

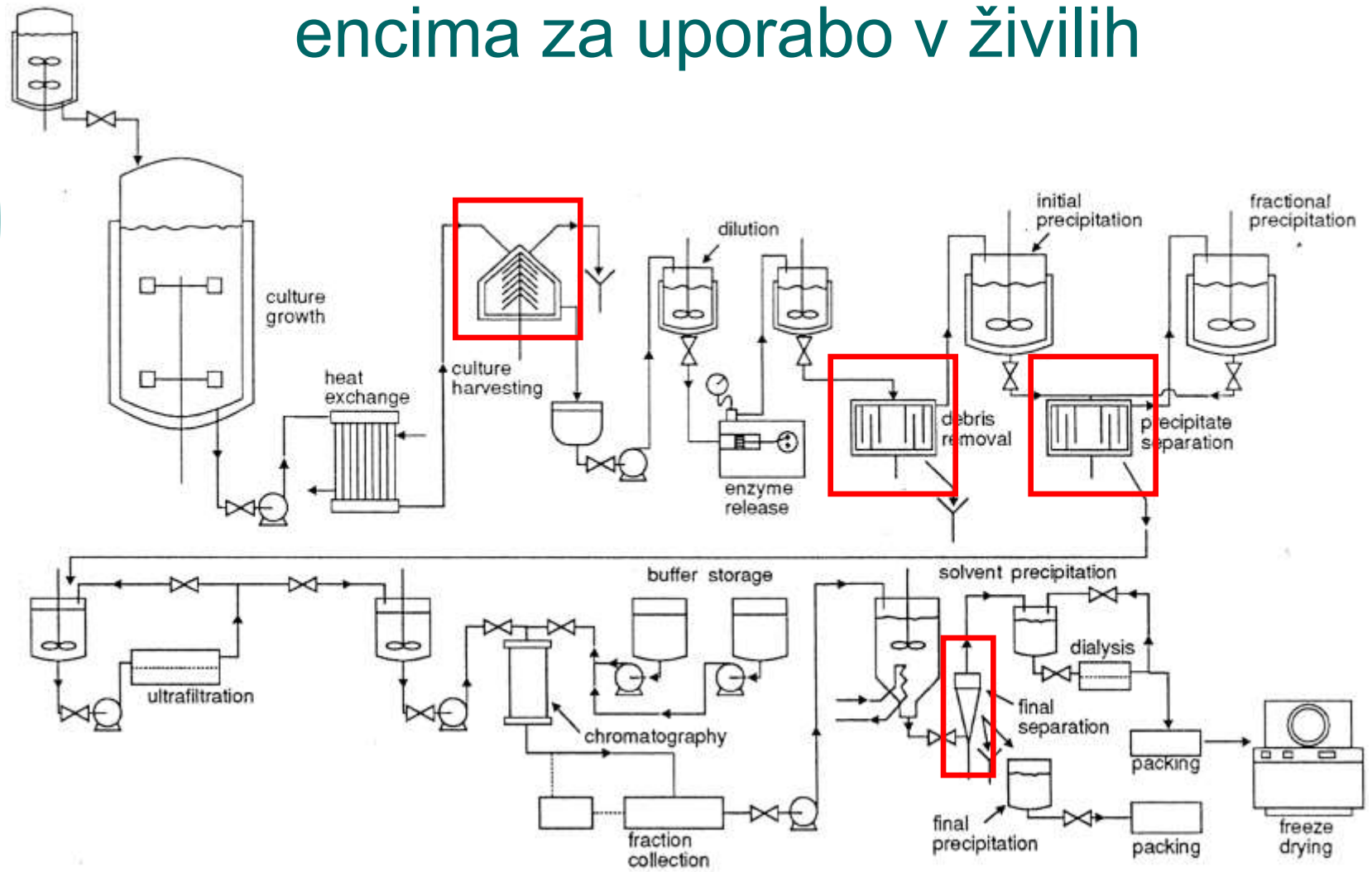


# ZAKLJUČNI PROCESI V BIOTEHNOLOGIJI

---

Ločevanje trdno - kapljevina

# Izolacija in čiščenje intracelularnega encima za uporabo v živilih

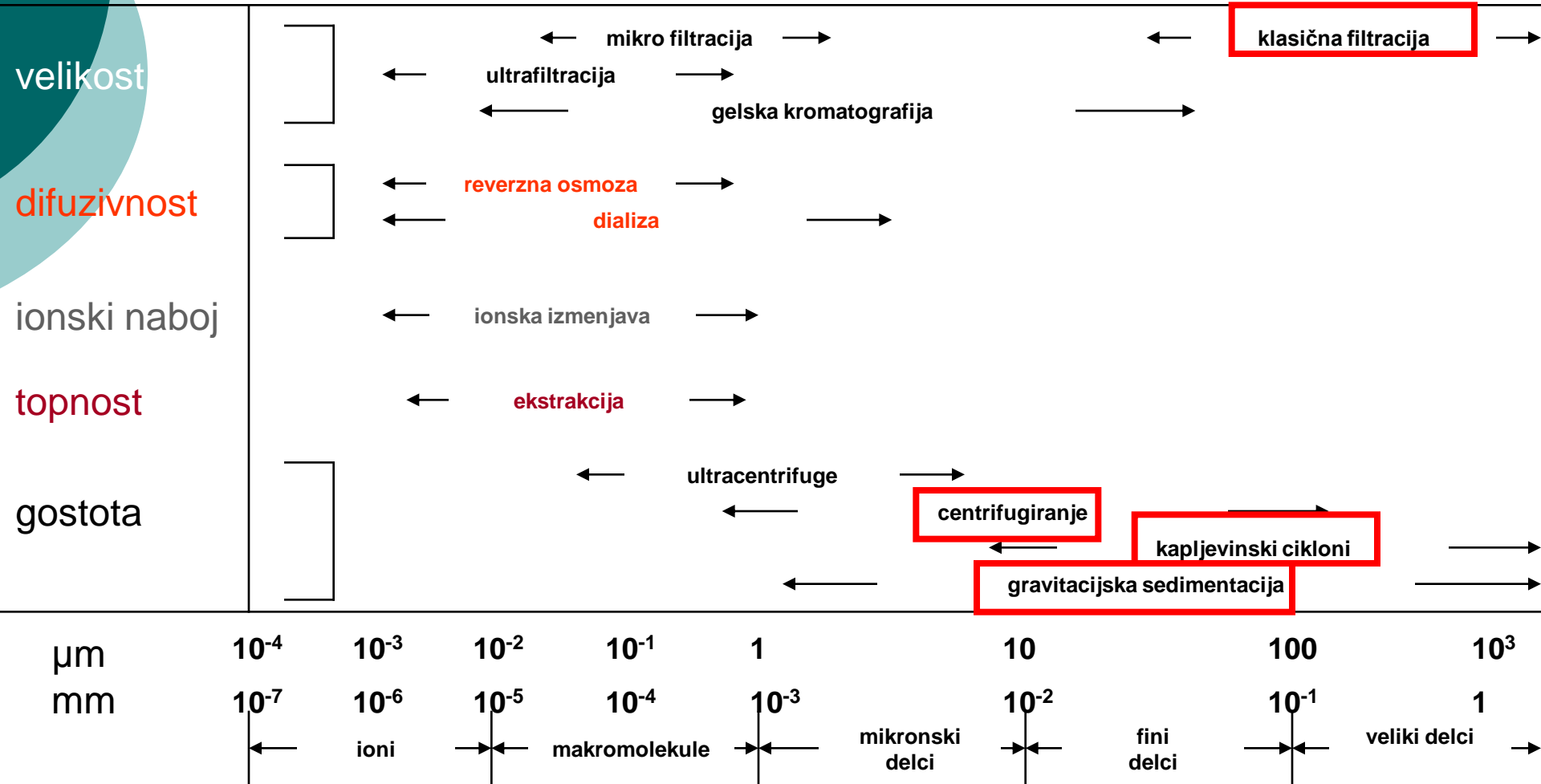


# Ločevanje trdno - kapljevina

---

- 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)

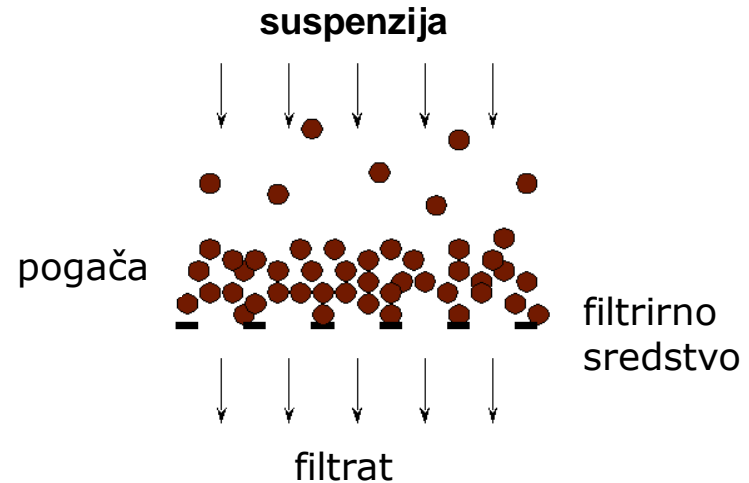
# Ločevanje glede na lastnosti snovi



# Ločevanje trdno-kapljevina

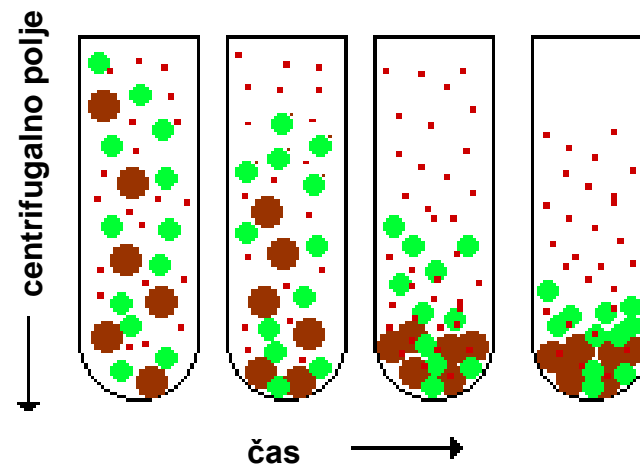
## Filtracija

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

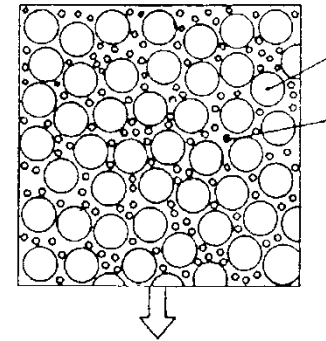
Sila, ki poganja proces, lahko posledica:

- razlike pritiskov ( $\Delta p$ ) na osnovi:
  - nadtlaka suspenzije
  - vakuuma pod filtrirnim sredstvom
- gravitacije
- centrifugalnega polja

# Filtracija

Načini filtracije:

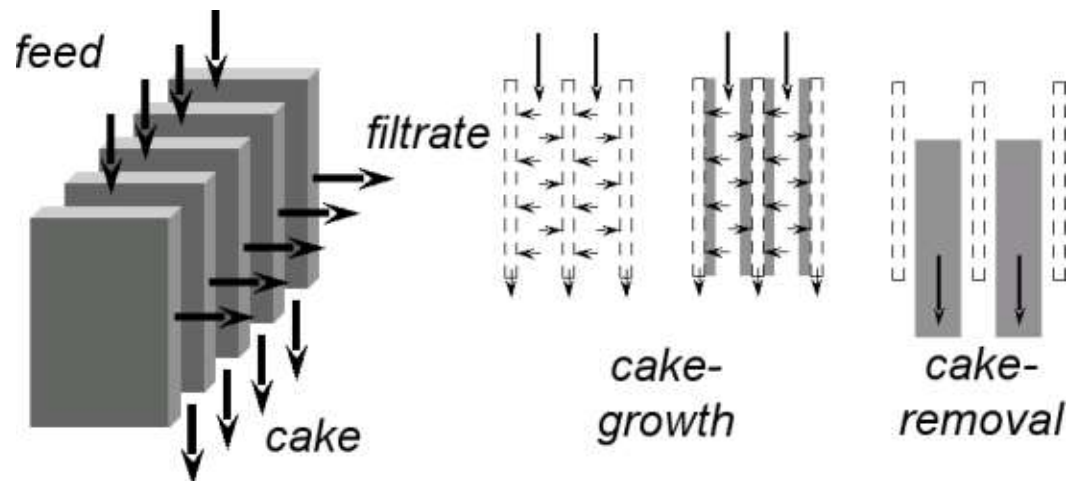
1. globinska (deep bed)
  - delci se nabirajo **v** filtrirnem sredstvu
  - $c < 0,1\%$  (v/v), po grobi filtraciji
2. skozi filtracijsko pogačo (cake filtration)
  - delci se nabirajo **na** filtrirnem sredstvu
  - $c > 3\%$  (v/v)
3. obtočna oz. tangencialna (cross flow)
  - filtracijska gošča teče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



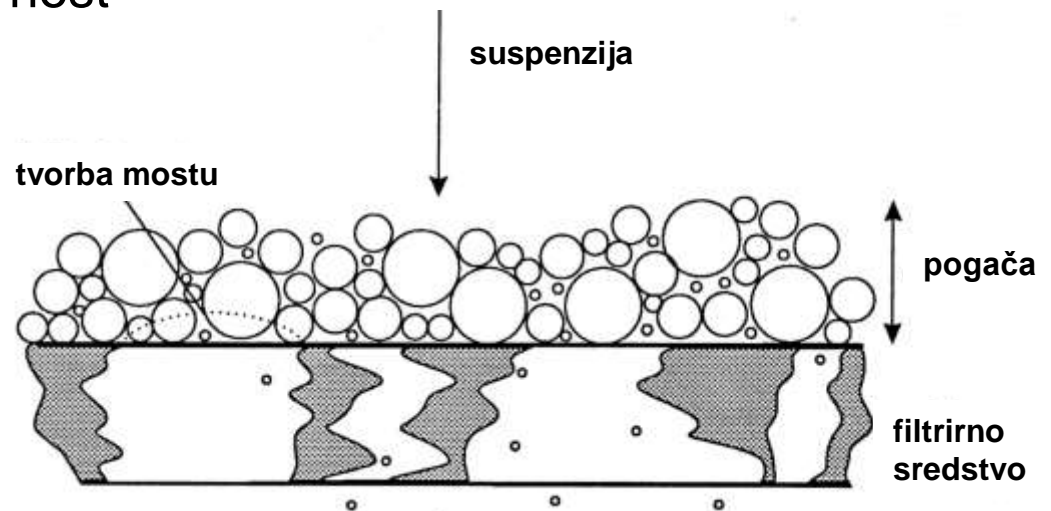


# Filtracija – filtrirno sredstvo

- 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:

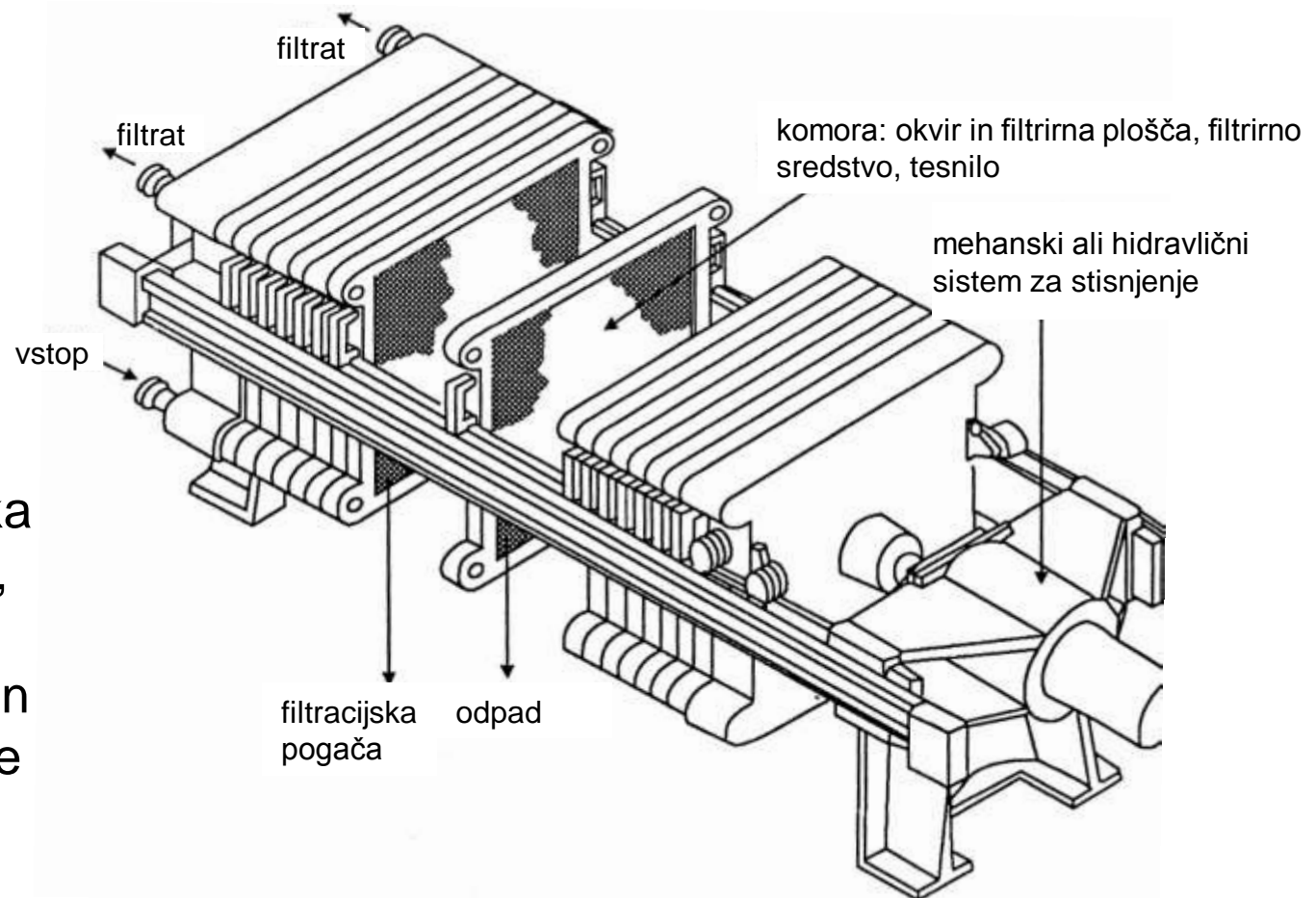


rotacijski vakuumski filter (rotating drum vacuum filter)



tračni vakuumski filter (belt filter)

# Industrijska filtracija – filtracijska stiskalnica

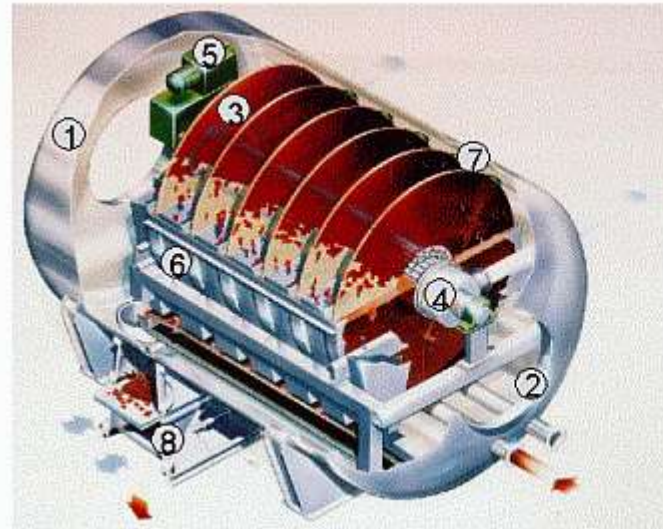


prednosti:  
kompaktnost, velika  
efektivna površina,  
prilagodljivost,  
enostavno pranje in  
izpihovanje pogače

# Industrijska filtracija – vakuumski filter

## vakuumski filtri z rotirajočim bobnom

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

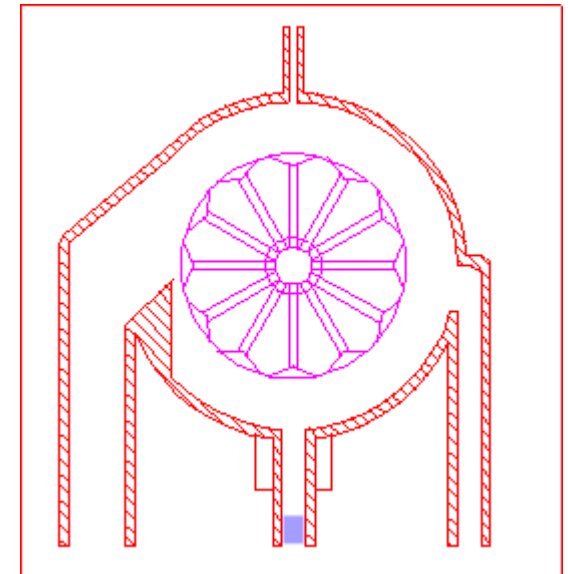
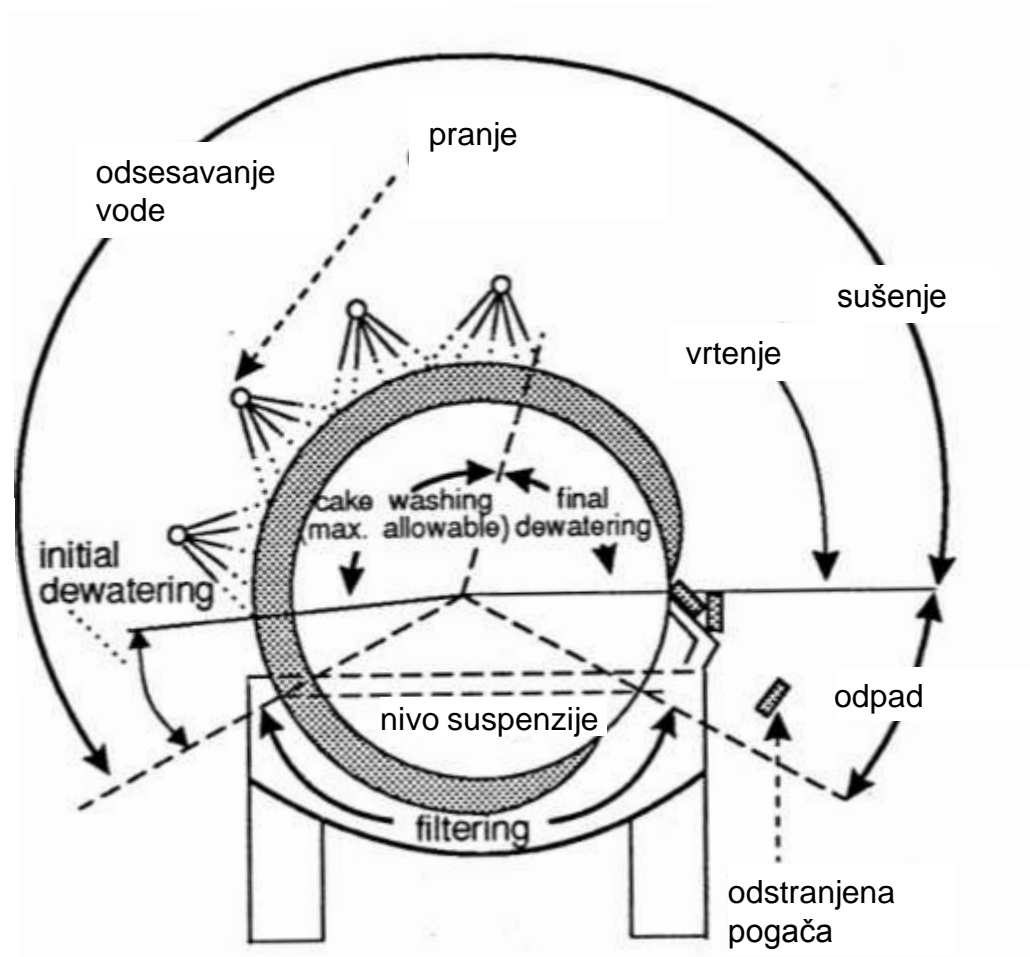


- 1 - Pressure Vessel
- 2 - Manhole
- 3 - Filterdisk
- 4 - Control head
- 5 - Filter drive
- 6 - Filter trough
- 7 - Agitators
- 8 - Discharger

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

# Industrijska filtracija – vakuumski filter

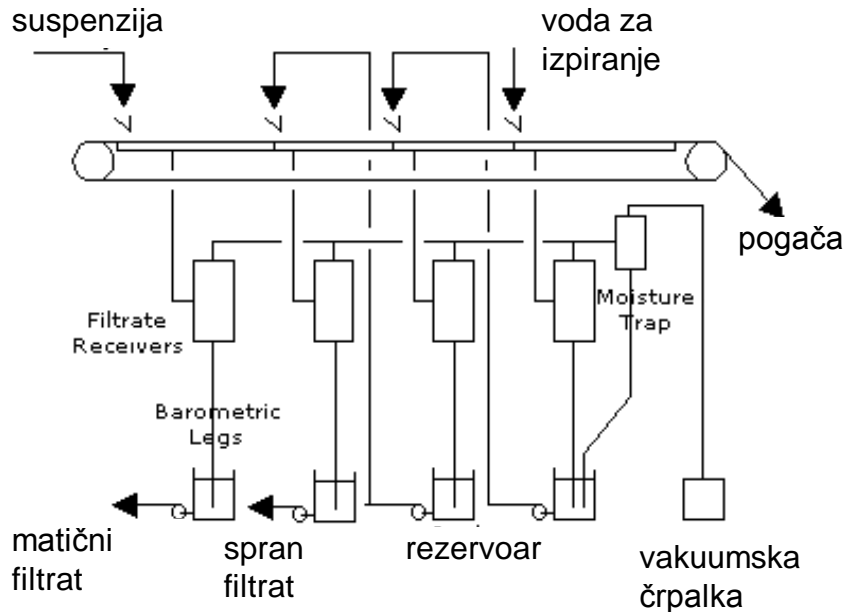
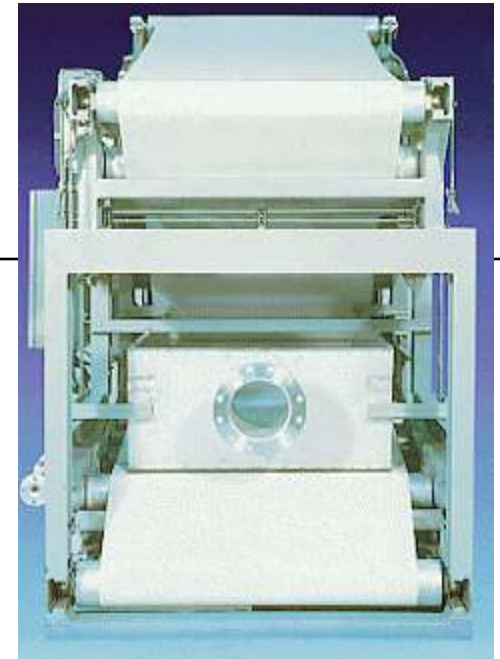
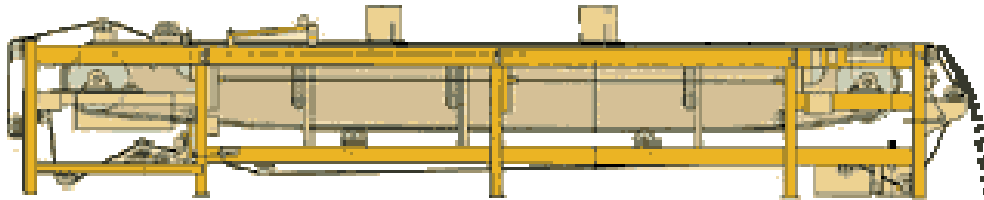
delovanje vakuumskega filtra



hitrost vrtenja bobna:  
0,3 do 3 min<sup>-1</sup>

# Tračni filter

horizontalni brezkončni trak



ceneni, enostavni  
za upravljanje

uporaba: filtracija mulja v  
bioloških čistilnih napravah

# Teorija filtracije na osnovi $\Delta p$

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

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

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

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

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

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

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

$\eta$  - dinamična viskoznost (Pa s, Ns/m<sup>2</sup>)

$R_C$  - upor pogače (m<sup>-1</sup>)

$R_M$  - upor filtrirnega sredstva (m<sup>-1</sup>)

$\phi_f$  - volumenski pretok filtrata (m<sup>3</sup>/s)

$A$  - površina (m<sup>2</sup>)

$V_f$  - prostornina filtrata (m<sup>3</sup>)

$V_C$  - prostornina pogače (m<sup>3</sup>)

$\alpha$  - specifični faktor upornosti pogače (m/kg)

$m_c$  - masa pogače (kg)

$w$  - masa pogače na enoto površine (kg/m<sup>2</sup>)

$C$  - koncentracija suspenzije (kg/m<sup>3</sup>)

nestisljiva  
pogača:

# Teorija filtracije na osnovi $\Delta p$

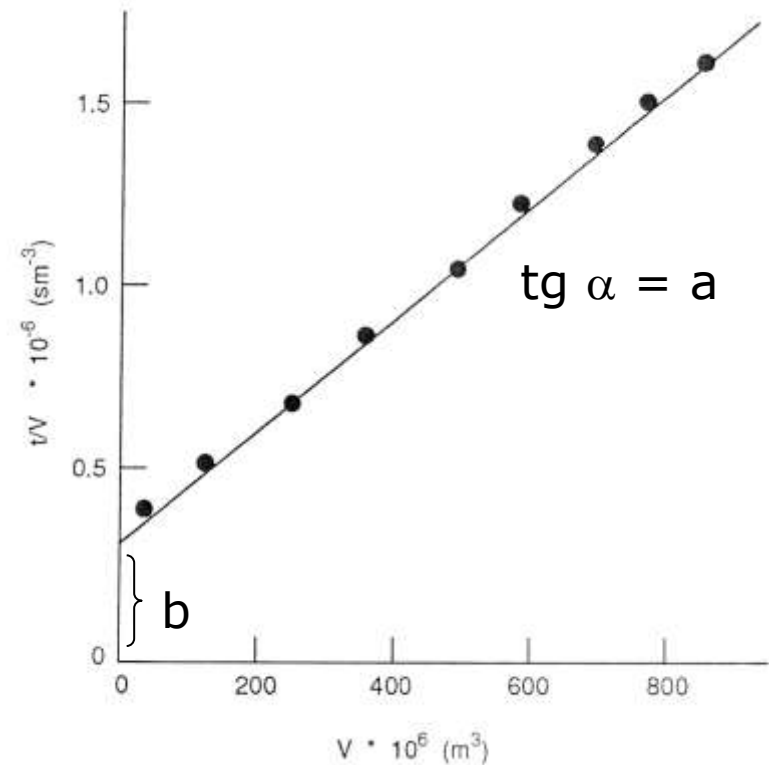
$$\frac{dt}{dV_f} = \frac{\eta \cdot \alpha \cdot C \cdot V_f}{\Delta p \cdot A^2} + \frac{\eta \cdot R_M}{\Delta p \cdot A}$$

konstantni  $\Delta p$ :

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

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

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



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

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



# Vplivi na filtracijo

Vpliv na specifični upor pogače (določen eksperimentalno):

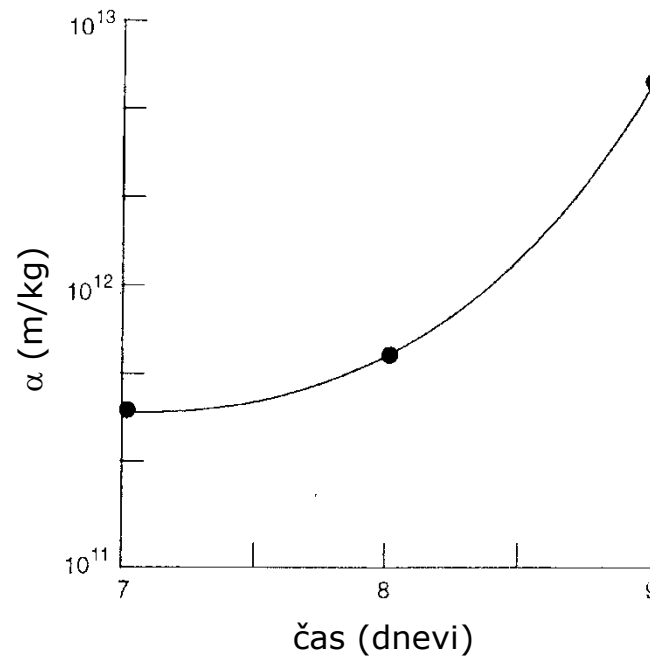
- vrsta mikroorganizma
- velikost/porazdelitev suspendiranih delcev
- pH fermentacijske brozge
- temperatura suspenzije/fermentacijske brozge

vpliv časa fermentacije z glivo  
*Penicillium chrysogenum* na  
specifični upor pogače ( $\alpha$ )

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.)

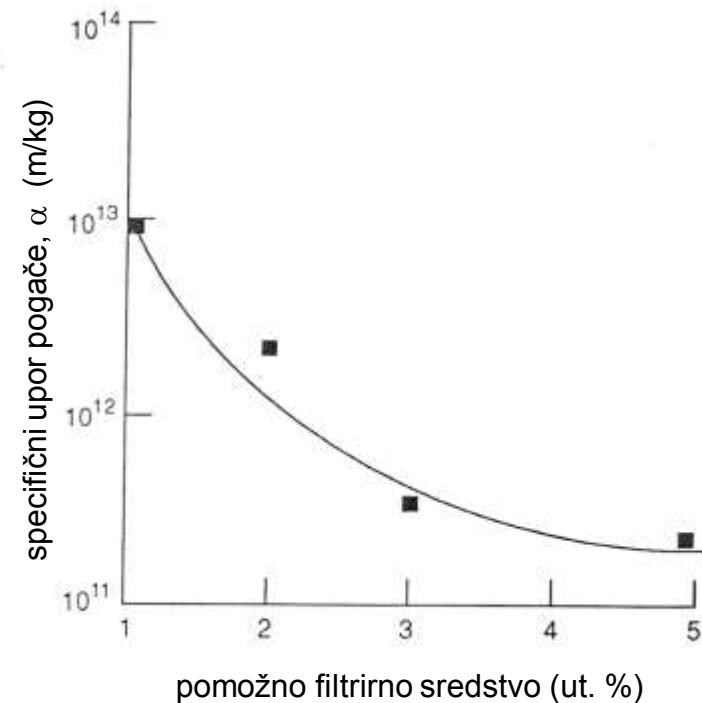
- dodajanje flokulantov

- elektroliti:  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

- polielektroliti (poliamini, poliakrili)

običajni dodatek k brozgi:

0,1 - 2 % (ut.)



vpliv dodatka (Radiolite) na specifični upor pogače ( $\alpha$ ) pri filtraciji *Streptomyces griseus*

# Vpliv predobdelave reakcijske zmesi na bioseparacijo

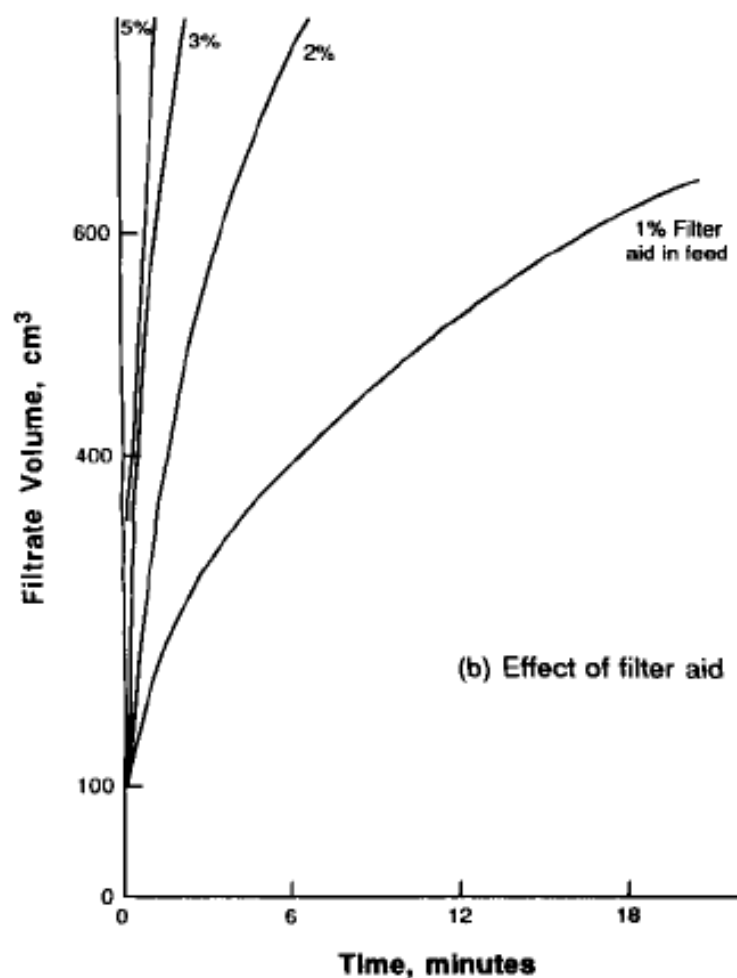
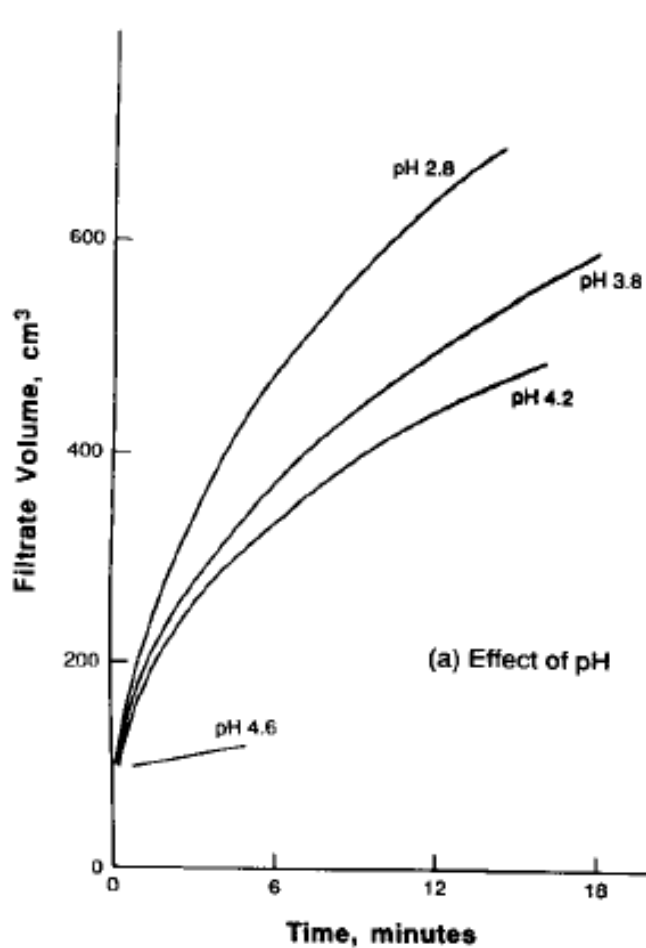
---

- dodatek flokulantov (npr. polielektrolitov): lažje centrifugiranje
- dodatek inertnih delcev (npr. diatomejska zemlja, perlit, visoko porozni aluminijski silikati): lažja filtracija
- toplotna obdelava: znižanje viskoznosti
- sprememba pH

Primer: *Actinetobacter 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:

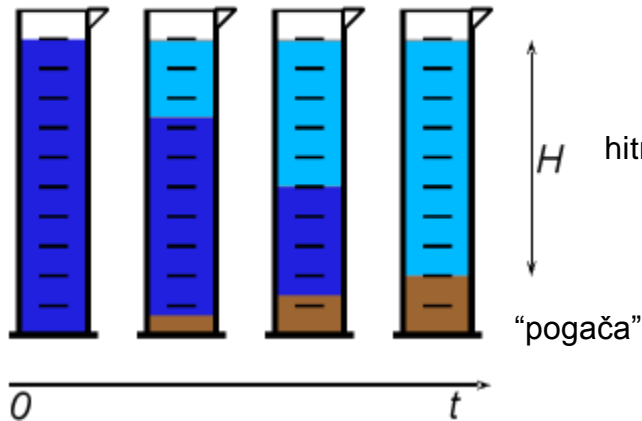
laboratorij	0,012	m <sup>2</sup>
pilotni nivo	0,16	m <sup>2</sup> (na ploščo)
proizvodnja	1,44	m <sup>2</sup> (na ploščo)

- 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

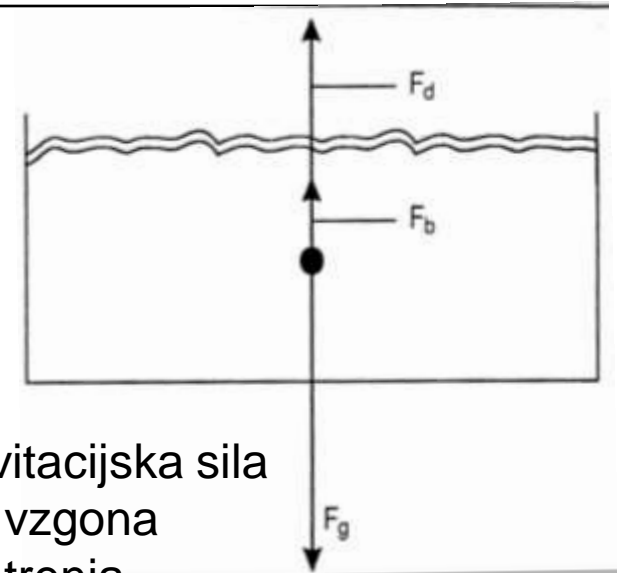
# Sedimentacija - teorija

suspenzija

kapljevina



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



$F_g$  gravitacijska sila

$F_b$  sila vzgona

$F_d$  sila trenja

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

$\eta$  ( $N s m^{-2}$ )

dinamična viskoznost

$d_p$  ( $m$ )

premer delca

$\rho_s$  ( $kg m^{-3}$ )

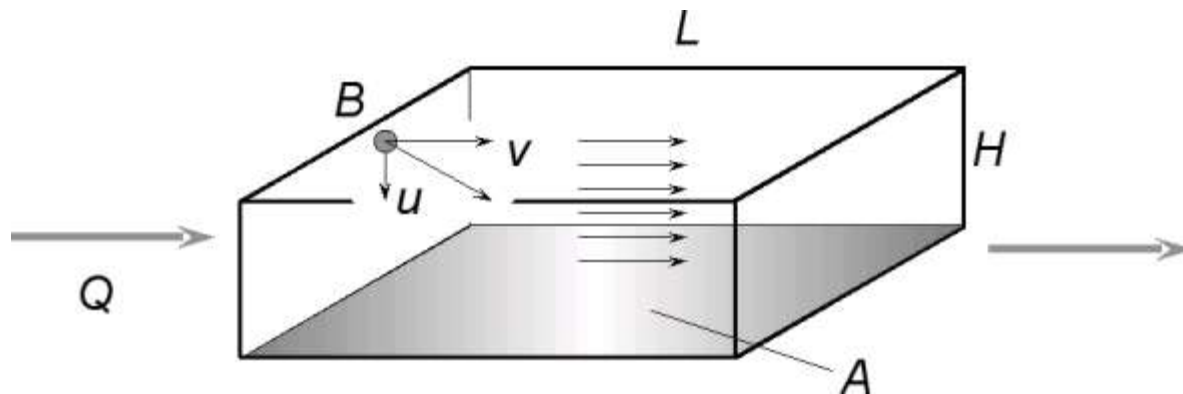
gostota suspenzije

$\rho_p$  ( $kg m^{-3}$ )

gostota delca

# Sedimentacija

## Pretočni usedalnik



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

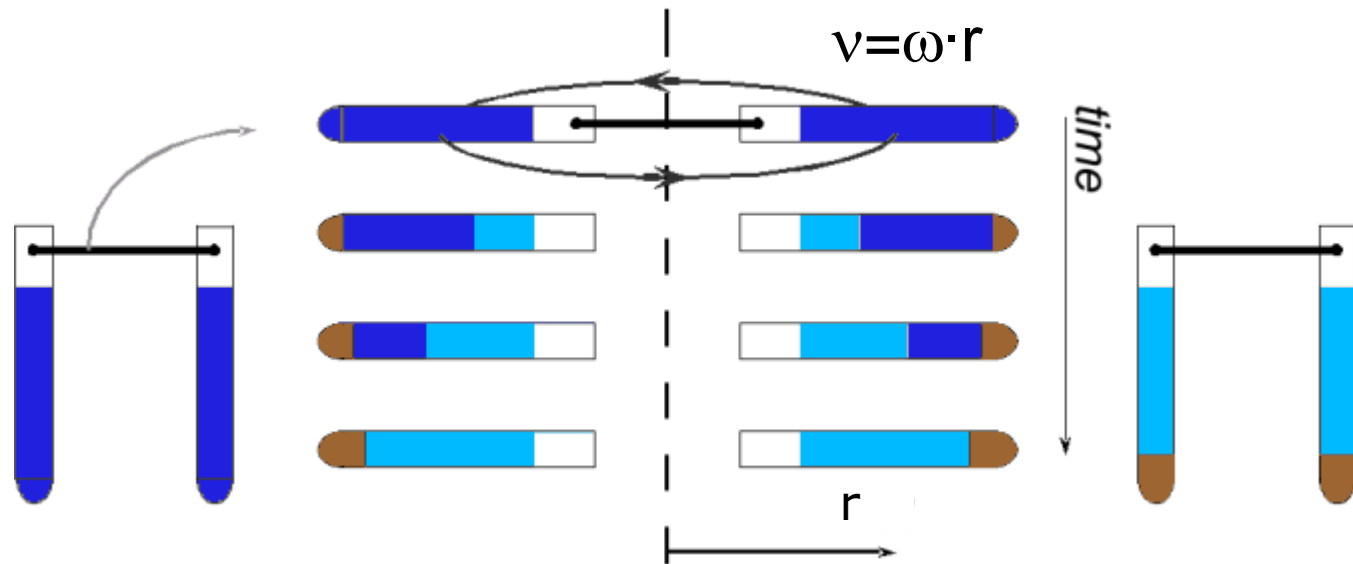
Q (m<sup>3</sup>/s) pretok  
A (m<sup>2</sup>) površina  
V (m<sup>3</sup>) volumen

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

$$Q = A \cdot u$$

kapaciteta usedalnika  
odvisna od površine  
usedalnika, ne od višine!

# Centrifugiranje



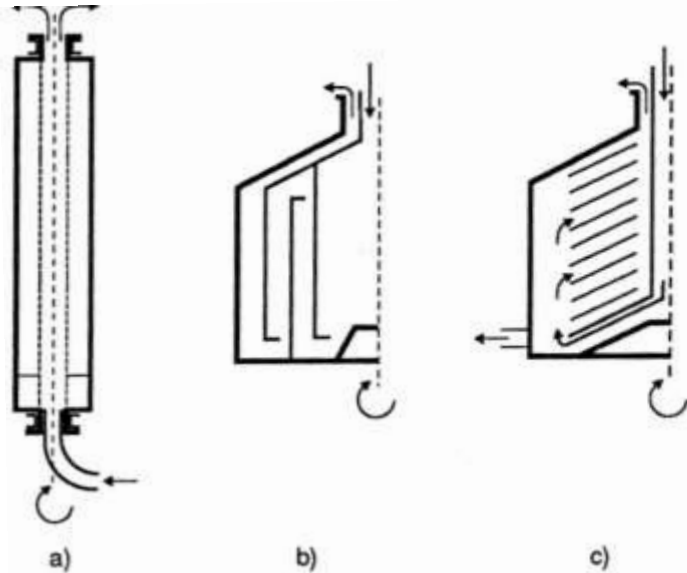
centripetalna sila:  $F_C = m \cdot \omega^2 \cdot r$

$\omega$  kotna hitrost ( $s^{-1}$ )

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



# Centrifugiranje - naprave



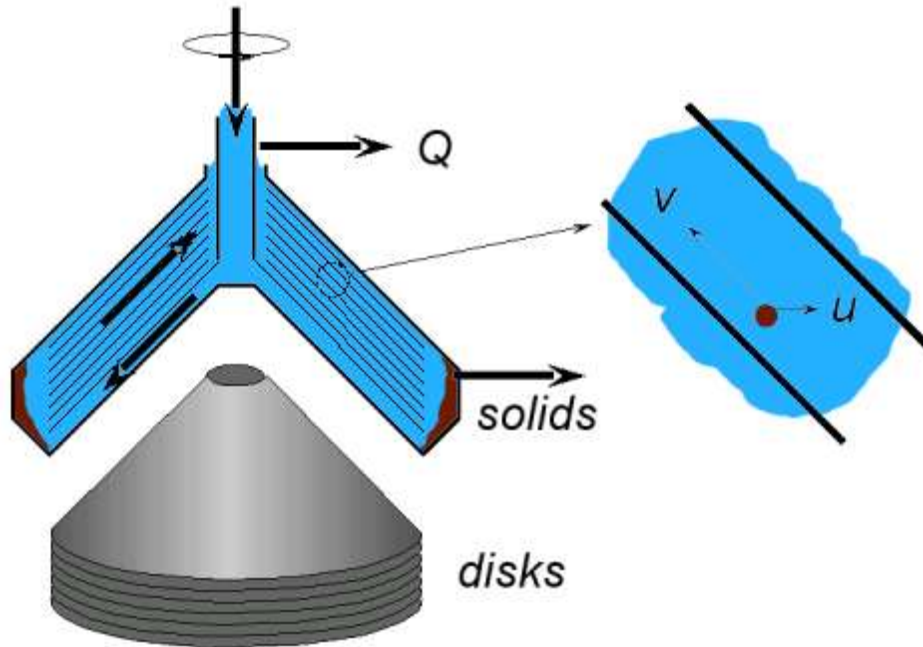
- a) cevna centrifuga
- b) večkomorna centrifuga
- c) centrifuga z diski
- d) centrifugalni dekanter



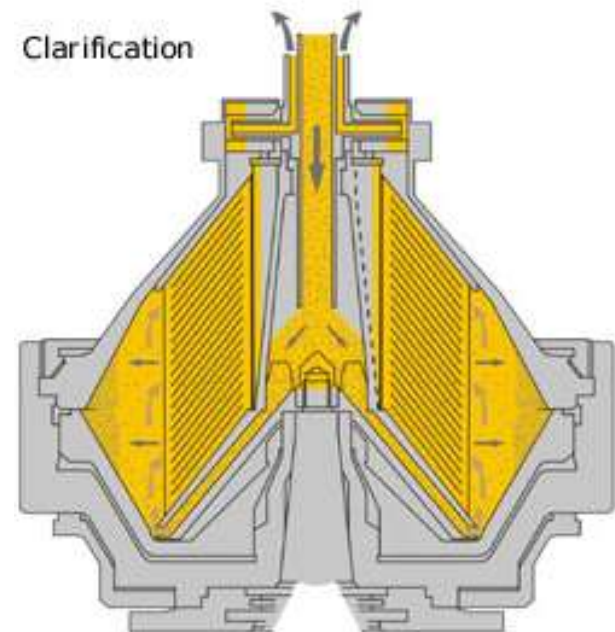
d)

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

# Centrifuga z diskmi

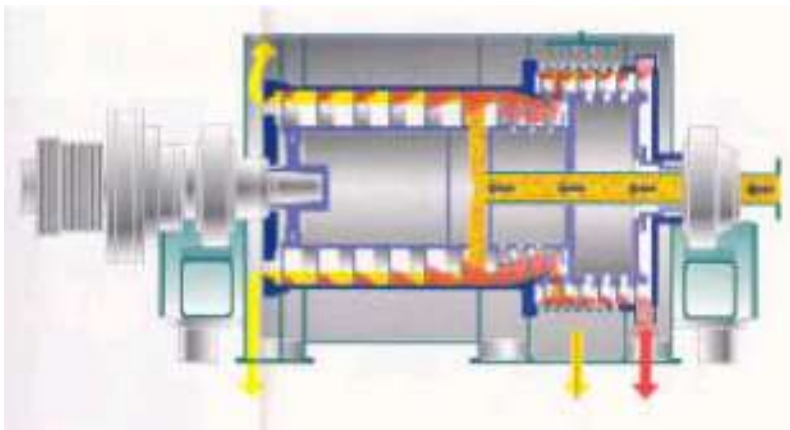
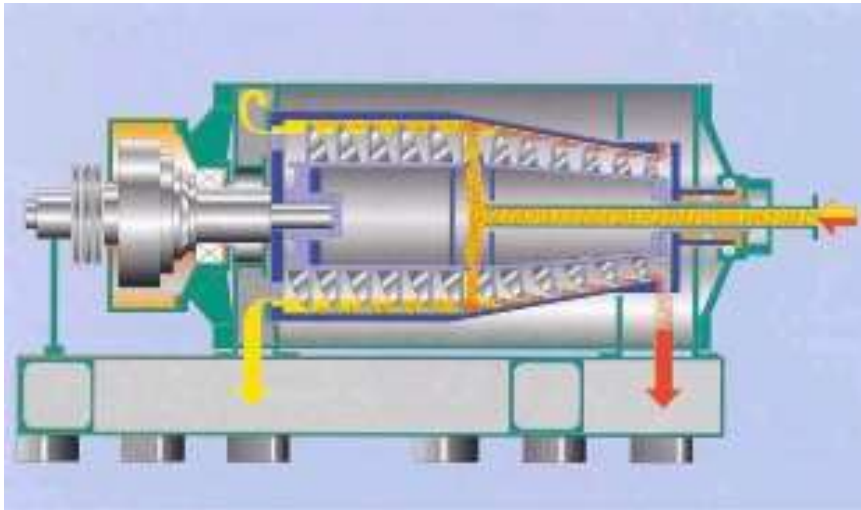


diski razmaknjeni 0,2-2 mm



# Centrifugalni dekanter

za separaciju zelo gostih suspenzija



# 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)

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

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

# Ločevanje celičnih struktur

laboratorijske ultracentrifuge:  
RCF nekaj 100.000xg

