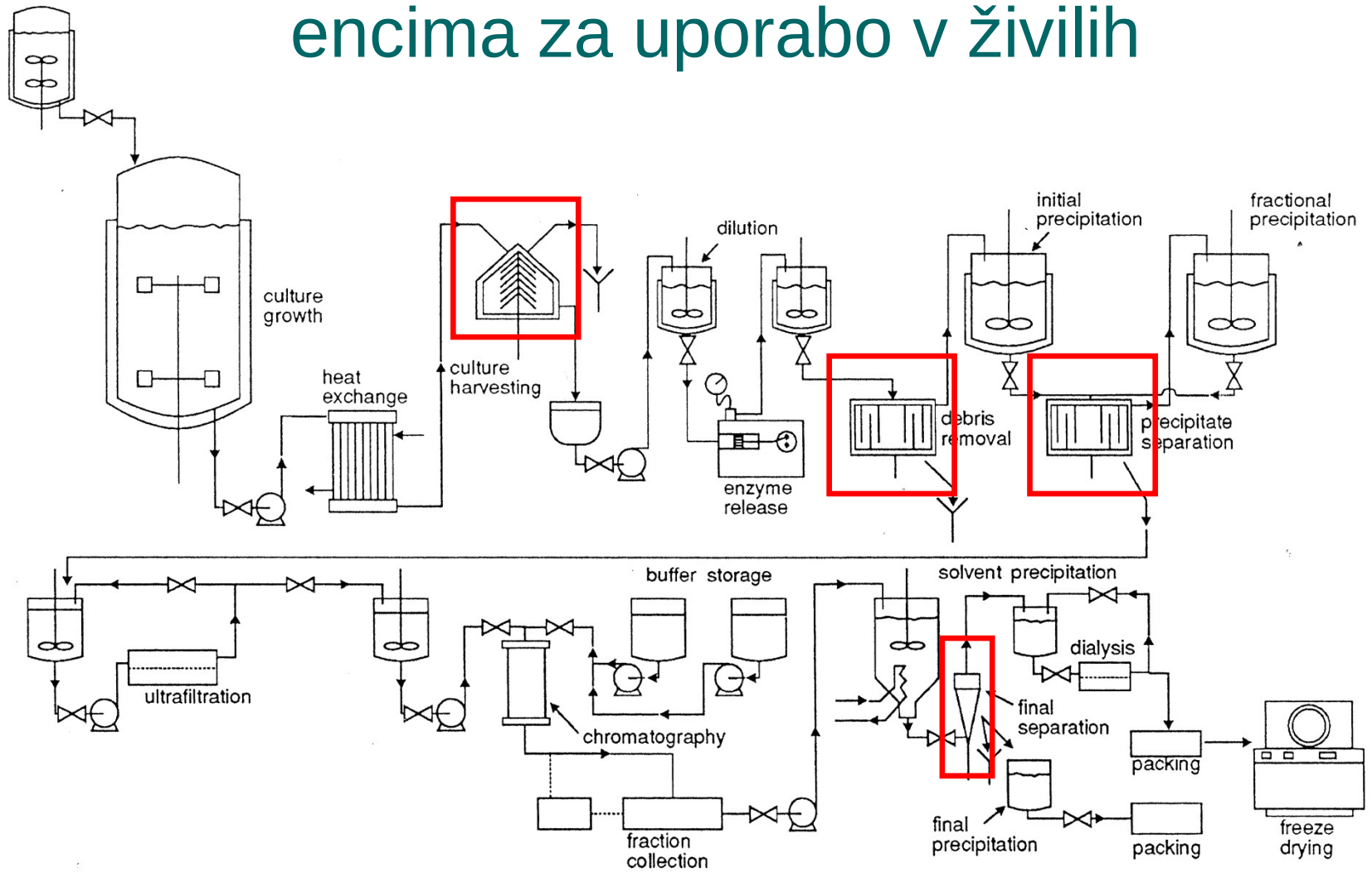


ZAKLJUČNI PROCESI V BIOTEHNOLOGIJI

Ločevanje trdno - kapljevina

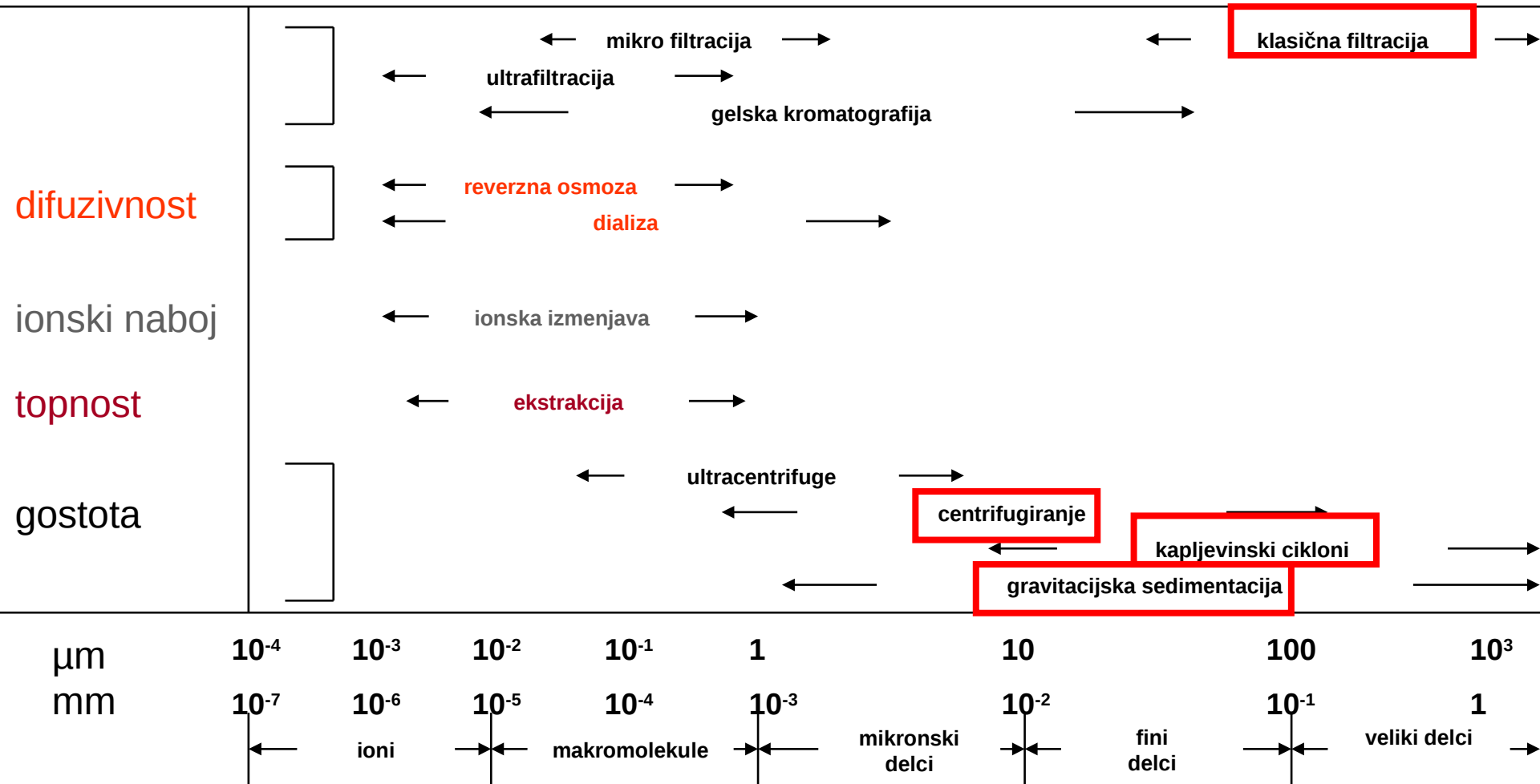
Izolacija in čiščenje intracelularnega encima za uporabo v živilih



Ločevanje trdno - kapljevina

- običajno prva stopnja separacije v biotehnoloških procesih (uporablja se tudi pri koncentriranju in/ali čiščenju produkta)
- mehanske separacijske metode za ločevanje heterogenih zmesi
- osnova ločevanja: razlika v fizikalno-kemijskih lastnostih suspendiranih delcev in/ali kapljev in – razlika v velikosti, obliki, gostoti
- princip ločevanja:
 - zadrževanje delcev na poroznem sredstvu – sito, filtrirno sredstvo
 - razlika hitrosti sedimentacije delcev, ki se prenašajo z gibanjem kapljevine (delovanje gravitacijske in/ali centrifugalne sile)

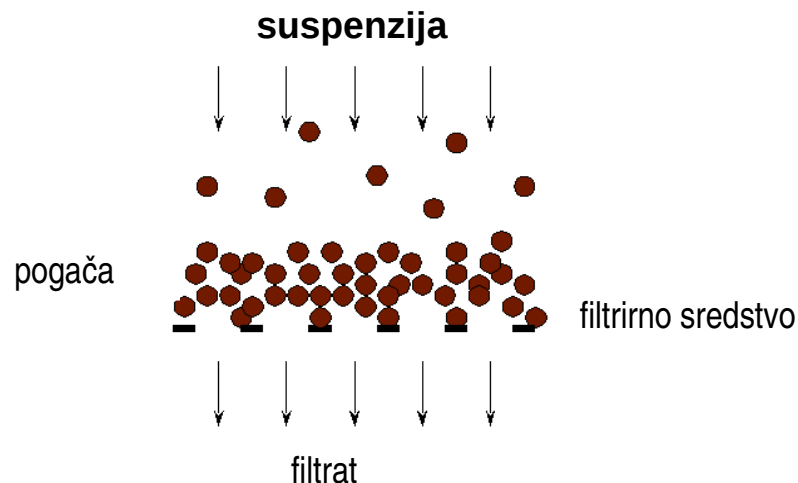
Ločevanje glede na lastnosti snovi



Ločevanje trdno-kapljevina

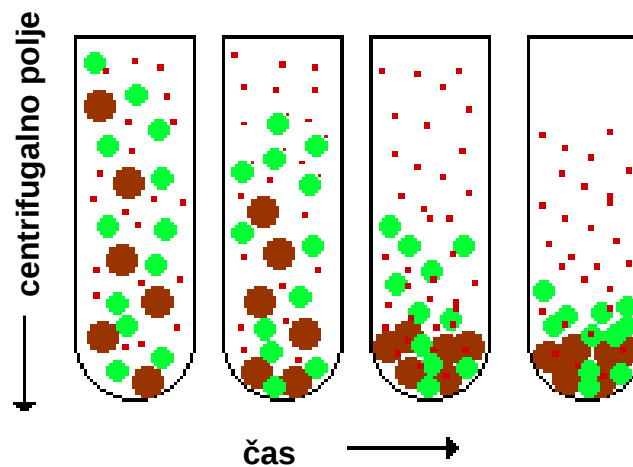
Filtracija

zadrževanje delcev na poroznem sredstvu, ki zadržuje eno komponento in prepušča drugo



Sedimentacija in centrifugiranje

izkoriščanje različne hitrosti sedimentacije delcev, ki se gibljejo s kapljevino



Filtracija

Ločevanje suspenzije trdno-kapljevina v dve fazi:

- koncentrat (filtracijska pogača)
- filtrat, v katerem so majhne molekule

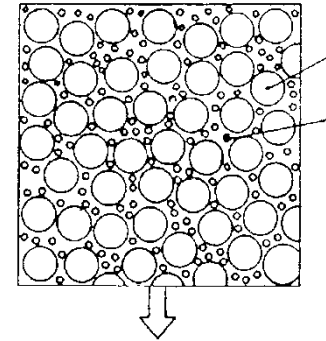
Sila, ki poganja proces, lahko posledica:

- razlike pritiskov (Δp) na osnovi:
 - nadtlaka suspenzije
 - vakuuma pod filtrirnim sredstvom
- gravitacije
- centrifugalnega polja

Filtracija

Načini filtracije:

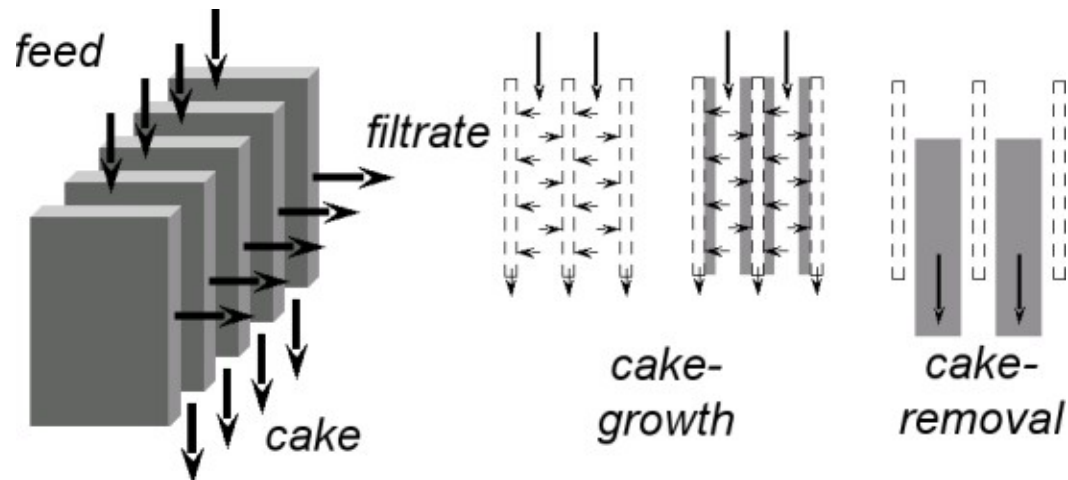
1. globinska (deep bed)
 - delci se nabirajo **v** filtrirnem sredstvu
 - c pod 0,1% (v/v), po grobi filtraciji
2. skozi filtracijsko pogačo (cake filtration)
 - delci se nabirajo **na** filtrirnem sredstvu
 - c nad 3% (v/v)
3. obtočna oz. tangencialna (cross flow)
 - filtracijska gošča teče **ob** filtrirnem sredstvu
 - $0,1\% < c < 3\%$ (v/v)



izbor odvisen od koncentracije trdnih delcev

Filtracija skozi filtracijsko pogačo

- celice same delujejo kot filtrirno sredstvo:
- učinkovitost filtracije določena s karakteristikami pogače

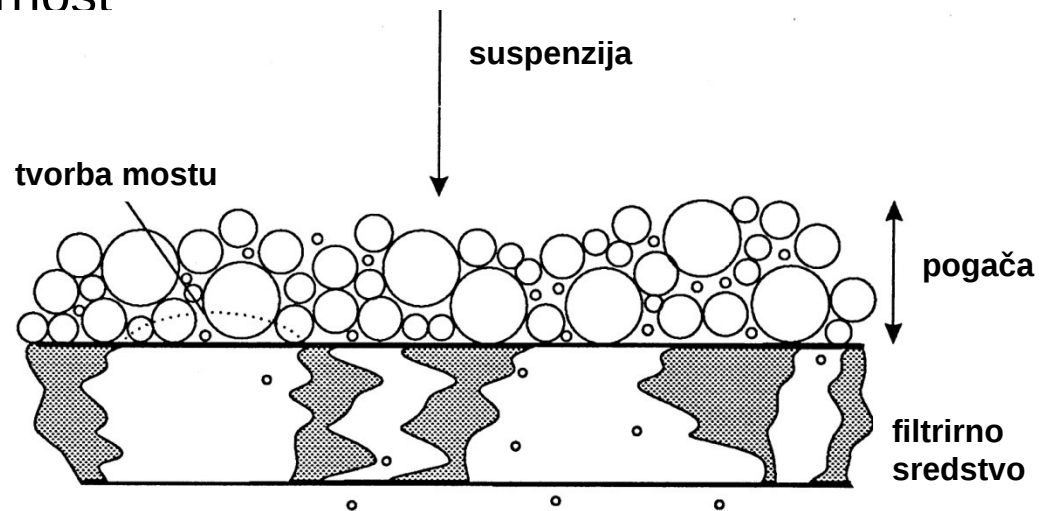


Filtracija – filtrirno sredstvo

- velikost por : 3-7 krat večje od velikosti suspendiranih delcev, tvorba mostu
- ključni parametri izbora filtrirnega sredstva:
 - postopek čiščenja/mehanizem zamašitve
 - kemijska odpornost
 - mehanska odpornost
 - trajnost

- materiali :

- kovine,
- plastika,
- keramika
- tkanine (naravni in umetni materiali)



Filtracijske naprave

- Šaržni procesi:

filtracijska stiskalnica
(filter press)



- Kontinuirni procesi:

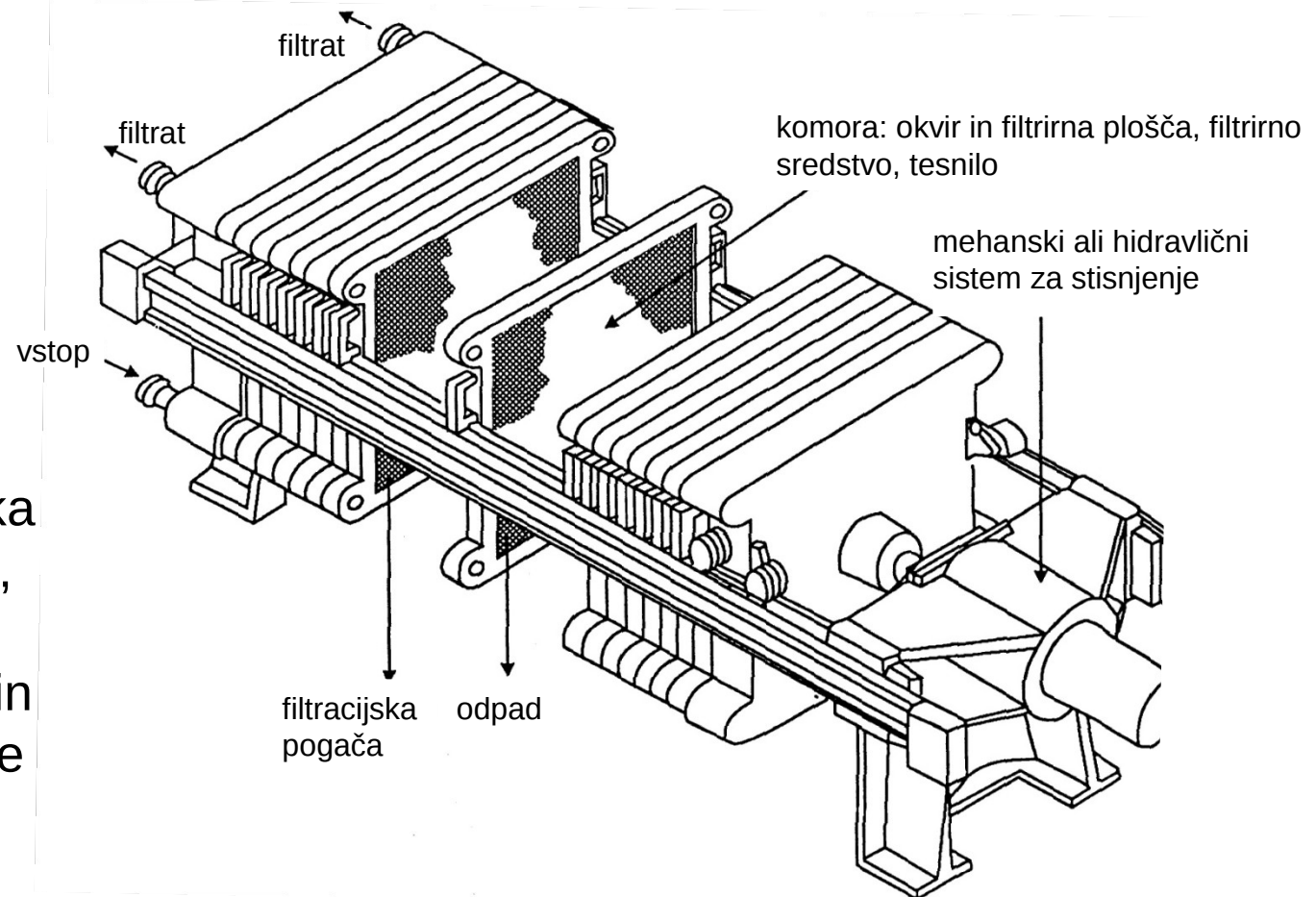


rotacijski vakuumski filter (rotating drum vacuum filter)



tračni vakuumski filter
(belt filter)

Industrijska filtracija – filtracijska stiskalnica

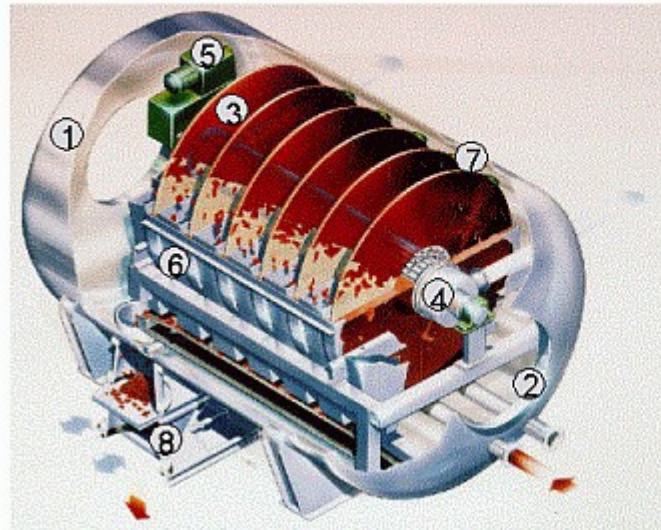


prednosti:
kompaktnost, velika
efektivna površina,
prilagodljivost,
enostavno pranje in
izpihovanje pogače

Industrijska filtracija – vakuumski filter

vakuumski filtri z rotirajočim bobnom

- notranja sesalna komora razdeljena na več prekatov
- celotna notranjost bobna vakuumaska sesalna komora

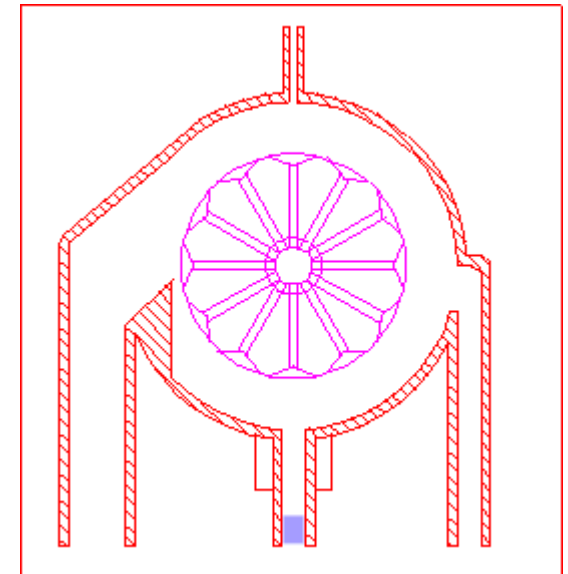
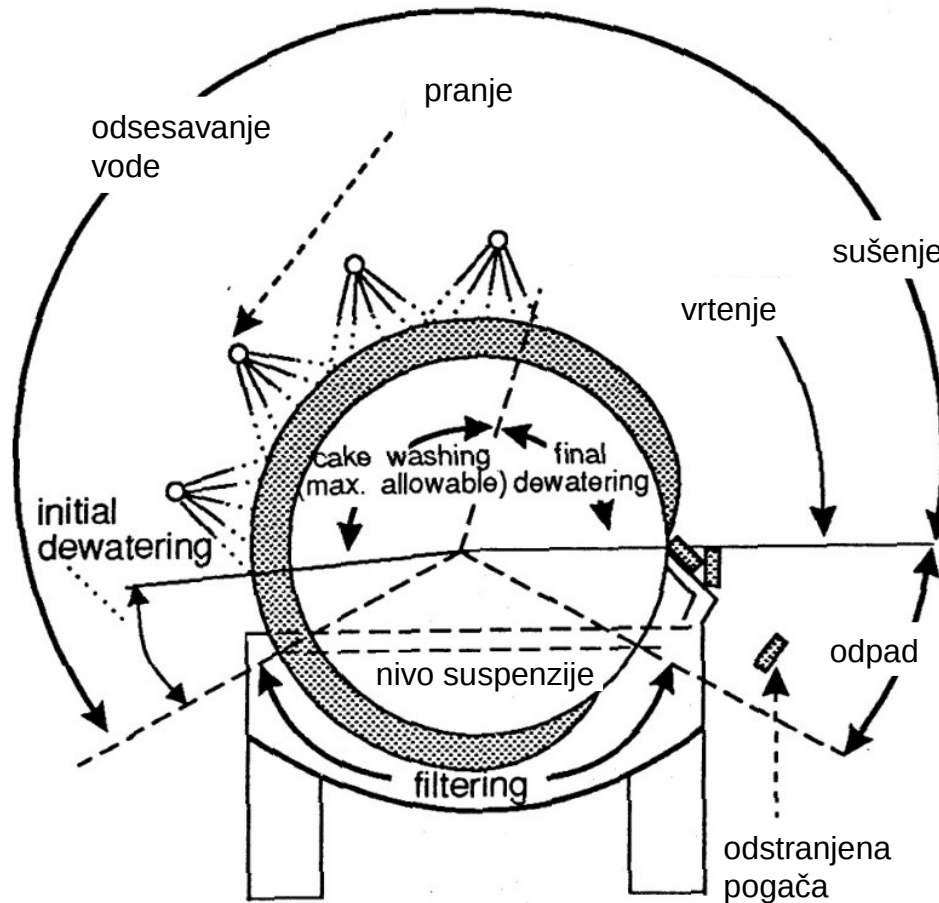


- 1 - Pressure Vessel
- 2 - Manhole
- 3 - Filterdisk
- 4 - Control head
- 5 - Filter drive
- 6 - Filter trough
- 7 - Agitators
- 8 - Discharger

na osnovno filtrirno tkanino pogosto nanese sloj pomožnega filtrirnega sredstva (perlit, celit – inertni materiali)
površina filtrne tkanine: 2 - 80 m²

Industrijska filtracija – vakuumski filter

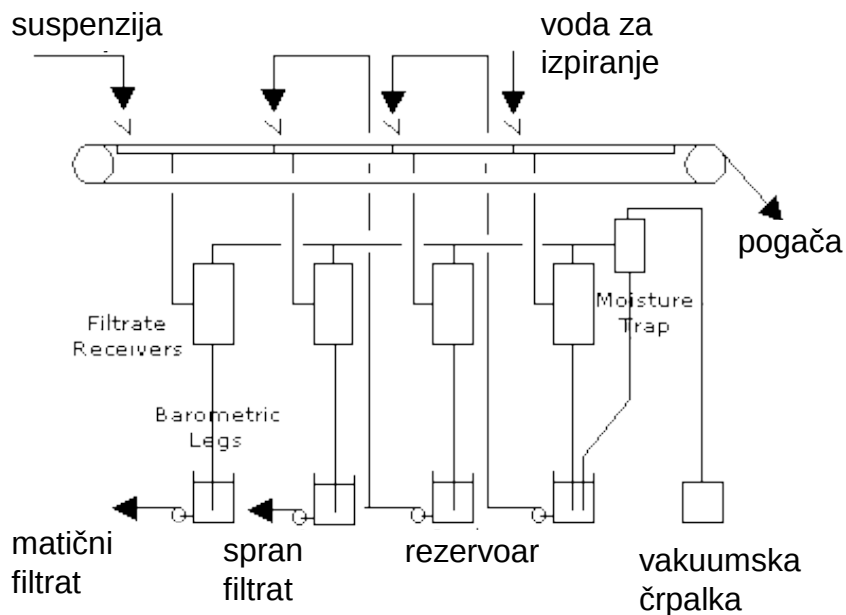
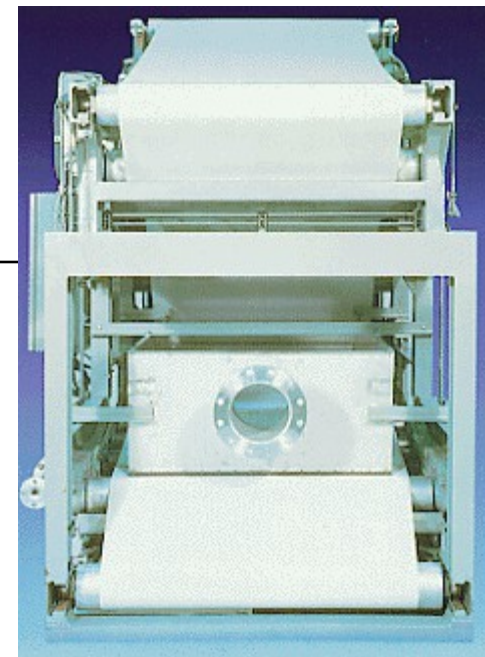
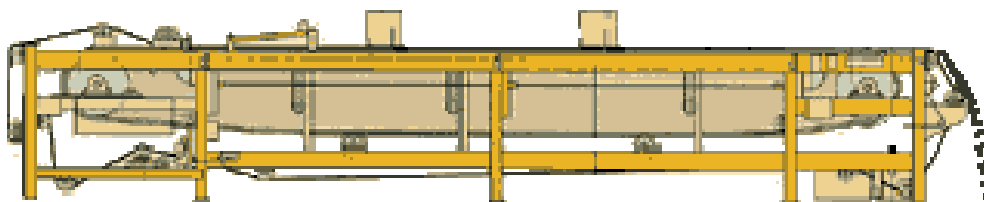
delovanje vakuumskega filtra



hitrost vrtenja bobna:
0,3 do 3 min⁻¹

Tračni filter

horizontalni brezkončni trak



ceneni, enostavni za
upravljanje

uporaba: filtracija mulja v bioloških
čistilnih napravah

Teorija filtracije na osnovi Δp

- tok kapljevine skozi strnjen sloj delcev – predpostavka laminarnega toka kapljevine skozi kapilare
- za filtracijsko pogačo in filtrirno sredstvo velja:

$$\Delta p = \frac{\eta(R_C + R_M) \cdot \Phi_f}{A}$$

$$\Phi_f = \frac{dV_f}{dt}$$

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p \cdot A}{\eta \cdot (R_C + R_M)}$$

$$m_C = w \cdot A = C \cdot V_f$$

$$R_C = \alpha \cdot w = \alpha \cdot \frac{C \cdot V_f}{A}$$

$$\frac{dt}{dV} = \frac{\eta \cdot \alpha \cdot C \cdot V_f}{\Delta p \cdot A^2} + \frac{\eta \cdot R_M}{\Delta p \cdot A}$$

η - dinamična viskoznost (Pa s, Ns/m²)

R_C – upor pogače (m⁻¹)

R_M – upor filtrirnega sredstva (m⁻¹)

ϕ_f - volumenski pretok filtrata (m³/s)

A – površina (m²)

V_f - prostornina filtrata (m³)

V_C - prostornina pogače (m³)

α – specifični faktor upornosti pogače (m/kg)

m_C – masa pogače (kg)

w – masa pogače na enoto površine (kg/m²)

C – koncentracija suspenzije (kg/m³)

nestisljiva
pogača:

Teorija filtracije na osnovi Δp

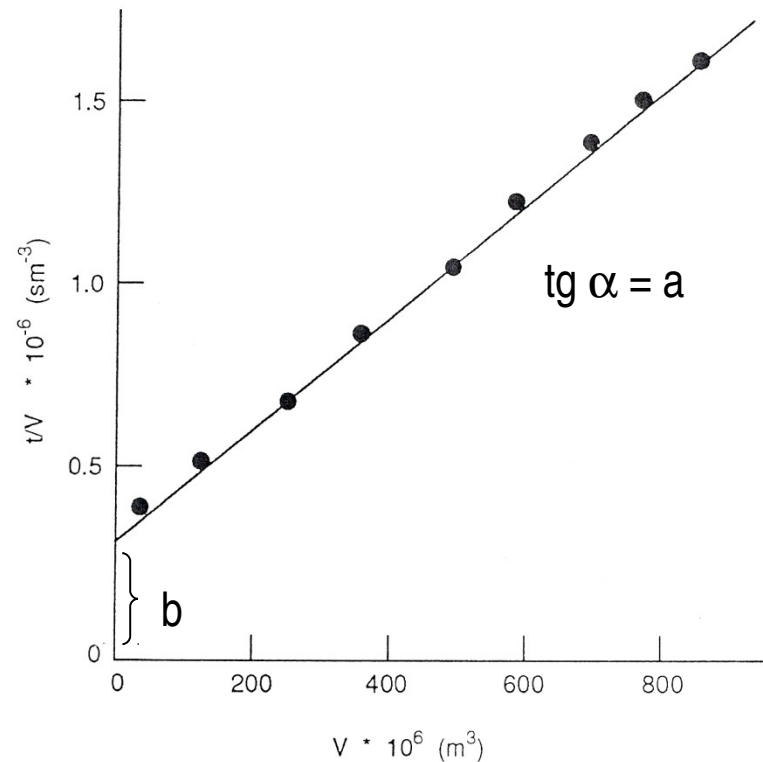
$$\frac{dt}{dV_f} = \frac{\eta \cdot \alpha \cdot C \cdot V_f}{\Delta p \cdot A^2} + \frac{\eta \cdot R_M}{\Delta p \cdot A}$$

konstantni Δp :

$$\int_0^t dt = \frac{\eta \cdot \alpha \cdot C}{\Delta p \cdot A^2} \int_0^{V_f} V_f dV_f + \frac{\eta \cdot R_M}{\Delta p \cdot A} \int_0^{V_f} dV_f$$

$$t = \frac{\eta \cdot \alpha \cdot C}{\Delta p \cdot 2 \cdot A^2} \cdot V_f^2 + \frac{\eta \cdot R_M}{\Delta p \cdot A} \cdot V_f$$

$$\frac{t}{V_f} = a \cdot V_f + b$$



$$a = \frac{\eta \cdot \alpha \cdot C}{\Delta p \cdot A^2}$$

$$b = \frac{\eta \cdot R_M}{\Delta p \cdot A}$$

Vplivi na filtracijo

Vpliv na specifični upor pogače (določen eksperimentalno):

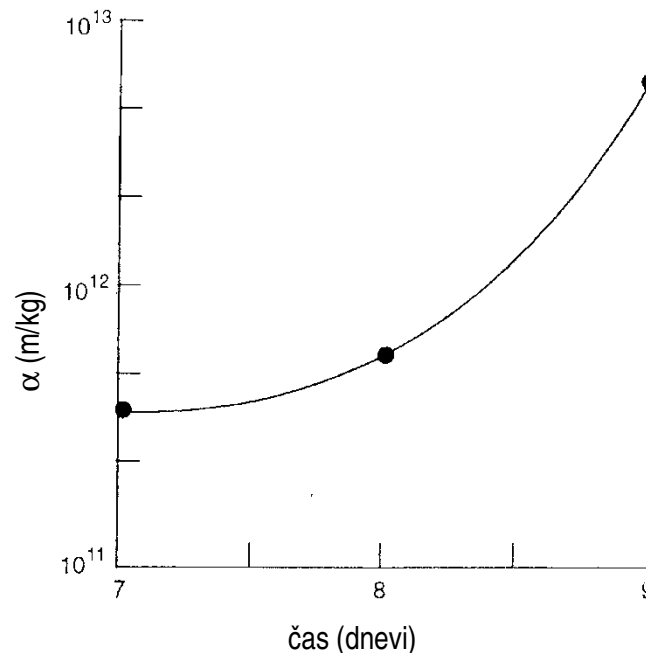
- vrsta mikroorganizma
- velikost/porazdelitev suspendiranih delcev
- pH fermentacijske brozge
- temperatura suspenzije/fermentacijske brozge

vpliv časa fermentacije z glivo
Penicillium chrysogenum na
specifični upor pogače (α)

tipične vrednosti:

$$10^{12} < \alpha < 10^{15} \text{ (m/kg)}$$

$$10^8 < R_M < 10^{11} \text{ (m}^{-1}\text{)}$$



Vplivi na filtracijo

Predobdelava brozge, če je upor pogače previsok ($\alpha > 10^{14}$)

- dodajanje pomožnega filtrirnega sredstva (bodyfeed)

material: nestisljivi delci visoke

prepustnosti, inertni

perlit, diatomejska zemlja,

neaktiven ogljik);

običajni dodatek k brozgi:

0,5 - 5 % (ut.)

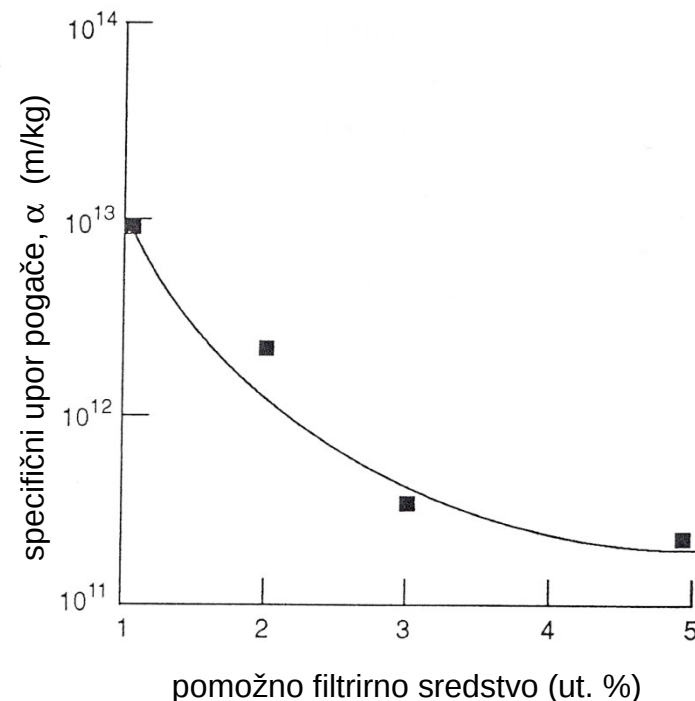
- dodajanje flokulantov

- elektroliti: $Al_2(SO_4)_3$

- polielektroliti (poliamini, poliakrili)

običajni dodatek k brozgi:

0,1 - 2 % (ut.)



vpliv dodatka (Radiolite) na specifični upor pogače (α) pri filtraciji *Streptomyces griseus*

Vpliv predobdelave reakcijske zmesi na bioseparacijo

-dodatek flokulantov (npr. polielektrolitov): lažje centrifugiranje

-dodatek inertnih delcev (npr. diatomejska zemlja, perlit, visoko porozni aluminijevi silikati): lažja filtracija

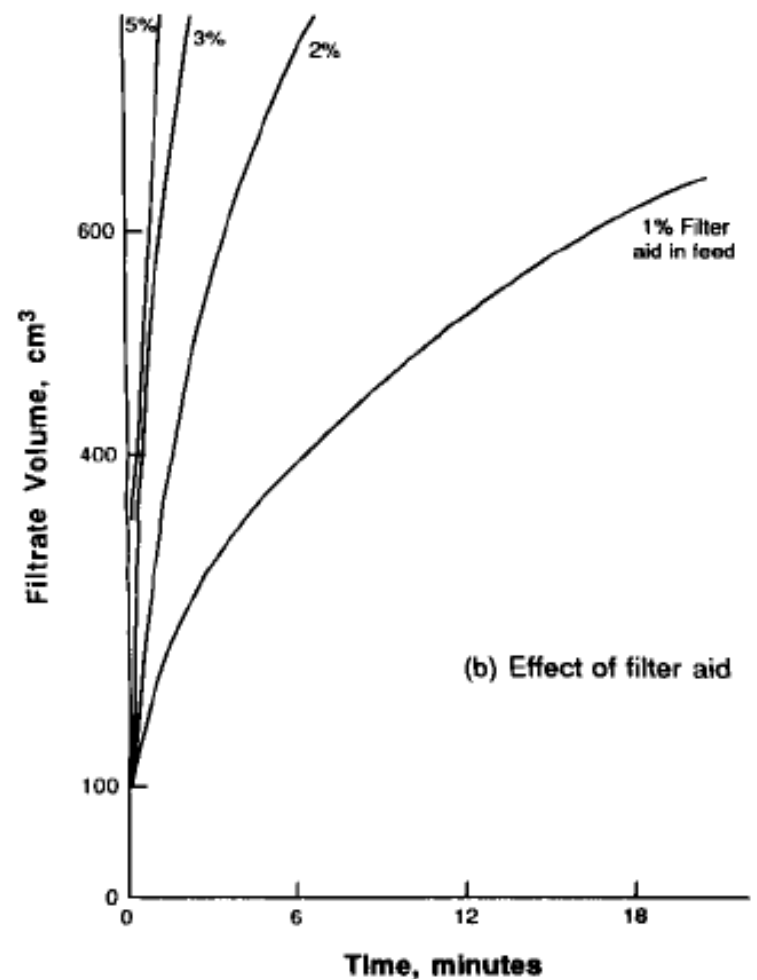
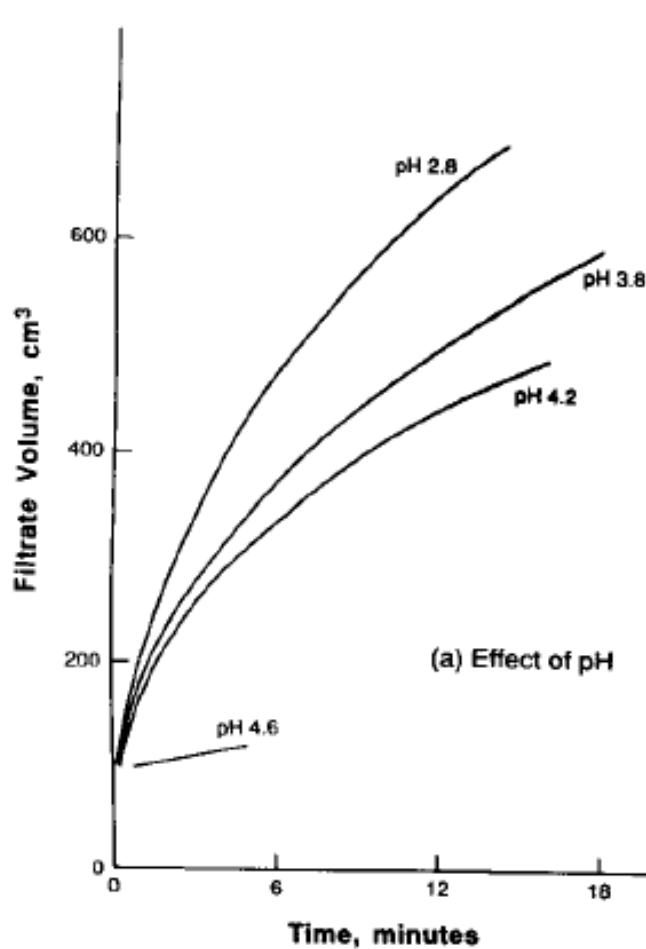
-toplotna obdelava: znižanje viskoznosti

-sprememba pH

Primer: *Actinobacter calcoaceticus* in *Streptomyces griseus*

dodatek kisline	toplotna obdelava	pH	T (°C)	hitrost filtracije (ml/min)
-	-	7,0	25	0,53
+	-	3,5	25	2,22
-	+	7,0	85	0,16
+	+	3,5	85	10,00

Vpliv predobdelave reakcijske zmesi na ločevanje (filtracijo)



Filtracija skozi pogačo: scale-up

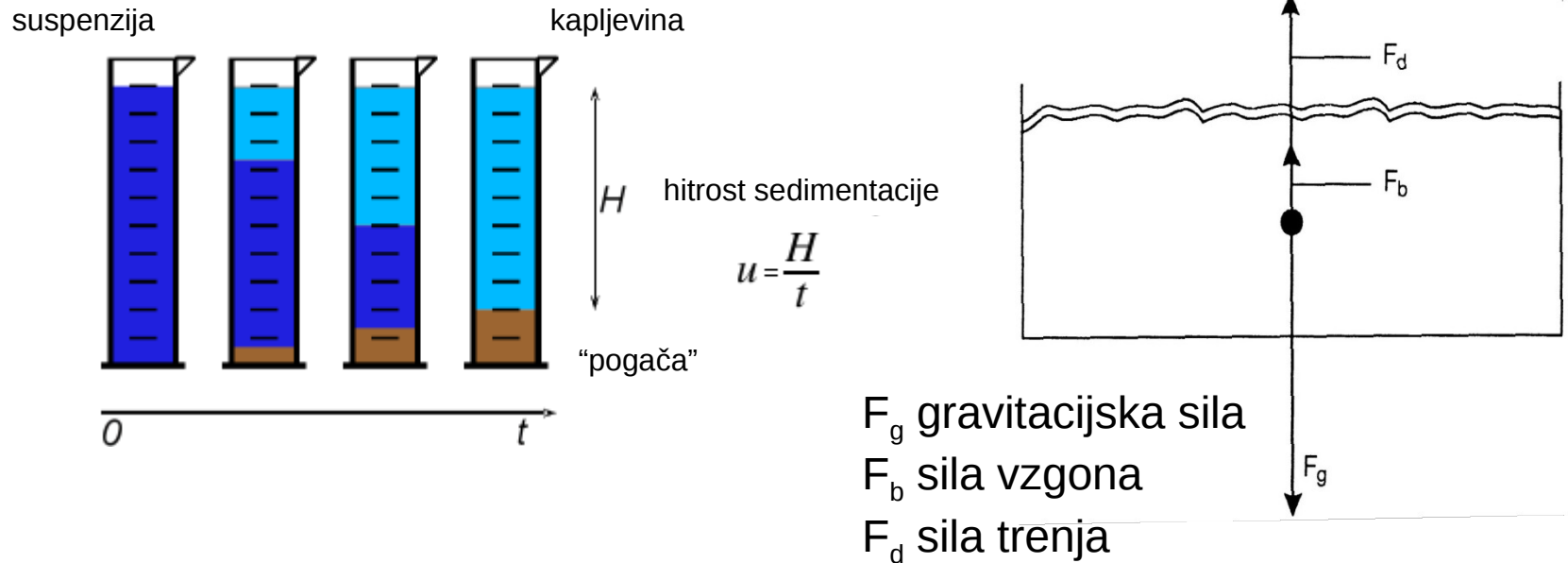
Dva glavna kriterija pri povečevanju filtracijskih stiskalnic:

- upornost pogače/filtrirnega sredstva
 - na laboratorijski aparaturi določimo konstanti a in b
 - na pilotni aparaturi (povečevalni faktor 15 - 150) predpostavimo vse parametre konstantne, razen A
 - na osnovi dobljenih rezultatov možni nadaljnji scale-up za faktor 10 - 1000

tipične velikosti filtrov:	laboratorij	0,012	m ²
	pilotni nivo	0,16	m ² (na ploščo)
	proizvodnja	1,44	m ² (na ploščo)

- volumen pogače
 - zbira se v omejenem volumnu komor v filtracijski stiskalnici
 - laboratorijski testi – določitev volumna pogače kot indikator števila komor in/ali števila filtracijskih ciklov

Sedimentacija - teorija



Okrogli delci, konstantna hitrost padanja v gravitacijskem polju – vse 3 sile v ravnotežju

hitrost sedimentacije:

$$u = \frac{g(\rho_s - \rho_p)d_p^2}{18\eta}$$

g ($m\ s^{-2}$)

gravitacijski pospešek

η ($N\ s\ m^{-2}$)

dinamična viskoznost

d_p (m)

premer delca

ρ_s ($kg\ m^{-3}$)

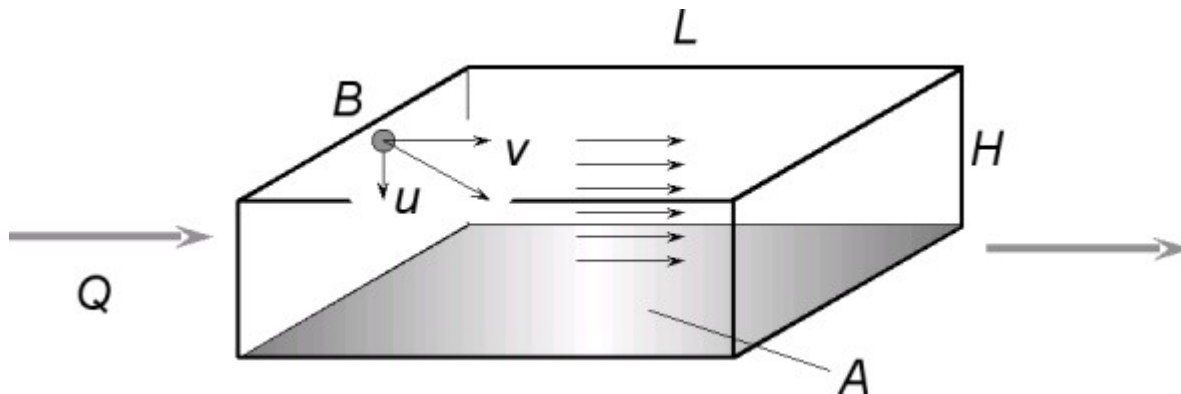
gostota suspenzije

ρ_p ($kg\ m^{-3}$)

gostota delca

Sedimentacija

Pretočni usedalnik



zadrževalni čas: $t = \frac{V}{Q} = \frac{A \cdot H}{Q}$

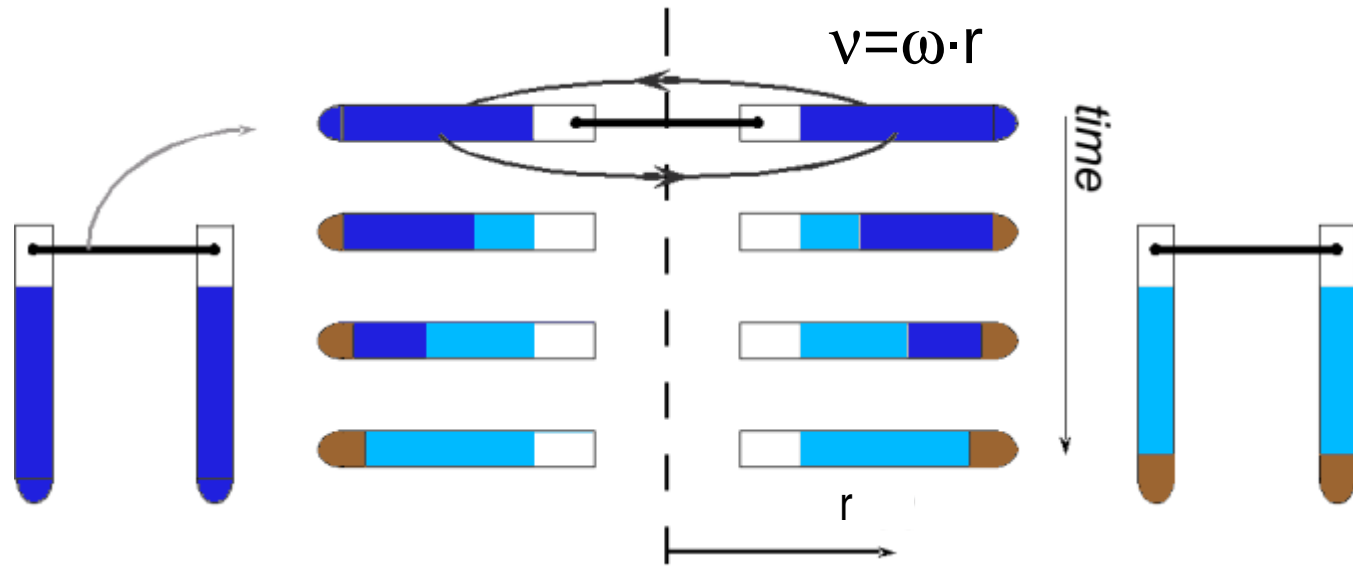
Q (m³/s) pretok
A (m²) površina
V (m³) volumen

$$t = \frac{H}{u}$$

$$Q = A \cdot u$$

kapaciteta usedalnika odvisna od površine usedalnika, ne od višine!

Centrifugiranje



centripetalna sila:

$$F_C = m \cdot \omega^2 \cdot r$$

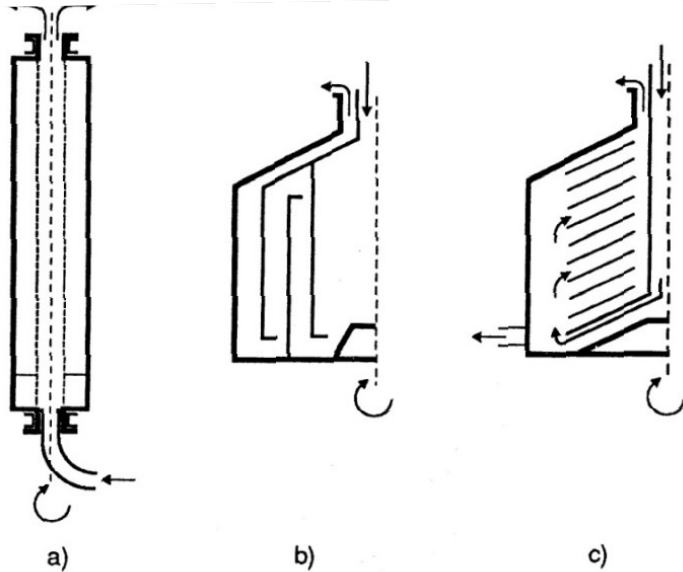
ω

kotna hitrost (s^{-1})

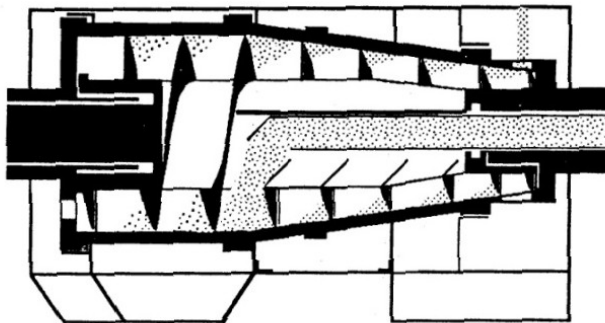
v

obodna hitrost ($m s^{-1}$)

Centrifugiranje - naprave



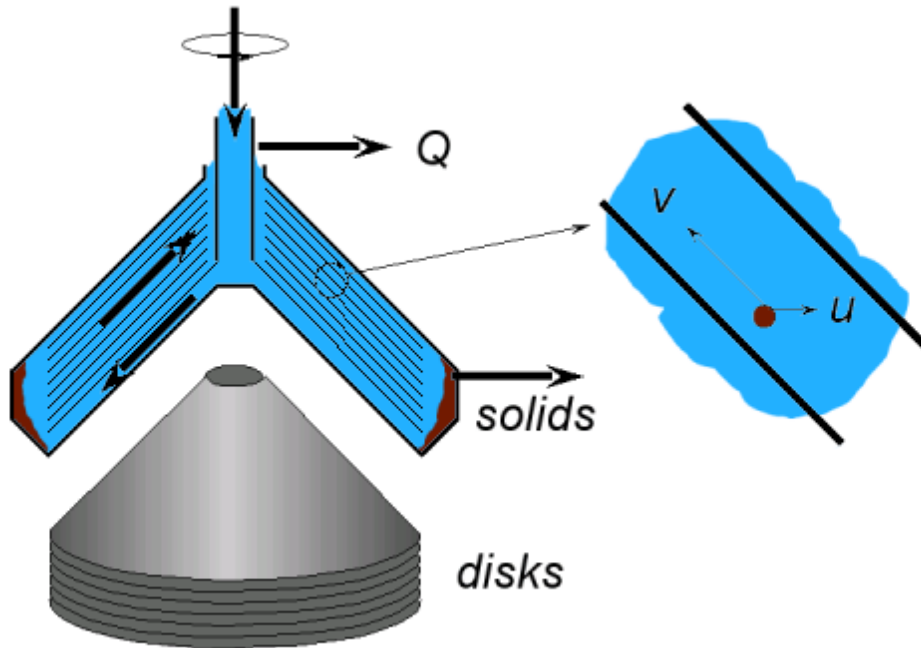
- a) cevna centrifuga
- b) večkomorna centrifuga
- c) centrifuga z diski
- d) centrifugalni dekanter



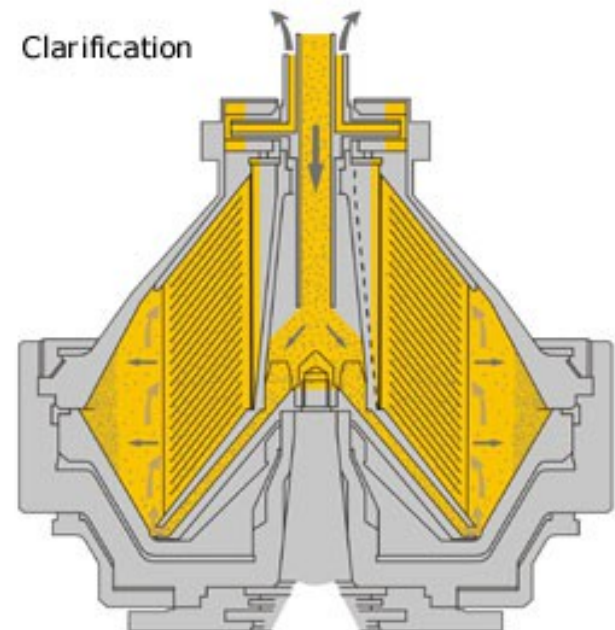
d)

	velikost delcev (μm)						vol % v suspenziji				
	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	20	40	60	80	100
večkomorna c.	██████████						█				
c. z diski	██████████						██████████				
samočistilna c.	██████████						█				
dekanter		██████████					██████████				

Centrifuga z diski

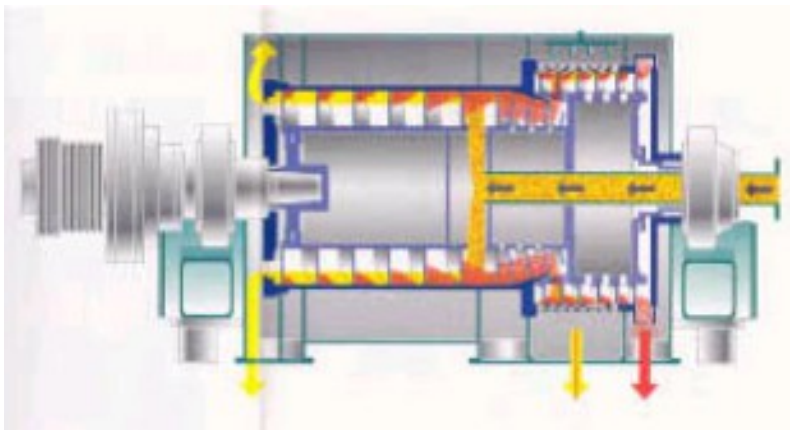
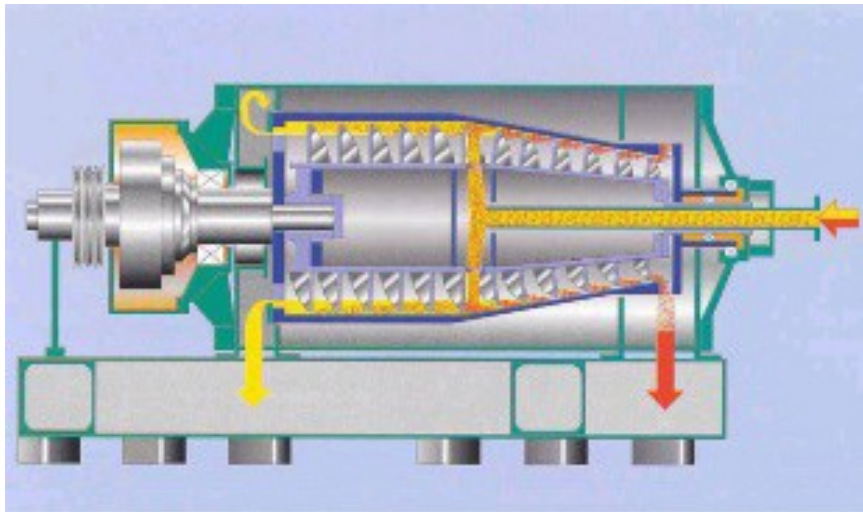


diski razmaknjeni 0,2-2 mm



Centrifugalni dekanter

za separaciju zelo gostih suspenzij



Centrifugiranje

relativna centrifugalna sila (*RCF*)

$$RCF = \frac{r \cdot \omega^2}{g} = \frac{r \cdot (2\pi \cdot N)^2}{g} = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r_{(cm)} \cdot N_{(rpm)}^2$$

g ... gravitacijski pospešek ($m \cdot s^{-2}$)

$r_{(cm)}$... polmer rotorja (cm)

ω ... kotna hitrost (s^{-1})

$N_{(rpm)}$... vrtilna hitrost rotorja (min^{-1} oz. rpm)

Industrijske centrifuge	<i>RCF</i>
cevne centrifuge	13000 – 17000
centrifuge z diski	5000 – 13000
centrifugalni dekanter	1500 - 4500

Ločevanje celičnih struktur

laboratorijske ultracentrifuge:
RCF nekaj 100.000xg

