

Folyadék-folyadék extrakció

A folyadék-folyadék extrakció (LLE – liquid-liquid extraction), olyan művelet, amelyben egy rendszerint kétkomponensű folyadékelegyet egyik komponensét akarjuk kinyerni egy harmadik folyadékkomponenssel, a szelektív oldószer segítségével. Az extrakciós műveletet rendszerint lepárlás követi. Három komponens vesz részt a LLE folyamatban: extrahálódó komponens, a hordozója és a szelektív oldószer.

Álljon a szétválasztandó anyaoadat A és C-ből, legyen B a C komponens szelektív oldószere (A és B nem elegyedő folyadékok). Az extrakciós művelet során kapott termékek: az extraktum (B és C, nagyon kevés A komponens), a raffinátum, azaz visszamaradt anyalúg (A és kevés C, esetleg nagyon kevés B komponens).

Az extrahálószer kiválasztása kulcsfontosságú, mert ez határozza meg az LLE folyamat hatékonyságát. Az extraháló oldószernek több követelménynek kell eleget tenniük, hogy gazdaságosan és hatékonyan elvégezhesük a szétválasztást.

- az értékes komponens jól oldja, nagy szelektivitással
- a hordozó oldószer és az alkalmazott extraháló oldószer lehetőség szerint minél kevésbé oldódjon egymásban (ALAPFELTÉTEL)
- az extraháló oldószert könnyű legyen elválasztani az extraktum fázisból (nagy forrpontról különbség, ne legyen azeotróp-képződés, stb.)
- nagy legyen a sűrűség-különbség a hordozó- és az extraháló oldószer között
- nagy legyen a határfelületi-feszültség a két oldószer között az emulzió-képződés elkerülése miatt
- az extraháló oldószer gőznyomása legyen alacsony a munkahőmérsékleten a párolgási veszteségek elkerülése miatt
- legyen alacsony viszkozitású a könnyebb szállíthatóság céljából
- legyen kémiai és termikusan stabil
- lehetőleg ne legyen korrozív, mérgező és gyúlékony, és alacsony árú legyen.

A fő problémák lehetnek:

- emulzióképződés,
- mérgező anyagokkal való munka,
- időigényesség.

Ezen problémák elkerülése végett szokták alkalmazni a mini extrakciót, melynek keretein belül kevesebb mérgező anyag felhasználásával egy kevésbé veszélyes folyamatot tudnak véghezvinni. A keverés és a rétegzés fontos és szükséges lépések, hogy növeljük az oldott anyag átvitelt az oldószerből az extrahálószerbe, és hogy elválasszuk az extrahálószerrel az oldott anyagotól.

- **Megoszlási hányados:** Az extrakciós művelet típusától függetlenül egyensúlyra vezető művelet, melyre jellemző a *megoszlási hányados* (N). N független az oldott anyag koncentrációjától abban az esetben, ha az oldott anyag molekuláris állapota egyik oldószerben sem függ a koncentrációtól.

$$N = \frac{c_E^*}{c_R^*} = \frac{\text{az értékesanyag egyensúlyi koncentrációja az extrakt fázisban}}{\text{az értékesanyag egyensúlyi koncentrációja a raffinátum fázisban}}$$

A két fázis közötti komponenstranszport az egyensúlyi koncentrációk eléréséig tart. Ezután a hajtóerő (koncentrációkülönbség) nulla.

- **Szeparációs faktor:** egy dimenziómentes faktor, amely megmutatja az oldott anyag relatív dúsulását az extraháló szerben az extrakciós folyamat után.

$$Sf = \frac{(Se/Re)}{(Sd/Rd)}$$

Se: szükséges oldott anyag az extrahálószerben

Re: szükségtelen oldott anyag az extrahálószerben

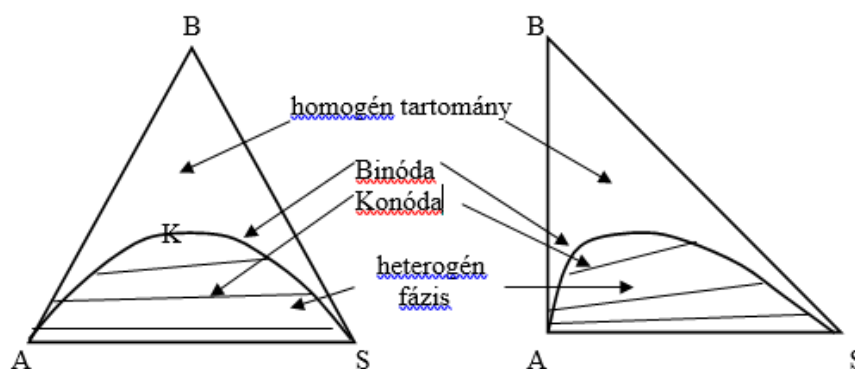
Sd: szükséges oldott anyag az oldószerben

Rd: szükségtelen oldott anyag az oldószerben

- Extrakciós faktor: az oldott anyag teljes tömege az extrahált fázisban osztva az oldott anyag teljes mennyiségével a raffinált fázisban.

A háromszög alakú fázisdiagramokat általában arra használják az LLe rendszerben, hogy illusztrálják a háromfázisú folyadék ekvilibríumot, ezeket a fázisdiagramokat egyszerű használni az oldószer fázisában. Más típusok is léteznek, nem csak háromszögek.

A folyadék-folyadék extrakciós anyagátadásban *három komponens* vesz részt és létrejön két nem- vagy csak részben elegyedő folyadékfázis. A három komponens jelenléte miatt az ilyen terner rendszereket célszerűen **háromszög-diagramban** ábrázolni, mely általában vagy egyenlő oldalú szabályos háromszög, vagy egyenlő szárú derékszögű háromszög.

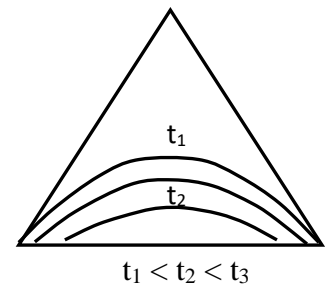


A háromszög csúcsaiban a három tiszta komponens állapotpontja található, ahol a másik két-két komponens koncentrációja nulla. A háromszög oldalait kétkomponensű elegyek állapotpontjai alkotják, melyek két komponense az oldalon található két csúcsban lévő komponensek. A háromszög által határolt területet az egyensúlyi görbe (**binóda**) két részre

Benkovits Bianka Rebeka
Böhm Ármin
Kis Gábor Dániel
Kiss Dorisz

osztja. A binóda fölötti részt homogén háromkomponensű elegyek állapotpontjai alkotják. A binóda alatti terület *instabil tartomány*, ahol azonnal bekövetkezik a fázis-szétválás. A szétválás az ún. egyensúlyi húr (**konóda**) mentén történik. A legrövidebb konóda valójában csak egy pont, ez a *kritikus oldási pont* (K). A szétválás eredményeképpen keletkező raffinátum fázis állapotpontja a kritikus ponttól balra, az extraktum fázis pontja a K ponttól jobbra helyezkedik el a binódán.

Az **egyensúlyi görbe** megmutatja az extrahálendő komponens eloszlását a raffinátum és az extraktum fázis között. A binóda alatti terület általában csökken a hőmérséklet emelésével, ami a két oldószer kölcsönös oldhatóságának javulásával magyarázható. Kivéve az extrém nyomási értékeket, a nyomás hatása elhanyagolható az egyensúlyi görbe alakjára.



LLE csoportosítása:

Standard extrakció:

Ez a legegyszerűbb fajtája, mely során az extrahálószer összekeverjük hígítószerrel egyetlen szakaszban, több szakaszban, vagy folyamatosan ellenáramú áramlással. A szennyeződések kivonása különös figyelmet igényel.

Frakcionálás. A standard extrakcióval azonos lépésekből áll, egy mosási lépés hozzáadásával. A hígítószer a folyamat közepén kerülnek be.

Disszociatív extrakció. A disszociatív extrakciót általában a gyenge szerves savat vagy bázist tartalmazó anyaggal végzik. Az extrahálási folyamat a különböző oldott állapotok különböző oldhatóságán alapul. A disszociatív extrakció fogalmát más kémiai elválasztásokban vizsgáljuk, mint pl. az antibiotikumok szétválasztása pH-eltolódásos extrakcióval,

Reakció-fokozott extrakció. Az oldott anyag oldhatóságának megváltoztatásához bizonyos oldott anyagot használunk, hogy nagy oldhatóságot érjen el az extrahálószerben.

Hibrid extrakciós folyamatok. Ezek a folyamatok magukban foglalják az extrakciós eljárások bármely kombinációját javítását.

LLE készülékei:

A folyadék-folyadék extraktorokat szerkezetük és működésük alapján négy fő csoportba lehet sorolni:

- Statikus: Keverő nélküli berendezés.
- Kevert: Lehessen kontrollálni az LLE hatékonyságát.
- Centrifugális extraktorok: elválasztja az extrahálószer az oldószerrel egy gyors centrifugát használva.
- Keverő-ülepítő extraktorok

A mai gépeket még fejleszteni lehetne az érintkezőfelület, a cseppméret és a cseppgyorsaság alapján. A statikus oszlopextraktort az oszlop újraosztásával fejleszthetjük.

Benkovits Bianka Rebeka
Böhm Ármin
Kis Gábor Dániel
Kiss Dorisz

Biofinomításban való alkalmazás:

Számos ipari területen használják, pl. petrolipar, élelmiszeripar, gyógyszeripar, savak előállítása. A legújabb biotechnológiákban is alkalmazzák, pl a szennyvízkezelésben. Jelenleg nagyon sok tanulmány elérhető az LLE-vel történő biotermék izolálással kapcsolatban, de nincsen átfogó áttekintő.

Etanol: A biofinomítási ipar egyik fő terméke, széles körben gyártják a világ minden táján, főleg Braziliában és az USA-ban. Az LLE-t használják az előkezelés és a hidrolízis során. A legfrissebb kutatások szerint a toluol a leghatékonyabb oldószer a furfurool eltávolítására. Sok tanulmány az ionos folyadékok oldószerként való felhasználására fókuszál. Az fermentorban termelődött etanolt ki kell venni a rendszerből, hogy a baktériumok folyamatosan tudják tovább termelni az etanolt. A produktivitás ezáltal ötször olyan jó, mint enélkül. Egy 407 g/liter glükózoldatot a *Saccharomyces Cerevisiae* teljesen meg tud fermentálni, ami amúgy normál esetben nem működne 200 g/l koncentráció fölött.

Biodízel: Másik alkalmazási területe az LLE-nek, általában hosszú láncú zsírsavak vagy trigliceridek észterezésével, metanollal készítik, ami nem csak egy reaktáns, hanem az oldószerként is szolgál.

Egyéb biofinomítás technológiák: Sok biofinomított termék termeltethető ki LLE technológiával. Szénhidrogéneket csak limitált számú mikroorganizmus képes előállítani, és az LLE technológia integrálható a sejtenyésztés során szénhidrogének termelése céljából. A „*botryococcus braunii*” algákban szintetizálódott szénhidrogént a hexán képes elválasztani. A szénhidrogén gyártása a hexános kezelés hatására nem gyengül.

Az LLE technológia az 1,3 propándiolokra ipari szempontból nem alkalmas, mivel a kitermelési folyamat nagy mennyiségű oldószer kezelését igényli, valamint az elválasztási határfok nagyon alacsony. Alternatív módszer: aldehiddel konvertálni az 1,3 PD-t, így nagyon hidrofób acetál lesz belőle (2-metil-1,3-dioxán). Ezután organikus oldószert használva (pl. o-xylene, toluene, ethylbenzene...) indítjuk a kitermelést, végül hidrolizáljuk az acetált 1,3-PD-vé.

Az LLE technológia jövőbeli fejlesztése, biofinomítás beállítására: A LLE technológia fejlesztésével, az oldószer környezeti hatása jelentős figyelmet kap. Új alkalmazásokat fejlesztettek mostanában, főleg a vizes két fázisú rendszereknél, a szuperkritikus oldószer extrakciónál, és az ionos folyadék extrakciónál. A víz jó extraktáns mert olcsó könnyen elérhető nem mérgező és újrahasznosítható. Magas hőmérsékletű víz módosítóként is használható egy organikus oldószer számára, mely növeli az oldhatóságot. Kétfázisú vizes rendszerek melyek polimerekből és szervesen sókból állnak. Alkalmazhatóak biotechnológiában, lehetséges vele érzékeny biológiai molekulák elválasztása, mint pl. intacelluláris enzimek és egyéb mikrobiológiai proteinek, denaturáció nélkül. Szuperkritikus folyadék extrakció olyan oldószert használ melynek nyomása és hőmérséklete nagyobb mint a kritikus pont, a fázisdiagramnak megfelelően. A legjobb erre a célra szén-dioxid, mert nem mérgező, nem éghető, és olcsó. Alkalmazásának legnagyobb ipari gátja, hogy speciális berendezés igényel. Az LLE technológia sok kihívást hordoz magával. Bioaktív organizmusokat és biológiai katalizátorokat alkalmaznak, ami limitálja az organikus extrahálószer alkalmazhatóságát. A nagy nyomás és hőmérséklet hátrányos az élő mikroorganizmusoknak.

Benkovits Bianka Rebeka
Böhm Ármin
Kis Gábor Dániel
Kiss Dorisz

Monoklonális antitestek tisztítása/elválasztása folyadék-folyadék extrakcióval

A monoklonális antitestek nagy ígéretnek örvendenek, mivel az új biotechnológiai eredetű gyógyszerek számos betegségben nyújtanak gyógyírt és kezelési módszert, beleértve a rákot és az autoimmun betegségeket is. Az antitestek extrahálásának és tisztításának jelenlegi módszerei elérik a maximális kapacitásukhoz közeli pontot, ráadásul a hagyományos eljárások egyszerűen túl drágák ahhoz, hogy a növekvő termékigényhez és mAb-termeléshez elegendő szintre legyenek méretezve. Ezért az új, kevésbé költséges és egyszerűen skálázható módszerek egyre nagyobb figyelmet kapnak.

A vizes kétfázisú extrakció (ATPE) olyan folyamat, amely képes az immunglobulinok nagy kitermeléssel történő szétválasztására, és ha megfelelően kezelik, nagy tisztítási kapacitással rendelkeznek. Továbbá a módszer környezetbarát és igen gazdaságos főleg akkor, ha komponensei újra felhasználhatóak.

A vizes kétfázisú rendszerek:

Vizes bifázisos rendszerek akkor fordulnak elő, amikor bizonyos oldott anyagok vizes oldatot két vizes fázisra osztják. 1896-os felfedezés óta sok vegyes kétfázisú vizes rendszert találtak vizes oldatban hidrofíl polimerek felhasználásával; például poli (etilén-glikol) (PEG, HO-(CH₂-CH₂-O)_n-H, ahol n a polimerizáció mértéke).

A különböző polimerek gyakran nem keverednek jól. A polimerek nagy aggregátumokat képeznek és a szterikus kizárás miatt két különböző fázisba különülnek el.

A keverés elegendő lehet ahhoz, hogy homogén fázisú régiókká váljanak, amelyek a két vagy több különböző polimert tartalmazzák. Ezek közül egyik leginkább kutatott a vizes dextrans-PEG rendszer, ahol a dextrans a hidrofíl, sűrűbb, alacsonyabb fázist és a PEG-et a hidrofób, kevésbé sűrű, felső fázist alkotja. Mindkét fázis főként vizet (jellemzően 70-90 tömeg% vizet) tartalmaz, és az egyik polimerben dúsított. A korlátozó koncentrációk a polimerek típusától és molekulatömegétől, valamint az oldat pH-értékétől, ionerősségétől és hőmérsékletétől függenek. Egyes polimerek önmagukban kétfázisú rendszert alkotnak; A felső, PEG-t tartalmazó fázist több hidrofób rész képezi meglehetősen koncentrált citrát vagy foszfát oldat esetén vagy magasabb hőmérsékleten. A fázisok közötti alacsony a határfelületi feszültség (körülbelül 400-szor kevesebb, mint a víz és egy nem elegyedő szerves oldószer között), amelyek kis cseppméretet, nagy határfelületi területeket, hatékony keverést biztosítanak és gyors szétválást. A polimerek stabilizáló hatást gyakorolnak a legtöbb fehérjére.

A leginkább vizsgált rendszerek:

PEG-citrát:

Egy kutatócsoport az antitestek extrakcióját polietilén-glikol (PEG) -citrát vizes kétfázisú rendszer (ATPS) alkalmazásával vizsgálta. A tisztított monoklonális antitesttel (mAb) végzett vizsgálatok során a sikeres fázisok kialakulását és az antitestek particionálódását jelentősen befolyásoló tényezőket határozták meg. Az antitest és a gazdasejtfehérje (HCP) szétválasztását a tisztított sejtkultúras táptalajoktól a kísérletek statisztikai tervezésével (DOE) vizsgálták. A HCP particionálás modelljét hozták létre, amelyben mind a NaCl, mind a citrát koncentrációt szignifikáns tényezőként azonosították. A legmagasabb tisztaság elérése érdekében a HCP sejtkultúra-folyadékból a terméket tartalmazó fázisba való elválasztását minimálisra csökkentették. Az optimális ATPS az, amely 14,0 tömeg% PEG-et, 8,4 tömeg%

Benkovits Bianka Rebeka
Böhm Ármin
Kis Gábor Dániel
Kiss Dorisz

citrátot és 7,2 tömeg% NaCl-t tartalmaz. Ez 7,2 pH-érték mellett, 89% termelést eredményezett, megközelítőleg 7,6-szeres csökkenést HCP-szintekben a tisztított sejtkultúra-folyadékhoz viszonyítva a kitermelés előtt, és általános tisztasága 70%.

15 tömeg% PEG-t, 8 tömeg% citrátot és 15 tömeg% NaCl-ot tartalmazó, 5,5 pH-értékű rendszert alkalmazva 95% -os termék visszanyerést értek el. A szakaszos üzemmódban optimalizált kísérleti körülmények között kifejlesztették az ellenáramú extrakciós technológia használatának mértéknöveléskor is használható modelljét, amely azonosítja a tisztaság és a helyreállítás potenciális javulását, amely a folyamatos üzemben megvalósítható.

PEG- foszfát:

Egy másik kutatócsoport vizsgálta a 2G12 (mAb 2G12) és 4E10 (mAb 4E10) anti-HIV monoklonális antitestek szétválasztására szolgáló, polietilén-glikol / foszfát (PEG / foszfát) ATPS alkalmazását a tisztítatlan transzgénikus dohány nyers kivonatból.

A növényi törmelék / mAb kinyerését elősegítő optimális körülmények 13,1 tömeg% (PEG 1500), 12,5 tömeg% foszfát volt pH 5-nél. Ilyen körülmények között a 2G12 mAb-t és a 4E10 mAb-t az alsó foszfát-fázisban 85 és 84% -os hozammal osztották fel, 2,4- és 2,1-szeres tisztítással. A javasolt ATPS-t sikeresen beillesztették egy biospecifikus elválasztási művelet (Protein A affinitás kromatográfia) mellé, amely nagy tisztaságú és hozamú antitesteket eredményezett. Ebben a vizsgálatban az ATPS kimutatták, hogy alkalmas a kiindulási fehérje kinyerésére és az mAb részleges tisztítására a nem tisztított transzgénikus dohány nyers kivonatból.

Dextrán-trietilén-glikol:

A kutatók az antitestek downstream feldolgozásánál PEG3350-ből, dextránból és trietilén-glikol-diglutarinsavból (TEG-COOH) előállított ATPS-t alkalmaztak. Az egy- és többlépcsős folyamatokat értékelték és hasonlították össze. Az egylépcsősben vizsgálták a pH hatását, TEG-COOH koncentrációt és az antitestek felülőszóban való arányát, ami és kimutatta, hogy a magas TEG-COOH koncentrációk és alacsonyabb pH alkalmas az antitest extrakciójára a PEG dús fázisban. Az egylépcsős extrakció legtermelékenyebb feltételei 1,3 tömeg% TEG-COOH és 2,2 térfogatarány volt, ami 96% -os visszanyerést eredményezett 87% fehérje tisztaságban és 43%-ot mAb tisztaságban. A végső IgG-koncentráció 0,21 mg / ml volt. Annak érdekében, hogy a visszanyerési hozamot és a tisztaságot egyidejűleg növeljék a többfázisú folyamatot fejlesztették, az IgG-t (immunglobulint) PEG-ben gazdag fázisban tisztították. Ez a szakasz 1,04 mg / ml végkoncentrációt mutatott, 93% -os fehérje tisztasággal. A PEG / dextrán ATPS 1,3 tömeg% TEG-COOH-t tartalmaz.

Pufferek alkalmazása:

A pH szabályozása elengedhetetlen lépése a különböző gyógyszer-technológiai eljárásoknak. A monoklonális antitestek, mint ahogy más biomolekulák is, érzékenyek a pH változásra, egy adott pH optimumon működnek a leghatékonyabban. A pH szinten tartására pufferoldatokat használnak.

Egy kutatásban a puffer típusának hatását vizsgálták egy monoklonális antitest dinamikus kötési kapacitására egy kationcserélőn. Az acetát puffer sokkal nagyobb kapacitást eredményezett, mint a foszfát-puffer. Általában az antitest-tisztításban alkalmazott közös pufferrendszerek a foszfát vagy citrát puffer (körülbelül 20 mM) vagy acetátpuffer (kb. 50 mM).

Benkovits Bianka Rebeka
Bóhm Ármin
Kis Gábor Dániel
Kiss Dorisz

Ami az összehasonlítható eredményeket illeti, a pufferek vezetőképességének hasonlónak kell lennie, ha különböző többkomponensű puffereket vizsgáltak. A puffer vezetőképességét általában 3,0-4,5 mS / cm tartományban tartják.

Fontos megemlíteni még a nagy koncentrációjú fehérjeoldatok önpufferelő hatását, ami 50 mg/ml-es tartományban hasonló pufferkapacitást ad, mint 6 mM citrát vagy 14 mM hisztidin. Az önpufferelő hatás lineáris tendenciát mutat 200 mg/ml fölött is. 220 mg / ml fehérjekoncentrációnál a pufferkapacitás hasonló, mint a 30 mM citrát vagy 50 mM hisztidin oldat általi.

Összefoglalás:

Munkánk elkészítése során sok kutatási anyagot olvastunk az eljárás fejlesztéséről, ami a jövőben ipari méretekben is megvalósulhat, ezzel egy kevésbé szennyező és költséghatékonyabb alternatívát biztosítva a folyamatnak.

Felhasznált irodalom:

http://www1.lsbu.ac.uk/water/aqueous_biphasic.html

https://www.researchgate.net/publication/46307539_Downstream_Antibody_Purification_using_Aqueous_Two-Phase_Extraction

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557796>

José Frederico Silva Oliveira-**An Integrated Process for the Purification of Antibodies Based on Magnetic Particles and Aqueous Two-Phase Systems**
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5084470/>

<http://www.biopharminternational.com/evolution-monoclonal-antibody-purification-platform>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296746>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17046339>