

Dielektrophorese-basiertes Lab-on-Chip-System zur Separation von Mikroalgen

A. Barai ^{1*}, J. Flügge ^{2*}, A. Hutari ², P. Neubauer ² und M. Birkholz ¹

¹ IHP – Leibniz-Institut für innovative Mikroelektronik, 15236 Frankfurt (Oder)

² Fachgebiet Bioverfahrenstechnik, Institut für Biotechnologie, TU Berlin, 13355 Berlin

Mikroalgen können als biologische Mikrosysteme von meist sphärischer Gestalt mit Durchmessern von wenigen bis zu einigen 100 µm aufgefasst werden. *Abb. 1* zeigt ein Ensemble von *Aurantiocytrium sp.* Zellen mit Durchmessern ab 15 bis 40 µm [1]. Als Produzenten von hochwertigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind sie als vielversprechender Rohstoff für die Biokraftstoffherstellung der dritten Generation, die Entwicklung von Pharmazeutika, organischen Polymeren und die Nahrungs- und Futtermittelindustrie im Bereich der Forschung und industriellen Nutzung von steigendem Interesse [2]. Zur Lipidgewinnung aus Mikroalgen wird ein Separationsverfahren benötigt, das adulte, lipidhaltige von Zellen trennt, die sich noch in der Wachstumsphase befinden. Hierfür kommt die Dielektrophorese (DEP) in Betracht, die die Polarisierbarkeit von Partikeln in inhomogenen elektrischen Feldern ausnutzt. Durch Anlegen einer Wechselspannung werden, je nach eingestellter Frequenz f , anziehende oder abstoßende Kräfte erzeugt (positive oder negative DEP) [3]. Durch die mikrosystemtechnische Integration von Elektroden in mikrofluidische Lab-on-Chip-Systeme wird so eine gesteuerte Bewegungsänderung der Partikel anhand ihrer Eigenschaften wie Größe, Dielektrizitätszahl ϵ sowie Leitfähigkeit σ und damit eine Zellseparation möglich [4].

Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, ein DEP-basiertes System zur Untersuchung der Separation von Mikroalgen zu entwickeln, mit dem auch ihre elektrischen Parameter ϵ und σ zu bestimmen sind. Basierend auf einem publizierten DEP-System von Piacentini et al. für die Auftrennung von Blutzellen [5] wurde ein Mikrofluidiksystem mit DEP-Elektroden konzipiert und durch FEM-Simulationen (Comsol Multiphysics 5.3 mit particle trace module) mit dem Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii* unterstützt, für den die elektrischen Parameter bekannt sind. Herausforderungen ergeben sich unter anderem bei der Einstellung der Spannung für eine optimale Auftrennung, da biologische Zellen bei zu hohen elektrischen Feldern Schädigungen durch Elektroporation erfahren. Die DEP-Kraft benötigt somit ein Mikrofluidiksystem, um die Spannungen niedrig zu halten, aber noch effektiv auf die Mikroalgen einwirken zu können. Durch die vorgeschaltete Simulation konnten viele solcher Hürden identifiziert und behoben werden.

Das konstruierte DEP-System (*Abb. 2*) ist aus drei Teilen aufgebaut, die mit einem 3D-Drucker (Keyence Serie 3000) hergestellt wurden. Das Oberteil umfasst vier Mikrofluidikanschlüsse, um die Zellsuspension und das Kulturmedium in die Mikrokanäle zu injizieren und die separierten Zellen wieder abzuführen. Die $(250 \mu\text{m})^2$ Mikrokanäle sind als gefräste Aussparung auf dem Mittelteil ausgeführt. Er liegt direkt an den Elektroden an, die auf ein vertikal orientiertes PCB aufgebracht sind; durch eine 50 µm dicken PDMS-Schicht ist die PCB-Oberfläche vom Kanal getrennt. Letzterer wurde mit einem automatischen Fräser erzeugt (LPKF Protomat Serie mit 0,8 µm lateraler Auflösung und $\pm 5 \mu\text{m}$ Wiederholgenauigkeit). Das Unterteil hat eine Aussparung für das PCB, welches über einen BNC-Stecker mit der Wechselspannung versorgt wird. In der FEM-Simulation wird eine Zellsuspension aus *C. reinhardtii* und dem entsprechenden Kulturmedium durch den Mikrokanal geleitet ($100 \mu\text{m s}^{-1}$). Entlang des Kanals erfahren die Zellen eine DEP-Kraft, wodurch diese in ihrer Bewegungsrichtung abgelenkt werden. Der DEP-Effekt führt zu einer Separation von Zellen mit hohem Lipidgehalt, welche für weitere Prozessschritte abgeführt werden können (*Abb. 3*). In dieser Konfiguration erreicht der zeitliche gemittelte Gradient des elektrischen Feldquadrats ∇/E_{rms}^2 Werte bis zu $10^{14} \text{ V}^2/\text{m}^3$ (*Abb. 4*). Die Simulation ergibt auch für diese Elektrodenanordnung eine klare Trennung von Zellen mit hohem und niedrigem Lipidgehalt wie es bereits für eine Anordnung mit horizontalen Deflektorelektroden gezeigt worden war [6].

Dieser DEP-Systemaufbau kann für die Zellseparation verschiedener Arten von Mikroalgen genutzt werden. Jedoch sollten die spezifischen DEP-Parameter (Dichte, Zellabmessung, ϵ und σ) für jede Mikroalgenart und für das entsprechende Kulturmedium bekannt sein oder sie müssen ermittelt werden, um ausreichend präzise Resultate in der Simulation und der praktischen Trennung zu erreichen [7].

Literatur

- [1] M. Paul Abishek, J. Patel, und A. Prem Rajan, „Algae Oil: A Sustainable Renewable Fuel of Future“, *Biotechnol. Res. Int.*, Bd. 2014, S. 1–8, 2014.
- [2] K. Wagemann und F. Ausfelder, „E-Fuels–Mehr als eine Option“, in *DECHEMA G.C.T.B.eV: Frankfurt*, 2017.

- [3] R. R. Pethig, *Dielectrophoresis: Theory, methodology and biological applications*. John Wiley & Sons, 2017.
- [4] B. Çetin und D. Li, „Dielectrophoresis in microfluidics technology“, *Electrophoresis*, Bd. 32, S. 2410–2427, 2011.
- [5] N. Piacentini, G. Mernier, R. Tornay, und P. Renaud, „Separation of platelets from other blood cells in continuous-flow by dielectrophoresis field-flow-fractionation“, *Biomicrofluidics*, Bd. 5, Nr. 3, S. 034122, 2011.
- [6] F. Gringel, V. Abt, P. Neubauer, und M. Birkholz, „Numerical analysis of dielectrophoresis for separation of microalgae“, *Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Berlin*, 2018.
- [7] C. Siebman, O. Velev, und V. Slaveykova, „Alternating current-dielectrophoresis collection and chaining of phytoplankton on chip: comparison of individual species and artificial communities“, *Biosensors*, Bd. 7, 2017.

Abbildungen

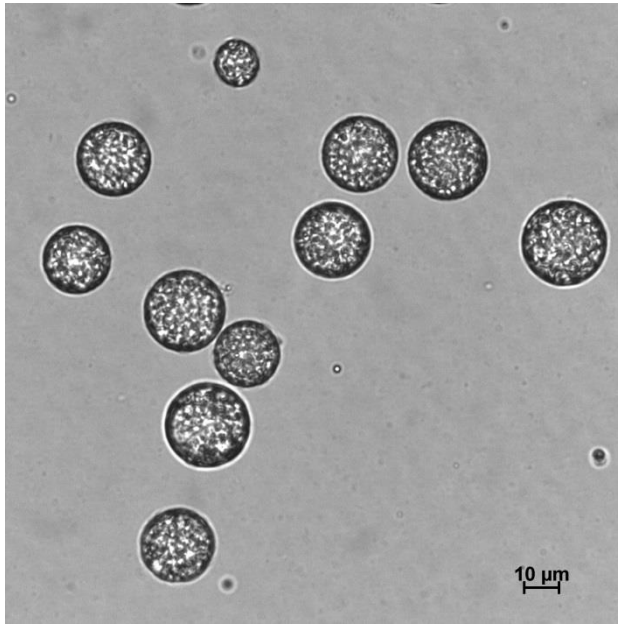


Abb. 1: Optisches Mikroskopbild eines Ensembles von *Aurantiochytrium sp.* Mikroalgen der Familie Thraustochytriaceae mit Durchmessern im Bereich von 15 bis 40 µm. Isoliert wurden die einzelligen, heterotrophen Mikroalgen aus einem indonesischen Mangroven-Habitat für die Produktion der mehrfach ungesättigten Fettsäure Docosahexaensäure (DHA).

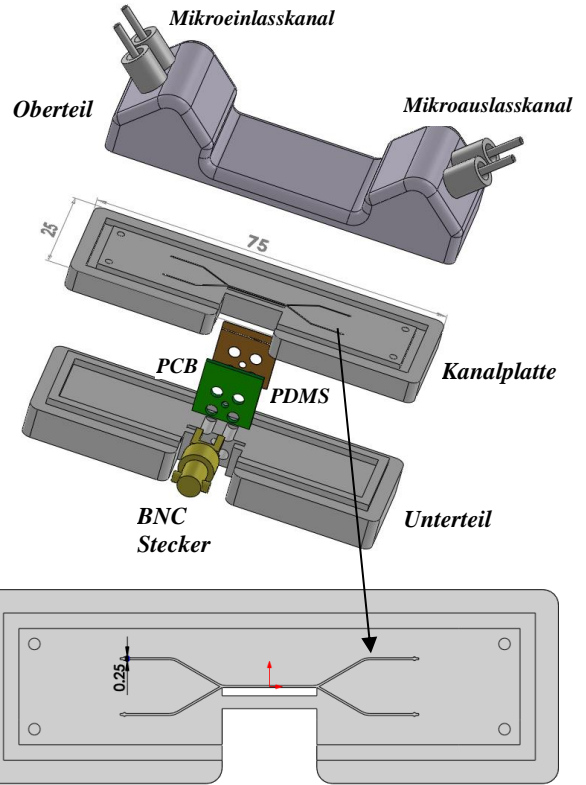


Abb. 2: Schema des DEP-Systemaufbaus. Das Oberteil umfasst vier Mikrofluidik-Anschlüsse. Die Kanalplatte hat einen Mikrokanal mit 250 µm Tiefe und Breite. Das Unterteil verfügt über einen Steckplatz für einen BNC-Stecker, über den die Wechselspannung zugeführt wird.

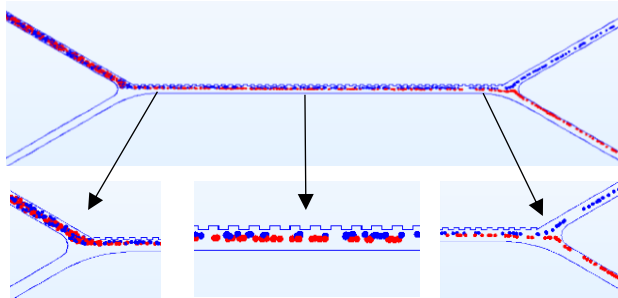


Abb. 3: FEM-Simulation zur Zellseparation von *C. reinhardtii* im 250 × 400 µm Mikrofluidik-Kanal bei einer mittleren Durchflussgeschwindigkeit 100 µm s⁻¹ (machbar bis 150 µm s⁻¹). Für die elektrischen Parameter wurde $V_{pp} = 12$ V bei $f = 1.8$ MHz, $\epsilon_p = 60$, $\epsilon_m = 80$ und $\sigma_m = 0,27$ Sm⁻¹ angesetzt. Die blauen Punkte repräsentieren Mikroalgen mit einem hohem und die roten solche mit niedrigem Lipidgehalt ($\sigma_p = 0,2$ bzw. 1,2 Sm⁻¹).

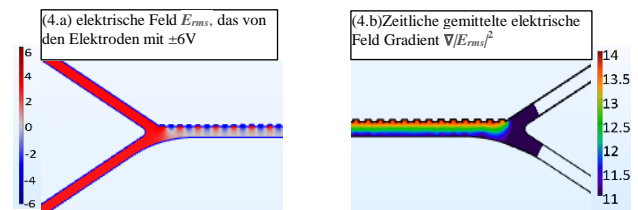


Abb. 4: (a) Elektrisches Feld, das von den Elektroden mit Wechselspannung (± 6 V) im Kanal erzeugt wird.

(b) Der zeitliche gemittelte elektrische Feldgradient $\nabla|E_{rms}|^2$ bis zu 10^{14} V²/m³ während der FEM-Simulation. DEP Kraft für polarisierbare Zelle:

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \text{Re} \left\{ \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right\} \nabla |\vec{E}_{rms}|^2$$

∇ : Nabla- Operator, E: elektrische Feldstärke
 ϵ_p^* : relative Dielektrizitätskonstante der Zelle
 ϵ_m^* : relative Dielektrizitätskonstante des Mediums