

IPARI KINYERÉSTECHNIKA GYAKORLAT

BIOMÉRNÖK MSc

II. KERESZTÁRAMÚ (CROSS FLOW, TANGENCIÁLIS) SZŰRÉS

DE TTK BIOMÉRNÖKI TANSZÉK, Kémia épület D10

Gyakorlatvezető: Molnár Ákos Péter

1. Szűrés

A szűrés a híg biológiai szuszpenzió (pl. fermentlevek) szétválasztásának megalapozott és sokrétűen alkalmazható művelete. Végrehajtására sokféle kialakítású berendezést alkalmaznak. A szűrés során a folyadékot lyukacsos szilárd anyagon vagy szűrőanyag rétegen nyomatják át. A lebegő szilárd részecskék részben vagy teljesen visszamaradnak a szűrőn. Ez egyszerű és jól kezelhető vegyipari művelet jól definiált kristályok esetében. A kicsi és képlékeny sejtek jelenléte azonban megnehezíti a fermentlevek vagy más biológiai oldatok szűrését. A klasszikus szakaszos szűrési módszerek alkalmazásával a művelet legtöbbször túlságosan lassú lenne az ipari léptékű technológiákban.

A szűrőberendezések kialakítása igen változatos, a hagyományos keretes szűrőpréstől a vákuum dobszűrőig sokféle konstrukció jött létre. A legismertebb, a keretes szűrőprés sorba rendezett fém szűrőtartó keretből áll, a szilárd anyag az elemek közötti térben rakódik le. A szűrő anyaga lehet a keretre szerelhető vászon, cellulóz szűrőlap, esetleg fém (rozsdamentes acél). Nagyobb mennyiségű szűrőlepleny kialakulása esetén a szűrőtér megnövelhető a közbe illesztett nyitott (üres) keretekkel. Ezt a szűrőtípust akkor célszerű alkalmazni, ha viszonylag tömör, kis nedvességtartalmú szűrőleplenyre van szükség.

A biológiai elválasztásoknál az eltéréseket a szűrőn összegyűlő sejtömeg tulajdonságai okozzák. Sok biológiai rendszer képez a szűrésnél sűrű, nyálkás, ragacsos, átjárhatatlan leplenyt. Ezeknél a szűrhetőség érdekében a levet előkezelésnek kell alávetni. A biomasszát legtöbbször csak szűrősegédanyag (filter aid) adagolásával lehet elválasztani. Ezek az adalékok (pl. diatómaföld) aggregáló és szerkezetjavító hatásúak. A hagyományos (dead end) szűrésnél egy folyadékfázist (szűrlet) és egy többé-kevésbé szilárd fázist (szűrőlepleny) kapunk szakaszos műveletben

Szűrésnél a nyomásesés túlnyomó részét a szűrőlepleny okozza. Az összenyomható szűrőlepleny megnehezíti a szűrést és annak matematikai leírását is. Ráadásul ez az egyre vastagodó réteg teszi a szűrést tipikusan szakaszos műveletté. Mindezek alapján érdemes keresni a lehetőséget a szűrőlepleny nélküli szűrésre. Erre egy megoldás a vákuum dobszűrő, amelynél a dob felületéről eltávolítják a szűrőréteget, ezáltal tiszta szűrőfelületet hoznak létre. A másik lehetőség a keresztáramú (cross flow) tangenciális szűrés alkalmazása.

A szűrési módszerek alapvetően kétféle módon csoportosíthatók:

- Szűrőréteg alapján: -Hagyományos szűrés a szűrőn át (cellulóz, üveg)
 - Segédanyagokkal történő szűrés (perlit, diatómaföld)
 - Membránszűrés
- A szűrés iránya alapján: -Normal flow filtration NFF (dead end)
 - Tangential flow filtration TFF (cross flow)

2. Mikroszűrés

Mikroszűrésnél az elválasztandó részecskék nem oldott molekulák, hanem lebegő szilárd fázist alkotó testek. A mikroszűrő membrán jól definiált pórusai 0,1-1 μm tartományba esnek. A nagyobb méretek miatt az elválasztás diffúziós jellege teljesen háttérbe szorul, és a membrán szita hatása érvényesül. A pórusokon szabadon áthatolnak az oldott anyagok, kis és nagy molekulák egyaránt. Teljes visszatartás érhető el élő sejtekre, ami lehetővé teszi az élelmiszer iparban különféle oldatok (bor, sör, gyümölcslé) sterilre szűrését.

3. Tangenciális szűrés

A szűrőlepeny által okozott problémák másik kiküszöbölési módja az ún. **tangenciális szűrés**, amelynél a szűrőfelületen létrehozott erőteljes turbulens áramlás akadályozza a szilárd részecskék lerakódását. Ez a megoldás általában együtt jár a betöményített szuszpenzió elvételével, azaz a keresztáramú (**cross flow**) szűréssel. A **keresztáramú szűrésnél** két folyadékfázis lép ki a szűrőanyag (membrán) két oldaláról folyamatosan. Az egyik a szűrőn átlépő tisztított folyadék (szűrlet, **permeátum**), a másik a visszamaradt folyadék, amely értelemszerűen gazdagabb a szűrő által visszatartott anyagokban (koncentrátum, **retentátum**).

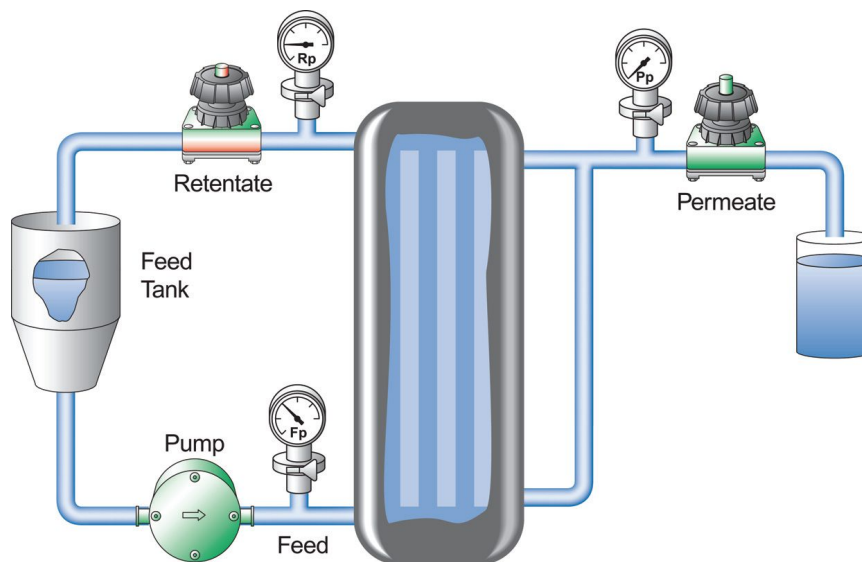
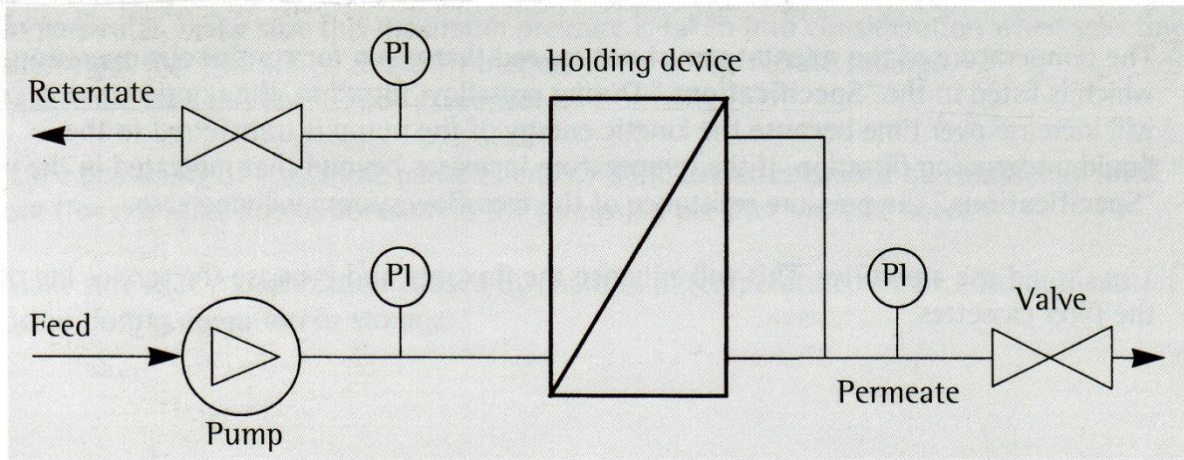
A keresztáramú szűrés általános elv, többféle műveletnél is alkalmazzák. Ez az elv megvalósítható a membrán szűrés esetén is, melynek több típusát különböztetjük meg a membrán által visszatartott és átengedett komponensek alapján. Ezt a méret szerinti elválasztást a membrán jól definiált pórusátmérője határozza meg.

Membrán műveletek mérettartománya:

- Ionok, kis molekulák: **reverz ozmózis**, elektrodialízis
- Makromolekulák (pl. fehérjék): **ultraszűrés**. Mérettartomány: 500–100000 Da.
Pórusméret: 1-1000 nm.
- Lebegő szilárd részecskék (pl. sejt): **mikroszűrés**. Pórusméret: 0,1-1 μm .

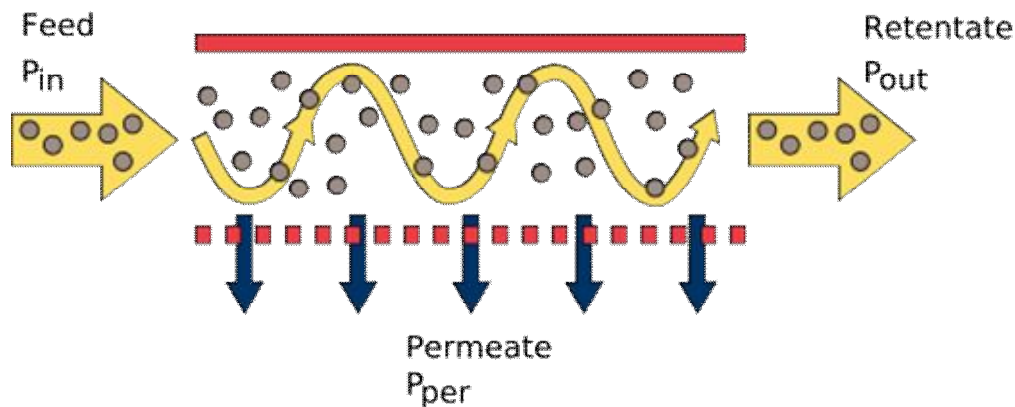
What a Complete Crossflow System Consists Of

Diagram



1. ábra. Keresztáramú szűrő rendszer

A tangenciális áramlású szűrésnél a szűrőfelülettel párhuzamos (érintőleges, tangenciális) áramlást hoznak létre, amely megakadályozza a visszatartott anyagok lerakódását (2. ábra). Az áramlási kép kialakítására változatos technikai megoldásokat alakítottak ki, pl. keringető szivattyúval fenntartott intenzív áramlás, mechanikus keverés a szűrőfelület közvetlen közelében, vagy maga a szűrőelem forog nagy sebességgel a folyadékban. A cirkulációs megoldásnál technológiai feltétel a nagy lineáris sebesség a szűrőnél, ami azt jelenti, hogy a keringetés térfogatárama legalább egy nagyságrenddel meghaladja a szűrlet térfogatáramát.



2. ábra. Keresztáramú szűrés

A keresztáramú szűrés több vonatkozásban is eltér a hagyományos szűréstől. A szuszpendált részecskék koncentráálására alkalmas, nem kapunk szilárd szűrőlepenyt. A mikroszűrés kulcsa maga a szűrőanyag, a membrán. Ezek a membránok vékonyak és mikropórusosak. A pórusok kicsinyek és monodiszperzek, azaz közel azonos átmérőjűek. Funkciójuk szerint vissza kell tartaniuk a kívánt szilárd részecskéket, ugyanakkor lehetőleg gyorsan át kell engedniük a folyadékot. A kis átmérőjű pórusok áramlási ellenállása nagy, ami nagy nyomáskülönbséget tesz szükségessé. Ez alapvető különbség a hagyományos szűrőanyagokhoz képest (szűrővászon, szűrőlap). Ez utóbbiak átteresztőképessége nagy, áramlási ellenállása kicsi. A szűrőanyag ellenállása általában elhanyagolható a szűrőlepenyé mellett.

A mikroszűrő működhet szakaszos és folytonos üzemben is. A betáplálás legtöbbször híg szuszpenzió, a szűrlet eltávozásával viszont fokozatosan betöményedik. A viszkozitás még a koncentrációnál is erőteljesebben emelkedik, ezáltal a keringetés egyre nehezebbé válik. Szakaszos üzemben a betöményített levet időnként leengedik, és a berendezés kitisztítása után újabb adag lével folytatódik a feldolgozás. Folytonos üzemben a folyamatos betáplálással és elvétellel az állandósult állapot hosszabb ideig fenntartható.

Ha a szilárd fázis (tökéletes) elválasztása a cél, a mikroszűrésből kikerülő koncentrátumot centrifugálással vagy hagyományos szűréssel dolgozzák tovább fel.

Érdeemes megvizsgálni a szűrők kialakítását, alakját. A mikroszűrésnél a szűrlet fluxusa sokkal kisebb, mint a hagyományos szűrőknél. Ezt jóval nagyobb szűrőfelületek beépítésével ellensúlyozzák. A készülék külső méreteit viszont nem célszerű túlságosan növelni, ezért a szűrőfelületek "összehajtogatásával" igyekeznek minél hatékonyabb berendezéseket építeni. Három alapkonceptió terjedt el: a keretes összeállítás, a spirálmembrán modul és a csőmembrán modul. A keretes elrendezés lényegében megfelel a keretes szűrőprésnek, megfelelő membránnal felszerelve. A felület/térfogat arány a legkisebb, de előnyére szól, hogy eltömődésre kevésbé hajlamos, szétszereléssel könnyen tisztítható, és membránszakadás esetén csak egy, viszonylag kis felületű és értékű darabot kell kicserélni. A spirális tekercsmembrán és a csőmembrán modulok felület/térfogat aránya kedvezőbb, de érzékenyebbek pl. az eltömődésre. A spirális membrántekercs egy jókora borítékra vagy fóliazacskóra emlékeztet, amelynek a belsejébe táplálják be a levet, és a külső felületen jelenik meg a szűrlet. Az egész lazán feltekerve egy hengeres házban (modul, patron) helyezkedik el. A csőmembrán modulokban néhány mm vastagságú mikropórusos csőmembránok találhatók. A folyadék a csővecskék belsejében áramlik, a falon átlépő szűrlet

a csövek között, a "köpenytérben" jelenik meg. Mindkét modulnál a membrán károsodása esetén az egész modult cserélni kell.

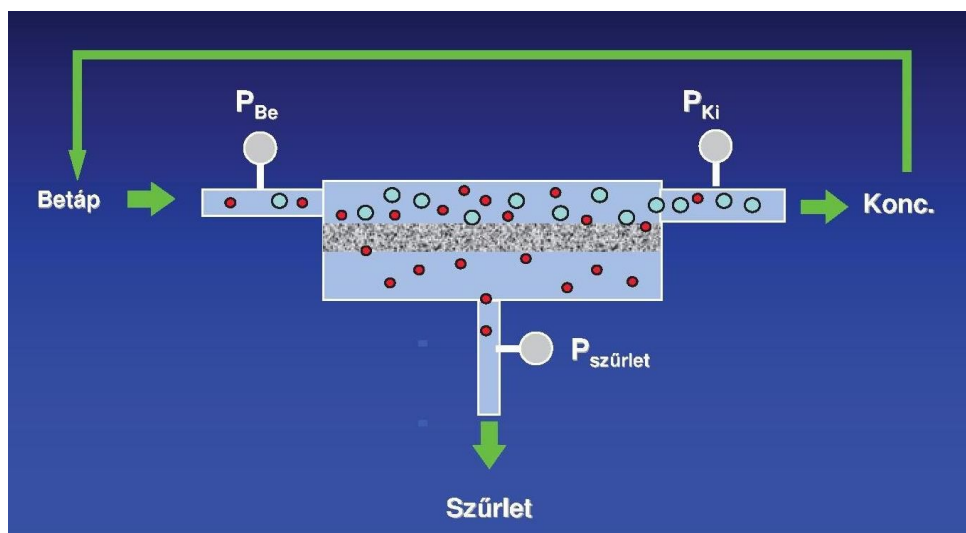
4. Technológiai paraméterek hatása a szűrésre:

A vadonatúj membrán tulajdonságai a legelső használatba vételnél erősen megváltoznak.

A membrán öregedésére ható legfontosabb tényezők:

- fehérjék adszorpciója a membrán felületén
- (irreverzibilis) gél vagy réteggépződés a felületen
- szilárd részecskék (sejttörmelékek), vagy fehérjék "beszorulása" a membrán pórusaiba.

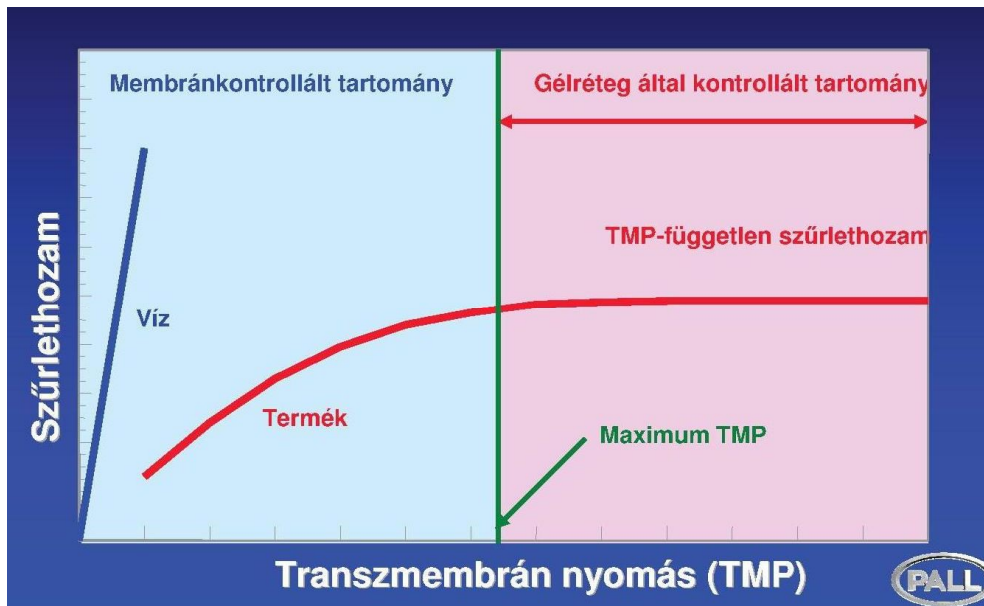
A folyamat hajtóereje a nyomás különbség:



3.Ábra. Transzmembrán nyomás

TMP: Trans Membrane Pressure: „The differential pressure from the upstream side of the membrane (applied pressure) and downstream side (permeate). The applied pressure is the average between the feed and retentate pressure.”

$$TMP = \frac{(P_{be} + P_{ki})}{2} - P_{szűrlet}$$



4.Ábra. TMP hatása a szűrlethozamra

Forrás: www.doksi.hu

Dr. Pécs Miklós: A biológiai iparok elválasztási műveletei - Szűrés és mikroszűrés. Oktatási segédanyag.

PALL: Szűrési segédanyag.

5. Gyakorlat

A gyakorlat célja:

- Keresztáramú szűrőberendezés működésének megismerése. Tiszta víz fluxus meghatározása. Optimális TMP érték meghatározása fermentlére.

Berendezések:

Fermentor: Zentai fermentor, 7 l térfogatú

Keresztáramú szűrő: Sartorius JABSCO SartoJet, PUREFLO 21 – Diafragma Pumpa

Membrán: Sartorius típusú Sartocon Slice Casette (membránszűrő kazetta), Hydrosart membrán, 0,45 μm pórusátmérő.

A membrán jellemzői:

-Cellulóz membrán, hidrofil, széles pH és hőmérséklet stabilitás. Hidrofil tulajdonságánál fogva a fehérjék, vírusok nem adszorbeálódnak a membránhoz.

-Biotechnológiai és gyógyszeripari használatra kifejlesztett membrán. Alkalmas az alábbi részecskék töményítésére: emlős sejtek, baktériumok, élesztők, sejt lizátumok.

-Pórusméret: 0,2 és 0,45 μm pórusmérettel kapható.

-Kazetta méret: Standard Casette: üzemi-, félüzemi méret

Sartocon Slice: kisebb mennyiségű oldatok szűrésére

- P_{be} : max 4 bar

-Hőmérséklet: max 50 °C

-pH stabilitás: 2-14.



Sartorius Hydrosart mikroszűrő kazetta és kazetta tartó

5.1. Előkészületek a gyakorlathoz:

A gyakorlaton *Pseudomonas putida* F1 sejttenyészetet szűrünk. Ehhez a következő előkészületek szükségesek: nagyobb mennyiségű (6-7 l) fermentlé előállítás.

A gyakorlat előtt 2 nappal le kell oltani az inokulumot és sterilizálni kell a fermentort.

Az inokulum: 3x150 ml LB táptalajt (pH 7.0) plate-ről kacsál leoltunk *P.putida* sejtekkel, a lombikokat rázógépbe tesszük és overnight rázatjuk (37 °C, 200 rpm).

A fermentort összeszerelve, 5 l LB táptalajjal (pH 7.0) együtt autoklávban sterilizzük.

A gyakorlat előtt 1 nappal az inokulummal leoltjuk a fermentor táptalaját (kevertetés: 200 rpm, hőmérséklet: 37 °C, levegőztetés: 200 l/perc). A tenyészetet kb. 12 órán át növesztjük. Másnap ezt a tenyészetet használjuk a szűréshez.

5.2. Keresztáramú szűrés

A szűrés alatt különösen fontos a helyes nyomás viszonyok megtartása. Úgy kell a pumpát beállítani, hogy a belépő oldalon (feed) a nyomás legalább 0,5 bar legyen. De a legfontosabb arra figyelni, hogy a **membrán két oldalán a nyomáskülönbség** nem lehet nagyobb 0,5 bar-nál. Ennél nagyobb nyomáskülönbség hatására a membrán károsodik!

$$p_{\text{back}} = p_{\text{szűrlet}} - p_{\text{ki}} \leq 0,5 \text{ bar}$$

Hátsó nyomásról (back pressure) akkor beszélünk, ha a permeát (szűrlet) oldali nyomás nagyobb, mint a retentát oldali nyomás. Tehát a permeát oldali nyomás max. 0,5 bar-l lehet nagyobb a retentát oldali nyomásnál.

A szűrés kivitelezésénél a retentát és permeát oldali szelepekkel „játszunk”, azaz manuálisan úgy állítjuk be az áramlási értékeket és a retentát oldali nyomást, hogy a megfelelő nyomás és térfogati viszonyok érvényesüljenek. Általában a permeát oldali szelepet teljesen kinyitjuk, azaz a szűrlet „szabadon távozik”. Így lehet a legkönnyebben biztosítani, hogy ne alakuljon ki

túl magas hátsó nyomás. Szokták azt javasolni, hogy a retentát oldali nyomásmérőn legyen nyomás, legalább 1 bar, ilyen módon a teljes kazetta felület szűr.

A gyakorlat napján a fermentációt le kell állítani és a fermentlevet leengedni (kb. 6 liter). Ezután következik a fermentlé szűrése a cross flow szűrőberendezéssel.

1. feladat: Tiszta víz fluxus meghatározása

A kezdeti tiszta víz fluxus értéket minden esetben az új kazettára meg kell határozni. Szűrés és tisztítás után mindig újra meg kell mérni. A kazetta áteresztő képessége minden használat után romlik, soha nem lesz olyan jó, mint „új korában”. A tisztítás utáni víz fluxust összehasonlítva a kiindulási referencia értékkel, megtudhatjuk, milyen hatékony volt a tisztítás. Többszörös használat után az eredeti érték 70-80 %-t lehet visszakapni. Ha kevesebb, a tisztítást meg kell ismételni.

$$\text{Water permeability} = \frac{\text{Permeate flux rate (LMH)}}{\text{TMP}}$$

(LMH: Liter/m²/óra)

Kivitelezés:

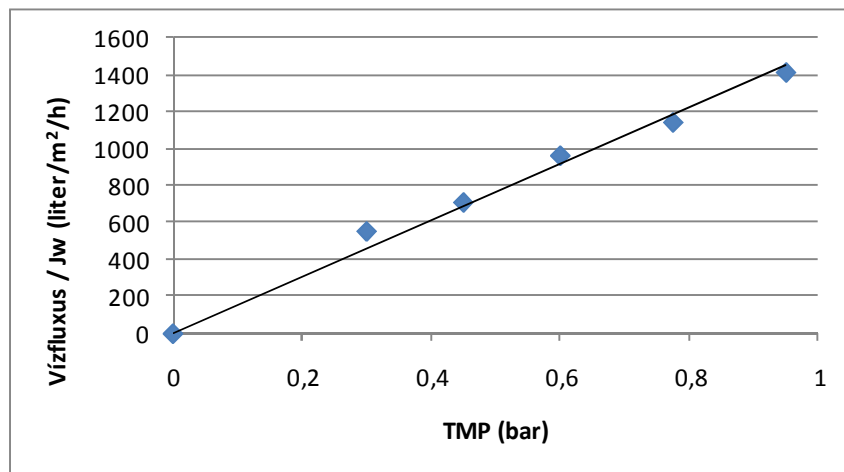
Beállítjuk a következő paramétereket: Pumpa sebesség: 10 %. Állandó pumpa fordulatszám mellett kell a nyomást változtatni.

P _{be} (bar)	P _{ki} (bar)	P _{szűrlet} (bar) szelep teljesen nyitva
0,5	0,2	0
0,7	0,5	0
1	0,75	0
1,2	1	0
1,4	1,3	0

A mérést a legkisebb nyomáson kezdjük. Minden egyes nyomás értéknél megmérjük a retentát és permeát oldali áramlási sebességet (mérőhenger, stopper) 1 perc alatt.

A kazetta szűrési felülete 0,1 m².

Ábrázoljuk a különböző fluxus értékeket a TMP függvényében.



5.Ábra. A Hydrosart membrán tisztavíz-áteresztő képességét meghatározó egyenes (példa)

2. feladat: TMP görbe felvétele: Cél: adott fermentlére és membránra meghatározni az optimális TMP értéket.

Azonos áramlási sebesség mellett beállítani különböző TMP értékeket, lsd. előző táblázat (a retentát oldali szelep fokozatos zárásával), és mérni a permeát oldali szűrlet mennyiségét időegységre vonatkoztatva. Ezt stopperrel és mérőhengerrel tehetjük meg. Először kis TMP értékeket állítunk be, majd fokozatosan növeljük. Minden egyes új nyomásnál 3-5 percig recirkuláltatni kell a fermentlevet, hogy beálljon az egyensúly. A kísérlet alatt végig teljes recirkuláció legyen, ne töményedjen be a fermentlé!

Ábrázolni kell a fluxust (szűrlet hozamot) a TMP függvényében.

3. feladat: Fermentlé betöményítése

Az optimális TMP közelében betöményíteni a fermentlevet a kétszeresére. Mennyi idő alatt töményedik be? Hogyan változnak a működési paraméterek a viszkozitás növekedésének hatására?

A szűrés végeztével a membránt azonnal egy **tisztítási folyamatnak** kell alávetni, megakadályozandó a membrán eltömődését azáltal, hogy üledék réteg rakódik ki a fermentléből. Az idő előrehaladtával ez a réteg egyre tömörebbé válik és egyre nehezebb lesz eltávolítani. Ilyen módon a membrán hosszabb életű lesz és megtartja kívánt tulajdonságait. A tisztítás lépései:

- 5 perces mosás izotóniás sóoldattal. Kioldja a lebegő száraz anyagokat.
- 10 perces mosás 0,1 M NaOH oldattal
- 10 perces mosás 0,5 M NaOH oldattal. Recirkuláltatás.
- mosás desztillált vízzel, amíg semleges lesz a pH.

Ha a membránt hosszabb ideig nem használjuk szükséges még egy 20 %-s EtOH oldatos mosás is, a befertőződés elkerülésére. Ha pedig hónapokig nincs használatban, szétszerelés után a membránt 20 %-s EtOH oldatban zárható edényben kell tárolni.

A jegyzőkönyv tartalmazza:

-Rövid elméleti bevezetést a tangenciális- és a mikroszűrésről.

-A gyakorlat leírását.

-Az első két feladatnál táblázatban megadni a különböző nyomás értékeket, a számolt TMP értékeket, s diagramon ábrázolni a fluxust a TMP függvényében. A 3. feladatnál leírni a tapasztalatokat.