

## Anreichern und Fraktionieren von Proteinen und Zellsuspensionen mit alternativen Verfahrensweisen in der Crossflow-Filtration



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) Abt. Technologie Prof. Dr. Ulrich Kulozik/M.Sc. Maria Weinberger
Industriegruppe(n):	VDMA-Fachverband Nahrungsmittel- und Verpackungsmaschinen e. V., Frankfurt Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e. V. (FAH), Bonn Vereinigung zur Förderung der Milchwissenschaftlichen Forschung an der TU München e. V., Freising Verband Forschender Arzneimittelhersteller e. V. (vfa), Berlin Arbeitsgemeinschaft für pharmazeutische Verfahrenstechnik e. V. (APV), Mainz Deutsche Gesellschaft für Membrantechnik e. V. (DGMT), Essen
Projektkoordinator:	Dr. Jan Schöning Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach a.d. Riss
Laufzeit:	2017 - 2020
Zuwendungssumme:	€ 328.140,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI im Rahmen der AiF-Forschungsallianz Energiewende)

### Ausgangssituation

Ziel der Crossflow-Filtration ist es, die Ablagerung zurückgehaltener Stoffe als Deckschicht zu vermindern und so den Flux zu stabilisieren. Beim Aufarbeiten komplexer Biosuspensionen oder kolloidaler Lösungen, wie Milch und Bier, lässt sich aufgrund der enthaltenen polymeren Makromoleküle (z.B. Proteine und Polysaccharide) und Partikel (z.B. Mikroorganismen) trotz hoher Überströmgeschwindigkeit die Deckschichtbildung nicht vermeiden. Dies führt zu geringen Filtratflüssen, schlechten Trennspezifitäten und kurzen Filterstandzeiten mit allen sich hieraus ergebenden negativen wirtschaftlichen Konsequenzen, insbesondere für kleine und mittelständische Unternehmen (KMU).

Durch Pulsation der Vorwärtsströmung könnte ggf. ein höherer Steady-state-Flux, eine bessere Permeation von Zielsubstanzen durch die Membran und eine längere Standzeit der Anlagen zwischen zwei Reinigungsvorgängen erreicht werden. Dies würde höhere Produktreinheiten, bessere Ausbeuten und einen deutlich reduzierten Energieaufwand, allein durch die geringere Anzahl von Diafiltrationsschritten bei der Fraktionierung von Proteinen und in der kontinuierlichen Fermentation mit Zellkulturen, erlauben. Durch die unetstetige Scherbeanspruchung der Ablagerungen kann bei insgesamt niedrigeren Strömungsgeschwindigkeiten eine reduzierte Partikelablagerung bzw. ein besserer Deckschichtabtrag erreicht werden.

Ein weiterer Strömungsmodus, der aufgrund seiner wechselnden Beanspruchung zur Verhinderung einer Deckschichtbildung in Betracht kommt, ist eine alternierende Strömung, also eine oszillierende Strömung mit Strömungsumkehr. Erste Erfahrungen mit der alternierenden Tangentialströmung als Zellrückhaltesystem für Fermentationen von Säugetierzellen in kontinuierlichen Perfusionsverfahren macht man derzeit in der pharmazeutischen Biotechnologie. Verfahrenstechnisch ist diese Technik allerdings bisher kaum untersucht, ebenso wenig ist sie in anderen Technologiebereichen erprobt.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Bewertung dieser beiden unterschiedlichen Strömungskonzepte, die zur Verminderung der Deckschichtbildung auf oder in Membranen und zur Erhöhung des angestrebten Stoffdurchgangs führen sollen.

### **Forschungsergebnis**

Im Rahmen des Projektes wurde eine Filtrationsanlage im Pilotmaßstab entwickelt, die zur Überströmung der Membran sowohl einen stetigen pulsationsarmen Feedstrom, also auch einen pulsierenden oder alternierenden Strömungsmodus realisieren kann. Dadurch können diese drei unterschiedlichen Modi in ihrer Wirkung auf Flux und Transmission während unterschiedlichen Trennprozessen beurteilt werden und damit der Einfluss der oszillierenden Strömungsmuster auf das Fouling abgeleitet werden. Dabei ergaben sich für unterschiedliche Trennaufgaben unterschiedliche Effekte in Bezug auf die Reduktion des Foulings.

Bei der Fraktionierung von Milchproteinen werden die Kaseinmizellen zurückgehalten, während die kleineren Molkenproteine durch die Membran in das Permeat gelangen. Lagern sich die zurückgehaltenen Kaseinmizellen an der Membran ab, können diese sich quervernetzen und bilden eine gelartige Deckschicht aus, welche nicht nur den Flux drastisch reduziert, sondern auch zu einer teilweisen Retention der Molkenproteine führt. Obwohl es durch die Anwendung pulsierender und alternierender Überströmung zu einer Lockerung dieser Deckschicht kommt, reicht dies nicht dazu aus, um Mizellen aus dem Deckschichtverbund zu lösen und damit das Fouling zu reduzieren.

Bei der Aufreinigung von Proteinen aus einer Zellbrühe, welche hier modellhaft mittels Rinderserumalbumin (BSA) und *Saccharomyces-cerevisiae*-Zellen abgebildet wurde, kommt es ebenfalls durch die zurückgehaltenen Zellen zur Deckschichtbildung, welche den Flux und den BSA-Durchgang negativ beeinflusst. Hier können durch die Anwendung wechselnder Strömungsbeanspruchung im Vergleich zur stetigen Überströmung vermehrt Zellen aus der Deckschicht wieder abgetragen werden wodurch sich nicht nur ein erhöhter Flux, sondern insbesondere auch eine stark erhöhte Transmission des BSA ergeben. Es zeigte sich dabei, dass insbesondere die Amplitude der Wechselbeanspruchung einen starken Einfluss auf die Filtrationseffizienz hat. Dadurch, dass eine Strömungsumkehr immer eine 100%ige Amplitude beinhaltet, ließen sich bei alternierender Strömung geringfügig höhere Flux- und Transmissionswerte erreichen als bei pulsierender Strömung mit hoher Amplitude. Dieser Mehrwert wird jedoch durch eine stärkere Anlagenbelastung und einen deutlich komplexeren Anlagenaufbau kompensiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass oszillierende Strömungsformen in der Crossflow-Filtration das Potential haben, Fouling zu reduzieren und dadurch eine deutlich höhere Prozesseffizienz zu erreichen. Dieses Potential hängt jedoch stark von intrinsischen Eigenschaften der deckschichtbildenden Komponenten ab.

### **Wirtschaftliche Bedeutung**

Die Konzepte der pulsierenden bzw. alternierenden Strömung haben das Potenzial, das Fouling von Membranen erheblich zu vermindern und somit die Filtrationseffizienz im Sinne eines höheren Fluxes und einer verbesserten Trenneffizienz von Ziel- und Störsubstanzen zu verbessern.

Von den Ergebnissen kann eine Vielzahl von Betrieben aus den Bereichen Membranherstellung, Anlagenbau, Lebensmittelindustrie und pharmazeutische Biotechnologie profitieren. Insbesondere kleine und mittelständische Unternehmen werden auf ihrer Basis neue Produkt- und Verfahrenskonzepte umsetzen können. Denkbar

ist der Einsatz der alternierenden Strömung insbesondere in kleinen bis mittelgroßen Anlagen für Spezialaufgaben, die zur Kapazitätsausweitung modularisiert erweitert werden könnten. Die pulsierende Strömung dürfte von Limitationen in Bezug auf Scale-up weniger betroffen sein. Sie ist leicht integrierbar, indem zyklisch arbeitende Pumpen neben den installierten Umwälzpumpen überlagernd installiert werden.

Der konkrete Nutzen für Anwender liegt vor allem in einer höheren Filtrationseffizienz sowie in der Erhöhung der Anlagenstandzeiten zwischen zwei CIP-Reinigungen. Membranhersteller und Unternehmen des Maschinen- und Anlagenbaus erhalten durch das Projekt eine Grundlage zur Planung und Bewertung für Investitionen in neue Anlagen- und Prozesskonzepte.

### ***Publikationen (Auswahl)***

---

1. FEI-Schlussbericht 2020.
2. Weinberger, M. E. & Kulozik, U.: Determination of Compressibility and Relaxation Behavior of Yeast Cell Sediments by Analytical Centrifugation and Comparison with Deposit Formation on Membrane Surfaces. *Membr.* 12, 603 (2022).
3. Weinberger, M. E. & Kulozik, U.: Understanding the fouling mitigation mechanisms of alternating crossflow during cell-protein fractionation by microfiltration. *Food Bioprod. Proc.* 131, 136-143 (2022).
4. Weinberger, M. E., Andlinger, D. & Kulozik, U.: A novel approach for characterisation of stabilising bonds in milk protein deposit layers on microfiltration membranes. *Int. Dairy J.* 118, 105044 (2021).
5. Weinberger, M. E. & Kulozik, U.: Pulsatile crossflow improves microfiltration fractionation of cells and proteins. *J. Membr. Sci.* 629, 119295 (2021).
6. Weinberger, M. E. & Kulozik, U.: On the effect of flow reversal during crossflow microfiltration of a cell and protein mixture. *Food Bioprod. Proc.* 129, 24-33 (2021).
7. Weinberger, M. E.: Rheologische Charakterisierung caseinreicher Mikrofiltrationsdeckschichten. *Jahresb. 2020 Milchwiss. Forsch. ZIEL Weihenstephan*, ISBN 978-3-947492-20-6, 75-76 (2021).
8. Weinberger, M. E. & Kulozik, U.: Effect of low-frequency pulsatile crossflow microfiltration on flux and protein transmission in milk protein fractionation. *Sep. Sci. Technol.* [https://doi.org/ 10.1080/01496395.2020.1749080](https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1749080) (2020).
9. Weinberger, M. E.: Einfluss von Frequenz und Amplitude auf die Prozesseffizienz bei der pulsierenden Crossflowfiltration einer zellhaltigen Modellsuspension. *Jahresb. 2019 Milchwiss. Forsch. ZIEL Weihenstephan*, ISBN 978-3-947492-16-9, 99-100 (2020).
10. Weinberger, M. E. & Scheibenzuber, S.: Über die Lockerung proteinreicher Deckschichten in der Crossflow-Filtration durch pulsierende Überströmung. *Jahresb. 2018 Milchwiss. Forsch. ZIEL Weihenstephan*, ISBN 978-3-947492-10-7, 94-95 (2019).
11. Weinberger, M. E. et al.: Milchproteinfraktionierung mittels polymerer Hohlfasermembranen. *Jahresb. 2017 Milchwiss. Forsch. ZIEL Weihenstephan*, ISBN 978-3-947492-00-8, 97-98 (2018).

### ***Weiteres Informationsmaterial***

---

Technische Universität München  
 Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL)  
 Abt. Technologie  
 Weihenstephaner Berg 1, 85354 Freising  
 Tel.: +49 8161 71-3535  
 Fax: +49 8161 71-4384  
 E-Mail: [ulrich.kulozik@tum.de](mailto:ulrich.kulozik@tum.de)

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 3079699-9  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

### **Förderhinweis**

---

## **... ein Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

Gefördert durch:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Bildnachweis - Seite 1: © Christian Kürzl/TU München

Stand: 5. Dezember 2022