

SEPARAREA MASEI CELULARE DE LICHIDUL DE FERMENTAȚIE

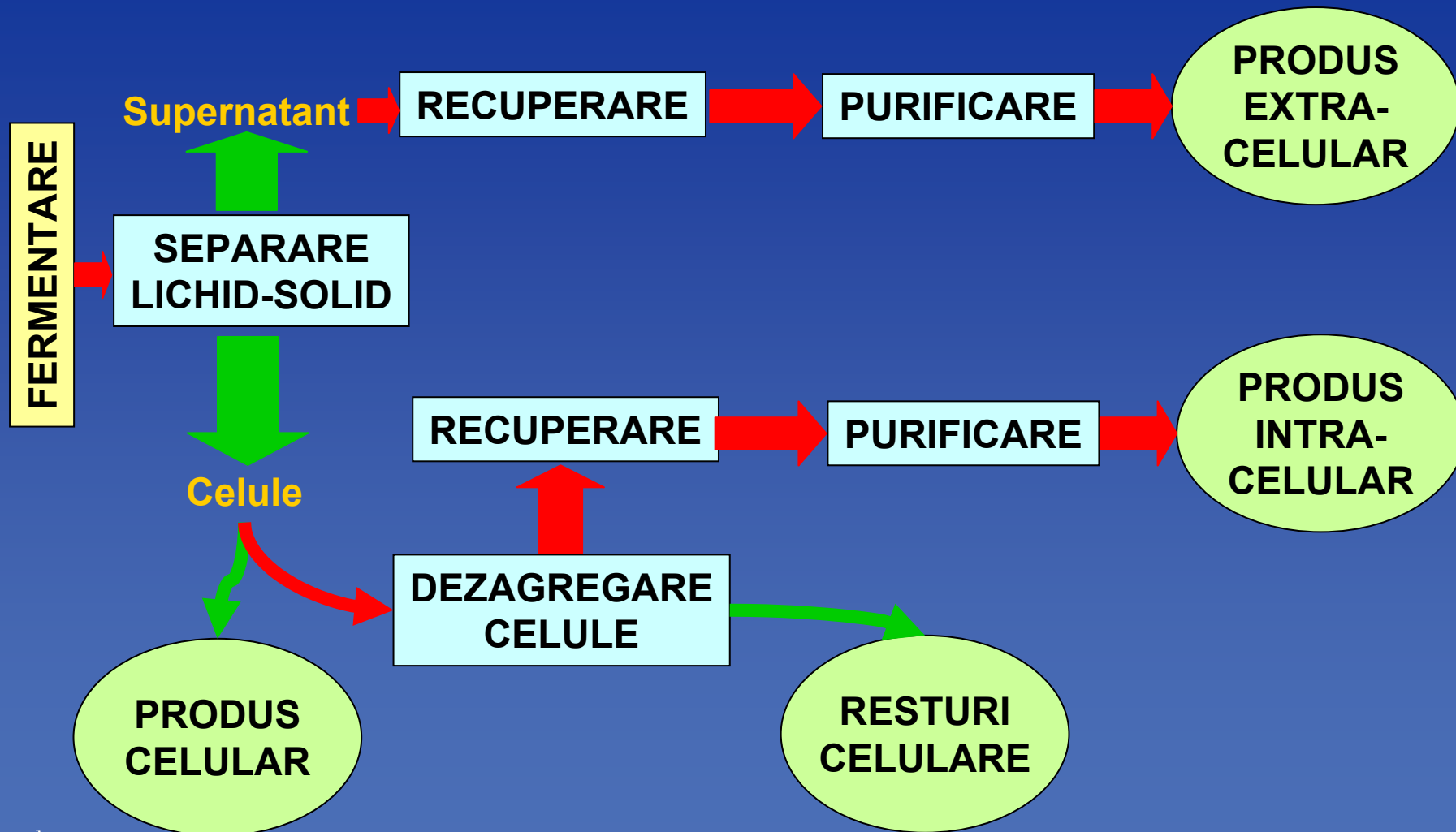
1. Condiționarea lichidului de fermentație prin floculare și coagulare
2. Separarea prin sedimentare gravitațională
3. Separarea prin filtrare
4. Separarea prin centrifugare
5. Separarea prin microfiltrare



SEPARAREA MASEI CELULARE

- Primul proces de prelucrare în aval de bioreactor
- **SCOPUL PROCESULUI:**
 - reținerea acelei faze care conține produsul util;
 - reducerea considerabilă a volumului de prelucrat, prin îndepărtarea celeilalte faze.





SEPARAREA MASEI CELULARE

- Tehnici de separare a celulelor de lichidul de fermentație:
 1. sedimentarea,
 2. filtrarea,
 3. centrifugarea,
 4. ciclonarea,
 5. microfiltrarea.
- Suplimentar, **flocularea** celulelor poate fi utilizată pentru îmbunătățirea eficienței tuturor acestor tehnici.



FLOCULAREA

- Pentru facilitarea proceselor ulterioare de separare a masei celulare de lichidul de fermentație este utilă aglomerarea particulelor celulare în agregate mari, ușor separabile.
- În absența floculării sau coagulării, sedimentarea gravitațională a particulelor celulare și subcelulare decurge foarte lent:



Timpul de sedimentare naturală al diferitelor particule

Tipul particulei	Diametrul particulei [μm]	Suprafața specifică [m^2/m^3]	Durata de sedimentare
Bacterii	1	6 000 000	8 zile
	0,1	60 000 000	2 ani
Coloizi	0,01	600 000 000	20 ani
	0,001	6 000 000 000	200 ani



FLOCULAREA și COAGULAREA

- FLOCULAREA: fenomenul de agregare a particulelor solide, indus de adaosul unui polimer;
- COAGULAREA: agregare indusă de către forțe de atracție electrostatice sau de tip van der Waals care apar între particule.

Din punctul de vedere al inginerului biotehnolog, distincția dintre **coagulare**, **agregare**, **floculare** și **aglomerare**, nu este întotdeauna clară.

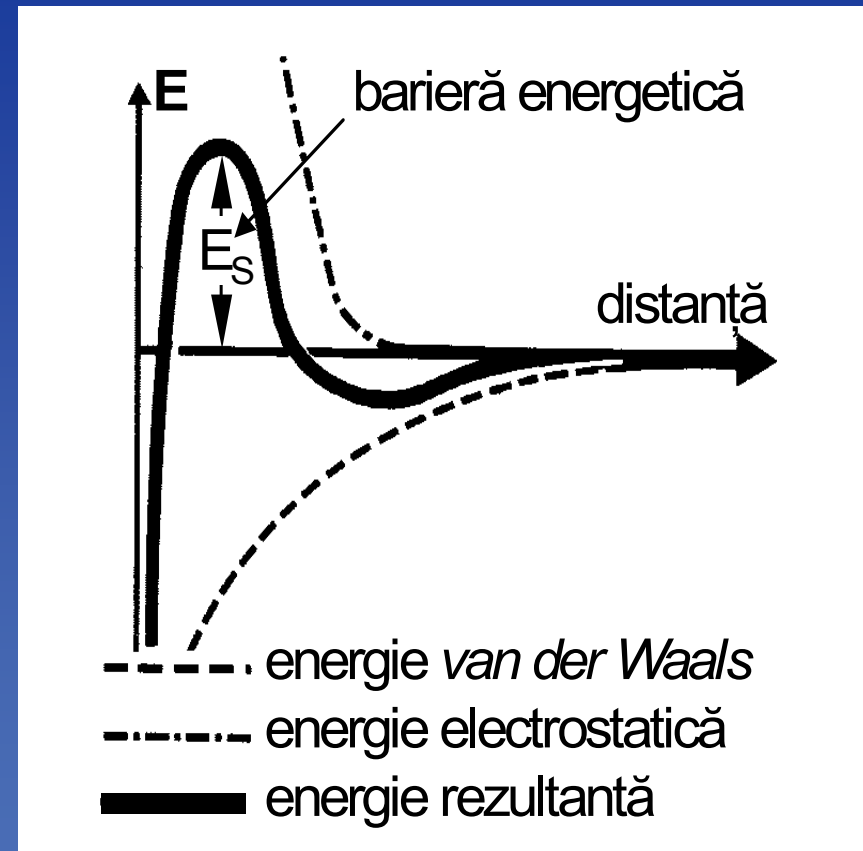
Cuvinte ca: *agregate*, *flocoane*, *aglomerate*, *clustere*, sunt deseori utilizate drept **sinonime**.

Ele se referă la un ansamblu de celule individuale, format din celule inițial libere sau prin absența dispersiei celulare, sub influența anumitor condiții fiziologice, sau după adăugarea anumitor agenți în mediu.



COAGULAREA

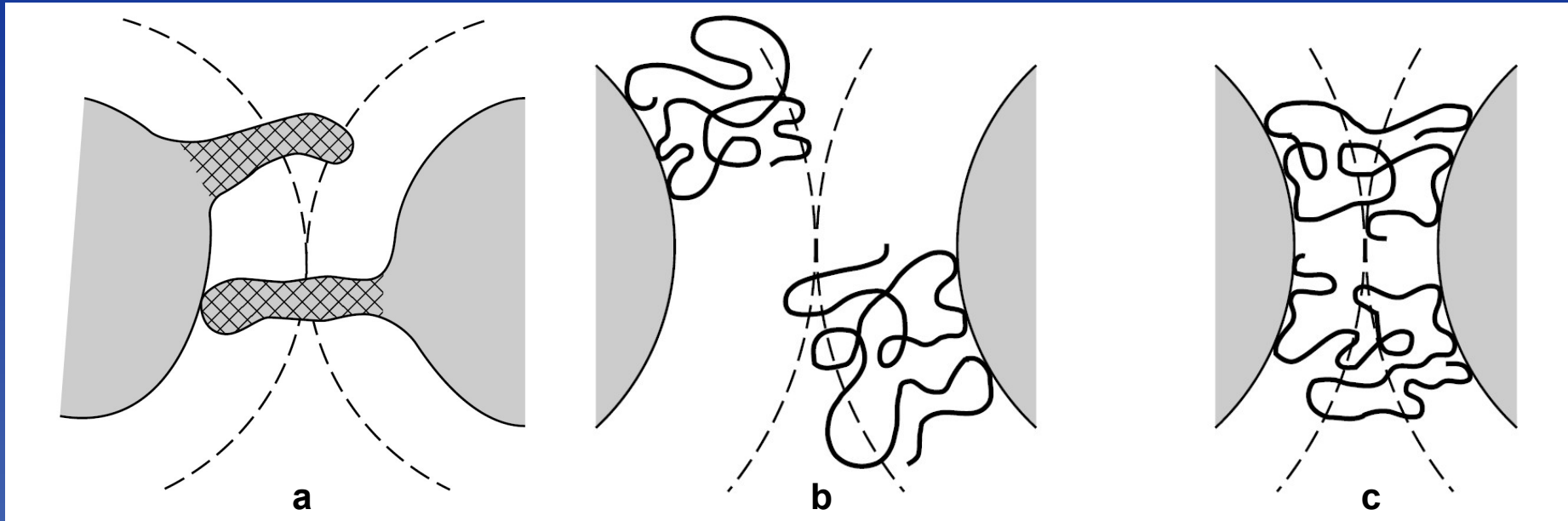
- Fenomenul de destabilizare a celulelor prin neutralizarea sarcinii lor electrice.
- Pentru destabilizarea unei suspensii coloidale trebuie depășită bariera energetică, E_s .
- Pentru a putea realiza acest lucru, este necesară reducerea forțelor repulsive dintre particule, fapt care permite aglomerarea coloizilor.



*Diagrama energetică
a suspensiilor coloidale*



FLOCULAREA și COAGULAREA



Mecanisme principale de aglomerare a celulelor:

- *a - datorită formei naturale a celulelor, prin apendici;*
- *b, c - prin punți de polimer*



AGENȚI DE AGLOMERARE

- Pentru aglomerare se pot utiliza:
 - particule coloidale,
 - săruri,
 - polimeri solubili,
 - combinații ale acestora.
- Eficiența aglomerării poate fi hotărâtor influențată de tăria ionică a soluției.
- La creșterea tăriei ionice, eficiența aglomerării scade dramatic.



AGENȚI DE AGLOMERARE

- **SĂRURILE** {electrolitii simpli} favorizează coagularea particulelor prin comprimarea stratului dublu electric care înconjoară particulele coloidale.
- Efect maxim au ionii metalici cu sarcină mare (Al^{3+} , Fe^{3+}), a căror tendință de adsorbție este mai mare.
- Prin hidroliză acești ioni formează complecși polinucleari hidroxo, încărcăți pozitiv, care au capacitatea de a inversa sarcina superficială a coloizilor.
- Concentrația M^{3+} trebuie să fie suficient de mare pentru a putea comprima stratul dublu electric.
- Supradozare poate duce însă la inversarea sarcinii particulelor coloidale și la restabilizarea lor.



AGENȚI DE AGLOMERARE

- **POLIMERII SOLUBILI**

- polimeri sintetici:

- anionici

- acrilamide

- copolimeri acizi

- cationici

- copolimeri ai acrilamidei cu metacrilatul sau acrilatul de dimetil-aminoetil

- neionici

- poliacrilamida - PAA*

- biopolimeri de origine naturală (chitosan - de ex.)

* PAA și derivații săi sunt folosiți pe scară largă, datorită economicității și eficacității lor. Acrilamida are însă proprietăți puternic neurotoxice și cangerigene.



FLOCULAREA și COAGULAREA

DEZAVANTAJE:

1. Cunoașterea insuficientă a mecanismelor care provoacă aglomerarea $\Leftrightarrow$ control redus al procesului.
2. Comportarea la adăugare de floclanți poate fi nepredictibilă, datorită faptului că fermentația decurge în șarje, caracteristicile suspensiei fiind variabile de la o șarjă la alta.



FLOCULAREA și COAGULAREA

DEZAVANTAJE:

3. Uzual, floculanții adăugați sunt incompatibili cu procesul de fermentare, făcându-se astfel imposibilă recircularea nutrienților neconsumați din lichidul de fermentație.
4. Flocoanele formate sunt instabile, putând fi degradate prin forfecare.
5. Procedura este puțin aplicabilă deșeurilor celulare.
6. Apar costuri suplimentare.



FLOCULAREA controlată GENETIC

- Flocularea poate fi controlată și de către factori genetici.
- Astfel, adăugarea de amidon la o suspensie de *E. coli* a condus la formarea unor flocoane bacteriene, permițând ulterior o separare foarte eficientă a celulelor prin sedimentare.
- Flocularea a depins de un receptor maltoporin pentru amidon aflat la suprafața celulei.
- Expresia acestui receptor maltoporin poate fi controlată genetic, astfel încât prezența sa la suprafața celulei să fie independentă de proprietățile suprafeței.



FLOCULAREA controlată GENETIC

- Agregarea amidono-dependentă a celulelor este potențial aplicabilă și altor microorganisme care răspund următoarelor cerințe:
 1. prezintă receptori pentru amidon,
 2. suprafața celulară nu este mascată de un strat de proteină sau polizaharidă,
 3. celula nu produce enzime amilolitice extracelulare.



FLOCULAREA controlată GENETIC

- Utilizarea amidonului în recoltarea celulelor bacteriene oferă câteva avantaje:
 1. legarea de celule este rapidă,
 2. amidonul este netoxic,
 3. spre deosebire de flocluanții încărcăți electric, nu afectează pH-ul, iar legarea sa este efectivă în condițiile de pH în care au loc de regulă procesele de fermentație,
 4. este un produs ieftin,
 5. este ușor separabil de bacterii, dacă acest lucru este necesar.



SEDIMENTAREA GRAVITAȚIONALĂ

Este aplicată în diverse procese de *biosinteză* sau de *bioseparare*:

- producerea proteinelor terapeutice sau de diagnostic din celule de mamifere,
- atingerea unor concentrații ridicate de celule în fermentatoarele continue prin recircularea celulelor,
- tratarea biologică a apelor uzate sau a deșeurilor,
- producerea berii,
- studiul diverselor tipuri de celule implicate în răspunsul imunologic,
- recoltarea celulelor obținute în micropurtători sau în culturi celulare în suspensie.



SEDIMENTAREA GRAVITAȚIONALĂ

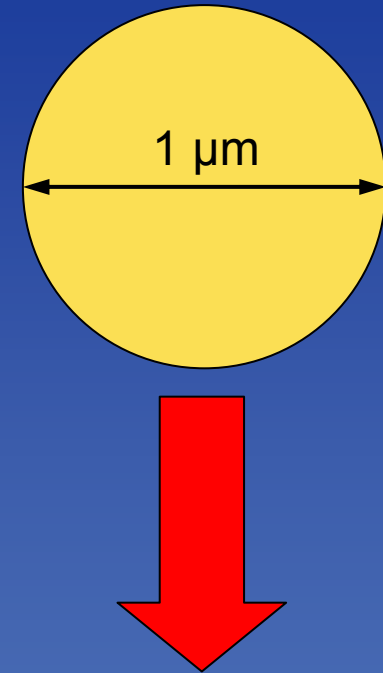
ASPECTE PARTICULARE:

- Este o tehnică blândă. Acest lucru este important în biologia celulară, când capacitățile funcționale ale celulelor izolate nu trebuie alterate în timpul separării.
- Se pretează foarte bine la manipularea aseptică. Echipamentele sunt ușor de asamblat, curățat și sterilizat.
- D.p.d.v. practic, sedimentarea „neajutată” poate fi prea lentă dacă vitezele de sedimentare sunt mici. La scară industrială, durata prea mare a procesului poate periclita creșterea microbiană sau poate accelera degradări enzimatiche nedorite.
- În forma ei cea mai simplă, sedimentarea gravitațională poate fi cea mai ieftină tehnică de separare a celulelor.
- Este o operație simplă și fezabilă. Spre deosebire de centrifugare, de ex., nu necesită o pregătire specială a personalului de exploatare.



SEDIMENTAREA GRAVITAȚIONALĂ

- Ca regulă generală, sedimentarea gravitațională poate fi utilizată pentru separare dacă diametrul celulelor depășește $1\ \mu\text{m}$.
- La dimensiuni mai mici ale particulelor trebuie avute în vedere alte opțiuni: centrifugare, ultracentrifugare, filtrare, separare membranară.



SEDIMENTAREA GRAVITAȚIONALĂ

- Factori care influențează sedimentarea gravitațională a celulelor în faza lichidă:
 - diferența dintre densitatea celulei (ρ_c) și densitatea mediului lichid înconjurător (ρ_l);
 - densitatea fazei lichide (ρ_l);
 - mărimea, forma și concentrația celulelor;
 - viscozitatea fazei lichide (μ_l).

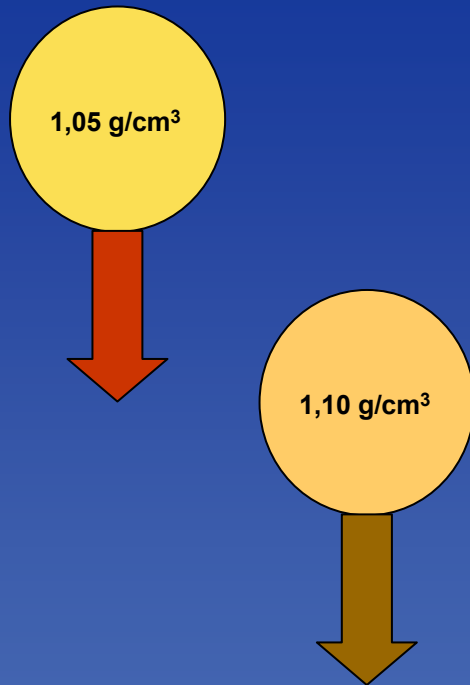
**Legea lui Stokes
modificată:**

$$v_0 = \frac{1}{18} \cdot \frac{(\rho_c - \rho_l)}{\mu_l} \cdot d_c^2 \cdot g$$

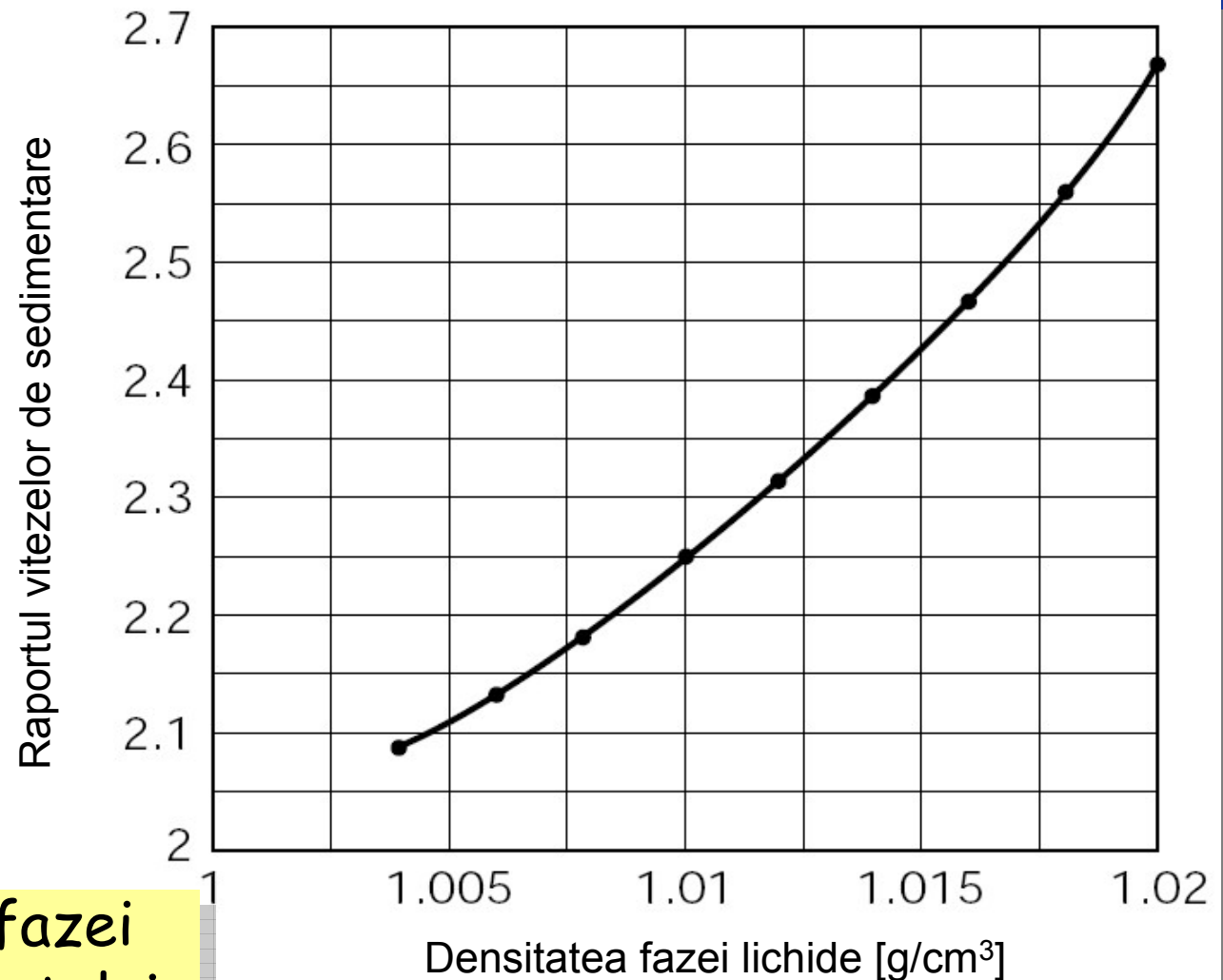
$$\text{Re} < 1$$



SEDIMENTAREA GRAVITAȚIONALĂ



Efectul densității fazei lichide asupra raportului vitezelor de sedimentare



SEDIMENTAREA GRAVITAȚIONALĂ

Raza particulei [nm]	Distanța parcursă
0,1	0,08 nm
1,0	8 nm
10	0,8 μm
100	80 μm
1000	8 mm

Distanța parcursă în timp de 1 h de o particulă sferică ($\rho_c = 2,0 \text{ g/cm}^3$) printr-un lichid ($\rho_l = 1,0 \text{ g/cm}^3$) la 298 K

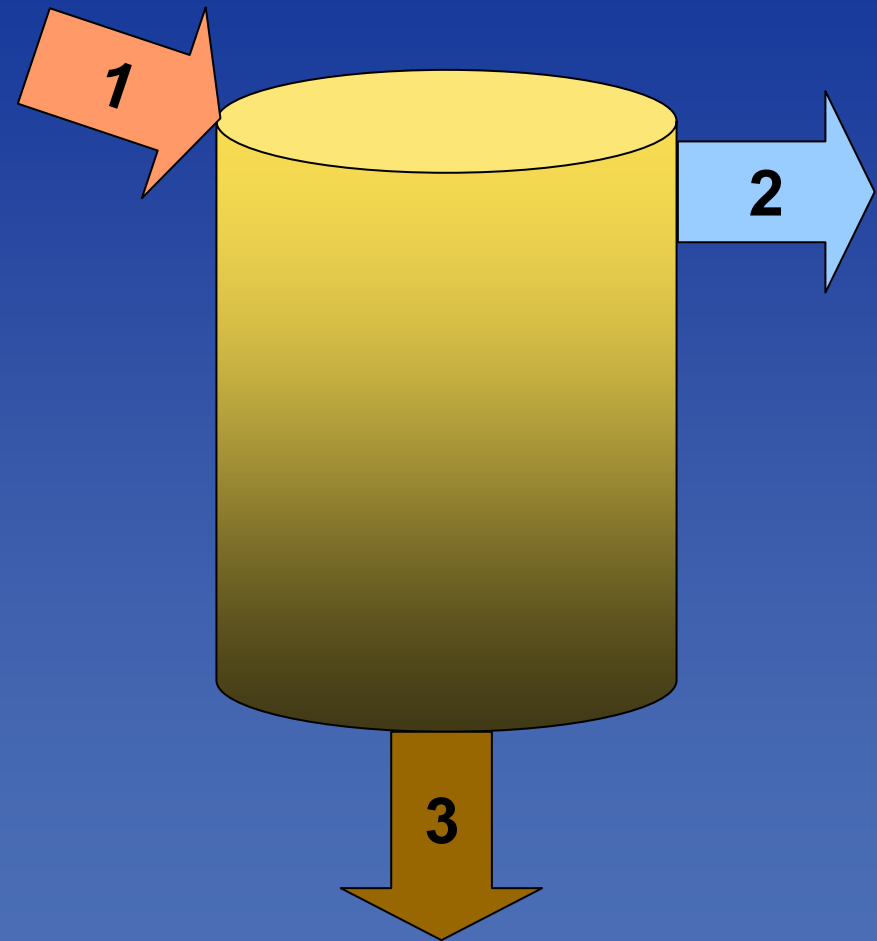
Tipul de celulă	Dimensiuni [nm]
Virusi bacterieni	0,08
Bacterii	0,1 – 2,5
Celule de drojdie	2 – 10
Eritrocite umane	6 – 8
Leucocite umane	8 – 12
Fungii filamentoase	10 – 40
Celule de ficat uman	30
Celule vegetale	10 – 100
Protozoare	100 – 200

Dimensiuni tipice ale unor celule



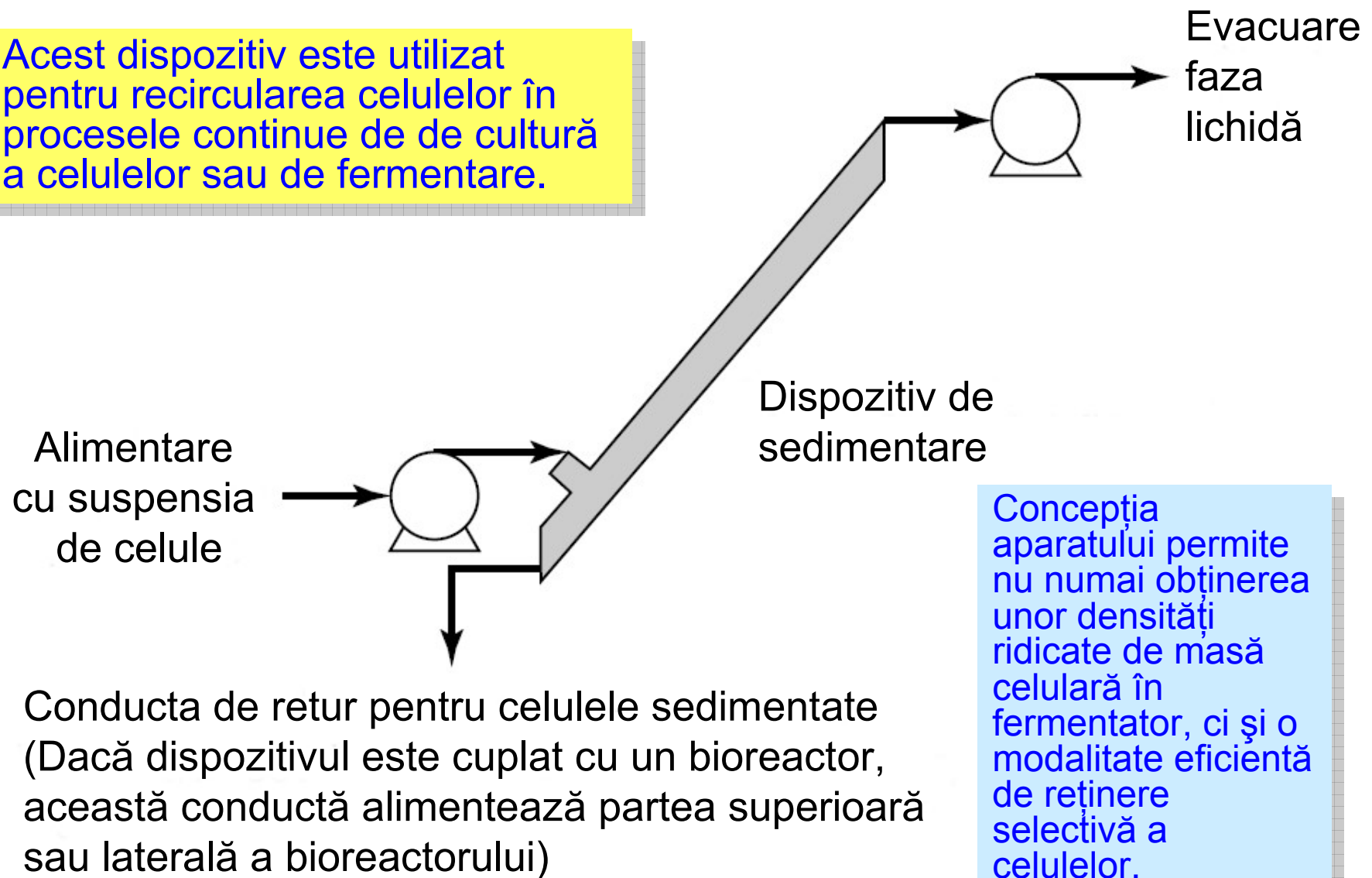
SEDIMENTAREA GRAVITAȚIONALĂ

- În aplicațiile industriale, sedimentarea gravitațională decurge de regulă în **rezervoare de sedimentare specifice**, prevăzute cu:
 - racord de alimentare (1),
 - racord de evacuare sau de preaplin (2),
 - racord pentru evacuarea materialului sedimentat (3).



SEDIMENTAREA GRAVITAȚIONALĂ

Acest dispozitiv este utilizat pentru recircularea celulelor în procesele continue de cultură a celulelor sau de fermentare.



Concepția aparatului permite nu numai obținerea unor densități ridicate de masă celulară în fermentator, ci și o modalitate eficientă de reținere selectivă a celulelor.

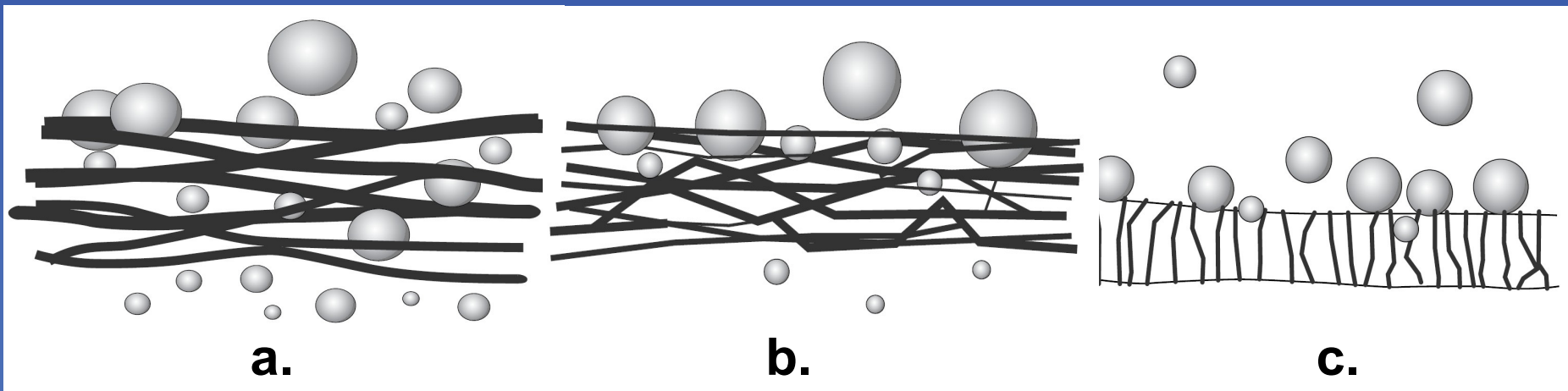
SEPARAREA PRIN FILTRARE

- Ca operație unitară, filtrarea este rezultatul a trei procese elementare:
 - (1) **sedimentarea** - proces prin care particulele solide se depun pe stratul/suprafața filtrantă ca într-un decantor,
 - (2) **cernerea** - sunt reținute acele particule solide care au dimensiuni mai mari decât dimensiunile porilor stratului/suprafeței filtrante,
 - (3) **adsorbția** - particulele mai mici decât deschiderea porilor stratului/suprafeței filtrante sunt reținute prin forțe de suprafață în interiorul porilor, provocând colmatarea (înfundarea) filtrului.



SEPARAREA PRIN FILTRARE

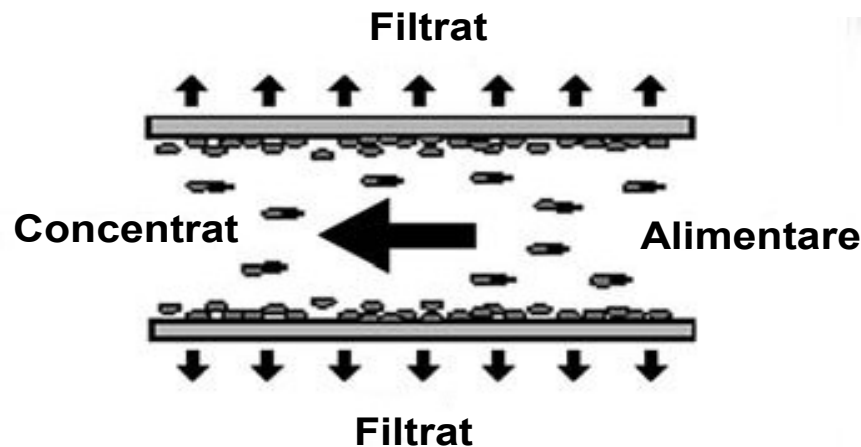
- În funcție de proprietățile materialului filtrant, unul dintre aceste procese elementare poate deveni determinant în filtrare, astfel încât putem vorbi despre:
 - (a) filtrare în adâncime,
 - (b) filtrare superficială,
 - (c) filtrare cu efect de sită.



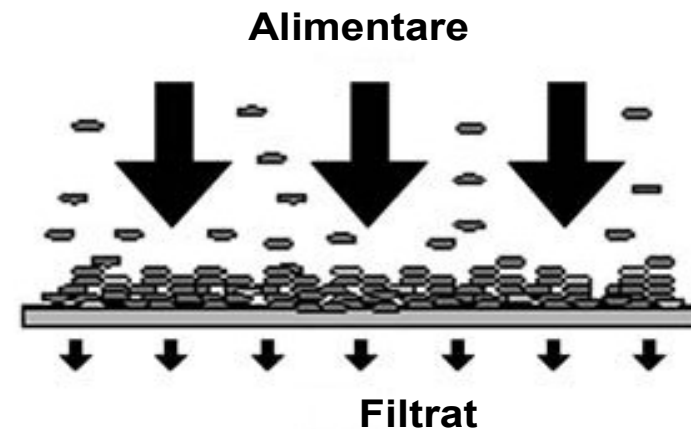
SEPARAREA PRIN FILTRARE

Față de suprafața filtrantă faza fluidă poate curge:

- **a - tangențial** = „filtrare în curent încrucișat” (cross flow filtration)
- **b - perpendicular** = filtrare fără ieșire (dead-end filtration)



a



b

SEPARAREA PRIN FILTRARE

- Ușurința filtrării depinde de proprietățile solidului și ale fluidului;
- Solide cristaline necompresibile din lichide cu viscozitate redusă = operație relativ simplă.
- Masa celulară din lichidele de fermentație = operație dificilă (dimensiuni reduse ale celulelor, comportare nenewtoniană a lichidelor de fermentație).
- Factorul determinant = natura masei celulare:
 - caracter fibros,
 - caracter mucilaginos,
 - caracter de pastă.
- Majoritatea celulelor microbiene formează precipitate compresibile, a căror porozitate scade pe măsură ce filtrarea avansează.



SEPARAREA PRIN FILTRARE

- Filtrarea este o operație care decurge în regim dinamic, nestaționar.
- Întrucât procesul de filtrare este influențat de un număr foarte mare de factori, o teorie a filtrării simplă și concomitent utilă din punct de vedere practic nu poate fi dezvoltată.
- Teoriile simple existente (teoria filtrului ideal, teoria filtrării prin stratul de precipitat, teoria filtrării prin stratul de precipitat cu luarea în considerare a suportului), completate cu determinări experimentale, servesc la proiectarea filtrelor și la conducerea rațională a filtrării.



SEPARAREA PRIN FILTRARE

- În conformitate cu teoria filtrării prin stratul de precipitat cu luarea în considerare a suportului, în cazul filtrării la cădere de presiune constantă volumul specific de filtrat poate fi determinat pe baza ecuației:

$$V_s^2 + 2\alpha \cdot V_s = \beta \cdot t \quad (2.2)$$



SEPARAREA PRIN FILTRARE

$$V_s^2 + 2\alpha \cdot V_s = \beta \cdot t \quad (2.2)$$

- V_s [m³/m²] este volumul de filtrat V [m³] care în timpul t [s] trece printr-un m² de suprafață filtrantă,
- α este coeficientul de rezistență al materialului filtrant [m³/m²],
- β este coeficientul de rezistență al precipitatului [m²/s].



SEPARAREA PRIN FILTRARE

- Dacă rezistența materialului filtrant este mult mai mică decât rezistența stratului de precipitat, iar stratul de precipitat este incompresibil, ecuația (2.2) devine:

$$V_s^2 = \left(\frac{V}{A} \right)^2 = \beta \cdot t = \frac{2 \cdot \Delta P}{\mu \cdot r \cdot C_s} \cdot t \quad (2.3)$$



SEPARAREA PRIN FILTRARE

- V [m^3] este volumul de filtrat colectat în timpul t [s],
- A este aria suprafeței filtrante [m^2],
- ΔP este diferența de presiune de pe fețele filtrului [Pa],
- μ este viscozitatea fazei lichide [$\text{Pa}\cdot\text{s}$],
- r este rezistența specifică a stratului de precipitat [m/kg],
- C_s este conținutul de fază solidă din suspensia supusă filtrării [kg/m^3].



SEPARAREA PRIN FILTRARE

- Viteza filtrării este exprimată uzual prin debitul de filtrat colectat.
- Ecuația (2.3) pusă sub forma (2.6):

$$m_V = \frac{V}{t} = \frac{2 \cdot A^2 \cdot \Delta P}{\mu \cdot r \cdot C_S \cdot V} \quad (2.6)$$

arată că:



SEPARAREA PRIN FILTRARE

- Debitul de filtrat (m_v) este:
 - **direct proporțional** cu:
 - pătratul ariei suprafeței filtrante,
 - **invers proporțional** cu:
 - rezistența specifică a stratului de precipitat,
 - viscozitatea fazei lichide,
 - volumul suspensiei,
 - concentrația suspensiei.
- Pe baza acestei ecuații se pot stabili o serie de măsuri care pot fi luate pentru îmbunătățirea procesului de filtrare al unei suspensii date.



SEPARAREA PRIN FILTRARE

Îmbunătățirea procesului de filtrare:

- Creșterea ariei suprafeței filtrante, A
- Creșterea valorii diferenței de presiune pe fețele filtrului, ΔP
- Reducerea masei precipitatului, $C_s = m_p/V$
- Reducerea viscozității fazei lichide, μ
- Reducerea rezistenței specifice a stratului de precipitat, r :

$$r = \frac{\varphi \cdot \sigma^2 \cdot (1 - \varepsilon)}{\varepsilon^3 \cdot \rho_p}$$

(2.5)



SEPARAREA PRIN FILTRARE

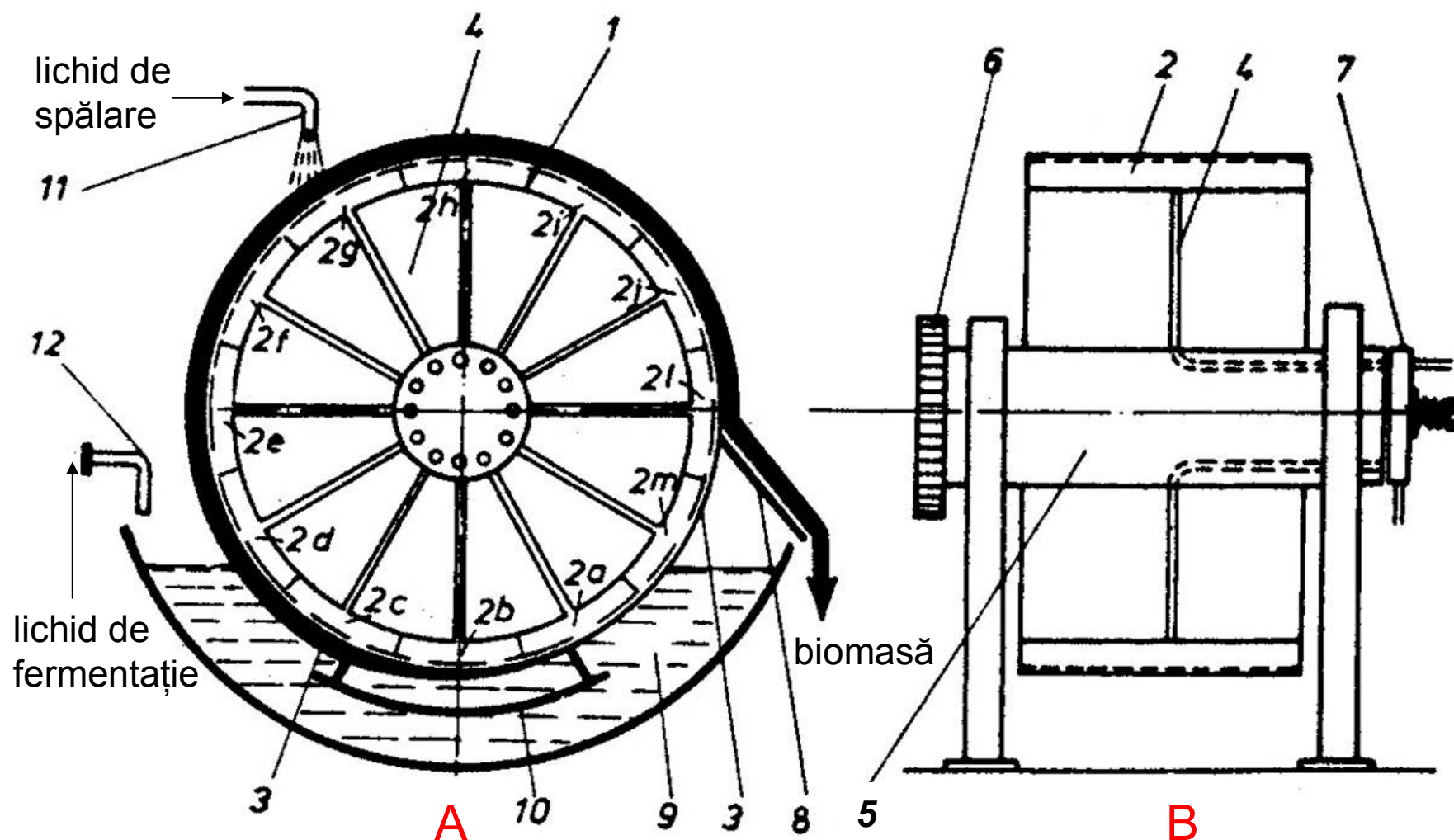
- *Creșterea porozității, ε .* Porozitatea scade pe măsură ce are loc filtrarea celulelor. Reducerea acestui efect se poate realiza utilizând adjuvanți.
- *Reducerea valorii factorului de formă, ϕ .* În cazul suspensiilor de micelii, morfologia celulelor se poate schimba modificând condițiile de fermentare.
- *Reducerea suprafeței specifice a particulelor, σ .* Creșterea dimensiunilor medii ale particulelor și minimizarea variațiilor în mărimea particulelor conduce la scăderea lui σ . Acest efect se poate atinge prin schimbarea condițiilor de fermentare sau prin condiționarea suspensiei (adaosuri de floculanți și/sau coagulanți) înainte de filtrare.



Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare

- Filtrarea lichidelor de fermentație care conțin **masă celulară cu caracter fibros** (culturi de fungi din clasele *Aspergillus* și *Penicillium*) este o operație relativ ușoară, miceliul necolmatând materialul filtrant și desprinzându-se ușor de pe acesta.
- La nivel de operare industrială se recomandă filtrele rotative cu vid (filtrele Oliver):
 - conferă o suprafață mare de filtrare,
 - posibilități de spălare a miceliului pe filtru pentru, recuperarea avansată a produselor utile,
 - se pretează la automatizare.





Filtru celular rotativ cu vid (Oliver)

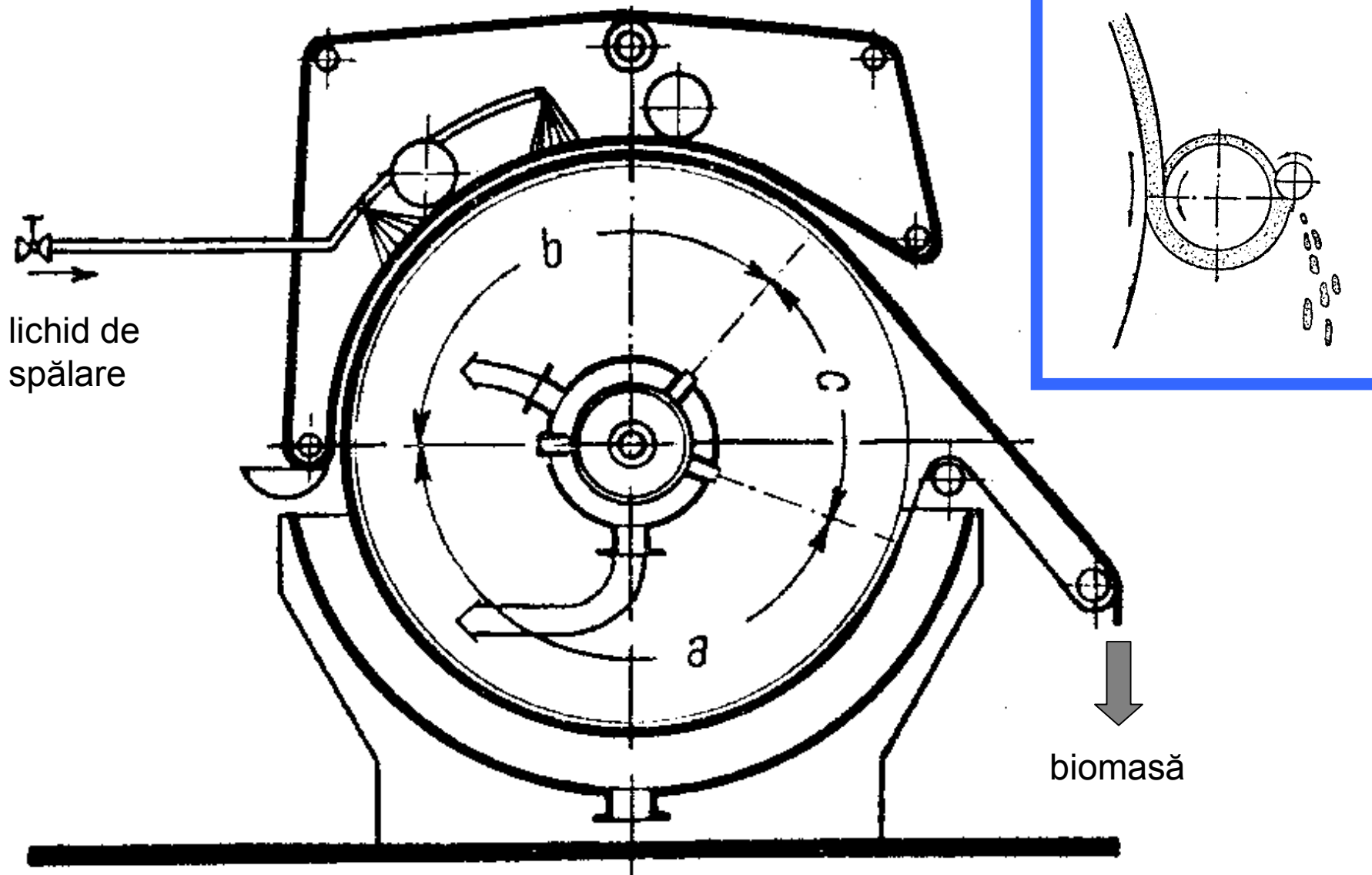
A – secțiune transversală; B – secțiune longitudinală

1 – tambur rotativ; 2 – celule; 3 – material filtrant; 4 – tuburi de legătură între celule și capul de distribuție;
 5 – arbore; 6 – roată dințată acționare; 7 – cap de distribuție; 8 – racletă desprindere precipitat; 9 – cuvă;
 10 – agitator pendular; 11 – racord alimentare lichid de spălare; 12 – racord alimentare lichid de fermentație (suspensia de masă celulară).

Filtrul celular rotativ cu vid (Oliver)

- Dezavantajele filtrului celular rotativ cu vid:
 - etanșarea defectuoasă a celor două discuri ale capului de distribuție;
 - griparea suprafeței șlefuite a discurilor prin particule de solid scăpate în filtrat;
 - spălarea insuficientă a biomasei, datorită depunerii sale într-un strat cu grosime inegală, sau prin apariția fisurilor în stratul de biomasă depus;
 - eliminarea nesatisfăcătoare a apei în faza de desecare a precipitatului de biomasă;
 - evacuarea defectuoasă a biomasei cu ajutorul racletei de desprindere.





Filtru rotativ celular cu vid perfecționat

a – zonă de filtrare; b – zonă de spălare; c – zonă de desprindere a precipitatului.

În medalion: desprinderea precipitatului cu ajutorul ruloului de preluare

Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare

- Dimensionarea filtrelor = stabilirea suprafeței necesare de filtrare, A .
- Uzual, $A = 5 \div 40 \text{ m}^2$
- Pentru o durată t a filtrării impuse, cunoscându-se forța motoare a filtrării (ΔP), caracteristicile suspensiei și ale precipitatului, aria filtrului în funcție de debitul de suspensie prelucrat se determină pe baza ecuației (2.3).

$$V_s^2 = \left(\frac{V}{A} \right)^2 = \beta \cdot t = \frac{2 \cdot \Delta P}{\mu \cdot r \cdot C_s} \cdot t \quad (2.3)$$



Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare

- Pentru precipitate compresibile, valoarea V_S obținută prin calcul se corectează prin înmulțire cu coeficienții K_1 și K_2 :

$$(V_S)_{corectat} = K_1 \cdot K_2 \cdot (V_S)_{calculat}$$

$$\text{unde: } K_1 = \sqrt{\frac{50}{C_S}} ; \quad K_2 = \sqrt{\Delta P}$$

(2.7)



Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare

- Pentru filtrele rotative continue, † reprezintă durata unui ciclu de filtrare, putându-se calcula cu relația:

$$t = \frac{1}{n} \cdot \frac{\Phi}{100} \text{ [s]}$$

(2.8)

- în care:
 - n = turația filtrului (s^{-1}),
 - Φ = gradul de scufundare al filtrului în mediul supus filtrării (%).



Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare

- Viteza de filtrare se determină în funcție de volumul de filtrat obținut pe unitatea de suprafață de filtrare într-un ciclu de filtrare:

$$v_f = \frac{(V_s)_{corectat}}{t} \quad [\text{m}^3/(\text{m}^2.\text{s})] \quad (2.9)$$



Viteza de filtrare a unor lichide de fermentație

Lichid de fermentație (produs)	C_s [kg/m ³]	Caracteristicile filtratului		Tipul filtrului	v_f [L/(m ² .h)]
		μ [Pa.s]	r [m/kg]		
<i>Penicillium</i> (peniciline G și V)	50	10,3	$3,1 \cdot 10^{11}$	filtru rotativ cu vid filtru rotativ cu strat adjuvant	238 - 256 1413 - 1848
<i>Streptomyces</i>	28	3,92	$1,6 \cdot 10^{14}$	filtru presă	12,5
<i>S. kanamyceticus</i> (kanamicina)				filtru rotativ cu strat adjuvant	87
<i>S. fradiae</i> (neomicina)				filtru rotativ cu strat adjuvant	130
<i>S. lincolnensis</i> (lincomicina)	18,5	9,8	$3,5 \cdot 10^{12}$	filtru presă filtru rotativ cu strat adjuvant	58 380
<i>Bacillus subtilis</i> (proteaze)				filtru rotativ cu strat adjuvant	109 - 435
Hidrolizat de drojdii				filtru rotativ cu strat adjuvant	304

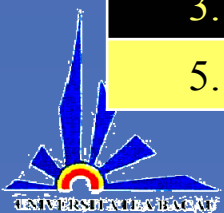


Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare

- În funcție de viteza de filtrare se determină turația optimă a tamburului, la diferite valori ale rezistenței precipitatului depus (r) și ale gradului de scufundare a filtrului în suspensie (Φ).

Viteza de filtrare a lichidelor de fermentație a *P. Chrysogenum*
($\Delta P = 0,054$ MPa, $\Phi = 40$ %)

r [m/kg]	Viteza medie de filtrare, v_f [L/((m ² .h))] la				
	$n = 1$ rpm	$n = 2$ rpm	$n = 3$ rpm	$n = 4$ rpm	$n = 5$ rpm
$2 \cdot 10^{11}$	1140	740	617	530	407
$3 \cdot 10^{11}$	875	615	500	342	390
$5 \cdot 10^{11}$	606	432	356	306	375

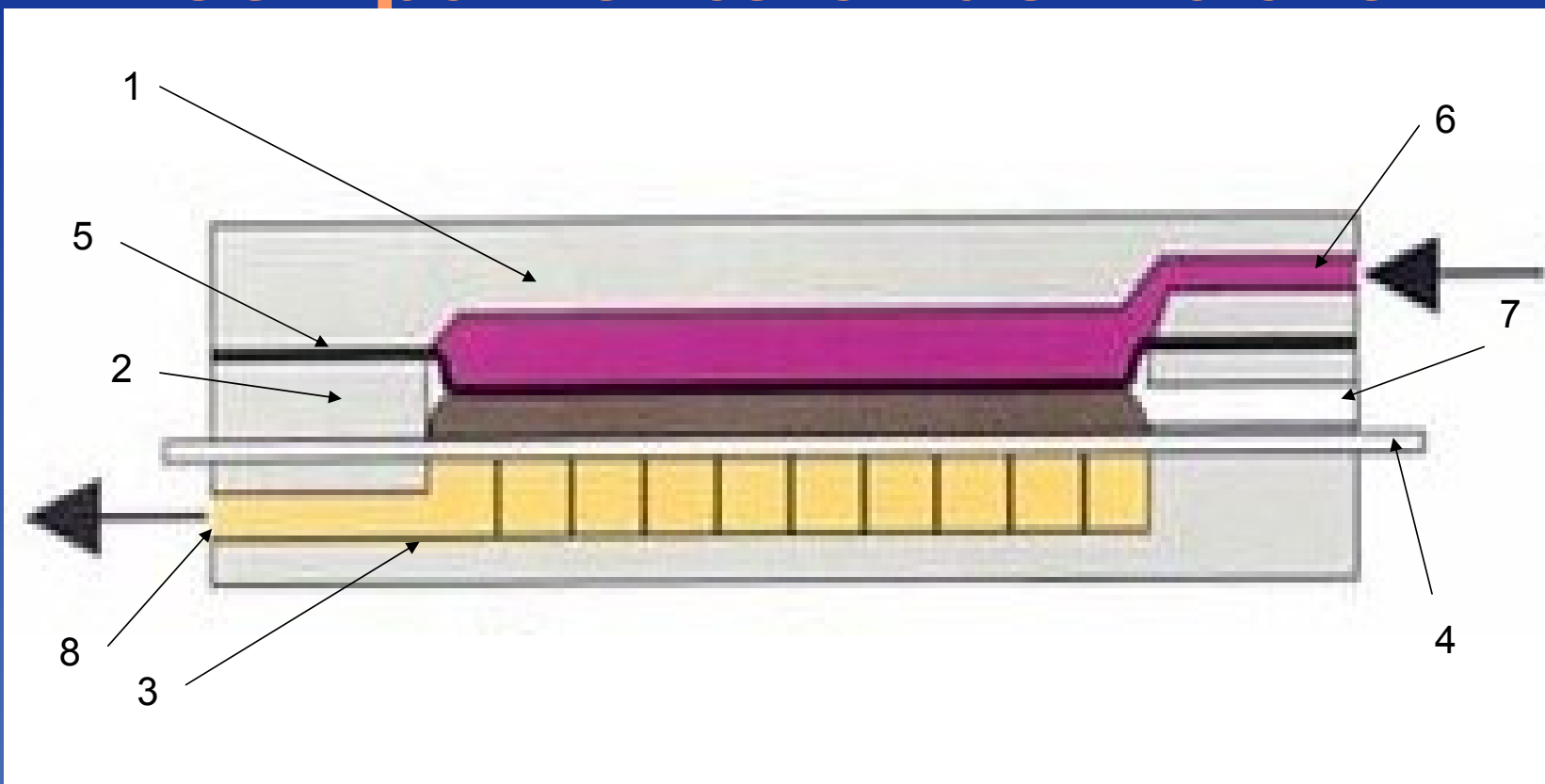


Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare

- Pentru capacități de producție mici se pot utiliza și **filtrele presă**:
 - acumulează treptat biomasa
 - sunt deschise periodic pt. îndepărtarea pp.
 - sunt operate în regim discontinuu
 - îndepărtarea pp. = operație costisitoare și greoaie, necesitând munca manuală.
- **Filtrele presurizate Larox**:
 - funcționează în regim pseudocontinuu
 - se pretează la automatizare pe scară largă.



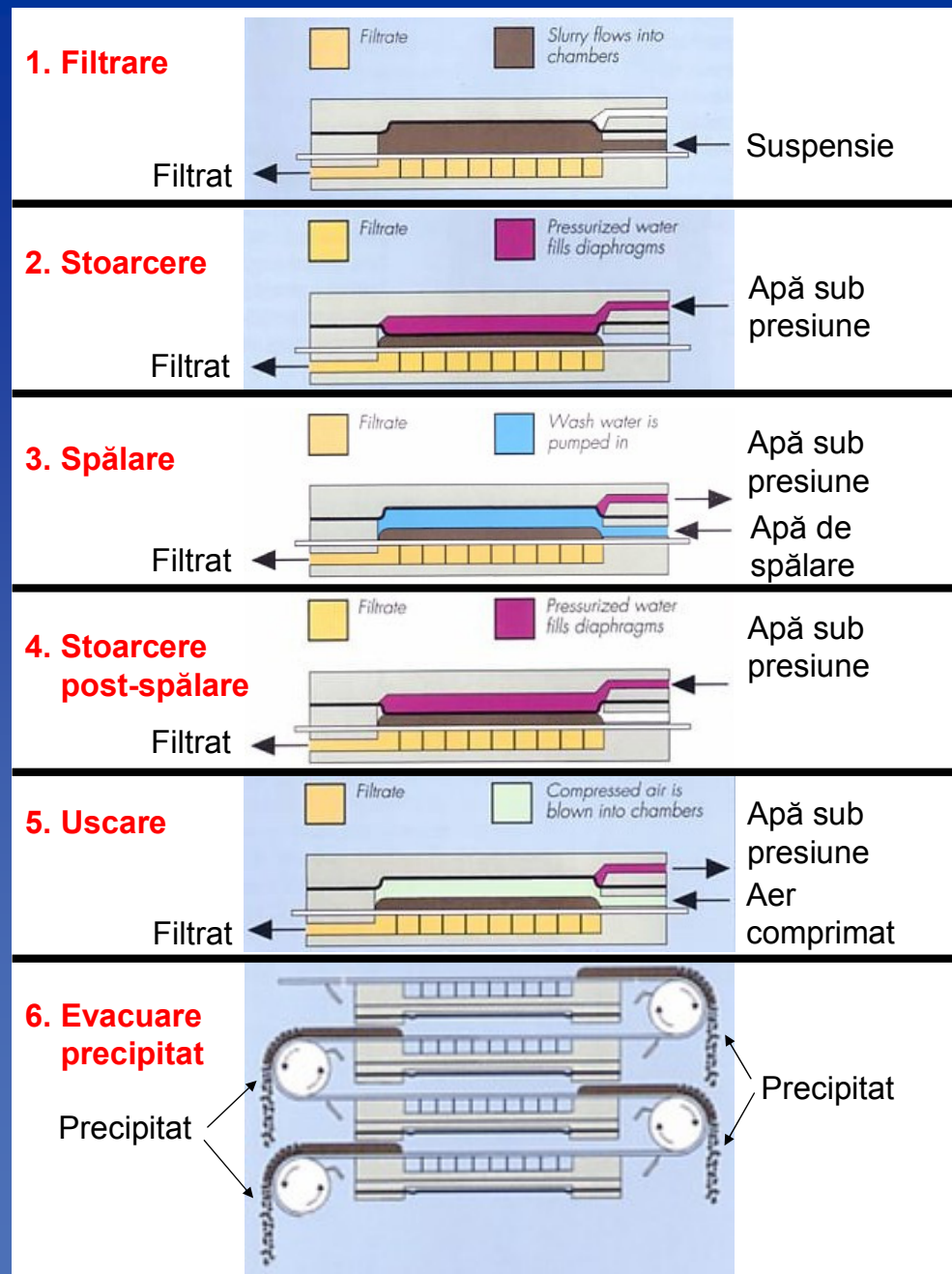
Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare



Unitate de filtrare a unui filtru presurizat Larox

1 – camera superioară; 2 – camera intermediară; 3 – camera inferioară; 4 – pânză filtrantă; 5 – membrană elastică; 6 – racord de alimentare cu apă sub presiune; 7 – racord de alimentare cu suspensie/apă de spălare/aer comprimat; 8 – racord de evacuare a filtratului.

Etapele procesului de filtrare într-un filtru presurizat Larox



Alegerea și dimensionarea echipamentelor de filtrare



Caracteristica	Valoare
Suprafață filtrantă	1,6 – 144 m ²
Capacitate maximă	150 t/h substanță uscată
Presiune de operare	max. 1,6 MPa
Putere consumată:	
-unități de 9,5 – 38 m ²	18,5 kW (5,5 – 15 kW pentru presare diafragme)
-unități de 48 – 144 m ²	86 kW (diafragme acționate pneumatic)

Îmbunătățirea filtrării

- Separarea antibioticelor cu schimbători de ioni direct din suspensia celulară, utilizarea centrifugelor sau a filtrelor presă nu au dat rezultatele scontate:
- rezolvarea problemei filtrării lichidelor de fermentație trebuie începută cu modificarea radicală a caracteristicilor de filtrabilitate a acestora, pentru:
 - mărirea vitezei de filtrare
 - reducerea pierderilor de produse utile.

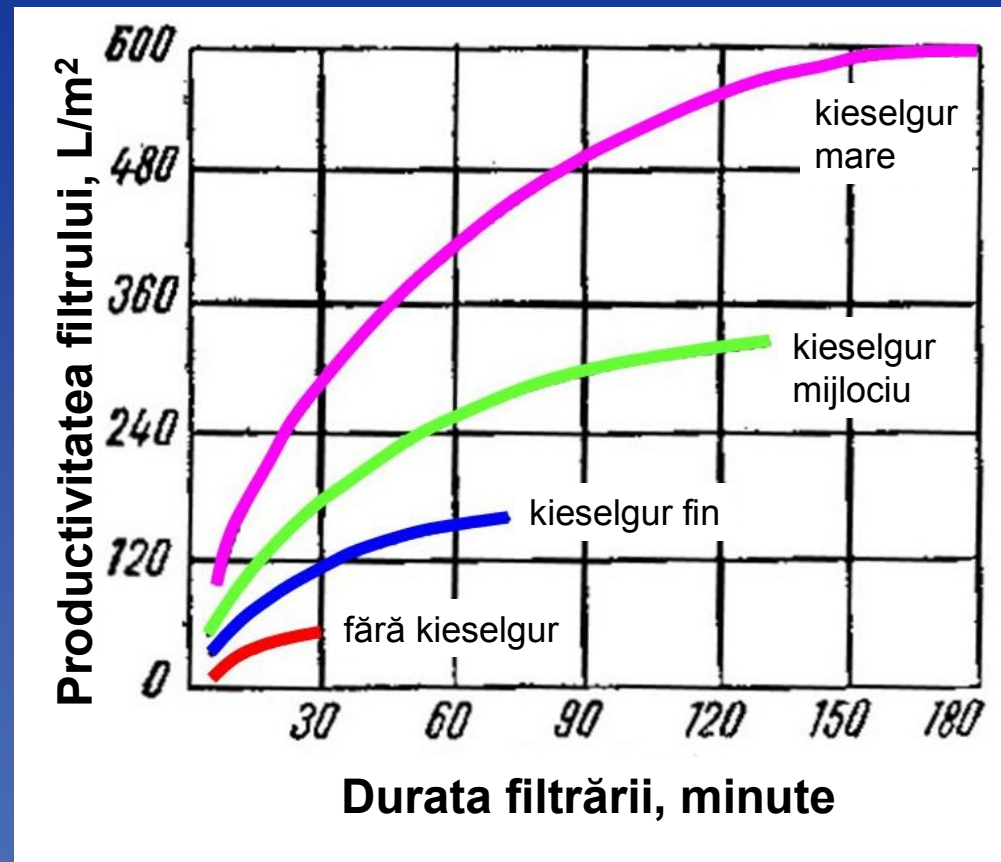
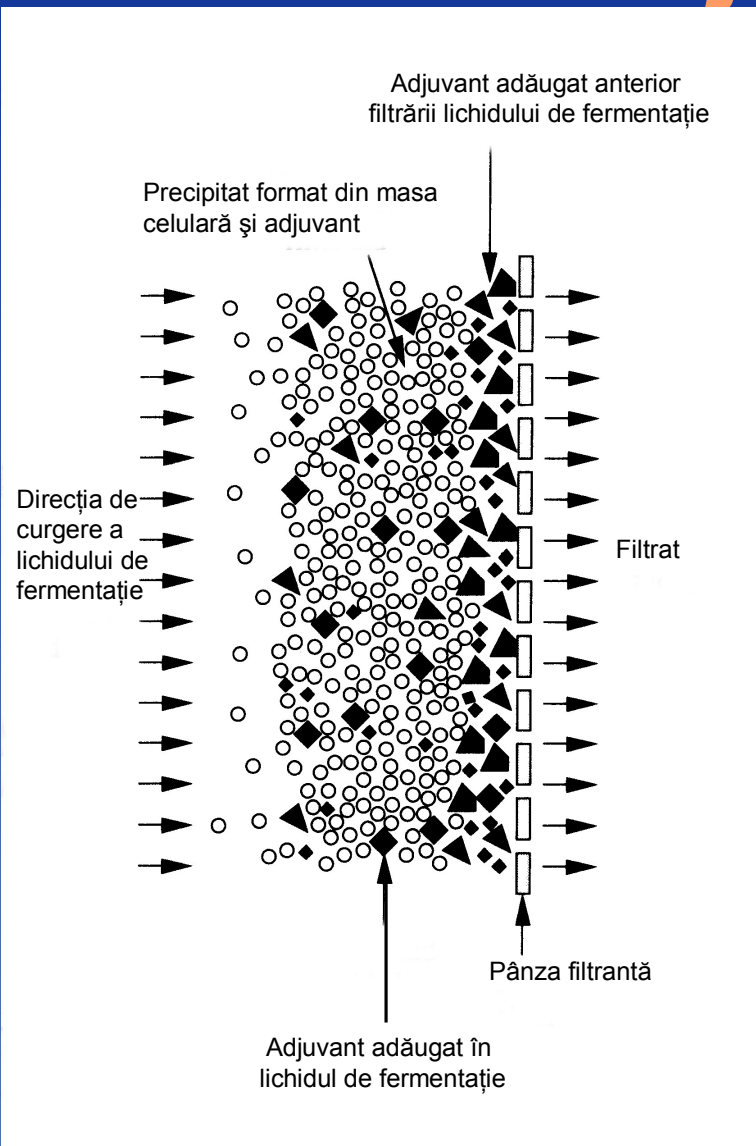


Îmbunătățirea filtrării

- Pt. mărirea vitezei de filtrare, lichidele de fermentație se supun unor tratamente preliminare termice, acide sau cu alți agenți chimici, în scopul coagulării moleculelor proteice și a agregării biomasei, cu sau fără adăugarea suplimentară a unor materiale cu rol de strat adjuvant.
- Alegerea metodei de prelucrare preliminară este determinată de:
 - caracteristicile lichidului de fermentație,
 - natura produsului biosintetizat (stabilitate chimică și termică),
 - caracteristicile precipitatelor formate.



Utilizarea adjuvanților de filtrare



Efectul adaosului de kieselgur asupra productivității filtrării

Dezavantajele utilizării adjuvanților de filtrare

- Adăosul de adjuvanți mărește costul filtrării, cantitatea minimă de adjuvant stabilindu-se experimental.
- Kieselgurul adsorbă lichid, și ca urmare, dacă produsul util se găsește în faza lichidă, vor apărea pierderi suplimentare.
- Deși adjuvanții măresc viteza de filtrare, limpiditatea filtratului scade.
- Apar probleme suplimentare cu depozitarea precipitatului: biomasa cu conținut de kieselgur, de ex., nu poate fi utilizată în hrana animalelor decât după îndepărtarea adjuvantului.



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- **Centrifugarea** = tehnică de lucru care permite realizarea unor procese de separare (sedimentare, filtrare, spargerea emulsiilor, extracție, etc.) într-un câmp de forțe centrifugal, procese care uneori sunt dificil sau chiar imposibil de realizat numai sub acțiunea gravitației.



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Aplicații în biotehnologii:
 - separarea masei celulare din lichidele de fermentație,
 - îndepărtarea resturilor celulare,
 - colectarea precipitatelor,
 - prepararea unor medii de fermentare,
 - separarea diferitelor tipuri de celule,
 - extracția diverșilor componenți:
 - alcaloizi,
 - arome,
 - uleiuri esențiale din plante,
 - antibiotice din lichidul de fermentație,
 - steroizi,
 - proteine.



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Primele aplicații ale separării centrifugale:
 - în industria alimentară - procesul de smântânire a laptelui,
 - în biotehnologie - recoltarea masei celulare în fabricarea drojdiei de panificație.



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Forța centrifugă, ca și gravitația este o forță masică.
- O particulă de masă m se rotește cu o viteză unghiulară ω la o rază r față de centrul de rotație, asupra acesteia se manifestă o forță centrifugă $F_c = m\omega^2 r$ orientată în direcție radială.
- Prin analogie cu expresia forței gravitaționale, $F_g = mg$, accelerația centrifugală este $\omega^2 r$.
- În centrifugele de sedimentare, $\omega^2 r \gg g$, astfel încât forțele gravitaționale se pot neglija.



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Raportul dintre forța centrifugă și forța gravitațională, denumit și **factor de eficacitate**, este utilizat deseori ca o măsură a puterii de separare a unei centrifuge :

$$z = \frac{F_C}{F_G} = \frac{m \cdot \omega^2 \cdot r}{m \cdot g} = \frac{\omega^2 \cdot r}{g} \quad (2.11)$$



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Viteza de sedimentare a particulelor sferice în câmp de forțe centrifugal este:

$$\begin{aligned} v_{0C} &= \frac{1}{18} \cdot \frac{(\rho_c - \rho_l)}{\mu_l} \cdot d_c^2 \cdot \omega^2 \cdot r = \\ &= \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho_c - \rho_l)}{\mu_l} \cdot d_c^2 \cdot (\pi \cdot n)^2 \cdot r \end{aligned}$$

(2.12)



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Comparând ecuațiile (2.1) și (2.12) se poate scrie că:

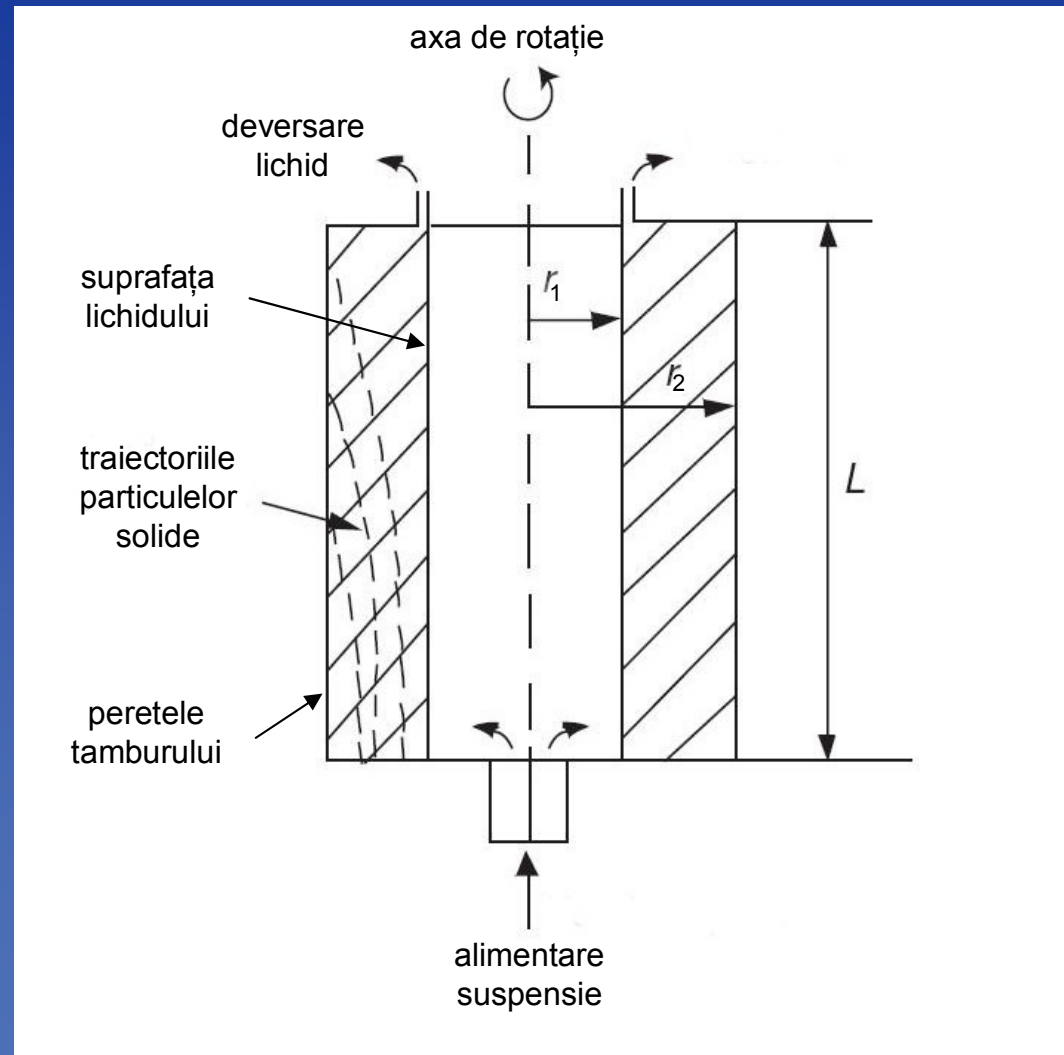
$$v_{0C} = v_{0G} \cdot \frac{\omega^2 \cdot r}{g} = v_{0G} \cdot z \quad (2.13)$$

- adică viteza de sedimentare în câmp centrifugal este de **z** ori mai mare decât în câmp gravitațional.
- În centrifugele industriale, **z** = 300 ÷ 16 000;
- Pentru centrifuge mici de laborator **z** poate atinge și 500 000



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Sedimentarea are loc prin deplasarea particulei dinspre centrul de rotație către peretele tamburului.
- Creșterea vitezei de deplasare a particulei va îmbunătăți sedimentarea.



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Din ecuația (2.12) se poate observa că viteza particulei într-o centrifugă dată poate fi crescută prin:
 - creșterea vitezei (ω) respectiv turației (n) centrifugei;
 - creșterea diametrului particulei, (d_c);
 - creșterea diferenței de densitate dintre particulă și lichid ($\rho_c - \rho_l$);
 - scăderea viscozității fazei lichide (μ_l).



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Performanțele centrifugelor de diferite mărimi pot fi comparate prin intermediul *factorului sigma*, Σ , concept introdus de către Ambler în 1952.
- Ca sens fizic, Σ = aria transversală echivalentă a unui decantor gravitațional care ar produce același efect de sedimentare ca și centrifuga.



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Pt. centrifugele continue:

$$\Sigma = \frac{m_V}{2v_{0G}} \quad (2.18)$$

- m_V = debitul de alimentare cu suspensie [m^3/s],
- v_{0G} = viteza de sed. în câmp gravitațional.

- Pt. mai multe centrifuge, de construcție asemenea, care separă aceeași suspensie ($v_{0G} = \text{ct.}$):

$$\frac{m_{V1}}{\Sigma} = \frac{m_{V2}}{\Sigma} = \dots = 2v_{0G} = \text{const} \quad (2.19)$$



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Ecuațiile pentru evaluarea factorului sigma depind de tipul constructiv al centrifugei:

- centrifuge cu talere conice

$$(2.20) \quad \Sigma = \frac{2\pi \cdot \omega^2 \cdot (N-1)}{3g \cdot \tan \theta} \cdot (r_2^3 - r_1^3)$$

- centrifuge tubulare

$$(2.21) \quad \Sigma = \frac{\pi \cdot \omega^2 \cdot L}{g} \cdot (3r_2^2 + r_1^2) = \frac{2\pi \cdot \omega^2 \cdot L \cdot r^2}{g}$$

- centrifuge decantoare continue cu transportor elicoidal

$$(2.22) \quad \Sigma = \frac{\pi \cdot \omega^2}{g} \left[L_1 \cdot \left(\frac{3}{2} r_2^2 + \frac{1}{2} r_1^2 \right) + L_2 \cdot \left(\frac{r_2^2 + 3r_2 r_1 + 4r_1^2}{4} \right) \right]$$



SEPARAREA PRIN CENTRIFUGARE

- Întrucât ecuațiile (2.20) - (2.22) sunt valabile pentru condiții ideale de operare:

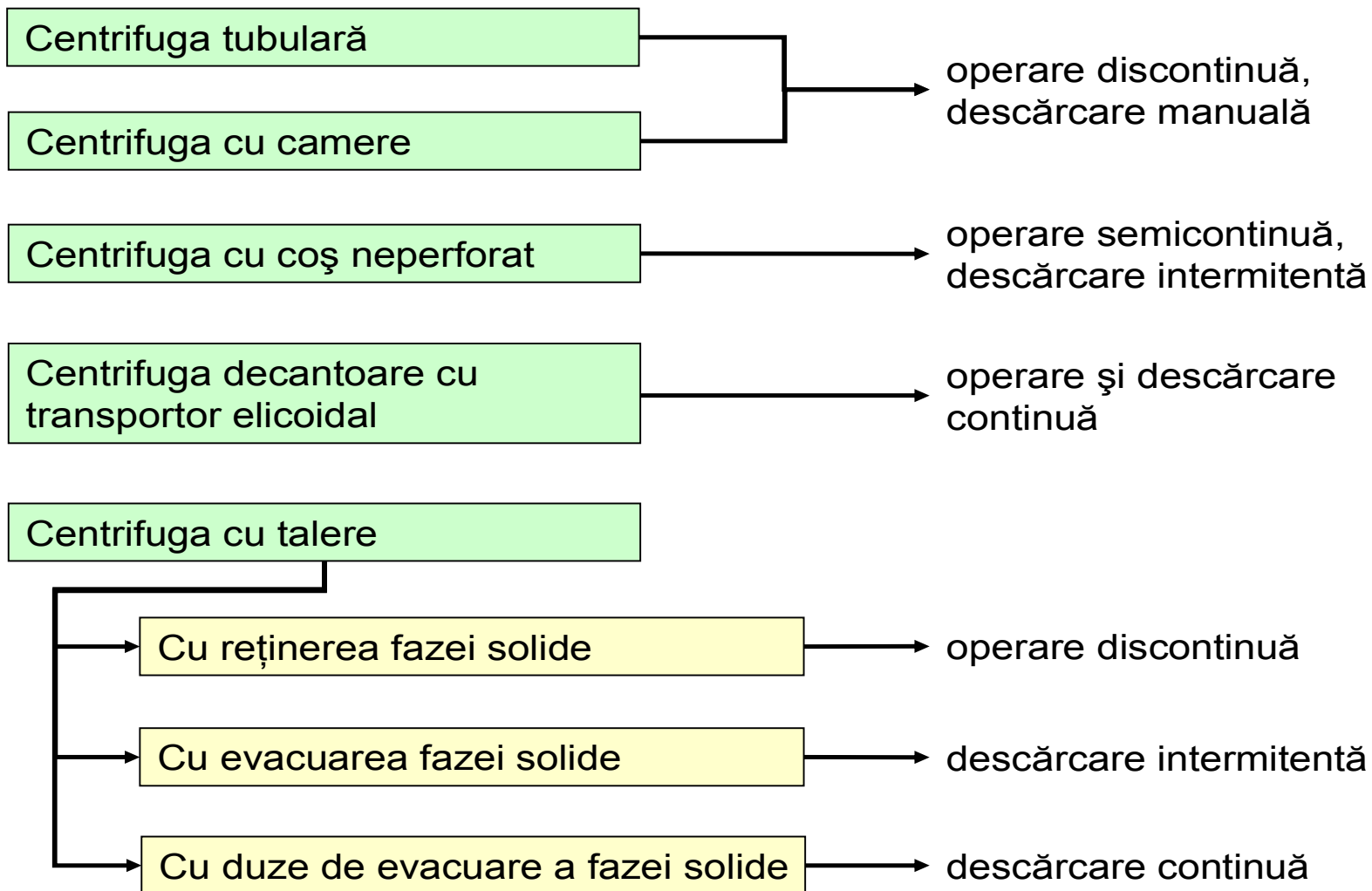
$$(m_V)_{real} = \zeta \cdot v_{0G} \cdot \Sigma \quad (2.23)$$

Factorul de eficiență ζ pentru diferite tipuri de centrifuge

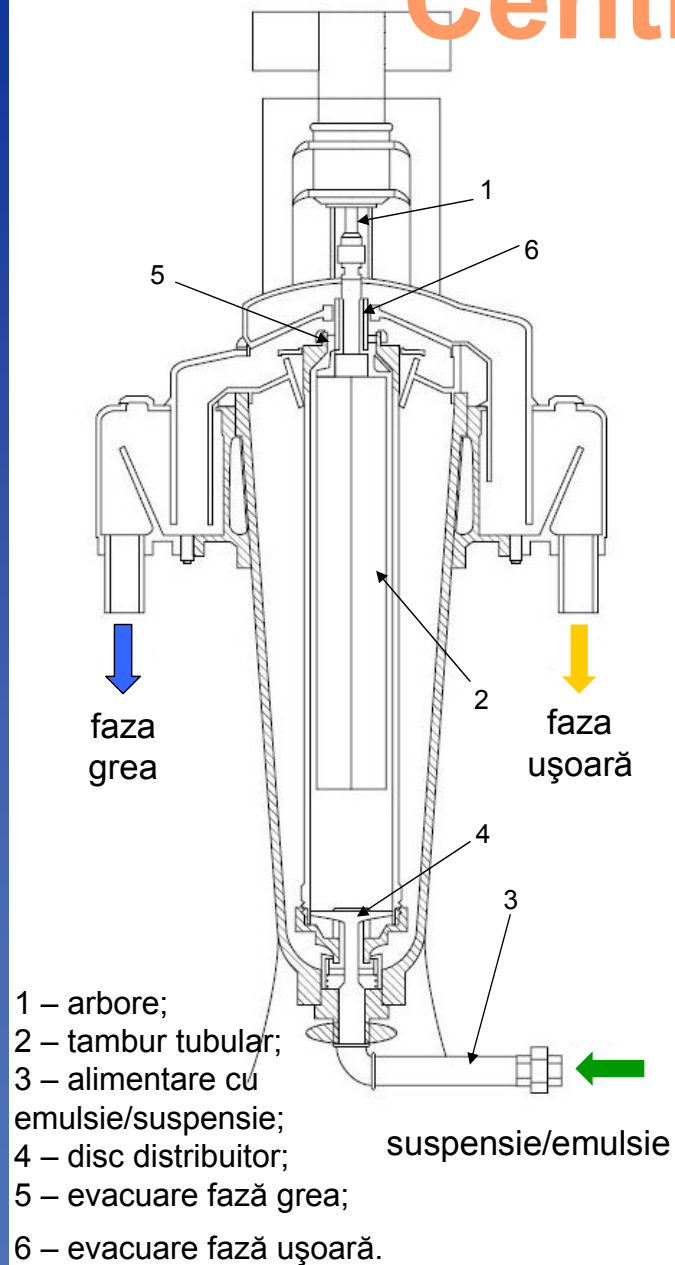
Tipul de centrifugă	Factorul de eficiență ζ [%]
Cu talere conice	45 – 73
Decantoare	54 – 67
Tubulară	90 – 98



Tipuri de centrifuge de sedimentare

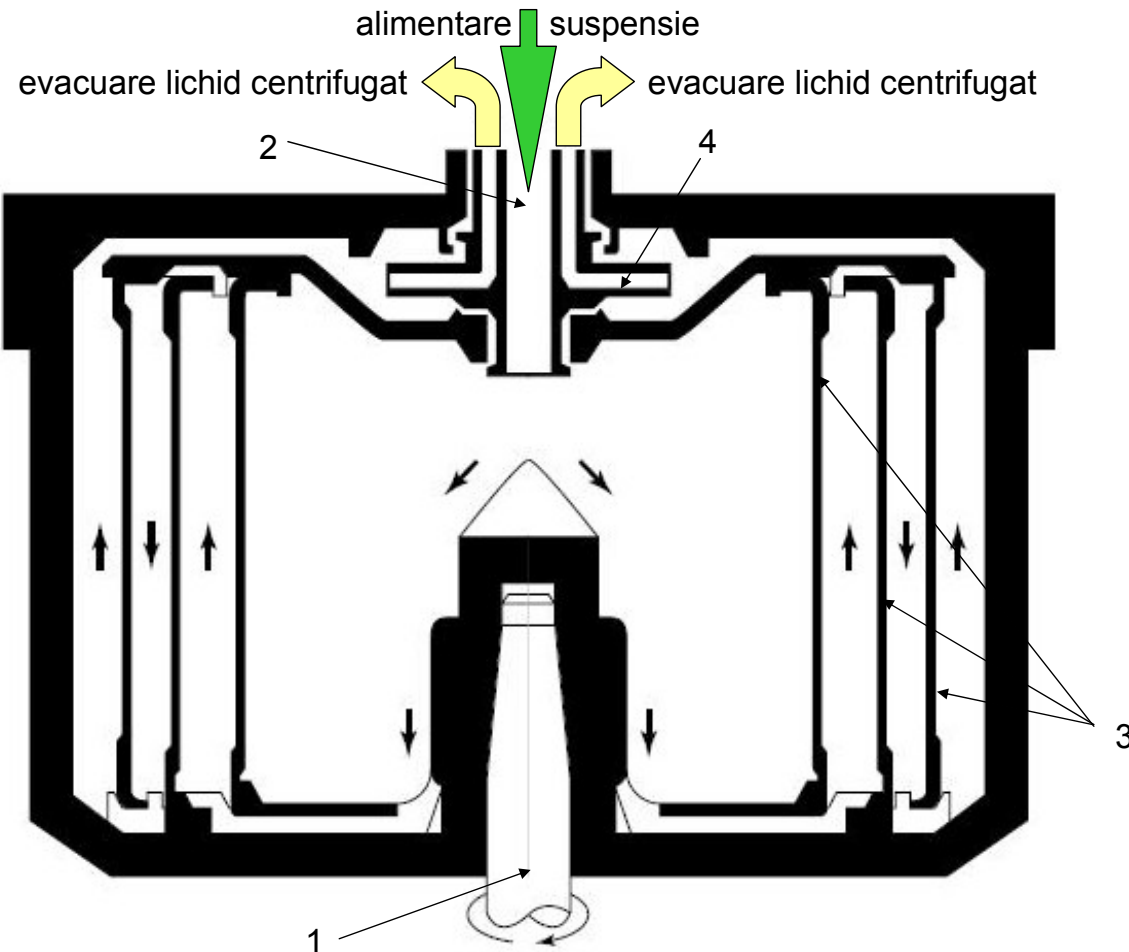


Centrifuga tubulară



- Lichidul evacuat este pompat printr-un disc distribuitor, pentru a evita formarea aerosolilor sau a spumei.
- Pentru îndepărtarea fazei solide acumulate la periferie, centrifuga trebuie oprită și demontată.
- Diametrul tamburului = până la 130 mm, putând reține până la 6 L de fază solidă.
- În modelele industriale, n poate ajunge până la 20 000.
- Aplicații în bioprocese: pentru separarea de vaccinuri, sânge, bacterii, etc.

Centrifuga cu camere



- 1 – arbore;
- 2 – alimentare suspensie;
- 3 – pereți cilindrici formând camere;
- 4 – dispozitiv cu pipe pentru evacuarea lichidului centrifugat.



Centrifuga cu camere

- Utilizează un tambur închis divizat în mai multe compartimente/camere (2 - 6) cilindrice verticale, pe care suspensia îi parcurge consecutiv.
- Ținând seama de razele camerelor, acestea au factorul de eficacitate crescător, de la interior spre exterior.
- Se poate realiza astfel o **centrifugare fracționată**, solidele de dimensiuni mari depunându-se în camerele interioare, iar cele fine în camerele exterioare.
 - **Eficiența - ridicată**, datorită timpului de staționare ridicat al lichidului în utilaj.
 - **Curățirea - dificilă**, fapt care limitează concentrația suspensiei inițiale la 4 - 5 % v/v fază solidă.



Centrifuga cu camere

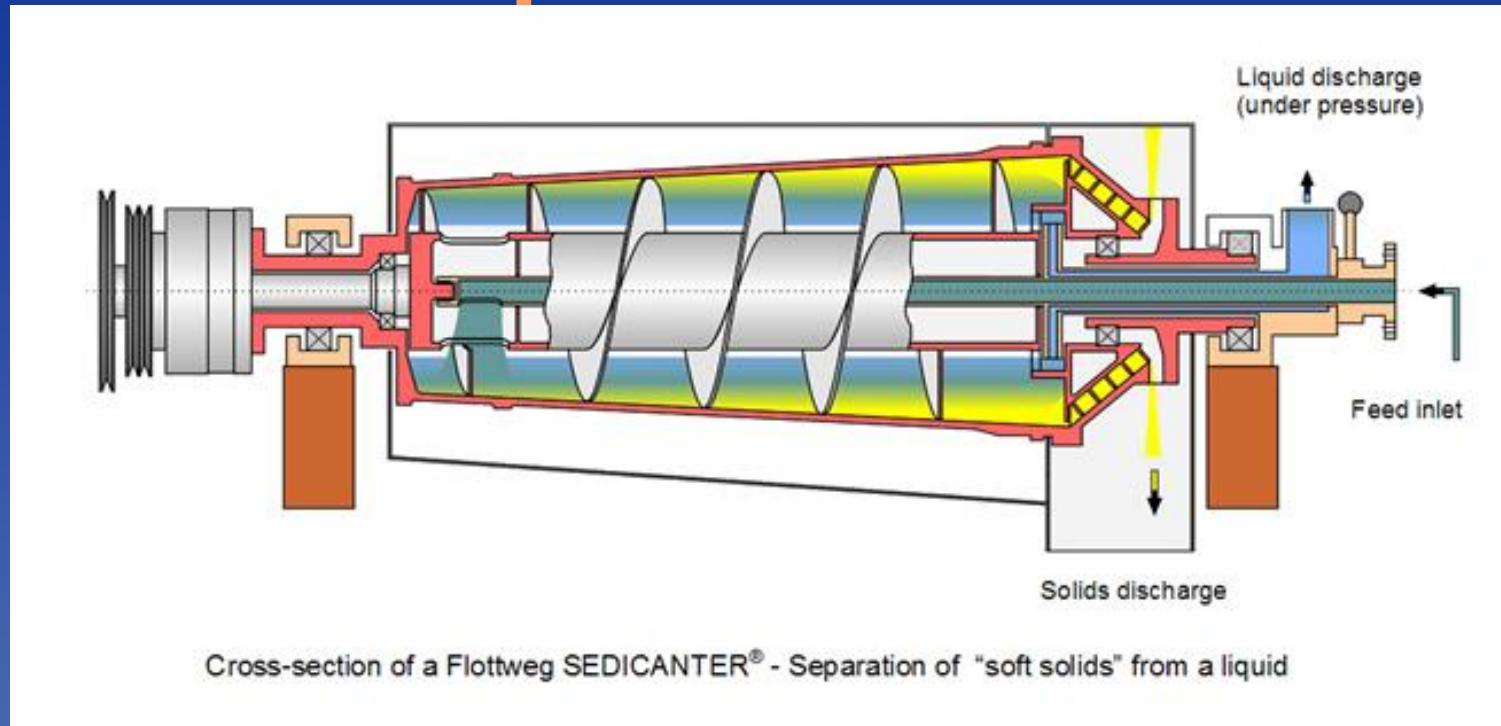
- Caracteristici:

- Turații = 4500 - 8500 rot/min,
- Debite = 2,5 - 10 m³/h,
- Diametru tambur = 335 - 615 mm,
- Capacitate reținere solide = până la 75 L.
- Unele modele includ:
 - canale de răcire în interiorul pereților tamburului,
 - o manta de răcire exterioară,
 - răcirea pompei centripete.

- Sunt utilizate în special în industria alimentară pentru clarificare berii, vinului sau a sucurilor de fructe.



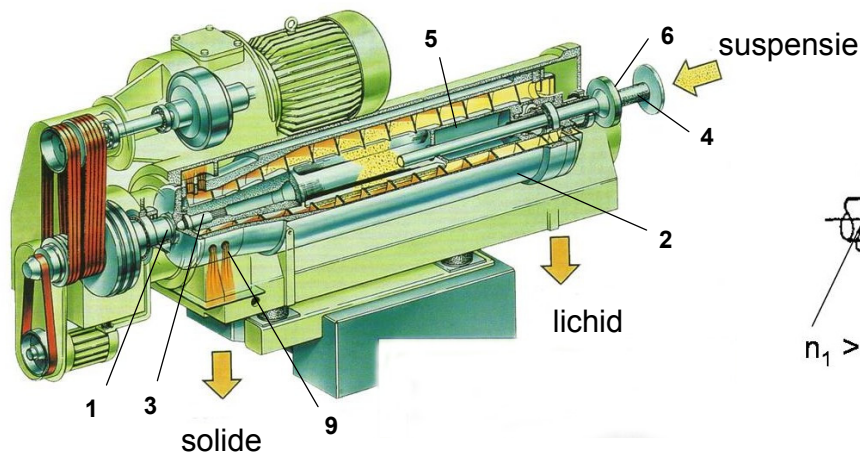
Centrifuga decantoare cu transportor elicoidal



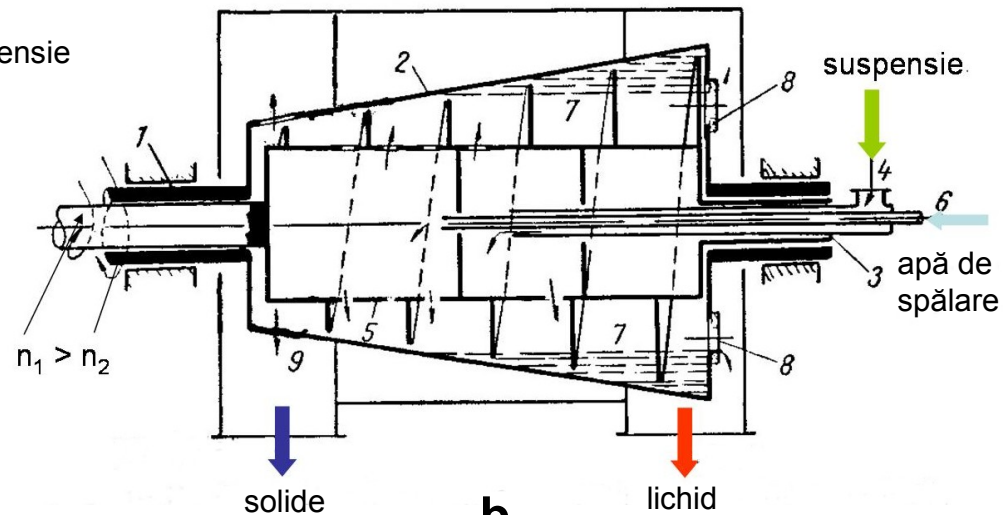
- Echipată cu un tambur conic sau cilindro-conic orizontal având un raport $L : D = 1,5 : 3,5$.
- Tamburul conține un transportor elicoidal care se rotește în aceeași direcție, dar cu o viteză ușor diferită (5 - 100 rot/min).
- Fc mai mici decât în alte tipuri constructive:
 - la turații de 1600 - 6000 rot/min, z poate ajunge până la maximum 5000.
 - Construcțiile speciale pot atinge $z = 10\,000$.



Centrifuga decantoare cu transportor elicoidal



a.

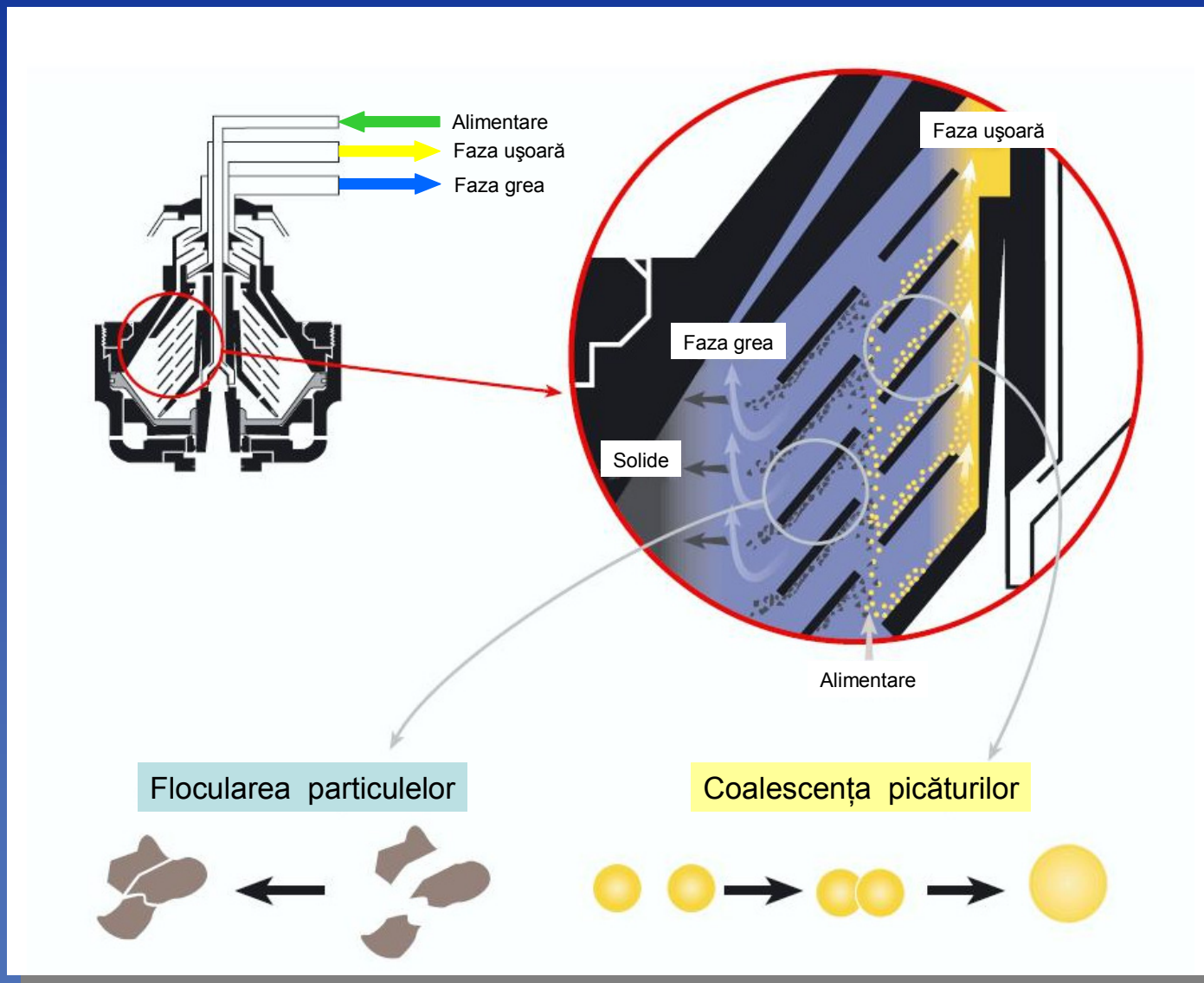


b.

a – Cu tambur cilindro-conic; b – Cu tambur conic.

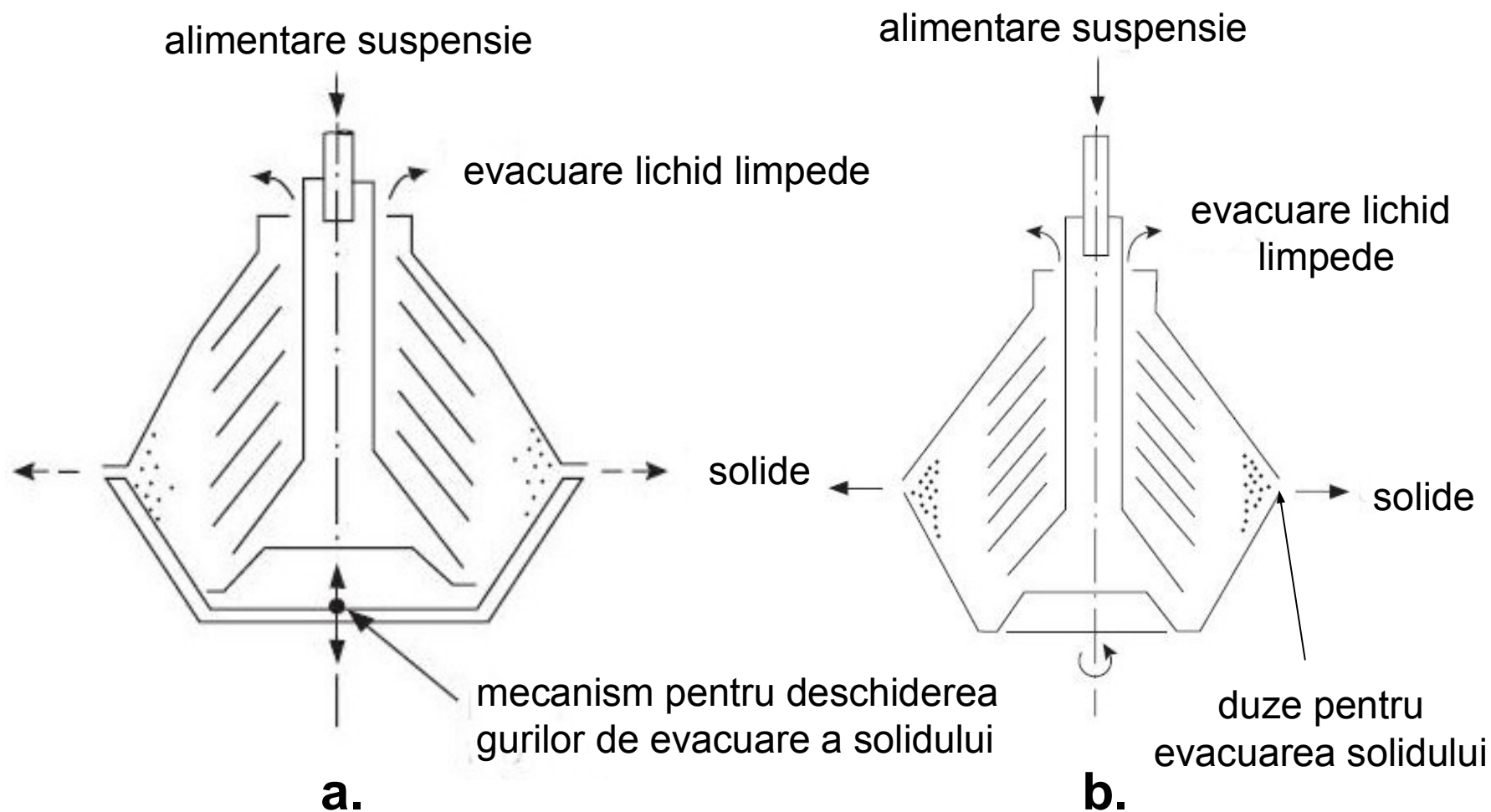
1 – arbore tubular pentru rotirea tamburului exterior; 2 – tambur exterior (cilindro-conic sau conic); 3 – arbore tubular pentru rotirea tamburului cilindric interior; 4 – alimentarea suspensiei; 6 – intrarea apei de spălare; 7 – suprafața lichidului separat; 8 – deschideri reglabile pentru deversarea lichidului; 9 – deschideri pentru evacuarea sedimentului.

Centrifuga (separatorul) cu talere



Centrifuga (separatorul) cu talere

Cu descărcarea intermitentă a fazei solide *Cu duze pentru descărcarea fazei solide*

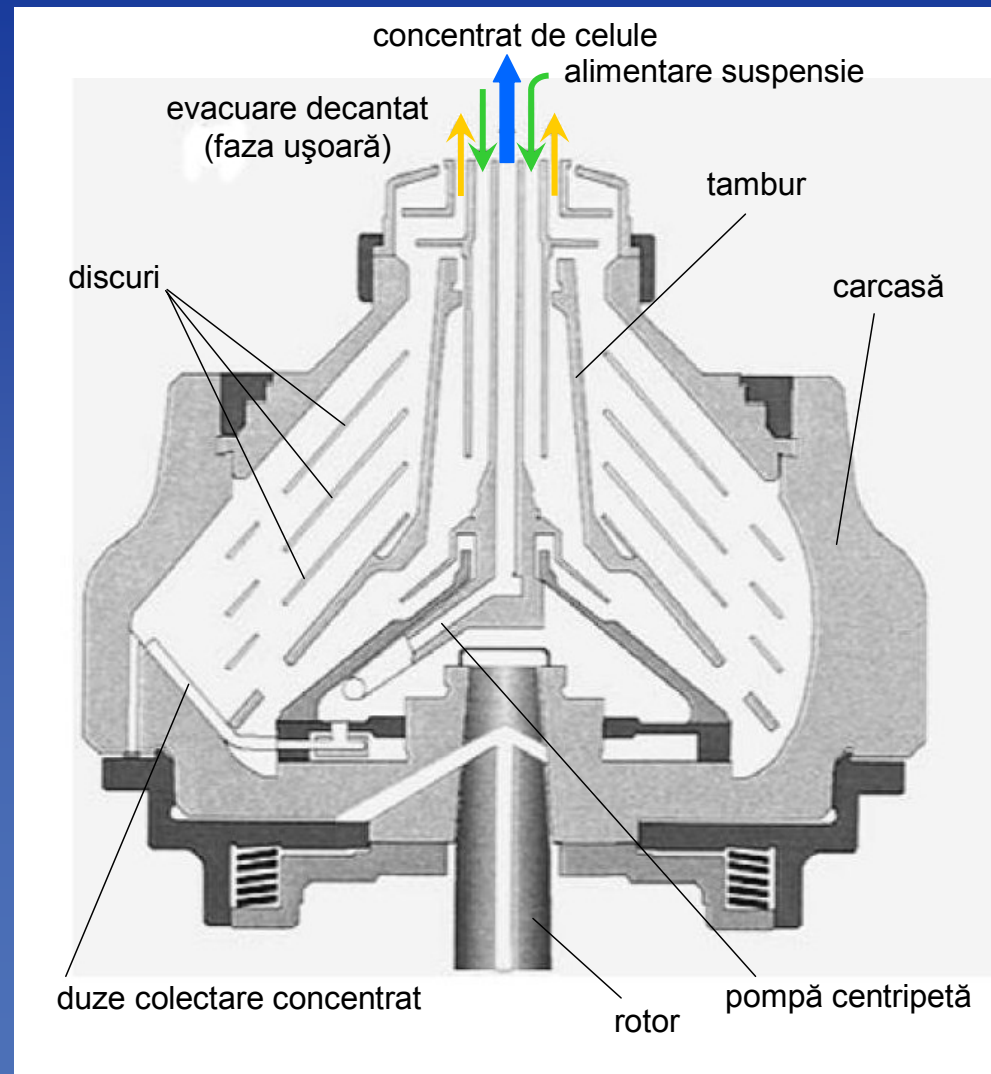


Centrifuga cu descărcare sub presiune a concentratului

- Susp. de drojdii, bacterii, unele precipitate proteice au o **comportare pseudoplastică**: viscozitatea aparentă scade cu creșterea vitezei de forfecare.
- Ca urmare a acestui fapt ele pot curge prin tuburi și canale chiar la concentrații ridicate.
- Concentratul adunat la periferia tamburului este împins de presiunea lichidului de alimentare, prin intermediul unor duze, către pompa centripetă aflată la partea inferioară a rotorului.
- Aceasta preia concentratul și îl evacuează prin axul centrifugei.
- **Sunt utilizabile numai pentru fluide pseudoplastice care nu mai au și alt fel de particule în componență.**

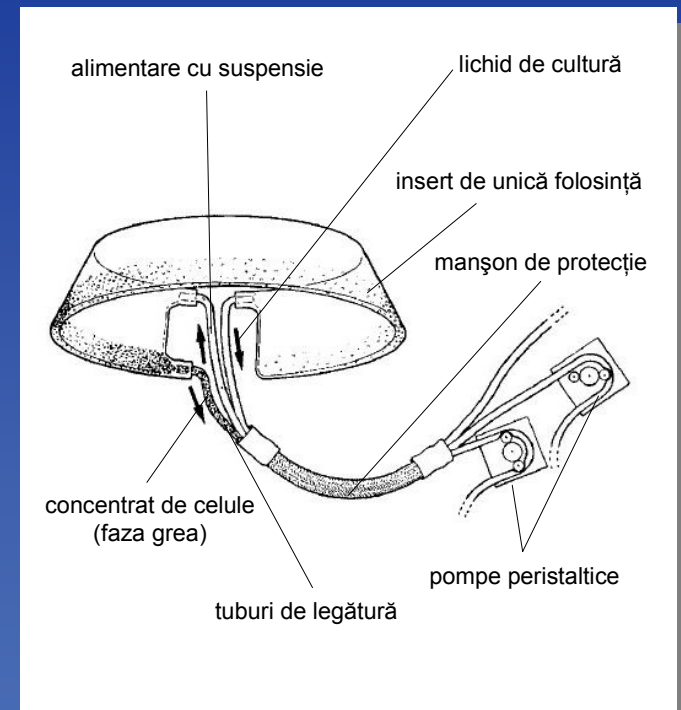


Centrifuga cu descărcare sub presiune a concentratului



Centrifuga Centritech

- Este prevăzută în rotor cu un insert din plastic de unică folosință, în care lichidul de alimentare este introdus la partea superioară, iar lichidul centrifugat iese pe la partea superioară a capătului opus al insertului.
- Faza grea (concentratul de celule) este evacuat intermitent prin ieșirea de la partea inferioară.
- Centrifuga, cu z de maximum 100, este utilizată pentru separarea celulelor animale din lichidul de cultură.



Insert de unică folosință utilizat în centrifugele Centritech

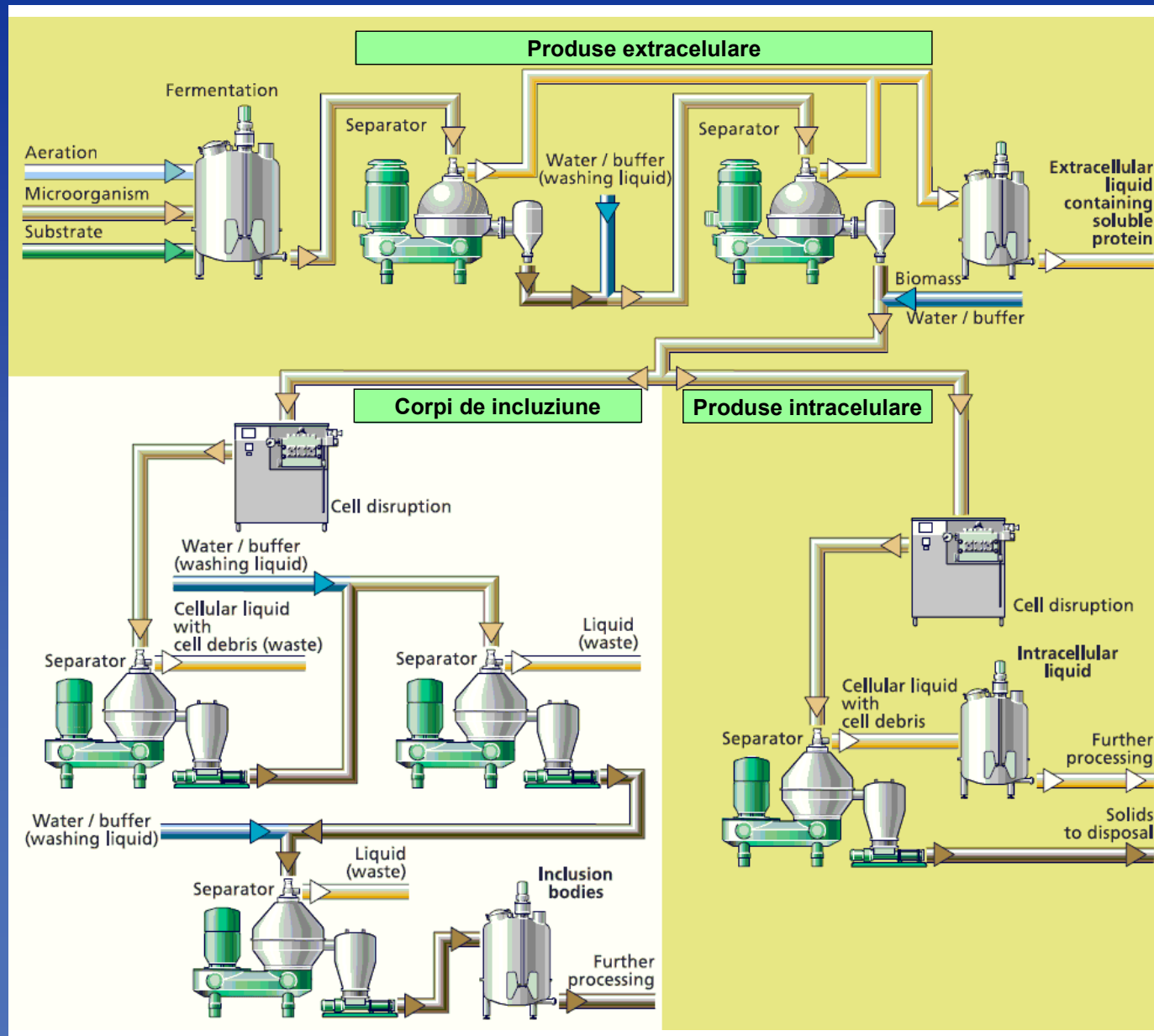


Aplicații ale separării centrifugale în biotehnologii

- Cea mai importantă utilizare: recoltarea celulelor, indiferent dacă produsul este extracelular, intracelular sau este chiar celula însăși.
- În aval de recoltare, nr. aplicațiilor crește:
 - clasare (sortare după dimensiuni),
 - deshidratare,
 - extracție lichid - lichid,
 - recuperarea precipitatelor.

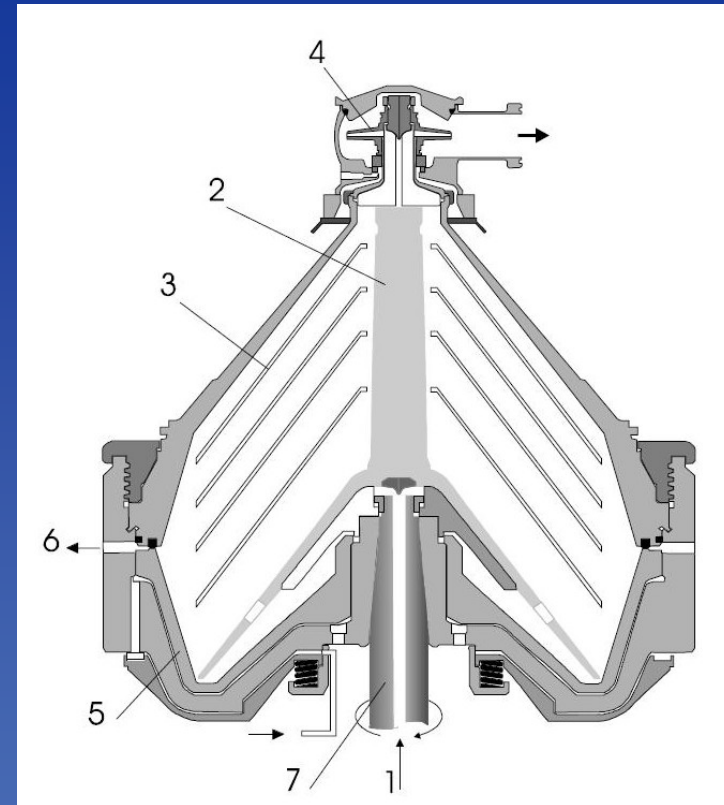


UTILIZAREA SEPARATOARELOR CENTRIFUGALE PENTRU RECOLTAREA CELULELOR



Separarea drojdiilor

- Concentrarea drojdiei de panificație s-a numărat printre primele aplicații ale centrifugelor cu talere.
- La ora actuală se utilizează centrifuge cu descărcare prin duze, sub presiune, a cremei de drojdie.
- Debitele vehiculate sunt printre cele mai mari din biotehnologie, până la 150 m³/h lichid de fermentație, cu până la 25 % v/v celule de drojdie.
- Drojdia este apoi spălată pentru creșterea duratei de viață.
- Raportul m_v/Σ (ec. 2.19) este de circa $2 \cdot 10^{-7}$ m/s, la o reducere de 99,9% a numărului de celule.



Centrifugă din industria berii

1 – alimentare lichid; 2 – distribuitor de accelerare; 3 – talere; 4 – pompă centripetă; 5 – fund culisant; 6 – orificii evacuare solide; 7 – arbore.



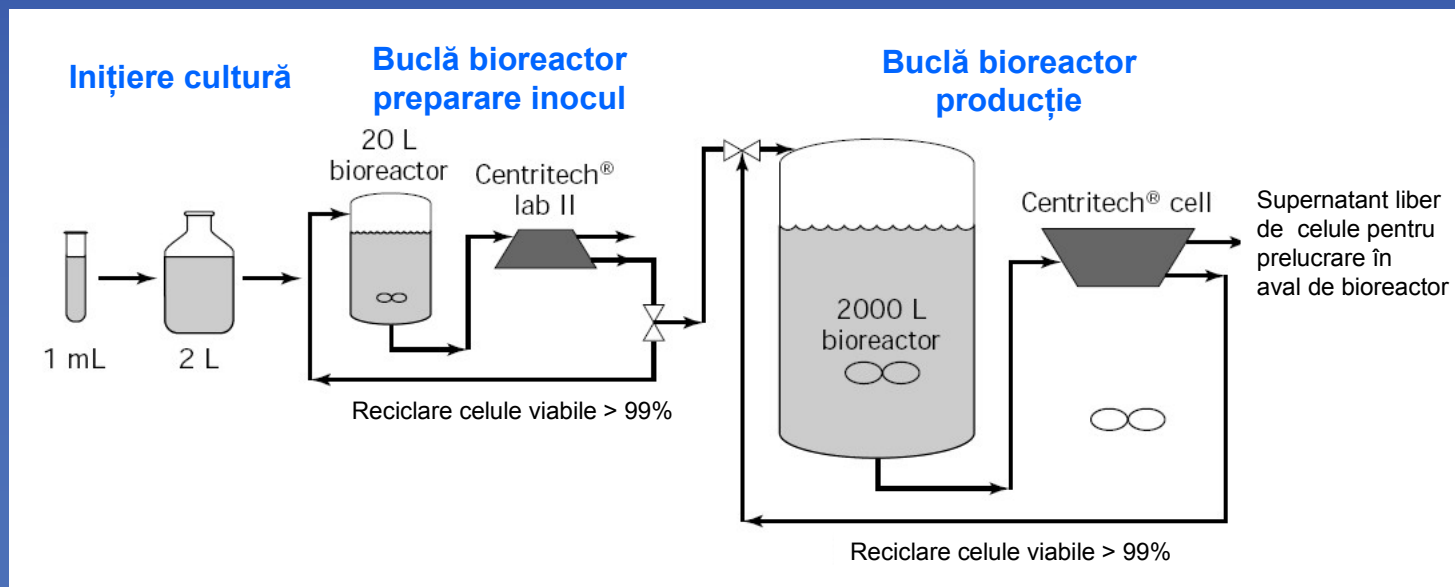
Separarea bacteriilor

- În biotehnologiile moderne, pentru recoltarea bacteriilor se utilizează centrifuge cu discuri, cu evacuare sub presiune a masei celulare sau centrifuge decantoare.
- Pentru microorganisme având dimensiuni de circa $1\ \mu\text{m}$ se utilizează centrifuge cu descărcare axială.
- Dacă concentrația solidelor este mare, necesitând o frecvență de descărcare la mai puțin de 60 s, se utilizează centrifuge cu descărcare radială, mai costisitoare.
- Pentru suspensiile curate se poate utiliza centrifuga cu descărcare continuă sub presiune.
- O valoare tipică m_v/Σ pentru o recuperare de 99% a *E. Coli* K12 este de $10^{-8}\ \text{m/s}$.



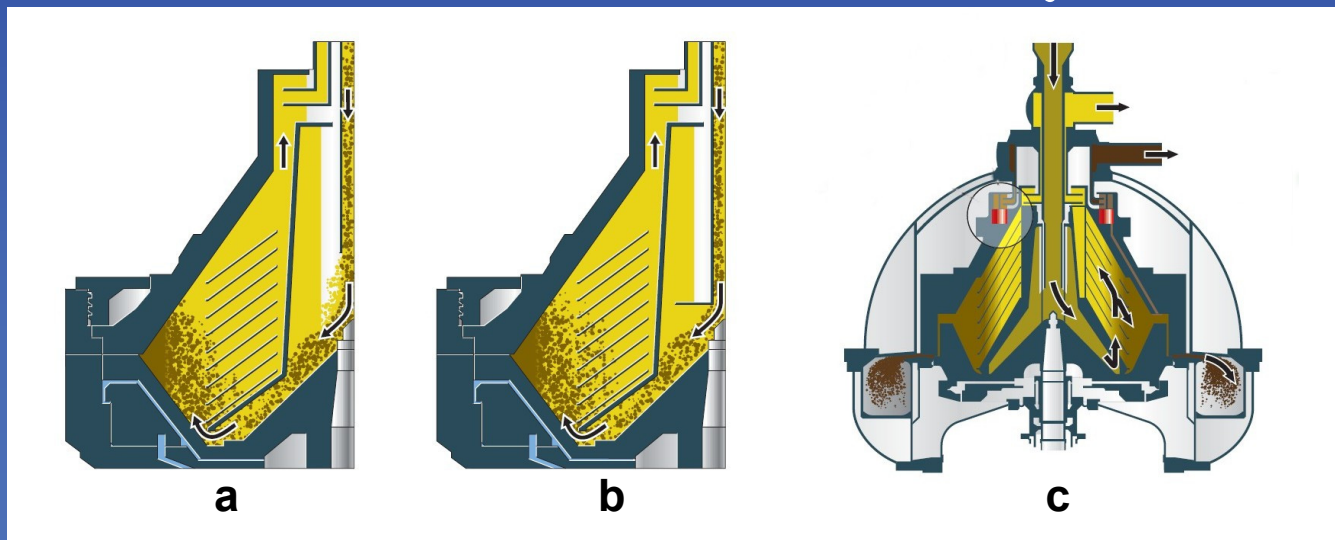
Separarea celulelor animale

- În comparație cu alte tipuri de celule, celulele animale:
 - au o viteză de creștere mai redusă,
 - sunt susceptibile la infecții prin numeroși viruși,
 - datorită cvasiabsenței peretelui celular, sunt mult mai fragile și deci sensibile la prelucrarea prin procedeele convenționale.

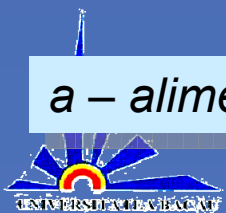


Separarea celulelor animale

- Centrifugele utilizate sunt adaptate special prelucrării celulelor animale.
- Întrucât celulele animale sunt mai sensibile la forfecare decât bacteriile sau drojdiile, dispozitivele de alimentare cu suspensie de celule și cele de evacuarea masei celulare ale centrifugelor sunt modificate.
- Alimentarea se face printr-un dispozitiv hidroermetic care evită supunerea celulelor la forțe de forfecare mari, prin alimentarea masei celulare sub nivelul de lichid existent deja în centrifugă.



a – alimentare uzuală; b – alimentare hidroermetică; c – evacuare prin duze VisCon



Separarea resturilor celulare

- Dacă produsele intracelulare nu formează corpi de incluziune, resturile celulare se îndepărtează, de regulă, imediat după dezagregarea celulelor.
- Separarea este dificilă:
 - prin dezagregare rezultă particule foarte fine, de 0,2 - 0,5 μm ,
 - viscozitatea sistemului este uzual ridicată.
- Diluarea suspensiei reduce viscozitatea, dar raportul m_v/Σ reprezintă doar 5 - 10% din valoarea pentru celule întregi.
- Este necesară utilizarea centrifugelor cu turații ridicate, cu evacuarea (continuă sau intermitentă) a solidelor.
- Acolo unde este posibil, se recomandă floclarea resturilor celulare, în acest mod raportul m_v/Σ putându-se mări cu cel puțin un ordin de mărime.

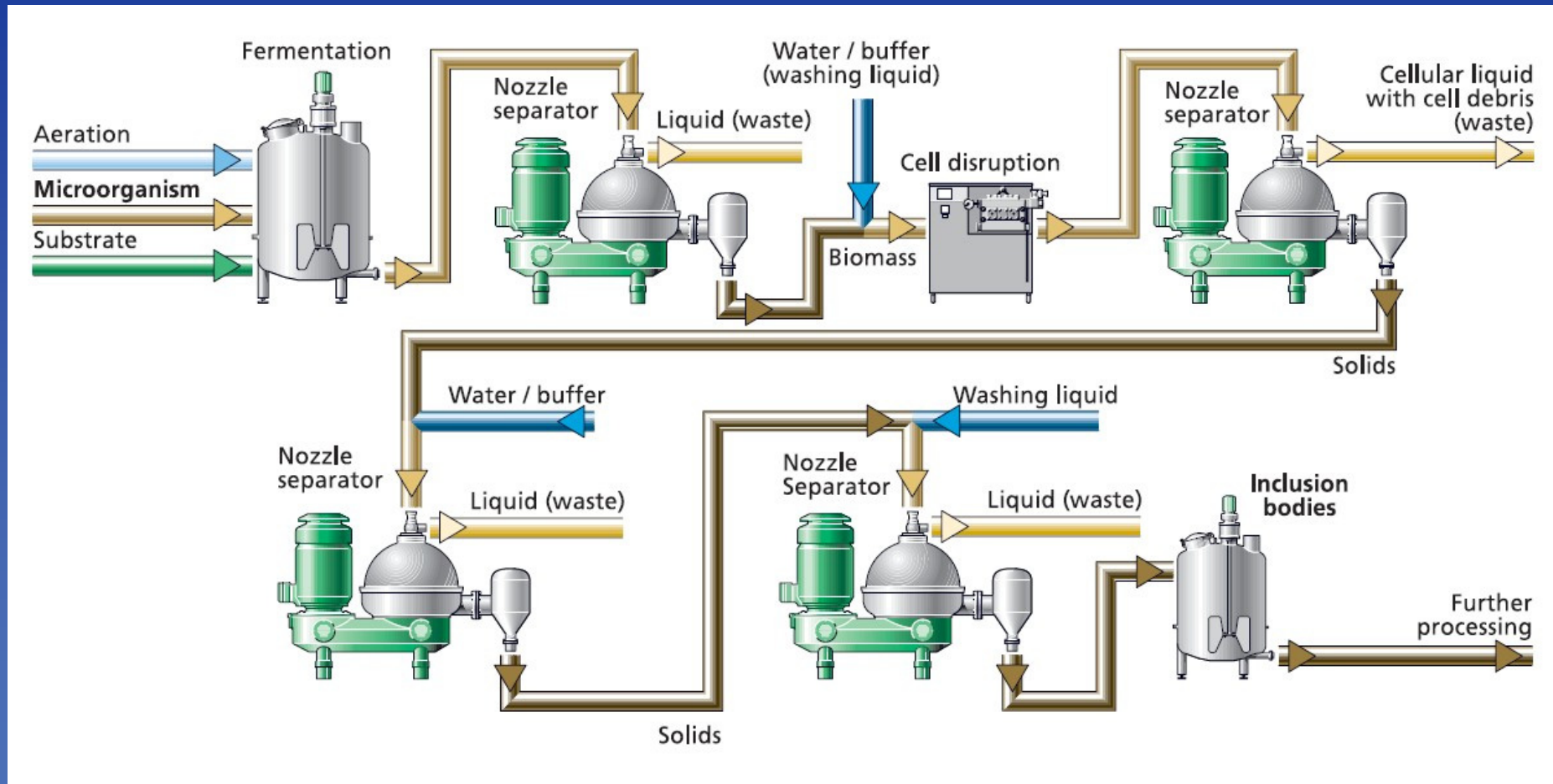


Recuperarea și spălarea corpiilor de incluziune

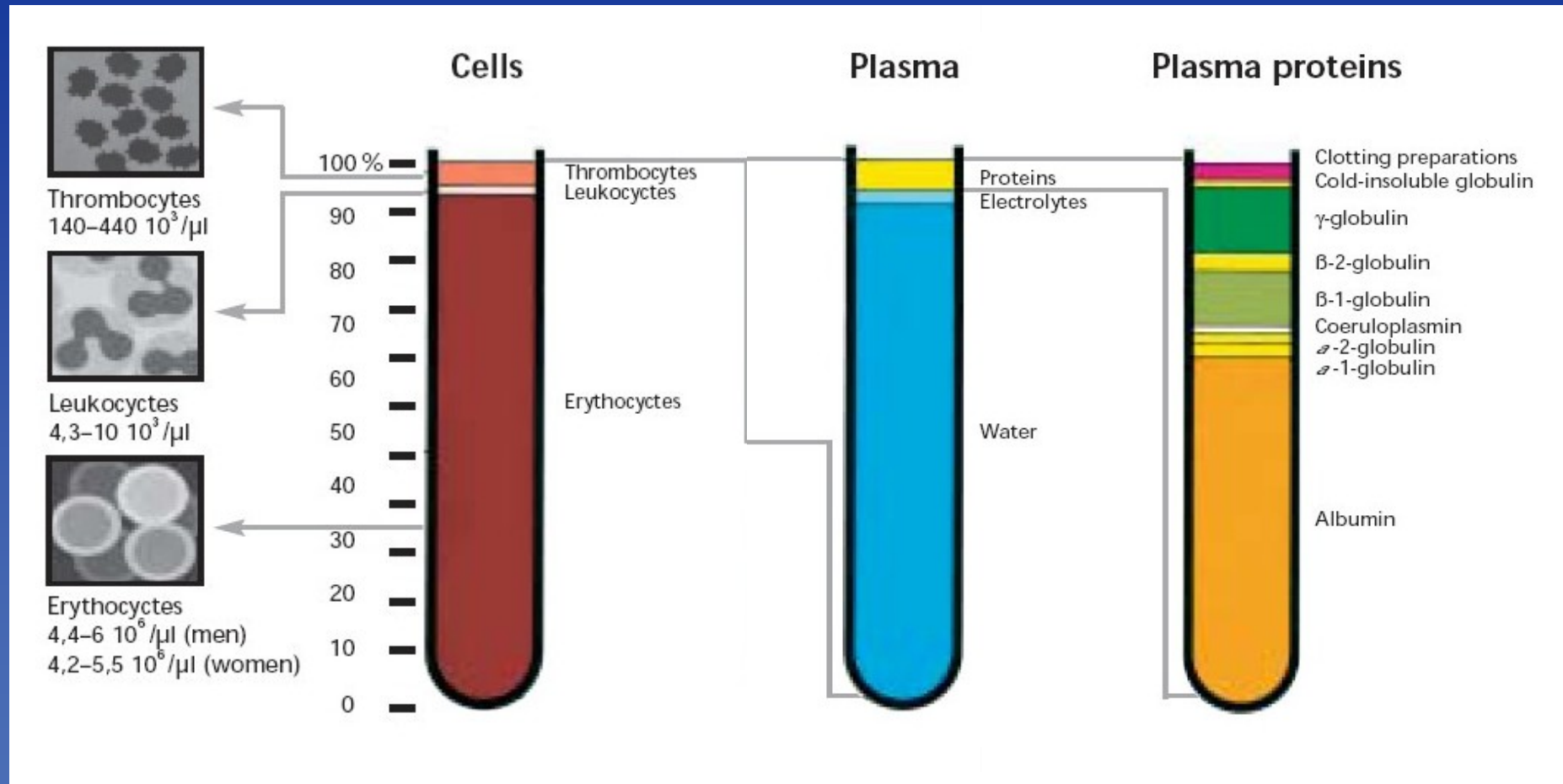
- Dacă produsul activ intracelular formează corpi de incluziune, este preferabilă îndepărtarea resturilor celulare și a celorlați componenți celulari înainte de următoarea etapă de prelucrare.
- Corpii de incluziune au o viteză de sedimentare mai ridicată decât resturile celulare, astfel încât într-o centrifugă de clasare corpii de incluziune vor fi reținuți, în timp ce resturile celulare vor părăsi echipamentul odată cu faza lichidă.
- Se utilizează centrifuge cu descărcare axială, sau mai bine radială a fazei solide, la un raport $m_v/\Sigma = (1\div 2) \cdot 10^{-8}$ m/s.
- În vederea reducerii consumurilor de reactivi în etapele următoare, separarea finală se face prin deshidratare, într-o centrifugă decantoare la $m_v/\Sigma = 2 \cdot 10^{-6}$ m/s.



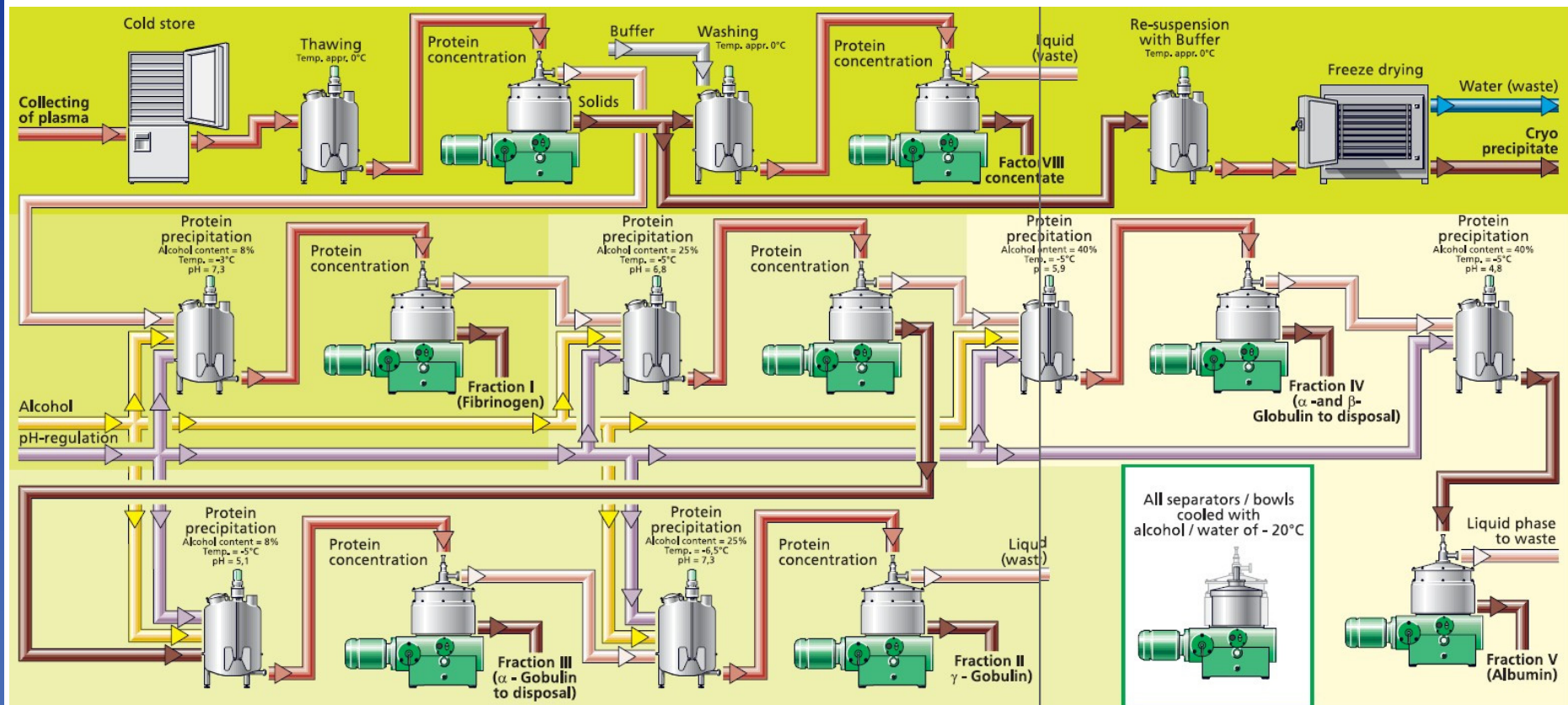
Recuperarea și spălarea corpurilor de incluziune



Fracționarea plasmei umane



Fracționarea plasmei umane

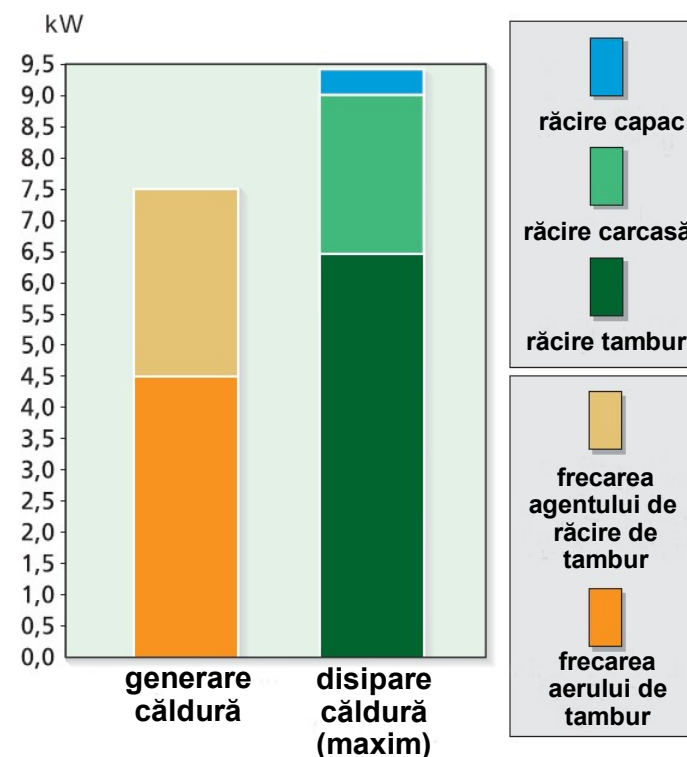
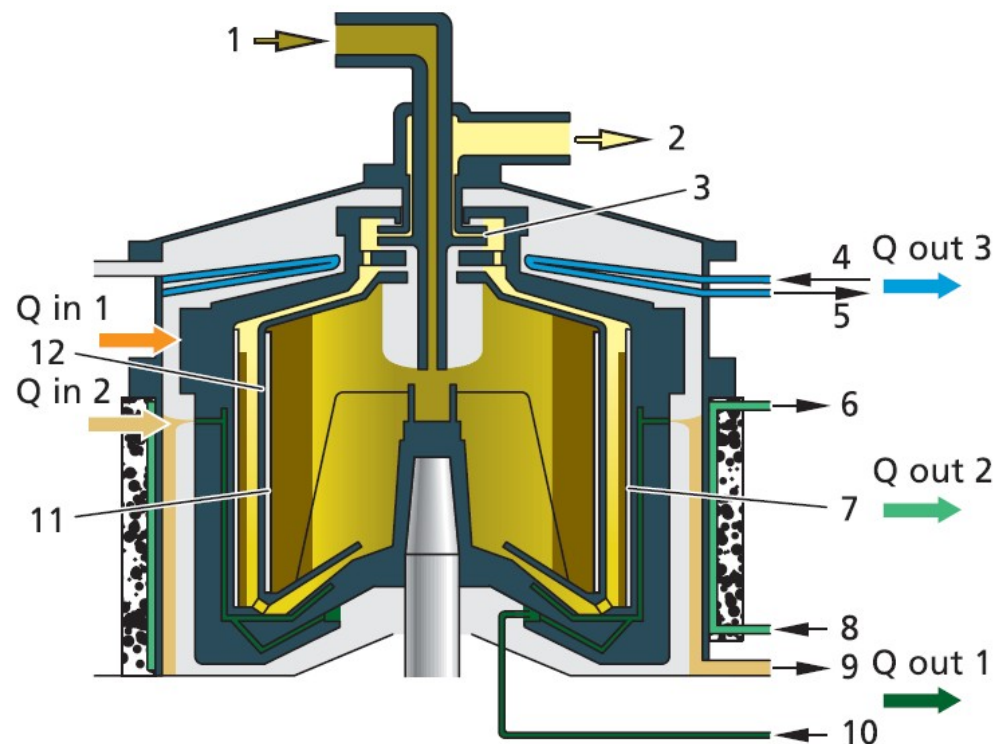


Fracționarea plasmei umane

- La fracționarea prin procedeul Cohn este necesară menținerea temperaturii în intervalul $-3 \div -6$ °C.
- Se folosesc centrifuge cu camere cu capacități între 60 - 1000 L/h, prevăzute cu răcire triplă:
 - (1) răcirea directă a tamburului, pentru îndepărtarea căldurii generate de frecarea aerului de tamburul care se rotește;
 - (2) răcirea părții superioare a carcasei pentru preluarea căldurii agentului de răcire care răcește tamburul;
 - (3) răcirea capacului pentru îndepărtarea căldurii din partea superioară a tamburului și din inelul de etanșare.
- Soluția salină utilizată ca agent de răcire este alimentată la -20 °C.
- Cu acest sistem de răcire se poate asigura un control al temperaturii cu o precizie de $\pm 0,3$ °C.



Centrifugă cu camere prevăzută cu circuite de răcire



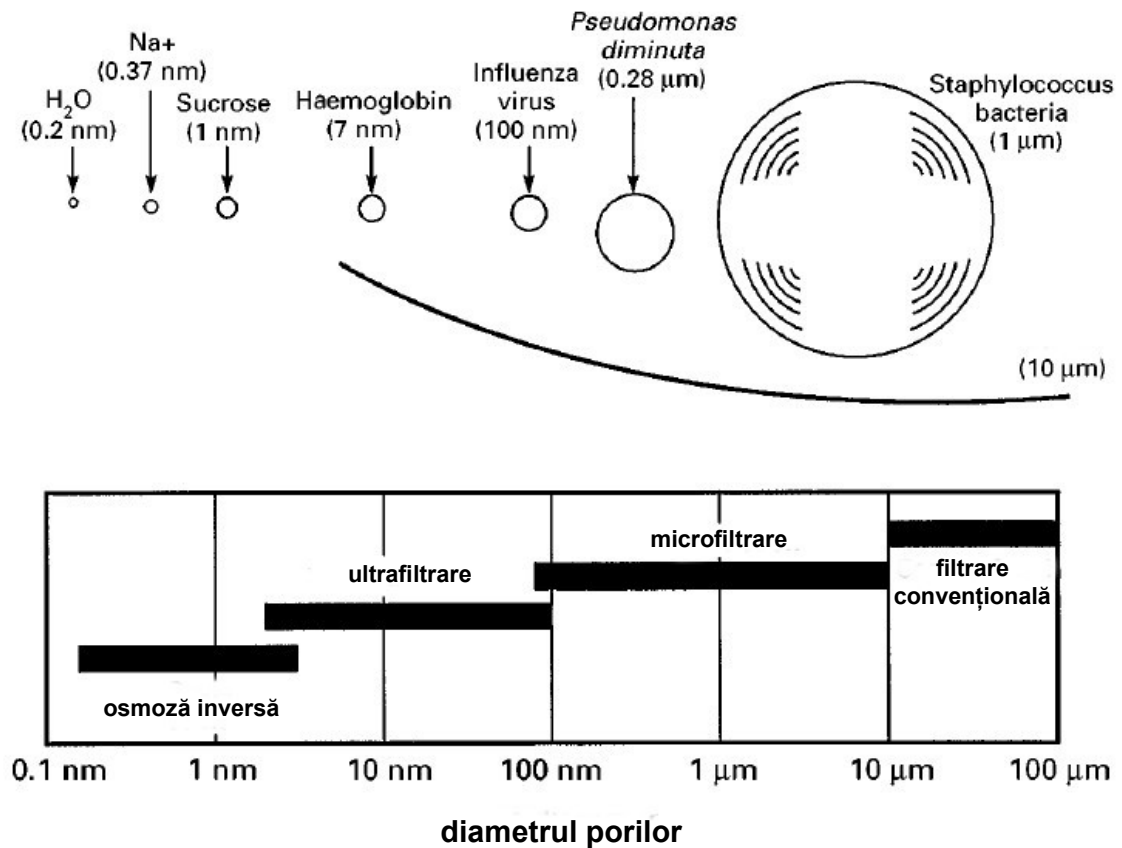
Q_{in1} – căldură generată prin frecarea tamburului cu aerul; Q_{in2} – căldură generată prin frecarea lichidului de răcire de tambur; Q_{out1} – căldură preluată de agentul de răcire a tamburului; Q_{out2} – căldură preluată de agentul de răcire a carcasei; Q_{out3} – căldură preluată de agentul de răcire a capacului.

1 – alimentare centrifugă; 2 – evacuare lichid limpede; 3 – pompă centripetă; 4 – intrare agent de răcire capac; 5 – ieșire agent de răcire capac; 6 – ieșire agent de răcire carcasă; 7 – căptușeală exterioră demontabilă; 8 – intrare agent de răcire carcasă; 9 – ieșire agent de răcire tambur; 10 – intrare agent de răcire tambur; 11 – căptușeală interioară demontabilă; 12 – insert sub formă de clopot.

SEPARAREA PRIN MICROFILTRARE

- microfiltrarea,
- ultrafiltrarea,
- osmoza inversă:

Sunt procese de membrană înrudite, diferența dintre acestea fiind mărimea particulelor care pot fi reținute.



SEPARAREA PRIN MICROFILTRARE

- Membranele pentru microfiltrare pot fi încadrate, în funcție de mecanismul filtrării:
 - în categoria filtrelor în adâncime,
 - în categoria filtrelor cu efect de sită.
- De obicei membranele de filtrare în adâncime se utilizează pentru filtrarea fără ieșire (dead-end filtration), acestea putând reține o cantitate mai mare de solide.



Centrifugare sau microfiltrare ?

- După apariția microfiltrelor sterilizabile, utilizarea microfiltrării pentru separări lichid-solid în biotehnologii a devenit o alternativă viabilă.
- Ca regulă generală, pe măsură ce cresc dimensiunile particulelor și scara de operare, centrifugarea este mai avantajoasă decât microfiltrarea, și viceversa.
- Dacă se dorește ulterior transpunerea la o scară mai mare a procesului pot apărea probleme.
- Este mult mai convenabil să se păstreze aceeași tehnologie și la scară mai mare, chiar dacă aceasta nu este tocmai alegerea optimă.
- În multe cazuri, răspunsul la întrebarea din titlu îl reprezintă o combinație de filtre și centrifuge.

