

Estrazioni di brodi di coltura microbiologici

Estrazione in fase solida

L'estrazione in fase solida evita i problemi derivanti dalle emulsioni che spesso si formano nelle estrazioni liquido-liquido e permette di ottenere una concentrazione ed una purificazione del prodotto. L'estrazione in fase solida utilizza adsorbenti su estratti grezzi provenienti da brodi di fermentazione dopo l'estrazione iniziale o dopo la separazione delle fasi per

- (1) purificare il campione,
- (2) l'arricchimento di tracce
- (3) il frazionamento dei prodotti desiderati

Quando è utilizzata per purificare il campione, la cartuccia può trattenere i soluti desiderati mentre lascia passare i composti indesiderati, o viceversa. L'arricchimento di tracce consente la concentrazioni di componenti che erano presenti sotto il limite di rilevabilità. Il frazionamento utilizza un gradiente a stadi per eluire componenti con diversa polarità.

Estrazione in fase solida

L'estrazione in fase solida sfrutta le stesse interazioni presenti nella cromatografia liquida. L'efficienza della separazione è principalmente funzione della velocità di flusso con cui è immesso il grezzo e del rapporto volumetrico tra campione e adsorbente. **Basse velocità di flusso migliorano la separazione ma aumentano i tempi**; velocità elevate possono impedire un sufficiente contatto del prodotto con l'adsorbente.

Le conseguenze di un'eccessiva velocità di caricamento possono essere:

- perdita di risoluzione
- insoddisfacente adsorbimento del prodotto
- basso recupero

Estrazione in fase solida

Come guida generale, cartucce contenenti meno di 300 mg di adsorbente dovrebbero essere caricate ad un flusso di circa 0.2-1.0 mL/min mentre cartucce più grandi possono essere caricate a 2-5 mL/min. Sebbene basse velocità di flusso danno un miglior recupero e selettività, un'eccessiva lentezza può determinare minore resa.

Un rapporto insufficiente tra i volumi del campione e dell'adsorbente può portare a perdita di risoluzione e recupero insoddisfacente. I fattori che determinano il rapporto sono:

- concentrazione dei prodotti
- concentrazione del composto rispetto alle impurezze
- fattore di capacità k' dei prodotti e dei materiali interferenti.

Estrazione in fase solida

Il fattore di capacità k' è una misura di volumi addizionali di fase mobile richiesti nel sistema per fluire un soluto seguendo l'eluizione di un componente non trattenuto e quindi è una misura diretta della ritenzione del soluto stesso. Valori di k' compresi tra 1 e 10 sono utili, mentre valori > 20 si riferiscono ad eluizioni troppo protratte nel tempo

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (\text{espresso in termini di tempo di ritenzione})$$

t_R = tempo di ritenzione del soluto

t_0 = tempo di non adsorbimento

oppure si usa il coefficiente di distribuzione k_d

$$k_d = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (\text{espresso in termini di volume di ritenzione})$$

Estrazione in fase solida

La capacità è in funzione di diversi fattori: **concentrazione** totale di tutti i componenti nel campione, **polarità** del grezzo, **affinità** dei componenti per l'adsorbente. Un eccessivo caricamento può determinare un recupero scarso o variabile. Se la ritenzione del prodotto desiderato è troppo scarsa, la polarità del grezzo può essere troppo alta o l'adsorbente può essere troppo debole. Per esempio, se l'estratto al 50% in metanolo di un brodo di coltura non è sufficientemente trattenuto da una cartuccia in fase inversa C-8, si può ridurre la concentrazione di metanolo (diluendo con acqua od evaporando il metanolo), o si può sostituire l'adsorbente con una fase inversa C-18.

Estrazione in fase solida

Quando si richiede il recupero del 100% dei prodotti, il caricamento del campione grezzo è limitato dal prodotto con il più basso fattore di capacità. Se si richiede il recupero del 100% di un prodotto, il caricamento del campione grezzo continuerà fino alla comparsa di quel prodotto. Aggiustamenti nella composizione del solvente del campione grezzo possono essere usati per aumentare le differenze tra i fattori di capacità dei prodotti e degli interferenti.

Materiali ed attrezzature

Le classi d'adsorbenti generalmente utilizzate nella SPE sono tre: polari, non polari e a scambio ionico.

Se è nota la struttura chimica ed i gruppi funzionali del prodotto desiderato, queste conoscenze possono essere utilizzate per la scelta del tipo d'adsorbente (vedi tabella). La capacità di ritenzione dell'adsorbente è generalmente del 5% del suo peso, % che può ridursi in caso di miscele complesse. Le fig. 4 e 5 mostrano delle tipiche cartucce contenenti l'adsorbente preimpaccato. La quantità d'adsorbente per cartuccia generalmente varia da 50 mg a 10 g. Le colonne più grandi sono utilizzate per maggiori capacità di ritenzione o per grandi volumi di campione.

Table 7
Adsorbent Selection Guide^a

	Adsorbent	Analyte functional groups	Mode	Matrix	Typical solvents
Nonpolar extraction	C18-octadecyl	Strong nonpolar	Hydrophobic groups	Aqueous: Water	Methanol
	C8-octyl	Moderate nonpolar	Aromatic rings	Acetonitrile	
	C2-ethyl	Weak nonpolar	Alkyl chains	Buffers	Ethyl acetate
	CH-cyclohexyl	Weak nonpolar		Biological fluids	Chloroform
	PH-phenyl	Moderate nonpolar			Acidic methanol
	CN-end capped cyanopropyl	Moderate nonpolar Moderate nonpolar/polar			Hexane
Polar extraction	CN-cyanopropyl	Moderate nonpolar/polar	Hydrophilic groups	Nonpolar	Methanol
	2OH-diol	Polar	Hydroxyls	Hexanes	Isopropanol
	Si-silica	Polar	Amines	Oils	Acetone
	NH ₂ -aminopropyl	Polar	Heteroatoms (S, O, N)	Chloroform Lipids	
Cation exchange extraction	SCX-benzenesulfonic acid	Strong cation	Cations:	Aqueous:	Alkaline buffer
	PRS-propylsulfonic acid	Strong cation	Amines	Water	High ionic strength buffer
	CBA-carboxylic acid	Weak cation	Pyrimidines	Acidic buffers Biological fluids	
Anion exchange extraction	SAX-quaternary amine	Strong anion	Anions:	Aqueous:	Acidic buffer
	PSA-primary/secondary amine	Weak anion/polar	Carboxylic acids Sulfonic acids Phosphates	Water Alkaline buffers Biological fluids	High ionic strength buffer
	NH ₂ -aminopropyl	Weak anion/polar			
	DEA-diethylaminopropyl	Weak anion/polar			
Covalent extraction	PBA-phenyl boronic acid	Covalent	Vicinal diols	Aqueous Alkaline buffer Biological fluids	Acidic buffer Acidic methanol

^aData taken from Varian Sample Preparation Products catalog (Harbor City, CA)

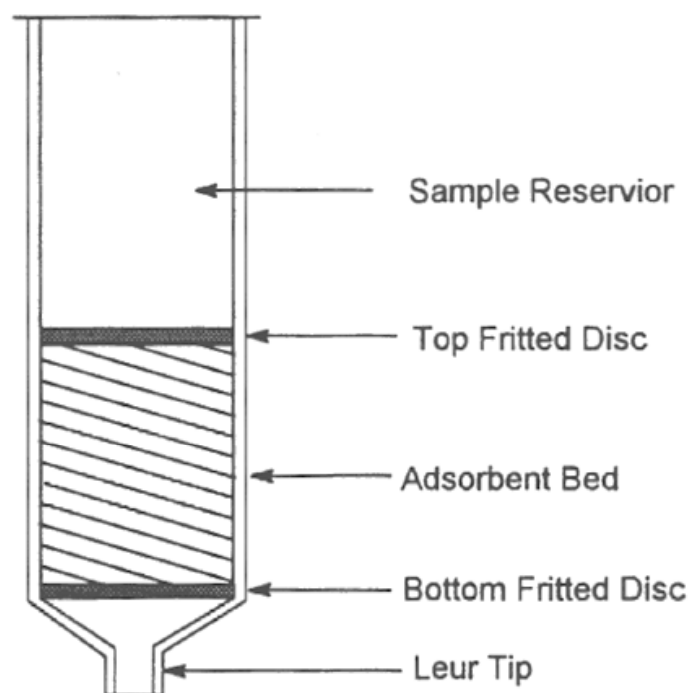


Fig. 4. Typical solid phase extraction cartridge. PRESSURE

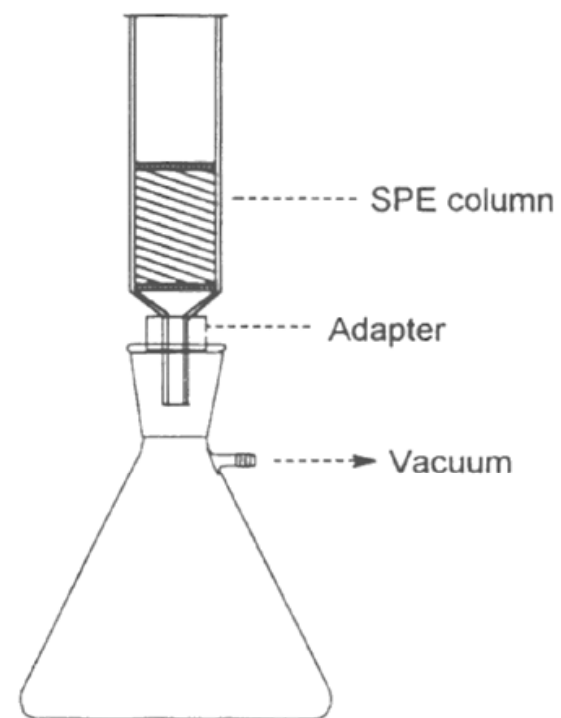
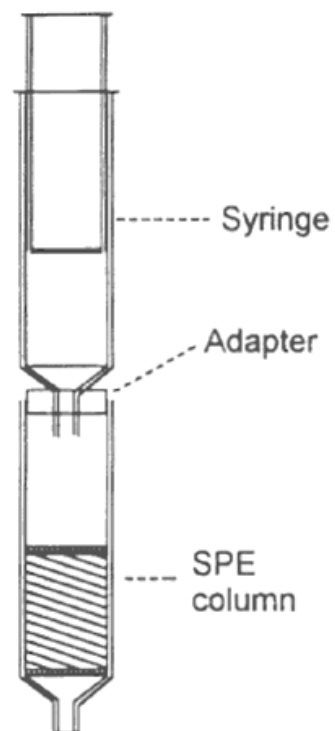


Fig. 5. Typical SPE cartridge setup. VACUUM

Preparazione dell'estratto grezzo

Il metodo di preparazione dell'estratto grezzo prima del caricamento sulla colonna dipenderà dalla compatibilità della colonna e del solvente. Per esempio, se un estratto metanolo acqua deve essere caricato su una colonna di silice o allumina, il campione deve prima essere completamente anidrificato eliminando l'acqua, che è incompatibile con adsorbenti in fase normale, e quindi deve essere risolubilizzato in un solvente non polare come etile acetato, toluene, esano. Se si devono usare adsorbenti in fase inversa, questi invece non sono compatibili con solventi quali il toluene (solubilizza la fase stazionaria), che devono quindi essere preventivamente eliminati.

Preparazione dell'estratto grezzo

Anche se il solvente è compatibile, la preparazione può essere necessaria a seconda che il nostro prodotto debba essere trattenuto dalla colonna o debbano invece essere trattenute le impurezze. Può essere necessario variare la polarità del solvente aggiungendo ad esempio esano, se in fase normale, o acqua, se in fase inversa; o può essere necessario evaporare parzialmente l'estratto. La diluizione ha il vantaggio di richiedere poco tempo e di avere meno probabilità di determinare la precipitazione del prodotto; tuttavia essa aumenta i tempi di caricamento ed inoltre può ridurre la capacità di adsorbimento. La concentrazione sotto vuoto ha il vantaggio di abbreviare i tempi di caricamento e di aumentare la capacità di adsorbimento; i suoi svantaggi sono di richiedere un equipaggiamento extra e del tempo per la concentrazione.

Ogni grosso contaminante che si formi durante la diluizione o la concentrazione dovrebbe essere eliminato con un prefiltro a 20 μm

Precondizionamento della colonna

Prima del caricamento del campione, la cartuccia SPE dovrebbe essere pretrattata con un eluente forte (adsorbenti a fase inversa con 6-10 volumi di *holdup* di acetonitrile o metanolo. Resine a scambio ionico con 6-10 volumi di *holdup* di metanolo; fasi normali non richiedono prelavaggi). Dopo il prelavaggio la cartuccia deve essere equilibrata con 6-10 volumi di *holdup* (un volume di *holdup* è approssimativamente equivalente ad 1 mL per 0.5 g di adsorbente) di eluente di polarità simile a quella della soluzione del campione. La velocità di flusso non è critica in questa fase ed è approssimativamente di 5-10 mL/min. Una volta equilibrata, è importante che la colonnina non vada a secco.

Caricamento del campione

Il campione dovrebbe essere caricato ad una velocità $<$ di 5 mL/min, al fine di ottenere una banda stretta dei prodotti adsorbiti alla sommità della cartuccia. La quantità adsorbita dovrebbe essere appena inferiore alla capacità massima dell'adsorbente (saturazione).

Come regola generale, cartucce contenenti meno di 300 mg di adsorbente dovrebbero essere caricate con 0.2-1.0 mL/min, mentre cartucce con più di 300 mg di adsorbente possono essere caricate a 2-5 ML/min. Tuttavia mentre velocità basse di flusso producono un miglior recupero e selettività, un flusso troppo basso riduce il passaggio del campione e dovrebbe essere evitato. Per misurare l'effetto del flusso si possono eseguire una serie di prove a differenti velocità di flusso.

Lavaggi

Dopo il caricamento, la cartuccia deve essere lavata con almeno un paio di volumi di *holdup* di eluente a polarità simile a quella della soluzione contenente il campione. Raccogliere a parte gli eluati, separatamente dal campione esaurito, per recuperare eventuale prodotto eluito.

Eluizione

Aggiungere l'eluente desiderato alla sommità della cartuccia nello spazio di riserva sopra l'adsorbente. Gocciolare il solvente molto lentamente. **La quantità minima di eluente corrisponde a due volumi di *holdup*.** La quantità e la forza dell'eluente devono essere determinate sperimentalmente e dipende dagli obiettivi della SPE: se lo scopo è semplicemente quello di ottenere una concentrazione della soluzione contenente tutti i prodotti in un piccolo volume, allora si userà un eluente forte (ad esempio metanolo o acetonitrile per fasi inverse). Altrimenti si può già in questa fase ottenere un primo frazionamento utilizzando un gradiente a stadi di eluenti di forza diversa, tipo una colonna cromatografica tradizionale.

Adsorbimento a letto espanso (expanded-bed)

Introduzione: Allo scopo di migliorare gli stadi iniziali di purificazione di prodotti derivanti da una fermentazione, recentemente è stata introdotta una tecnica chiamata “*Expanded-bed Absorption*” (adsorbimento a letto espanso) che consente di eliminare lo stadio di separazione del solido (chiarificazione), aumentando la resa del prodotto ed accorciando i tempi.

Tale tecnica non è concettualmente nuova, in quanto era già stata applicata negli anni '50 per l'isolamento della streptomicina, e successivamente negli anni '70 per la novobiocina. Tali applicazioni, tuttavia, non prevedevano l'uso d'adsorbenti specificamente preparati per questa tecnica e spesso richiedevano attrezzature complesse. La disponibilità in commercio di adsorbenti specifici per EBA ha recentemente rinnovato l'interesse per questa metodica.

Adsorbimento a letto espanso (expanded-bed)

Gli adsorbenti utilizzati nell'EBA consentono contemporaneamente di procedere ad una concentrazione e purificazione del prodotto, mentre **il particolato passa attraverso la colonna senza essere trattenuto**.

La principale diversità dell'EBA rispetto alle colonne convenzionali risiede nel modo in cui l'adsorbente è impaccato. Mentre nella cromatografia convenzionale esso è tenuto rigidamente sul supporto, cosa che, se da una parte aumenta l'efficienza, dall'altra richiede che sia caricato un campione privo di particolato, nell'EBA, poiché c'è nella parte superiore della colonna un certo spazio riempito di eluente, è possibile ottenere un'espansione dell'adsorbente in grado di consentire il passaggio del particolato tra i granuli d'adsorbente; è tuttavia necessario che quest'espansione sia la più uniforme possibile, per prevenire il possibile passaggio del liquido senza contatto con l'adsorbente.

Adsorbimento a letto espanso (expanded-bed)

Background: In una EBA, il liquido che entra dal basso causa il trascinamento dei granuli di adsorbente così che si avrà una espansione del letto non appena si raggiunge la velocità minima d'espansione. Man mano che la velocità del liquido aumenta, il letto si espande ulteriormente con la formazione di (relativamente) grandi spazi vuoti tra i singoli granuli. Se la velocità continua ad aumentare, l'adsorbente raggiungerà l'apice della colonna, e si sarà allora raggiunta la velocità terminale. Essa è determinata dalla lunghezza della colonna e dalle caratteristiche fisiche dell'adsorbente e del liquido. Tanto più denso e viscoso è il brodo, tanto minore è la velocità terminale, mentre tanto più denso e viscoso è l'adsorbente, tanto maggiore è la velocità terminale. Fino a che la velocità è compresa tra la velocità minima e la velocità terminale, l'adsorbente rimarrà in uno stato d'espansione stabile determinato dall'equilibrio tra la forza gravitazionale e la forza di trascinamento.

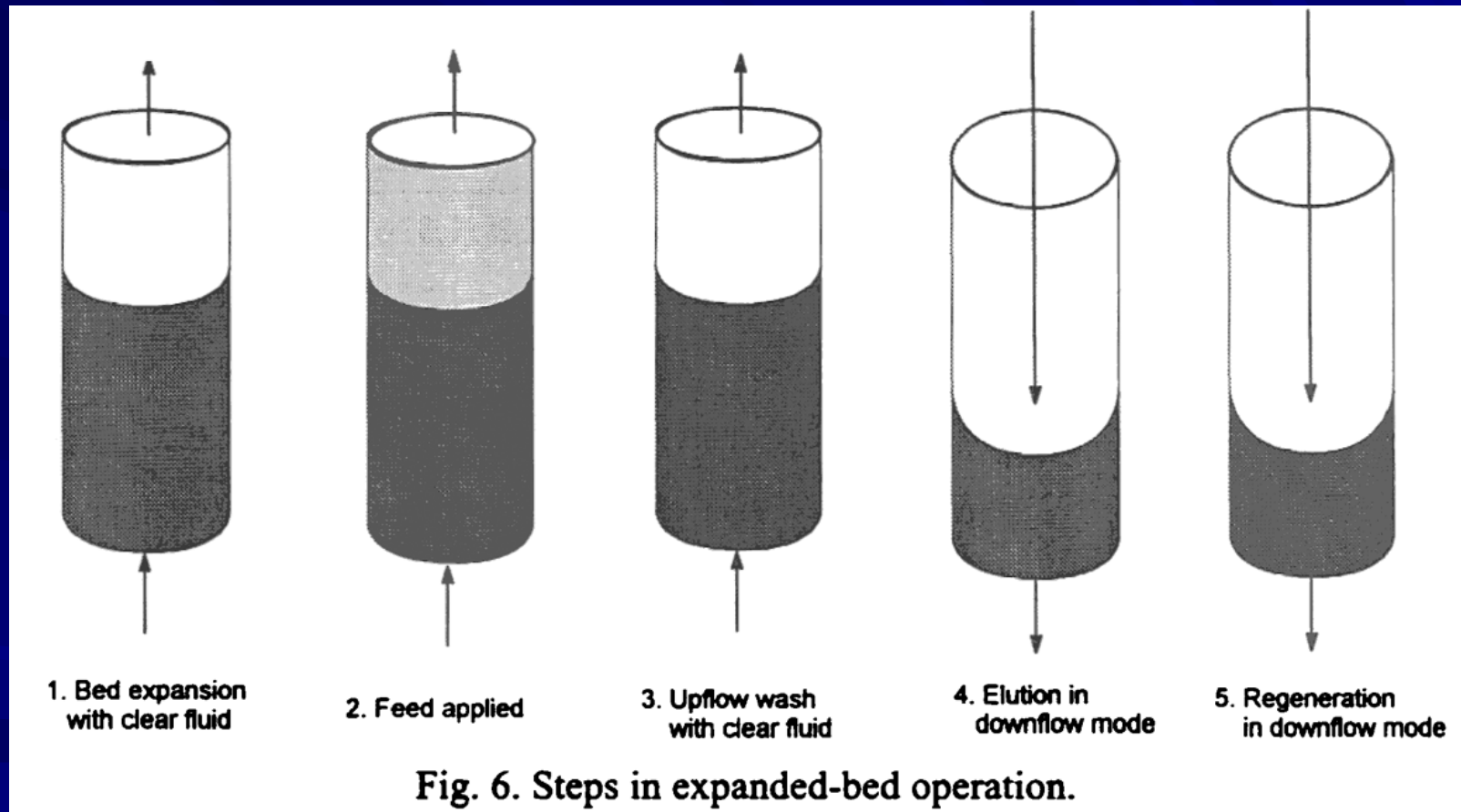
Adsorbimento a letto espanso (expanded-bed)

Se il liquido contiene un particolato, con una velocità terminale inferiore a quell'operativa, esso semplicemente passerà attraverso gli spazi vuoti tra l'adsorbente senza essere trattenuto dalla colonna.

Sebbene ci siano delle variazioni, gran parte delle EBA consiste di cinque stadi di base, come mostrato nella figura seguente.

1. lo strato di adsorbente è convertito in letto espanso usando un liquido privo di particolato
2. il campione (ad es. il brodo) contenente il particolato è caricato sulla colonna fino ad avere la saturazione dell'adsorbente
3. la colonna viene lavata da sotto per rimuovere il materiale particolato ancora rimasto negli spazi vuoti del letto
4. il letto espanso è convertito in letto impaccato o per gravità, o invertendo il flusso ed il prodotto è eluito dall'adsorbente
5. l'adsorbente è ripulito dalle impurezze legate tenacemente e quindi riequilibrato per un nuovo ciclo.

Adsorbimento a letto espanso (expanded-bed)



Adsorbimento a letto espanso (expanded-bed)

Prima degli anni '80 non c'erano adsorbenti specificamente preparati per l'EBA e questo costituiva uno dei principali problemi per utilizzare questa tecnica sia a livello di laboratorio sia industriale. Gli adsorbenti devono possedere la capacità di fluidificare e di legare possibilmente, anche in maniera selettiva, i prodotti. Negli ultimi anni sono stati preparati adsorbenti destinati esclusivamente all'EBA, con particolari caratteristiche di densità, uniformità di dimensioni, etc.

Gran parte delle applicazioni sono state nell'isolamento delle proteine, anche se sono state riportate applicazioni sull'isolamento di molecole relativamente piccole (ad es. immunomycin, con $PM < 900$).

Materiali: solventi ed adsorbenti

Per prodotti non polari, è necessario aggiungere preventivamente al brodo di coltura un solvente miscibile con acqua (tabella 8) allo scopo di solubilizzare il prodotto. E' importante cercare di minimizzare la quantità di solvente allo scopo di non ridurre la capacità dell'adsorbente; questo dipende sia dalla diminuzione dell'isoterma d'adsorbimento (aumento del potere eliotropo), dovuta al solvente, sia dalla diminuzione della concentrazione del prodotto nel solvente; tale diminuzione, se si opera in un intervallo lineare dell'isoterma d'adsorbimento, porta ad una proporzionale diminuzione della capacità della resina. D'altra parte, l'aggiunta di un solvente conduce ad una diminuzione della densità e viscosità del brodo, che si traduce in una maggiore velocità terminale dell'adsorbente che, a sua volta, determina una riduzione del tempo d'adsorbimento. Il solvente non ha influenza sulla differenza relativa tra la velocità terminale dell'adsorbente e del particolato.

Materiali: solventi ed adsorbenti

Table 8
Common Water-Miscible Solvent for Solubilizing Nonpolar Compounds (35)

Solvent	UV ^a cutoff	B.P., °C	Density, g/cc	Refractive index	Viscosity, cP
Methanol	205	64.5	0.786	1.326	0.551
Acetonitrile	190	81.6	0.776	1.342	0.341
Acetone	330	56.1	0.784	1.356	0.303
Ethanol	210	78.3	0.785	1.359	1.08
2-propanol	205	82.2	0.781	1.375	2.04
1-propanol	240	97.2	0.799	1.384	1.94
Tetrahydrofuran	212	65.9	0.888	1.405	0.460
2-Methyl-2-Propanol (<i>t</i> -Butanol)		82.3	0.781	1.385	4.438

^aApproximate wavelength below which solvent has low UV absorbance (36).

Materiali: solventi ed adsorbenti

Una lista parziale d'adsorbenti disponibili in commercio è data dalla tabella 9.

La Sepabeads fu introdotta in commercio nella metà degli anni '80 ed è stata preparata con una densità di circa 1.2 g/mL, ottenuta attraverso la bromurazione della base polimerica stirene-divinilbenzene. La bromurazione, oltre ad aumentare la densità, aumenta anche la lipofilicità della resina rispetto al polimero puro.

La Streamline, adsorbente per proteine, anche ha una densità di 1.2 g/mL, ottenuta mediante inclusione di un nocciolo di materiale inerte nella matrice.

Adsorbents for Expanded Bed Adsorption^a

Property	Streamline SP	Streamline DEAE
Type of ion exchanger	Strong cation	Weak anion
Functional group	Sulfopropyl (SP) -O-CH ₂ CHOHCH ₂ O(CH ₂) ₃ SO ₃	Diethylaminoethyl, DEAE -O-CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ H
Ionic capacity per milliter adsorbent	0.17–0.24 mmol/mL	0.13–0.21 mmol/mL
Matrix structure	Macroporous, crosslinked agarose, 6% containing a crystalline quartz core	Macroporous, crosslinked agarose, 6% containing a crystalline quartz core
Mean particle size (range)	200 μm (100–300 μm)	200 μm (100–300 mm)
Particle density	Approx 1.2 g/mL	Approx 1.2 g/mL
Degree of expansion at 300 cm/h	2–3	2–3
Binding capacity, mg/mL adsorbent	Approx 70 mg Lysozyme	Approx 55 mg BSA

Property	Sepabead SP205	Sepabead SP206	Sepabead SP207
Surface area (m ² /g dry)	507	556	627
Pore volume (mL/g)	1.04	0.94	0.79
Pore size diameter (angstroms)	Broad	200–800	100–300
Particle density (g/mL)	1.17	1.19	1.18
Particle size range (μm)	250/4500	250/600	250/600
Adsorption capacity			
Cephalosporin-C	91	101	118
α-Lactalbumin (mw 14000)	30	30	19
Albumin (mw 66000)	30	26	5
γ-Globulin (mw120000)	25	15	2

^aData for Streamline obtained from Pharmacia Biotech '95 product catalog (Piscataway). Data for Sepabeads obtained from Mitsubishi Kasei Catalogs (Tokyo, Japan).

Adsorbimento a letto espanso (expanded-bed)

Attrezzatura. Colonna, collettore di frazioni, pompa peristaltica connessa con tubi flessibili, ed, eventualmente, rivelatore.

Una differenza rispetto alla cromatografia convenzionale è la lunghezza della colonna: in genere, una colonna per laboratori ha un diametro di 2-5 cm per una lunghezza di 50-100 cm; poiché non c'è una caduta apprezzabile di pressione, non c'è un reale limite alla lunghezza della colonna.

Molto importanti sono l'estremità della colonna (figura 8). Il basso (ingresso del brodo) deve consentire il libero passaggio del particolato, che deve essere distribuito uniformemente su tutta la sezione della colonna, e nello stesso tempo, deve trattenere la resina quando s'interrompe il flusso o quando questo è invertito (si usa un reticolo con aperture di 200-600 μm).

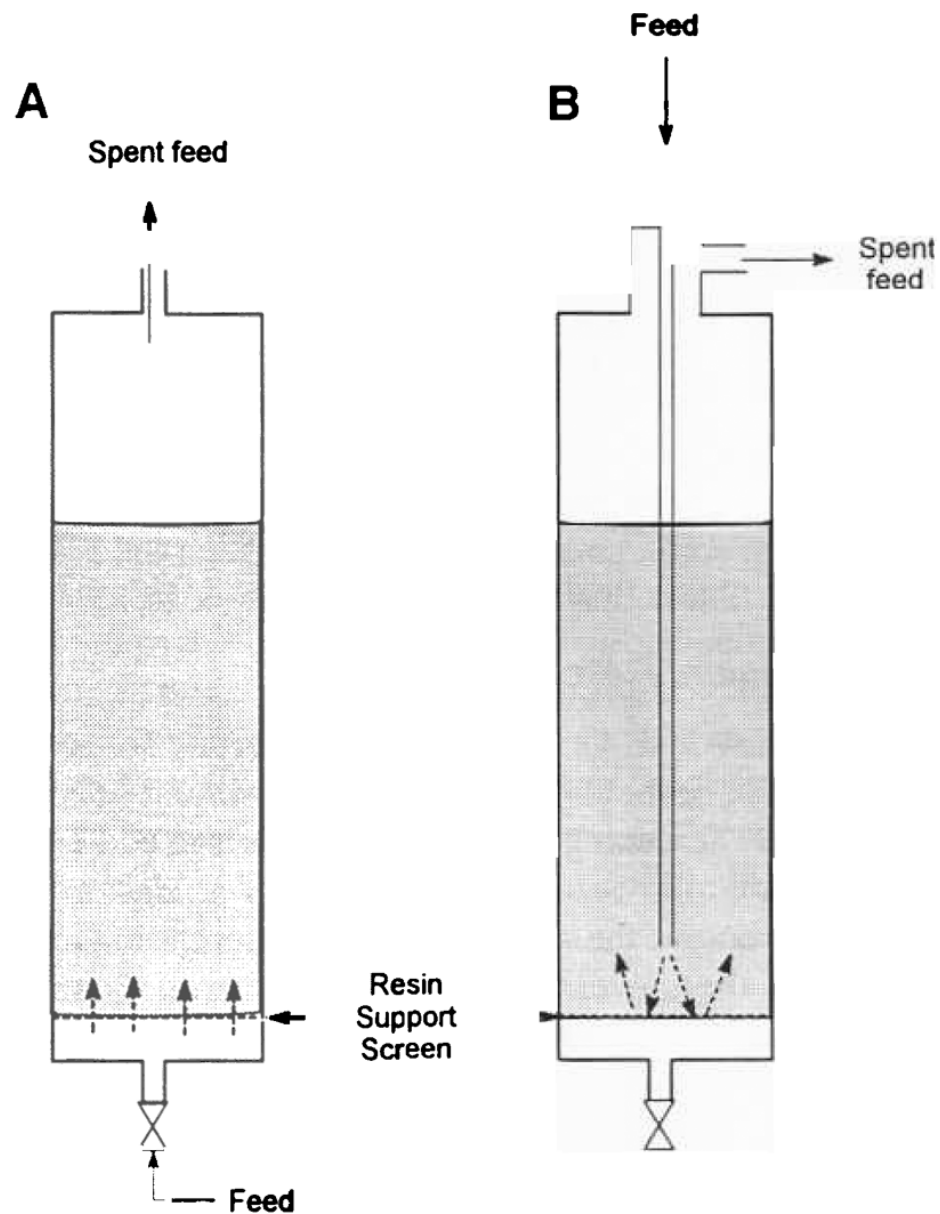


Fig. 8. Expanded-bed feed arrangements. (A) Feed passes through adsorbent support. (B) Feed enters above adsorbent support screen.

Adsorbimento a letto espanso (expanded-bed)

La parte superiore (uscita effluente) dovrebbe essere mobile così da poter essere alzata, durante la fase di caricamento, appena sopra il letto espanso e quindi riabbassata durante la fase di eluizione. Da questa parte non c'è bisogno di un reticolo. Nel dis. A, è necessario che il brodo sia filtrato per eliminare il particolato che non passerebbe nel reticolo. Nel dis. B, il brodo è introdotto dall'alto e quindi deflesso dalla base; un vantaggio è che in questo caso non c'è la possibilità d'ostruzione del reticolo (che non c'è).

Metodica

Preparazione del brodo. Una caratteristica preliminare è che il particolato debba avere una velocità terminale più bassa rispetto a quella dell'adsorbente.

Mentre alcuni brodi di fermentazione possono essere utilizzati come tali, altri richiedono opportuni aggiustamenti.

Alcuni brodi possono formare miceli filamentosi od aggregati che potrebbero bloccare il reticolo od avere una velocità limite troppo elevata, così da accumularsi alla base della colonna. In questi casi si può passare preventivamente il brodo su un colino prima di immetterlo nella colonna. Se il p.a. è intracellulare, il filtraggio dovrebbe essere condotto solo dopo aver aggiunto un adatto solvente estraente. Un'alternativa è quella di omogeneizzare il brodo.

Se il brodo è troppo viscoso, così che la velocità terminale dell'assorbente può essere troppo bassa e richiedere tempi inaccettabilmente lunghi, esso può essere diluito o, se il p.a. è termostabile, si può ricorrere ad un aumento della temperatura.

Alcuni brodi possono contenere troppa biomassa così da intasare la colonna; in questi casi si può diluire o trattare il brodo a porzioni.

Metodica

Formazione del letto espanso. Prima di introdurre il flusso contenente il brodo, bisogna convertire il letto impaccato in un letto espanso. Questo è effettuato pompando del liquido privo di particolato nella colonna ed aumentando gradualmente il flusso fino a quando il letto si è espanso di 1.5-3 volte il suo volume iniziale e la sua altezza si sono stabilizzate. Questo liquido può essere acqua o una soluzione acqua-solvente nella stessa proporzione presente nel brodo.

Bisogna assolutamente evitare di introdurre aria che potrebbe formare delle bolle nel letto e spingere l'adsorbente verso l'alto.

Metodica

Adsorbimento del prodotto. Una volta stabilizzato il letto espanso, si può pompare all'interno della colonna direttamente il brodo con il particolato, eventualmente addizionato di solvente. Poiché le proprietà fisiche del brodo (densità, temperatura, viscosità) sono probabilmente differenti da quelle del liquido utilizzato per l'equilibratura, spesso è necessario un aggiustamento della velocità di flusso onde mantenere lo stesso livello di espansione. Tipici valori di velocità di flusso attraverso la colonna, sono di 3-10 volumi d'adsorbente l'ora. Quando tutto il brodo è stato caricato, si raccoglie l'eluato mediante un frazionatore e si analizzano le singole frazioni per l'eventuale uscita del prodotto. In genere si continua a pompare il brodo nella colonna fino a quando la concentrazione di prodotto nell'eluato raggiunge un determinato rapporto con la concentrazione nel brodo.

Metodica

Lavaggi. I lavaggi dopo lo stadio di adsorbimento servono innanzitutto ad eliminare i residui di brodo contenente il particolato dalla colonna e secondariamente le impurezze debolmente legate. Lo stadio iniziale di lavaggio deve essere fatto nello stato di letto espanso. Le proprietà fisiche del solvente di lavaggio devono essere scelte in modo da evitare perdita di prodotto e lunghi tempi di lavaggio. Dopo aver rimosso il particolato, si possono continuare i lavaggi per rimuovere le impurezze adsorbite ed ogni residuo della fase liquida del brodo. Quest'operazione può essere effettuata sia con letto espanso o impaccato; in questo secondo caso, s'interrompe il flusso del solvente, si attende che l'adsorbente si depositi per gravità, eventualmente si abbassa la parte superiore della colonna fino al livello del letto ed infine s'immette l'eluente. Uno dei vantaggi è che il flusso di questo non è determinato dalla necessità di fluidificare il letto. Inoltre si ha una riduzione del volume del letto e quindi la necessità di volumi minori.

Metodica

Eluizione e pulizia. Quest'ultimo stadio viene sempre effettuato con il letto impaccato. La scelta del protocollo d'eluizione è effettuata seguendo i criteri generali cromatografici. Dopo l'eluizione del prodotto è necessario provvedere ad una pulizia della colonna utilizzando opportuni eluenti.

Conclusioni. Sebbene la EBA sia ancora agli stadi preliminari di sviluppo (o rinascita), essa si può già considerare una promessa per il diretto isolamento di prodotti dal brodo di fermentazione non chiarificato. In un singolo stadio, piuttosto semplice, il prodotto è concentrato, purificato e chiarificato senza la necessità di centrifughe o filtri. Tali metodologie potranno ulteriormente svilupparsi quando saranno disponibili in commercio altre resine opportunamente realizzate.