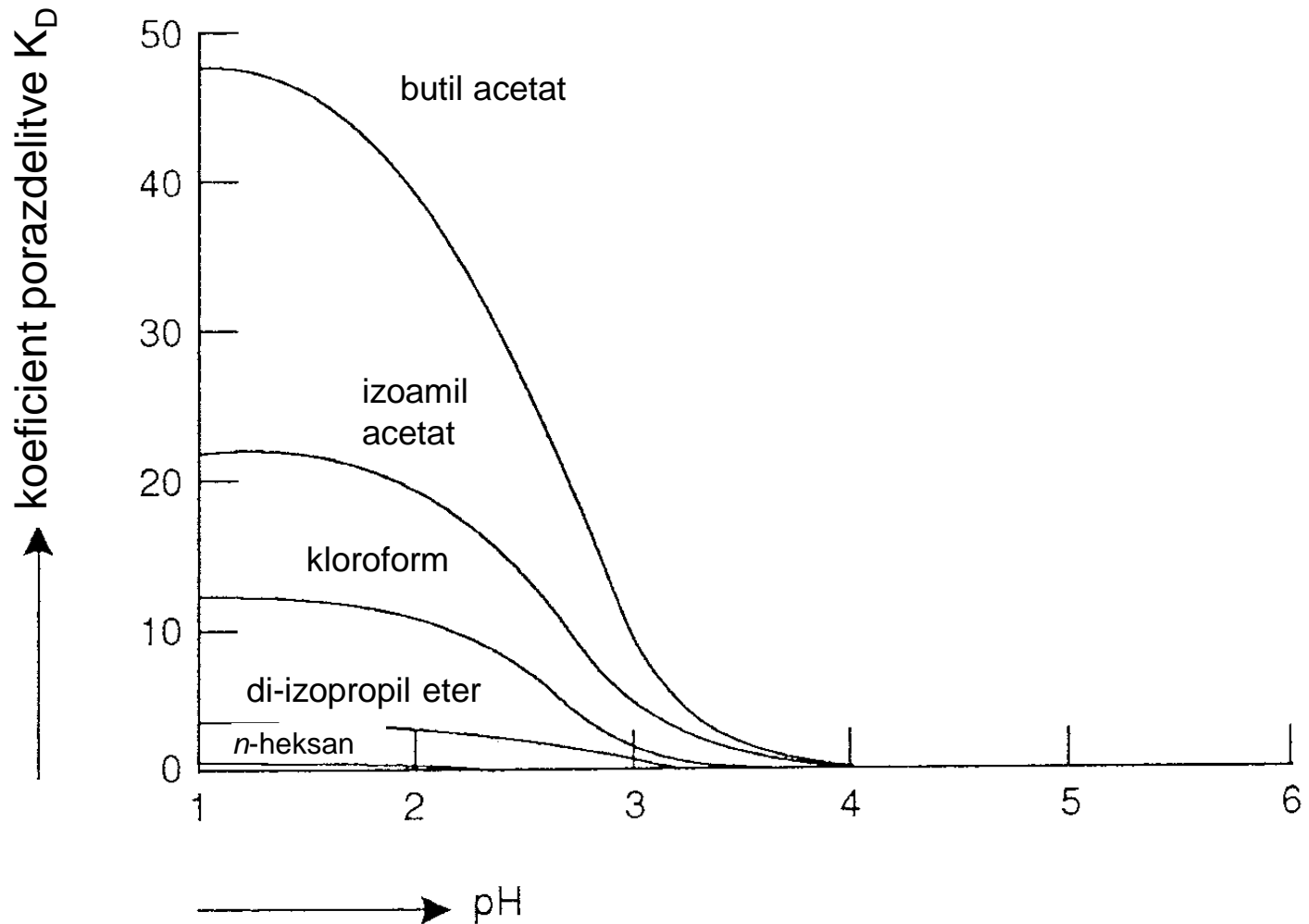
koeficient porazdelitve (distribution coefficient):

$$K_D = \frac{\text{ravnotežna koncentracija v lažji (organski) fazi}}{\text{ravnotežna koncentracija v težji (vodni) fazi}} = \frac{C_e}{C_r}$$

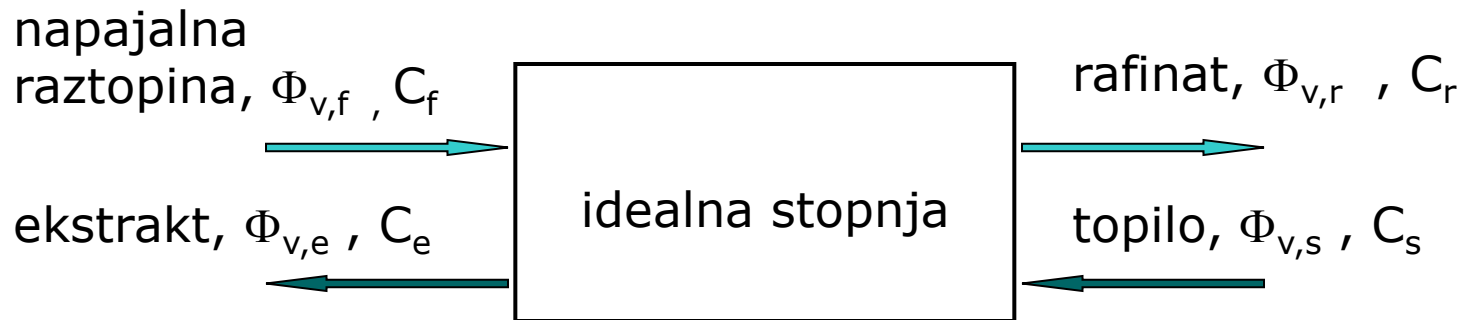
Koeficienti porazdelitve za različne topljence v sistemu topilo/voda

Type	Solute	Solvent	K	Remarks
Amino acids	Glycine	n-butan ol	0.01	25 °C
	Alanine	n-butan ol	0.02	
	Lysine	n-butan ol	0.2	
	Glutamic acid	n-butan ol	0.07	
	α -aminobutyric acid	n-butan ol	0.02	
	α -aminocaproic acid	n-butan ol	0.3	
Antibiotics	Celesticetin	n-butan ol	110	at pH 4.2
	Cyclheximide	Methylene chloride	23	
	Erythromycin	Amyl acetate	120	
	Lincomylin	n-butan ol	0.17	
	Gramicidin	Benzene	0.6	
		Chloroform-methanol	17	
	Novobiocin	Butyl acetate	100	
			0.01	
	Penicillin F	Amyl acetate	32	
			0.06	
Proteins	Glucose isomerase	PEG 1550/potassium phosphate	3	
	Fumarase	PEG 1550/potassium phosphate	0.2	
	Catalase	PEG/crude dextran	3	

Odvisnost K_D penicilina od pH



Enostopenjska protitočna kontinuirna ekstrakcija



Snovna bilanca za topljenec ($C_s = 0$):

$$\Phi_{v,f} \cdot C_f = \Phi_{v,r} \cdot C_r + \Phi_{v,e} \cdot C_e$$

faktor ekstrakcije (S ali E):

$$S \text{ ali } E = \frac{\Phi_{v,e} \cdot C_e}{\Phi_{v,r} \cdot C_r} = K_D \frac{\Phi_{v,e}}{\Phi_{v,r}}$$

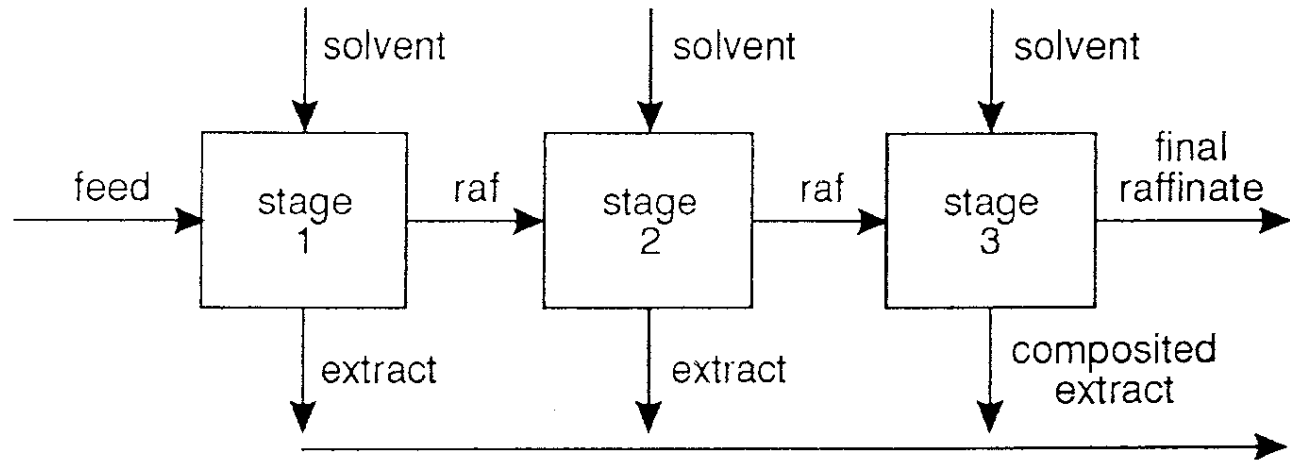
ekstrahirani delež oz. stopnja ekstrakcije (f):

$$f = \frac{\Phi_{v,e} \cdot C_e}{\Phi_{v,f} \cdot C_f} = \frac{S}{S+1}$$

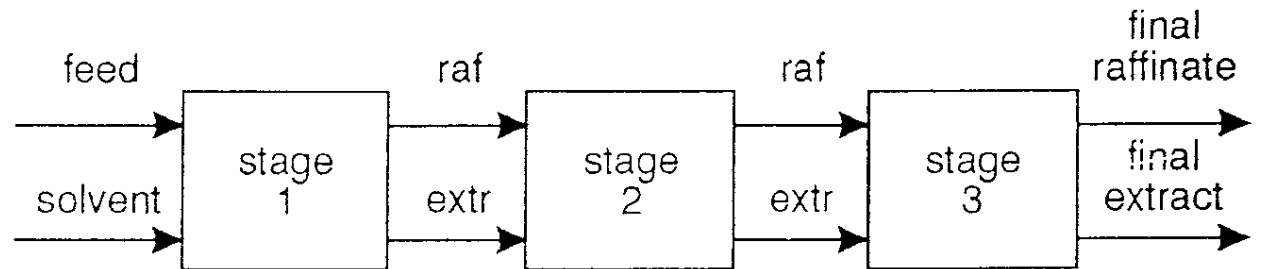
$$1 - f = \frac{C_r}{C_f}$$

Večstopenjske ekstrakcije – načini obratovanja

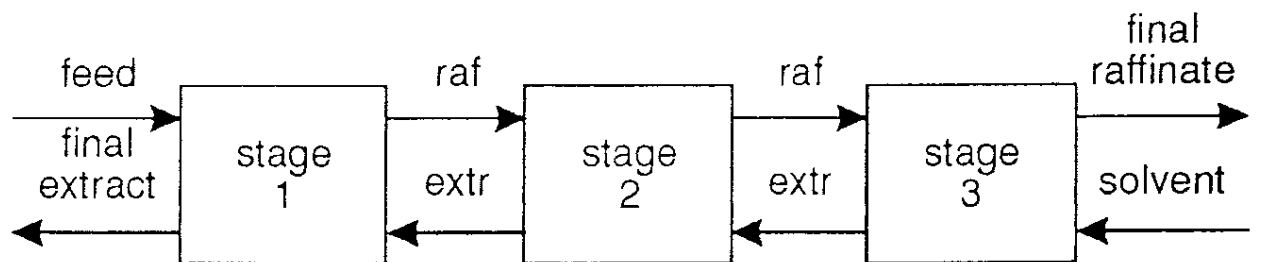
šaržna



kontinuirna, sotok



kontinuirna, protitok

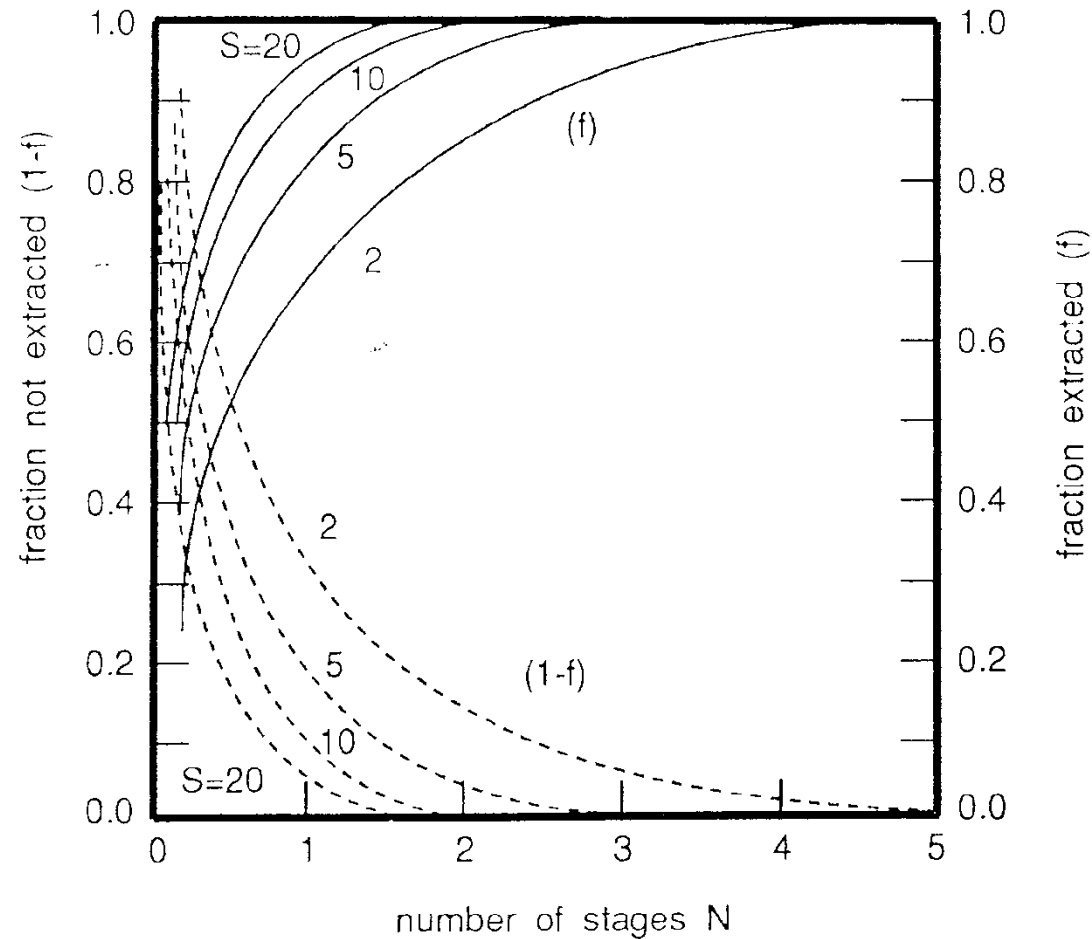


Določanje števila stopenj

Kremserjeva enačba

$$N = \frac{\ln \left[\frac{(S-1)}{(1-f)} + 1 \right]}{\ln S} - 1$$

$$S = K_D \frac{\Phi_{v,e}}{\Phi_{v,r}}$$



----- neekstrahirani delež (1-f)

———— ekstrahirani delež (f)

Grafična metoda določanja števila stopenj ekstrakcije

ravnotežna črta

$$x_n = f(y_n)$$

obratovna črta

$$x_n = \frac{H}{L}(y_{n+1} - y_1)$$

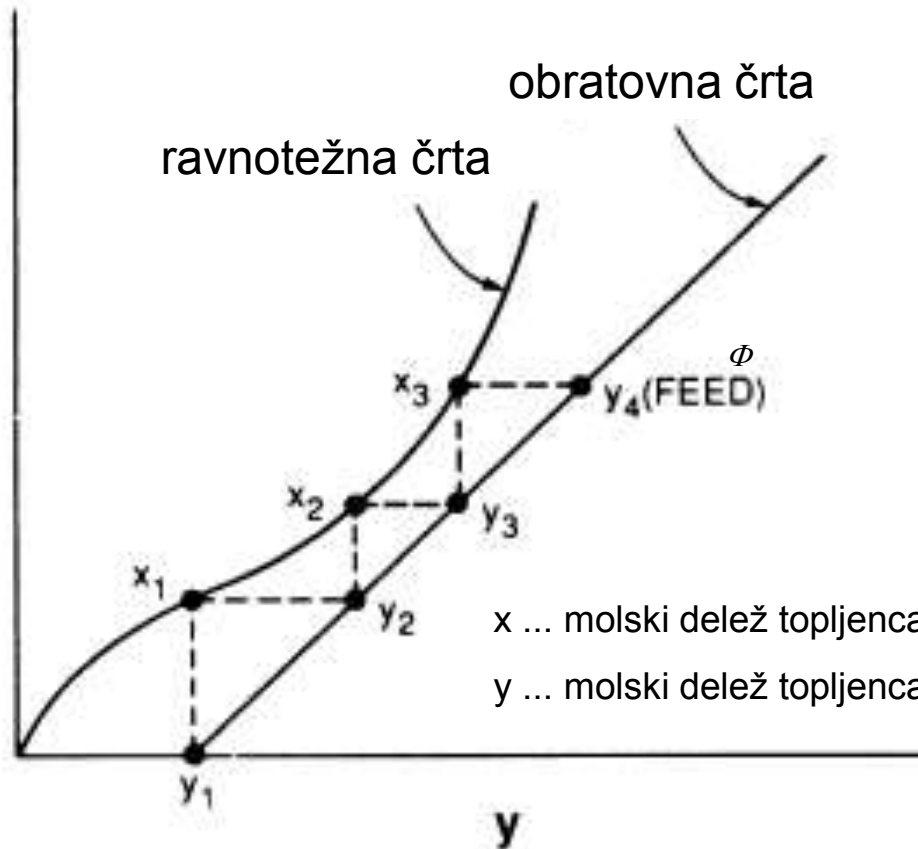
H ... molski tok težje kapljevine
L ... molski tok lažje kapljevine

1. stopnja:

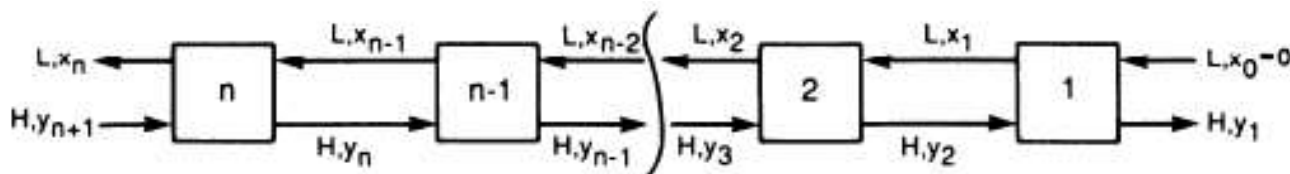
$$Hy_2 + L(0) = Hy_1 + Lx_1$$

za vse stopnje:

$$y_{n+1} = \left(\frac{E^{n+1} - 1}{E - 1} \right) y_1$$



x ... molski delež topljenca v težji kapljevini
y ... molski delež topljenca v lažji kapljevini

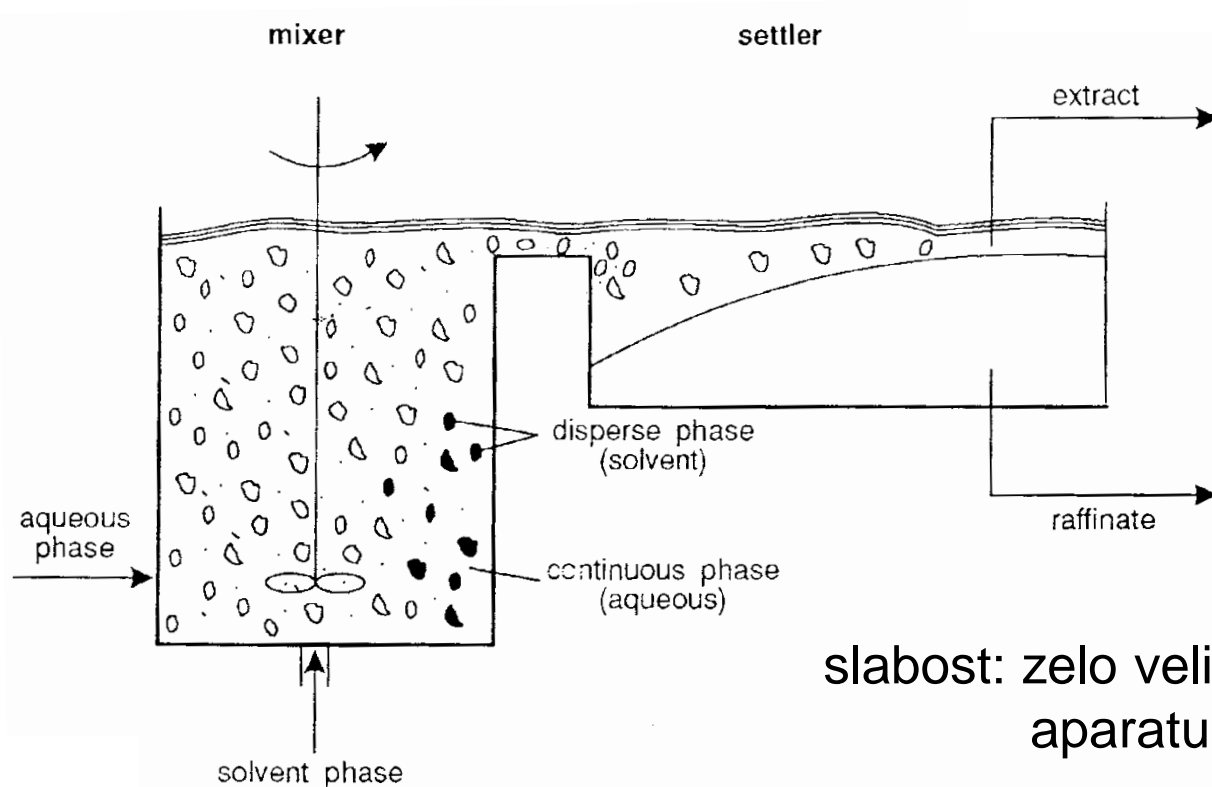


Ključni parametri kontinuirne ekstrakcije

- delovna temperatura
- delovni pritisk
- napajalna raztopina
 - pretok
 - temperatura
 - pritisk
 - sestava
- ekstrakcijska naprava
 - majhna medfazna napetost in viskoznost → tvorba emulzije
 - visoka medfazna napetost in viskoznost → potreben večji vnos moči za hiter prenos snovi
- ustrezno topilo:
 - topljenec čim bolj topen, visoka selektivnost
 - ostale komponente v napajalnem toku čim manj topne
 - visok koeficient porazdelitve → manj potrebnih teoretičnih stopenj
 - majhna viskoznost → povečana kapaciteta, hitrejša separacija faz
 - nizka cena, nestrupen, nevnetljiv

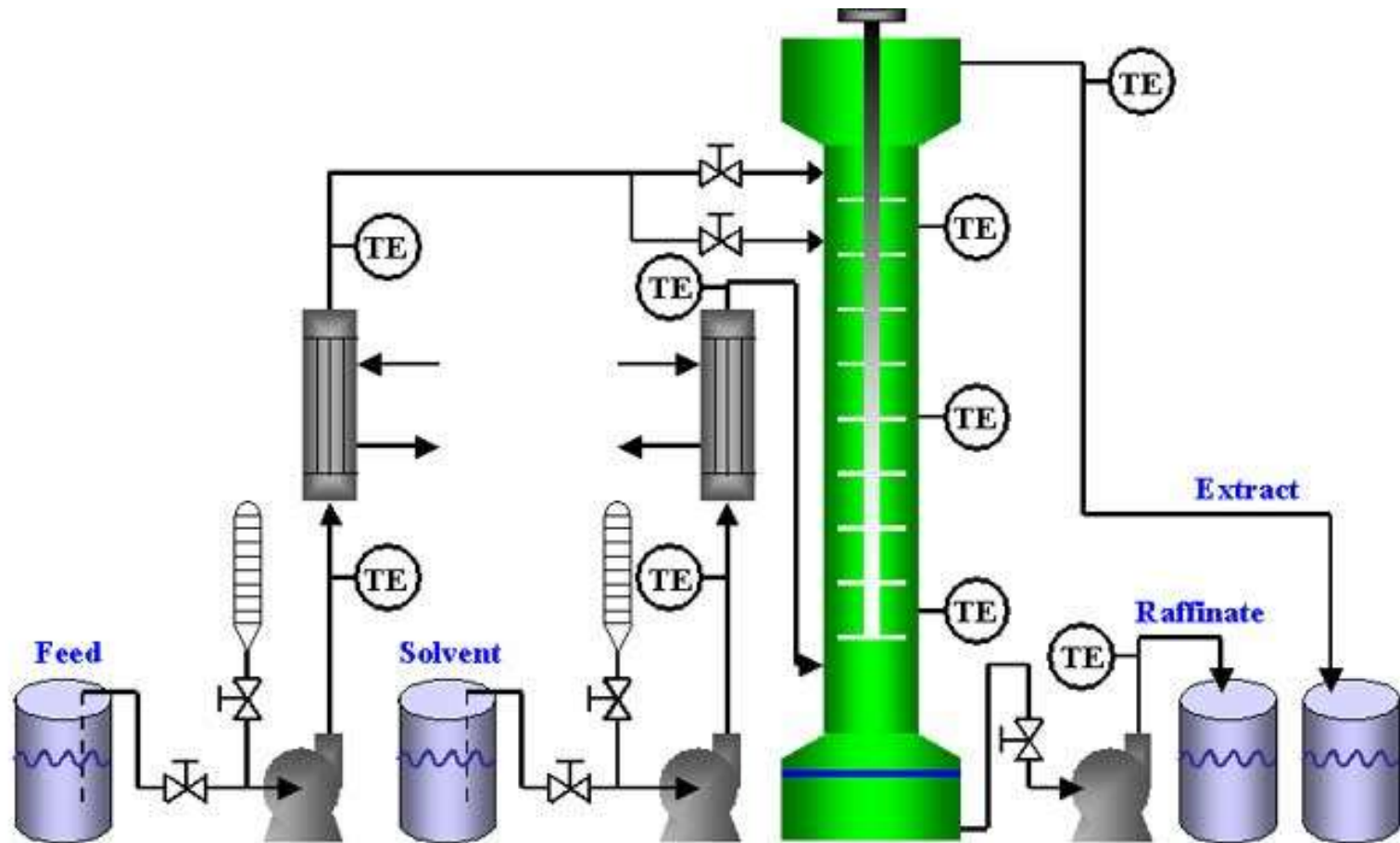
Naprave za ekstrakcijo: mešalnik – usedalnik (mixer – settler)

- enostopenjska kontinuirna ekstrakcija, najbolj uporabljana
- raztopina s produktom + topilo se intenzivno premešata → vzpostavitev ravnotežja
- ločitev obeh faz v usedalniku – razlika v gostoti



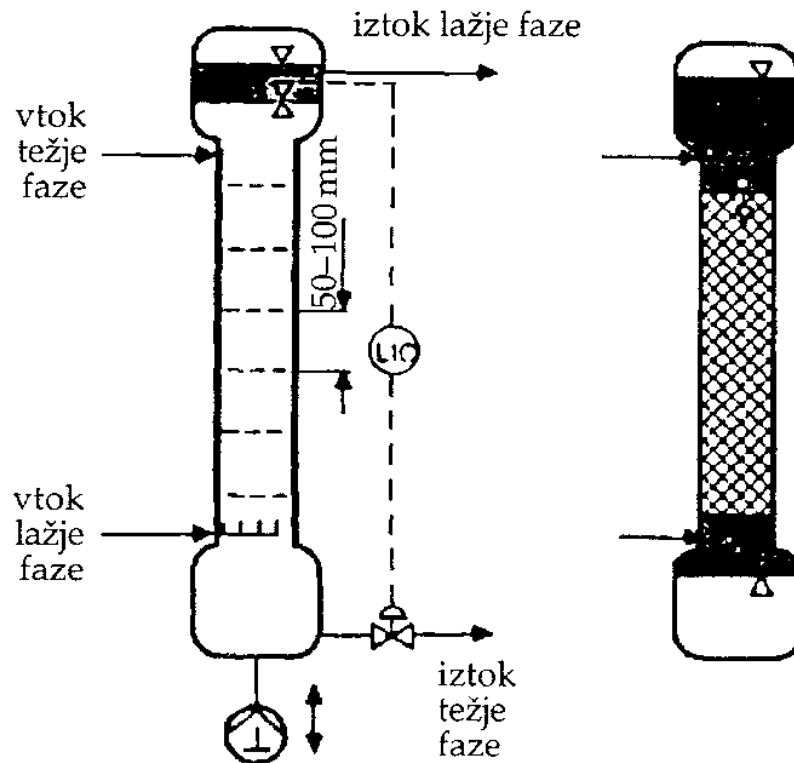
slabost: zelo velike prostornine
aparatur

Kontinuirna ekstrakcija v koloni



protično delovanje

Kolone za ekstrakcijo

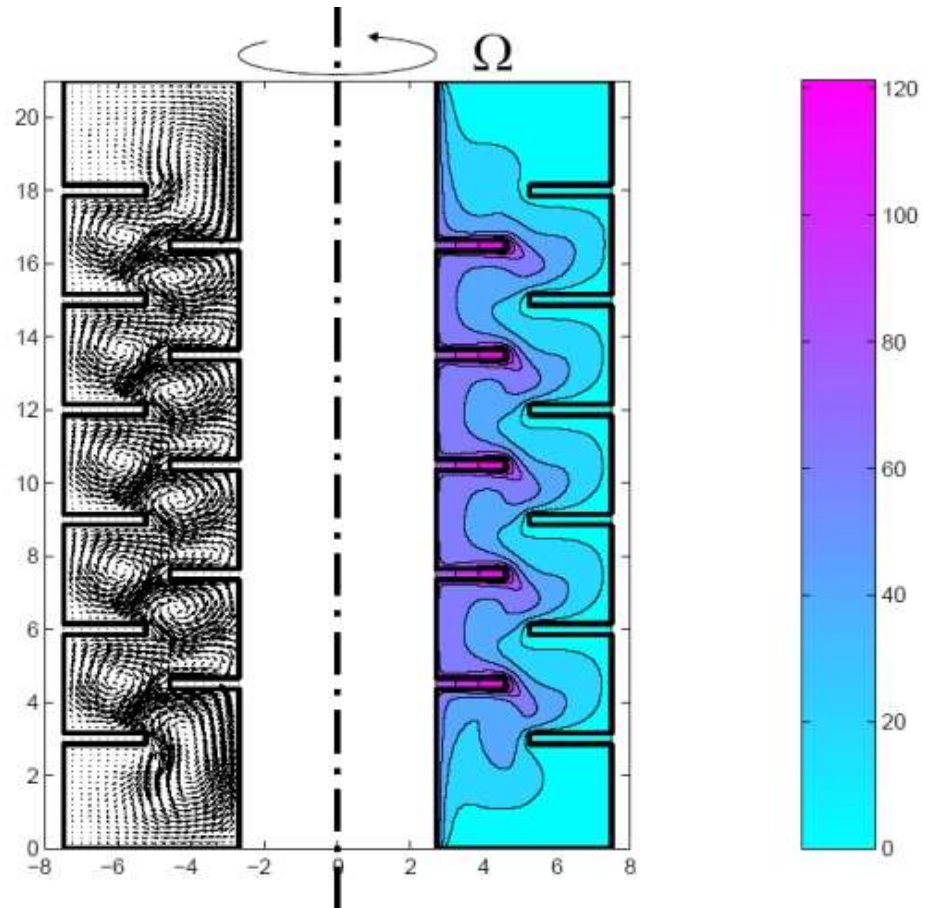
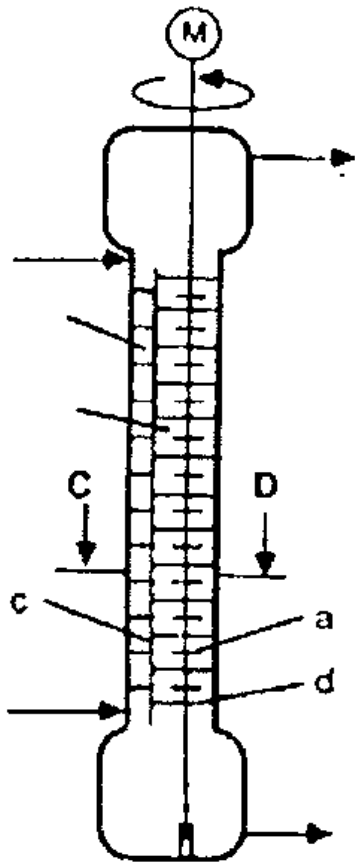


kolona s prekati

kolona s polnili



Rotirajoča kolona s prekati



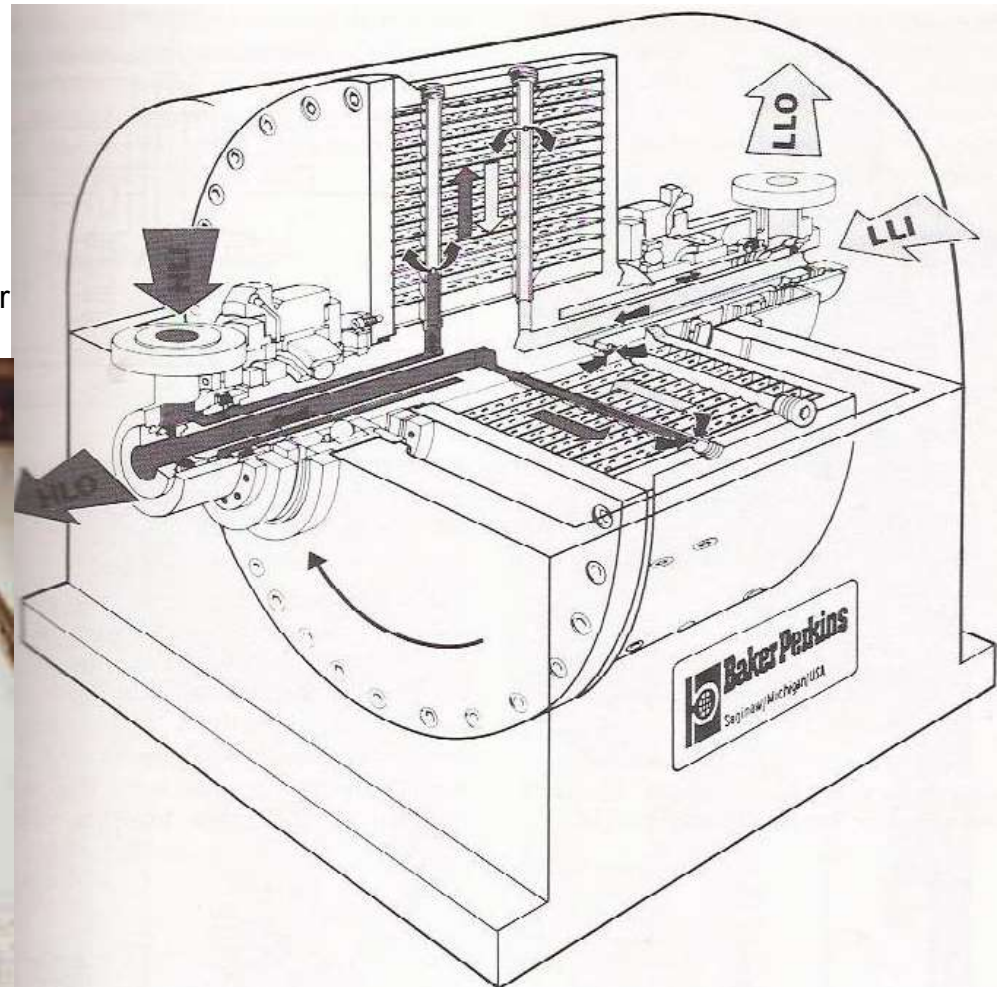
Centrifugalni ekstraktor

- idealni za sisteme, kjer je razlika v gostoti pod 4%
- če proces zahteva več ravnotežnih stopenj

Večstopenjski c. ekstraktor
pretoki: 12 do 8.000 l/h



Enostopenjski centrifugalni ekstraktor
pretoki: 3 000 to 80 000 l/h



2. Podbielniak centrifugal extractor POD. (Courtesy of Baker Perkins, Inc., Michigan [38])

Primerjava različnih naprav za ekstrakcijo

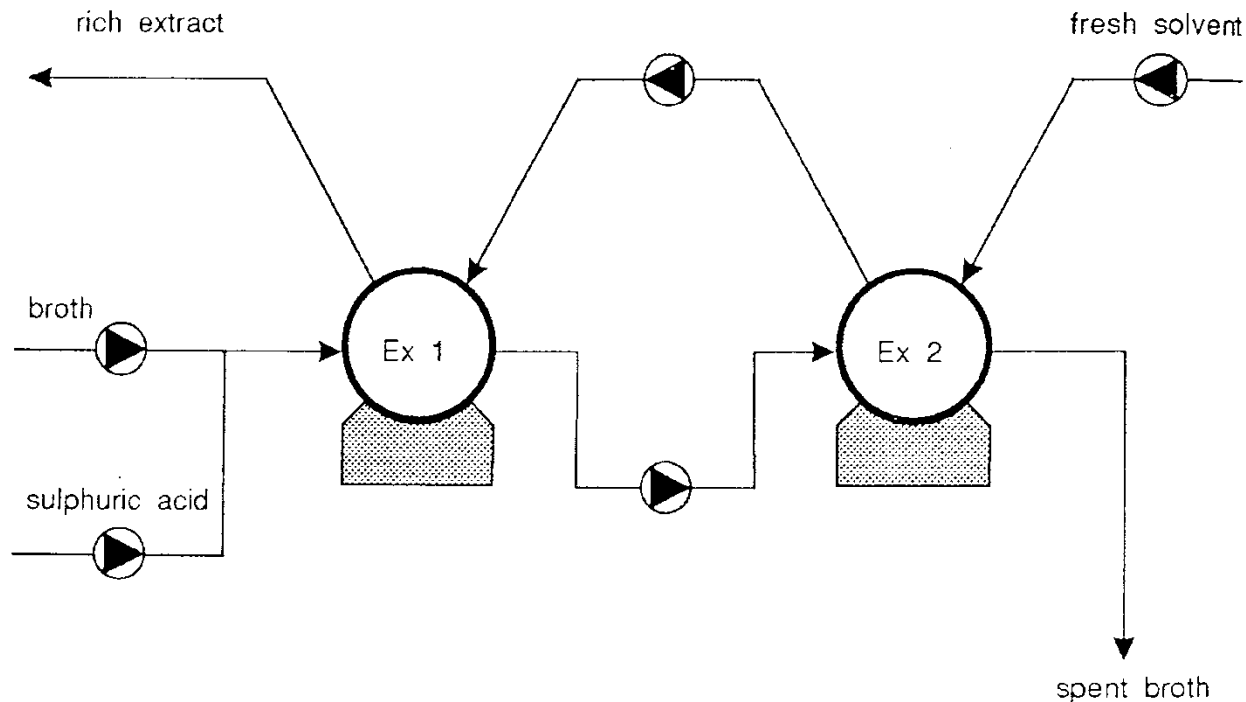
	prednosti	slabosti
mixer-settler	<ul style="list-style-type: none">• učinkoviti• zagotavljajo dober prenos snovi• lahko izvajamo različno število stopenj	<ul style="list-style-type: none">• zavzemajo veliko prostora• visoki investicijski stroški• visoki obratovalni stroški
kolone (brez mešanja)	<ul style="list-style-type: none">• majhni investicijski stroški• majhni obratovalni stroški	<ul style="list-style-type: none">• manj učinkoviti kot mixer-settler• zahteven scale-up
kolone (z mešanjem)	<ul style="list-style-type: none">• dobro dispergiranje• majhni investicijski stroški• lahko izvajamo različno število stopenj	<ul style="list-style-type: none">• težko ločujejo topila z majhno razliko v gostoti• ne omogočajo visokih pretokov
centrifugalni ekstraktorji	<ul style="list-style-type: none">• lahko ločujejo topila z majhno razliko v gostoti• kratki zadrževalni časi	<ul style="list-style-type: none">• visoki investicijski stroški• visoki obratovalni in investicijski stroški• niso primerni za veliko stopenj

Ekstrakcija antibiotikov

ključni problem: stabilnost pri nizkih in /ali visokih pH

→ zelo kratek zadrževalni čas v ekstraktorju

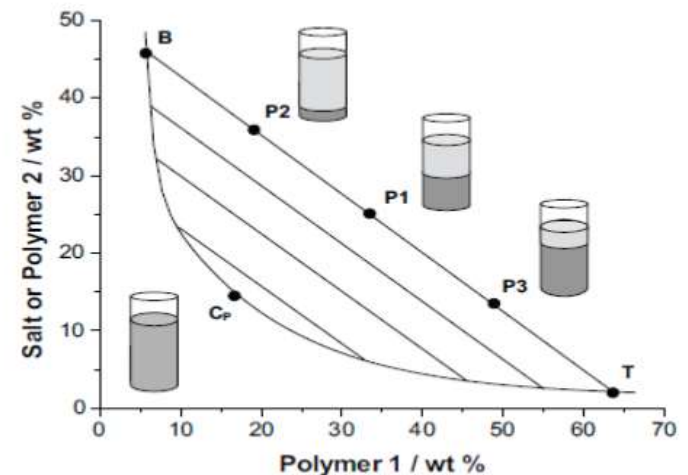
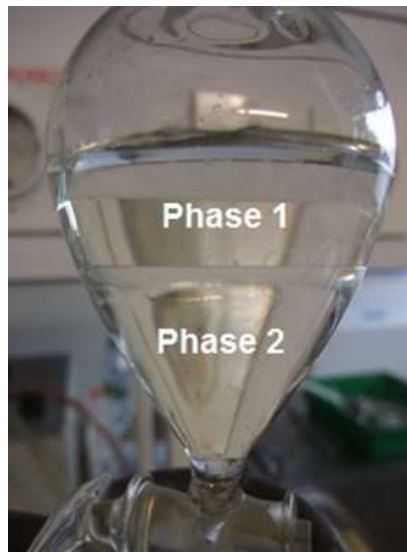
→ rešitev: sistem 2 centrifugalnih ekstraktorjev s protitočnim delovanjem



→ ali: dodatek nosilca, ki reagira s produktom → izboljšan K_D , možna ekstrakcija pri višjih pH

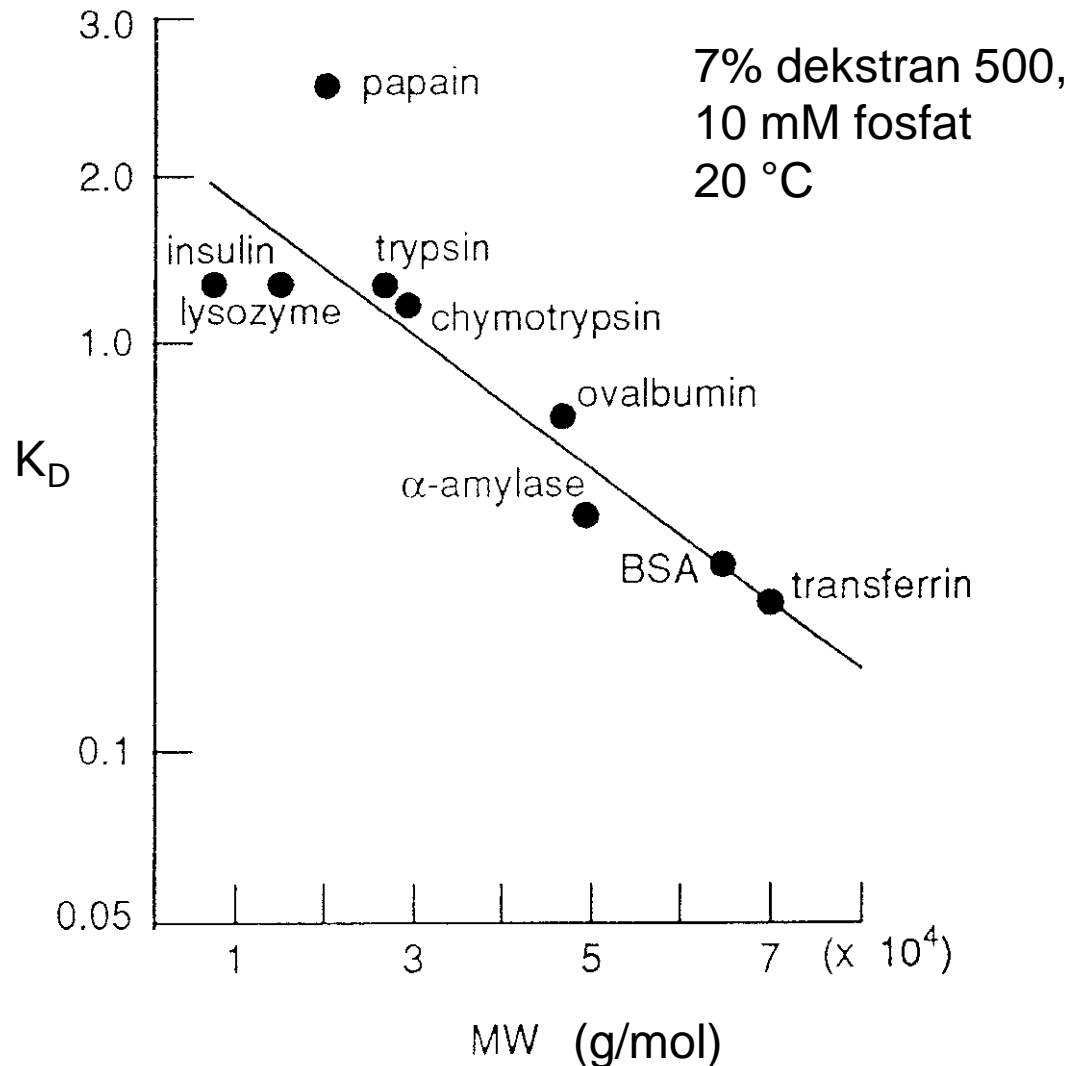
Ekstrakcija produktov z visoko molsko maso (proteini, encimi)

- uporaba vodotopnih polimerov ali mešanice polimerov in anorganskih soli – njihove vodne raztopine z vodo tvorijo večfazne mešanice
 - primer: polietilenglikol, dekstran... + NaCl, K_2HPO_4 ...
- prednosti dvofaznih vodnih sistemov: visoka kapaciteta proteinov, nenedenaturirajoče topilo, visoka selektivnost



Odvisnost K_D od molske mase

K_D odvisen še od:
-temperature
-vrste soli (ioni)
- M_{polimera}



Shema procesa izolacije encima s polietilen glikolom (PEG)

