

Diss. ETH Nr. 10939

**Die Abscheidung von Biopartikeln durch  
Ultraschallagglomeration und dynamische  
Mikrofiltration mit alternierender Überströmung**

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
THOMAS SCHLUEP  
dipl. Natw. ETH  
geboren am 23. März 1965  
von Nennigkofen / SO

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. F. Widmer, Referent  
PD Dr. A. Einsele, Korreferent

Zürich 1995

## Zusammenfassung

Die Abtrennung feiner Partikel im Bereich zwischen 0.1 und 20  $\mu\text{m}$  spielt in der Biotechnologie eine grosse Rolle, einerseits in der Zellrückhaltung während der kontinuierlichen Fermentation und andererseits bei der Abtrennung von Zellen und Zellbruchstücken während der Aufarbeitung. Die spezifischen Eigenschaften dieser Materialien, wie geringe Dichtedifferenz zum umgebenden Medium und hohe Deckschichtwiderstände bei der Filtration, schränken jedoch die Effizienz der üblichen Abtrennverfahren ein. In dieser Arbeit wurden deshalb zwei neue Verfahren untersucht und deren Eignung für eine Verbesserung der Abtrennung von Biopartikeln bewertet.

Eine Möglichkeit die Abtrenneigenschaften von Partikeln zu verbessern, stellt die Agglomeration derselben zu grösseren Flocken dar. Eine Entstabilisierung der normalerweise in dispersem Zustand vorliegenden Biosuspensionen ohne die Zugabe unerwünschter Flockungsmittel kann durch das Einbringen der Suspension in ein stehendes Ultraschallfeld induziert werden. Theoretische Überlegungen ergaben, dass die dabei vom Schall auf die suspendierten Biopartikel ausgeübten Kräfte diese in bestimmte Positionen treiben, so dass Banden erhöhter Dichte entstehen. In diesen Banden, die einen Abstand von  $1/2$  Wellenlänge aufweisen, wirken weitere Kräfte auf die Partikel, welche eine Anziehung der Partikel und gegenseitige Kollisionen verursachen.

Um abzuklären, ob diese Kräfte ausreichen, um die elektrostatische Abstossung der Partikel zu überwinden, wurden Agglomerationsversuche im stehenden Ultraschallfeld mit einer Frequenz von 1.64 MHz und einer Schallintensität von bis zu  $84 \text{ J m}^{-3}$  durchgeführt. Die Versuche mit Hefesuspensionen und Hybridoma-Zellkulturen ergaben, dass sich innert kürzester Zeit sehr grosse Flocken in der Form diskusartiger Scheiben mit einem Durchmesser von bis zu 0.5 mm ausbilden. Nach dem Abschalten des Ultraschalls, sedimentieren die Agglomerate sehr schnell, sind jedoch so instabil, dass sie sich alleine dadurch wieder auflösen. Die Stabilität der Flocken kann auch durch eine Zugabe von Fe(III)-Flockungsmittel nicht erhöht werden.

Vergleichende Agglomerationsversuche in einem turbulenten Scherfeld ergaben, dass in diesem stabile Flocken gebildet werden, wobei die

Stabilität aus einem Selektionsmechanismus resultiert, der darauf beruht, dass zu grosse und daher instabile Flocken durch die Strömung wieder zerstört werden. Da im Schallfeld ein solcher Mechanismus nicht vorhanden ist, sind die dort gebildeten Flocken zu gross und weisen eine bezüglich der Flockenstabilität ungünstige Form auf. Ebenfalls nachteilig wirkt sich die geringe Dichtedifferenz zwischen den Partikeln und dem umgebenden Medium aus, welche einen negativen Einfluss auf die anziehenden Kräfte ausübt.

Aufgrund der Beobachtung, dass bei einer kontinuierlichen Durchströmung des Schallfelds mit Suspension Partikel in diesem zurückgehalten werden, wurde ein Ultraschallabscheider konstruiert. Versuche mit Hefesuspensionen ergaben bei langsamer Durchströmung ( $1 - 3 \text{ mm s}^{-1}$ ) einen Abscheidegrad von bis zu 98 %. Der Vorteil eines solchen Schallabscheiders liegt darin, dass keine bewegten Einbauten, Membranen oder andere Filtermedien benötigt werden und somit weder Sterilität, Reinigung noch Verstopfung der Apparatur ein Problem bietet. Da somit eine schonende Abtrennung von Partikeln möglich wird, steckt in diesem System besonders im Bereich der Rückhaltung von animalischen Zellen ein grosses Entwicklungspotential.

Als zweites Verfahren wurde die dynamische Mikrofiltration mit alternierender Überströmung untersucht. In der Literatur wird von verschiedenen Autoren dargestellt, dass durch das Aufprägen von Vibrationen auf das Filtermodul oder durch eine pulsierende Strömung eine Steigerung der Filterleistung erreicht werden kann. Zur Untersuchung dieser Effekte wurde in dieser Arbeit eine Querstromfiltrationsapparatur konstruiert, in welcher instationäre Druckverhältnisse im Filtermodul dadurch herbeigeführt werden können, dass die Überströmungsrichtung mittels einer einfachen Anordnung von 4 Ventilen gewechselt werden kann. In dem speziell konstruierten, in 4 Abschnitte unterteilten Flachkanalmodul ist es möglich, neben den üblichen Messgrössen wie Druck, Druckabfall und Filtratvolumenströmen auch die Deckschichthöhe mittels eines Laser-Distanz-Sensors (LDS) online auf  $\pm 2 \mu\text{m}$  genau zu messen.

Um die Auswirkungen der instationären Betriebsbedingungen auf die Deckschichthöhe und den Filtratfluss beschreiben zu können, wurde ausgehend von theoretischen Betrachtungen ein Deckschichtmodell

hergeleitet, mit welchem deren zeitlicher Verlauf berechnet werden kann. Bei der Ermittlung der Modellparameter aus den Messdaten ergaben sich folgende Resultate:

- Bei im Verhältnis zum Druck hohen Überströmungsgeschwindigkeiten werden selektiv nur Zellbruchstücke und Makromoleküle auf und in der Membrane abgelagert. Diese Ablagerungen können unter dem Begriff Membranfouling zusammengefasst werden und sind mit hydrodynamischen Massnahmen nicht zu verhindern.
- Wird ein bestimmter Schwellenwert im Verhältnis von Druck zu Überströmung überschritten, findet eine Ablagerung von Primärpartikeln (= Zellen) statt, wobei die Filtration dann in 3 Phasen verläuft. Diese Phasen können als 1.) *Deckschichtaufbau*, 2.) *Kompression* und 3.) *Deckschichtfouling* charakterisiert werden. Für die Versuche mit Hefesuspensionen ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und Messresultaten.

Daraus kann gefolgert werden, dass bei der dynamischen Mikrofiltration vor allem das Membranfouling limitierend ist. Eine Steigerung der Filterleistung mittels alternierender Überströmung ist theoretisch nur bei einem hohen Druckabfall im Strömungskanal möglich, was zwangsweise eine hohe Überströmungsgeschwindigkeit bedingt. Da in diesem Fall bei den hier untersuchten Suspensionen keine Ablagerung von Primärpartikeln sondern ein starkes Membranfouling auftritt, kann durch eine Alternierung keine Leistungssteigerung erzielt werden. Dies konnte durch Messungen mit Hefesuspensionen und Hybridoma-Zellkulturen bestätigt werden.

## Summary

The separation of fine particles with sizes ranging from 0.1 to 20  $\mu\text{m}$  plays an important role in biotechnology, especially in cell retention during continuous fermentation and in cell and cell debris removal during downstream processing. The specific properties of these substances - like low difference in density compared to the suspending media and high filter cake resistance - reduce the efficiency of the traditional separation processes. In order to assess their potential to improve the separation of bioparticles, two new processes were investigated.

One possibility of improving the separation characteristics of particles is the agglomeration of these particles to larger flocs. A destabilisation of the normally dispersed biosuspensions without adding any undesirable flocculants can be induced by exposing the suspension to a standing ultrasonic wave field. The sound-forces cause the particles to build layers of high particle density at positions  $1/2$  a wavelength apart. In these layers further forces have the effect of causing attraction and collisions between the particles.

To find out whether these forces are high enough to surmount the electrostatic repulsion between the particles, agglomeration experiments were carried out in a standing wave field with a frequency of 1.64 MHz and sound intensities up to  $84 \text{ J m}^{-3}$ . These experiments with yeast and hybridoma cells showed, that within seconds very large, discus-like flocs with diameters up to 0.5 mm are formed. When the sound is disconnected, these agglomerates sediment very rapidly, but are so instable, that this alone causes their dissolution. Even by adding Fe(III)-floculants the stability of these flocs cannot be improved.

Comparing agglomeration experiments showed, that in a turbulent shear field stable flocs are formed. The stability of these flocs results from a selection mechanism based on the destruction of too large or instable agglomerates. Because of the absence of such a mechanism in the sound field, the flocs formed there are too large and unfavourably shaped regarding to floc stability. Additionally the low density difference between particles and suspending media reduces the stability of the flocs, because it lowers the attracting forces between suspended particles.

The observation of particles being held back in the sound field lead to the construction of a continuous ultrasonic separator. Experiments with yeast suspensions showed that with slow fluid-velocities ( $1 - 3 \text{ mm s}^{-1}$ ) separation rates of up to 98 % can be achieved. The advantage of such a system compared to common processes is the absence of rotatory elements, membranes or other filter media and therefore neither sterility nor cleaning nor blockage of the device causes any problem. This system has a high evolution potential especially as a retention system for animal cell cultures.

As second process the dynamic microfiltration with alternation of the flow direction was investigated. Different authors report that an improved filtration performance may be achieved by imposing vibrations on the filtration module or by pulsating the retentate flow. In order to investigate these effects a crossflow filtration device was constructed in which instationary pressure conditions are generated by alternating the flow direction through a simple arrangement of four valves. The special design of the flat channel module offers the possibility of measuring on-line not only the usual data like pressure and filtrate flow but also the height of the filter cake with an accuracy of  $\pm 2 \mu\text{m}$  by laser-distance-sensor (LDS).

In order to describe the effects of the instationary operating conditions on the height of the filter cake and on the filtrate flow, a model was formed with which the time-dependent values of these parameters could be calculated. Fitting the model to the measured data gave following results:

- If the crossflow velocity is high in relation to the pressure, a selective deposit of cell debris and macromolecules occurs both on the surface and in the pores of the membrane. These deposits are called membrane fouling and cannot be prevented by hydrodynamic means.
- If a certain threshold-value of the relation between pressure and crossflow velocity is exceeded, primary particles (= cells) are deposited on the membrane and the filtration proceeds in 3 different phases. These phases can be characterised as 1.) *build-up of the filter cake*, 2.) *compression* and 3.) *fouling of the filter cake*. The experiments with yeast suspensions showed good correlation between the model and the measured data.

These results show that the performance of dynamic microfiltration is limited by membrane fouling. Theoretically an improvement of the filter performance by alternating the flow direction is only possible with a high pressure decrease in the filtration channel, thus with a high crossflow velocity. As in this case the investigated suspensions show no deposit of primary particles but strong membrane fouling, no improvement of the filter performance can be achieved. These results were confirmed by experiments with yeast suspensions and hybridoma cell cultures.