
Downstream Processing

Opwerken van een Produkt in de Biotechnologie

2 <http://www.vssd.nl/hlf/d003.htm>

Downstream Processing

Opwerken van een Produkt in de Biotechnologie

J A Wesselingh,
J Krijgsman
en P Vonk

Delft University Press

CIP-GEGEVENS KONINKLIJKE BIBLIOTHEEK, DEN HAAG

Wesselingh, J.A.

Downstream processing : opwerken van een produkt in de biotechnologie / J.A. Wesselingh, J. Krijgsman en P. Vonk.

- Delft : Delft University Press. – Ill.

Uitg. in opdracht van: Vereniging voor Studie- en Studentenbelangen. – 1e dr.: Delft : Delftse U.M., 1994.

Met lit. opg.

ISBN 90-407-1298-0

Trefw.: biotechnologie.

© VSSD

Eerste druk 1994, herdruk 1996, 1999; internet 2001

Uitgegeven door:

Delft University Press

Postbus 98, 2600 MG Delft

tel. 015 278 3254, telefax 015 278 1661, e-mail info@library.tudelft.nl

In opdracht van:

Vereniging voor Studie- en Studentenbelangen te Delft

Poortlandplein 6, 2628 BM Delft

tel. 015 - 2782124, telefax 015 - 2787585, e-mail: hlf@vssd.nl

internet: <http://www.vssd.nl/hlf>

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of op enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the publisher.

ISBN 90-407-1298-0

Voorwoord

Dit is een slecht boekje. Het is ontstaan als een onderdeel van cursussen biotechnologie bij de Technische Universiteit Delft, Gist-brocades en de Rijksuniversiteit Groningen. Die cursussen gaan langs de hele biotechnologie; vanaf de wonderbaarlijke complexiteit van de levende cel tot aan de grove en grootschalige techniek van de industrie.

Het 'volk' dat wij op die cursussen krijgen omvat zowel fijnbesnaarde biologen als botte technologen. Daarin zit de spanning in dit vak; die totaal verschillende mensen moeten samenwerken om processen te ontwikkelen en te bedrijven. De 'bioloog' en de 'biochemicus' leven in een uiterst complexe wereld. Theorie en rekenen helpen daar niet zo veel, maar experimenten des te meer. De technoloog daarentegen, kan nauwelijks experimenteren. Op grond van (meest onvolledige) laboratoriumgegevens en rekenmodellen, moet hij grote installaties aan de praat zien te krijgen. Dat kan niet zonder theorie en modelvorming.

Dit boekje begint daar waar de meeste mensen in de biotechnologie denken dat alles klaar is. De fermentatie met alles eromheen is gebeurd, het produkt is gemaakt, we hoeven alleen nog . . . En dan komt het meest grove deel van de biotechnologie: de opwerking of zuivering van de produkten. Bij dit onderdeel is het belangrijk dat de technoloog goede gegevens krijgt uit het laboratorium. Daarom moet ook de bioloog iets van dit vakgebied begrijpen.

U begrijpt nu waarom dit boekje slecht is:

- het is te moeilijk, te droog en te theoretisch voor een bioloog en
- het is te simpel en te onvolledig voor een technoloog.

Het is gelukkig ook niet dik!

Groningen/Delft, najaar 1994

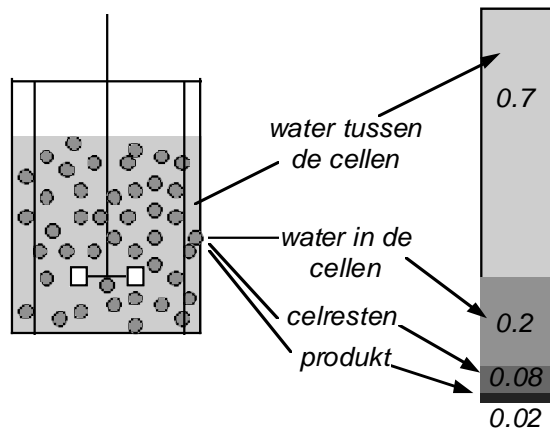
J. A. Wesselingh, J. Krijgsman en P. Vonk

Inhoud

Voorwoord	5
Inhoud	6
1 Inleiding	7
2 Celdisruptie	9
Indeling van methoden	9
De homogenisator	10
3 Klaren	12
Bezinken	12
Centrifugeren	14
Filtratie	16
4 Concentreren	21
Indampen	21
Precipitatie	24
Ultrafiltratie	28
Uitspoelen	31
5 Zuiveren	33
Hulpfasen	33
Kringlopen	37
Extractie	40
Kristallisatie	44
Antwoorden	46
6 ZeerZuiveren	47
Sorptie-processen	47
Pieken en banden	54
Gelfiltratie	59
Ionenwisseling	62
Affiniteitsadsorptie	65
7 Schakelen	69
Een compleet proces	69
Hoe kan het beter?	72
Conclusie	74
8 Literatuur	75
Symbolen	77

1 Inleiding

Na al ons werk hebben micro-organismen een goed produkt gemaakt. Dat kan zijn in een schudflesje van 200 ml in het laboratorium. Het kan ook zijn in een industriële fermentor van 200 m³. Wij zijn klaar . . . of toch niet? Nee! Wij moeten het produkt nog ontsluiten, klaren, concentreren, zuiveren en verpakken. Het kan best zijn dat het grootste deel van het werk nog moet gebeuren. . .



Figuur 1-1 Volumefracties in een fermentor

Het opwerken van het produkt na de fermentatie (dus 'benedenstrooms' van de fermentor) noemen wij met een goed Nederlands woord 'Downstream Processing' (DSP). Dat opwerken kent een aantal bijzondere problemen:

- De fermentor bevat veel water (figuur 1-1). Dat loopt van 80 % bij de produktie van ethanol tot 95 % bij sommige therapeutische eiwitten.
- Het produkt kan in de micro-organismen zitten (intracellulair). Wij zullen dan de cellen stuk moeten maken.
- De fermentatie-vloeistof is een uiterst ingewikkeld mengsel, dat dikwijls veel stoffen bevat die op het produkt lijken.
- Toch willen wij vaak een hoge eindzuiverheid van het produkt. Bij medische toepassingen misschien wel 99.9999 %!

Deze problemen bepalen de opzet van de opwerking. Daarbij moeten wij dikwijls de volgende stappen afwerken:

- de cellen stukmaken (alleen bij intracellulaire produkten),
- de cellen of celresten van de vloeistof scheiden ('klaren').
- het produkt ruw voorscheiden en concentreren,
- het produkt zuiveren (dikwijls in meerdere stappen) en
- het produkt in een verkoopbare vorm brengen (bijvoorbeeld als een oplossing in een flesje, of als een poeder of in een capsule). Dit heet 'formuleren'. Dit zijn ook de hoofdstukjes van deze syllabus. Het formuleren zullen wij niet bespreken, ook al is het belangrijk.

Bij elke processtap hoort een apparaat. Daarvan willen wij weten, hoe het eruit ziet, en hoe groot of het is. Meestal willen wij ook weten hoeveel energie of hulpstoffen het apparaat verbruikt.

Dikwijls hebben wij veel processtappen nodig. Elke stap geeft verliezen en dat kan hard oplopen. Stel dat wij een twintigste van het produkt per stap verliezen. Dan hebben wij een opbrengst:

$$\text{na één stap:} \quad 0.95^1 = 0.95$$

$$\text{na twee stappen} \quad 0.95^2 = 0.90$$

$$\text{na drie stappen} \quad 0.95^3 = 0.86$$

.....

$$\text{na tien stappen} \quad 0.95^{10} = 0.60$$

Dit betekent dat een goede bedrijfsvoering heel belangrijk is.

Nog een probleem in de biotechnologie zijn de grote afvalstromen, vooral van verontreinigd water. Wij kunnen zowel de produktverliezen als de afvalstromen sterk verkleinen door een handige keuze van de processtappen en van de manier waarop wij ze schakelen. In het laatste hoofdstuk nemen wij daar een voorbeeld van door.

De eigenschappen van alle deeltjes en stoffen in de fermentatie-vloeistof kennen wij maar slecht. Dat betekent dat wij een ontwerp van een opwerkingsproces niet alleen vanuit een theorie kunnen opzetten. Wij moeten alle stappen *doormeten*. De voorbeelden met modellen en formules in deze syllabus zijn daarom een beetje misleidend. Zij helpen wel om proeven te begrijpen en te extrapoleren, maar zij worden nooit alleen gebuikt zonder ondersteunende proeven. Wij doen dat hier alleen omdat wij geen tijd hebben voor proeven!

Tenslotte: in een inleiding als deze, moeten wij alles kort en overzichtelijk houden. Daarom hebben wij modellen en beschrijvingen gekozen die 'eenvoudig' zijn. Zij geven de hoofdtrekken van processen en apparaten, maar zij zijn niet altijd nauwkeurig.

2 Celdisruptie

Het liefst hebben wij dat cellen hun produkt uitscheiden. Wij hoeven dan de cellen niet stuk te maken; dat scheelt veel ellende bij het scheiden van de cellen van de vloeistof. Jammer genoeg lukt dat niet altijd. Zelfs met genetische manipulatie krijgen wij niet alle produkten buiten de cel. En als dat lukt, dan zijn zij niet altijd stabiel.

Indeling van methoden

Celwanden kunnen wij op veel manieren kapotmaken. Er worden dan ook veel verschillende technieken gebruikt. Die verdelen wij in twee hoofdgroepen:

- de mechanische methoden en
- de niet-mechanische methoden¹.

De tweede groep is op grote schaal minder belangrijk dan de eerste. Daarom besteden wij er maar een paar woorden aan. Niet-mechanische manieren om celwanden doorlatend of kapot te krijgen zijn:

- drogen (vries- of vacuümdrogen),
- veranderen van de zoutsterkte van de omgeving ('osmotische schok'), waardoor cellen zwellen en barsten,
- aanbrengen van een temperatuurschok en
- toevoegen van oppervlakte-actieve stoffen, oplosmiddelen, antibiotica of enzymen (lysozym), die de celwanden degraderen of oplossen.

De mechanische methoden worden het meest gebruikt. Dat zijn er drie, met

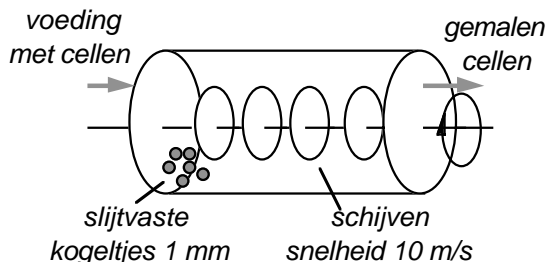
- ultrasone disruptors,
- kogelmolens en
- 'homogenisators'.

In het laboratorium zijn cellen goed stuk te maken met ultrasone trillingen. Voor produktie op grote schaal gebruikt deze methode echter te veel energie.

Kogelmolens (figuur 2-1) bestaan uit een cilindrisch vat waar schijven snel in ronddraaien (met een omtreksnelheid van circa 10 m/s). Zij zijn gevuld met kogeltjes van ongeveer een millimeter diameter, die intensief door de schijven worden geroerd. Cellen in de vloeistof tussen de kogeltjes worden fijngemalen; wij weten niet precies hoe dat gaat. Kogelmolens moeten gekoeld worden. Hoe groter ze zijn, hoe moeilijker dat wordt.

Op produktieschaal wordt de homogenisator het meest gebruikt.

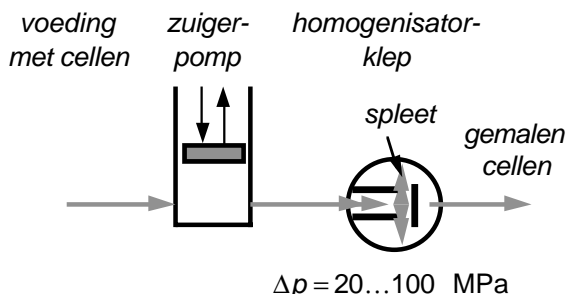
¹Zo kun je alles indelen!



Figuur 2-1 Een kogelmolen om cellen te malen

De homogenisator

De homogenisator (figuur 2-2) is verwant aan de kraan in de waterleiding. Hij is alleen veel steviger; hij moet drukverschillen tussen 20 en 100 MPa kunnen hebben (ongeveer honderd keer de druk in de waterleiding). De fermentatievloeistof wordt met een zeer grote snelheid door een spleet in de klep geperst. Achter de spleet ontstaan dampbellen ('cavitatie') die weer imploderen. Cellen worden door de drukfluctuaties kapot getrokken.



Figuur 2-2 Een homogenisator om cellen stuk te maken

De homogenisator is een eenvoudig apparaat, dat populair is in de productie. Hij heeft wel een paar bezwaren:

- hij is zeer lawaaierig,
- hij kan alleen grote doorzetten aan en is niet geschikt voor het laboratorium,
- hij slijt snel en
- de pompen die erbij horen zijn niet goedkoop.

Wij gebruiken de homogenisator dikwijls om intracellulaire eiwitten vrij te maken. Of hij effectief is, hangt af van het micro-organisme. Bacteriën zijn makkelijk stuk te krijgen; gisten moeilijk. Niet alle gistcellen gaan in één keer stuk. De concentratie eiwit die bij gist vrijkomt voldoet aan de volgende vergelijking:

$$\frac{c}{c_{max}} = 1 - \exp[-KN\Delta p^3]$$

Hierin is

c_{max} de concentratie als alles zou zijn vrijgemaakt

K een 'constante' die afhangt van de celstructuur en de temperatuur,

N het aantal keren dat de suspensie door de klep wordt gepompt en

Δp de drukval over de klep

Wij zien dat de fractie die vrijkomt, oploopt naar één als het getal onder de exponent groot wordt. Dus bij meer passages of bij een grotere drukval.

Door de hoge drukval wordt er veel warmte gevormd. De temperatuurstijging is met een energiebalans te berekenen:

$$\Delta T = \frac{\Delta p}{\rho c_p} \approx 2.5 \cdot 10^{-7} \Delta p$$

Daarin is

ρ de vloeistofdichtheid en

c_p de specifieke warmte

Als wij een thermolabiel eiwit hebben, dan kan dit betekenen dat wij de voeding en/of produkt moeten koelen om denaturatie te voorkomen. Merk op dat de temperatuurstijging niet afhangt van de grootte van de doorzet. Dit is een voordeel van de homogenisator tegenover andere apparaten.

Opdracht 2-1:

Uit een laboratoriumproef is gebleken dat in een bepaald type homogenisator 40 % van een eiwit vrij kwam bij een druk van 40 MPa (met één passage). Bepaal nu hoeveel passages er nodig zijn om een omzetting van 95 % te halen bij drukvallen van 40, 60, 80 en 100 MPa.

3 Klaren

Voordat wij gaan concentreren en zuiveren, moeten wij meestal de cellen (of celresten) uit de fermentatie-vloeistof halen. Dat levert een heldere vloeistof, waarin het produkt is opgelost. Voor dat 'klaren' zijn de twee belangrijke technieken:

- centrifugeren en
- filtreren.

Grote deeltjes verwijderen wij uit de vloeistof door bezinken. In de biotechnologie gebruiken wij deze techniek alleen voor precipitaten (waar fijn materiaal aan elkaar geklonterd is tot grotere deeltjes). Toch zullen wij bezinken eerst bekijken, omdat de theorie een aanloop geeft naar centrifugeren.

Bezinken

Op een deeltje in een vloeistof werken er drie krachten:

- de zwaartekracht, die het omlaag trekt,
- een drukkracht, die het omhoog duwt en
- een wrijvingskracht als het deeltje beweegt ten opzichte van de omgeving.

Voor een klein, enkel, bolvormig deeltje zijn deze krachten:

$$\frac{\pi}{6}D^3g\rho_s - \frac{\pi}{6}D^3g\rho_l - 3\pi\eta uD$$

Meestal kunnen wij versnellings-effecten vergeten, zodat de som van de krachten nul is. Omwerken levert dan voor de bezink- of stijgsnelheid:

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

Hierin is:

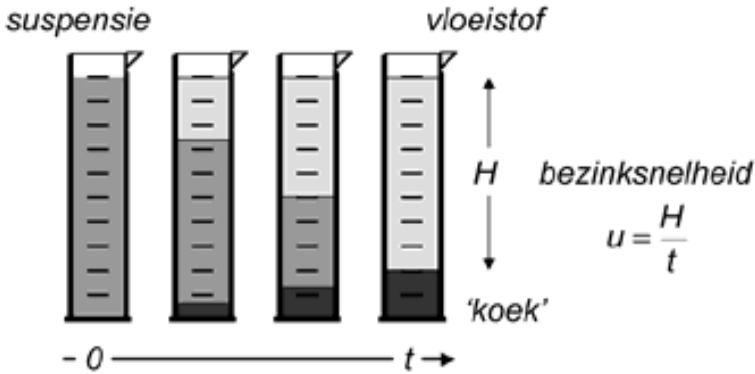
g	de zwaartekrachtsversnelling
ρ_s	de dichtheid van het deeltje
ρ_l	de dichtheid van de vloeistof
η	de viscositeit van de vloeistof
D	de diameter van het deeltje

Wij zien dat de bezinksnelheid evenredig is met het kwadraat van de diameter van het deeltje. Een deeltje dat tien keer groter is, valt honderd keer sneller. In de biotechnologie zijn deeltjes klein:

precipitaten	$10^{-4} < D < 10^{-3}$ m
cellen	$10^{-6} < D < 10^{-5}$ m
celresten en virussen	$10^{-7} < D < 10^{-6}$ m

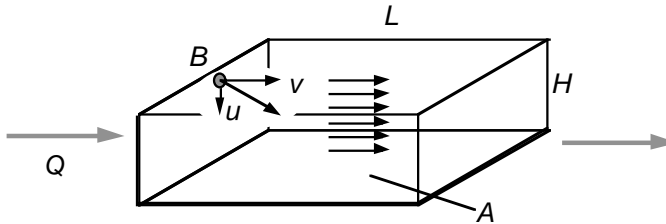
Daardoor zijn bezinksnelheden klein, en is het lastig om oplossingen te klaren.

Echte deeltjes zijn meestal niet bolvormig en ook niet alleen. Zij beïnvloeden elkaar en dit verlaagt hun bezinksnelheid. Die snelheid is dan niet goed te voorspellen. Wij kunnen wel een waarde meten met een proef in een maatcylinder (figuur 3-1). Het grensvlak tussen de vloeistof en de suspensie is dikwijls vrij scherp, zodat hij goed is te volgen. Als er niet binnen een paar minuten een heldere laag is te zien, dan kunnen wij bezinken als scheidingstechniek meestal vergeten.



Figuur 3-1 Een proef om de bezinksnelheid te bepalen

Het bezinken is niet anders in grote apparaten. Wel moeten wij daar voorkomen dat de vloeistof in de bak blijft wervelen door opwarmen of afkoelen. Bij grote doorzetten gebruiken wij 'continue' bezinkers (figuur 3-2).



Figuur 3-2 Een bak met een bezinkend deeltje

Wij beschouwen een rechthoekige bezinkbak met breedte B , lengte L en hoogte H . Een vloeistofstroom Q loopt van links naar rechts door de bak; wij nemen aan dat de snelheid overal hetzelfde is. (In werkelijkheid is de stroming minder regelmatig. Daardoor werkt een bezinkbak minder goed dan wij hier voorspellen). De snelheid heeft een waarde:

$$v = \frac{Q}{BH}$$

De verblijftijd in de bak is dan:

$$\frac{L}{v} = \frac{LBH}{Q}$$

Bij de ingang komt een deeltje binnen, bovenin de bak. (Dit is de meest ongunstige plaats). Het deeltje zinkt met een snelheid u . Het zal de bodem bereiken voor het einde van de bak, als de bezinktijd kleiner is dan de verblijftijd:

$$\frac{H}{u} \leq \frac{LBH}{Q}$$

De grootste doorzet waarbij alle deeltjes worden verwijderd is:

$$Q_{max} = uLB = uA$$

Daarbij is A de oppervlakte ('area') van de bak. Wij zien dat de capaciteit van een bezinkbak niet afhangt van de hoogte, maar alleen van de oppervlakte. Bij een grotere hoogte is de verblijftijd groter, maar moeten de deeltjes ook verder vallen. Wij kunnen de oppervlakte vergroten door extra platen parallel met de bodem van de bak te installeren, maar dat wordt al heel gauw onhandig.

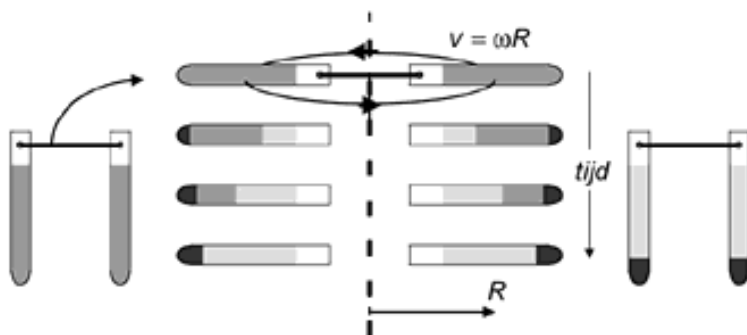
Opdracht 3-1

Wij brengen 1 m^3 van een suspensie van een eiwit precipitaat in een bezinkbak met een oppervlakte van 2 m^2 . Wij beschouwen de precipitaat-deeltjes als afzonderlijke bollen met een diameter van 0.1 mm . Hun dichtheid is 1200 kg/m^3 . De dichtheid en viscositeit van de vloeistof zijn 1000 kg/m^3 en 0.0012 Pa s .

1. Bereken de bezinksnelheid van een enkel deeltje.
2. Schat de tijd nodig voor het klaren van de vloeistof.

Centrifugeren

De zwaartekracht is niet sterk genoeg om kleine deeltjes te scheiden in een redelijke tijd. Wij gebruiken dan centrifuges, die deeltjes met een veel grotere kracht uitslingeren.



Figuur 3-3 Centrifugeren in het lab met een uitzwaaicentrifuge

In het laboratorium kunnen wij een 'uitswaai-centrifuge' (figuur 3-3) gebruiken. De vloeistof gaat in twee gelijke buisjes die wij rondslingeren. De versnelling waarmee de deeltjes worden uitslingerd, hangt af van de straal R in de buis:

$$\omega^2 R$$

De versnelling is ook evenredig met het kwadraat van de 'hoeksnelheid':

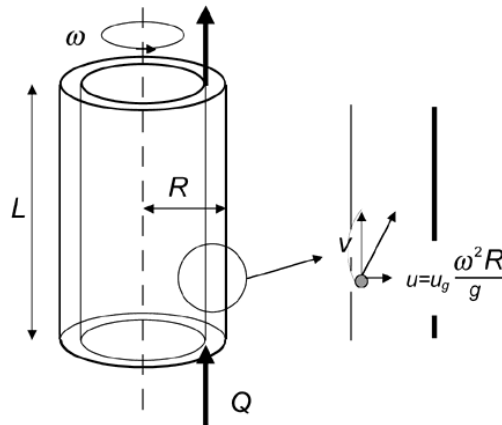
$$\omega = 2\pi n$$

waarin n het toerental is. De versnelling is al gauw enkele duizenden keren groter dan die van de zwaartekracht. Als wij binnen tien minuten bij 3000 g een goede scheiding krijgen in de uitzwaai-centrifuge, dan valt centrifugeren ook te overwegen in een grote installatie. (De verblijftijden in grote centrifuges zijn veel korter, maar de bezinkafstanden ook).

Twee belangrijke productie-centrifuges zijn:

- de buiscentrifuge, die veel op kleine schaal wordt gebruikt en
- de schotelcentrifuge, die grotere doorzetten toelaat.

Wij kunnen beide apparaten zowel met een enkele lading ('batch') als continu bedrijven.



Figuur 3-4 Een buiscentrifuge is een bezinkbak op zijn kant

De buiscentrifuge (figuur 3-4) is het eenvoudigst; wij zullen hem eerst bekijken. Als de cilinder een straal R en een lengte L heeft, dan is zijn oppervlakte:

$$A = 2\pi RL$$

De verhouding van de centrifugale versnelling ten opzichte van de zwaartekracht is:

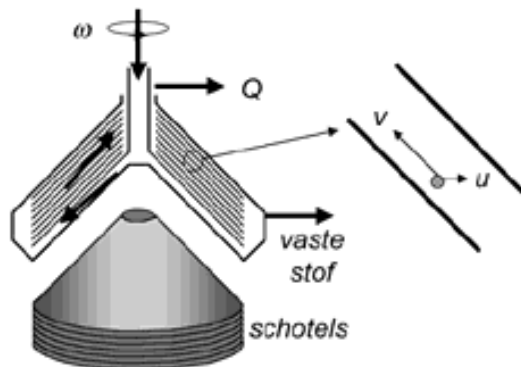
$$\frac{\omega^2 R}{g}$$

Daardoor gedraagt de centrifuge zich als een bezinkbak met een oppervlakte:

$$\Sigma = 2\pi RL \cdot \frac{\omega^2 R}{g} = 2\pi R^2 L \frac{\omega^2}{g}$$

Als wij de waarde van Σ (de 'sigma') kennen, dan kunnen wij uit een sedimentatie of centrifugeer-proef de maximale doorzet van de centrifuge schatten. (Ook hier zijn de prestaties van een continu doorstroomd apparaat wat minder dan die van een 'batch' apparaat. Dit omdat de snelheid v niet overal gelijk is.)

Schotelcentrifuges (figuur 3-5) bevatten een stapel konische platen (de 'schotels'). Die staan op een korte afstand van elkaar; dikwijls op minder dan een millimeter. De bezinkafstand is dus klein. Zij kunnen daardoor een grote effectieve oppervlakte hebben (tot $\Sigma \approx 0.1 \text{ km}^2!$). De voeding komt binnen door de as, in een ruimte onder de schotels. Het gaat dan eerst naar buiten voordat het door de schotels naar binnen loopt. De vaste stof wordt afgevoerd door openingen in de buitenwand; de vloeistof door een ringspleet langs de boven-as.



Figuur 3-5 Een schotelcentrifuge is een schuine bezinkbak met een groot oppervlak

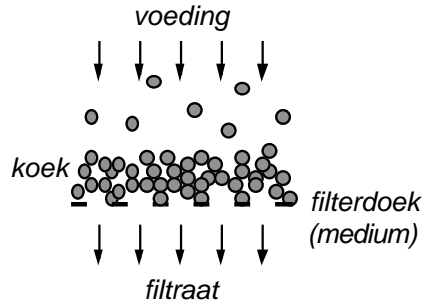
Opdracht 3-2:

Ons bedrijf Groningen Biotechnology BV (GBB) gaat het extracellulair enzym GSA produceren. Daarbij moet een celsuspensie worden geklaard. Bij een sedimentatieproefje met een maatcilinder blijkt dat de suspensie na een dag nauwelijks gesedimenteerd is. In een batch-centrifuge bij 1000 g loopt het scheidingsfront tussen heldere en troebele vloeistof ongeveer 10 cm in een half uur.

De totale productie aan GSA vereist dat er per dag 10 m^3 wordt behandeld. Hiervoor heeft GBB een centrifuge met een equivalente oppervlakte van 1000 m^2 . Bepaal of deze centrifuge de vereiste capaciteit heeft.

Filtratie

Een andere manier om deeltjes uit een suspensie te halen is filtratie (figuur 3-6). De deeltjes worden tegengehouden door een filterdoek (het 'medium'). Op het doek vormt zich een 'koek'. Vreemd genoeg, zijn de gaten in het doek meestal groter dan de deeltjes. Zeg drie maal groter dan de grootste deeltjes. Deze vormen 'bruggen' en daarna houdt de koek andere deeltjes tegen. De vloeistof loopt door de koek en het medium door een drukverschil.

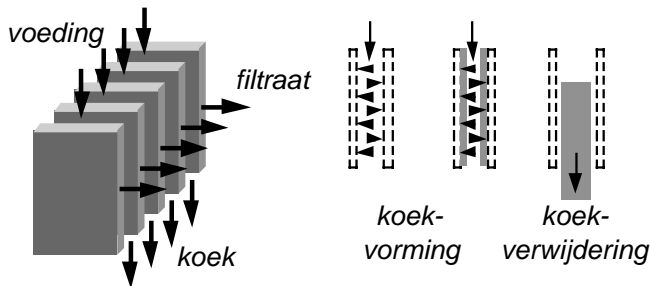


Figuur 3-6 Bij filtratie houden de deeltjes elkaar tegen

In de praktijk filtreren wij op twee manieren:

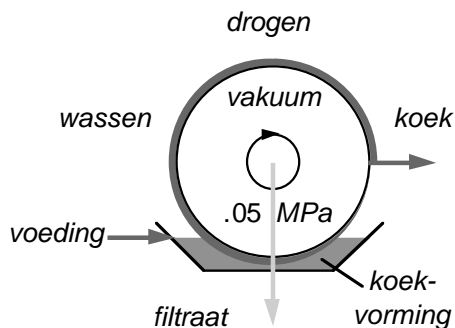
- ladinggewijs met vlakke platenfilters en
- continu met een roterend vacuümfilter.

De platenfilters (figuur 3-7) gebruiken een groot aantal holle platen die evenwijdig staan met tussenafstanden van een paar centimeter. Het filterdoek is over beide kanten van de platen gespannen. De vloeistof gaat van de buitenkant naar de binnenkant van de platen, door het filterdoek. De vaste stof blijft achter op het doek. Na een tijd is de ruimte tussen de platen gevuld met koek. Wij halen dan het filter uit elkaar om de koek te verwijderen. (Dit kan ook automatisch).



Figuur 3-7 Een platenfilter

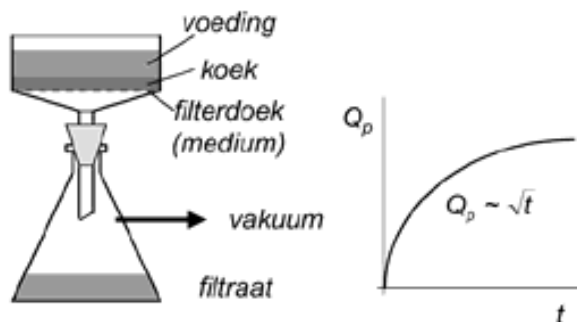
Een roterend vacuümfilter (figuur 3-8) heeft een grote cilinder ('trommel') die draait om een horizontale as. Het filterdoek is gespannen over het cilindrisch deel van het oppervlak. In de cilinder heerst vacuüm. De cilinder draait langzaam door een trog met de voeding. Daar wordt vloeistof aangezogen, en vormt zich de koek. Alleen het onderste deel van de trommel (ongeveer een derde) draait door de vloeistof. De rest van de trommel-oppervlakte gebruiken wij om de koek te 'wassen' en droog te trekken. De koek wordt van het doek geschrapt voordat de trommel weer de vloeistof indraait.



Figuur 3-8- Een roterend vacuümfilter

Het ontwerpen van een filter begint met een proef in het laboratorium. Wij gebruiken hetzelfde doek als in de echte filter. De proef kan bijvoorbeeld op een 'Büchner trechter' (figuur 3-9). Daarbij trekken wij de voeding met een constant drukverschil Δp door het filter. Aanvankelijk is het filterdoek schoon en gaat de filtratie snel. Er vormt zich echter een koek; daardoor loopt de permeatiesnelheid terug. Wij nemen de hoeveelheid filtraat op als functie van de tijd. Achteraf moeten wij ook het koekvolume meten. Uit deze proef halen wij twee parameters:

- de verhouding C van het volume van koek ('cake') en filtraat en
- een weerstand r per eenheid van hoogte van de koek.



Figuur 3-9 Filtratie op een Büchner trechter

De volumeverhouding C halen wij uit de koek- en filtraatvolumes na afloop van de proef:

$$C = \frac{V_c}{V_f} \quad (t = \infty)$$

Deze waarde is groot als er veel vaste stof in de voeding is, of als de koek veel water bevat.

De weerstand r volgt uit het verloop van het filtraat-volume met de tijd. Dat verband leiden wij hier af. De volumeflux door het filter is evenredig met het

drukverschil Δp , en omgekeerd evenredig met de viscositeit η en de koekweerstand. Die laatste is weer een produkt van r en de koekhoogte H :

$$v = \frac{\Delta p}{\eta(rH)} \quad v = \frac{d(V_f / A)}{dt}$$

De koekhoogte neemt toe met het volume filtraat:

$$H = \frac{V_c}{A} = \frac{CV_f}{A}$$

Wij substitueren V_f in de fluxvergelijking:

$$\frac{1}{A} \frac{dV_f}{dt} = \frac{A\Delta p}{\eta r C V_f}$$

De enige variabelen hierin zijn V_f en t . Integreren van de vergelijking geeft:

$$V_f^2 = \frac{2\Delta p A^2 t}{\eta r C} \quad \text{of} \quad V_f = \sqrt{\frac{2\Delta p A^2 t}{\eta r C}}$$

Het filtraatvolume loopt op met de wortel uit de tijd; eerst snel, dan steeds langzamer. Wij kunnen r bepalen door V_f^2 uit te zetten tegen t . Dat moet een rechte lijn geven met een helling:

$$\frac{2\Delta p A^2}{\eta r C}$$

Bij deze afleiding hebben wij de weerstand van het doek verwaarloosd. Die kan een rol spelen bij zeer doorlaatbare koeken.

Opdracht 3-3:

De klaring tijdens de productie van GSA kan ook gebeuren door filtratie. Om dit te onderzoeken doet de researchafdeling een experiment met een kleine drukfilter (oppervlakte 0.00115 m^2) bij een drukverschil van 300 kPa. (Dit is dezelfde drukverschil die gebruikt zal worden in een grote filter.) Daarbij worden de volgende hoeveelheden filtraat gemeten:

tijd (s)	filtraat (ml)
5	40
24	60
60	160
130	240
228	320
319	380

Het volume van de voeding is 500 ml. Op het moment dat de koek droogvalt, is het filtraatvolume 395 ml. De viscositeit van de vloeistof is 0.0012 Pa s .

De grote filter wordt een platenfilter. Daar duurt een filtratie 130 s. Wij hebben nog eens deze tijd nodig om de koek te verwijderen.

1. Bepaal de volumeverhouding koek/filtraat.

2. Bepaal de koekweerstand. (Deze is niet nodig voor de volgende vragen).
3. Bepaal hoeveel oppervlakte er nodig is om 10 m^3 fermentatie-vloeistof te filtreren 8 uur.
4. Hoe groot moet de afstand tussen de filterplaten minimaal zijn, om te zorgen dat de ruimte niet volloopt met 'koek'?

Als wij iets van de deeltjes in de koek afweten, dan kunnen wij de koekweerstand r_{uw} schatten met de formule:

$$r \approx 5 \frac{1 - \phi}{\phi^2} s^2$$

Voor niet-te-kleine bolletjes is het deel van het volume van de koek dat open is ongeveer $\phi \approx 0.4$. Bij fijne deeltjes zijn de koeken dikwijls meer open. Bolletjes met een diameter D , hebben een oppervlak per volume koek:

$$s = \frac{6(1 - \phi)}{D}$$

De formule laat zien dat de weerstand erg groot wordt voor kleine waarden van de diameter van de deeltjes. Daarom zijn celresten alleen, nauwelijks te filtreren. Dat lukt wel als wij grovere deeltjes (een 'filterhulpmiddel') toevoegen. Dat zijn poreuze, inerte materialen, met een gemiddelde deeltjesgrootte in het gebied van 20...50 mm. Het volume aan filter-hulpmiddel moet groter zijn dan dat van de af te vangen deeltjes. De optimale hoeveelheid is alleen experimenteel te bepalen. Meestal voegen wij het hulpmiddel in twee delen toe:

- het eerste (kleine) deel als een voorlaag of 'precoat' op het medium (voordat de eigenlijke filtratie begint) en
- het grootste deel gemengd met de voeding (als 'body feed').

Filterhulpmiddelen veroorzaken twee problemen:

- niemand weet wat je er mee moet en
- je raakt dikwijls vrij veel produkt erin kwijt.

De koekweerstand hangt ook sterk af van de volumefractie ϕ van de kanalen. Wij kunnen de koek soms ijler en doorlatender maken door 'flocculanten' aan de voeding toe te voegen, of door verandering van de pH of zoutsterkte.

4 Concentreren

Na het klaren, hebben wij nog altijd een vloeistof die veel water bevat. Voordat wij het produkt gaan zuiveren, is het meestal beter om eerst water te verwijderen. Dit 'concentreren' levert ook dikwijls enige zuivering op. Soms is deze zuivering al voldoende voor het eindprodukt. Wij bespreken hier drie methoden om te concentreren:

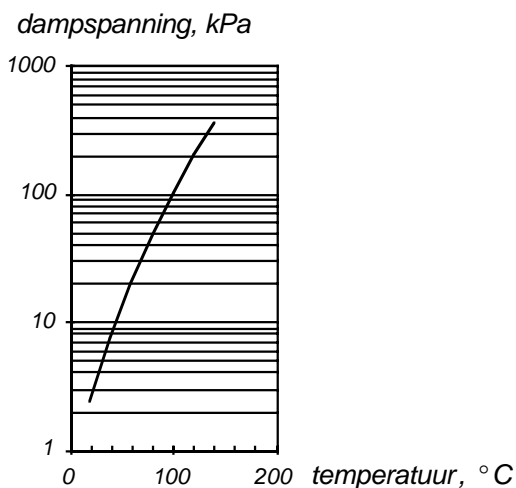
- indampen,
- precipitatie en
- ultrafiltratie.

Indampen

Het oudste en eenvoudigste proces om te concentreren is indampen. Daarmee verwijderen wij water of oplosmiddelen uit een mengsel.

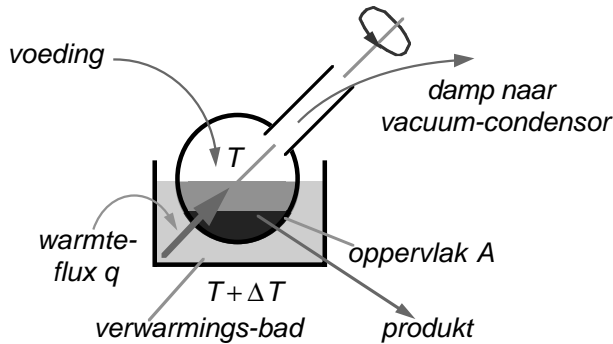
Produkten uit de biotechnologie zijn meestal niet erg stabiel. Daarom moeten wij bij het indampen:

- de temperatuur laag en
- de verblijftijd kort houden.



Figuur 4-1 De dampspanning van water als functie van temperatuur

De temperatuur houden wij laag door onder vacuüm te werken. In figuur 4-1 staat de dampspanning van water uitgezet als functie van de temperatuur. (Let op de logaritmische schaal). Wij zien dat wij de druk moeten verlagen tot minder dan 10 kPa (0.1 atmosfeer) om water bij 40 °C te verdampen. Bij een mengsel moet de druk nog iets lager zijn.



Figuur 4-2 Een roterende vacuüm-indamper

Ook bij indampen begint het leven met een proefje in het laboratorium, bijvoorbeeld in een roterende vacuüm-indamper (figuur 4-2). Dit is een glazen bol, met een schuine cilindrische afvoerpijp. De bol is gedeeltelijk gedompeld in de vloeistof van een opwarm-bad. Wij brengen de voeding in de bol en sluiten de afvoer aan op een condensor en vacuüm-systeem. Het apparaat is zo geconstrueerd dat de bol in de vloeistof kan draaien. Dit houdt het produkt op een homogene temperatuur en het vergroot de warmteoverdracht. Tijdens de proef meten wij:

- de temperatuur van het bad en het produkt,
- de hoeveelheid condensaat als functie van de tijd, en eventueel ook
- de activiteit van het produkt als functie van de tijd.

Wij kunnen daar waardevolle informatie uithalen:

- hoever of wij kunnen indikken,
- hoeveel deactivering of ontleding van het produkt optreedt,
- of de vloeistof erg schuimt bij koken en
- een ruw idee van de warmteflux die wij door de wand van de verdamper kunnen sturen.

Als wij ver proberen in te dikken, dan wordt de vloeistof viskeus. De warmtestroom wordt dan steeds kleiner. Bovendien wil de vloeistof op een gegeven moment niet meer stromen.

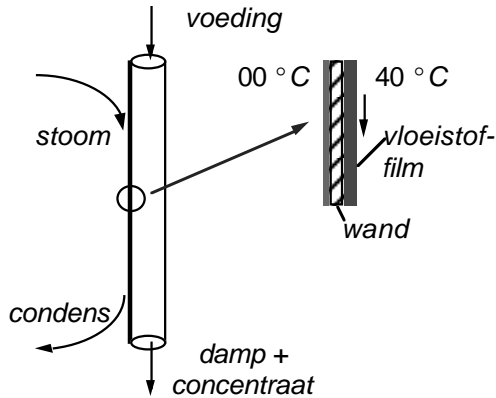
Uit het verloop van de activiteit van het produkt tijdens het indampen, kunnen wij zien of er deactivering optreedt. Deactivering is meestal evenredig met de tijd; de snelheid ervan loopt dikwijls steil op met de temperatuur.

De warmteflux q door de wand (in W m^{-2}) is ongeveer evenredig met het temperatuurverschil tussen bad en produkt:

$$q = \alpha \Delta T$$

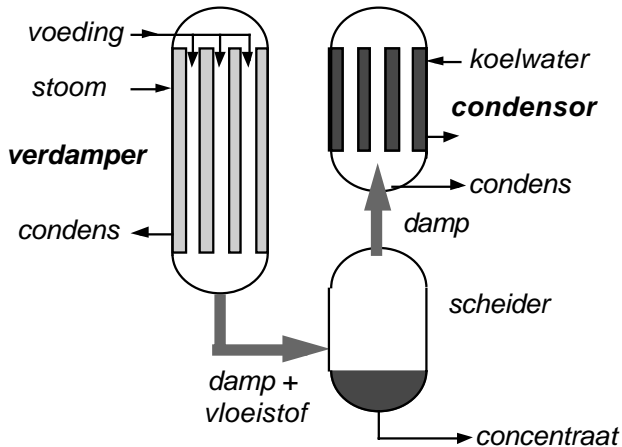
De evenredigheidsfactor a heet de 'warmteoverdrachtscoëfficiënt'. Hij heeft meestal een waarde tussen 300 en 3000 $\text{W m}^{-2} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$. Deze waarde loopt sterk terug als wij ver indikken.

In technische warmtewisselaars, kunnen wij de voeding als een film langs de binnenkant van een verticale pijp laten lopen (figuur 4-3). Zo'n dunne film is veel sneller op te warmen dan bijvoorbeeld een ketel. De warmte voor het verdampen komt van stoom, dat aan de buitenkant van de pijpen condenseert. De druk aan de buitenkant is hoger dan aan de binnenkant, zodat ook de temperatuur daar hoger is.



Figuur 4-3 Een pijp in een verdamper

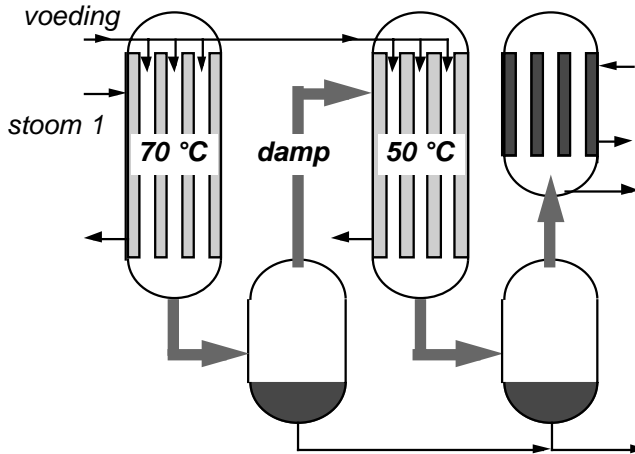
Na de verdamper, scheiden we de damp en de vloeistof of concentraat (figuur 4-4). De damp wordt in een condensor gekoeld en vloeibaar gemaakt. De druk in de verdamper wordt bepaald door de temperatuur van de condensor.



Figuur 4-4 Vallende film verdamper

Bij het condenseren geeft één kg stoom een warmte af van 2.2 MJ (megajoule). Dit is slechts voldoende om één kg water (of enkele kg oplosmiddelen) te verdampen. Stoomverbruik is een grote kostenpost bij indampen. Daarom proberen wij de stoom meerdere keren te gebruiken. Een manier waarop dat kan

staat in figuur 4-5. Die laat een tweetraps-verdamper zien. Daar wordt damp uit de eerste trap (in plaats van stoom) in de tweede trap ingezet. De temperatuur (en dus de druk) van de tweede verdamper moet lager zijn dan van de eerste verdamper. Met meer trappen kunnen wij het stoomverbruik verder drukken, echter wel ten koste van meer apparatuur.



Figuur 4-5 Tweetraps verdamper

Zoals wij in het laboratorium hebben gevonden, kunnen wij niet onbeperkt indampen; meestal niet verder dan tot ongeveer 60% 'vaste stof' in de oplossing. Daarboven wordt de warmteoverdracht te langzaam en worden de kosten voor de extra pijpen snel hoger.

Opdracht 4-1

Wij moeten een stroom van 0.2 kg/s van een gist-extract indampen. Daarbij moet het vaste stof gehalte omhoog van 20% naar 50%. In een proeffabriek zijn metingen gedaan onder de volgende condities:

Voeding 0.05 kg/s; $T_{voeding} = 40\text{ °C}$, vaste stof gehalte 20%

Concentraat 0.02 kg/s; $T_{concentraat} = 40\text{ °C}$; vaste stof gehalte 50%

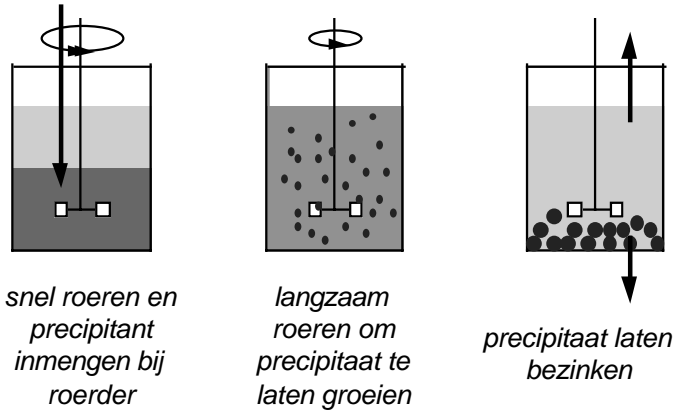
Stoomtemperatuur 100 °C; stoom verbruik 0.03 kg/s

Oppervlakte van de verdamper $A_{proef} = 0.5\text{ m}^2$.

In de echte fabriek zullen wij met stoom van 140 °C werken. Schat het stoomverbruik en de oppervlakte van de benodigde verdamper in de fabriek. Neem daarbij aan dat de warmteoverdrachtscoëfficiënten in beide apparaten gelijk zijn.

Precipitatie

Bij precipitatie (figuur 4-6) verlagen wij de oplosbaarheid van eiwitten tot zij neerslaan. Wij scheiden dan de neerslag met een bezinkbak, centrifuge of filter. De neerslag is veel geconcentreerder dan de voeding. Wij kunnen dit neerslaan ook stukje bij beetje doen ('gefractioneerd'). De fracties bevatten dikwijls verschillende verhoudingen van de eiwitten in de fermentatie-vloeistof; daarmee kunnen wij voorzuiveren.



Figuur 4-6 Precipiteren (neerslaan) van eiwitten

Wij verlagen de oplosbaarheid door een zout of door een organische oplosmiddel (meestal aceton of een alcohol). Daarvan hebben wij grote hoeveelheden nodig. Precipitatie met zouten heeft als voordelen:

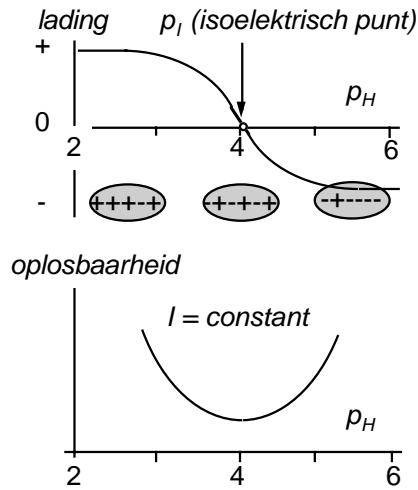
- de kans op denaturatie is klein,
- meestal kunnen wij bij kamertemperatuur werken,
- wij kunnen dikwijls een redelijk zuiver preparaat krijgen met weinig bewerkingen.

Er zijn drie nadelen:

- wij moeten veel zouten lozen,
- het produkt bevat zouten, die wij moeten verwijderen (bijvoorbeeld met ultrafiltratie) en
- zouten zijn zeer corrosief.

Met een oplosmiddel is er meer kans op denaturatie. Daarom moeten wij bij lage temperaturen werken. Een voordeel van oplosmiddelen boven zouten is, dat wij ze makkelijker kunnen terugwinnen.

De oplosbaarheid van eiwitten kunnen wij niet goed voorspellen. Wel zijn de grote trekken van het gedrag redelijk te begrijpen. Eiwitten hebben zowel zwak-zure als zwak-basische groepen. Als het eiwit in water komt, ioniseren die; daardoor krijgt het eiwit een lading. Bij een hoge pH zijn vooral de zure groepen geïoniseerd, en is het eiwit negatief. Bij een lage pH is het eiwit positief. Er is steeds één pH waarbij het eiwit geen nettolading heeft: het 'isoelektrisch punt' of pI (figuur 4-7). In de buurt van de pI stoten eiwitten elkaar niet af en kunnen ze flocculeren en neerslaan. De oplosbaarheid gaat daar door een minimum.

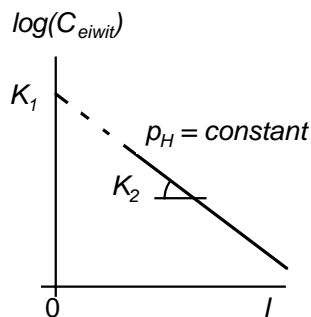


Figuur 4-7 Lading en oplosbaarheid van eiwitten

Kleine ionen vormen een 'elektrische dubbellaag' om de eiwitten. Bij lage concentraties van de ionen, is die laag dik, zodat de eiwitten elkaar afstoten. Als wij meer ionen toevoegen, dan wordt de afstoting kleiner, zodat de eiwitten kunnen precipiteren. De oplosbaarheid volgt dikwijls:

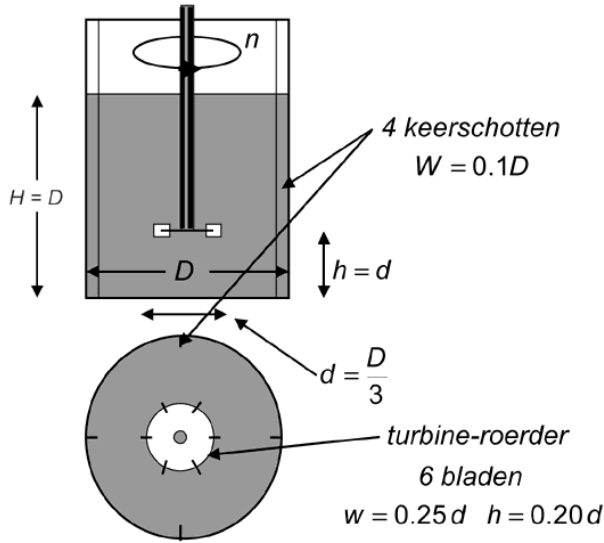
$$\log c_{\text{eiwit}} = K_1 - K_2 I \quad \text{met} \quad I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

(Zie figuur 4-8.) Daarin zijn de 'constanten' K_1 en K_2 specifiek voor ieder eiwit/zout systeem. K_1 hangt af van de pH en ook enigszins van de temperatuur. De grootte I is de 'ionsterkte'. Hij bevat de concentraties c_i van de verschillende ionen, en hun ladingstgetallen z_i . Een zout dat hoge ionsterktes kan geven is ammoniumsulfaat. Het is zeer oplosbaar, en het tweewaardig sulfaat ion helpt een handje mee.



Figuur 4-8 Oplosbaarheid van een eiwit als functie van de ionsterkte

De oplosbaarheid van eiwitten is laag in organische oplosmiddelen. Dit komt door de lage dielectrische constante van deze stoffen, die ionisatie onderdrukt.



Figuur 4-9 Standaard geroerd vat

Precipiteren doen wij in een geroerd vat (figuur 4-9). Het is goed mogelijk om met laboratoriumproeven in kleine vaten, de juiste condities uit te zoeken. Daarbij is het wel belangrijk dat het laboratorium-apparaat en het grote vat dezelfde vorm of 'geometrie' hebben. Dat kan bijvoorbeeld de standaard-geometrie met een turbineroerder zijn van figuur 4-9, maar andere geometrieën kunnen ook.

Een maat voor de roer-intensiteit is de dissipatie per kilogram vloeistof. Het vermogen dat een turbineroerder opneemt hangt af van het toerental n , de roerder-diameter d en de vloeistof dichtheid ρ :

$$P = 5\rho n^3 d^5$$

De massa van de inhoud van het standaard-vat is:

$$m = \rho \frac{\pi}{4} D^2 H = \rho \frac{\pi}{4} D^3$$

Zodat

$$\frac{P}{m} = 0.026n^3 D^2$$

'Hard roeren' is bijvoorbeeld een dissipatie van 1 W kg^{-1} ; 'zachtjes roeren' een factor tien of honderd lager.

In het begin van de precipitatie roeren wij hard om de precipitant goed op te mengen. Om dezelfde reden voeren wij de precipitant in vlak bij de menger. De deeltjes die dan gevormd worden, zijn fijn; zij hebben weinig last van het roeren. Daarna moeten wij zachter roeren om ze te laten groeien. Als de

deeltjes te klein blijven, kan het handig zijn om stukjes van een inert materiaal (bijvoorbeeld gips) toe te voegen. Het eiwit dat precipiteert hecht zich daaraan.

Bij de proeven op kleine en op grote schaal houden wij de volgende zaken hetzelfde:

- de dissipatie per kilogram vloeistof,
- de toevoegtijd van het precipitant en
- de tijden van de verschillende mengstappen.

Verder gebruiken wij dezelfde materialen. Merk op dat het roerder-toerental in een groot vat dan veel lager is dan in een klein vat.

Opdracht 4-2:

De GSA-oplossing uit opdracht 3-2 bevat als verontreiniging het eiwit BSA. Bij precipitatie met ammoniumsulfaat vinden wij de volgende oplosbaarheden. De waarden zijn in gram/(liter van de oorspronkelijke vloeistof).

$[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ (%)	GSA (g/l)	BSA (g/l)
0.0	10.0	2.0
25.0	1.0	1.0
50.0	0.1	0.5
75.0	0.01	0.25
100.0	<0.01	0.13

Bepaal hoeveel GSA wij neerslaan uit 10 m^3 fermentatie-vloeistof met 25, 50 en 75 % zout.

Bepaal de verhouding van de concentraties BSA en GSA in deze neerslagen.

De percentages zijn fracties van de maximale oplosbaarheid; ongeveer 530 g $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ /(l oplossing). Dit is een oplossing met een dichtheid van 1230 kg/m^3 . Deze waarden heb je overigens niet nodig in de opdracht.

Ultrafiltratie

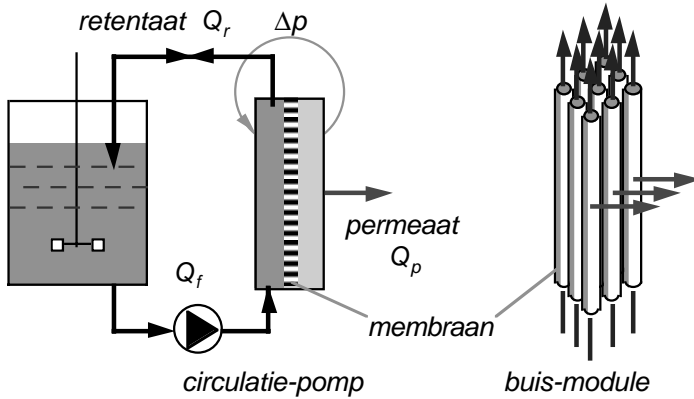
Bij het concentreren kunnen wij ook membranen gebruiken. Er zijn twee soorten membranen die veel gebruikt worden in de biotechnologie:

microfiltratie (MF) membranen en

ultrafiltratie (UF) membranen.

Microfiltratie-membranen hebben poriën van $0.2 \dots 0.5 \mu\text{m}$. Zij kunnen cellen tegenhouden. Microfiltratie lijkt veel op gewone filtratie; wij zullen het hier verder niet bespreken.

Een ultrafiltratie-membraan heeft poriën van ongeveer 10 nm. Dit is zo'n duizend keer kleiner dan de openingen in een filterdoek. Daardoor kan een ultrafiltratie-membraan eiwitten tegenhouden, terwijl het water en zouten doorlaat. Wij gebruiken meestal membranen in de vorm van poreuze buizen van 1.5 mm diameter. Een dun laagje op de buiswand vormt het membraan. Dat membraan kan bestaan uit een poreuze (sponsachtige) polymeer, uit poreus koolstof of uit een laagje poreuze keramiek.



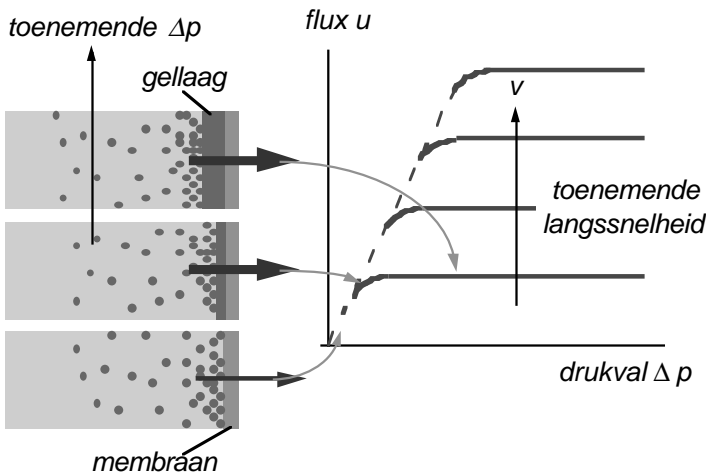
Figuur 4-10 Concentreren met ultrafiltratie

Wij gebruiken zo'n membraan op twee manieren:

- om te concentreren ('gewone' ultrafiltratie, figuur 4-10) en
- om er zout mee uit een produkt te spoelen ('diafiltratie').

Een verschil tussen ultrafiltratie en gewone filtratie is dat er bij UF een belangrijke stroom *langs* het membraan is. UF is een vorm van 'kruisstroom-filtratie'.

Over het membraan staat een drukverschil van enkele honderden kPa. Daardoor wordt water (met opgeloste zouten) door het membraan geperst. De flux u door het membraan is klein; rond $10 \mu\text{m/s}$. Bij een toenemend drukverschil loopt de flux eerst op (figuur 4-11). Het water voert eiwit mee, dat niet door het membraan kan. Daardoor krijgt het eiwit een hogere concentratie bij het membraan. Door diffusie en turbulentie in de langsgestroomde vloeistof wordt dit eiwit weer teruggemengd.



Figuur 4-11 De twee regimes bij ultrafiltratie

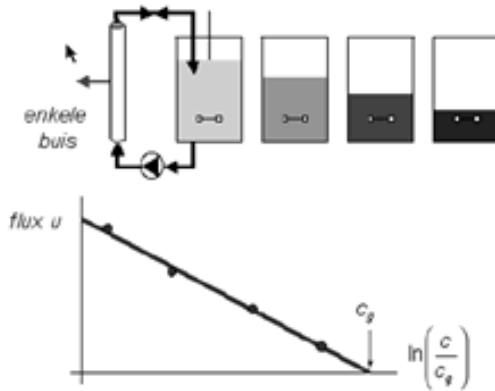
Bij een bepaald drukverschil, wordt de concentratie eiwit bij het membraan zo hoog, dat eiwit precipiteert. Het vormt een gellaag, die niet erg permeabel is. Een verdere drukverhoging geeft niet meer flux, maar alleen een dikkere gellaag. De maximale flux voldoet aan:

$$u = k \ln \frac{c_g}{c}$$

Daarbij is

- k de 'stofoverdrachtscoëfficiënt' die toeneemt met de langsstroming,
- c_g de concentratie waarbij het eiwit een gel vormt,
- c de eiwitconcentratie in de 'bulk' van de vloeistof.

Wij zien dat de maximale flux afneemt bij een toenemende bulkconcentratie. Bij $c = c_g$ wordt hij nul.



Figuur 4-12 Batch proef met een enkele buis in het laboratorium

Het verloop van de flux met de concentratie kunnen wij met een laboratoriumproef met één membraanbuis opmeten (figuur 4-12). Daar is maar een enkele batch proef voor nodig: de concentratie doorloopt tijdens de proef het hele gebied waarin wij geïnteresseerd zijn. Met deze resultaten kunnen wij grote installaties ontwerpen, ook bijvoorbeeld meertraps continue installaties.

In het gebied van gellaagvorming kunnen wij de flux wel vergroten door de vloeistof sneller *langs* het membraan te pompen. Dat verhoogt de stofoverdrachtscoëfficiënt en de terugmenging van het eiwit. Wij gebruiken langssnelheden van 1...3 m/s. De stofoverdrachtscoëfficiënt is dan ruw te schatten met:

$$k = 10^{-5} v$$

Het membraan splitst de voedingstroom in twee delen: een permeaat- en een concentraatstroom.

$$Q_f = Q_p + Q_c$$

De verhouding van de permeaatstroom en de voedingstroom heeft een eigen naam: de 'permeaatopbrengst'.

$$\Delta = \frac{Q_p}{Q_f}$$

Bij een grote concentrering heeft die een waarde dicht bij één.

Omdat wij de vloeistof aan de hogedrukkant van het membraan moeten rondpompen, is de bulksamenstelling c_c (van 'concentraat') daar overal dezelfde. Daarom heeft ook het permeaat overal dezelfde samenstelling c_p . Wij beschrijven de scheiding van een stof door het membraan door zijn 'retentie'. Deze bevat een verhouding van die twee concentraties:

$$R = 1 - \frac{c_p}{c_c}$$

Voor een eiwitmolecuul gaat $c_p \rightarrow 0$ en $R \rightarrow 1$. Voor een klein molecuul zoals een zout, is er weinig verschil tussen de twee concentraties. $c_p \rightarrow c_c$ en $R \rightarrow 0$.

Uit de permeaat-opbrengst en de retentie kunnen wij berekenen welk deel van een stof in het concentraat blijft:

$$\phi = \frac{1 - \Delta}{1 - R\Delta}$$

Als $\Delta \rightarrow 1$ dan moet ook $R \rightarrow 1$, anders komt er teveel produkt in het permeaat terecht.

Opdracht 4-3

Wij concentreren een enzymoplossing met ultrafiltratie. De concentratie van het enzym is 100 'units/ml'. (Eigenlijk is dit een maat voor de activiteit.) De flux neemt af terwijl de concentratie oploopt, volgens:

flux u , 10^{-5} m/s	1.4	1.15	0.77	0.49	0.23
concentrering cn (-)	1.0	1.5	3.0	5.0	8.0

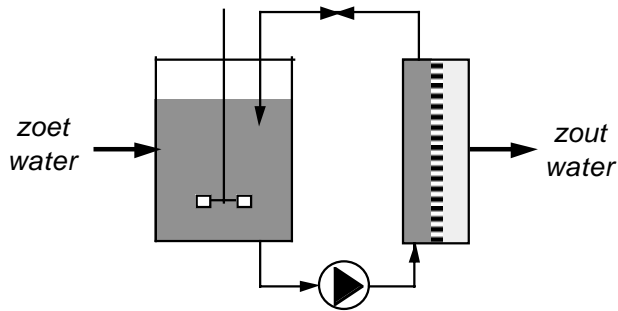
Maak hieruit een schatting van de stofoverdrachtscoëfficiënt naar het membraan en van de waarde van de concentratie waarbij het enzym precipiteert. Neem daarbij aan dat de retentie van het enzym de waarde $R = 1$ heeft. (Aanwijzing: zet u uit tegen $\ln(cn)$. Wat is de waarde van de helling? Wanneer wordt de flux nul?)

Uitspoelen

Zouten en andere laagmoleculaire stoffen spoelen wij uit een eiwitoplossing met 'diafiltratie' (figuur 4-13). Het water met zout voeren wij af door een ultrafiltratiemembraan; wij vullen dat aan met even veel schoon water. Wij kiezen een membraan met een bijna volledige retentie voor het eiwit. De retentie voor het zout moet laag zijn. Bij diafiltratie lopen de concentraties exponentieel terug met de toegevoegde hoeveelheid water:

$$c = c_0 \exp \left[-\frac{V_w}{V_f} (1 - R) \right]$$

Daarbij is V_w het volume van het toegevoegde water en V_f dat van de voeding.



Figuur 4-13 Diafiltratie = zout uitspoelen

Opdracht 4-4

Bij de precipitatie van GSA, krijgen wij een suspensie van 0.5 m^3 met daarin 99 kg GSA. Daarin zit veel ammoniumsulfaat. Wij willen 99% van dit zout verwijderen met diafiltratie. Tijdens het diafiltreren lost het precipitaat weer op; voor de eenvoud nemen wij aan dat dit meteen gebeurt. Wij gebruiken een membraan met een retentie van 0.99 voor het eiwit en 0.10 voor het zout. Verder is gegeven dat de stofoverdrachts-coëfficiënt een waarde heeft $k = 10 \text{ } \mu\text{m/s}$ en dat de gelconcentratie van het eiwit $c_g = 600 \text{ g/l}$ bedraagt.

Hoeveel water hebben wij nodig?

Wat zijn de verliezen aan GSA?

Welke oppervlakte aan membranen is er nodig om de lading in een uur te verwerken?