

## SEPARACE V BIOTECHNOLOGIÍCH

### Separáční techniky – jejich role a m sto v biotechnologiích

Předmět navazuje na Chemické inženýrství I a II, kde jsou zm něny základní separační techniky, které jsou zde rozšířeny o moderní procesy používané v biologických technologiích jako jsou např. membránové a chromatografické techniky.

Separáční techniky využívané v biotechnologiích lze charakterizovat jako jednotkové operace mající multidisciplinární charakter, bez kterých se neobejde ř dn  biotechnologick  výroba.

Separáčn ch technik je mořné klasifikovat z různých pohledů:

- separace v jedno- nebo více-fázových systémech,
- podle charakteru a vlastností separovaných částic,
- podle hnací sily procesu apod.

Separáční techniky v biotechnologiích se rozdělují také podle jejich postaven  ve vztahu k bioprocesu. Pak se hovoří o jejich využití v oblastech tzv. "up-stream" a "down-stream processing", česky před nebo n sledn  po bioprocesu. Jde o operace, které lze shrnout do následujících aplikací:

- p prava a sterilace fermentačních médií a plynů
- separace biomasy z médií po fermentaci
- izolace a purifikace produktů, rozdíly v izolaci extracelulárních a intracelulárních metabolitů a komponent a s tím související způsoby uvoln n  těchto produktů z buněk pomocí jejich dezintegrace
-  ištění odpadních produktů (pevných, kapalných a plynny ch)
- integrovan  systémy využívající spojení bioprocesu (fermentace) a současné separace produktu (např. membránové bioreaktory).

### Dezintegrace buněk

Slouží k uvoln n  obsahu buňky p  izolaci intracelulárních komponent, buněčných organel či fragmentů p  zachování jejich biologické aktivity. Jde o techniky, které mohou být spojeny se změnou buněčné morfologie (tj. porušení buněčné stěny, otevřen m a fragmentací buňky) nebo vedou pouze k permeabilizaci cytoplazmatick  membrány, která je propustn  vnitrobuněčné látky.

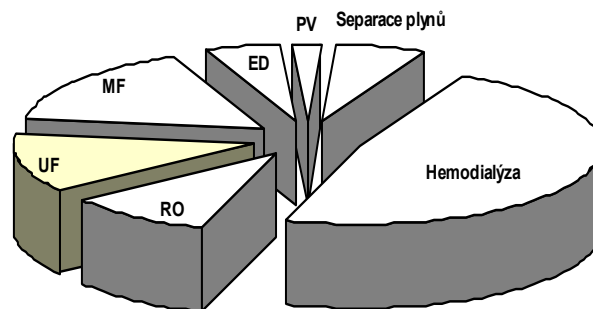
Metody dezintegrace se d l  fyzik ln  (mechanick ), které využívají např. opakovan  zmrazování a rozmrazování, X-press, French-press, tryskov  homogenizátory, vysokoot tkov  mixery, balotinov  dezintegr tory ... Další metody jsou chemick , p p. enzymov  využívající u inků sloučenin způsobilujících permeabilizaci buněčné membrány (organick  rozpouštědla, tenzidy, komplexotvorn  látky ... a v neposlední řadě i lytick  enzymy schopn  štěpit buněčnou stěnu -, lysozym, enzymy trávícího traktu (řnekasa) apod.). Volba vhodn  techniky závisí zejména na charakteru buněk a izolovaných komponent, na pořadovan m měřítku (laboratorn  a pr myslov ).

### Membr nov  separace

Membr nov  technologie jsou „ istou“ a energeticky úspornou alternativou k tradičním procesům. Od 70. let minulého století nacházejí stále v tř  uplatnění i v pr myslov m měřítku a to zejména v oblastech p pravy  ist  vody, biotechnologií, zpracování potravin, ve farmaceutick m a chemick m průmyslu a také v medicíně (um l  ledvina, řizen  dávkování léků apod.). Důvodem ke stále rozř ruj c mu se využívání membránových technologií je mořnost realizovat procesy, které by byly bez využití membrán neprovediteln  nebo obt řn  provediteln  a p  tom minimalizovat negativn  z t ř životního prostř d . Membr nov  separace se tak stávají nedílnou součástí technologických procesů, které často poskytují nové

produkty s unikátními vlastnostmi a ve vysoké čistotě. Membránové separační procesy zahrnují velice širokou skupinu procesů, které mají jeden společný rys a to je použití membrány jako semipermeabilního separačního rozhraní. V současné době by bylo velice nepřesné omezovat se pouze na skupinu membránových filtračních technik, jejichž hnací silou je transmembránový tlak, a na procesy probíhající v koncentračním gradientu jako jsou osmosa a dialýza.

Membrány hrají i velice důležitou roli při hledání alternativních zdrojů energie, jsou důležitou součástí palivových článků budoucnosti.



Obr. 1 Rozdělení trhu s membránami a membránovými moduly podle jednotlivých aplikací (RO – reverzní osmosa, UF – ultrafiltrace, MF – mikrofiltrace, ED – elektrodialýza, PV – pervaporace).

Separací procesy jsou takové operace, při kterých ze zařízení vystupují minimálně dva kvalitativně odlišné proudy. U membránových separací se získává jednak proud, který prostupuje membránou, který se nazývá **permeát (P)**, a jednak proud látek, které jsou membránou zadržovány a zůstávají tak na nástřikové straně membrány, který se obecně nazývá **retentát (R)**. V některých membránových aplikacích se hovoří o diluátu či koncentrátu. Pro vstupující proud se používá označení **nástřik** neboli „**feed**“ (**F**).

### Hnací síla membránových separačních procesů

Obecně platí, že hnací silou každého membránového procesu je transmembránový gradient.

Podle typu hnací síly se mohou membránové separační procesy rozdělovat na:

- procesy s gradientem tlaku – mikrofiltrace (MF), ultrafiltrace (UF), nanofiltrace (NF) a reversní osmosa (RO)
- procesy s gradientem chemického potenciálu – pervaporace (PV), permeace plynů, dialýza, osmosa
- procesy s gradientem elektrického potenciálu – elektrodialýza (ED), membránová elektrolyza
- procesy s gradientem teploty – membránová destilace (MD).

### Princip separace

K separaci dochází na základě rozdílných fyzikálně-chemických vlastností látek a částic v separované směsi – nástřiku. Nejčastěji se uplatňují:

- velikost částic (typické membránové procesy, kde je tento princip separace dominantní - MF, UF, NF, RO),
  - difuzivita a velikost (PV, permeace plynů, MD, dialýza, osmosa),
  - elektrický náboj (ED, membránová elektrolyza, Donnanova dialýza)
- a dále rozpustnost, povrchové vlastnosti, afinita, reaktivita apod.

Vzhledem k rozmanitosti hnacích sil a principů separace, které se uplatňují při membránových separačních procesech, není překvapující ani velká různorodost používaných membrán, zejména z pohledu chemického složení a fyzikálních vlastností (struktura, velikost pórů, porosita...). Membránové procesy lze dělit i podle typické velikosti pórů membrány, která koresponduje s jejími separačními vlastnostmi, viz obr. 2.

Velikost póru v membráně	Relativní molekulová hmotnost (Da)	Typické separované částice	Membránový separační proces
neporézní			PV, ED, dialýsa, MD
0,1 nm	100	Ionty kovů	
	1000	Malé molekuly	NF/RO
1 nm	10000	Peptidy	
	100000	Polysacharidy	
10 nm	1000000	Proteiny	UF
		RNA	
		DNA	
100 nm		Viry	
			MF
1 μm		Mikroorganismy	
			■ klasická ■ filtrace
10 μm		Koloidy, prach	
		Rostlinná a živočišná buňka	

Obr. 2 Rozdělení membránových procesů podle separačních schopností membrány (podle velikosti separovaných částic)

## Membrány

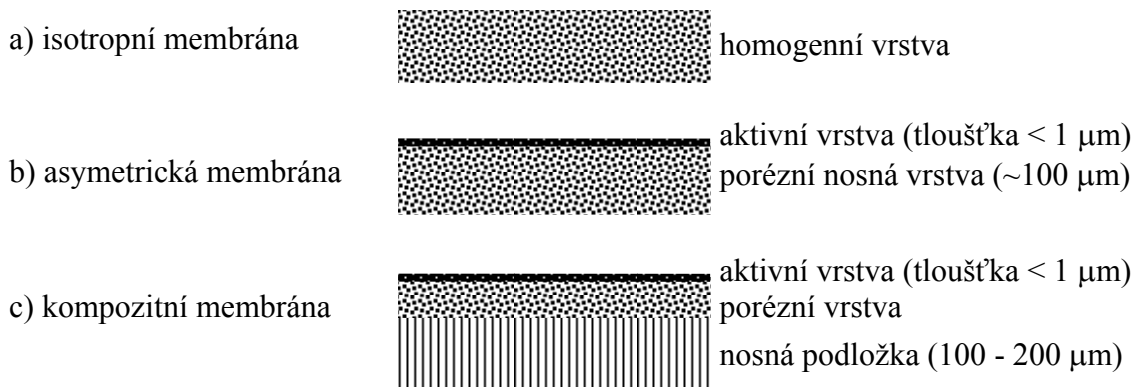
Membrány jako aktivní separační rozhraní v membránových procesech se mohou rozdělovat a třídit podle různých kritérií.

Na základě chemického složení rozeznáváme membrány organické (polymerní) a anorganické. Starší generace **polymerních membrán** byla vyrobena na bázi přírodních polymerů (celulosa a její deriváty) a nyní se stále více uplatňují syntetické polymery, např. polysulfon, polyamid, polyetherimid, polyethersulfon, polyvinylidenfluorid, polytetrafluorethylen, které jsou chemicky a fyzikálně stabilnější (odolnost vůči organickým rozpouštědlům, pH, teplotě). Poslední generací jsou **anorganické (keramické) membrány** vyrobené z oxidů hliníku, zirkonu a titánu, silikátových materiálů, karbidů, zeolitů apod., které vynikají extrémní pevností a odolností.

Podle struktury rozeznáváme membrány (viz obr. 3):

- **isotropní (symetrické)**, které jsou na řezu homogenní, mohou být porézní i neporézní,

- **asymetrické** s hustou velice tenkou *aktivní vrstvou*, která membráně propůjčuje její separační vlastnosti. Aktivní i nosná vrstva jsou vyrobeny z jednoho materiálu.
- **kompozitní** – složené s více vrstev různých materiálů a rozdílné funkce, vrchní aktivní vrstva zajišťující separační vlastnosti je ukotvena na porézní vrstvě, plnící zejména funkci drenáže (odvodu permeátu), a vše je fixováno na nosné makroporézní podložce (většinou tzv. netkaná textilie), která membráně propůjčuje dobré mechanické vlastnosti (pevnost, manipulovatelnost, ...).



Obr. 3 Struktura membrán

Tenká *aktivní vrstva* přispívá k výraznému snížení odporu membránové separace, protože se zkracuje dráha, kterou musí transportovaná částice překonat při průchodu skrz membránu. Podpurné vrstvy již nekladou průchodu částice významný odpor.

Porézní membrány jsou tvořeny labyrintem kanálek, pórů nebo izolovanými póry válcového tvaru, které jsou typické pro tzv. *jaderné membrány*, které se získávají „prostřílením“ vrstvy polymeru  $\alpha$ -částicemi nebo jádry těžkých kovů a následným chemickým odleptáním míst zásahu, tyto membrány se vyznačují dobře definovanými póry.

Speciálním typem membrán jsou **ionoaktivní membrány**, které umožňují transport kationů (kationaktivní membrána) nebo anionů (anionaktivní membrána). Těto selektivity je dosaženo tím, že záporné nebo kladné iony jsou pevně vázány v polymerní struktuře membrány, zatím co protiiony se mohou volně pohybovat. Charakteristickým znakem nabitých membrán je jejich elektrická vodivost daná množstvím nabitých pohyblivých částic na jednotku plochy membrány.

Pro hodnocení membránových procesů a zejména membrán z pohledu kvalitativních a kvantitativních znaků se používají dva základní ukazatele: selektivita a propustnost (tok permeátu).

**Selektivita** udává schopnost membrány přednostně propouštět (preferovat) jednu složku z nástřiku a tím vzájemně oddělit dvě či více složek.

Selektivitu je možné vyjádřit následujícími způsoby:

$$\beta = \frac{c_{i(\text{retentát})}}{c_{i(\text{nástřás})}}, \text{ stupeň zakoncentrování (obohacení)}, \text{ používá se zejména u}$$

ultrafiltrace a vyjadřuje poměr koncentrace složky  $i$  v retentátu k její koncentraci v nástřiku. Tento jednoduchý vztah je vhodný zejména v těch případech, kdy

produkt je membránou zadržován a hromadí se v retentátu (koncentrátu) a jde o jeho zakoncentrování.

$$R = 1 - \frac{c_{i(\text{permeát})}}{c_{i(\text{nástřás})}}, \text{ koeficient rejekce, používá se zejména u reversní osmosy}$$

k vyjádření schopnosti zadržet soli a nízkomolekulárních látek. V případě, že membránou neprochází žádné sledované ionty (látky), nabývá hodnoty 1.

$$\alpha = \frac{c_{a(\text{permeát})} / c_{b(\text{permeát})}}{c_{a(\text{retentát})} / c_{b(\text{retentát})}}, \text{ separační faktor, používá se zejména u pervaporace,}$$

permeace plynů, membránové destilace a vyjadřuje poměr koncentrací složek *a* a *b* v permeátu k poměru koncentrací těchto složek v retentátu.

Vyjádření chování vícesložkových soustav je značně komplikované.

**Propustnost membrány** je definována jako rychlost toku permeátu vztažená na jednotku plochy membrány a času (např.  $\text{m}^3 \text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$ )– je brána jako výkonové kritérium procesu. Slouží k porovnání propustnosti jednotlivých druhů membrán (výrobci udávají tyto hodnoty pro modelové roztoky separované za standardních podmínek) nebo k porovnání efektivity různých membránových procesů.

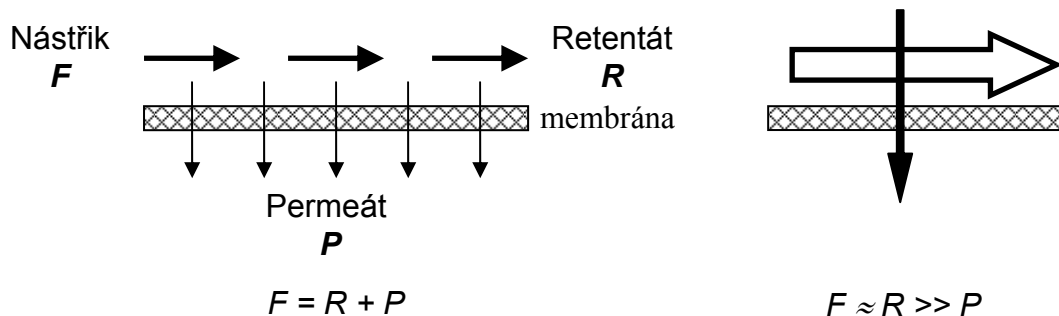
U porézních membrán selektivita závisí na velikosti a uniformitě pórů. Čím jsou póry membrány jednodušší z hlediska velikosti a tvaru, tím se zvyšuje i tzv. ostrost separace. Na výkonu membrány kromě velikosti pórů se významně podílí i porosita, která je definována jako poměr plochy (průřezu) pórů k celkové ploše membrány. U některých polymerních symetrických membrán dosahuje hodnot až 70 %, naopak u „jaderných“ membrán bývá maximálně 15 %.

I přes značnou rozmanitost membránových separačních procesů lze definovat obecnou rovnici transportu látky přes membránu, podle které tok permeátu je přímo úměrný velikosti hnací síly procesu a ploše membrány a nepřímo úměrný odporu.

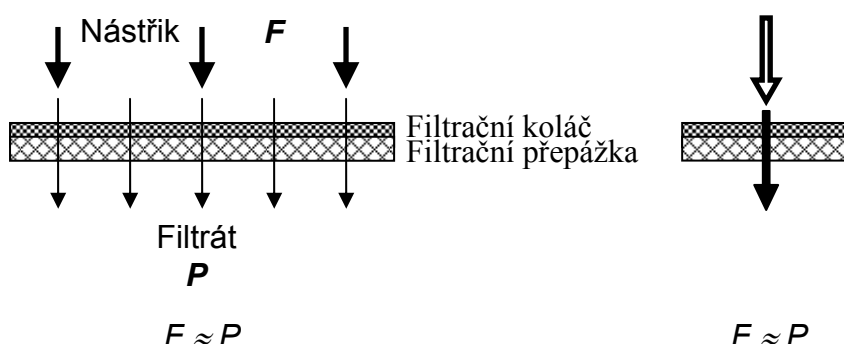
$$\text{Tok permeátu} = \frac{\text{Hnací síla procesu} \cdot \text{Plocha membrány}}{\text{Odpor transportu částice}}$$

### Charakteristika toků

Pokud se podíváme na charakteristiku toků pro většinu membránových procesů je typické **uspořádání s tzv. příčným tokem („crossflow“ filtrace)** neboli **tangenciálním tokem**, díky kterému nedochází k hromadění (akumulaci) zadržovaného materiálu (částic, molekul, iontů) před membránou a tím i vytváření filtračního koláče, viz obr. 4. Na rozdíl od „tradiční“ filtrace, která je označována jako filtrace do mrtvého bodu („dead-end“ filtrace, viz obr. 5), při membránové filtraci se silným tangenciálním tokem nad membránou je možné proces výrazně prodloužit a získat vyšší množství permeátu.



Obr. 4 Charakteristické uspořádání toků při membránové filtraci s příčným tokem.

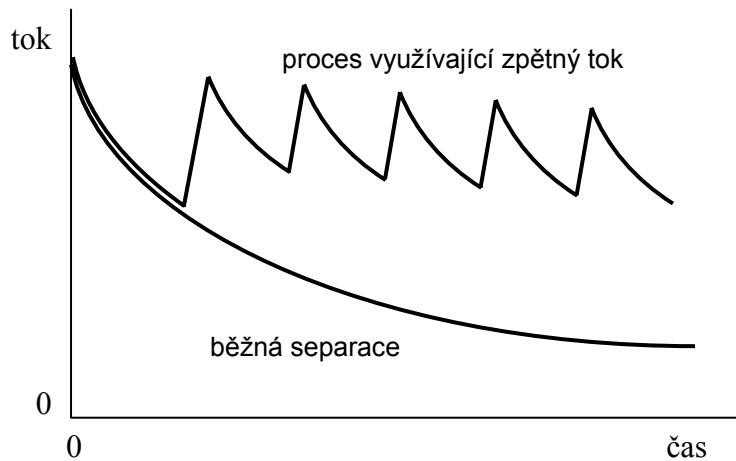


Obr. 5 Charakteristické uspořádání toků při tradiční jednosměrné filtraci, kde nad filtrační přepážkou dochází k postupnému vytváření filtračního koláče.

### Zanášení membrán a jejich regenerace

S charakterem toků v těsné blízkosti membrány souvisí i některé negativní jevy jako např. **koncentrační polarizace**, která je způsobena hromaděním zadržovaných částic před membránou, které při nedostatečném tangenciálním toku nad membránou mohou zde vytvářet tzv. sekundární membránu (vrstva gelu, sraženiny). Proto se do prostoru nad membránou ještě vkládají různé vestavby - turbulizátory, které narušují laminární proudění. Efekt koncentrační polarizace se projevuje zejména u membránových procesů s vysokými rychlostmi toku permeátu (MF, UF, částečně i NF a RO).

V důsledku koncentrační polarizace a dalších dějů na membráně dochází v průběhu membránové separace k postupnému snižování toku permeátu (viz obr. 6), tento typický projev označujeme jako **zanášení membrány („fouling“ efekt)** a může být vratný nebo nevratný. V případě nevratného děje hovoříme o otravě membrány, ta bývá způsobena ionty těžkých kovů, látkami reagujícími s membránou – chlor, oxidovadla atd.. U vratných dějů se membrána regeneruje za pomoci chemických činidel nebo fyzikálními metodami. Pro **chemické čištění a regeneraci** u průmyslových aplikací jsou membránové jednotky vybaveny automatickými systémy CIP („cleaning in place“), které využívají proplachy roztoky alkálií, kyselin, detergentů, sanitačních prostředků apod. podle charakteru znečišťujících látek. **Fyzikální metody regenerace** jsou používány většinou již během separačního procesu k prodloužení pracovní periody membrány. Pro tyto účely se využívá pulsace toku nad membránou, ultrazvuku nebo zpětného toku permeátu (viz obr. 6).



Obr. 6 Charakteristická závislost toku membránou na čase u běžné membránové separace a v případě použití zpětného toku permeátu

V případě aplikace membránových separačních technik v potravinářském průmyslu a biotechnologiích je nutná kromě běžné sanitace i **sterilace membrán** a zařízení, ta se většinou provádí chemicky dezinfekčními přípravky, v případě použití teplotně odolných membrán je možné zařízení sterilovat parou.

**Životnost membrán** závisí na procesu, ve kterém jsou používány, a na způsobu péče o ně a o celé zařízení. Při dodržování technologické kázně a dobré výrobní praxe je jejich životnost i několik let. Extrémní životnost je deklarována u anorganických membrán, ta je ale vyvážena jejich vysokou cenou.

### Membránové moduly

Membrány se vyrábějí ve dvou základních tvarech:

- ploché membrány – ve formě listů různé velikosti,
- tubulární membrány – s průměrem od 0,1 mm (ty jsou označovány jako dutá vlákna – „hollow fibre“) do několika cm, nástřiková strana membrány je většinou orientována na vnitřní stěnu „trubky“, permeát je odváděn z vnější strany membrány.

Aby membrána byla použitelná, vyžaduje umístění do vhodného zařízení – membránového modulu. Jedním ze základních kritérií hodnocení membránových modulů je poměr plochy instalovaných membrán ku objemu celého zařízení. Je snahou výrobců, aby tato hodnota byla co nejvyšší.

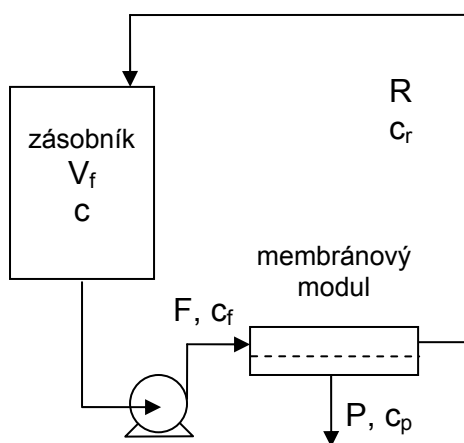
Ploché membrány se umísťují do **deskových modulů**, kde je podobné uspořádání jako u deskového filtru nebo kalolisu (místo plachetky je zde použita membrána a v prostoru nad membránou je díky usměrňovačům toku a turbulizátorům zajištěna vysoká rychlost proudění). Tato zařízení jsou investičně poměrně drahá, výhodou je možnost jejich rozebrání a výměny membrán při jejich poškození. Dalším způsobem využití plochých membrán je jejich umístění do **spirálově vinutého modulu**, kde dvojice membrán je přiložena permeátovou stranou k sobě a po okraji slepena, vzniklá kapsa je zasazena do podélně prořízle trubky a navinuta na tuto trubku. Nástřik je veden z čela modulu do mezikruží. Permeát prochází membránou do prostoru uvnitř kapsy a je odváděn centrální trubkou. Výhodou je dosažení lepšího poměru membránové plochy ku objemu zařízení, nevýhodou může být díky kompaktnosti konstrukce modulu u některých aplikacích obtížnější sanitace.

Pro tubulární membrány je vhodný **trubkový modul**, kde se svazek membrán vloží do trubky a na obou stranách v čelech zafixuje a zalepí. Nástřik je přiváděn do čela modulu a prochází vnitřní stranou membrán, na opačné straně je odváděn retentát, permeát se hromadí

v meziprostoru a je odváděn z boku modulu. Většina tubulárních membrán je tzv. samonosná a nevyžadují podporu z vnější strany. Trubkové moduly se vyznačují nevyšším poměrem plochy membrán ku objemu modulu, zvláště v případě modulů s dutými vlákny. Trubkové moduly se lépe sanitují než spirálně vinuté.

### Uspořádání membránového separačního procesu

Zařízení s membránovým separačním modulem může být provozováno v několika základních upořádáních – ve vsádkovém nebo kontinuálním režimu, jak je znázorněno na obr. 7.



a) vsádkové uspořádání

$$F = R + P$$

$$V_f = V_{f,0} - \int_0^t J A dt$$

$$c_p = 0$$

$$c_f = c_r = c_{f,0} V_{f,0} / V_f$$

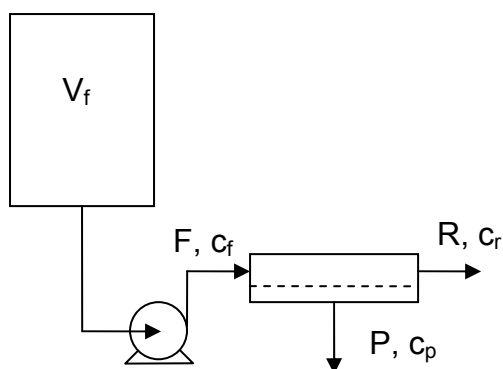
J – propustnost membrány

A – plocha membrány

c – koncentrace složky  
zadržované membránou

$V_f$  – objem v zásobníku

t – čas



b) kontinuální separační proces

$$V_f = V_{f,0} - Ft$$

$$c_p = 0$$

$$c_r = c_f F / R$$

$V_f$  – objem v zásobníku

t – čas

c – koncentrace složky  
zadržované membránou

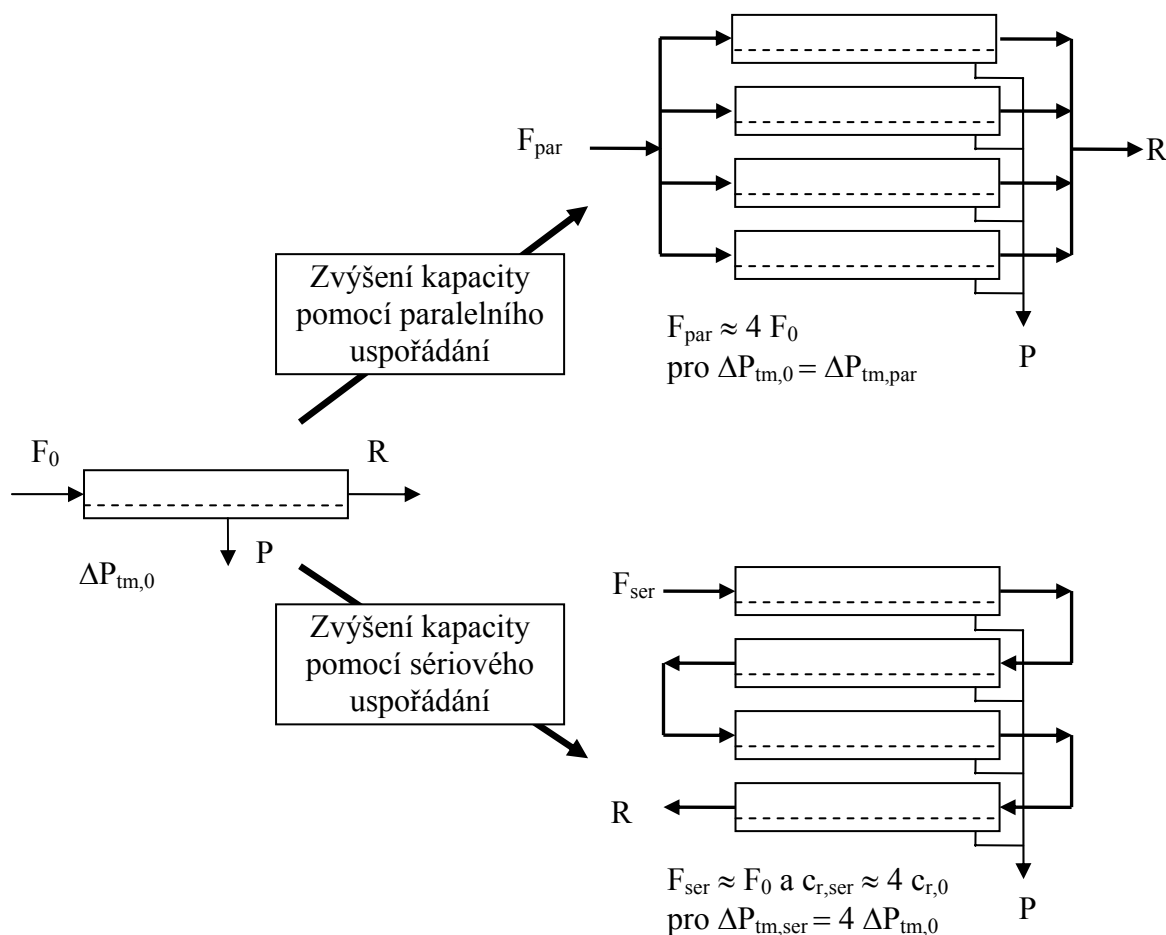
Obr. 7 Základní uspořádání membránového separačního procesu pro a) vsádkový a b) kontinuální režim separace s uvedením hmotnostních bilancí

Velice často jsou membránové jednotky provozovány v režimech semikontinuálních nebo přítokovaných zařízení.

Výhoda membránových separačních jednotek je v jejich vysoké flexibilitě umožňující rozšíření jednotky pomocí sériového či paralelního uspořádání modulů (viz obr 8) nebo jejich kombinace. Právě díky modulárnímu charakteru membránových separačních jednotek je možné zvyšovat výkon a efektivně reagovat na změny technologie. V obou způsobech rozšíření zařízení dochází ke zvětšení membránové plochy. **Při paralelní expanzi zařízení** pokud chceme zachovat stejné podmínky jako u původního modulu tj. lineární rychlost toku a



gradient hnací síly, např. transmembránového tlaku, je nutné v tomto případě 4-násobně zvýšit průtok nástřiku. **Při sériovém zapojení modulů** nemohou být operační podmínky konstantní pro všechny membránové moduly, protože na každý modul je přiváděn nástřikový proud jiného složení a podél membrány dochází i ke změně velikosti hnací síly procesu. Sériové uspořádání prodlužuje dráhu kontaktu s membránou a simuluje v podstatě několikanásobný průchod nástřiku/retentátu membránovým modulem. Výsledkem je zvýšení koncentrace látek zadržovaných membránou ve výstupním proudu retentátu, často doprovázené i výrazným nárůstem hustoty a viskosity, vyšším než by bylo možné dosáhnout při provozování modulu ve vsádkovém uspořádání (viz obr. 7a).



Obr. 8 Možnosti zvýšení kapacity a výkonu membránové separační jednotky rozšířením o membránové moduly uspořádané paralelně nebo do série ( $\Delta P_{tm}$  – gradient transmembránového tlaku)

### Mikrofiltrace, ultrafiltrace, nanofiltrace a reversní osmosa

MF, UF, NF a RO jsou membránové separační procesy, jejichž hnací silou je gradient tlaku. Odlišují se velikostí pórů v membráně a tím i potřebným transmembránovým tlakem, který je tím větší, čím „hustší“ membrána je použita (viz tab.1). U RO a NF významnou roli hraje i překonání osmotického tlaku separovaných roztoků.

Tab. 1 Základní charakteristika MF, UF, NF a RO

Proces	Velikost pórů	Cut-off* (Dalton)	Tlak (MPa)	Zadržované částice**
MF	0,1 – 10 $\mu\text{m}$	$\sim 1.000.000$	< 0,5	koloidy, mikroorganismy, viry

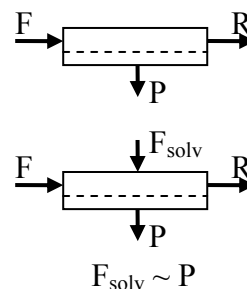
UF	0,001 – 0,1 $\mu\text{m}$	1.000 – 500.000	0,1 - 2	makromolekuly
NF	0,1 – 1 nm	300 – 1.000	2 - 4	nízkomolekulární látky
RO	0,1 – 1 nm	< 500	4 - 8	nízkomolekulární látky

\* „cut-off“ je uváděn jako charakteristika zejména UF a RO membrán a vyjadřuje relativní molekulovou hmotnost částice, která je danou membránou z 95 % zadržována.

\*\* při daném membránovém procesu jsou zadržovány i složky uvedené v horních buňkách tabulky.

Tyto procesy jsou z pohledu uspořádání toků používány ve dvou základních modech:

- **zakoncentrování a purifikace** – do membránového modulu vstupuje proud nástřiku a získává se retentát a permeát,
- **diafiltrace** – do membránového modulu je ještě přiváděn proud rozpouštědla, nejčastěji vody, který vymývá z retentátu látky, které mohou procházet membránou. Objem použitého rozpouštědla ( $F_{\text{solv}}$ ) zpravidla odpovídá objemu získaného permeátu, koncentrace zadržovaných látek se tak během diafiltrace nemění.



### Aplikace:

**Zakoncentrování roztoků** – jako horní dosažitelná hranice se uvádí koncentrace rozpuštěných či suspendovaných látek 30 %

- zahušťování ovocných šťáv, sirupů, protlaků, kečupu (RO/NF)
- zakoncentrování odpadů z potravinářských a biotechnologických výrob jako jsou lihovarské výpalky, odpadní vody z jatek a ze zpracování zeleniny (RO/NF/UF)
- izolace a zakoncentrování enzymů, bílkovin, škrobu, dextrinů, pektinu apod. (UF)
- zahušťování vaječných bílků, přírodních extraktů, mléčných bílkovin (UF)
- izolace olejů a tuků z emulzí (MF)
- izolace mikrobiálních buněk z fermentačních médií a jejich zakoncentrování (MF)
- izolace fermentačních produktů, např. organických kyselin, aminokyselin, ... (RO/NF)

### Klarifikace a purifikace kapalin a plynů

- filtrace octa, vína, piva a dalších nápojů (UF/MF)
- purifikace vody, příprava apyrogenní vody (RO)
- „studená“ sterilace kapalin – sterilní filtrace (MF)
- sterilace vzduchu před vstupem do bioreaktoru (MF)
- odstranění vysokomolekulárních látek, buněčných fragmentů a buněk z fermentačních médií (UF/MF)

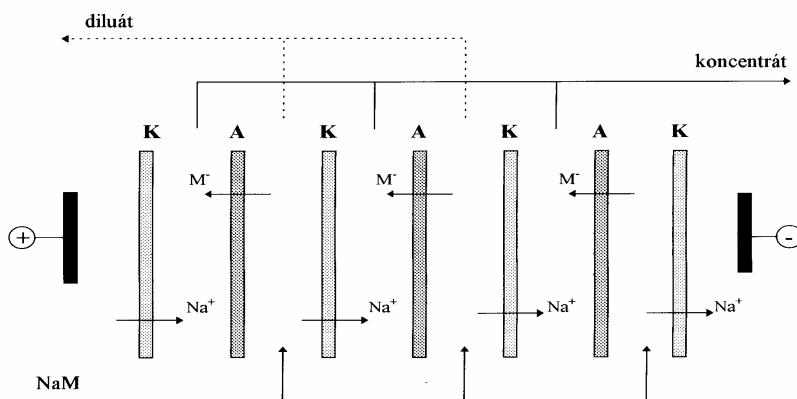
### Diafiltrace

- odstranění nebo snížení obsahu ethanolu v pivě a víně (RO)
- přečištění makromolekulárních látek, vyplavení nízkomolekulárních látek (UF)
- promývání buněčné suspence – odstranění zbytků média apod. (MF)

Membránová filtrace se stává běžným procesem nahrazujícím klasickou filtraci, rotační vakuové rotační filtry, odstředivky a částečně i odparky, sterilační a pasterační jednotky. Významným rysem použití membránové filtrace je, že separace probíhá beze změny skupenství, výrobek není tepelně zatěžován, což umožňuje zachování jeho vysoké nutriční hodnoty, původní barvy a vyloučení přídatku konzervačních látek.

### Elektrodialýza

ED je separační proces využívající rozdíly v pohyblivosti elektricky nabitých částic a neelektrolytů ve stejnosměrném elektrickém poli, kde mezi anodu a katodu je vložen svazek ionově aktivních membrán, které umožňují transport vždy pouze jednoho typu ionů – kationpropustná membrána kationů nebo anionpropustná membrána anionů. Iony opačného náboje danou membránou procházet nemohou. Iony z nástřikového proudu pohybující se k elektrodě opačného náboje procházejí membránou odpovídající selektivity a hromadí se ve vedlejších celách, před membránou opačné selektivity, která jejich průchod neumožňuje. Odtud jsou odváděny jako ve formě *koncentrát*, pro původní vyředěný roztok je používáno označení *diluát*, ve kterém jsou obsaženy i nenabitě částice (viz obr 9). Hnací silou procesu je gradient elektrického potenciálu.



Obr. 9 Schéma elektrodiályzéry s klasickým uspořádáním s kationpropustnými (K) a anionpropustnými (A) membránami vhodným pro izolaci laktátu (NaM: mléčnan sodný) a jeho případné zakoncentrování

Zvláštním typem ionově aktivních membrán jsou **biopolární membrány**, které díky současné vazbě ionů obojí polarity neumožňují průchod žádných nabitých částic, ale dochází zde k rozkladu vody na  $H^+$  a  $OH^-$ . Používají se v procesech elektrokonverze jako generátory  $H^+$  ionů, kde nahrazují použití velkých objemů anorganických kyselin.

#### Aplikace:

- výroba pitné vody (odsolování mořské nebo brakické vody) – produktem je diluát
- výroba kuchyňské soli, karlovarské vřidelní soli, ... – koncentrát
- demineralizace syrovátky, cukerných roztoků, sojové omáčky, ovocných šťáv a džusů, ... – diluát
- izolace a zakoncentrování solí organických kyselin z fermentačních médií (kyselina mléčná, citrónová, vinná, ...) - koncentrát
- přečišťování a odsolování aminokyselin a bílkovin v jejich izoelektrickém bodě - diluát
- elektrokonverze solí na organické kyseliny – biopolární membrány
- regenerace iontovýměnných pryskyřic (ionexu) – biopolární membrány
- zakoncentrování odpadních vod z řady výrobních procesů – oplachové lázně z metalurgického, elektronického, kožedělného průmyslu atd.

Využití ED v průmyslových aplikacích přináší řadu výhod, počínaje vysokou účinností a efektivitou separace, přes energetické úspory až po šetrnost k životnímu prostředí.

### Pervaporace a permeace plynů

Pervaporace a permeace plynů jsou separační procesy založené na stejném principu, kde z nástřikového proudu kapaliny (PV) nebo plynu jsou určité látky „odpařovány“ přes neporézní selektivní membránu. Mechanismus transportu přes membránu je možné rozdělit do tří na sebe navazujících kroků:

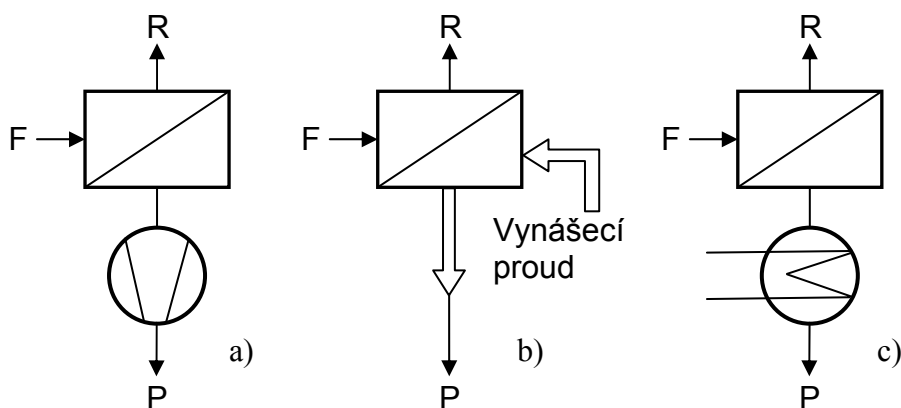
- **sorpce** látky na membránu na základě fyzikálně-chemické afinity mezi materiálem membrány a látkou v nástřiku
- **rozpuštění a difuze** - látka se musí nejprve rozpustit v materiálu membrány a v solubilizovaném stavu je transportována membránou na základě jejího koeficientu difusivity ( $D_i$ )
- **desorpce** na permeátové straně membrány

Rychlost transportu látky membránou závisí na nejpomalejším z těchto dějů, obvykle to bývá difuze membránou.

Hnací silou je gradient chemického potenciálu (parciálního tlaku) „odpařované“ složky, proto je snaha, aby se parciální tlak složky na permeátové straně blížil nule ( $p_{iP} \rightarrow 0$  Pa). Tuto podmínku je možné technicky zajistit několika způsoby (viz obr. 10):

- a) **udržováním vakua** na permeátové straně tj. odváděním par z permeátové strany vakuovou pumpou,
- b) **oplachem** permeátové strany membrány vynášecím plynem (většinou se používá dusík nebo inertní plyny),
- c) **termokondenzací** – podél permeátové strany membrány je ochlazovaná plocha, na které dochází ke kondenzaci desorbovaných par, nesmí docházet k ochlazení membrány.

V případech a) a b) je nutné vést páry/plyny přes vymrazovací jednotku, kde transportované složky zkondenzují. Tyto dva způsoby jsou i nejčastěji používány v průmyslových aplikacích.



Obr. 10 Schéma operačních systémů PV zajišťující snížení parciálního tlaku složky na permeátové straně membrány a) vakuum, b) vynášecí proud, c) termokondenzace

Pro PV a permeaci plynů se používají kompozitní neporézní organoselektivní nebo hydroselektivní membrány. Organoselektivní membrány mají aktivní separační vrstvu většinou tvořenu polydimethylsiloxanem nebo dalšími guměpodobnými polymery, mají vysokou selektivitu k organickým rozpouštědlům a malým molekulám plynů.

Hydroselektivní membrány preferující nízkomolekulární látky polární povahy, zejména molekuly vody, mají aktivní vrstvu tvořenu částečně krystalickými doménami hydrofilních polymerů jako polyvinylalkohol, polyimidy, zeolity apod.

Díky tomu, že mechanismus „odpařování“ přes membránu využívá jiných fyzikálních principů než jsou rovnováhy kapalina-pára, je možné PV odvodňovat i azeotropické směsi organických rozpouštědel a vody.

Aplikace PV:

- odvodňování organických rozpouštědel – dehydratace esterů (HS)
- separace složek z kapalin (OS, HS)
- odvodňování azeotropických směsí – např. ethanol-voda (HS)
- odstraňování nečistot a polutantů z kontaminované vody a plynů (OS)
- izolace fermentačních produktů – ethanolová a aceton-butanolová fermentace (OS)

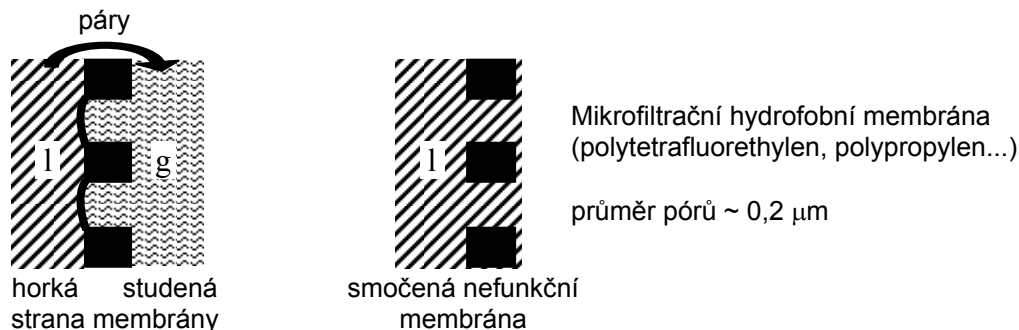
Aplikace permeace plynů:

- separace oxidu uhličitého a methanu z bioplynu a zemního plynu
- získávání vodíku při syntese amoniaku, methanolu, hydrogenaci olefinů
- odstraňování H<sub>2</sub>S z přírodních plynů
- N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> separace – udržování řízené atmosféry při skladování ovoce a zeleniny, obohacování aeračních plynů kyslíkem při aerobních kultivacích
- sušení plynů – odstraňování vody

Nevýhodou PV jsou nízké permeační rychlosti látek a tím při průmyslových aplikacích nutnost instalace velké membránové plochy k zajištění předpokládaného výkonu zařízení. Přednosti vynikají v oblastech, kde tradiční technologická řešení selhávají nebo jsou příliš technicky a energeticky náročná – např. separace plynů, dělení azeotropických směsí, ekologické aplikace.

### Membránová destilace

MD je separační proces, při kterém se z kapaliny na „horké“ straně membrány odpařují páry, které přecházejí na „studenou“ stranu membrány. Na první pohled by se mohlo zdát, že jde proces podobný pervaporaci, ale mechanismus transportu a hnací síla děje jsou odlišné. Hnací silou procesu je gradient teploty mezi nástřikovou a permeátovou stranou mikroporézní hydrofobní membrány. K odpařování látek dochází při teplotě pod jejich bodem varu a teplotní gradient bývá od 20 do 50°C, se vzrůstem gradientu stoupá selektivita membrány i její propustnost. Pro MD platí rovnováhy kapalina-pára. Při MD je důležité, aby nedošlo ke smočení pórů membrány, tzn. aby do nich nevnikla kapalina z „horké“ strany membrány, při zaplnění pórů kapalinou se membrána stává nefunkční (viz obr. 3.19.11). Proto je tato separační metoda vhodná pouze pro nesmáčivé roztoky, tj. roztoky anorganických solí a zředěné vodní roztoky organických rozpouštědel, v případě ethanolu pro roztoky do 30 % obj..



Obr. 11 Mechanismu transportu při membránové destilaci

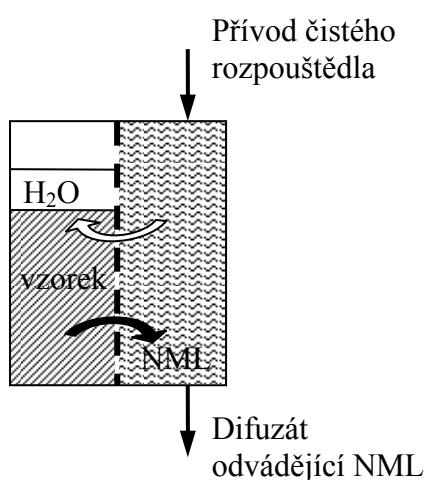
Aplikace:

- získávání pitné vody odsolováním mořské vody
- příprava vody pro topné soustavy

- zakonzentrování roztoků anorganických solí
- získávání organických rozpouštědel ze zředěných vodných roztoků

### Dialýza

Dialýza je membránový separační proces, kterým je možné oddělovat látky makromolekulárního charakteru od nízkomolekulárních. Nízkomolekulární látky (NML), nejčastěji soli, přecházejí membránou do vody nebo jiného rozpouštědla na základě gradientu chemického potenciálu (rozdílu koncentrace). Separační rozmezí závisí na vlastnostech použité membrány, zejména velikosti pórů, případně náboji. Vlastní proces je pomalý, je možné ho urychlit obměnou roztoku, do kterého nízkomolekulární látky difundují a tak udržovat větší koncentrační gradient. Při dialýze dochází ke zvětšování objemu odsolovaného roztoku v důsledku osmosy – protisměrné difuze molekul vody do roztoku makromolekulárních látek, která rovněž vede k vyrovnání chemických potenciálů.



Obr. 12 Schéma procesu dialýzy s kontinuálním odvodem difuzátu s NML

Aplikace:

- hemodialýza – jeden z procesů v umělé ledvině
- přečišťování proteinů (odsolování) – preparativní biochemie, farmaceutický průmysl

### Chromatografické separace

Chromatografické separační metody jsou operace, při nichž dochází k postupnému a mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma fázemi – stacionární a mobilní. **Stacionární fáze** je nepohyblivá (fixovaná) a je obtékána **mobilní fází**, která unáší separované látky. Jejich pohyb je ovlivňován vzájemnými interakcemi se stacionární a mobilní fází, čím vyšší afinitu mají ke stacionární fázi, tím je jejich pohyb systémem pomalejší a naopak. Mobilní fázi může být kapalina nebo plyn, pak hovoříme o kapalinové chromatografii nebo o plynové chromatografii.

Podle uspořádání stacionární fáze je možné rozlišit kolonovou chromatografii – stacionární fáze je umístěna v koloně, nebo na ploše – papírová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie. Vlastnosti stacionární fáze, kterou může být kapalina nebo pevná látka, určují převládající separační mechanismus:

- adsorpce – sorpce látek na povrch pevné stacionární fáze, mobilní fází mohou být plyn i kapalina (adsorpční chromatografie) – jde o historicky nejstarší chromatografickou techniku objevenou ruským botanikem Cvetem na počátku minulého století,
- rozdělování – stacionární fázi je kapalina a o rozdělení směsi rozhoduje rozpustnost látek v mobilní a stacionární fázi (rozdělovací chromatografie),

- sítový neboli permeační efekt – složky se separují na základě velikosti molekuly podle přístupnosti pórů stacionární fáze (gelu), látky s menší molekulou pronikají hlouběji do pórů a jsou eluovány později (gelová permeační chromatografie, plynová chromatografie na molekulových sítích)
- výměna iontů – o separaci rozhodují elektrostatické síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměniče) a ionty ve separované směsi (ionovýmienná chromatografie).
- biospecifická interakce – základem je vysoce selektivní vazba stacionární fáze a separované složky (afinitní chromatografie).

V kapalinové chromatografii velice frekventovaný termín „vysoce účinná kapalinová chromatografie – HPLC“ neříká nic o separačním mechanismu, pouze o způsobu provedení chromatografie.

### Účinnost separace v chromatografii

**Účinnost** charakterizuje její schopnost separovat složky směsi. Mírou účinnosti kolony je **počet teoretických pater**  $n$ . Teoretické patro je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází, tato délka se nazývá **výškový ekvivalent teoretického patra**  $H$ . Pro kolonu o délce  $L$  pak platí:

$$H = \frac{L}{n}$$

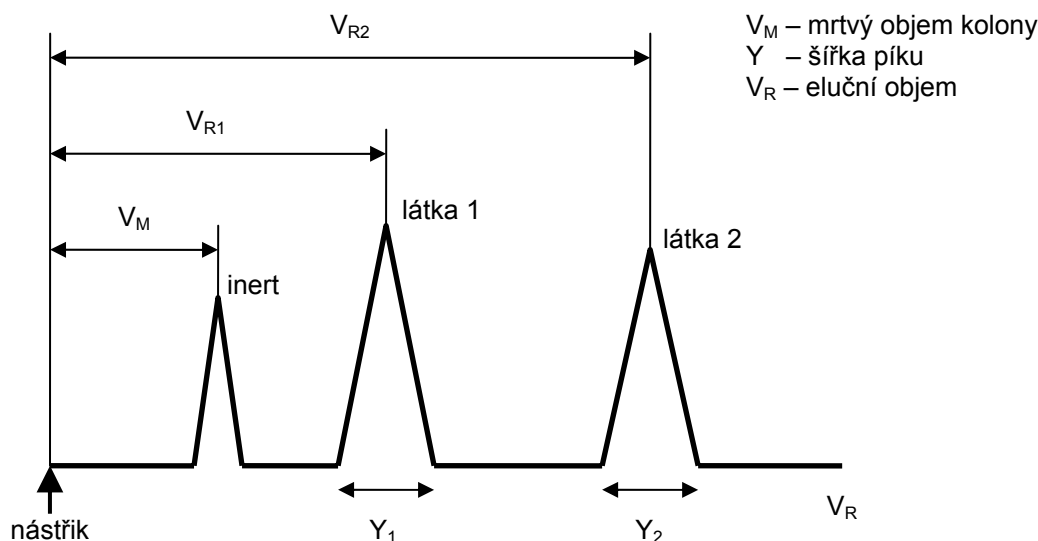
Kolona je tím účinnější, čím má více teoretických pater a čím menší výškový ekvivalent teoretického patra. Počet pater lze určit z šířky píku  $Y_V$  a jeho elučního objemu  $V_R$ :

$$n = 16 \left( \frac{V_R}{Y_V} \right)^2$$

Pro izolaci látek v čistém stavu je důležité dostatečné oddělení separované složky od ostatních látek, tj. získání osamocené píky nekontaminované jinými složkami. Ani v koloně, která má vysoký počet teoretických pater, ale nemusí dojít k dokonalé separaci dvou složek, k vyjádření míry separace dvou složek (1 a 2) se používá veličina **rozlišení**  $R_{12}$ :

$$R_{12} = \left| \frac{2(V_{R2} - V_{R1})}{Y_1 + Y_2} \right|$$

Vlivem neideality distribuce látky dochází na přední a zadní straně zóny k efektům rozmývání fronty a chvostování, proto i při hodnotě rozlišení  $R = 1$  jsou píky od sebe odděleny pouze z 95 % a při 1,5 již z 99,7 %.



Obr. 13 Typický chromatogram separace dvou látek

Důležitým faktorem každé chromatografické separace je **nalezení optimálního průtoku mobilní fáze**, při kterém je nejnižší výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ ), ten je výsledkem tří níže uvedených dějů:

- **turbulentní difuze** ( $H_A$ ) – ovlivňuje jí velikost a tvar částic náplně kolony a rovnoměrnost uložení náplně v koloně, je nezávislá na rychlosti toku mobilní fáze
- **molekulární difuze** ( $H_B$ ) – látky se snaží pronikat do míst s nižší koncentrací a tak dochází k rozšiřování zóny, tento děj je významný při nízkých průtocích mobilní fáze,
- **odpor proti převodu hmoty** ( $H_C$ ) – závisí na rychlosti ustavování rovnowah distribuce látky mezi stacionární a mobilní fází, hodnota je přímo úměrná rychlosti toku.

Poté výsledný výškový ekvivalent teoretického patra je podle van Deemterovy rovnice dán součtem tří výše uvedených příspěvků:

$$H = H_A + H_B + H_C$$

Častěji se vyjadřuje ve tvaru:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u,$$

kde  $A$ ,  $B$  a  $C$  jsou konstanty charakterizující kolonu a nezávislé na lineární rychlosti mobilní fáze  $u$ .

### Uspořádání preparativní chromatografické stanice

Chromatografie v různém provedení se stala rutinní technikou používanou v analytických laboratořích, zde je snaha o zkrácení doby analýzy při zachování účinnosti separace, zvýšení citlivosti stanovení a snížení nákladů, proto je preferováno použití kapilárních kolon, mikrokolon apod.. U preparativní chromatografie jde nejenom o čistotu izolované látky, ale i o získané množství, používají se náplňové kolony s vyšší kapacitou, to znamená s větším průřezem od několika  $\text{cm}^2$  až k  $\text{m}^2$ . Jsou známy aplikace, kde jsou používány kolony s průměrem téměř 2 m a vrstvou lože stacionární fáze cca 30 cm. Pokud jsou využívány kolony větších průměrů a délek, je výhodné lože stacionární fáze rozdělit do několika oddělených segmentů, zabrání se tak různým zkratovým tokům a v celém objemu kolony se lépe zajistí stejná lineární rychlost toku.

Základní části preparativního chromatografu:

- pumpa (1 nebo více) na čerpání mobilní fáze na kolonu,
- zařízení na nanesení vzorku na kolonu – vícecestný ventil,



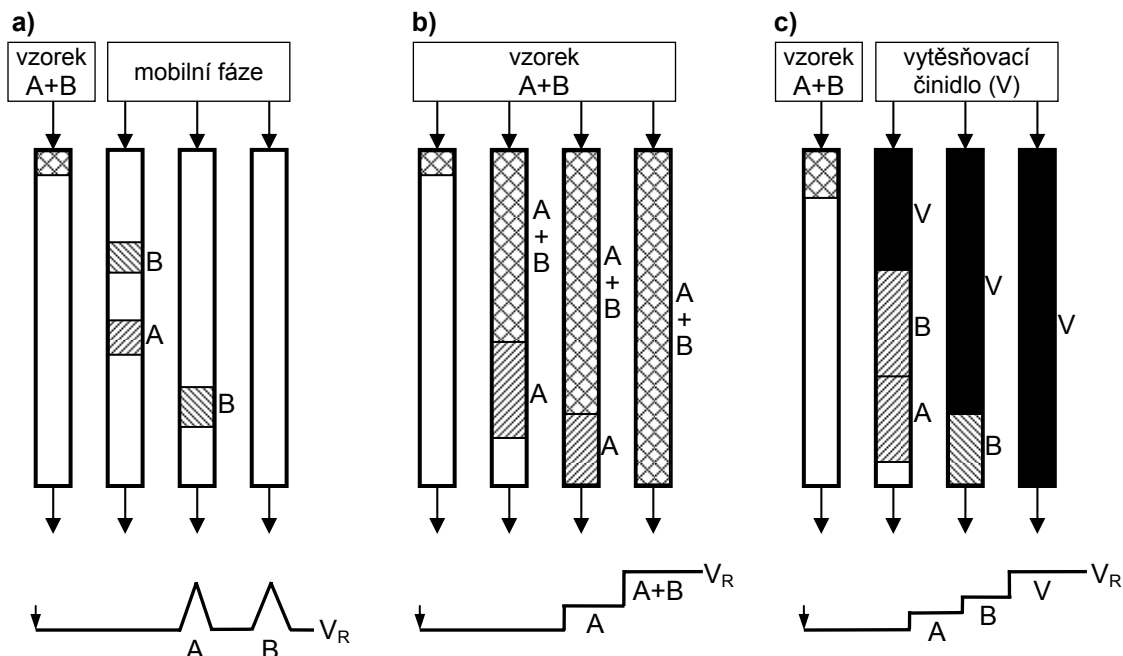
- chromatografická kolona,
- detektor,
- jímač frakcí.

Z pohledu složení mobilní fáze se rozlišují dva základní způsoby eluce:

- izokratická – složení mobilní fáze je konstantní po celou dobu procesu, tak dlouho až všechny složky se uvolní z kolony,
- gradientová – během procesu se mění složení mobilní fáze – vzrůstá její eluční síla, změna se provádí spojitě (lineární či nelineární gradient) nebo skokově, cílem je zkrácení procesu, ostřejší rozdělení látek, uvolnění látek s vysokou afinitou ke stacionární fázi.

Kolonovou preparativní chromatografii je možné provozovat různými způsoby (viz obr. 14). Kromě tradiční eluční metody, kde po nanesení vzorku na kolonu následuje eluce mobilní fází, je možné pro preparativní chromatografii použít v některých případech i metodu frontální nebo vytěšňovací. Podmínkou použití **eluční metody** je dostatečné rozlišení látek tak, aby je bylo možné izolovat v co nejčistším stavu, je omezena kapacitou kolony.

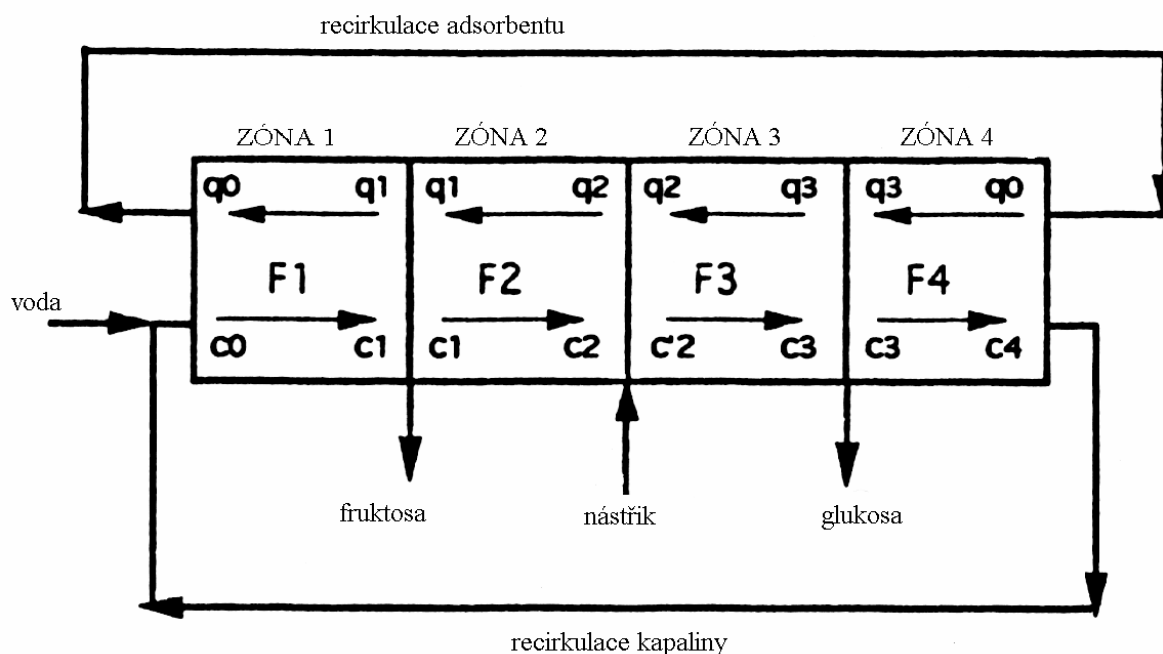
**Frontální metoda** využívá kapacitní možnosti celé kolony místo mobilní fáze se eluce provádí separovanou směsí, nevýhodou je, že v čistém stavu lze získat pouze první složku s nejnižší afinitou ke stacionární fázi. Tuto nevýhodu eliminuje **vytěšňovací metoda**, při které se pro eluci využívá tzv. vytěšňovací činidlo („displacer“)- látka s nejvyšší afinitou ke stacionární fázi, která z kolony před sebou postupně „vytlačí“ (vytěsí) látky zajímavější pásy (vrstvy) podle stoupající afinity. Používání vytěšňovací metody je v preparativní chromatografii velice frekventované, nevyžaduje stacionární fáze s vysokou selektivitou separace, látky se řadí za sebou podle stoupající afinity a tyto pásy se pouze minimálně překrývají, šířka pásu odpovídá množství látky ve směsi, ze zředěných směsí umožňuje i zakoncentrování látek.



Obr. 14 Způsoby provozování chromatografické stanice s uvedením schématického průběhu separace směsi dvou látek (A a B) v koloně a s ukázkou typického chromatogramu: a) eluční metoda, b) frontální metoda a c) vytěšňovací metoda

Tradiční chromatografické separace jsou vsádkové procesy, pro jejich intenzifikaci byla a je snaha tyto operace provozovat v kontinuálním režimu a tím efektivněji využít možnosti chromatografického zařízení. Jedním z moderních systémů je uspořádání série chromatografických kolon do tzv. simulovaného pohyblivého lože (Simulated Moving Bed - SMB). SMB také znám jako kontinuální protiproudá chromatografie.

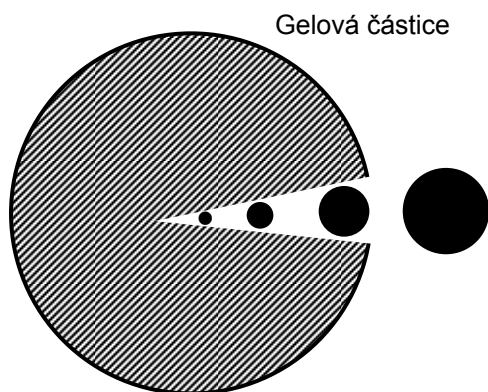
V aparátu je protiproudé uspořádání ionexu a desorbentu a nástřik je umístěn do středu, rozpuštěná látka s vyšší rovnovážnou konstantou bude preferovat unášení s ionexem a další (glukosa) s kapalným tokem v protisměru, princip SMB je ukázán na příkladu separace glukosy a fruktosy z roztoku invertního cukru. Aby se zabránilo unášení rozpuštěných látek ze systému (fruktosy s ionexem, glukosy s desorbentem), jsou navrženy dva odtahy na obou stranách přívodu. Jestliže se vhodně upraví (změní) průtoky, koncentrační profily rozpuštěných látek v aparátu se stávají stacionárními, a je možné dále čistit a koncentrovat frakce glukosy a fruktosy. Na obr. 15 je patrné, že čtyři vstupní a výstupní proudy (nástřik, desorbent, glukosa a fruktosa) ohraničují čtyři zóny, z nichž každá má specifickou funkci pokud jde o absorpci a desorpci.



Obr. 15 Schematické uspořádání kontinuální protiproudé chromatografie v systému s pohyblivým ložem (SMB)

### Gelová permeační chromatografie

V gelové permeační chromatografii dochází k separaci látek na základě velikosti jejich molekuly. Kolonou nejdříve procházejí velké molekuly a nejdéle jsou zadržovány nízkomolekulární látky, které mohou pronikat hlouběji do pórů stacionární fáze a tudíž jsou v koloně déle zadržovány (viz obr. 16).



Obr. 16 Permeace molekul do póru gelu při gelové permeační chromatografii

Vhodný gel se volí podle vlastností separovaných složek. Výrobci gel charakterizují hodnotou tzv. vylučovacího limitu, tj. hodnota relativní molekulové hmotnosti, při které začíná frakcionační rozsah gelu. Molekuly přesahující tuto hodnotu jsou z kolony eluovány v jednom počátečním píku.

Jako gely jsou využívány přírodní materiály typu dextranu, agarosu, či syntetické polymery (polyakrylamid a jeho kopolymery). Původní materiály byly velice choulostivé na tlak, moderní gely snesou již vyšší tlaky, ale přesto se nevyrovnají rozdělovací a adsorpční chromatografii.

Gelová permeační chromatografie nachází široké uplatnění v biotechnologických procesech při izolaci a purifikaci makromolekulárních látek (enzymy, bílkoviny, nukleové kyseliny,...) a jejich odsolování.

### Ionovýmiěnná chromatografie

Stacionární fázi při ionovýmiěnné chromatografii je polymerní matrice (celulosa, sepharosa, polydivinylbenzen, polystyren, ...) nesoucí funkční nabitě skupiny. Ionoměnič se dělí podle schopnosti měnit buď aniony nebo kationy na *anexy* a *katexy*. Podle typu funkční skupiny a tím i síly vazby mezi funkční skupinou a protiionem je iontoměnič rozdělují na *silné a slabé*. Kapacita ionoměnič je dána hustotou funkčních skupin v částici. Jako mobilní fáze se používají roztoky elektrolytů (solí) s gradientem rostoucí koncentrace soli při eluci.

V potravinářském průmyslu a biotechnologiích ionexy stále nacházejí široké uplatnění především v oblasti úpravy vody, ať již při jejím změkčování nebo demineralizaci. Dále se uplatňují v celé řadě procesu při izolaci a purifikaci biologicky aktivních látek nízkomolekulárního či makromolekulárního charakteru – získávání bílkovin ze syrovátky, krve, izolace a čištění enzymů, odbarvování cukerných roztoků a celá řada dalších.

Pro vazbu menších iontů jsou preferovány silné anexy a katexy, naopak pro vazbu biomakromolekul jsou výhodnější slabé anexy a katexy, které se snáze regenerují a vazba je reverzibilní a navíc se zde uplatňují i jiné interakce než je ionová výměna – hydrofobní interakce, síťový efekt apod.

### Rozdělovací chromatografie

Rozdělovací chromatografie využívá jako stacionární fáze kapaliny zakotvené na pevném nosiči – silikagel, agarosa atd. Povrch těchto vysoce polárních hydrofilních nosičů je chemicky upraven a na něm je zakotvena stacionární fáze. Nepolární zakotvené fáze jsou označovány jako reversní fáze a proces jako **chromatografie na reversní fázi (RPC)**.

Hydrofobní ligáty jsou nejčastěji octadecyl (C18), octyl (C8), butyl, fenyl. Základním vazebním mechanismem jsou hydrofobní interakce. Tento typ chromatografie je vysoce

universální a rozšířený v analytických aplikacích, je vhodný pro menší organické molekuly. Gradientová eluce se provádí hydro-organickými mobilními fázemi s rostoucí koncentrací organické složky. Metoda není vhodná pro biomakromolekuly, protože při eluci dochází k nevratným denaturačním změnám a tím i ztrátě jejich biologické aktivity.

Pro biomolekuly se používá tzv. **chromatografie s hydrofobní interakcí (HIC)**, kde vysoce hydratovaný povrch agarosy je řídce osazen hydrofobními ligáty. Hydrofobní interakce biomolekul není tak silná jako v případě RPC, k eluci se používají roztoky solí s klesající koncentrací (nejsilnějším eluentem je voda). Za těchto podmínek nedochází k denuraci biologicky aktivních látek.

RPC se používá k izolaci a purifikaci malých až středních molekul, HIC pro separace a purifikace biopolymerů (bílkovin, nukleových kyselin, ...).

### **Afinitní chromatografie**

Afinitní chromatografie je separační technikou, která je založena na biospecifické interakci stacionární fáze a látky ze separované směsi– využívá se vysoce specifických vazeb např. antigen-protilátka, enzym-substrát, enzym-inhibitor apod. Pro tento typ chromatografie se používá speciálně zkonstruovaných stacionárních fází, kdy jedna látka z dvojice tvořící biospecifickou vazbu je vázána na nosič. Díky vysoké specifitě interakce je metoda použitelná i pro izolaci látky ze surových buněčných extraktů. Po aplikaci vzorku na kolonu, dojde v navázání dané látky, ostatní balastní složky se vymyjí (eluuji) z kolony, poté změnou mobilní fáze se látka uvolní. V tomto kroku může dojít až k tisícinásobnému zakoncentrování dané látky.

Afinitní chromatografie je využívána v biopreparativní chemii a ve farmaceutickém průmyslu při izolaci a čištění biologicky aktivních látek, včetně rekombinantních proteinů.

### **Uplatnění separačních technik v biotechnologických procesech**

Strategie výběru účinné separační a purifikační sekvence, kritéria pro volbu separačního procesu:

- fyzikální, chemické a biochemické vlastnosti látek v systému
- lokalizace produktu v biosystému
- požadavky na kvalitu, čistotu a biologickou aktivitu produktu
- ekonomická, technická a časová náročnost separačního kroku

Návaznost a posloupnost jednotlivých separačních kroků, jejich začlenění do celkového technologického postupu, zachování biologické aktivity bioproduktů, ekonomika procesu

Zajištění požadavků na sterilitu procesu a produktů

"Bezpečné" technologie, uzavřené systémy