

Mecanismo de colmatación por el flujo de intercambio en el filtro rotatorio como centrifuga filtrante

✉ Luis Y Hernández¹, Abel González¹, Guido Riera²

¹ Centro de Inmunología Molecular, CIM
Esquina 15 y 216, Atabey, Playa, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba

² Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, ISPJAE
Calle 114 No. 11901 entre 119 y 129, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: yunier@cim.sld.cu

INVESTIGACIÓN

RESUMEN

El filtro rotatorio (*spinfilter*) se emplea para la retención celular en el cultivo en perfusión, con altas densidades celulares. Debido a su obstrucción precoz, se precisó el estudio de este sistema, introduciéndole el caldo de cultivo (suspensión) por el interior del filtro, para obtener la suspensión clarificada por el exterior de este, y que las células queden retenidas en su interior. El líquido claro se recogió en una probeta, hasta que el filtro se obstruyó parcial o totalmente. Por lo tanto, el filtro rotatorio se usó como una centrifuga filtrante, en la que se fue midiendo el volumen de filtrado con respecto al tiempo, para varias concentraciones de suspensión y de velocidad de giro del dispositivo. Se le ajustó el mecanismo de filtración que controla el proceso. Para el ajuste del perfil de filtración, se determinó la influencia de la concentración de la suspensión y de la velocidad de giro del filtro rotatorio, y se obtuvo el comportamiento de la resistencia específica (de la torta aparente), de la resistencia del medio filtrante, la porosidad de la torta y el régimen en que ocurre el proceso hidrodinámico de separación.

Palabras clave: colmatación, flujo de intercambio, filtro rotatorio

Biotecnología Aplicada 2010;27:19-23

ABSTRACT

Mechanism of clogging by exchange flow of a spinfilter as filtrating centrifuge. Perfusion cultures usually reach high cell densities and, therefore, require a spinfilter for cellular retention. But spinfilters may clog prematurely so we decided to study the process by pumping a suspension culture through the filter, so that the cells are trapped inside and the clarified flow-through can be measured by collecting it in a measuring cylinder until partial or total obstruction of the filter, which in this case is used as a filtrating centrifuge. Filtrate volume with time was measured at several cellular concentrations and rotational speeds, calculating the behavior of specific resistance for the apparent cake, the resistance of the filtration medium, cake porosity and hydrodynamic regime. The results were used to adjust the filtration profile.

Keywords: clogging, exchange flow, spinfilter

Introducción

Los métodos de retención que tienen más aplicación industrial son los que se emplean en los sistemas en suspensión. A pesar de que los problemas de escalado no están del todo resueltos [1], la potencialidad que estos sistemas presentan para ser escalados [2], es mayor que las dificultades de los otros sistemas [3]. Los procesos en perfusión pueden clasificarse en dependencia de la manera en que se logra la retención celular en el biorreactor. Las células pueden mantenerse fuera de la circulación del fluido, mediante el uso de barreras de exclusión [4, 5], vesículas de materiales porosos o perlas, que pueden usarse para retener en una fase que no es la del medio de cultivo [6, 7], y además, las células pueden mantenerse suspendidas en el caldo de cultivo y la retención se alcanza mediante un dispositivo acoplado al fermentador, como los filtro rotatorios y rotofiltros externos [8-14]. Este último método es el único que puede ser escalado satisfactoriamente a niveles de cientos o miles de litros de cultivo para la producción de cantidades de producto de decenas o centenas de kilogramos [3, 15]. Pero hasta el momento, no se tiene claro el fenómeno de colmatación que ocurre en estos dispositivos de separación (filtro rotatorio), ni qué variable es la de

más influencia en este sistema, ni el régimen que envuelve este proceso: si es laminar o turbulento; ni se sabe la relación que tiene el proceso hidrodinámico con la cinética del cultivo y ni se conoce si la torta aparente formada en la superficie de la membrana del dispositivo es compresible o no. Esto se determina mediante experimento, calculando los valores de la resistencia específica de la torta, de la resistencia del medio filtrante y de la porosidad con la variación de la caída de la presión. Por eso es importante investigar cuál es el mecanismo de colmatación más probable que interviene en la oclusión del filtro rotatorio, para que en trabajos futuros se logre modelar con bastante precisión este modo de cultivo.

Materiales y métodos

Materiales

Sistema de filtración

El sistema de filtración está compuesto por un agitador mecánico de la firma Alka (Alemania) y un filtro rotatorio o filtro rotatorio fabricado por la firma B. Braum (Alemania), el cual se encuentra protegido

1. Ozturk SS. Engineering challenges in high density cell culture systems. *Cytotechnol* 1996;22:3-16.
2. Johnson M, Lanthier S, Massie B, Lefevre G, Kamen AA. Use of a Centritech lab centrifuge for perfusion culture of hybridoma cells in protein free medium. *Biotechnol Prog* 1996;12:855-64.
3. Piret JM, Devens DA, Cooney CL. Nutrients and metabolic gradients in mammalian cell hollow fiber bioreactors. *J Chem Eng* 1991;69:421-8.
4. Fouron Y. Growing cultures in perfusion bioreactors. *Nature* 1987;327:537-8.
5. Knazek RA, Gullino PM, Kohler PO, Dedrick RL. Cell culture in artificial capillaries: an approach to tissue growth *in vitro*. *Nature* 1972;178:65-7.
6. Sinacore MS, Creswick BC, Buehler R. Entrapment and growth of murine hybridoma cells in calcium alginate gel microbeads. *Biotechnology* 1989;7:1275-9.
7. Vournakis JN, Rustandler PW. Microenvironment: The key to improve cell culture products. *Biotechnology* 1989;7:143-5.

por una estructura de vidrio. El cuerpo del filtro es cilíndrico, de acero inoxidable y la malla es del mismo material; con un diámetro de poro de 10 μm . El filtro rotatorio posee un diámetro es de 8.5 cm y una altura de 26 cm. El mecanismo de unión del filtro rotatorio al agitador es a través de un eje ubicado en la parte superior de la estructura del filtro rotatorio [6].

Dispositivo de medición del volumen

El dispositivo de medición es una probeta plástica graduada de 2 L, que sirve de base al filtro rotatorio. En esta probeta se colecta la suspensión, que pasa del interior del filtro rotatorio al exterior, atravesando la torta de células formada y la malla del filtro [6].

Línea celular para la formación de la torta filtrante

La línea celular que se utilizó es la NSO/H7 [6].

Dispositivo de adición de la suspensión al filtro rotatorio

Se utilizó una bomba peristáltica, diseñada por la firma Watson Marlow, modelo 323. Posee un cabezal de 3 rodillos y sistema de control digital [6] (Figura 1).

Métodos

Medición de la velocidad de filtración

El experimento está diseñado para la medición de la velocidad de filtración en tres niveles de velocidad de rotación del filtro rotatorio, rotando a 100, 200 y 300 rpm, para suspensiones de células con concentraciones celulares de 1×10^6 , 3×10^6 , 6×10^6 y 9×10^6 céls./mL [6], para la determinación del mecanismo de colmatación que controla durante el funcionamiento del dispositivo, y de las variables hidrodinámicas como la resistencia específica de la torta, resistencia del medio filtrante y porosidad (Figura 2).

Discusión

Desarrollo de la experimentación

El cultivo en perfusión con filtro rotatorio, es un proceso en el que intervienen varios fenómenos simultáneamente [8]. En trabajos anteriores [8] se han preguntado sobre la influencia o no del flujo de intercambio a través de la membrana (F) por sí solo, durante la colmatación del filtro rotatorio en el proceso de fermentación. Por esa razón, se situó la atención sobre esta variable, no con el objetivo de ver su influencia, sino para modelar su régimen de colmatación; en trabajos futuros, se estudiará el efecto durante el desempeño con el cultivo (Figura 3).

En el experimento se fue midiendo el volumen clarificado en intervalos de tiempo fijos [16], y se representaron los valores de las variables del $1/V_t$ frente a $1/t_t$ obtenidos durante la experimentación. Estos reflejaron una correlación lineal en la recta ajustada (Figura 4).

Se procedió al trabajo con la ecuación diferencial general para la operación de filtración centrífuga [16-18], porque apareció el flujo de intercambio, producto de la acción centrífuga. Este flujo influye sobre la operación y el proceso de colmatación de la membrana, por lo que se decidió investigar su máxima componente.

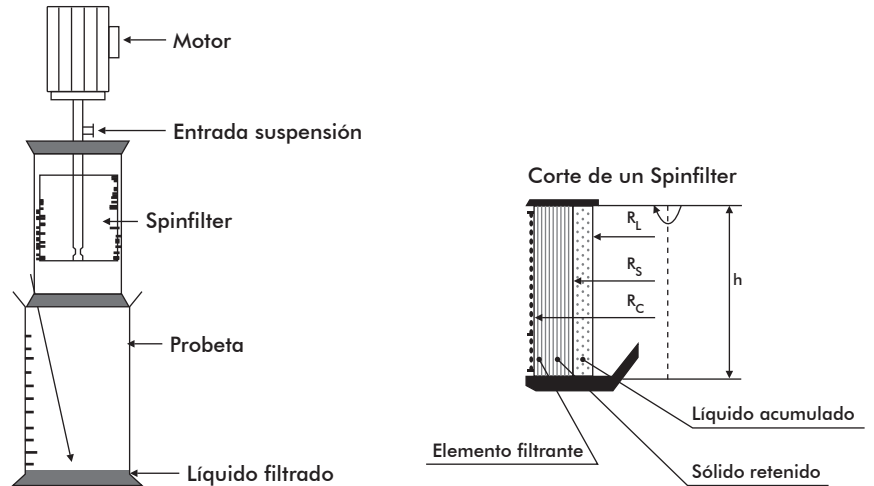


Figura 1. Dispositivo de medición. R_L : radio del eje de la superficie del líquido acumulado, R_S : radio del eje a la superficie de la torta, R_C : radio del eje a la superficie de la malla filtrante.

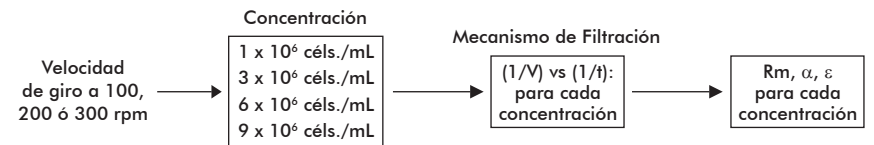


Figura 2. Diseño del experimento para la determinación del mecanismo de filtración y de las variables hidrodinámicas.

$$\frac{d^2t}{dV^2} = K \left(\frac{dt}{dV} \right)^n \quad (1)$$

Donde:

- t : tiempo (s)
- V : volumen (mL)
- K : constante (mL^2/s)

En la ecuación 1 se fijó el orden $n = 3/2$, para obtener una curva con $1/V_t$ (mL^{-1}) frente a $1/t_t$ (s^{-1}), que representa el mecanismo de bloqueo estándar, del que resultó:

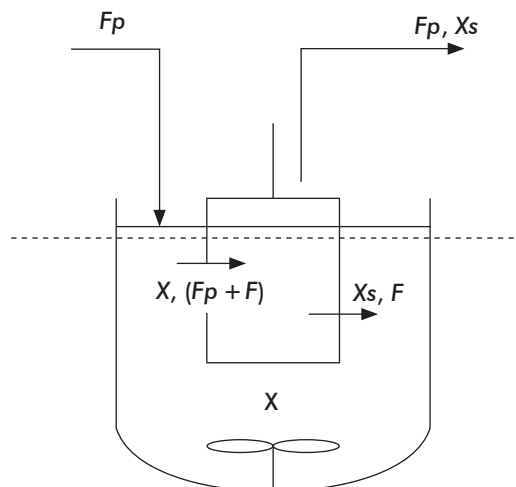


Figura 3. Distribución de flujos en el sistema del cultivo en perfusión. F: flujo de intercambio (L/h); F_p : flujo de perfusión; X_s : concentración de biomasa en el filtro rotatorio (g/L).

8. Yabannavar VM, Singh V, Connelly N. Mammalian cell retention in a spinfilter perfusion bioreactor for mammalian cell. *Biotechnol Bioeng* 1992;43:159-64.

9. Doblhoff-Dier O, Gaida T, Kättinger H, Burger W, Groschl M, Benes E. A novel ultrasonic resonance field device for the retention of animal cells. *Biotechnol Prog* 1994;10:428-32.

10. Hulscher M, Scheibler U, Onken U. Selective recycle of viable animal cells by coupling of airlift reactor and cell settler. *Biotechnol Bioeng* 1992;39:442-6.

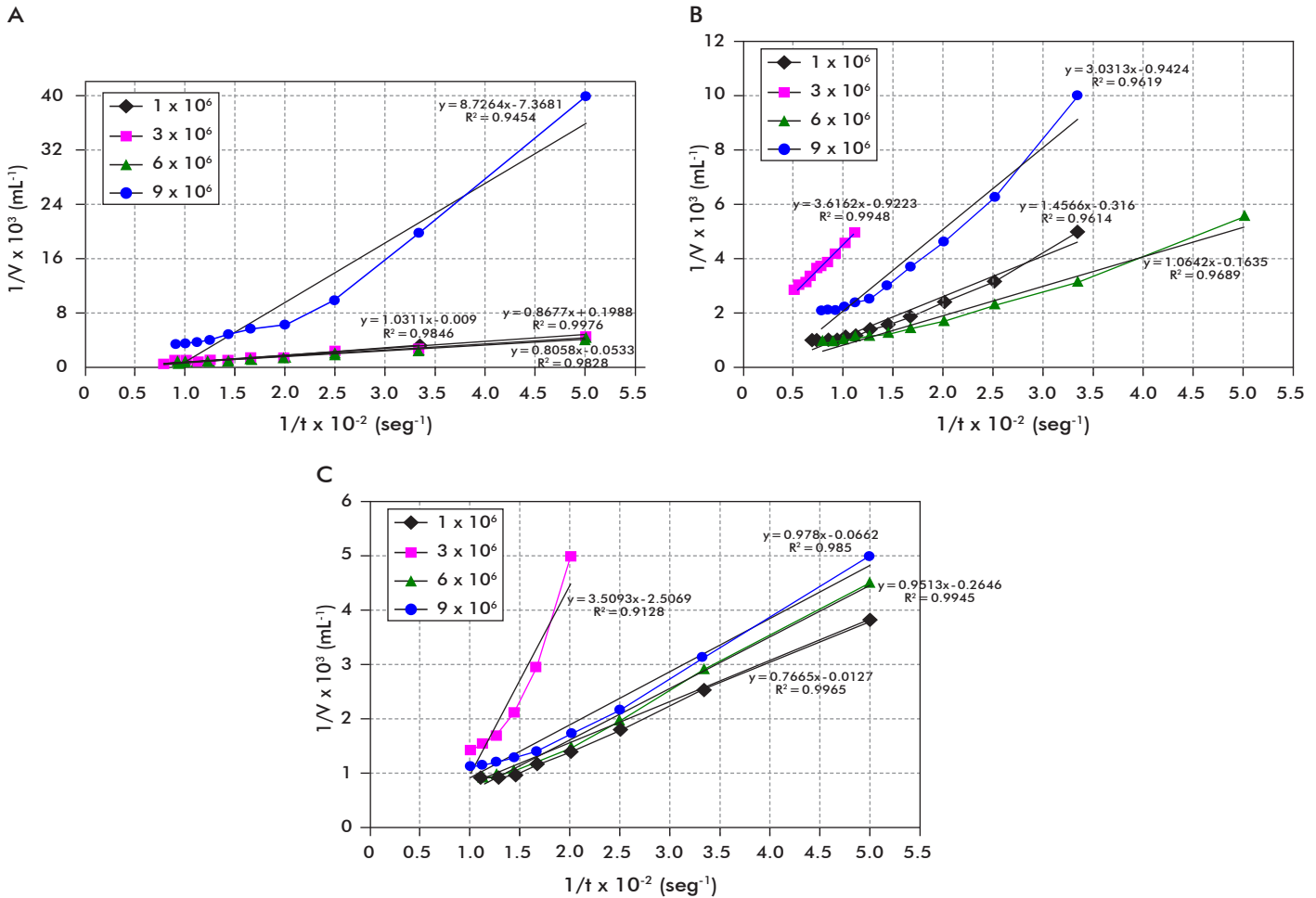


Figura 4. Ajuste del modelo con $1/V$ (mL^{-1}) frente a $1/t$ (s^{-1}), para velocidades de rotación del filtro rotatorio a 100 rpm (A), 200 rpm (B) y 300 rpm (C).

$$\left(\frac{1}{V}\right) = \frac{1}{q_0} \left(\frac{1}{t}\right) + \frac{K}{2(q_0)^{1/2}} \quad (2)$$

Donde:

q_0 : constante (mL/s)

$$\frac{1}{q_0} : \text{pendiente y } \frac{1}{q_0} = \frac{\mu R_m}{\Delta P S}$$

$$\frac{K}{2(q_0)^{1/2}} : \text{Intercepto y } K = \frac{\mu C \alpha}{\Delta P S^2}$$

Siendo:

μ : viscosidad ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)

R_m : resistencia del medio de filtración (m^{-1})

C : razón de sólidos en la torta / volumen filtrado (kg/m^3)

α : resistencia específica de la torta (m/kg)

$-\Delta P$: diferencia de presión (Pa)

S : área de filtración (dm^2)

Por lo tanto, de la figura 4 y de la ecuación 2, se determinó que efectivamente el mecanismo predominante es el de bloqueo estándar [17, 18].

Como el efecto de la fuerza centrífuga es el principal componente del mecanismo de separación de un filtro rotatorio, se utilizó para el cálculo del valor de la caída de presión ($-\Delta P$) en la ecuación 3 [16]:

$$-\Delta P = \frac{\rho V u \eta K s g}{S} \quad (3)$$

Donde:

ρ : densidad líquido puro (kg/m^3)

Vu : volumen útil del filtro rotatorio (L)

η : coeficiente de llenado

Ks : poder de separación de los filtro rotatorio

g : constante gravitacional ($9.81 \text{ m}/\text{s}^2$)

A partir de los valores de pendientes e intervalos reportados por la ecuación que describe la línea de tendencia en las gráficas del $1/V = f(1/t)$ de la figura 4, se procedió al cálculo de las variables hidrodinámicas: la resistencia del medio filtrante (R_m), la resistencia específica de la torta (α) y la porosidad (ε), las cuales posibilitan la caracterización del régimen en que ocurre el proceso de filtración.

Determinación del comportamiento de la resistencia del medio filtrante, resistencia de la torta y la porosidad

Una vez obtenido el valor de las variables, se correlacionan los valores de $R_m = f(n)$, del $\text{Ln}\alpha = f(n)$ y del $\varepsilon = f(n)$, incluyendo el valor de concentración celular para cada una de las curvas. En este caso, n es el exponente. La figura 5 refleja el comportamiento de la torta.

11. Batt BC, Davis RH, Kompala DS. Inclined sedimentation for selective retention of viable hybridomas in a continuous suspension bioreactor. *Biotechnol Prog* 1990;6:458-64.

12. Tokashiki M, Arai T, Hamamoto K, Ishimaru K. High density culture of hybridoma cells using a perfusion vessel with an external centrifuge. *Cytotechnol* 1990;3:329-344.

13. Banik GG, Heath CA. Partial and total cell retention in a filtration-based homogeneous perfusion reactor. *Biotechnol Prog* 1995;11:584-8.

14. Elsayed EA, Medronho RA, Wagner R, Deckwer WD. Use of hydrocyclones for mammalian cell retention: Separation efficiency and cell viability (Part 1). *Biotechnol Bioeng* 2006;6:347-54.

15. Smith CG, Guillaume JM, Greenfield PF, Randerson DH. Experience of scale-up homogeneous perfusion culture for hybridomas. *Bioprocess Eng* 1991;6:213.

16. Rosabal VJ. Hidrodinámica y Separaciones Mecánicas. Ed. ENPES, La Habana; 1990.

17. González VA. Estudio del proceso de formación de tortas de células de mamíferos en la superficie de un *spinfilter*. Trabajo de tesis. Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría". Cuba; 2004.

La figura evidencia el aumento de la resistencia específica de la torta con el aumento de la velocidad de giro del filtro rotatorio, por lo que ayuda a deducir que es sinónimo de que con el aumento de la presión del sistema, la resistencia aumenta y por tanto la torta (aparente) formada en la superficie de la membrana es del tipo compresible, elemento que hasta el momento no se tenía claro. Solo para la concentración de 1×10^6 cel./mL no se cumple, lo que puede deberse a que en ese punto exista algún óptimo, cuya búsqueda no es tema de investigación en este trabajo.

Al analizar el comportamiento del medio filtrante (R_m), se observa también un incremento junto con el aumento de la velocidad de giro del filtro (Figura 6), debido a que está bajo el campo centrífugo, lo que provoca que aparezcan zonas de laminaridad en el interior del filtro rotatorio (Figura 7). El espesor de esta zona depende directamente de la intensidad del giro y forma parte de la resistencia del medio filtrante del sistema.

La porosidad disminuye con el aumento de la velocidad de rotación (Figura 8), debido a que con el aumento de la presión del sistema, la torta se compacta más, y la porosidad se hace más pequeña. Es posible una combinación de estas variables para encontrar puntos óptimos, ya que la porosidad se hace mayor con el incremento de la velocidad de giro y la densidad celular. Solo para la concentración de 1×10^6 cel./mL no se cumple, y se atribuye a la posibilidad de que en ese punto exista algún óptimo, pero esta interrogante no será objeto de análisis en este trabajo.

Se estudió también cómo varía el régimen de flujo cuando el fluido atraviesa la malla del filtro, en que se desarrolla en régimen laminar (Tabla 1). Las primeras ideas en torno a este tema se expusieron no muy claramente en la literatura [19, 20].

Se comprueba que el mecanismo de filtración para el sistema del filtro rotatorio corresponde a $n = 3/2$ con:

$$\left(\frac{1}{V}\right) = \frac{1}{q_0} \left(\frac{1}{t}\right) + \frac{K}{2(q_0)^{1/2}} \quad (2)$$

Y en términos de flujo se obtiene [18]:

$$F = \frac{q_0}{\left[1 + \frac{q_0 K^* t}{2}\right]^2}, \text{ donde } K^* = \frac{K}{2 [q_0]^{1/2}} \quad (4)$$

Por lo que se evidencia la gran influencia del tiempo sobre el flujo de intercambio a través de la malla

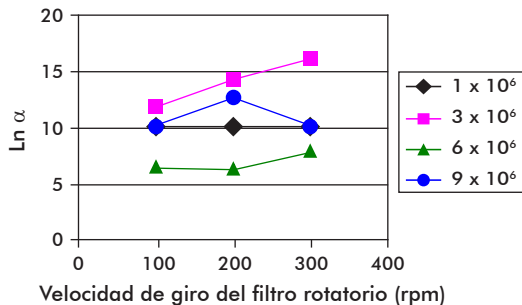


Figura 5. Variación de la resistencia específica de la torta ($\ln \alpha$) con respecto a la velocidad de giro del filtro rotatorio (rpm) y la concentración celular.

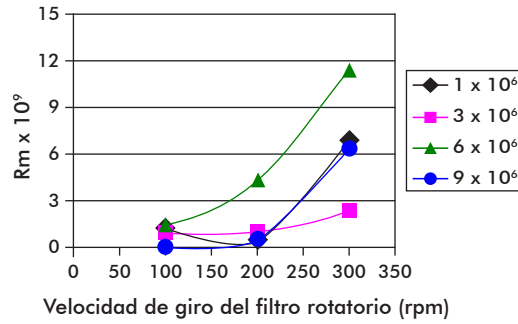


Figura 6. Variación de resistencia del medio filtrante (R_m) con respecto a la velocidad de giro del filtro rotatorio (rpm).

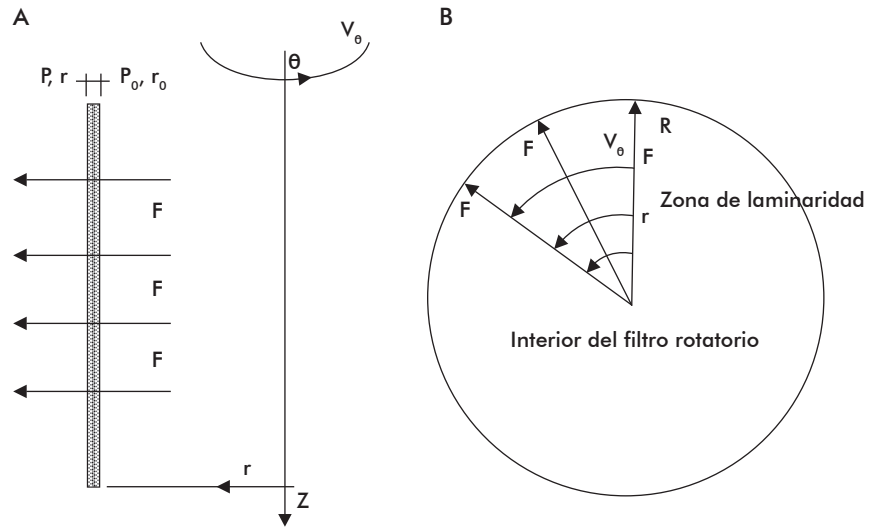


Figura 7. Resistencia de la zona de laminaridad al paso del flujo de intercambio (F). Corte longitudinal (A) y transversal (B) del filtro rotatorio.

(F), ya que a medida que aumenta el tiempo, disminuye el flujo de intercambio con gran rapidez.

La ecuación 4 constituye el modelo para el flujo de intercambio a través de la malla (F) en los filtros rotatorios. En trabajos futuros se estudiará este efecto en conjunto con el flujo de perfusión (F_p), que atraviesa la membrana del filtro en sentido contrario al del flujo de intercambio a través de la malla (F) (Figura 3) [21].

Conclusiones

Se determinó que el mecanismo que se ajusta para la operación de filtración centrífuga en un filtro rotatorio

Tabla 1. Variación del número de Re con respecto a la velocidad agitación y a la concentración

Velocidad de giro	X_s ($\times 10^6$ céls/mL)	Re
100 rpm	1	8.38×10^{-8}
	3	1.91×10^{-5}
	6	2.25×10^{-8}
	9	4.53×10^{-9}
200 rpm	1	8.82×10^{-8}
	3	4.20×10^{-6}
	6	8.98×10^{-7}
	9	6.75×10^{-6}
300 rpm	1	1.27×10^{-7}
	3	2.46×10^{-5}
	6	1.62×10^{-6}
	9	1.85×10^{-3}

18. Rushton A, Ward AS, Holdich RG. Solid liquid filtration and separation technology. Second ed. Wiley; 2000.

19. Favre E, Thaler T. An engineering of rotating sieves for hybridoma cell retention in stirred tank bioreactor. Cytotechnology 1992;9:11-9.

20. Yashwant MD, Mina DM, Renato F. Practical consideration in operation and scale-up of spinfilter based bioreactors for monoclonal antibody production. Biotechnol Prog 1996;12:57-64.

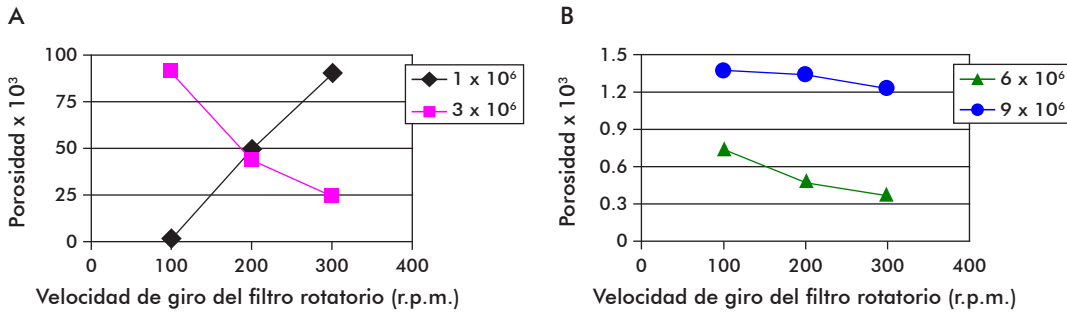


Figura 8. Variación de la porosidad con respecto a la velocidad de giro del filtro rotatorio (r.p.m.), para las concentraciones de 1×10^6 y 3×10^6 céls/mL (A); y 6×10^6 y 9×10^6 céls/mL (B).

rio, es el de la ecuación diferencial para orden $n = 3/2$ a una caída de presión ($-\Delta P$) constante; es decir, que la caída de presión no depende de la concentración de la suspensión, sino de la velocidad de giro, tal como la ecuación (3) [12, 17], donde la caída de presión ($-\Delta P$) es directamente proporcional a la velocidad de giro del filtro rotatorio y a la densidad del líquido puro. Analizando la tendencia en los gráficos que relacionan la porosidad con la velocidad de giro en que $\varepsilon = f(n)$, se observó que la curva tiende a disminuir en valores de porosidad, a medida que aumenta el valor de la velocidad de giro, por lo que se puede demostrar que

la torta de células formada sobre la malla del filtro rotatorio es compresible. Esto concuerda con lo planteado en la literatura, donde las tortas compresibles son aquellas cuya porosidad disminuye al aumentar la caída de presión [17], lo cual provoca el aumento de la resistencia hidráulica. Por último se determinó que durante la colmatación del filtro rotatorio, el proceso se desarrollaba en régimen laminar, tal como se pensaba, ya que hasta el momento no se tenía la seguridad de que esto es lo que sucede y que guarda correspondencia con lo que se plantea en la literatura [19, 21].

Recibido en agosto de 2008. Aprobado en diciembre de 2009.

21. Hernández LY. Estudio hidrodinámico del cultivo de células de mamífero en perfusión con *spinfilter* en tanque agitado. Trabajo de tesis de maestría. Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría". Cuba; 2006.