

Einsatz magnetischer Extraktionsphasen zur Bioproduktaufarbeitung

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)
der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik der
Universität Fridericiana Karlsruhe (TH)

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Ing. Jörg Becker
geb. 22. März 1979 in Karlsruhe

Referent: PD Dr.-Ing. habil Matthias Franzreb

Koreferent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 2009

Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH

Karlsruhe 2009

„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,
das Erforschliche erforscht zu haben und
das Unerforschliche zu verehren.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)
dt. Schriftsteller

Erklärung

Hiermit versichere ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der genannten Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht und die Quellen angegeben.

Die dem Verfahren zu Grunde liegende Promotionsordnung der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik der Universität Karlsruhe (TH) vom 26. Februar 2007 ist mir bekannt.

Des weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht ist sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die Promotion wurde als Bestandteil des Projekts „STREP 013469: Magnetic Field Assisted Biomaterials Processing – NanoBioMag“ innerhalb des 6. Rahmenprogramms der Europäischen Kommission mit Fördermitteln der Europäischen Union durchgeführt.

Ich versichere, dass die vorliegende Version der Dissertation in Form und Inhalt mit der begutachteten Fassung übereinstimmt.

Darmstadt, den 16.02.2009, Jörg Becker

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2005 bis 2008 am Institut für Technische Chemie, Bereich Wasser- und Geotechnologie des Forschungszentrums Karlsruhe. An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei all jenen Personen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn PD Dr.-Ing. habil. Matthias Franzreb für die hervorragende Betreuung, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und vor allem für das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiräume bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Prof. Clemens Posten danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ebenso danke ich unserem im Dezember 2006 verstorbenen Institutsleiter Prof. Rolf Nüesch für die Annahme als Doktorand, sowie seinem Amtsnachfolger Prof. Wolfgang Höll.

Sehr wichtig für das Fortschreiten der Arbeit waren die anregenden Diskussionen innerhalb des NanoBioMag-Projekts, für die ich mich stellvertretend bei dem Projektleiter Dr. Thomas Friedmann bedanke. Großer Dank gilt hier speziell der Arbeitsgruppe um Prof. Owen Thomas, mit der ich eine schöne Zeit an der Universität Birmingham, UK, verbringen durfte.

Einen großen Anteil zum Gelingen der Arbeit erbrachten Christian Henrich und Stefan Raffelt mit ihren Diplomarbeiten sowie Sabrina Griebe und Michael Müller durch ihre Praktika, denen ich an dieser Stelle noch einmal herzlich danke. Für die kompetente Beratung und Hilfe bei spektroskopischen und lasertechnischen Fragestellungen danke ich Dr. Werner Faubel und Stefan Heissler.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die tolle Zeit. Den Kreis der Kollegen etwas erweiternd danke ich der Kaffee-Runde für die oftmals lustigsten (natürlich nie mehr als) 30 Minuten am Tag.

Meinen Eltern danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und liebevolle Unterstützung, welche durch die gesamte Studien- und Promotionszeit währte und weiter andauert.

Schließlich danke ich meiner Frau Nora:

Für deine Liebe, deine leider oft strapazierte Geduld und dein in mich gesetztes Vertrauen. Dein Beitrag zum Gelingen der Arbeit durch deine Fähigkeit mich zu motivieren, besonders wenn es auch mal nicht so gut lief, kann nicht als hoch genug eingeschätzt werden.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die, bisher erst durch wenige Literaturstellen beschriebene, kombinierte Anwendung von magnetischen Adsorbentien und wässrigen Zweiphasensystemen (ATPS) unter dem zusätzlichen Aspekt einer möglichst vollständigen Recyclierbarkeit der eingesetzten Phasen weiter entwickelt und die mathematischen Grundlagen zur Beschreibung des sorptiven und hydrodynamischen Verhaltens des Systems abgeleitet. Die verwendeten mizellaren ATPS unterscheiden sich gegenüber herkömmlichen ATPS u.a. durch folgende Eigenschaften: (i) sie bestehen aus relativ verdünnten, wässrigen Lösungen kostengünstiger Tenside; (ii) der Übergang zwischen dem ein- und dem zweiphasigen Zustand dieser Lösungen ist via Temperaturwechsel reversibel schaltbar und (iii) Proteine werden aus der mizellreichen Phase des ATPS weitgehend ausgeschlossen. Für das Zielprotein wird dieser allgemeine Ausschluss dadurch überwunden, dass es sich selektiv an magnetische Mikrosorbentien anlagert und durch diese in die mizellreiche Phase transferiert wird, in der es nach magnetfeldunterstützter Phasentrennung isoliert von den anderen Komponenten der Ausgangslösung vorliegt. Durch Zugabe eines Elutionsmittels löst sich das Zielprotein von den Sorbentien, tendiert in die neu gebildete wässrige Phase und kann in so gereinigter Form gewonnen werden. Durch das in der vorliegenden Arbeit entworfene Verfahrenskonzept (MEP – Magnetische Extraktionsphasen) können Proteinmischungen mittels einer geeigneten Abfolge von Temperatur- und Pufferwechseln sowie der Applikation magnetischer Felder in einer technisch vergleichsweise einfach realisierbaren Weise fraktioniert werden.

Die Untersuchungen zum neuen Verfahrenskonzept gliederten sich in experimentelle und theoretische Arbeiten zu dem temperaturabhängigen Gleichgewicht der Phasentrennung mizellarer ATPS, der Kinetik der Phasentrennung von ATPS mit und ohne die Applikation magnetischer Partikel und Felder, dem Verteilungsverhalten von Proteinen und Partikeln in ATPS, der Adsorption von Proteinen auf magnetische Sorbentien sowie der gekoppelten Adsorption und Extraktion. Abschließend mündeten alle untersuchten Aspekte in Experimente, welche im halbtechnischen Maßstab (200 mL) durchgeführt wurden.

Zur Beschreibung der Gleichgewichte von Phasentrennung und Adsorption wurden bekannte Theorien aus der Literatur erfolgreich auf das vorliegende System übertragen, und mit zum Teil neu entwickelten Methoden zur Gewinnung der experimentellen Daten verifiziert. Die abgeleiteten mathematischen Ausdrücke ermöglichen die näherungsweise Berechnung der Sedimentationskinetik magnetischer Extraktionsphasen unter Einfluss inhomogener externer Magnetfelder. Die Beschreibung von Sorptionsgleichgewichten nach Butler-Ockrent wurde auf die Kombination von Adsorption und Extraktion erweitert, wobei auf eine Übertragbarkeit der aus Einstoff-Systemen gewonnenen Daten auf Mehrstoff-Systeme geachtet wurde.

Im Vorfeld der Versuche zur Bioseparationen wurden kommerziell erhältliche magnetische Grundpartikel auf Polyvinylalkoholbasis ($d \approx 1\mu\text{m}$) in geeigneter Weise chemisch modifiziert, d.h. an ihrer Oberfläche mit Liganden versehen, welche eine spezifische Adsorption der gewählten Zielproteine ermöglichen. Auf diese Weise wurden magnetische Kationenaustauscher, Metall-Chelatbildner sowie Partikel mit ausgeprägten hydrophoben Wechselwirkungen erzeugt. Als biologische Modellsysteme dienten u.a. eine binäre Mischung der hydrophilen Proteine Lysozym und Albumin (=Ovalbumin) aus Hühnereiweiß sowie mit einem Histidinrest („Tag“) ausgestattetes, rekombinant hergestelltes 6xHIS-GFP aus *Escherichia Coli*. Bei Untersuchungen im Labormaßstab konnte so z.B. das Zielprotein Lysozym durch den kombinierten Einsatz magnetischer Mikro-Kationenaustauscher und des nichtionischen Tensids Triton® X-114 mit Ausbeuten um 97% und hoher Reinheit aus Lösungen gleichen Gehalts an Lysozym und Ovalbumin isoliert werden. Die experimentell erhaltenen Ergebnisse wurden dabei durch die oben erwähnten mathematischen Ausdrücke mit hoher Genauigkeit vorhergesagt. Die Übertragung der anhand des Modellsystems gewonnenen Erkenntnisse auf das korrespondierende komplexe System Hühnereiweiß blieben aufgrund einer, durch nicht näher identifizierte Bestandteile des Eiweißes verursachten, starken Agglomeration der Partikel jedoch ohne Erfolg.

In im halbtechnischen Maßstab durchgeführten Versuchen wurde ebenfalls das Modellsystem Lysozym/Ovalbumin eingesetzt. Hierbei konnte über drei Zyklen mit Adsorptions-, Phasenseparations- und Elutionsschritten ebenfalls eine erfolgreiche Protein-Fraktionierung erreicht werden. Die zuvor auf experimentellem und theoretischem Weg gefundenen Zusammenhänge waren hierbei sowohl bei der Wahl der Prozessparameter als auch der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse erfolgreich einsetzbar. Durch Bilanzierungsrechnungen konnten die erwarteten geringen Verluste an magnetischen Partikeln ($< 1\%$) und Tensid ($< 7\%$) pro Zyklus experimentell nachgewiesen werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen für ein neuartiges Verfahren erarbeitet, welches sowohl im absatzweisen als auch im kontinuierlichen Betrieb zur primären Bioproduktaufarbeitung eingesetzt werden kann. Durch die nahezu 100%-ige Recyclierbarkeit der phasenbildenden Tenside sowie die magnetfeldinduzierte rasche Phasentrennung sind wichtige Voraussetzungen für einen wirtschaftlichen Betrieb eines derartigen Verfahrens erfüllt. Zu den noch verbliebenen kritischen Aspekten, wie z. B. das Verteilungsverhalten der magnetischen Sorbentien, konnten anhand theoretischer Überlegungen Ansätze für eine zukünftige Optimierung aufgezeigt werden. Schwerpunkte nachfolgender Arbeiten sollten daher die Entwicklung einer in Bezug auf das Verteilungsverhalten robusten Kombination von Magnetpartikel und ATPS sowie die Realisierung einer kontinuierlichen Proteinisolierung aus einem realen Ausgangsmedium sein.

Abstract

The work presented here concentrated on the further development of the still hardly described combined application of magnetic adsorbents and aqueous two-phase systems to reach a maximum recyclability of the phases used and on deriving mathematical fundamentals to describe the sorptive and hydrodynamic behaviour of the system. Contrary to conventional ATPS, the micellar ATPS used are characterized by the following properties: (i) They consist of relatively diluted, aqueous solutions of low-cost surfactants, (ii) transition between the single-phase and two-phase state of these solutions may be reversed by thermal cycling, and (iii) proteins are largely excluded from the micelle-rich phase of the ATPS. This general exclusion is overcome by the target protein binding selectively to magnetic microsorbents. With them, the protein enters the micelle-rich phase. By magnetic field-supported phase separation, the target protein is isolated from the components of the initial solution. When adding an eluting agent, the target protein separates from the adsorbents, enters the new build aqueous phase, and thus exists in cleaned form. By means of the concept designed (MEP – magnetic extraction phases), protein mixtures can be fractionated relatively easily under an appropriate sequence of temperature and buffer cycles and magnetic fields.

Experimental and theoretical studies of the new concept focused on the temperature-dependent equilibrium of phase separation of micellar ATPS, the kinetics of phase separation of ATPS with and without the application of magnetic particles and fields, the distribution behaviour of proteins and particles in ATPS, the adsorption of proteins on magnetic adsorbents, and coupled adsorption and extraction. Finally, experiments on the semi-technical scale (200 mL) were carried out on the basis of these findings.

To describe the equilibria of phase separation and adsorption, theories known from literature were transferred successfully to the system applied and verified using partly newly developed methods to obtain experimental data. The mathematical expressions derived allow for the approximate calculation of sedimentation kinetics of magnetic extraction phases under the influence of inhomogeneous external magnetic fields. Description of sorption equilibria according to Butler-Ockrent was extended to cover the combination of adsorption and extraction, with particular attention being paid to the transferability of the data obtained for single-substance systems to multi-substance systems.

Prior to bioseparation experiments, commercially available magnetic particles on the basis of polyvinylalcohol ($d \approx 1 \mu\text{m}$) were modified chemically. This means that they were provided with ligands on their surface, which allow for a specific adsorption of the target proteins selected. In this way, magnetic cation exchangers, metal chelators and particles with pronounced hydrophobic interactions were generated. The biological model systems used were a binary mixture of the hydrophilic proteins lysozyme and albumin (= ovalbumin) from

hen egg white as well as recombinant 6xHIS-GF produced from *Escherichia Coli* and tagged with a residual amount of histidine. In experiments on the laboratory scale, the target protein of lysozyme was isolated from solutions with the same contents of lysozyme and ovalbumin by the combined use of magnetic micro cation exchangers and the non-ionic surfactant Triton® X-114. Yields around 97% and a high purity were reached. These experimental results had been predicted with high accuracy using the above mathematical expressions. Transfer of the findings obtained from the model system to the corresponding complex system of hen egg white, however, did not meet with success due to a strong particle agglomeration caused by unidentified protein constituents.

The model system of lysozyme/ovalbumin was also used in experiments on the semi-technical scale. Protein fractionation was achieved over three cycles, including adsorption, phase separation, and elution steps. The relationships obtained before by experiments and theoretical studies were applied successfully for the selection of process parameters and interpretation of the results. With the help of balancing calculations, the small losses of magnetic particles (< 1%) and surfactant (< 7%) expected per cycle were verified experimentally.

Based on the findings obtained, a novel process was developed for both batch-wise and continuous primary bioproduct processing. Major prerequisites for an economically efficient operation of this process were fulfilled, namely, nearly 100% recyclability of phase-forming surfactants and magnetic field-induced rapid phase separation. Approaches to optimizing the remaining critical aspects, such as the distribution behaviour of magnetic adsorbents, were conceived theoretically. Future work should therefore focus on the development of a robust combination of magnetic particles and ATPS in terms of the distribution behaviour and continuous protein isolation from a real feedstock.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Grundlagen.....	3
2.1	Aufarbeitung von Bioprodukten.....	3
2.1.1	Problemstellung	3
2.1.2	Bioproduktaufarbeitung in der Praxis.....	5
2.1.3	Moderne Verfahrensansätze.....	8
2.1.4	Affinitätstechniken im Zusammenhang mit Proteinseparationsprozessen	9
2.2	Aqueous Two-Phase Systems (ATPS).....	9
2.2.1	Arten und Anwendungen von ATPS	10
2.2.2	Sonderfall: Mizellare ATPS.....	11
2.2.3	Verfahrenstechnische Einsetzbarkeit von ATPS	13
2.2.4	Affinitätstechniken in Verbindung mit ATPS	16
2.3	Magnetische Mikrosorbentien.....	17
2.3.1	Magnetische Kenngrößen und Materialeigenschaften.....	18
2.3.2	Magnetfelder und Kräfte.....	23
2.3.3	Einsatzfelder magnetischer Partikel in der Biotechnologie	25
2.3.4	High Gradient Magnetic Fishing (HGMF)	25
2.4	Magnetische Extraktionsphasen (MEP).....	28
2.4.1	Stand des Wissens.....	28
2.4.2	Vorstellung des neuen MEP-Konzepts	34
3	Theoretischer Teil	37
3.1	Verteilungsverhalten von Feststoffen in Flüssig-flüssig-Dispersionen	37
3.2	Phasentrennung von ATPS und MEP	41
3.2.1	Gleichgewicht der Phasentrennung.....	41
3.2.1.1	Das Phasendiagramm.....	41
3.2.1.2	Klassische ATPS	45
3.2.1.3	Mizellare ATPS	46
3.2.2	Kinetik der Phasentrennung von Flüssig-flüssig Dispersionen	48
3.2.2.1	Dimensionsanalytische Betrachtung.....	49
3.2.2.2	Sedimentation im laminaren und turbulenten Bereich	52
3.2.2.3	Interne Zirkulation	54
3.2.2.4	Schwarmverhalten	55
3.2.2.5	Koaleszenz	56
3.2.2.6	Komplette Berechnungsansätze aus der Literatur	56
3.2.3	Kinetik der Phasentrennung im Magnetfeld	59
3.2.3.1	Ableitung der Bewegungsgleichung für MEP-Tropfen.....	59
3.2.3.2	Einflussnahme auf die Phasenseparationszeit	62
3.3	Gleichgewicht der Proteinextraktion.....	67
3.3.1	Definitionen	67
3.3.2	Der Partitioning-Koeffizient K	68
3.3.3	Elektrostatische Einflüsse: Das Donnan-Potential.....	70
3.3.4	Excluded Volume Theorie (für mizellare ATPS)	71
3.4	Gleichgewicht der Proteinadsorption	72
3.4.1	Einstoffsystem: Langmuir Theorie	72
3.4.2	Zweistoffsystem: Theorie nach Butler und Ockrent.....	73

3.5	MEP: Kopplung von Adsorption und Extraktion	74
3.5.1	Gleichungen für Einstoffsysteme	74
3.5.2	Gleichungen für Zweistoffsysteme	75
3.5.3	Beispielrechnungen	79
4	Experimenteller Teil.....	85
4.1	Eingesetzte mizellare ATPS	85
4.1.1	Aethoxal® B.....	85
4.1.2	Triton® X-114.....	85
4.1.3	Weitere mizellare ATPS.....	85
4.2	Eingesetzte Protein-Biosysteme	86
4.2.1	Hühnereiweiß: Lysozym und Ovalbumin	86
4.2.2	<i>Escherichia Coli</i> : 6x HIS-tagged GFP	87
4.2.3	Soja Bohnen: Isoliertes Soja Protein	87
4.3	Eingesetzte magnetische Mikrosorbentien	88
4.3.1	Grundpartikel und Waschmethoden	88
4.3.2	Hydrophobierung.....	88
4.3.3	Kationenaustauscher.....	89
4.3.4	Metall-Chelatbildner	90
4.3.5	Hybridfunktionalisierungen.....	91
4.3.6	Weitere Funktionalisierungsversuche	92
4.4	Eingesetzte Puffer	93
4.5	Verteilungsverhalten der Mikrosorbentien in mizellaren ATPS	93
4.5.1	Versuchsaufbau	93
4.5.2	Suche nach geeigneten MEP-Kombinationen	96
4.6	Versuche zur Phasentrennung von ATPS und MEP.....	98
4.6.1	Gleichgewicht.....	98
4.6.2	Kinetik.....	101
4.6.2.1	Einzeltropfen	101
4.6.2.2	Tropfenschwärme.....	104
4.7	Gleichgewicht der Proteinextraktion	104
4.7.1	Versuchsdurchführung	104
4.7.2	Auswertemethoden incl. Fehlerbetrachtung.....	105
4.8	Gleichgewicht der Proteinadsorption.....	108
4.8.1	Adsorptions-Gleichgewicht.....	108
4.8.2	Desorptions-Gleichgewicht	111
4.9	MEP: Untersuchungen zur Kopplung von Adsorption und Extraktion.....	111
4.10	MEP: Verfahrenstechnische Untersuchungen im halbtechnischen Maßstab	113
5	Ergebnisse und Diskussion	116
5.1	Verteilungsverhalten der Mikrosorbentien in mizellaren ATPS	116
5.2	Phasentrennung von ATPS und MEP	121
5.2.1	Gleichgewicht.....	121
5.2.2	Kinetik.....	125
5.2.2.1	Einzeltropfen	125
5.2.2.2	Tropfenschwärme.....	128
5.3	Gleichgewicht der Proteinextraktion	133
5.3.1	Einzelstoffe.....	133
5.3.2	Komplexe Mischungen.....	137
5.4	Gleichgewicht der Proteinadsorption.....	138

5.4.1 Einzelstoff-Adsorption und Elution.....	138
5.4.1.1 Adsorptionsisothermen	138
5.4.1.2 Elutionsversuche.....	142
5.4.1.3 Temperatureinfluss auf die Lage des Adsorptionsgleichgewichts ...	143
5.5 MEP: Bioseparation unter Einsatz magnetischer Extraktionsphasen	144
5.5.1 Arbeiten im Labormaßstab	144
5.5.1.1 Separation der Modellproteine Lysozym und Ovalbumin.....	144
5.5.1.2 Elutionsversuche.....	147
5.5.1.3 Versuche mit realen Biosystemen	148
5.5.2 Halbtechnischer Maßstab.....	149
5.5.2.1 Ergebnisse der Bioseparationsexperimente	149
5.5.2.2 Bestimmung von Tensid- und Partikelverlusten.....	153
6 Fazit und Ausblick	155
7 Literaturverzeichnis	158
8 Formelzeichen und Symbole	172
9 Anhang.....	178
9.1 Verwendete Magnetfeldquellen	178
9.1.1 Elektromagnetspulen.....	178
9.1.2 Permanentmagnete	178
9.2 Proteinanalytik incl. Probenvorbereitung.....	179
9.2.1 Umgang mit Störeinflüssen der verwendeten nichtionischen Tenside.....	179
9.2.2 Gelelektrophorese	180
9.2.3 Photometrische Methoden	181
9.3 Stoffdatenbestimmung der flüssigen Phasen.....	182
9.3.1 Dichte	182
9.3.2 Viskosität	182
9.4 Charakterisierung der magnetischen Mikrosorbentien.....	183
9.4.1 Konzentrationsmessung	183
9.4.2 Magnetisierungskurve.....	183
9.5 MathCad Quellcode zur Anpassung der theoretischen Binodalkurve	184
9.6 Aus der Arbeit bislang hervorgegangene Publikationen und Patente	189
9.7 Lebenslauf	190

1 Einleitung und Zielsetzung

Bei einer Vielzahl der heutzutage kommerziell hergestellten Produkte im pharmazeutischen oder diagnostischen Bereich handelt es sich um biologische Makromoleküle (Proteine, Enzyme, Antikörper), deren erfolgreicher Einsatz meist den Erhalt ihrer komplexen, dreidimensionalen Struktur voraussetzt. Die sich an die eigentliche Erzeugung anschließende Aufreinigung („Downstream Processing“) der Produkte unterliegt in der Regel erheblichen Einschränkungen, da herkömmliche Trennoperationen wie beispielsweise Rektifikation oder Lösungsmittlextraktion aufgrund von hohen Temperaturen oder dem unpolaren Charakter von Lösungsmitteln zu irreversiblen Schädigungen der makromolekularen Struktur führen können. Den aus diesem Sachverhalt erwachsenden Restriktionen stehen oft hohe Anforderungen an die Reinheit der Produkte gegenüber, was die, durch diese Umstände meist mehrschrittigen, Aufreinigungsprozesse oftmals zu den größten Kostenfaktoren (>80%) im gesamten Herstellprozess werden lässt.

Um hohe Reinheiten zu erhalten, werden bei der Feinreinigung derartiger Produkte meist mehrstufige chromatographische Operationen durchgeführt. Diese zeichnen sich in der Regel durch ein, selbst bei der Trennung chemisch sehr ähnlicher Moleküle, hohes Auflösungsvermögen aus. Aufgrund der Verblockungsneigung der für die Chromatographie benötigten Säulenpackungen im Falle feststoffhaltiger Zuläufe sind hierfür jedoch aufwendige Vorreinigungsschritte durch Zentrifugation, Filtration oder Fällung erforderlich. Eine daraus resultierende lange Verfahrenskette bedeutet einen hohen Investitionsaufwand, hohe Betriebskosten und geht zudem meist mit einem beträchtlichen Ausbeuteverlust an Wertprodukt einher.

Zur Lösung der oben genannten Probleme werden bereits seit einiger Zeit so genannte „Whole-Broth“-Prozesse diskutiert, mit denen sich die Wertstoffe direkt aus komplexen, feststoffhaltigen Zuläufen gewinnen lassen. Selbst wenn der Produktstrom aus einem Whole-Broth-Prozess nachträglich chromatographisch aufgearbeitet werden muss, kann die Einsparung von vorher benötigten Prozessschritten zu einem insgesamt wirtschaftlicheren und nachhaltiger arbeitenden Verfahren mit höherer Produktausbeute führen.

Bereits seit den 1950er Jahren werden wässrige Zweiphasensysteme (ATPS) in diesem Zusammenhang untersucht. Hierbei handelt es sich um wässrige Polymer bzw. Polymer/Salz-Lösungen, welche Mischungslücken aufweisen und dadurch je nach Zusammensetzung zwei makroskopisch getrennte, hauptsächlich aus Wasser bestehende, Phasen bilden. Aufgrund des polaren Charakters der wässrigen Phasen können ATPS zur nichtdenaturierenden Extraktion von Biomolekülen eingesetzt werden. Weit über 1000 Publikationen auf diesem Gebiet belegen das Interesse an ATPS, jedoch sind bislang nur sehr wenige industriell einsetzbare

Applikationen bekannt. Der Einsatz magnetischer Mikro- oder Nanosorbentien in Kombination mit Hochgradienten-Magnetseparatoren bietet ebenfalls das Potential für neue Whole-Broth-Verfahren. Magnetische Mikropartikel sind im Zusammenhang mit Bioseparationsprozessen schon seit einiger Zeit Stand der Technik für Trennaufgaben im analytischen Bereich. Das Scale-Up in den präparativen Maßstab wird seit Mitte der 1990er Jahre untersucht, bislang konnte jedoch noch keine Marktreife erreicht werden.

Ein interessanter Ansatz, dem in der Literatur bislang nur wenig Aufmerksamkeit zugebracht wurde, ist der kombinierte Einsatz von ATPS und magnetischen Partikeln. Eine Forschergruppe der Universität Lund, Schweden, berichtete in den Jahren 1987 – 1990 über, durch diesen Ansatz erzielte, drastische Verkürzungen bei der für die Phasenseparation benötigten Zeit. Eine weitere Gruppe der Universität Nagoya, Japan hat 1995 einen Artikel publiziert, in dem magnetische Sorbentien in ATPS zu merklichen Ausbeutesteigerungen bezüglich des Zielmoleküls geführt haben.

Vorrangiges Ziel der Arbeit war es, aufbauend auf diesen Ideen, ein Verfahren zu konzipieren, welches das Potential besitzt für die großtechnische, primäre Bioprodukt-aufarbeitung einsetzbar zu sein. Ansprüche an das neue Verfahren waren neben der Anwendbarkeit auf feststoffhaltige Suspensionen eine nachhaltige Betriebsweise ohne übermäßigen Verbrauch an Einsatzmitteln, gute Raum-Zeit-Ausbeuten sowie ein im Idealfall kontinuierlicher Betrieb.

Zu Beginn der Arbeit war eine umfangreiche Literaturstudie auf dem Gebiet der ATPS vorgesehen, die der Arbeitsgruppe „Magnetische Verfahren“ den Einstieg in das für sie neue Gebiet der ATPS erleichtern und zur Berücksichtigung möglichst vieler unterschiedlicher Aspekte bei der Verfahrenskonzeption führen sollte. Nach der Konzipierungsphase sollten Machbarkeitsstudien anhand von biologischen Modellsystemen sowohl im Labor- (1 mL) als auch im halbtechnischen Maßstab (bis 200 mL) erfolgen. Als magnetische Sorbentien waren hierfür kommerziell erhältliche magnetische Mikropartikel ($d \sim 1 \mu\text{m}$) auf Polyvinyl-Alkohol-Basis vorgesehen, welche vor ihrem Einsatz mit, für die angedachte Trennoperation geeigneten, Liganden zu funktionalisieren waren.

Zudem bestand der Wunsch, die Effekte magnetischer Felder auf die Kinetik der Phasentrennung der „Magnetischen Extraktionsphasen“ näher zu untersuchen. Sowohl zu den rein physikalischen, kinetischen Untersuchungen als auch zu den Versuchen zur Bioseparation, waren begleitende theoretische Arbeiten vorgesehen. Einerseits sollte das für die Experimente notwendige Scale-Up vom Labor auf den halbtechnischen Maßstab, andererseits eine mögliche Maßstabsübertragung in einen großtechnischen Prozess auf ein sicheres Fundament gestellt werden.

2 Grundlagen

2.1 Aufarbeitung von Bioprodukten

2.1.1 Problemstellung

Bei vielen der heutzutage biotechnologisch produzierten Produkte handelt es sich um makromolekulare Substanzen (z.B. Proteine, Enzyme, DNA etc.), welche nach Synthese und Aufarbeitung nur bei Erhalt ihrer dreidimensionalen Struktur einsetzbar sind. Diese oftmals gegebene Fragilität der Produkte macht den Einsatz konventioneller Aufbereitungsverfahren aus der chemischen Technologie, wie Rektifikation oder Extraktion in organischen Lösungsmitteln, nahezu unmöglich [Onken 1989]. Da die nach der Synthese aufzuarbeitenden Fermentationsbrühen bzw. Zellhomogenisate oftmals hochkomplexe Mischungen aus nieder- und makromolekularen Substanzen sowie Feststoffen sind, stellt die Einschränkung in der Verfahrensauswahl ein großes Problem dar, welches in der Vergangenheit meist durch die Aneinanderreihung vieler unterschiedlicher Einzeloperationen gelöst wurde. Die so entstehenden Prozessketten lassen sich sinnigerweise in vier Teilbereiche gliedern (nach [Shaeiwitz 1988]):

1. Fest-flüssig Trennung (Removal of Solids) – Bsp.: Zentrifugation, Mikrofiltration
2. Aufkonzentrierung (Isolation) – Bsp.: Fällung, Ultrafiltration
3. Feinreinigung (Purification) – Bsp.: Chromatographische Verfahren
4. Veredelung (Polishing) – Bsp.: Kristallisation, Trocknung

Da jeder dieser Teilbereiche nur sehr selten durch eine einzige Operation abgedeckt werden kann ist die tatsächliche Anzahl an Schritten oft viel größer als vier. Ein grundsätzliches Problem bei der Steigerung der Anzahl an Verfahrensschritten ist die damit einhergehende Minderung der Produktausbeute. Auch bei einer hohen Ausbeute von 95% pro Schritt beträgt die Gesamtausbeute nach 10 Schritten nur noch 60%. Bei niedrigen Ausbeuten wie z.B. 75% pro Schritt verbleiben nach 10 Schritten gerade noch 5% des anfangs vorhandenen Produkts (siehe auch Abbildung 2-1).

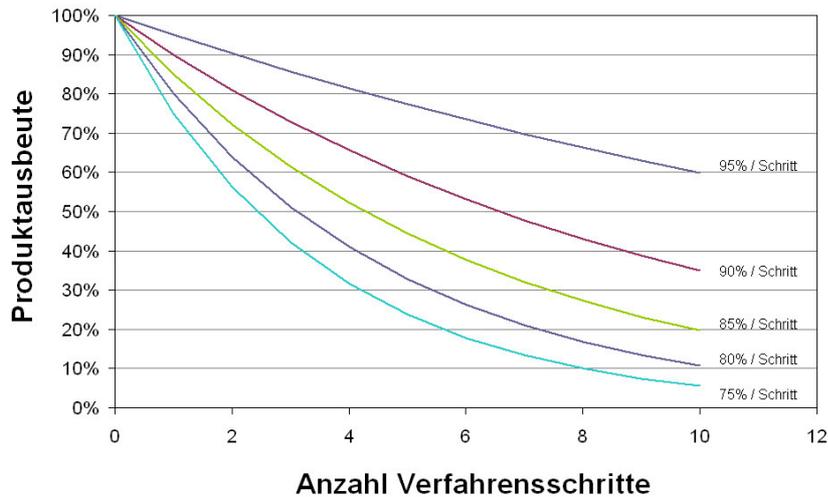


Abbildung 2-1: Produktausbeute aufgetragen gegen die Anzahl der eingesetzten Verfahrensschritte für unterschiedliche Einzelschrittausbeuten (nach [Amersham-Biosciences 2003])

Ein weiteres Problem sind die oftmals sehr hohen Kosten der einzelnen Verfahrensschritte. Aufgrund hoher Viskositäten und geringer Partikelgrößen innerhalb des Mediums ist der Einsatz von Zentrifugen energieintensiv und Filtrations-Medien neigen zum Fouling. Werden jedoch die partikulären Bestandteile nicht in ausreichendem Masse entfernt, neigen wiederum die zur Feinreinigung eingesetzten Chromatographiekolonnen zum Verblocken, was die Standzeiten erheblich verkürzt. Diese bekannten Probleme wurden über viele Jahre nicht gelöst, was der bekannte Forscher Johan Wesselingh (Universität Groningen, NL) mit der Aussage kommentierte: „Die Aufarbeitung verursacht 50% der Kosten, bekommt aber nur 5 % der Aufmerksamkeit“ (übersetzt nach [Chaudhuri 1995]). Diese Formulierung trifft das Grundproblem, auch wenn der tatsächliche Kostenanteil des DSP („Down Stream Processing“) am Gesamtprozess die Marke von 50% oft weit übersteigt und im Falle therapeutischer Proteine eher mit 90% zu beziffern ist. Wie hoch die Kosten bezogen auf die abgesetzte Produktmenge, gerade für therapeutische Proteine wie beispielsweise Human-Faktor VIII, tatsächlich steigen kann, zeigt die in Abbildung 2-2 gewählte, doppelt logarithmisch aufgetragene Zusammenstellung verschiedener am Markt befindlicher Bioprodukte (aus [Spalding 1991]).

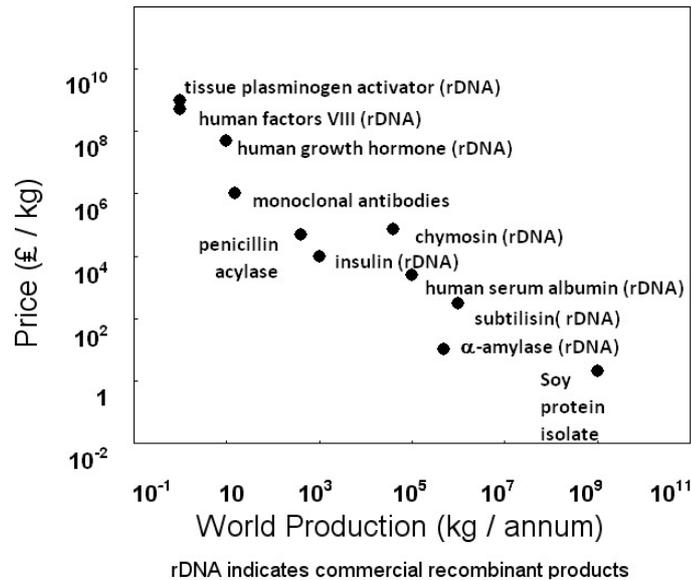


Abbildung 2-2: Preise für industrielle und pharmazeutische Proteine (doppelt logarithmische Auftragung), Preise in britischen Pfund (nachgezeichnet aus [Spalding 1991])

Obwohl die dargestellten Probleme bereits viele Aktivitäten ausgelöst haben und eine große Anzahl an Verfahrensalternativen entwickelt wurde, ist das DSP noch immer der Flaschenhals bei der Umsetzung großtechnischer Proteinsynthesen [Siklosi 2005]. Während in den letzten Jahrzehnten oftmals die Frage nach neuen „Breakthrough“-Verfahren gestellt wurde, die viele der klassischen Aufarbeitungsschritte vereinen und die teure Chromatographie ersetzen sollen (z.B. [Janson 1984], [Scopes 1996]), ist man heute meist etwas realistischer und verweist darauf, dass selbst die Einsparung einzelner Chromatographieschritte einen erheblichen Mehrwert bedeutet und großtechnische Verfahren, durch die Vermeidung gewaltiger Abwasserströme, nachhaltiger werden ließe ([Przybycien 2004]). Verbesserungen bei den Syntheseschritten und die damit steigenden Ausgangskonzentrationen des Wertstoffs / Produkts lassen gerade in jüngster Zeit den Ruf nach eben solchen Breakthrough-Verfahren wieder laut werden. In Hochzelldichte-Fermentationen werden heutzutage Produktkonzentrationen von bis zu 10 g/L erreicht, was das DSP vor völlig neue Herausforderungen stellt [de Palma 2007]. Die sich stets verändernden Anforderungen, der hohe Kostendruck und der Ruf nach nachhaltigen Prozessführungen machen die Entwicklung neuer Verfahren für die industrielle Bioproduktaufarbeitung bis heute und weit darüber hinaus interessant.

2.1.2 Bioproduktaufarbeitung in der Praxis

Die in der industriellen Praxis angewendeten Verfahrensketten zur Aufarbeitung von Bioprodukten hängen einerseits vom Produkt selbst (z.B. physikochemische Eigenschaften oder Stabilität), der Art des Zulaufs (Produktion mit Zellkulturen, in transgenen Tieren oder Pflanzen [Nikolov 2004]) sowie den Marktanforderungen (Reinheit, Formulierung etc.) ab.

Schon in puncto Reinheitsanforderungen sind die Unterschiede sehr groß: während für viele industriell eingesetzte Enzyme die Funktionalität im Vordergrund steht und beispielsweise 20% Verunreinigungen keinen Anlass geben es weiter aufzureinigen ([Scopes 1996]), so sollte die Reinheit bei *in vitro* Diagnostika schon höhere Grade erreichen (z.B. 95%) während manche therapeutische Proteine nur Verunreinigungen im ppm-Bereich enthalten dürfen (z.B. 99,9998% [Wheelwright 1989]). Demgegenüber stehen Diskussionen zur Aufarbeitung niedermolekularer Substanzen als Bulk-Chemikalien (z.B. Bio-Ethanol)- für die teure chromatographische Verfahren oft ausscheiden und alternative Vorgehensweisen diskutiert werden [Keller 2001], die sich teilweise eher an konventionellen Trennverfahren aus der chemischen Technologie orientieren. Im Folgenden wird jedoch nur auf die Aufarbeitung fragiler, makromolekularer Substanzen wie z.B. Proteinen eingegangen. Eine Übersicht über großtechnisch angewandte Unit-Operations bei der Aufarbeitung von Proteinen mit den korrespondierenden physikochemischen Eigenschaften geben Leser *et al* [Leser 1992].

Tabelle 2-1: Trenn- und Reinigungsschritte für die großtechnische Aufarbeitung von Proteinen mit den korrespondierenden physikochemischen Eigenschaften (nach [Leser 1992])

Unit-Operation	Physikochemische Eigenschaft
Zentrifugation	Sinkgeschwindigkeit
Filtration	Partikelgröße
Mikrofiltration	Partikelgröße
Homogenisierung	Intrazelluläre Eigenschaften (Druckgradient)
Mahlen in Kugelmühle	Intrazelluläre Eigenschaften (Scherwirkung)
Ultrafiltration	Molekülgröße
Zweiphasen Extraktion	Verteilungskoeffizient
Fällung	Löslichkeit (Hydrophobe Wechselwirkung)
Adsorption	Van-der-Waals Kräfte, Wasserstoffbrücken, Polarität, Dipol-Momente
Ionenaustausch	Ladung (Titrationskurve)
Hydrophobe Wechselwirkung	Oberflächen Hydrophobizität
Affinitäts-Chromatographie	Biologische Affinität
Gelfiltration	Molekülgröße
Umkehrphasen-Flüssigchromatographie	Hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen

Die in Tabelle 2-1 dargestellten Unit-Operations stellen das Rüstzeug dar, auf das ein Verfahreningenieur bei der Entwicklung eines neuen Prozesses zurückgreifen wird, wobei sich die Schritte nicht beliebig anordnen lassen. Die Chromatographie-Schritte kommen meist

erst am Ende der Prozesskette, nachdem feste Bestandteile entfernt wurden um Verblockung oder Fouling der Kolonnen zu vermeiden. Zu diesem Zeitpunkt liegt das Produkt zudem aufkonzentriert in einem geringen Volumen vor, wodurch die benötigte Baugröße der chromatographischen Anlagen möglichst gering gehalten wird. Einen guten Überblick über die zur Verfügung stehenden Verfahren und die Einsetzbarkeit bieten [Kalyanpur 2002] und [Amersham-Biosciences 2003]. Ein Beispiel für die großtechnische Aufarbeitung eines monoklonalen Antikörpers findet sich bei [Storhas 2003], siehe auch Abbildung 2-3.

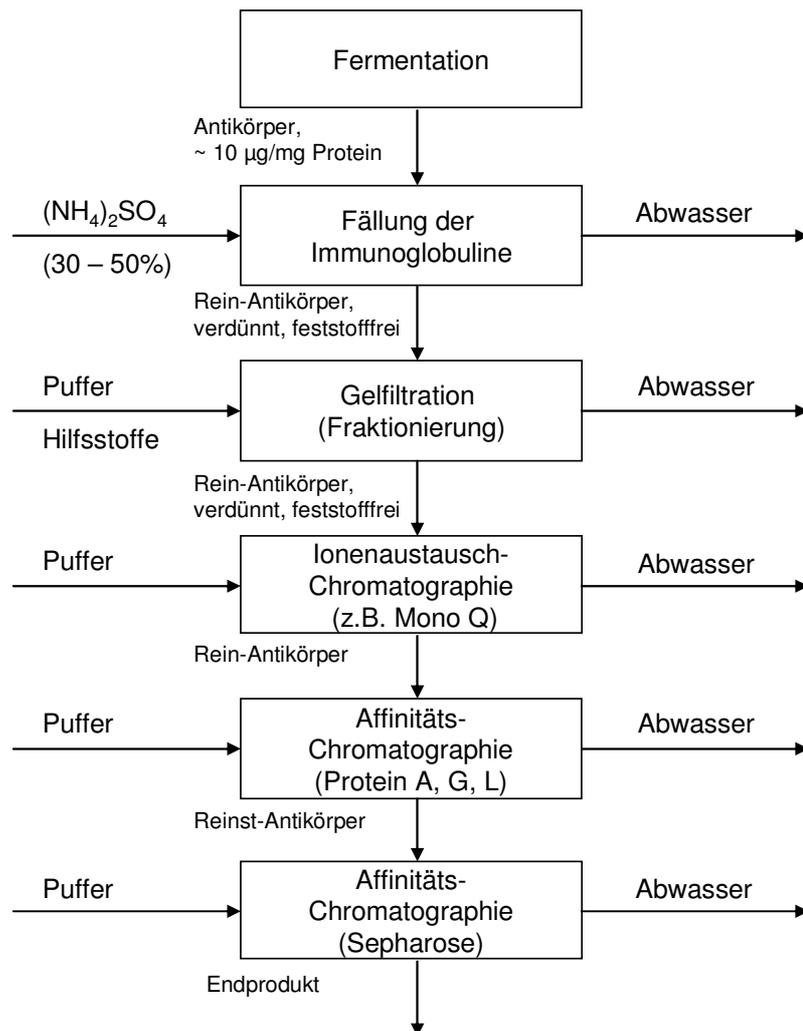


Abbildung 2-3: Exemplarisches Schema für die industrielle Gewinnung eines monoklonalen Antikörpers (nach [Storhas 2003])

Betrachtet man die lange Folge einzelner Schritte und die anfallenden Abwasserströme in Abbildung 2-3, so drängt sich die Frage auf, wie solche Prozesse grundsätzlich kürzer und damit wirtschaftlicher und nachhaltiger gestaltet werden können. Bereits 1984 vermutete Janson [Janson 1984] drei kommende Trends, die bis heute fast nichts an Aktualität eingebüßt haben:

1. Direkte Behandlung feststoffhaltiger, komplexer Zuläufe. Interessanterweise wählte Janson als Beispiel den Einsatz magnetischer Mikrosorbentien
2. Erhöhung der Affinität der Prozesse (z.B. durch den Einsatz monoklonaler Antikörper als Liganden)
3. Die Weiterentwicklung von Chromatographie-Medien (um beispielsweise eine präparative HPLC früher im Prozess einsetzen zu können)

Alle Punkte sind bis heute Herausforderungen geblieben; auf Punkt 1 wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

2.1.3 Moderne Verfahrensansätze

In die Kategorie der hier diskutierten modernen Verfahrensansätze zur direkten Bioprodukt-aufarbeitung zählen solche, die in der Lage sind in einem Schritt komplexe, feststoffhaltige Zuläufe zu behandeln und das Zielmolekül zumindest zu einem gewissen Grad aufzureinigen und zu konzentrieren. Zu nennen sind die in den folgenden Kapiteln ausführlich diskutierten wässrigen Zweiphasensysteme („Aqueous Two-Phase Systems“ – ATPS, [Albertsson 1986]) sowie der Einsatz magnetischer Mikrosorbentien im Zusammenspiel mit Hochgradienten Magnetseparatoren im HGMP-Prozess („High Gradient Magnetic Fishing“, [Hubbuch 2001]). Ein weiterer Ansatz ist die Anwendung von Chromatographie-Medien im Schwebebett-Modus („Expanded Bed Adsorption“ – EBA).¹ Ein weiteres extraktives Verfahren neben ATPS ist die „Reversed Micellar Extraction“ [Abbott 1988], bei der wasserlösliche Proteine in Mizellen eingeschlossen und in organische Lösungsmittel extrahiert werden.

Zusätzlich zu den genannten extraktiven und adsorptiven Ansätzen gibt es eine Vielzahl an Verfahren, die auf andere physikochemische Wechselwirkungen setzen, wie z.B. die selektive Fällung [Hilbrig 2003] oder selektive Filtrationsprozesse [Wan 2006]. Alle aktuell in der Diskussion befindlichen Verfahren zu besprechen würde hier den Rahmen sprengen, empfehlenswerte Übersichtsartikel zu diesem Thema bieten [Raghavarao 2002] und [Przybycien 2004].

¹ Ein Artikel, der zeigt, dass die modernen Verfahren nicht nur mit den herkömmlichen sondern auch untereinander konkurrieren, ist der von Hubbuch *et al* gegebene Vergleich von HGMP und EBA [Hubbuch 2001].

2.1.4 Affinitätstechniken im Zusammenhang mit Proteinseparationsprozessen

Für die Ausnutzung biospezifischer Wechselwirkungen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip [Gupta 2002a], [Chase 2000] werden hier grundsätzlich drei Strategien unterschieden:

1. Anpassung des z.B. Sorbens oder der Extraktionsphase für das Zielmolekül, beispielsweise durch Funktionalisierung des eingesetzten Chromatographie-Mediums mit Liganden, die das Zielmolekül spezifisch binden. Beispiele für solche Liganden sind Antikörper, Ko-Faktoren im Falle spezieller Enzyme oder die Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin. Ebenfalls in diese Kategorie fällt das „Molecular Imprinting“ bei dem das als Template dienende Zielprotein im Chromatographie-Medium seinen „Abdruck“ hinterlässt, um anschließend während des Aufreinigungsprozesses wieder erkannt und gebunden zu werden [Labrou 2003].
2. Die (mikrobiologisch erreichte) Erweiterung des Zielproteins um einen Fortsatz (engl. „Tag“), welcher dem Protein neue Eigenschaften verleiht. Erreichen die Tags selbst die Größe von Proteinen spricht man auch von „Fusions“-Proteinen [Terpe 2003].
3. Die Kombination beider obiger Ansätze, wodurch das größtmögliche Maß an Flexibilität erreicht wird. Ein Beispiel hierfür ist die Kombination von IMALT („Immobilized Metal-Ion Affinity Ligand Technology“) und einem 6xHIS-Tag (sechs Histidin-Reste), wie sie von Ebner verwendet wurde um GFP direkt aus einer homogenisierten Fermentationsbrühe von *E.Coli* mittels HGMF aufzuarbeiten [Ebner 2006].

Entfernt man sich von der Strategie das Protein zu verändern und berücksichtigt die Tatsache, dass hochspezifische (jedoch nichtkovalente) Bindungen wie im Fall Streptavidin/Biotin sehr schwer zu trennen sind (Probleme bei der Elution), so bietet sich die Möglichkeit der Verwendung „gruppenspezifischer“ Liganden, wie z.B. Farbstoff-Liganden für Ko-Faktor abhängige Enzyme [Denizli 2001], Metall-Chelatbildner (IMALT) oder Protein A für monoklonale Antikörper an. Zukünftig eingesetzte Liganden werden voraussichtlich immer häufiger über den Einsatz leistungsstarker Computer und der damit möglichen molekularen Simulation dreidimensionaler Strukturen und Interaktionen entwickelt. Bereits heute diskutierte Beispiele sind „biomimetische“ (d.h. die Natur nachahmende) Liganden [Clonis 2000] oder Peptid-Liganden aus sog. Random-Peptide Libraries [Mondal 2006].

2.2 Aqueous Two-Phase Systems (ATPS)

Die erste bekannte Erwähnung über die Bildung zweier makroskopischer Phasen beim Versuch zwei hydrophile Makromoleküle (in diesem Fall Agarose und Stärke) gemeinsam in Wasser zu lösen stammt aus dem Jahre 1896 [Beijerinck 1896]. Seit der schwedische Forscher Albertsson 1956 erstmals über die Anwendung solcher wässriger Zwei-

phasensysteme zur extraktiven Trennung fragiler, biologischer Stoffe berichtet und damit einen Ersatz für die ungeeigneten (da auf Proteine denaturierend wirkenden) organischen Lösemittel eingeführt hatte [Albertsson 1956], entstand eine unüberschaubare Vielfalt potenzieller Anwendungen von ATPS, die an dieser Stelle nur verkürzt wiedergegeben werden kann. Empfehlenswerte Übersichtsartikel zum Einstieg in das Feld der ATPS bieten [Raghavarao 1995], [Kula 1999], [Estela da Silva 2000a] und [Hatti-Kaul 2001]. Ausführliche Darstellungen in Buchform bieten [Walter 1985], [Albertsson 1986], [Zaslavsky 1995] oder [Hatti-Kaul 2000].

2.2.1 Arten und Anwendungen von ATPS

Wässrige Zweiphasensysteme bestehen klassischerweise aus einer wässrigen Lösung zweier hydrophiler Polymere (z.B. PEG und Dextran) oder einem Polymer und einem Salz (z.B. PEG und Kaliumphosphat). Abbildung 2-4 zeigt eine gängige Darstellung eines Phasendiagramms klassischer ATPS. In dieser Darstellung wird der Massenanteil des Polymers A in einem kartesischen Koordinatensystem über dem Massenanteil des Polymers B oder des Salzes aufgetragen, der fehlende dritte Anteil ist Wasser.

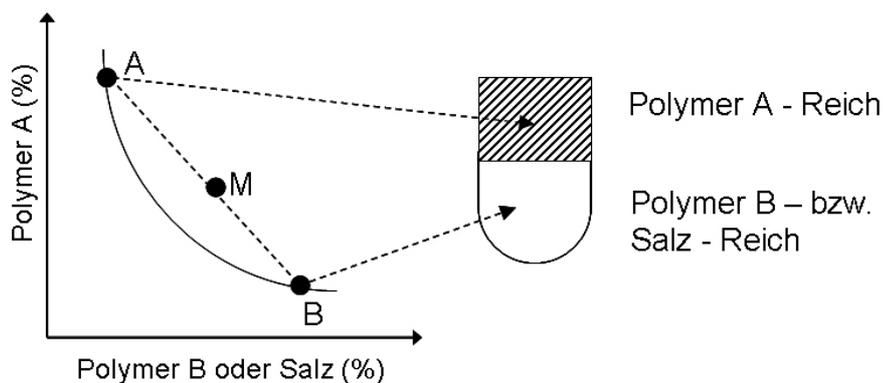


Abbildung 2-4: Schematisches Phasendiagramm klassischer ATPS aus wässrigen Lösungen zweier Polymere oder einem Polymer und einem Salz

Eine Mischung der Komposition M zerfällt in zwei Phasen der Zusammensetzungen A und B (diese liegen auf der Phasengrenzkurve). Phase A wäre hier im Beispiel reich an Polymer A und arm an Polymer B bzw. dem Salz, für Phase B verhält es sich genau umgekehrt. Die Hauptkomponente der beiden Phasen ist Wasser (meist > 80%, [Albertsson 1986]), was zur Benennung dieser Systeme mit dem Namen ATPS geführt hat. Dieser hohe Wassergehalt ist verantwortlich für die Biokompatibilität, d.h. die schonende Umgebung für Proteine, Enzyme, Zellen und andere biologische Materialien. In zahlreichen Arbeiten konnten mittels ATPS Proteine aus Zelltrümmern enthaltenden Homogenisaten oder anderen komplexen Medien mit bemerkenswerten Ausbeuten und Aufreinigungsfaktoren abgetrennt werden. Idealerweise reichert sich in einer ATPS-Extraktion das Zielprotein in einer Phase (z.B. der PEG-Phase)

an, während sich Zellen, Zellbruchstücke, Nukleinsäuren, Lipide etc. in der anderen Phase (z.B. der Dextran-Phase) anreichern.

Neben den bereits erwähnten PEG/Dextran- und PEG/Kaliumphosphat-ATPS gibt es eine Reihe abgeleiteter ATPS in denen das PEG (z.B. durch EOPO-Blockpolymere [Persson 2000b], Tenside [Sivars 2000] oder Polyvinylpyrrolidon [Giuliano 1991]), das Dextran (z.B. durch Hydroxypropylstärke [Wu 2001], Maltodextrin [da Silva 2001] oder Xanthan [Chethana 2006]) oder beide Polymere ersetzt sind. Auch die Anzahl bekannter einsetzbarer Salze ist sehr groß (Na_2SO_4 , NaCl und viele andere). In jüngster Zeit bekannt gewordene moderne Arten von ATPS bestehen aus ionischen Flüssigkeiten [Dreyer 2007] oder wässrigen Lösungen zweier chaotroper Salze [Bridges 2007]. Der für diese Arbeit wichtige Fall der Tensid-basierten, mizellaren ATPS wird im folgenden Kapitel gesondert betrachtet. Genauso vielfältig wie die Möglichkeiten ATPS herzustellen sind die diskutierten Anwendungen. Im biologischen Bereich sind dies neben dem Downstream-Processing von Proteinen [Kula 1985] z.B. extraktive Biokonversionsreaktionen ([Daugulis 1997], [Banik 2003]), analytische Anwendungen bzw. Proteomics ([Schindler 2006], [Everberg 2006], [Zaslavsky 2007]) oder die Aufreinigung von Plasmid-DNA ([Kepka 2004], [Frerix 2006], [Rahimpour 2006]).

2.2.2 Sonderfall: Mizellare ATPS

Im Gegensatz zu den im vorangegangenen Kapitel betrachteten, aus drei Komponenten bestehenden, ATPS wird im Falle mizellarer ATPS neben Wasser nur eine Komponente benötigt. Auch für diese sog. AMTPS [Tani 1998] gibt es verschiedene zum Einsatz kommende Arten von mizellbildenden Tensiden, hier wird jedoch nur die Klasse der nichtionischen Tenside abgehandelt. Bei diesen AMTPS ist der Phasenzерfall einerseits von der Lösungszusammensetzung aber auch in besonderem Maße von der Temperatur abhängig. Phasendiagramme von AMTPS werden üblicherweise durch Auftragen der Temperatur gegen den Massenanteil des Tensids in wässriger Lösung aufgetragen. Auch hier wird die Mischungslücke durch die Binodalkurve begrenzt und ein System der Zusammensetzung M zerfällt bei gegebener Temperatur in zwei wässrige Phasen, eine reich und eine arm an Tensid (siehe Abbildung 2-5). Die Temperatur, bei der eine mizellare Lösung in zwei makroskopische Phasen zerfällt (d.h. sich eintrübt) wird oft auch als Wolkenpunkt bzw. Cloud-Point bezeichnet.

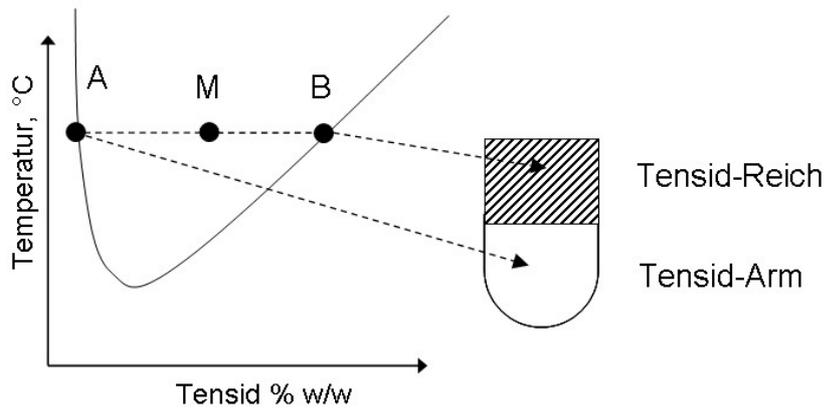


Abbildung 2-5: Schematisches Phasendiagramm mizellarer ATPS aus nichtionischen Tensiden

Für AMTPS werden neben dem Einsatz in der Biotechnologie viele weitere potentielle Einsatzfelder diskutiert [Paleologos 2005], wobei das mit den meisten Aktivitäten die Probenvorbereitung (Aufkonzentrierung) bei der Analytik von Schwermetall-Spuren in Wässern oder Böden darstellt (von [Watanabe 1978] bis [Ghaedi 2008]). Auch die Extraktion von aromatischen Verbindungen ([Trakultamupatam 2004a, b]) oder Textil-Farbstoffen aus Abwässern ([Materna 2005]) wird rege untersucht. Insgesamt gelten AMTPS als umweltschonende, nachhaltige Prozesse ermöglichende Extraktionssysteme ([Quina 1999]).

Das Potential von AMTPS für die Extraktion hydrophober und amphiphiler Proteine aus komplexen Lösungen stellte als erster der Schweizer Forscher Clement Bordier fest ([Bordier 1981]). Seither gab es sehr viele Untersuchungen im bioanalytischen Bereich, hier sei nur auf einen umfangreichen Übersichtsartikel aus dem Jahr 1994 verwiesen [Sanchez-Ferrer 1994]. Andere versuchten AMTPS für das Downstream-Processing hydrophober Proteine bzw. hydrophobierter Fusionsproteine einzusetzen, wobei viele Arbeiten in und um die Gruppe der deutschen Forscherin Maria-Regina Kula stattfanden ([Ramelmeier 1991], [Terstappen 1993], [Minuth 1997, Minuth 1995, 1996], [Rodenbrock 2001], [Selber 2002a, 2002b, 2004]). Auch aus Japan gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen zum Einsatz von AMTPS zur Extraktion hydrophober Proteine ([Saitoh 1995b], [Tani 1997a, 1998, Tani 1997b, Tani 2001]). Sehr grundlegende Arbeiten zum Phasenzerrfall und dem Verteilungsverhalten von Proteinen in AMTPS kommen seit Mitte der 1980er Jahre aus den USA, genauer aus der Gruppe um Daniel Blankschtein am Massachusetts Institute of Technology, MIT ([Blankschtein 1986], [Nikas 1992], [Liu 1998, Liu 1995, 1996], [Lam 2005]). Besonders interessant bei vielen dieser Arbeiten ist der Ansatz, die hydrophobe Proteine bevorzugenden AMTPS zur Trennung hydrophiler Proteine einzusetzen [Rangel-Yagui 2004]. Dieser Ansatz spielt auch für die vorliegende Arbeit eine übergeordnete Rolle, wie noch gezeigt werden wird.

2.2.3 Verfahrenstechnische Einsetzbarkeit von ATPS

Ein, wenn es um den technischen Einsatz von ATPS geht, immer wieder herangezogenes Charakteristikum ist die relativ einfache Realisierung eines Scale-Up [Cunha 2002]. In der Tat wurden schon einige Anwendungen erfolgreich vom Labor- in den Pilotmaßstab übertragen (z.B. β -Galactosidase aus *Escherichia Coli* in PEG/ KH_2PO_4 -ATPS [Veide 1984], Fumarase aus *Saccharomyces Cerevisae* mittels PEG/ KH_2PO_4 -ATPS [Hustedt 1986] oder Cholesterol Oxidase aus *Nocardia Rhodochrous* mittels Agrimul NRE05-AMTPS [Minuth 1997]). Auch die Kostenreduktion durch Einsparung vieler Schritte gegenüber konventionellen Aufarbeitungswegen kann im Einzelfall sehr beeindruckend sein, wie das von [Kula 1999] angegebene Beispiel bei der Aufreinigung von Alpha-Amylase aus *Bacillus Subtilis* (siehe Abbildung 2-6) zeigt:

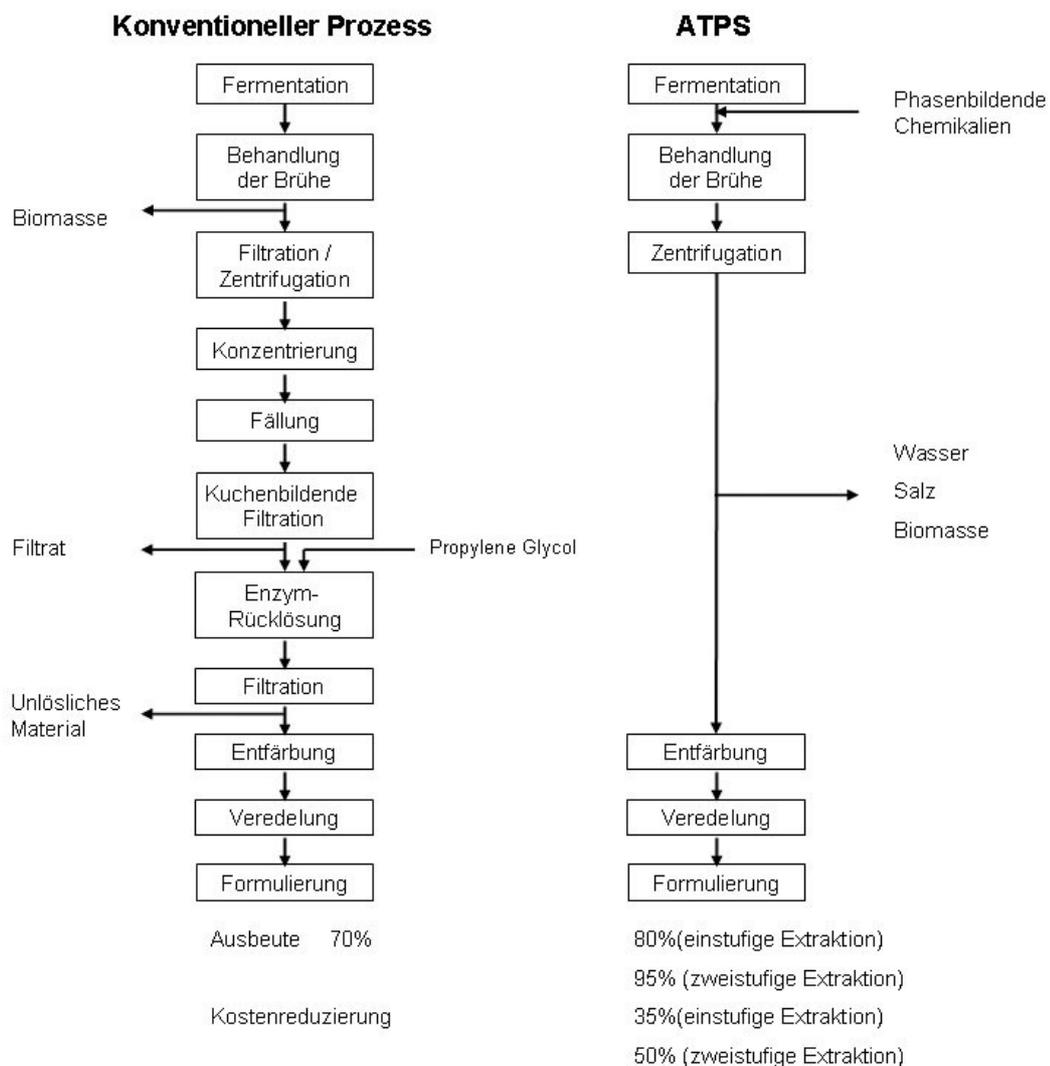


Abbildung 2-6: Vergleich zweier Aufarbeitungsstrategien von Alpha-Amylase: Konventioneller Prozess vs. ATPS (nach [Kula 1999])

Die Zahl bekannt gewordener industrieller Anwendungen von ATPS ist dennoch bis heute sehr überschaubar geblieben, wobei die Gründe schon lange bekannt sind und auch immer wieder in Übersichtsartikeln diskutiert werden (z.B. [Rito-Palomares 2004]):

1. Kosten und Nachhaltigkeit: Schwierigkeiten beim Recycling der phasenbildenden Polymere/Salze und damit verbundene Einsatzkosten und Entsorgungsprobleme
2. Prozessführung: Oftmals unzureichende Selektivitäten und der zumeist verwendete Mixer-Settler Betrieb erfordern mehrstufige Extraktionsprozesse
3. Prozessdauer: Die aufgrund hoher Viskositäten und geringen Dichtedifferenzen meist sehr langsame Phasentrennung verlängert den Prozess oder erfordert den Einsatz energieintensiver Zentrifugationsschritte
4. Vorhersagbarkeit: Bis heute hat sich keine Methode etabliert, die es ermöglicht, die Performance einer ATPS-Extraktion ohne aufwendige Labortätigkeit vorherzusagen

Zu Punkt 1: Fraktioniertes Dextran (meist mit einer Molmasse von 500 kDa eingesetzt) ist sehr teuer, kann aber nicht ohne weiteres durch unfraktioniertes Dextran ersetzt werden. Da sich in der Dextran-reichen Phase meist die kompletten Verunreinigungen des Zulaufs befinden, ist das Recycling bisher nicht wirtschaftlich zu betreiben. Diskutierte Ersatzstoffe sind die billigeren, bereits erwähnten Polymere Maltodextrin oder Hydroxypropylstärke, die aber wiederum die Viskosität der Phasen sehr unvorteilhaft beeinflussen [Bolognese 2005]. PEG und einfache Salze sind in der Regel keine teuren Chemikalien; da jedoch zur Bildung von ATPS oftmals Lösungsgehalte von 15% w/w und mehr erforderlich sind, können auch hier die Chemikalienkosten zu Buche schlagen. Die hohen Chemikalien-Gehalte finden sich nach dem Prozess im Abwasser wieder, was hohe Behandlungskosten nach sich ziehen kann. Zur Wiedergewinnung der Salze, z.B. mittels Ultrafiltration, wurden schon einige Arbeiten durchgeführt, die aber im besten Fall, gemessen an der Abwasserbehandlung, kostenneutral arbeiteten ([Greve 1991], [Papamichael 1992]). Einen eleganten Ansatz für das Salzrecycling fanden van Berlo *et al* [van Berlo 1998], die flüchtige Salze einsetzten, die nach Ausgasung dem System wieder zugeführt werden konnten (z.B. NH_4HCO_3 welches später in Form von NH_3 und CO_2 recycelt wurde). Der vielversprechendste Ansatz zum Polymer-Recycling wurde in einigen Aufsätzen von der Universität Lund in Schweden diskutiert, nämlich der Einsatz thermoresponsiver Polymere wie EOPO ([Persson 2000a, Persson 1999, Persson 2000b]) als Ersatz für das PEG und/oder das Dextran. Diese thermoresponsiven Polymere können nach einer Hitzebehandlung (i.d.R. 60 °C oder darüber) in fast reiner Form dem Prozess zurückgeführt werden. Jedoch haben auch diese Systeme nach Kenntnisstand des Autors noch nicht die Hürde von der Forschung in die industrielle Anwendung genommen.

Zu Punkt 2: Wird eine unzureichende Selektivität als gegeben hingenommen (mehr dazu in Kapitel 2.2.4), sollte versucht werden Apparate mit multiplen GGW-Stufen einzusetzen. Zum

Einsatz von ATPS in differentiellen Kontaktapparaten wie Spray- oder Platten-Kolonnen gibt es zahlreiche Arbeiten aus Indien, wobei die Forscher meist mit PEG/Salz-Systemen und Protein-Modelllösungen gearbeitet haben ([Sawant 1990], [Patil 1991], [Jafarabad 1992a, Jafarabad 1992b], [Bhavasara 1996, Bhawasara 1994], [Pawar 1997]). Ein, bislang ebenfalls nur mit Modelllösungen demonstrierter, vielversprechender Ansatz ist die Übertragung der CCC (Counter-Current-Chromatography, [Sutherland 2007a]), d.h. dem Einsatz von Zentrifugal-Extraktoren aus der klassischen Extraktionstechnik auf ATPS, [Sutherland 2007b]. Die Autoren berichten von mehreren hundert theoretischen Trennstufen in einem Apparat, was auch den Einsatz relativ unselektiver ATPS möglich machen würde.

Zu Punkt 3: Zur Beschleunigung der Phasentrennung wird schon seit einiger Zeit der Einsatz von Zentrifugen diskutiert. Diese sind für klassische ATPS geeignet [Kula 1985], beim Umgang mit AMTPS ergeben sich jedoch Probleme, da aufgrund komplexer rheologischer Zusammenhänge die Trennschärfe mit steigender Zentrifugalkraft abnehmen kann [Minuth 1997]. Aufgrund der Betriebskosten von Zentrifugen wurden schon vielfältige andere Möglichkeiten die Phasentrennung zu beschleunigen diskutiert. Dies waren unter anderem der Einsatz von Ultraschall [Srinivas 2000], Mikrowellen [Nagaraj 2003] oder elektrischer Felder [Nagaraj 2005]. Das größte Problem beim Einsatz dieser Techniken ist die Erhitzung der ATPS und die damit verbundene Denaturierung von Proteinen. Ein im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit stehender Ansatz ist der Einsatz magnetischer Partikel und Felder [Wikström 1987] (siehe auch Kapitel 2.4.1). Eine interessante Übersicht über die Thematik der Phasenseparations-Beschleunigung bieten Raghavarao *et al* [Raghavarao 2002].

Zu Punkt 4: Obwohl die vorangestellten Punkte große Probleme darstellen, ist das wohl größte Hindernis bei der industriellen Etablierung der ATPS das mangelnde physikochemische Verständnis des Verteilungsverhaltens von Proteinen in diesen Systemen (auf den diesbezüglichen Stand des Wissens wird gesondert in Kapitel 3.3 eingegangen). Dieser Mangel an Vorhersagbarkeit erfordert bei jeder Prozessentwicklung sehr viel Laborarbeit und verhindert die meist erforderliche Flexibilität auf während der Verfahrensentwicklung neu entstehende Probleme kurzfristig zu reagieren. Eine moderne Herangehensweise, die trotz fehlender physikalischer Theorien den Umgang mit ATPS erleichtern könnte, bieten sog. High-Throughput-Screening (HTS) Techniken, wie sie im Zusammenhang mit ATPS erstmals von Bensch *et al* [Bensch 2007] angewendet wurden.

Ein nicht sehr häufig diskutiertes, aber dennoch elementares, Problem sprechen Johansson *et al* in einem Artikel zum Phasengleichgewicht von ATPS an [Johansson 1998]. Die für den technischen Einsatz angewendeten Polymere sind oft polydisperse Mischungen mit mehr oder weniger breiten Molekülgrößenverteilungen. Unterschiedlich große Moleküle können sich auf zwei koexistierende Phasen unterschiedlich verteilen, was dazu führen kann, dass die

Rückführung eines Polymers in den Extraktionsschritt zur Bildung eines ATPS mit veränderten Eigenschaften führen kann.

2.2.4 Affinitätstechniken in Verbindung mit ATPS

Die Idee die Selektivität von ATPS durch den Einsatz von Affinitäts-Liganden zu erhöhen, hat eine sehr lange Tradition (spätestens seit [Takerkart 1974] und [Flanagan 1975]), empfehlenswerte Übersichtsartikel zu dieser Thematik bieten [Kopperschläger 1990], [Johansson 2000] oder [Xu 2003]. Zusätzlich zu der in Kapitel 2.1.4 getroffenen Unterscheidung, ob das Protein oder die Extraktionsphase mit einer Affinitätsfunktion versehen wird, ist bei ATPS die zusätzliche Unterscheidung in freie oder immobilisierte Affinitäts-Liganden zweckmäßig. Den ersten Weg, also die Anpassung des Proteins durch Tags und/oder Fusionen beschreiben beispielsweise [Berggren 1999], [Selber 2004] oder [Fexby 2004]. Freie Affinitätsliganden beschreiben Gouveia *et al* [Gouveia 2000] oder Teotia *et al* [Teotia 2001a, Teotia 2001b], z.B. Stärke oder Alginat für die Extraktion von Amylasen. Als auf Polymeren immobilisierte Liganden kommen hauptsächlich Metall-Chelatbildner ([Plunkett 1990], [Teixeira Franco 1997], [Estela da Silva 2000b], [Sivars 2000], [Fernandes 2002], [Lu 2006]) oder Azo-Farbstoffe, d.h. Dye-Liganden, ([Johansson 1989b], [Giuliano 1991], [Xu 2002], [Fernandes 2002]) zum Einsatz. Beispiele für oft eingesetzte Dye-Liganden sind Cibacron Blue 3FGA, Procion yellow HE-3G oder Procion red HE-3B.

Aufgrund des steigenden Interesses am Einsatz mizellarer ATPS zur Extraktion eben solcher Textil-Farbstoffe ([Tatara 2004, 2005]) ist es verwunderlich, dass diese interessante Kombination bisher noch zu keinen Aktivitäten im Bereich der Proteinseparation geführt hat. Überhaupt sind bislang nur sehr wenige Berichte über Affinitäts-AMTPS bekannt geworden, zu nennen sind hier lediglich [Saitoh 1995a], [Lee 1999] und [Lam 2005]. Lam *et al* setzten als phasenbildendes Polymer das nichtionische Tensid Decyl- β -D-Glucopyranosid ($C_{10}G_1$) ein, welches gleichzeitig als Affinitätsligand für ein aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und einer Kohlenhydrat-Bindenden Domäne (CBM9) rekombinant gebildeten Fusionsprotein (CBM9-GFP aus *Escherichia Coli*) fungiert. Das hydrophile Fusionsprotein, welches eigentlich aus der tensidreichen Phase ausgeschlossen würde, reichernte sich mit einem Verteilungsverhältnis von 3,1 in der tensidreichen Phase an. Wurde jedoch die affine Wechselwirkung durch einen Überschuss an Glucose „ausgeschaltet“, sank das Verteilungsverhältnis auf den (durch die Autoren theoretisch modellierten und experimentell nachgewiesenen) Wert 0,47. Das Konzept der Extraktion hydrophiler Proteine in die tensidreiche Phase eines AMTPS durch Einführung einer Affinitätsfunktion spielt auch in der vorliegenden Arbeit eine übergeordnete Rolle.

Aus theoretischen Überlegungen schlossen Baskir *et al* [Baskir 1989], dass im Falle klassischer ATPS nicht das hauptsächlich in der Zielphase vorliegende Polymer

funktionalisiert, sondern zu dem ATPS ein zusätzliches funktionelles Polymer zugefügt werden sollte. Zum selben Ergebnis kamen auch Johansson *et al* auf experimentellem Wege [Johansson 1989a]. Dieses funktionelle Polymer muss sich natürlich vollständig in der Zielphase anreichern um eine effektive Extraktion zu ermöglichen (womit sich dieser Ansatz prinzipiell nicht mehr von den eben erwähnten freien Makroliganden unterscheidet). Aus den oben zitierten Arbeiten schlossen Huddleston *et al* [Huddleston 1991], dass es von Vorteil sein könnte die Affinitätsliganden auf festen Partikeln zu immobilisieren, da deren Partitioning doch meistens sehr einseitig und nicht wie bei funktionellen Polymeren selbst einer statistischen Verteilung unterworfen sei². In der Tat wurde die Kombination ATPS und funktionalisierte Partikel schon einige Male versucht ([Hedman 1984], [Mattiasson 1986], [Ku 1989a, b], [Kondo 1993], [Kwon 1999], [Roobol-Boza 2004]), einmal sogar mit funktionellen magnetischen Partikeln [Suzuki 1995]. Die Hauptmotivation der genannten Arbeiten, feste Partikel anstatt funktioneller Polymere als Träger der Affinitätsliganden zu verwenden, war anstelle der von Baskir *et al* angeführten Gründe wahrscheinlich eher die vereinfachte Wiederverwendbarkeit der Affinitäts-Liganden. Im Falle funktioneller Polymere ist nämlich der Fakt, dass diese nur sehr schwer recycelt werden können, bis heute die entscheidende Hürde auf dem Weg in die Anwendung. Allerdings wurden auch in diesem Bereich, z.B. durch den Einsatz Temperatur-induziert fällbarer Polymere, bereits Fortschritte erzielt ([Teixeira Franco 1997], [Lu 2006]).

2.3 Magnetische Mikrosorbentien

Im folgenden Kapitel werden zunächst die für den Umgang mit magnetischen Feldern und Materialien notwendigen physikalischen Grundlagen kurz erläutert. Die Auswahl folgt hierbei der didaktischen Herangehensweise innerhalb der Habilitationsschrift zur „Magnettechnologie in der Verfahrenstechnik wässriger Medien“ von Franzreb [Franzreb 2003], die physikalischen Erklärungen für die verschiedenen Erscheinungsformen des Magnetismus finden sich in Lehrbüchern und werden hier nicht wiederholt. In den darauf folgenden Abschnitten werden verschiedene Einsatzfelder magnetischer Partikel in der Biotechnologie und anschließend das HGMF-Verfahren („High Gradient Magnetic Fishing“), also die Bioproduktaufarbeitung unter Einsatz magnetischer Mikrosorbentien im Zusammenspiel mit Hochgradienten-Magnetseparatoren betrachtet.

² Hatti-Kaul [Hatti-Kaul 2001] weißt unter anderem darauf hin, dass Partikel in ATPS zwar meist eine Phase bevorzugen, sich aber auch oftmals an der Phasengrenze anreichern können, ein Sachverhalt der an anderer Stelle in dieser Arbeit diskutiert wird (siehe Kapitel 3.1).

2.3.1 Magnetische Kenngrößen und Materialeigenschaften

Magnetische Flussdichte bzw. Induktion

In der Umgebung eines stromdurchflossenen Leiters herrscht ein Magnetfeld, dessen Feldlinien auf einer zum Stromleiter senkrechten, ebenen Fläche konzentrische Kreise bilden. Bringt man den Leiter in ein fremdes Magnetfeld, so überlagern sich die beiden Felder. Das superpositionierte Feld übt auf den Leiter eine Kraft F aus, die senkrecht zu den Feldlinien des Magnetfeldes und zur Stromrichtung steht. Den Quotienten:

$$B = \frac{F}{I \cdot L} \quad [\text{Gl. 2.3-01}]$$

nennt man den Betrag der magnetischen Induktion oder Flussdichte des magnetischen Felds. Die magnetische Flussdichte B ist ein Vektor, dessen Richtung derjenigen des Magnetfeldes entspricht und der senkrecht zur Kraft- und Stromrichtung steht. Das magnetische Feld kann somit durch die Wirkung beschrieben werden, die es auf einen stromdurchflossenen Leiter ausübt. Wenn ein Leiter der Länge $L = 1 \text{ m}$, der von einem Strom der Stärke $I = 1 \text{ A}$ durchflossen wird, in einem Magnetfeld die Kraft 1 N erfährt, so besitzt das Feld die Flussdichte 1 Tesla . Für die Einheit der magnetischen Flussdichte folgt demnach:

$$[B] = \frac{N}{A \cdot m} = \frac{V \cdot s}{m^2} = \frac{kg}{A \cdot s^2} \equiv \text{Tesla} \quad [\text{Gl. 2.3-02}]$$

Magnetische Feldstärke und Permeabilität

Ursache des magnetischen Feldes ist die magnetische Feldstärke H . Innerhalb einer stromdurchflossenen Spule wird ihr Betrag wie folgt definiert:

$$H = n \cdot \frac{I}{L} \quad [\text{Gl. 2.3-03}]$$

Hierbei drückt L die Länge der Spule und n die Anzahl der Windungen aus. Die Einheit von H ist A/m und die Richtung von H entspricht derjenigen der magnetischen Flussdichte B . Zwischen der magnetischen Flussdichte und der magnetischen Feldstärke besteht ein linearer Zusammenhang. Es gilt:

$$B = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot H \quad [\text{Gl. 2.3-04}]$$

Dabei ist μ_0 die magnetische Feldkonstante und μ_r die Permeabilitätszahl. μ_r ist eine Maßzahl und beschreibt den verstärkenden oder abschwächenden Einfluss der innerhalb der Spule

befindlichen Materie. Liegt innerhalb der Spule ein Vakuum vor, wird die Permeabilitätszahl zu eins.

Polarisation und Suszeptibilität

Wird eine Substanz in ein magnetisches Feld eingebracht, so ändert sich die magnetische Flussdichte innerhalb des Feldbereichs von dem Anfangswert B_{Vakuum} auf einen neuen Wert B_{Materie} . Die Änderung der magnetischen Induktion ΔB wird magnetische Polarisation J genannt. Es gilt:

$$J = \Delta B = B_{\text{Materie}} - B_{\text{Vakuum}} \quad [\text{Gl. 2.3-05}]$$

Mit Ausnahme ferro- bzw. ferrimagnetischer Substanzen ist die Polarisation bei allen Stoffen zu der Feldstärke, die sie hervorruft, proportional:

$$J = \kappa \cdot \mu_0 \cdot H \quad [\text{Gl. 2.3-06}]$$

Der Proportionalitätsfaktor heißt magnetische Suszeptibilität κ :

$$\kappa = \mu_r - 1 \quad [\text{Gl. 2.3-07}]$$

Je nach Größe der Permeabilitätszahl μ_r werden die Stoffe mit konstanter Suszeptibilität κ in zwei Gruppen eingeteilt:

Stoffe mit $\mu_r > 1$ bzw. $\kappa > 0$ heißen paramagnetisch und verstärken das Magnetfeld

Stoffe mit $\mu_r < 1$ bzw. $\kappa < 0$ heißen diamagnetisch und schwächen das Magnetfeld

Bei den ferro- bzw. ferrimagnetischen Stoffen ist die magnetische Polarisation J nicht proportional zu der Feldstärke H , sondern strebt bei sehr großen Feldstärken einem Maximalwert zu. Die Suszeptibilität ist damit eine Funktion der Feldstärke H .

Magnetisierung und Magnetisierungskurve

Anstelle der Polarisation J wird in der Technik der Einfluss eines Magnetfeldes auf ferro- bzw. ferrimagnetische Substanzen meist mit der scheinbaren Erhöhung der Feldstärke, der Magnetisierung M , beschrieben.

$$M = \Delta H = H_{\text{Materie}} - H_{\text{Vakuum}} \quad [\text{Gl. 2.3-08}]$$

Die Einheit der Magnetisierung ist A/m. Der Maximalwert der Polarisation bzw. Magnetisierung bei ferro- bzw. ferrimagnetischen Stoffen wird als Sättigungspolarisation J_s bzw. Sättigungsmagnetisierung M_s bezeichnet. Er kommt durch eine vollständige

Ausrichtung der magnetischen Dipole unter der magnetischen Kraftwirkung des Magnetfeldes zustande. Die Magnetisierung wächst mit zunehmender Feldstärke solange bis eine vollständige Ausrichtung aller Dipole vorliegt.

Neben Angaben zur Suszeptibilität lassen sich die magnetischen Eigenschaften von Substanzen wesentlich detaillierter aus den Magnetisierungskurven dieser Stoffe ablesen. In Abbildung 2-7 ist eine solche Kurve exemplarisch dargestellt. Wird die Feldstärke ausgehend von einem zur magnetischen Sättigung ausreichenden Wert bis auf einen Wert von Null verringert, verbleibt in der Regel eine Remanenz J_R , d.h. die Polarisation verschwindet auch ohne äußeres Feld nicht vollständig. Um die Polarisation bzw. die Magnetisierung auf Null abzusenken bedarf es eines, dem ursprünglichen Feld entgegengesetzten, Feldes der Stärke H_C , die als Koerzitivfeldstärke bezeichnet wird. Die Form der Magnetisierungskurven ist normalerweise neben den Materialeigenschaften auch stark von der eingesetzten Probenform und deren Ausrichtung zum Magnetfeld abhängig. Von der Form unabhängige Magnetisierungskurven lassen sich durch die Verwendung ringförmig geformter Materialproben gewinnen.

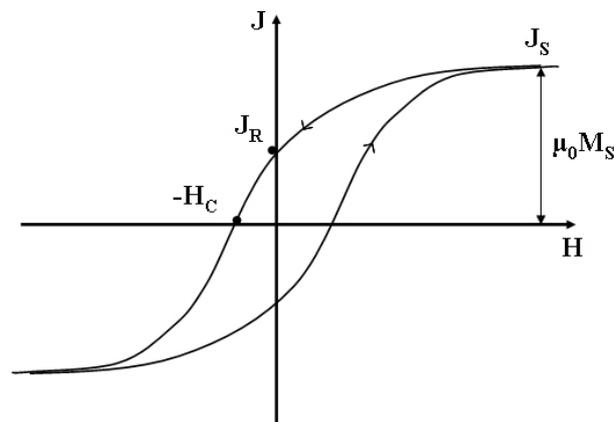


Abbildung 2-7: Magnetisierungskurve einer ferromagnetischen Substanz ausgehend vom Zustand magnetischer Sättigung

Einfluss der Partikelgröße

Partikel aus ferro- bzw. ferrimagnetischem Material, die aufgrund ihrer Größe nur eine oder wenige magnetische Domänen umfassen, zeigen ein magnetisches Verhalten, das sich von jenem makroskopischer Materialproben stark unterscheidet. Partikel, die aufgrund ihrer Größe eine Vielzahl magnetischer Domänen beinhalten, ergeben weitgehend konstante Werte für die Remanenz und die Koerzitivfeldstärke H_C . Nach einer vorausgegangenen magnetischen Sättigung finden sich z.B. für große Magnetitpartikel Werte von $H_C \approx 2000 \text{ A/m}$ und $M_R \approx 40000 \text{ A/m}$, entsprechend ca. 10% der Sättigungsmagnetisierung. Unterschreitet die Partikelgröße ca. $100 \mu\text{m}$, nimmt die Anzahl der magnetischen Domänen innerhalb der

Partikel zunehmend ab. Dieser Rückgang ist begleitet von einem Anstieg der Koerzitivfeldstärke und einem Rückgang der Partikelsuszeptibilität (siehe Abbildung 2-8). Wird die Partikelgröße erreicht, unterhalb der das gesamte Partikel nur noch eine magnetische Domäne umfasst, ergibt sich für die Koerzitivfeldstärke ein Maximum und für die Suszeptibilität ein Minimum. Im Falle von Magnetit erfolgt der Übergang zu Eindomänenpartikeln bei einem Partikeldurchmesser von ca. 1 μm . In diesem Bereich finden sich Koerzitivfeldstärken von über 10000 A/m und Remanenzen von bis zu $M_R \approx 80000$ A/m bzw. $J_R \approx 0,1$ Tesla.

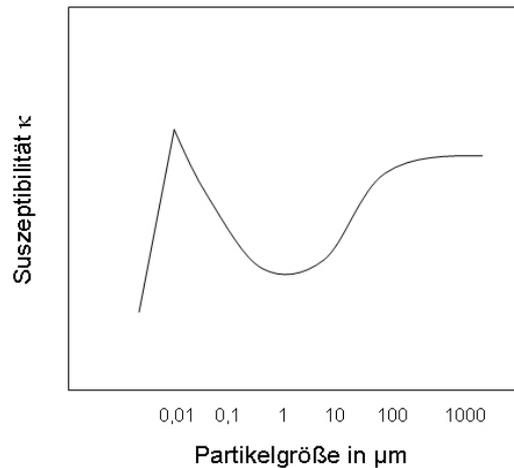


Abbildung 2-8: Abhängigkeit der Suszeptibilität von Magnetit von der Partikelgröße (nach [Svoboda 1987])

Für noch kleinere Partikel sinkt die Koerzitivfeldstärke H_C rasch ab und erreicht schließlich den Wert null [Michalowsky 1995]. Ferromagnetische Nanopartikel dieser Größe verhalten sich in Bezug auf Remanenz und Koerzitivfeldstärke damit wie paramagnetische Stoffe, die Absolutbeträge der Magnetisierung sind aber wesentlich größer. Man spricht daher von Superparamagnetismus bzw. superparamagnetischem Verhalten. Die kritische Partikelgröße für den Superparamagnetismus liegt für sphärische Magnetitteilchen bei ca. 0,05 μm [Svoboda 1987]. Die Bestimmung der Magnetisierungskurve einer superparamagnetischen Materialprobe führt zu einem durch Abbildung 2-9 repräsentierten Verlauf.

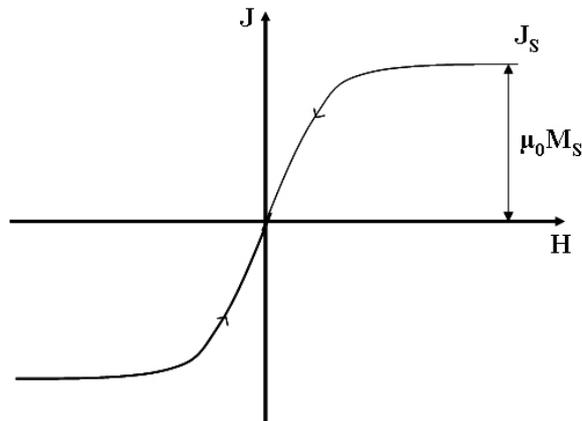


Abbildung 2-9: Magnetisierungskurve einer superparamagnetischen Substanz ausgehend vom Zustand magnetischer Sättigung

Für ideal superparamagnetische Substanzen ($H_C = M_R = 0$ A/m) ist die Magnetisierungskurve punktsymmetrisch zum Ursprung. Als mathematischer Ausdruck zur näherungsweisen Berechnung der Magnetisierungskurve im 1. Quadrant hat sich eine, hier durch Gl. 2.3-09 ausgedrückte, zweiparametrische Form als geeignet erwiesen.

$$\kappa = \kappa(H) = \frac{\chi_1}{\chi_2 + H} \quad [\text{Gl. 2.3-09}]$$

Einfluss der Partikelform

Unter Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes der Stärke H_0 ergibt sich für ein isotropes Material im einfachsten Fall folgende Magnetisierung entlang der Feldrichtung:

$$M = \kappa \cdot H_0 \quad [\text{Gl. 2.3-10}]$$

Die Suszeptibilität ist hierbei jedoch keine reine Stoffeigenschaft, sondern neben (wie bereits gezeigt wurde) der Partikelgröße auch von der Partikelform abhängig. Die Ursache für die Formabhängigkeit liegt darin begründet, dass im Fall eines endlichen Körpers das Magnetfeld innerhalb des Körpers nicht dem äußeren Feld entspricht. Die innerhalb des Körpers induzierten Magnetpole überlagern das Hintergrundmagnetfeld, wobei die Richtung der Feldlinien in der Regel denen des äußeren Feldes entgegengesetzt ist. Unter Einführung des Demagnetisierungsfaktors D_m gilt:

$$H_i = H_0 - D_m \cdot M \quad [\text{Gl. 2.3-11}]$$

Bei Kenntnis des Demagnetisierungsfaktors kann entsprechend die Magnetisierung eines Körpers aus seinen reinen Materialeigenschaften, d.h. der intrinsischen Suszeptibilität κ_i , und dem äußeren Magnetfeld berechnet werden:

$$M = \frac{\kappa_i}{1 + D_m \cdot \kappa_i} \cdot H_0 \quad [\text{Gl. 2.3-12}]$$

Der Demagnetisierungsfaktor ist in erster Linie formabhängig und liegt im Bereich von $0 < D_m < 1$. Eine Auswahl von Demagnetisierungsfaktoren verschiedener Körper zeigt Tabelle 2-1.

Tabelle 2-2: Demagnetisierungsfaktoren für Zylinderstäbe und Ellipsoide [Svoboda 1987]

Längen zu Durchmesser-Verhältnis	Zylinder	Ellipsoid (Prolat)	Ellipsoid (Oblat)
1	0,27	0,3333	0,3333
2	0,14	0,1735	0,2364
5	0,04	0,0558	0,1248
10	0,0172	0,0203	0,0696

Die intrinsische Suszeptibilität κ_i entspricht der Suszeptibilität, die an einem Probekörper gemessen wird, der keinerlei Selbstentmagnetisierung zeigt. Beispiele hierfür sind ein in axialer Richtung magnetisierter, sehr langer Zylinder oder ein aus dem Probenmaterial bestehender geschlossener Ring. Für die Suszeptibilität gilt:

$$\kappa = \frac{\kappa_i}{1 + D_m \cdot \kappa_i} \quad [\text{Gl. 2.3-13}]$$

Hieraus ergeben sich folgende Grenzfälle für ein stark magnetisches Material wie Magnetit:

$$H_0 \ll M_S \Rightarrow \kappa_i \gg D_m \Rightarrow \kappa \approx \frac{1}{D_m}$$

$$H_0 \gg M_S \Rightarrow \kappa_i \ll D_m \Rightarrow \kappa \approx \kappa_i$$

2.3.2 Magnetfelder und Kräfte

Grundlage für alle Typen von Magnetseparatoren bildet die Eigenschaft magnetischer Felder auf Materie eine Kraft auszuüben. Der allgemeine Zusammenhang für diese Magnetkraft F_M lautet:

$$F_M = \mu_0 \cdot V_P \cdot M_P \cdot \text{grad}H \quad [\text{Gl. 2.3-14}]$$

mit der Permeabilitätskonstante des Vakuums μ_0 , dem Partikelvolumen V_P , der Partikelmagnetisierung M_P und dem Gradienten der magnetischen Feldstärke $\text{grad}H$ am Ort des Partikels.

Gl. 2.3-03 definiert die Feldstärke innerhalb einer stromdurchflossenen Spule, allerdings gilt diese Berechnungsformel nur für lange, dünne Spulen. Technische Prozesse werden jedoch oftmals innerhalb der Raumlufthohlung von Spulendurchgeführt, bei denen die Annahme einer langen dünnen Spule, d.h. $L \gg R$ nicht gültig ist. Schematisch ist eine solche Spule samt Definition der axialen Ortskoordinate x in Abbildung 2-10 dargestellt.

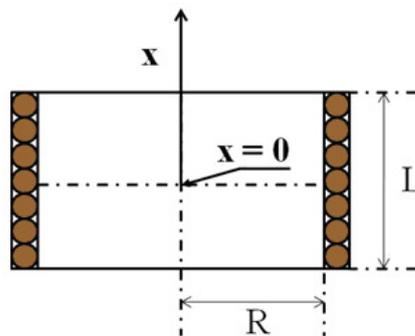


Abbildung 2-10: Skizze einer Magnetspule der Länge L und Radius R mit Definition der axialen Ortskoordinate x

Die axiale Feldverteilung der magnetischen Feldstärke H lässt sich bei Kenntnis der Windungszahl n , der Stromstärke I sowie der Länge L und des Radius R der Spule ³ mittels Gl.2.3-15 als Funktion des Ortes x näherungsweise berechnen [Michalowsky 1995].

$$H(x) = \frac{n \cdot I}{2 \cdot L} \cdot \left[\frac{x + \frac{L}{2}}{\sqrt{R^2 + \left(x + \frac{L}{2}\right)^2}} - \frac{x - \frac{L}{2}}{\sqrt{R^2 + \left(x - \frac{L}{2}\right)^2}} \right] \quad [\text{Gl. 2.3-15}]$$

Der Gradient lässt sich in analytischer Form durch Gl. 2.3-16 ausdrücken:

³ Im Falle dünner Wicklungen kann mit guter Näherung der Innenradius der Wicklung für Berechnungen herangezogen werden. Wird die Wicklung sehr breit und es gilt $R \gg L$ muss jedoch korrekterweise der Mittelwert von Innen- und Außenradius, $R_M = (R_i + R_a) / 2$, verwendet werden.

$$\text{grad}H(x) = -\frac{dH(x)}{dx} = -\frac{n \cdot I}{2 \cdot L} \cdot \left[\frac{1}{\left(R^2 + \left(x + \frac{L}{2}\right)^2\right)^{\frac{1}{2}}} - \frac{\left(x + \frac{L}{2}\right)^2}{\left(R^2 + \left(x + \frac{L}{2}\right)^2\right)^{\frac{3}{2}}} - \frac{1}{\left(R^2 + \left(x - \frac{L}{2}\right)^2\right)^{\frac{1}{2}}} + \frac{\left(x - \frac{L}{2}\right)^2}{\left(R^2 + \left(x - \frac{L}{2}\right)^2\right)^{\frac{3}{2}}} \right]$$

[Gl. 2.3-16]

2.3.3 Einsatzfelder magnetischer Partikel in der Biotechnologie

Die Tatsache, dass der Einsatz magnetischer Mikro- und Nanopartikel und deren Beeinflussung durch magnetische Felder den Gewinn eines zusätzlichen Freiheitsgrades für viele Anwendungen bedeutet, hat in den letzten Jahrzehnten zu vielen Aktivitäten in den verschiedensten Bereichen sowohl biologischer als auch chemischer Forschung und Technik geführt. Übersichtsartikel zu diesem Thema bieten u.a. [Hirschbein 1982], [Setchell 1985], [Safarik 1995], und [Safarik 2002].

Für die chemische Technik interessant sind verschiedenste Separationsprozesse [Böhm 1999] oder die Immobilisierung von Enzymen auf magnetischen Trägern für die Reaktionstechnik ([Robinson 1973], [Schultz 2007]). Im medizinischen Bereich werden magnetische Nanopartikel zur Krebsbehandlung im sog. Hyperthermie-Verfahren verwendet, ebenfalls interessant ist die kontrollierte Wirkstofffreisetzung mittels magnetischer Materialien und Felder [Saiyed 2003]. In der Mikrobiologie werden magnetische Partikel zur Zellsortierung verwendet ([Safarik 1995], [Gore 2004]), in der Biochemie zur Protein- und Nukleinsäureanalytik ([Safarik 2004], [Berensmeier 2006]).

Vom ingenieurstechnischen Standpunkt besonders interessant ist die präparative Aufreinigung von Proteinen und Enzymen aus komplexen Zulaufen, deren Erforschung und Entwicklung ebenfalls bereits eine lange Tradition hat [Dunnill 1974]. In den letzten Jahren hat die Kombination von unporösen, superparamagnetischen Mikrosorbentien und Hochgradienten-Magnetseparatoren zur Entwicklung des HGMF-Verfahrens geführt, auf welches im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

2.3.4 High Gradient Magnetic Fishing (HGMF)

Der prinzipielle Verfahrensablauf beim Einsatz magnetischer Mikrosorbentien zur direkten Abtrennung von Wertstoffen aus komplexen Mischungen ist in Abbildung 2-11 dargestellt. Hierbei werden die magnetischen Partikel zunächst in einen, neben der Zielkomponente auch Verunreinigungen enthaltenden, Zulauf gemischt. In einem Adsorptionsschritt wird die

Zielkomponente selektiv adsorbiert, im darauf folgenden Magnetseparationsschritt werden die Partikel von der Mischung separiert und der, die Verunreinigungen enthaltende, Überstand verworfen. Nach Zugabe eines Elutionsmittels zu den Partikeln und dem folgenden Desorptionsschritt wird die Zielkomponente in die freie Lösung entlassen und kann nach einem weiteren Magnetseparationsschritt als Produkt abgezogen werden.

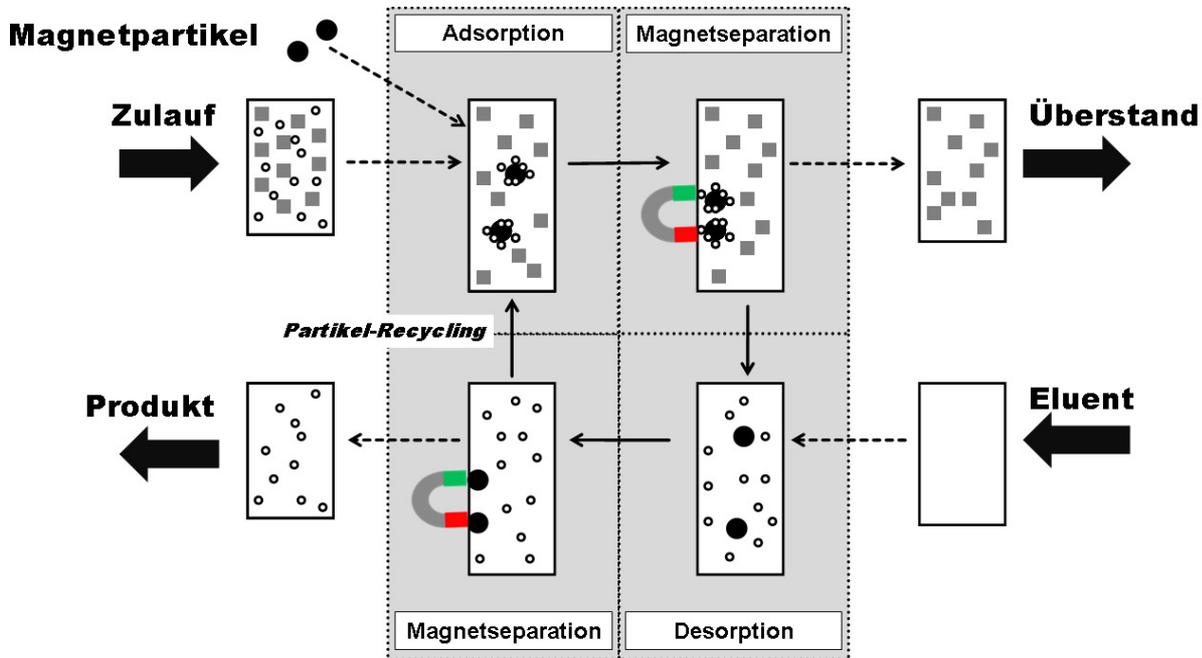


Abbildung 2-11: Schematischer Verfahrensablauf bei der Bioproduktaufarbeitung mittels HGMP

Die Übertragung dieses Prinzips aus dem Labor- in den technischen Maßstab hätte neben dem Aspekt der direkten Bioproduktaufarbeitung aus feststoffhaltigen Suspensionen den Vorteil, dass die Adsorptions- und Desorptionskinetik durch die Verwendung von (für die Zielkomponente) unporösen Mikro- oder Nanopartikeln sehr rasch verläuft und somit zu kurzen Prozessdauern führt. Da jedoch derart kleine Partikel nicht in Fest- oder Schwebbetten einsetzbar sind und somit meist der absatzweise Betrieb gewählt werden muss, ist eine Prozessstufe auch immer mit einer Gleichgewichtsstufe gleichzusetzen. Dies bedeutet gegenüber differentiellen Kontaktapparaten, wie z.B. Chromatographiesäulen, einen Nachteil in der Aufreinigungseffizienz. Dass jedoch die Vorteile, die sich durch kurze Prozessdauern sowie die entfallende Konditionierung des feststoffhaltigen Zulaufs ergeben, die genannten Nachteile überwiegen können, wurde in den letzten Jahren bereits mehrfach demonstriert [Franzreb 2006a, Franzreb 2006b].

Wird das in Abbildung 2-11 gezeigte Prinzip im Labormaßstab angewendet, werden die magnetischen Partikel meist mittels einfacher Handmagnete abgetrennt. Hierbei werden die Partikel am Rand bzw. Boden des verwendeten Gefäßes in Form einer Art Sediment gesammelt und anschließend die überstehende Flüssigkeit abdekantiert oder abgesaugt. Dass diese Methode aufgrund der Reichweitenverhältnisse magnetischer Kräfte nicht beliebig

skalierbar ist, liegt auf der Hand. Um das Konzept in den technischen Maßstab zu übertragen, wurde im Falle des HGMF-Verfahrens versucht, die in anderen Anwendungsbereichen wie der Erzaufbereitung etablierte Technologie der Hochgradienten-Magnetseparation [Svoboda 1987] zu adaptieren.

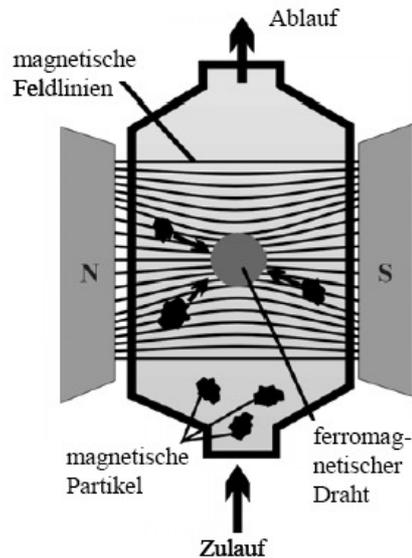


Abbildung 2-12: Grundprinzip der Hochgradienten-Magnetseparation (aus [Franzreb 2003])

Das in Abbildung 2-12 dargestellte Prinzip der Hochgradientenmagnetseparation ähnelt dem der Tiefenfiltration. In den Bereich eines äußeren Magnetfelds wird eine mit einer magnetisierbaren Abscheidematrix gefüllte Filterkammer eingebracht. Diese Abscheidematrix, in der Abbildung durch einen einzelnen Drahtquerschnitt symbolisiert, besteht zum Beispiel aus einer lockeren Packung grober Stahlwolle oder einem Stapel Drahtnetze. Die Matrixdrähte bündeln das äußere Magnetfeld in ihrer Umgebung und schaffen so auf ihrer Oberfläche Bereiche, die auf para-, ferri- bzw. ferromagnetische Partikel stark anziehend wirken. Die Partikel werden an die Oberfläche der Matrix angelagert und so von der Suspension abgetrennt. Ist die Aufnahmekapazität der Matrix erschöpft, wird die Zufuhr der Suspension gestoppt, der Magnet ausgeschaltet und die abgeschiedenen Partikel im Gegenstrom ausgespült. Anschließend kann ein neuer Abscheidezyklus beginnen.

Die ersten Untersuchungen, in denen die Magnetseparation im Rahmen des in Abbildung 2-11 dargestellten Grundprinzips nicht mehr mittels einfacher Handmagnete sondern mittels Magnetfiltern erfolgte, fanden Ende der 1990er Jahre am University College London (UCL) statt. Auch wenn es sich bei den von Zulqarnain [Zulqarnain 1999] am UCL verwendeten Magnetfiltern mit einem Volumen von nur 22 mL um relativ kleine Ausführungen handelte, so konnte dennoch demonstriert werden, dass mit dieser Vorgehensweise Partikel aus Lösungsvolumina abgetrennt werden konnten, die dem 50-fachen des Magnetfiltervolumens entsprachen. Die Untersuchungen am UCL beschränkten sich nicht nur auf die Magnet-

separation, auch im Bereich der Magnetpartikelsynthese und Oberflächenmodifikation für die selektive Proteinadsorption wurden hier große Fortschritte erzielt (z.B. [O'Brien 1996]). In den folgenden Jahren, d.h. Anfang der 2000er verlagerten sich die Aktivitäten auf dem Gebiet des HGMF-Verfahrens vom UCL an die Technische Universität Dänemarks (DTU). Parallel begannen mit der Doktorarbeit von Hoffmann [Hoffmann 2003] entsprechende Arbeiten am Forschungszentrum Karlsruhe. In einigen Arbeiten wurde das Prinzip des HGMF an verschiedenen biologischen Zuläufen (z.B. Fermentationsbrühen bzw. Homogenisate von Bäckerhefe oder *Escherichia Coli*, tierische Quellen wie Schweine-Pankreatin oder Molke sowie pflanzliche Quellen wie Bohnenextrakt) gezeigt und viel Erfahrung im Bereich der Herstellung, Modifikation und Handhabung magnetischer Mikrosorbentien im Labor- sowie im halbtechnischen Maßstab gesammelt ([Hubbuch 2001], [Hubbuch 2002], [Hoffmann 2003], [Heeboll-Nielsen 2004b], [Heeboll-Nielsen 2004a], [Meyer 2004], [Meyer 2005], [Meyer 2007], [Ebner 2006]).

In einem unlängst veröffentlichten Übersichtsartikel stellt Franzreb [Franzreb 2006b] den State-of-the-Art des HGMF-Prozess dar, wobei er auf die folgenden momentanen Hauptprobleme und Anforderungen bei der Entwicklung des HGMF-Prozess hinweist:

- Hohe Herstellungskosten unporöser, superparamagnetischer Mikrosorbentien mit Partikelgrößen > 500 nm und magnetischen Sättigungen > 35 Am²/kg
- Gezielte Steuerung der Selektivität und Kapazität durch Oberflächenmodifikation
- Wiederfindung der Magnetpartikel aus der Filtermatrix nach abgeschlossener Hochgradienten-Magnetseparation

Diese Punkte sollen hier nicht im Detail betrachtet werden, wichtig für das Verständnis der vorliegenden Arbeit ist jedoch die Tatsache, dass im Laufe der Erforschung des HGMF die Idee aufkam, durch den Einsatz wässriger Zweiphasensysteme (ATPS) in Kombination mit magnetischen Mikrosorbentien nicht mehr auf den Gebrauch von Hochgradienten-Magnetfiltern angewiesen zu sein. Auch auf Seite der ATPS-Forschung wurde mehrfach auf die sich ergebenden Möglichkeiten durch den Einsatz magnetischer Partikel und Felder in Kombination mit der wässrigen Zweiphasen-Extraktion hingewiesen. Der Wissensstand und die in dieser Arbeit gewählte Kombinationsmöglichkeit von ATPS und HGMF werden im folgenden Kapitel (2.4) vorgestellt.

2.4 Magnetische Extraktionsphasen (MEP)

2.4.1 Stand des Wissens

Als magnetische Extraktionsphasen werden hier Flüssig-flüssig Extraktionssysteme definiert, die (i) durch die Einführung magnetischer Materialien zugänglich für die Anwendung

magnetischer Felder und Kräfte gemacht werden und (ii) durch die magnetischen Materialien (z.B. Mikro- oder Nanopartikel) eine „Senke“ für das Zielmolekül darstellen, d.h. die Fähigkeit besitzen das Zielmolekül möglichst selektiv zu adsorbieren. Da der Gegenstand dieser Arbeit die Aufarbeitung fragiler makromolekularer Biomoleküle ist, kommen als Extraktionssysteme besonders die wässrigen Zweiphasensysteme (ATPS) in Betracht. Alle bisher bekannt gewordenen Bemühungen, die in die Richtung des Einsatzes magnetischer Extraktionsphasen weisen, kamen aus der Richtung der ATPS-Forschung. Die einzige Arbeit, bei denen die beiden oben genannten Kriterien als erfüllt angesehen werden können, stammt aus den 1990er Jahren von der Universität Nagoya in Japan [Suzuki 1995].

In der von Suzuki *et al* publizierten Arbeit wurden kommerziell erhältliche Magnetit-Nanopartikel (7-15 nm) zunächst aminosilanisiert und anschließend mit Eudragit S-100, einem Copolymer aus Methacrylat und Methylmethacrylat, gecoatet. Auf diesen Basispartikeln (Eudragit-Mag) wurde, als Affinitätsligand, menschliches Immunglobulin G (IgG) immobilisiert. Die so funktionalisierten Partikel wurden zusammen mit einem ATPS aus PEG 8000 (15% w/w) und Kaliumphosphat (10% w/w) eingesetzt, um rekombinant hergestelltes Protein A aus einem *Escherichia Coli*-Extrakt selektiv abzutrennen. Zu Herstellung des Extrakts wurden die *E.Coli*-Zellen nach der Fermentation zunächst von der Brühe durch Zentrifugation abgetrennt, anschließend in PBS-Puffer resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelldebris wurde wiederum abzentrifugiert und der erhaltene Rohextrakt für weitere Untersuchungen eingesetzt. Die vorgeschlagene Kombination von ATPS-Extraktion und selektiver Adsorption mittels magnetischer Mikrosorbentien incl. Magnetseparationsschritten ist in Abbildung 2-13 dargestellt. Die Magnetseparation erfolgte mittels einfacher Handmagneten, die Gesamtmasse der behandelten Lösung (ATPS + Magnetpartikel + Rohextrakt) betrug ca. 8 g. Die Elution von Protein A von den magnetischen Sorbentien erfolgte mittels 3.5 M KSCN-Lösung nach Abtrennung der Partikel vom ATPS. Das mit gestrichelten Pfeilen eingetragene Recycling der Phasenbildenden Polymere wurde in dieser Arbeit, wie auch die Wiederverwendung der Magnetpartikel nach Regeneration, nicht untersucht.

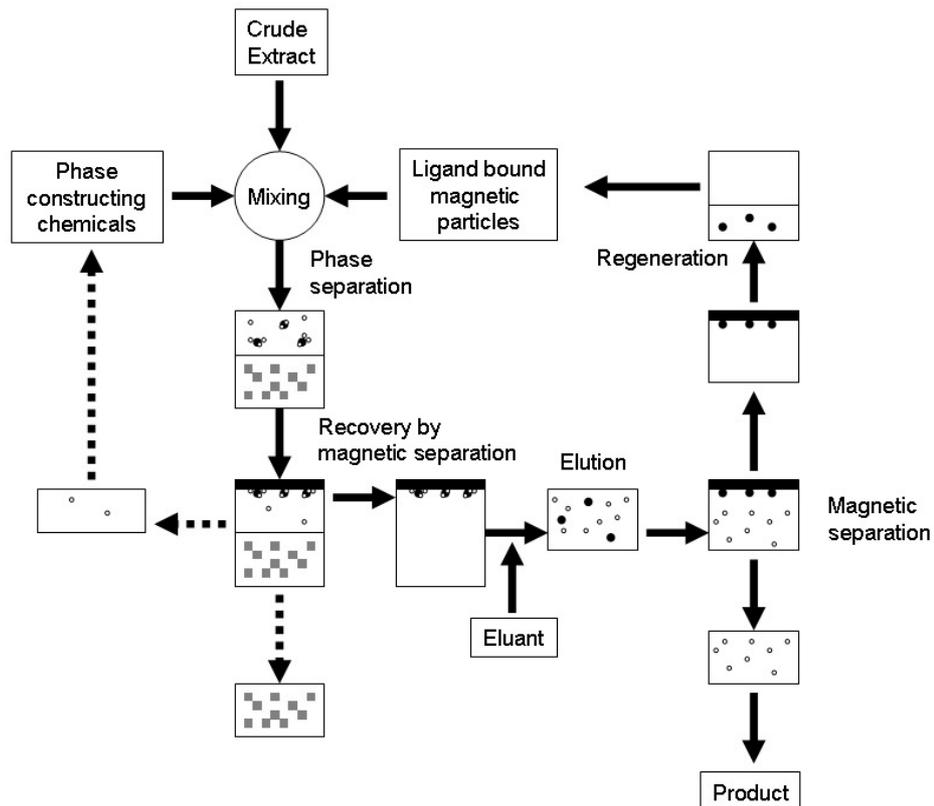


Abbildung 2-13: Von Suzuki *et al* vorgeschlagenes Verfahrensschema für den Einsatz magnetischer Sorbentien und klassischer ATPS zur Bioproduktaufarbeitung aus komplexen Zuläufen [Suzuki 1995]

Ergebnisse der Arbeit von Suzuki *et al* waren (verkürzt wiedergegeben):

- die Steigerung des Verteilungskoeffizienten von Protein A um den Faktor 35 von 0,33 auf 11,4. Das zuvor aus der PEG-reichen Oberphase ausgeschlossene Protein wurde durch die selektive Adsorption (ca. 90%) und die Anreicherung der Sorbentien in die Oberphase eingeschleust.
- eine Verringerung der Phasenseparationsdauer um den Faktor 9 durch den Einsatz einfacher Handmagnete
- eine Protein A-Ausbeute von 39% bei einer Reinheit von 49% nach Elution (der Gehalt von Protein A im Rohextrakt betrug 12% des Gesamtproteins, der Aufreinigungsfaktor betrug somit 4)

Auch wenn die erreichten Änderungen des Verteilungsverhaltens sowie die Verkürzung der Phasenseparationsdauer als erfolgreich und wegweisend anzusehen sind, so ist die Gesamt-Performance im Hinblick auf Ausbeute und Reinheit eher ernüchternd. Suzuki *et al* räumten ein, dass insbesondere die Elution des Zielmoleküls verbesserungswürdig ist, worauf in Folgearbeiten besonderes Augenmerk zu lenken sei. Leider gab es in dieser Richtung keine weiteren Veröffentlichungen.

Weitere, für die Entwicklung magnetischer Extraktionsphasen, interessante Arbeiten aus dem Bereich der ATPS-Forschung beleuchten jeweils nur eins der eingangs dieses Abschnitts genannten Kriterien, d.h. entweder den Einsatz magnetischer Partikel (ohne Affinitätsligand) oder den Einsatz Affinitäts-Liganden tragender unmagnetischer Partikel. In die erste Kategorie fallen eine Reihe von Arbeiten aus der schwedischen Universität Lund aus den späten 1980er Jahren ([Wikström 1987], [Wikström 1989], [Flygare 1990] und [Larsson 1994]). Die wesentlichen, die vorliegende Arbeit betreffenden, Erkenntnisse seien hier nur in verkürzter Form wiedergegeben:

- Durch den Einsatz magnetischer Partikel und Felder lassen sich die Phasenseparationszeiten von ATPS, besonders im Falle von Polymer/Polymer-ATPS wie PEG/Dextran, drastisch verkürzen
- Die magnetischen Partikel müssen sich in der Dispersphase des Zweiphasensystems anreichern um eine nennenswerte Beschleunigung der Phasenseparation zu erreichen
- Neben der magnetischen Kraftwirkung ist auch die, durch unterschiedliche Tropfengrößen und damit verbundene unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten getriebene, Koaleszenz für die Beschleunigung der Phasenseparation verantwortlich
- Um die magnetischen Partikel aus dem ATPS abtrennen zu können, sollten diese eine Größe im Mikrometerbereich aufweisen (zur Beschleunigung der Phasenseparation kamen in den Arbeiten auch Nanopartikel in Form von Ferrofluiden zum Einsatz)

In die zweite Kategorie, also Arbeiten in denen unmagnetische, funktionalisierte Partikel zur Erhöhung der Selektivität und Kapazität von ATPS eingesetzt wurden, zählen [Hedman 1984], [Mattiasson 1986], [Ku 1989a, b], [Kondo 1993], [Kwon 1999] und [Roobol-Boza 2004]. In diesen Arbeiten wurden trotz der prinzipiellen Gemeinsamkeit unterschiedliche Verfahrensabläufe, ATPS, Partikel und Modellproteine verwendet. Tabelle 2-3 zeigt eine Übersicht über bestimmte Charakteristika der, in den oben zitierten Arbeiten, untersuchten Systeme incl. Methoden. Der Vollständigkeit und Vergleichbarkeit halber wurde auch die Arbeit von Suzuki *et al* [Suzuki 1995], in der magnetische Partikel eingesetzt wurden, mit aufgelistet.

Tabelle 2-3: Übersicht über Literaturstellen in denen funktionalisierte Partikel in A TPS zur Bioproduktaufarbeitung eingesetzt wurden (rDNA markiert rekombinante Zellkulturen)

Quelle	ATPS	Partikel	d, μm	Ligand	Rohextrakt	Zellfrei?	Zielprotein(e)	Elutionsmethode
[Hedman 1984]	PEG 4000 / KH ₂ PO ₄	PEGylated Sepharose®CL-6B	40 - 165	Cibacron Blue	S. Cerevisae Homogenisat	Nein	ADH (=Alkohol Dehydrogenase)	Außerhalb ATPS in Chromatographiekolonne
[Hedman 1984]	PEG 4000 / KH ₂ PO ₄	PEGylated Sepharose®CL-6B	40 - 165	IgG	Modelllösung	--	Protein A	Außerhalb ATPS in Chromatographiekolonne
[Mattiasson 1986]	PEG 8000 / Reppail-PES	PEGylated Sepharose®CL-2B	60 - 200	Cibacron Blue	S. Cerevisae Homogenisat	Nein	ADH	Außerhalb ATPS in Chromatographiekolonne
[Ku 1989a, b]	PEG 8000 / Dextran	Sepharose®CL-6B	40 - 165	Cibacron Blue	S. Cerevisae Homogenisat (rDNA)	Ja	Pyruvat Kinase, ADH	Im ATPS
[Ku 1989a, b]	PEG 8000 / Dextran	Sepharose®4 B	40 - 165	Anti-PK	S. Cerevisae Homogenisat (rDNA)	Ja	Pyruvat Kinase	Im ATPS
[Kondo 1993]	PEG 4000 / KH ₂ PO ₄	Poly(Styrol/Acrylamid)	0,33	Human g-Globulin	Escherichia Coli Homogenisat (rDNA)	Nein	Fusion Protein of IgG and Albumin binding Domains	Außerhalb ATPS im Batch-Modus
[Suzuki 1995]	PEG 8000 / KH ₂ PO ₄	Eudragit-Mag	kA	IgG	Escherichia Coli Homogenisat (rDNA)	Ja	Protein A	Außerhalb ATPS im Batch-Modus
[Kwon 1999]	PEG 8000 / Dextran	Sepharose®CL-6B	40 - 165	IDA + Cu ²⁺	Modelllösung	--	Lysozym aus HEW	Im ATPS
[Roobol-Boza 2004]	Tween 20 / Dextran	BD Talon® Cobalt Ion based Resin	kA	Co ²⁺	P. Pastoris (rDNA)	Nein	11 b-Hydroxysteroid Dehydrogenase	Außerhalb ATPS im Batch-Modus

Für die vorliegende Arbeit wichtige Erkenntnisse aus den zitierten Arbeiten (siehe auch Tabelle 2-3) sind u.a.:

- Bereits [Hedman 1984] und [Mattiasson 1986] setzten Sorbentien ein, die sich in der Oberphase des ATPS anreicherten, während andere Feststoffe wie Zelltrümmer in die Unterphase tendierten. Der Einsatz der ATPS führte somit durch Partikel-Fraktionierung zu einer selektiven Fest-flüssig Trennung.
- Durch PEGylierung, also der Funktionalisierung der Sorbentien mit PEG, kann eine Tendenz der Sorbentien sich in der PEG-reichen Phase anzureichern hergestellt bzw. verstärkt werden. Allerdings sind die Zusammenhänge komplexer als man es sich wünschen würde: [Hedman 1984] stellte fest, dass relativ unpolare Liganden wie Cibacron Blue die Tendenz in die PEG-reiche Phase verstärken, während noch unpolare Liganden wie Octyl-Gruppen diese Tendenz wieder umkehren können. Hedman *et al* fanden hierfür keine Erklärung.
- Fast alle zitierten Arbeiten versuchten ein Protein durch die Affinitätsfunktion in eine Phase des ATPS zu „ziehen“, in der sich das Protein sonst nicht anreichern würde, aber nur [Ku 1989a, b] haben sich diese Eigenschaft auch zur Elution der Partikel im ATPS zu Nutze gemacht. Im Falle der Arbeit von Kwon *et al* [Kwon 1999] ist nicht klar, ob die Elution mit einem Ausschluss des Proteins aus der Phase, in der sich die Adsorbentien anreicherten, einherging.
- [Ku 1989a, b] schlagen vor, die Adsorption in einer einphasigen Lösung durchzuführen und erst anschließend ein ATPS zu bilden um kinetische Hemmungen auszuschließen. Für die Elution fanden sie allerdings experimentell und theoretisch, dass die Durchführung der Elution im ATPS die Gleichgewichtslage betreffend vorteilhaft ist, die Kinetik war allerdings um den Faktor 10 schlechter (3 min Adsorption, 30 min Elution).
- [Kondo 1993] weisen auf die kinetischen Vorteile des Einsatzes unporöser, submikroner Partikel hin.
- In keiner der Arbeiten wurde von einer Störung des Adsorptionsgleichgewichts durch die phasenbildenden Polymere berichtet, allerdings können hohe Salzgehalte wie in PEG/Salz-ATPS das Adsorptionsgleichgewicht, beispielsweise von Enzymen auf Cibacron Blue®, empfindlich stören [Hedman 1984].
- Die Phasentrennung erfolgte bei allen Arbeiten in Zentrifugen (außer [Suzuki 1995]). Die behandelten Volumina betragen meist wenige mL, maximal 20 mL (außer ca. 1L bei [Mattiasson 1986], hier wurde ein Standzylinder stehen gelassen bis die

Phasenseparation abgeschlossen war). Die an der Phasengrenze absedimentierten Partikel wurden dann vom ATPS getrennt und außerhalb eluiert.

2.4.2 Vorstellung des neuen MEP-Konzepts

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit sah vor, ein Verfahren zu konzipieren und zu untersuchen, welches magnetische Mikro- oder Nanosorbentien in Kombination mit wässrigen Zweiphasensystemen einsetzt um Proteine selektiv aus feststoffhaltigen, komplexen Zuläufen wie Fermentationsbrühen oder Zellhomogenisaten aufzureinigen.

Nach Literaturrecherche und ersten Vorversuchen sollte das Verfahrenskonzept folgende Punkte berücksichtigen:

- Es sollen unporöse, superparamagnetische Mikrosorbentien eingesetzt werden, um eine schnelle Adsorptions- und Desorptionskinetik sowie eine vollständige Dispergierung bei ausgeschaltetem Feld zu gewährleisten (Erfahrungen aus der HGMF-Forschung [Franzreb 2006b])
- Es soll ein ATPS zum Einsatz kommen, in dem kostengünstige Stoffe in vergleichsweise geringen Konzentrationen eingesetzt werden
- Die phasenbildenden Stoffe sowie die Magnetpartikel müssen, um einen kostengünstigen und nachhaltigen Prozess zu ermöglichen, recycelt werden
- Die Adsorptions- und Desorptionsschritte sollen in einem einphasigen System erfolgen, um kinetische Hemmungen auszuschließen (Erfahrungen von [Ku 1989a])
- Im ATPS sollen sich die beladenen Sorbentien in einer Phase anreichern, während andere Proteine und weitere Verunreinigungen in die andere Phase tendieren (Erfahrungen von [Ku 1989a] und [Suzuki 1995])
- Die Phase mit den Sorbentien muss die Dispersphase sein. Allerdings dürfen die Magnetpartikel nicht durch die magnetische Kraftwirkung aus den dispersen Tropfen herausgezogen werden (Erfahrungen von [Wikström 1987])

Für ein solches Verfahren scheinen mizellare ATPS, also AMTPS (siehe auch Kapitel 2.2.2), die meisten Kriterien zu erfüllen und das größtmögliche Maß an Flexibilität zu bieten. Die Einsatzstoffe sind vergleichsweise kostengünstig, man braucht nur wenige Massenprozent einer einzigen Komponente in wässriger Lösung um ein ATPS zu bilden und sie sind durch die Temperaturabhängigkeit reversibel schaltbar. Durch ihre Eigenschaft, hydrophile Proteine meist aus der (fast immer) dispersen Koazervatphase auszuschließen, wurden sie bereits als hervorragende Basis-ATPS für Affinitätsextraktionen vorgeschlagen ([Saitoh 1995a]). Durch die meist sehr hohe Viskosität der Koazervatphase ([Minuth 1997]) ist die Gefahr, dass die

Magnetpartikel durch magnetische Kraftwirkung aus dem dispersen Tropfen herausgezogen werden, eher gering.

Die Kombination von AMTPS und magnetischen Mikrosorbentien führte in dieser Arbeit zur Konzipierung von neuartigen Magnetischen Extraktionsphasen (MEP) und einem zugehörigen Verfahren zur Bioproduktaufarbeitung, dass in Abbildung 2-14 schematisch dargestellt ist.

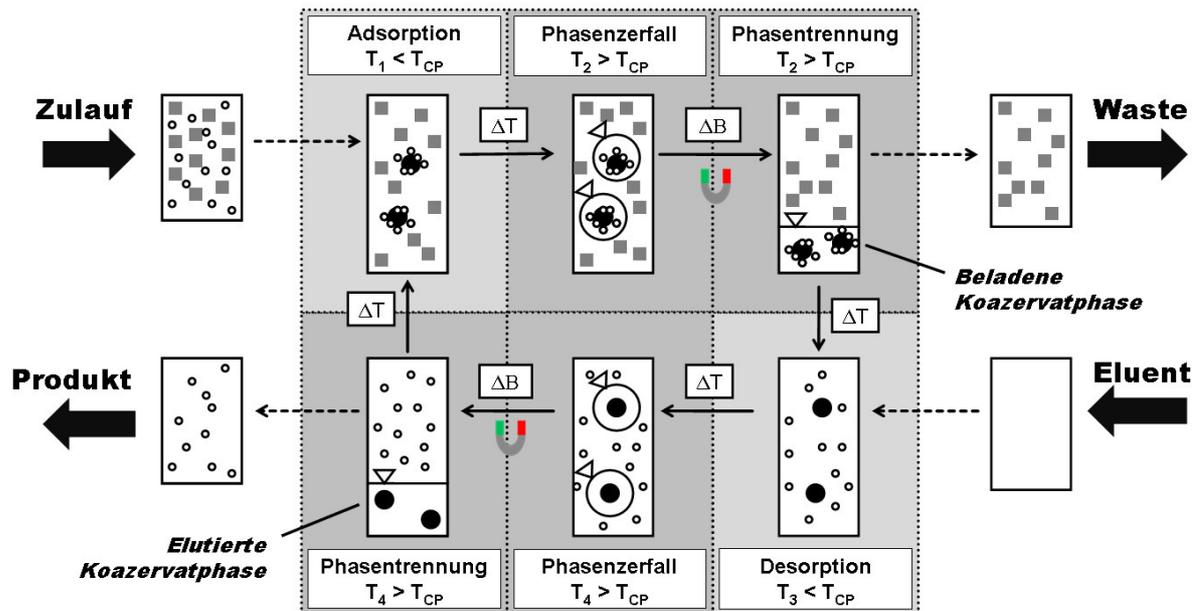


Abbildung 2-14: Vorgeschlagener (schematischer) Verfahrensablauf bei der Bioproduktaufarbeitung mittels Magnetischer Extraktionsphasen (MEP)

In dem Verfahren werden die ATPS-bildenden Tenside zusammen mit den magnetischen Mikrosorbentien bei einer niedrigen Temperatur (kein ATPS gebildet) gemischt, wodurch das Zielmolekül selektiv an die Partikel adsorbiert. Durch Temperaturerhöhung (ΔT) bildet sich ein ATPS in dessen Dispersphase nur die magnetischen Mikrosorbentien akkumulieren, alles nicht adsorbierte Material bleibt außerhalb. Durch Einsatz eines inhomogenen Magnetfeldes (ΔB) wird die Phasentrennung beschleunigt. Der Überstand (im Beispiel bildet die Koazervatphase die Unterphase) kann als Waste verworfen werden. Nach Zugabe eines Elutionsmittels und Erniedrigung der Temperatur aus dem Zweiphasengebiet heraus erfolgt die Desorption. Nach erneutem Temperatur-induzierten Phasenzерfall und Separation im Magnetfeld kann der Überstand als Produkt abgezogen, und die Magnetpartikel sowie das Tensid wieder verwendet werden. Durch die Eigenschaft von AMTPS nahezu alles Tensid in der Koazervatphase zu akkumulieren, geht im Waste- und Produktstrom relativ wenig Tensid verloren und das meiste kann im Prozess gehalten werden. Weitere wichtige Aspekte der vorliegenden Arbeit, bezogen auf das Verfahrensschema in Abbildung 2-14, sind:

- Gleichgewicht der Phasentrennung mizellarer ATPS sowie das Verteilungsverhalten von magnetischen Sorbentien, Proteinen und Verunreinigungen
- Funktionalisierung der magnetischen Sorbentien sowie die Gleichgewichtslage von Ad- und Desorption
- Kinetik der Phasentrennung im Magnetfeld
- Interferenzen bei der simultanen Adsorption und Extraktion
- Test des Gesamtverfahrens anhand von Modellsystemen im Labor- und halotechnischen Maßstab

In den folgenden Kapiteln werden die theoretischen und experimentellen Ergebnisse zu den oben genannten Punkten in systematischer Form dargelegt und diskutiert.

3 Theoretischer Teil

3.1 Verteilungsverhalten von Feststoffen in Flüssig-flüssig-Dispersionen

Um das Verteilungsverhalten von partikulären Stoffen in Flüssig-flüssig Dispersionen zu verstehen, ist es zweckmäßig zunächst geometrische Überlegungen anzustellen. Gelangt ein Partikel in den Bereich der Flüssig-flüssig-Phasengrenze, so werden sowohl der Ober- und Unterphase Teile der Partikeloberfläche zugewandt, als auch ein Teil der Phasengrenze „abgeschirmt“. Abbildung 3-1 zeigt eine gängige Darstellung dieses Phänomens (nach [Walter 1985]), in der auch der für die folgende mathematische Beschreibung wichtige Grenzwinkel θ definiert wird.

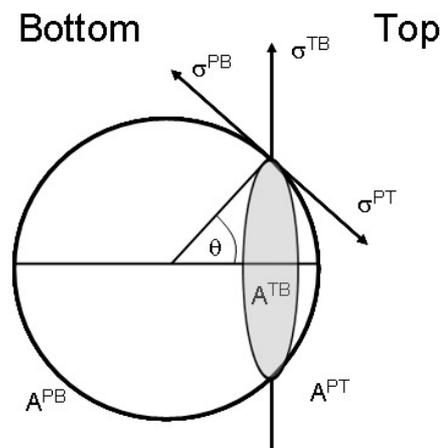


Abbildung 3-1: Adsorption und Grenzwinkel einer Kugel an einer Flüssig-flüssig-Phasengrenze

Die Flächen, die der Partikel der Unterphase (A_{PB}) bzw. der Oberphase (A_{PT}) zuwendet, sowie die abgeschirmte Phasengrenzfläche (A_{TB}) lassen sich mit Hilfe des Grenzwinkels und des Partikelradius R wie folgt berechnen:

$$A_{PB} = 2 \cdot \pi \cdot R^2 \cdot (1 + \cos \theta) \quad [\text{Gl. 3.1-01}]$$

$$A_{TB} = \pi \cdot R^2 \cdot (1 - \cos^2 \theta) \quad [\text{Gl. 3.1-02}]$$

$$A_{PT} = 2 \cdot \pi \cdot R^2 \cdot (1 - \cos \theta) \quad [\text{Gl. 3.1-03}]$$

Die gesamte freie Oberflächenenergie F setzt sich aus der Summe der Produkte der Grenzflächenenergien mal der zugehörigen Flächen zusammen, wobei die abgeschirmte Fläche negativ gezählt werden muss:

$$F = \sigma_{PB} \cdot A_{PB} + \sigma_{PT} \cdot A_{PT} - \sigma_{TB} \cdot A_{TB} \quad [\text{Gl. 3.1-04}]$$

Eine Beispielrechnung mit den Werten $\sigma_{PB} = 0,01 \text{ J m}^{-2}$, $\sigma_{PB} = 0,02 \text{ J m}^{-2}$ und $\sigma_{TB} = 0,015 \text{ J m}^{-2}$ ergibt den in Abbildung 3-2 gezeigten Verlauf der Grenzflächenenergien, wobei zur Verdeutlichung der prinzipiellen Unabhängigkeit des Verlaufs von der Partikelgröße eine mittels Division durch die Kugeloberfläche „normierte“ Grenzflächenenergie über dem Grenzwinkel aufgetragen wird.

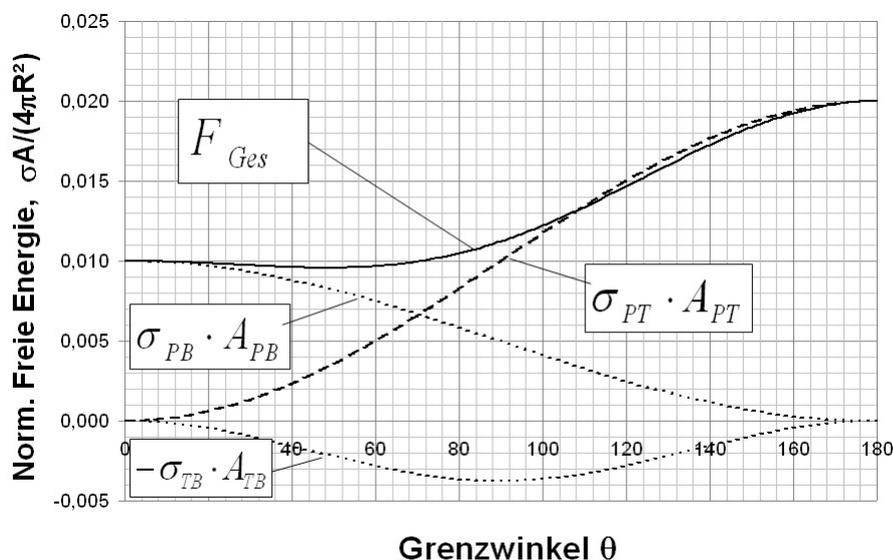


Abbildung 3-2: Beiträge zur freien Energie (normiert) eines runden Partikels an einer Flüssig-flüssig Phasengrenze aufgetragen gegen den Grenzwinkel θ

In diesem Beispiel hätte der Partikel, wenn er nur die Wahl zwischen Ober- und Unterphase hätte, eine klare Präferenz für die Unterphase aufgrund der niedrigeren Grenzflächenenergie. Die Phasengrenzflächenenergie sorgt jedoch dafür, dass sich der Partikel mit einem Grenzwinkel von ca. 48° an der Phasengrenze in einem Energieminimum befindet, sich also bevorzugt dort aufhalten wird. Dieser Grenzwinkel ist auch direkt mittels der Youngschen Gleichung berechenbar, die man durch Differentiation von Gl. 3.1-04 nach θ erhält.

$$\{F\}_{\min} \rightarrow \cos \theta = \frac{\sigma_T - \sigma_B}{\sigma_{TB}} \quad [\text{Gl. 3.1-05}]$$

Mit Hilfe dieser Gleichung hat schon Albertsson [Albertsson 1986] folgende zu unterscheidenden Fälle für das Verteilungsverhalten partikulärer Bestandteile in ATPS beschrieben:

- a) $\frac{|\sigma_T - \sigma_B|}{\sigma_{TB}} \geq 1$ und $\sigma_T > \sigma_B \rightarrow$ Partikel komplett in der Unterphase
- b) $\frac{|\sigma_T - \sigma_B|}{\sigma_{TB}} < 1$ und $\sigma_T > \sigma_B \rightarrow$ Partikel an der Phasengrenze: $0^\circ < \theta < 90^\circ$
- c) $\frac{|\sigma_T - \sigma_B|}{\sigma_{TB}} < 1$ und $\sigma_T = \sigma_B \rightarrow$ Partikel an der Phasengrenze: $\theta = 90^\circ$
- d) $\frac{|\sigma_T - \sigma_B|}{\sigma_{TB}} < 1$ und $\sigma_T < \sigma_B \rightarrow$ Partikel an der Phasengrenze: $90^\circ < \theta < 180^\circ$
- e) $\frac{|\sigma_T - \sigma_B|}{\sigma_{TB}} \geq 1$ und $\sigma_T < \sigma_B \rightarrow$ Partikel komplett in der Oberphase

Diese Unterscheidung ist offensichtlich nur von den Grenzflächenenergien und nicht von der Partikelgröße abhängig. Jedoch beschränkt sich diese Betrachtung auf die Oberflächenkräfte und vernachlässigt sowohl das Gewicht als auch die Brownsche Bewegung. Eine sehr anschauliche, kombinierte Darstellung dieser drei Einflüsse als Funktion der Partikelgröße findet sich bei [Hoeben 2004]. Die von ihm abgeleiteten Ausdrücke liefern sowohl die Energie, die aufgewendet werden muss um einen adsorbierten Partikel von der Phasengrenze zu entfernen (ΔE_{Ads}), als auch die Energie ΔE_G , die frei wird, wenn sich der Partikel im Schwerfeld um eine seinen halben Durchmesser messende Strecke bewegt (was ausreicht um sich gerade von der Phasengrenze zu befreien).

$$\Delta E_{Ads} = -\frac{\pi}{4} \cdot d_p^2 \cdot \sigma_{TB} \cdot (1 + \cos \theta)^2 \quad [\text{Gl. 3.1-06}]$$

$$\Delta E_G = \pm \frac{\pi}{12} \cdot d_p^3 \cdot (\rho_p - \rho_i) \cdot g \quad [\text{Gl. 3.1-07}]$$

In Gl. 3.1-07 bezeichnet ρ_i eine Durchschnittsdichte der beiden flüssigen Phasen. Berechnet man diese Energien mit den Zahlenwerten $\sigma_{TB} = 0,03 \text{ J m}^{-2}$, $\theta = 90^\circ$ und $(\rho_p - \rho_i) = 200 \text{ kg m}^{-3}$, sowie einer Temperatur von 298 K, erhält man die in Abbildung 3-3 dargestellte Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser (nach [Hoeben 2004]):

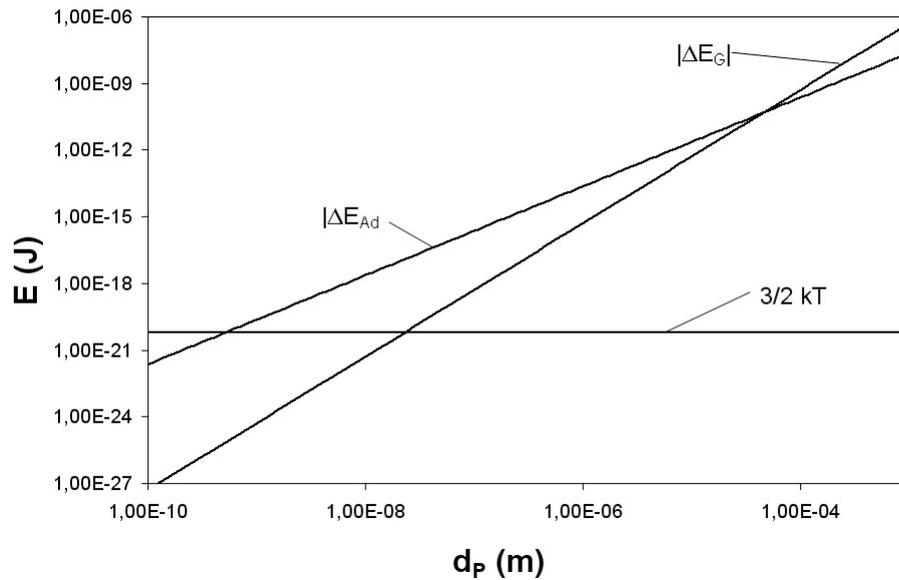


Abbildung 3-3: Absolutwerte von ΔE_G und ΔE_{Ad} für die Entfernung eines runden Partikels von einer horizontalen Phasengrenze aufgetragen gegen den Partikeldurchmesser (nach [Hoeben 2004])

Aus Abbildung 3-3 wird ersichtlich, dass sich große Partikel (hier größer als $10 \mu\text{m}$) von den Oberflächenkräften nicht beeinflussen lassen und die Gravitation das Verhalten dominiert. Sehr kleine Partikel können aufgrund ihrer Brownschen Bewegung ebenfalls nicht an der Phasengrenze gehalten werden und verteilen sich entsprechend ihrer Oberflächeneigenschaften auf die beiden flüssigen Phasen. Dazwischen gibt es jedoch einen, je nach Systembeschaffenheit großen oder kleinen Größenbereich, in dem sich die Partikel an der Phasengrenze anreichern. So beobachteten zum Beispiel Helfrich *et al* [Helfrich 2005] bei Experimenten mit Gold- und Silberkolloiden in ATPS eine Tendenz zur Adsorption an der Phasengrenze erst bei einer Partikelgröße $> 100 \text{ nm}$, darunter ist die thermische Eigenbewegung zu groß. Wie vollständig die Adsorption an der Phasengrenze ist, hängt von dem Verhältnis frei werdender Energie zur thermischen Energie ab, wobei manchmal von einer Boltzmann-Statistik ausgegangen wird [Albertsson 1986], andere Autoren aber auch über kinetische Modelle zu brauchbaren Beschreibungen kommen [Hoeben 2004].

Die Adsorption von partikulären Stoffen an Phasengrenzflächen kann man sich auf unterschiedliche Weisen zu Nutze machen. So wurde schon vor hundert Jahren eine Methode vorgeschlagen, um Emulsionen auf diesem Weg zu stabilisieren [Pickering 1907]. Diese sog. „Pickering-Emulsions“ sind bis heute Gegenstand aktiver Forschung [Levine 1989], [Binks 2000], [Melle 2005]. Ein weiterer Ansatz ist, die unterschiedliche Adsorbierbarkeit verschiedener Materialien zur Realisierung von Separationsprozessen einzusetzen [Hoeben 2004].

Eine Strategie, die Adsorption an der Phasengrenze gezielt zu steuern, muss Oberflächenkräfte betreffen. Hier kann man zum einen auf Wechselwirkungen zwischen den Solventien

und den Partikeloberflächen setzen, oder man versucht die Phasengrenze zu beeinflussen, zum Beispiel mit Tensiden. Eine weitere Strategie ist die elektrische Polarisation der Phasengrenze durch den Einsatz von Salzen, deren Ionen ein unterschiedliches Verteilungsverhalten aufweisen [Leunissen 2007]. Bei der Arbeit mit biologischen Systemen, die zwangsläufig in wässrigen Systemen unter Einsatz von pH-stabilisierenden Puffern und mindestens isotonischen Salzkonzentrationen ablaufen, ist es absolut notwendig diese elektrischen Effekte zu berücksichtigen, da sie zum Einen die Adsorption an der Phasengrenze begünstigen, zum Anderen auch zu einer Präferenz für eine der beiden flüssigen Phasen führen können. Eine grundsätzliche theoretische Überlegung aus [Leunissen 2007] soll diesen Sachverhalt verdeutlichen. Gl. 3.1.08 zeigt die Berechnungsformel der „elektrostatischen Selbstenergie“ eines ladungstragenden, monovalenten Teilchens mit dem Radius R in einem Medium mit der Dielektrizitätskonstante ϵ_i . Hierbei bezeichnet e die Elementarladung.

$$E_{el} = \frac{e^2}{2 \cdot \epsilon_i \cdot R} \quad [\text{Gl. 3.1-08}]$$

Da alle Systeme eine minimale Energie anstreben, wird sich dieses geladene Teilchen vorzugsweise in der flüssigen Phase mit der höheren dielektrischen Konstante anreichern. Verändert also ein Salz die dielektrischen Eigenschaften einer Phase in günstiger Weise, wird diese das geladene Teilchen leichter aufnehmen.

Zur Abrundung dieser theoretischen Überlegungen dient eine Beobachtung aus dem Bereich des Verteilungsverhaltens niedermolekularer Substanzen. Mizellare ATPS sind aufgrund des hohen Wassergehalts der tensidreichen Phase sehr interessant für die Extraktion von aromatischen, ladungstragenden Molekülen wie Azo-Farbstoffen aus wässrigen Strömen [Doroschuk 2005]. Trotz der aromatischen Natur lassen sich diese Moleküle, aufgrund ihrer elektrischen Eigenschaften, nämlich nicht mittels gewöhnlicher organischer Lösemittel extrahieren. Die Präferenz vieler dieser Moleküle zur tensidreichen Phase eines mizellaren ATPS gegenüber der wässrigen Phase ist möglich, da die elektrischen die hydrophoben Wechselwirkungen nicht vollständig aufwiegen, wie es bei organischen Phasen der Fall ist.

3.2 Phasentrennung von ATPS und MEP

3.2.1 Gleichgewicht der Phasentrennung

3.2.1.1 Das Phasendiagramm

Die meisten theoretischen Ansätze zur Beschreibung des Phasengleichgewichtes von ATPS leiten sich aus der chemischen Thermodynamik wässriger Polymerlösungen ab. Als Konzentrationsmaße finden hier neben dem Massenbruch (w_i) der Molenbruch (x_i) sowie der

Volumenbruch (ϕ_i) Anwendung (Gl. 3.2-01 bis 3.2-03), wobei m die Masse, n die Stoffmenge und V das Volumen bezeichnet.

$$w_i = \frac{m_i}{m_{Ges}} \quad [\text{Gl. 3.2-01}]$$

$$x_i = \frac{n_i}{n_{Ges}} \quad [\text{Gl. 3.2-02}]$$

$$\phi_i = \frac{V_i}{V_{Ges}} \quad [\text{Gl. 3.2-03}]$$

Da die Dichteänderungen zwischen wässriger Lösung, polymerreicher Phase und salzreicher Phase oft nur sehr gering sind, lassen sich Massen- und Volumenbruch ungefähr gleichsetzen.

$$\phi_i \cong w_i \quad [\text{Gl. 3.2-04}]$$

In wässrigen Lösungen von nur einem Polymer bzw. Tensid lassen sich der Molen- und Massenbruch mit Hilfe der Molgewichte M und M_W (M = Molmasse des gelösten Stoffes und M_W = Molmasse von Wasser) ineinander umrechnen:

$$w = \frac{x \cdot M}{x \cdot M + (1 - x) \cdot M_W} \quad [\text{Gl. 3.2-05}]$$

$$x = \frac{\frac{w}{M}}{\frac{w}{M} + \frac{(1 - w)}{M_W}} \quad [\text{Gl. 3.2-06}]$$

Um zu bestimmen, welche Konzentrationen nach einem Phasenzersfall in den einzelnen Phasen vorliegen, benötigt man zusätzlich zur Phasengrenzkurve (=Binodale) die Gleichgewichtslinien, die sog. Konoden (engl. Tie-Line). Häufig werden die physikochemischen Eigenschaften von ATPS mit Hilfe der Konodenlänge (Tie-Line Length = TLL) ausgedrückt, da sich mit steigender TLL auch die Zusammensetzungen der Phasen ändern [Kula 1999]. Ein wichtiger Punkt im Phasendiagramm ist derjenige, an dem die Konodenlänge gerade Null ist (TLL = 0), dieser wird im Allgemeinen als kritischer Punkt bezeichnet.

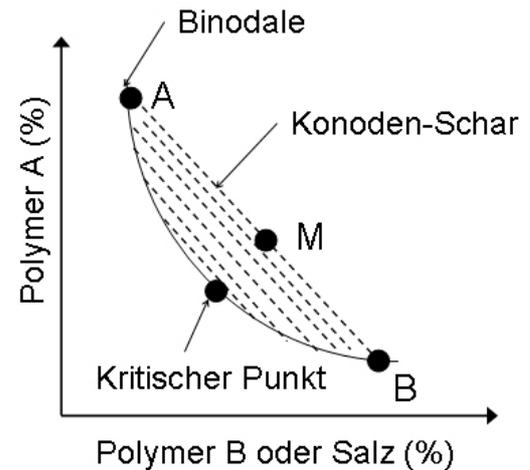


Abbildung 3-4: Binodale mit Konoden und kritischem Punkt

Zur Bestimmung des Phasenverhältnisses findet das „Hebelarmgesetz“ Anwendung. Eine Ableitung für ATPS findet sich bei [Albertsson 1986].

$$R = \frac{V_T}{V_B} = \frac{w_{i,B} - w_{i,0}}{w_{i,0} - w_{i,T}} = \frac{\overline{MB}}{\overline{AM}} \quad [\text{Gl. 3.2-07}]$$

Das Volumenverhältnis von Ober- und Unterphase R lässt sich mit dieser Formel berechnen, wobei zunächst bekannt sein muss, welche Phase die Oberphase bildet. Dies hängt von den jeweiligen Dichten ab und muss meist experimentell bestimmt werden. Jedes Phasendiagramm gilt für eine gewisse Temperatur, wobei die Temperaturabhängigkeit bei klassischen ATPS für gewöhnlich nur schwach ausgeprägt ist [Hatti-Kaul 2001].

Im Falle der mizellaren ATPS ist die Temperaturabhängigkeit im Gegensatz dazu entscheidend. Die Phasendiagramme erhält man hier durch Auftragen der Temperatur über dem Massenanteil des mizellbildenden Tensids in Wasser. Oberhalb der Binodalkurve (bei manchen Systemen auch unterhalb) zerfällt die Lösung in eine tensidreiche und eine tensidarme Phase. Für die tensidreiche Phase wird üblicherweise die Bezeichnung Koazervatphase geführt (nach [Gullickson 1989]), die tensidarme wird meist als wässrige Phase bezeichnet. Der Tensidgehalt der wässrigen Phase ist für gewöhnlich sehr gering und liegt meist im Bereich der kritischen Mizellkonzentration (Critical Micellar Concentration = CMC) [Blankschein 1986].

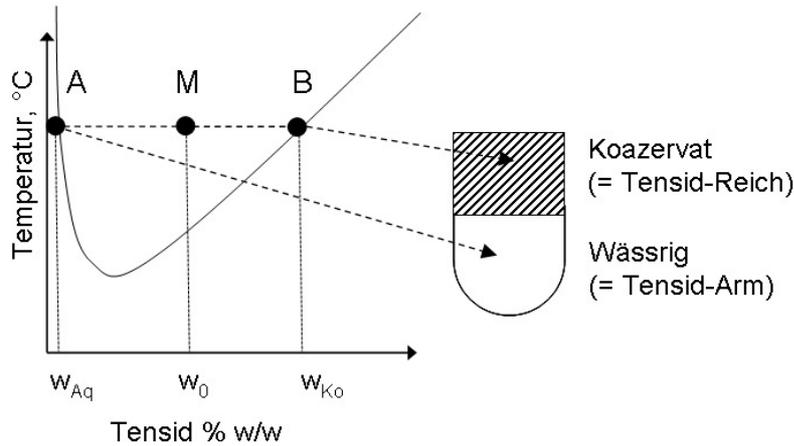


Abbildung 3-5: Schematische Binodalkurve eines mizellaren ATPS

Analog zur Ableitung von Albertsson [Albertsson 1986] lässt sich auch für mizellare ATPS ausgehend von der Massenbilanz das Hebelarmgesetz ableiten:

$$w_0 = \frac{m_0}{m_{Ges}} = \frac{w_{Ko} \cdot \rho_{Ko} \cdot V_{Ko} + w_{Aq} \cdot \rho_{Aq} \cdot V_{Aq}}{\rho_{Ko} \cdot V_{Ko} + \rho_{Aq} \cdot V_{Aq}} \quad [\text{Gl. 3.2-08}]$$

Für den Dispersphasenanteil ε (die disperse Phase ist in diesem Fall die Koazervatphase) erhält man nach Umformung

$$\varepsilon = \frac{V_{Ko}}{V_{Aq} + V_{Ko}} = \frac{w_0 - w_{Aq}}{w_{Ko} - w_{Aq} + w_0 \cdot \left(1 - \frac{\rho_{Ko}}{\rho_{Aq}}\right)} \quad [\text{Gl. 3.2-09}]$$

Aufgrund der normalerweise sehr kleinen Dichtedifferenzen liegt der Quotient der Dichten nahe bei eins, was sich zur Vereinfachung der Berechnungsformel des Hebelarmgesetzes ausnutzen lässt:

$$\frac{\rho_{Ko}}{\rho_{Aq}} \cong 1 \rightarrow \varepsilon = \frac{w_0 - w_{Aq}}{w_{Ko} - w_{Aq}} = \frac{\overline{AM}}{\overline{AB}} \quad [\text{Gl. 3.2-10}]$$

Das Phasenverhältnis R lässt sich direkt aus dem Dispersphasenanteil berechnen, wobei auch hier bekannt sein muss, welche Phase die Ober- und welche die Unterphase bildet.

$$\text{Koazervat = Top: } R = \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \quad [\text{Gl. 3.2-11}]$$

$$\text{Koazervat = Bottom: } R = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \quad [\text{Gl. 3.2-12}]$$

3.2.1.2 Klassische ATPS

Um Lösungsgleichgewichte von Polymeren in niedermolekularen Solventien zu beschreiben werden meist Gittertheorien nach Art der Flory-Huggins-Theorie verwendet. In diesen Theorien wird die Gibbsche Energie (=freie Enthalpie G) des Gesamtsystems mit Hilfe kombinatorischer Überlegungen bestimmt, wobei der enthalpische Anteil aus den möglichen Wechselwirkungen der Molekülsegmente untereinander und der entropische Anteil aus den möglichen Anordnungen der Polymere im Gitter berechnet wird. Johansson et. al [Johansson 1998] geben den unten stehenden Ausdruck für die Mischungsenergie einer beliebigen Polymerlösung mit m Komponenten in einem fiktiven Gitter mit N Plätzen an.

$$\Delta G_{Mix} = \Delta H_{Mix} - T \cdot \Delta S_{Mix} = N \cdot \left\{ \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m \phi_i \phi_j w_{ij} + RT \sum_{i=1}^m \frac{\phi_i}{M_i} \ln \phi_i \right\} \quad [\text{Gl. 3.2-13}]$$

Die Variablen ϕ_i bezeichnen die Volumenbrüche der einzelnen Moleküle, w_{ij} die binären Wechselwirkungsparameter der Moleküle untereinander und M_i die Molmassen. Eine Phasengrenzkurve lässt sich berechnen durch Nullstellensuche der Funktion für ΔG_{Mix} , da eine positive Änderung der Gibbschen Energie die Mischbarkeit ausschließt. Praktische Probleme bei der Berechnung bereiten hier vor allem die aufwendig zu bestimmenden WW-Parameter w_{ij} , weshalb die Vorhersage des Phasenverhaltens eines zufällig gewählten ATPS bis heute praktisch unmöglich ist. Der interessierte Leser sei hier auf zum Einstieg in diese Problematik geeignete Fachartikel verwiesen ([Cabezas Jr. 1996], [Johansson 1998]), Gegenstand der vorliegenden Arbeiten sind diese Arten von Berechnungen jedoch nicht.

Eine andere Art das Verständnis der Physikochemie der Phasentrennung von ATPS zu vertiefen, ist der Versuch zu verstehen, wie die Polymere untereinander und mit Wasser interagieren. Spricht man beispielsweise von der „Inkompatibilität“ [Kula 1999] zweier hydrophiler Polymere in wässriger Lösung, so sind damit meistens die inkompatiblen Wasserstrukturen gemeint, welche durch nichtkovalente Wechselwirkungen rund um die Polymere und dem Solvenz Wasser entstehen [Hatti-Kaul 2001], [Gupta 2002b]. Diese Wasserstruktur kann durch Zusatzstoffe wie z.B. Elektrolyte stark beeinflusst werden. Einerseits kann die Binodalkurve von Polymer/Polymer-ATPS durch die Zugabe von Salz verschoben werden, andererseits kann bei sehr hohen Salzgehalten (im Bereich mehrerer Massenprozent) sogar die Anwesenheit nur eines Polymers gemeinsam mit diesem Salz zur Bildung eines ATPS ausreichen. Polymer/Salz-ATPS kann man also als ein System verstehen, in dem das Salz das Polymer aus der Lösung zu drängen versucht, es „aussalzt“. Das Verhalten unterschiedlicher Salze kann man sich anhand der „Hofmeister-Reihe“ [Queiroz 2001] verdeutlichen, aus der man ablesen kann, welche Salze die Tendenz haben

einen anderen Stoff aus dem Wasser „auszusalzen“ [Ananthapadmanabhan 1987] bzw. die Löslichkeit zu erhöhen.

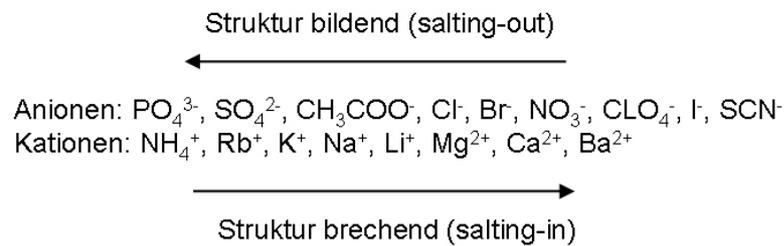


Abbildung 3-6: Hofmeister-Reihe (nach [Queiroz 2001])

In diesem Zusammenhang interessant sind neuartige ATPS, die aus Mischungen von zwei chaotropen (= Struktur brechenden) Salzen entstehen, also Salz/Salz-ATPS [Bridges 2007].

3.2.1.3 Mizellare ATPS

Das Phasentrennungsverhalten mizellarer Lösungen wurde von Blankschtein anhand von thermodynamischen Überlegungen umfassend beschrieben und aufgeklärt [Blankschtein 1986], [Puvvada 1990]. In seiner Theorie wird von zylindrischen oder sphärischen Mizellen ausgegangen, bei denen Temperaturunterschiede zu Änderungen der Größe und der intermizellaren Anziehungskräfte führen. Abbildung 3-7 veranschaulicht den Phasenerfall einer mizellaren Lösung (nach [Liu 1996]).

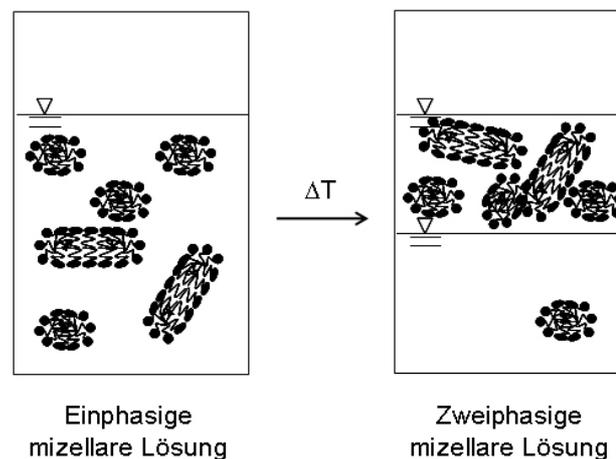


Abbildung 3-7: Temperaturinduzierter Phasenerfall einer mizellaren Lösung in eine mizellreiche- (Koazervat) und eine wässrige Phase (nach [Liu 1996])

Blankschtein definiert zwei für die Phasentrennung entscheidende physikalische Parameter: C ist ein Mass für die intermizellaren Anziehungskräfte und $\Delta\mu$ ein Mass für die Wachstumstendenz von Mizellen. Beide Parameter sind starke Funktionen der Temperatur und der Molenbrüche des Tensids in den jeweiligen Phasen (x_{Aq} und x_{Ko}). Zudem fließt über die

Konstante γ das Volumenverhältnis von einzelnen Tensid- und Wasser-Molekülen ein ([Blankschein 1986], [Lam 2005]).

$$C(x_{Aq}, x_{Ko}, T) = \frac{k \cdot T}{\gamma} \cdot \left(1 + \frac{3 \cdot \gamma - 2}{3}\right) \cdot \left[2 \cdot \left(\sqrt{x_{Aq}} + \sqrt{x_{Ko}}\right)^2 - 3 \cdot \sqrt{x_{Aq} \cdot x_{Ko}}\right] \quad [\text{Gl. 3.2-14}]$$

$$\Delta\mu(x_{Aq}, x_{Ko}, T) = k \cdot T \cdot \ln \left[\frac{\left(\frac{6}{3 \cdot \gamma - 2}\right)^2}{x_{Aq} \cdot x_{Ko} \cdot \left(\sqrt{x_{Aq}} + \sqrt{x_{Ko}}\right)^6} \right] \quad [\text{Gl. 3.2-15}]$$

Es hat sich gezeigt, dass die Parameter C und $\Delta\mu$ näherungsweise lineare Funktionen der Temperatur sind. Hat man also für einen gewissen Temperaturbereich die Phasenzusammensetzungen x_{Aq} und x_{Ko} gemessen, so lässt sich mit Hilfe der Messdaten eine lineare Regression von C und $\Delta\mu$ über der Temperatur T ausführen ([Lam 2005]):

$$C_{Reg}(T) = k \cdot (m_1 \cdot T + b_1) \quad [\text{Gl. 3.2-16}]$$

$$\Delta\mu_{Reg}(T) = k \cdot (m_2 \cdot T + b_2) \quad [\text{Gl. 3.2-17}]$$

Setzt man Gl. 3.2-14 mit Gl. 3.2-16 sowie Gl. 3.2-15 mit Gl. 3.2-17 gleich:

$$C(x_{Aq}, x_{Ko}, T) \equiv C_{Reg}(T) \quad [\text{Gl. 3.2-18}]$$

$$\Delta\mu(x_{Aq}, x_{Ko}, T) \equiv \Delta\mu_{Reg}(T) \quad [\text{Gl. 3.2-19}]$$

erhält man ein Gleichungssystem mit dem sich nach Vorgabe einer Temperatur T die beiden Unbekannten (x_{Aq} und x_{Ko}) und damit die Begrenzung des Zweiphasengebietes berechnen lassen (nach [Lam 2005]). Da dieses Gleichungssystem hochgradig nichtlinear ist, wurden derartige Berechnungen mit Hilfe der Software MathCad®2000 Professional, MathSoft Inc. durchgeführt (siehe dazu Anhang 9.5).

Ein vollständiges Phasendiagramm für ein nichtionisches Tensid⁴ in wässriger Lösung findet sich bei [Selber 2002b], siehe Abbildung 3-8. Das für uns interessante Zweiphasengebiet ist hier gestreift dargestellt. Die linke Begrenzungslinie bezeichnet die Zusammensetzung der wässrigen Phase, die rechte Linie die der Koazervat-Phase. Die Punkte am unteren und oberen Rand sind die kritischen Punkte, d.h. die Punkte an denen die Konodenlänge gerade Null ist. Bemerkenswert ist, dass die Linie der kritischen Mizellkonzentration (CMC) deutlich links von der Phasengrenzlinie der wässrigen Phase eingezeichnet ist, was im Widerspruch zu [Blankschtein 1986] bedeutet, dass der Tensidanteil in der wässrigen Phase deutlich höher ist als die CMC. Dieser Sachverhalt wurde auch schon von anderen Forschern beschrieben [Materna 2001], wobei der Unterschied dort vergleichsweise gering ausfiel (Faktor 2 höher). Ein weiteres Charakteristikum ist die obere Begrenzung des Phasengebietes. Der Tensidanteil in der Koazervatphase lässt sich nicht, wie man erwarten könnte, durch Erhitzen beliebig steigern; ab einer gewissen Temperatur zeigt sich ein retrogrades (rückschreitendes) Verhalten und die Lösung wird oberhalb der kritischen Temperatur wieder einphasig. Neben dem von Blankschtein beschriebenen Phasengebiet finden sich bei höheren Tensidanteilen und niedrigen Temperaturen Meso-Phasen, die in der Literatur auch Flüssig-Kristall-Phasen genannt werden [Panayotova 2004], welche allerdings nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

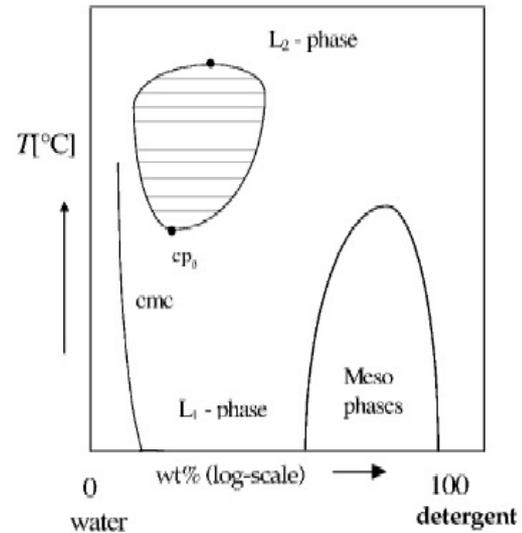


Abbildung 3-8: Komplettes Phasendiagramm eines mizellaren ATPS (aus [Selber 2002b])

3.2.2 Kinetik der Phasentrennung von Flüssig-flüssig Dispersionen

Die kinetische Beschreibung der Phasenseparation versucht im Allgemeinen den zeitlichen Verlauf einer Sedimentation oder Flotation wiederzugeben. Hierzu werden oftmals Sedimentationskurven, das heißt die Höhe der Dispersion über der Zeit, aufgetragen. Geht man von einem eindimensionalen System mit der Koordinate h (für Höhe) aus und definiert die Geschwindigkeit einer Bewegung entgegen dieser Koordinate als positiv, so ergibt sich als Definition:

⁴ Die hier geführte Bezeichnung „detergent“ steht für Tensid bzw. grenzflächenaktive Substanz. Es sei aber angemerkt, dass für Tensid im englischen Sprachgebrauch die Bezeichnung „Surfactant“ treffender ist, da die Bezeichnung „Detergent“ eher für kommerziell erhältliche Waschmittel verwendet wird.

$$v(t) = -\frac{dh}{dt} \quad [\text{Gl. 3.2-20}]$$

Die Sedimentationskurve $h(t)$ erhält man durch Integration von Gl. 3.2-20. Anschaulich gesprochen kommt der „Sedimentationsfront“ die „Koaleszenzfront“, also die aus Dispersphase neu am Boden gebildete bulk-Phase, entgegen. Diese erhält man (unter Annahme eines in etwa konstanten Dispersphasenanteils) durch Bilanzieren. Die folgenden Ausführungen beziehen sich aber nur auf die Sedimentationskurve:

$$h(t) = h_0 - \int_0^t v(t) dt \quad [\text{Gl. 3.2-21}]$$

In vielen Berechnungsmodellen hängt die Geschwindigkeit nicht von der Zeit ab und kann vor das Integral gezogen werden. Selbst in diesem vereinfachenden Fall ist die Bestimmung jedoch oftmals mathematisch aufwendig. Im Folgenden werden die gängigsten und in dieser Arbeit verwendeten Ansätze beschrieben.

3.2.2.1 Dimensionsanalytische Betrachtung

Um physikalische Vorgänge mit mehreren Einflussgrößen zu beschreiben, bietet sich oftmals die Methode der Dimensionsanalyse an, mit deren Hilfe sich Kennzahlen zur vereinfachten Beschreibung des Problems finden lassen. Hierzu dient zunächst eine Skizze mit Eintragung aller physikalisch relevanten Parameter (Abbildung 3-9). Diese physikalischen Parameter (hier insgesamt acht) werden nun in einer sogenannten Relevanzliste zusammengefasst (Tabelle 3-1, nach [Löffler 1992]). Die Dichte der Dispersphase wird hierbei zweckmäßigerweise mittels der Dichtedifferenz $\Delta\rho$ ausgedrückt. Zusätzlich zu den Größen sollten schon in der Relevanzliste die Einheiten (ausgedrückt nach dem SI-Einheitensystem) aufgeführt sein.

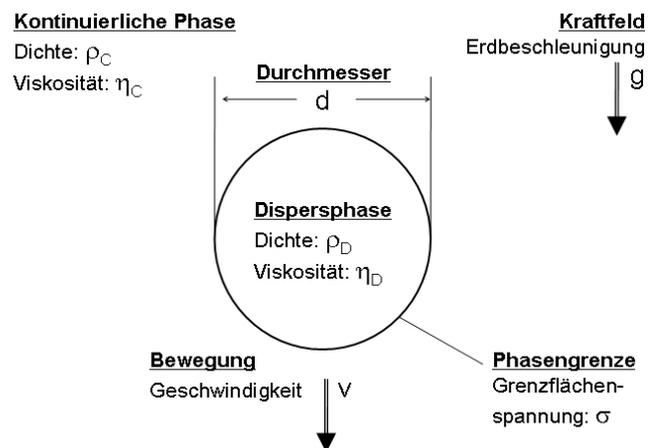


Abbildung 3-9: Skizze eines einzelnen dispersen Tropfens mit den für die Sedimentation physikalisch relevanten Größen

Tabelle 3-1: Relevanzliste zur Dimensionsanalyse der Sedimentation eines kugelförmigen Tropfens bzw. einer Gas-Blase im Schwerfeld

Symbol	Einheit	Physikalische Größe
d	[m]	Durchmesser
η_D	[kg m ⁻¹ s ⁻¹]	Viskosität der dispersen Phase
η_C	[kg m ⁻¹ s ⁻¹]	Viskosität der kontinuierlichen Phase
$\Delta\rho$	[kg m ⁻³]	Dichtedifferenz
ρ_C	[kg m ⁻³]	Dichte der kontinuierlichen Phase
σ	[kg s ⁻²]	Grenzflächenspannung
g	[m s ⁻²]	Erdbeschleunigung
v	[m s ⁻¹]	Geschwindigkeit

Nach Überprüfung, welche der sieben SI-Einheiten insgesamt für das vorliegende Problem relevant sind, lässt sich eine Matrix aufstellen, die alle notwendigen Informationen enthält (Tabelle 3-2):

Tabelle 3-2: Einheitenmatrix zur Dimensionsanalyse

		x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8
		d	η_D	η_C	$\Delta\rho$	ρ_C	σ	g	v
Masse	[kg]	0	1	1	1	1	1	0	0
Länge	[m]	1	-1	-1	-3	-3	0	1	1
Zeit	[s]	0	-1	-1	0	0	-2	-2	-1

Aus dem Buckingham-Theorem folgt, dass bei acht Größen und dem Matrix-Rang drei insgesamt fünf Pi-Produkte ausreichen, um das Problem zu beschreiben. Durch algebraische Umformungen [Löffler 1992] lassen sich je nach Vorgehen unterschiedliche Sätze an dimensionslosen Kennzahlen erhalten, wobei hier nur das Endergebnis dargestellt werden soll (Tabelle 3-3):

Tabelle 3-3: Aus der Dimensionsanalyse erhaltene Pi-Produkte

Π	Term	Bezeichnung	Abkürzung
Π_1	$\frac{d \cdot \rho_C \cdot v}{\eta_C}$	Reynolds-Zahl	Re
Π_2	$\frac{\rho_C \cdot \Delta\rho \cdot g \cdot d^3}{\eta_C^2}$	Archimedes-Zahl	Ar
Π_3	$\frac{\eta_D}{\eta_C}$	Viskositätsverhältnis	κ
Π_4	$\frac{d^2 \cdot \Delta\rho \cdot g}{\sigma}$	Eötvös-Zahl	Eö
Π_5	$\frac{g \cdot \eta_C^4 \cdot \Delta\rho}{\rho_C^2 \cdot \sigma^3}$	Mortimer-Zahl	M

Von diesen fünf Pi-Produkten reichen die ersten beiden (Reynolds- und Archimedes-Zahl) aus, falls man die Sedimentation von starren Körpern (z.B. Feststoffpartikel) betrachtet. Werden jedoch deformierbare Körper wie flüssige Tropfen oder Luftblasen betrachtet, kommen die weiteren Pi-Produkte (Viskositätsverhältnis, Eötvös- und Mortimer-Zahl) ins Spiel. Eine umfassende Beschreibung der relevanten Zusammenhänge findet sich bei Clift *et al* [Clift 1978]. Unter anderem findet man hier auch ein sehr aufschlussreiches Diagramm, mittels dem, bei gegebener Mortimer- und Eötvös-Zahl, die Reynolds-Zahl eines sedimentierenden oder aufsteigenden Tropfens bzw. einer Luftblase bestimmt werden kann. Eine Vereinfachung, die vorher getroffen wird betrifft das Viskositätsverhältnis, wobei angenommen wird, dass die disperse Phase nicht viel viskoser als die Conti-Phase sein darf (der Extremfall wäre der Festkörper mit unendlicher Viskosität).

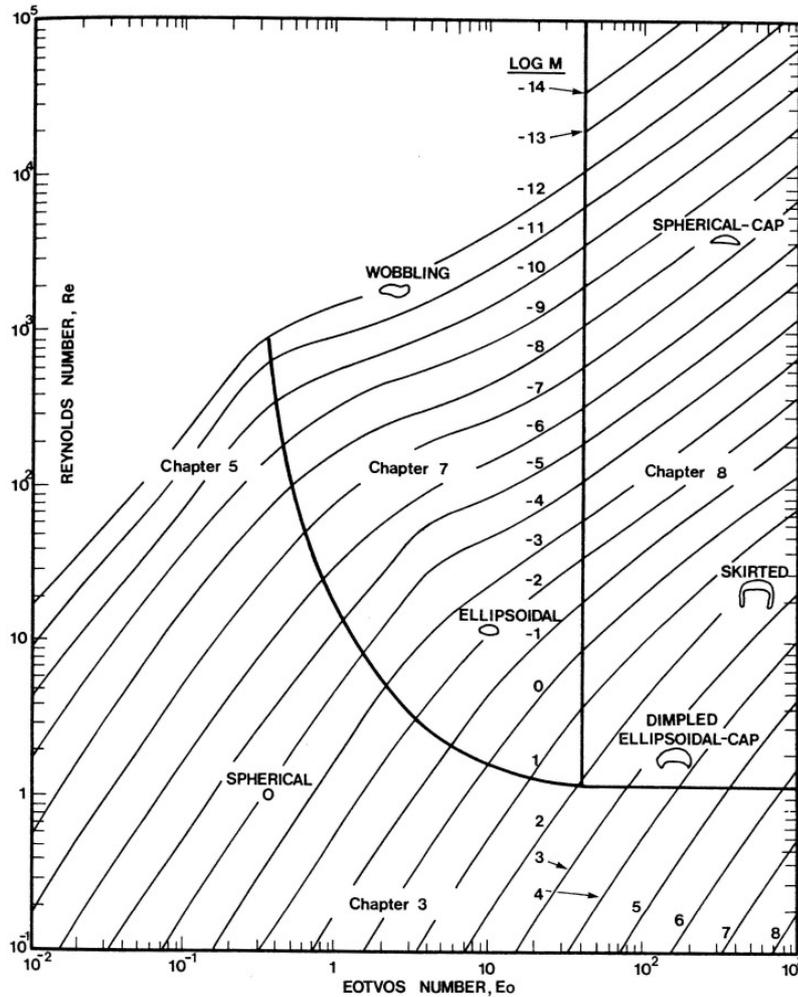


Abbildung 3-10: Abhängigkeit der Reynolds-, Eötvös und Mortimer-Zahl und Deformationszustände bei der Sedimentation bzw. Flotation von Tropfen oder Blasen (aus [Clift 1978])

Bemerkenswert in Abbildung 3-10 ist der abgedeckte Bereich. So werden jeweils ca. fünf Größenordnungen der Reynolds- und Eötvös-Zahl sowie 22 bei der Mortimer-Zahl abgedeckt. Auch die resultierenden Formen der Körper muten zunächst befremdlich an, können jedoch in der Natur durchaus beobachtet werden, zum Beispiel beim Aufsteigen großer Luftblasen in Wasser. Werden Festkörper betrachtet, so ist die Auftragung des Widerstandbeiwertes (c_w) über der Reynoldszahl zweckmäßiger (siehe z.B. [Löffler 1992]), was hier jedoch nicht näher behandelt werden soll.

3.2.2.2 Sedimentation im laminaren und turbulenten Bereich

Ein analytischer Ausdruck zur Berechnung der Sedimentationsgeschwindigkeit einer laminar umströmten starren Kugel in einem unendlich ausgedehnten Fluid wurde erstmals von Stokes gegeben ([Stokes 1845]). Dieser Ausdruck lautet:

$$v_{Stokes} = \frac{g \cdot \Delta\rho}{18 \cdot \eta_C} \cdot d^2 \quad [\text{Gl. 3.2-22}]$$

Durch Vergleich mit den zuvor abgeleiteten dimensionslosen Kennzahlen (Tabelle 3-3) lässt sich folgender Kennzahlzusammenhang aufstellen:

$$Re_{Stokes} = \frac{Ar}{18} \quad [\text{Gl. 3.2-23}]$$

Mittels einem dieser beiden Ausdrücke lässt sich bei Kenntnis aller erforderlichen Stoffdaten und der Kugelgröße die stationäre Sedimentationsgeschwindigkeit berechnen. Ist die bestimmte Reynoldszahl kleiner als 0,25, so kann man von laminarer Umströmung ausgehen und das Ergebnis als zutreffend betrachten ([Zimmels 1988], [Löffler 1992]). Ist die Reynoldszahl jedoch größer als 0,25 muss man von turbulenter Umströmung ausgehen und der von Stokes gefundene Zusammenhang verliert seine Gültigkeit. Aus den von Zimmels ([Zimmels 1988]) angegebenen Gleichungen zur Berechnung der Reynoldszahl im turbulenten Bereich kann nach Umformung ebenfalls ein Kennzahlzusammenhang hergestellt werden:

$$Re_{Zimmels} = \left(\frac{-4,80 + \sqrt{23,04 + 2,91 \cdot \sqrt{Ar}}}{1,26} \right)^2 \quad [\text{Gl. 3.2-24}]$$

Einen etwas anderen Ausdruck geben Ishii und Zuber [Ishii 1979] an:

$$Re_{Ishii} = 9,72 \cdot \left\{ (1 + 0,01 \cdot Ar)^{4/7} - 1 \right\} \quad [\text{Gl. 3.2-25}]$$

Abbildung 3-11 zeigt eine doppelt logarithmische Auftragung der mit den Gleichungen 3.2-24 und 3.2-25 berechneten Reynoldszahlen als Funktion der Archimedes-Zahl:

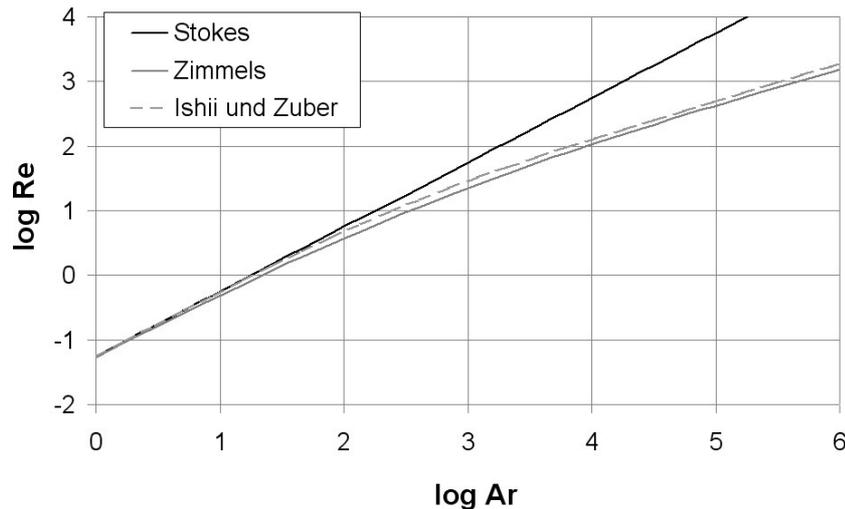


Abbildung 3-11: Doppeltlogarithmische Auftragung der Reynoldszahl als Funktion der Archimedeszahl für laminare und turbulente Umströmung einer Kugel

Aus Abbildung 3-11 wird ersichtlich, dass beide Berechnungen für turbulente Umströmung qualitativ denselben Verlauf ergeben; jedoch sollte der Berechnung nach Zimmels der Vorzug gegeben werden, da diese die Abweichung von dem laminaren Fall ab $Re > 0,25$ besser wiedergibt.

3.2.2.3 Interne Zirkulation

Neben der Art der Umströmung muss auch ein weiterer Effekt, die durch die Reibungskraft hervorgerufene interne Zirkulation von Tropfen oder Blasen, berücksichtigt werden. Diese sogenannte „Marangoni-Konvektion“ [Thornton 1992] ist ein, vor allem für die Stoffübertragung bei der Flüssig-flüssig Extraktion, sehr wichtiges Phänomen. Die mathematische Beschreibung ist im Allgemeinen hochkomplex, meist werden hier FEM-Berechnungsmodelle bemüht (z.B. [Augier 2003]). Einen etwas leichteren Zugang bietet hier ein von Hadamard und Rybczynski gefundener Korrekturfaktor K_{HR} (nach [Henschke 2002]), der lediglich eine algebraische Funktion des Viskositätsverhältnisses ist.

$$K_{HR} = \frac{3 + 3 \cdot \kappa}{2 + 3 \cdot \kappa} \quad [\text{Gl. 3.2-26}]$$

Die interne Zirkulation ermöglicht eine schnellere Bewegung, wobei sich die resultierende Geschwindigkeit mit der Stokes-Gleichung und K_{HR} näherungsweise bestimmen lässt ([Clift 1978]):

$$v_{Stokes,HR} = \frac{g \cdot \Delta\rho \cdot d^2}{18 \cdot \eta_C} \cdot K_{HR} \quad [\text{Gl. 3.2-27}]$$

Der Korrekturfaktor bewegt sich dabei in einem sehr engen Bereich, zwischen 1 und 1,5.

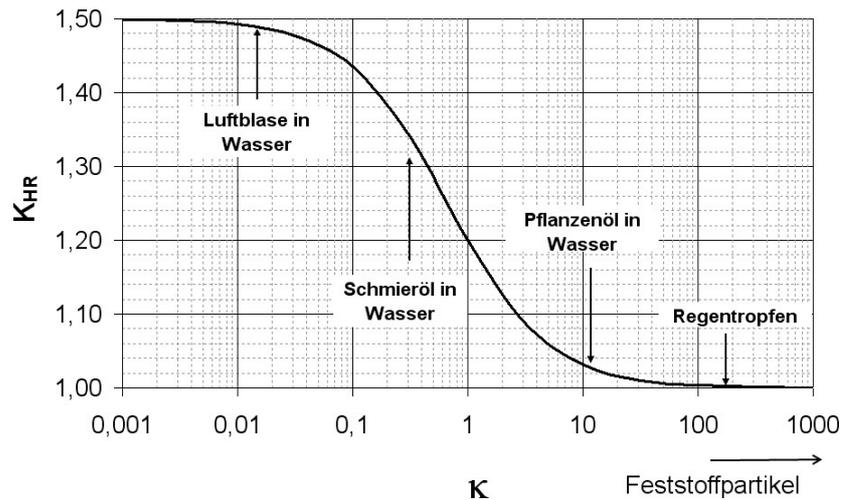


Abbildung 3-12: Korrekturfaktor für interne Zirkulation aufgetragen über dem Viskositätsverhältnis κ

Für sehr große Werte von κ , d.h. die Viskosität der dispersen Phase ist sehr viel größer als die der kontinuierlichen Phase, findet praktisch keine Zirkulation statt und K_{HR} geht gegen 1. Der Grenzfall $\kappa \rightarrow \infty$ entspricht einem Feststoffpartikel. Ist das Viskositätsverhältnis umgekehrt, d.h. κ sehr klein, geht K_{HR} gegen 1,5. Abbildung 3-12 zeigt den Verlauf von K_{HR} über mehrere Größenordnungen von κ , wobei zur Veranschaulichung einige Beispiele aus Alltag und Technik eingetragen sind.

3.2.2.4 Schwarmverhalten

Das vorhergehende Kapitel beschäftigte sich ausschließlich mit Körpern, die sich alleine in einem unendlich ausgedehnten Fluid bewegen. Sind jedoch viele solche Körper vorhanden, kommt es zu gegenseitigen Beeinflussungen, die oftmals unter dem Begriff „Schwarmverhalten“ zusammengefasst werden. Dieses ist abhängig von der Volumenkonzentration der dispersen Phase und verlangsamt die durchschnittliche Sinkgeschwindigkeit. Mathematische Ausdrücke für eine Korrektur, dem sog. „Schwarmfaktor“ als Funktion des Dispersphasenanteils ε , finden sich bei [Zimmels 1988] und [Jeelani 2005], wobei der Dispersphasenanteil der Volumenkonzentration entspricht.

$$K_{\text{Schwarm,Zimmels}} = \frac{(1 - \varepsilon)}{\left(1 + \varepsilon^{1/3}\right) \exp\left(\frac{5}{3} \cdot \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon}\right)} \quad [\text{Gl. 3.2-28}]$$

$$K_{\text{Schwarm,Jeelani}} = \frac{(1 - \varepsilon)^2}{1 + 4,56 \cdot \varepsilon} \quad [\text{Gl. 3.2-29}]$$

Die Verläufe beider Berechnungsformeln sind sehr ähnlich (siehe Abbildung 3-13) und es wird deutlich, dass das Schwarmverhalten selbst bei niedrig konzentrierten Systemen zu einer

starken Verlangsamung der Sedimentation führen kann. So sedimentieren Systeme mit 10% Dispersphasenanteil nur noch mit 50% der ohne Korrektur berechneten Geschwindigkeit.

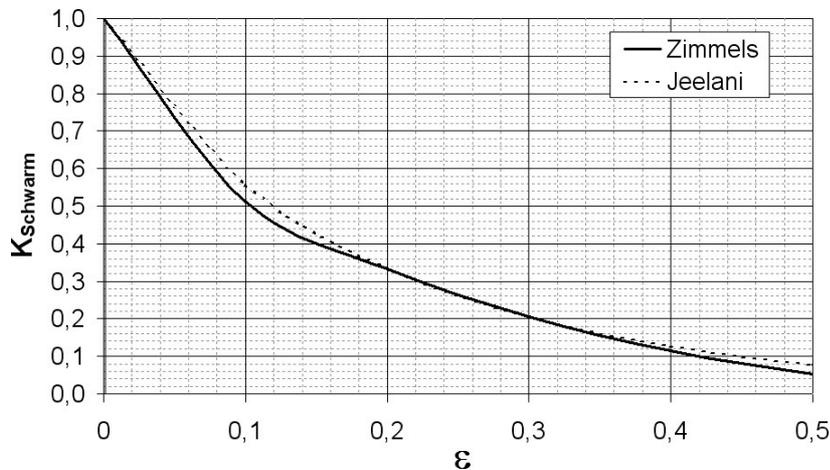


Abbildung 3-13: Schwarmfaktor aufgetragen über dem Dispersphasenanteil ϵ

3.2.2.5 Koaleszenz

Ein weiterer Mechanismus, der bei der gesamtheitlichen Betrachtung der Phasenseparation von Flüssig-flüssig Dispersionen betrachtet werden muss, ist die „Koaleszenz“, also die Bildung größerer Tropfen durch die Vereinigung kleinerer. Dies kann zum einen geschehen, wenn die Tropfengrößenverteilung breit ist, da die Großen und somit schnelleren Tropfen die Kleineren auf ihrem Weg einsammeln. Auch die thermische Bewegung kann zu zufälligen Kollisionen führen, wobei die Grenzflächenspannung i.d.R. zur Vereinigung und damit Verringerung der spezifischen Oberfläche führt. Da große Tropfen schneller sedimentieren als Kleine, hat die Koaleszenzneigung eines Systems einen entscheidenden Einfluss auf die insgesamt benötigte Separationszeit. Dieser Sachverhalt ist jedoch so komplex, dass eine einfache Formulierung von Korrekturfaktoren bis heute nicht möglich ist.

3.2.2.6 Komplettre Berechnungsansätze aus der Literatur

Berechnung nach [Henschke 2002]

Dieses Modell setzt voraus bzw. berücksichtigt:

- Turbulente Umströmung (nach Ishii und Zuber)
- Schwarmverhalten
- Interne Zirkulation (nach Hadamard und Rybczynski)
- Gültigkeitsbereich: $Ar > 1$ und $0,06 < \epsilon < 0,55$

$$v_{Henschke} = \frac{\eta_c}{\rho_c \cdot d} \cdot \frac{3 \cdot \psi \cdot \varepsilon}{c_w \cdot \xi \cdot (1 - \varepsilon)} \cdot \left[\sqrt{1 + Ar \cdot \frac{c_w \cdot \xi \cdot (1 - \varepsilon)^3}{54 \cdot \psi^2 \cdot \varepsilon^2}} - 1 \right] \quad [\text{Gl. 3.2-30}]$$

mit:

$$c_w = \frac{Ar}{6 \cdot Re_\infty^2} - \frac{3}{K_{HR} \cdot Re_\infty} \quad [\text{Gl. 3.2-31}]$$

$$Re_\infty = 9,72 \cdot \left[(1 + 0,01 \cdot Ar)^{4/7} - 1 \right] \quad [\text{Gl. 3.2-32}]$$

$$\xi = 5 \cdot K_{HR}^{-3/2} \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right)^{0,45} \quad [\text{Gl. 3.2-33}]$$

$$\psi = \frac{1 - \varepsilon}{2 \cdot \varepsilon \cdot K_{HR}} \cdot \exp\left(\frac{2,5 \cdot \varepsilon}{1 - 0,61 \cdot \varepsilon} \right) \quad [\text{Gl. 3.2-34}]$$

Dieses Modell beinhaltet zwar sehr viele Korrekturen gegenüber dem Stokes-Gesetz, jedoch geht es von einer monodispersen und statischen Tropfengrößenverteilung aus, womit der oftmals experimentell gefundene geschwungene Verlauf von Sedimentationskurven, insbesondere bei langsam sedimentierenden Systemen, nicht wiedergegeben werden kann. Die Sedimentationskurve ist immer, wie auch bei Stokes, eine Gerade.

Berechnung nach [Jeelani 2005]

Dieses Modell setzt voraus bzw. berücksichtigt:

- Laminare Umströmung (nach Stokes), d.h. $Re < 0,25$
- Schwarmverhalten
- Koaleszenz (mittels eines zeitlich veränderlichem mittleren Durchmesser $d(t)$)

$$v(t)_{Jeelani} = v_0 \cdot \left(\frac{d(t)}{d_0} \right)^2 \quad [\text{Gl. 3.2-35}]$$

mit:

$$v_0 = \frac{g \cdot \Delta\rho \cdot d_0^2}{18 \cdot \eta_c} \cdot \frac{(1 - \varepsilon_0)^2}{1 + 4,56 \cdot \varepsilon_0} \quad [\text{Gl. 3.2-36}]$$

$$d(t) = d_0 \cdot (c_0 + k_1 \cdot t + k_2 \cdot t^2 + k_3 \cdot t^3) \quad [\text{Gl. 3.2-37}]$$

Die Parameter k_1 bis k_3 werden an Experimente angepasst, wobei hinter der Anpassungsmethode viele theoretische Überlegungen stecken, die eine Übertragbarkeit auf andere Experimente gewährleisten. Auf eine ausführliche Darstellung der Gleichungen wird hier verzichtet, stattdessen sei nur ein exemplarischer Sedimentationskurvenverlauf gezeigt (Abbildung 3-14). Hier wird angenommen, dass ein disperses System insgesamt eine Stunde benötigt um 10 cm Sedimentationsstrecke zurückzulegen, der Dispersphasenanteil geht gegen Null, womit das Stokes-Gesetz ohne Schwarmkorrektur verwendet werden kann.

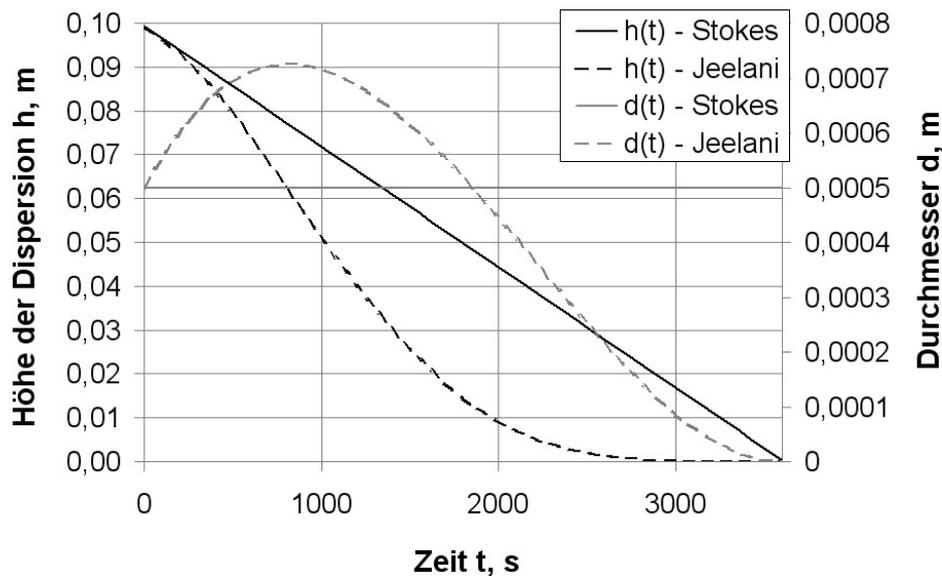


Abbildung 3-14: Exemplarischer Verlauf von Sedimentationskurven nach Stokes und Jeelani mit den für die Berechnung eingesetzten Tropfendurchmessern

Der S-förmige Verlauf der Sedimentationskurve nach Jeelani lässt sich bildhaft erklären: Die Tropfenkoaleszenz führt durch die Bildung größerer Tropfen zunächst zu einer beschleunigten Sedimentation. Diese großen Tropfen verlassen das Gesamtsystem jedoch schneller und lassen kleine Tropfen zurück, wodurch die Kurve über einen Wendepunkt (Tropfendurchmesser maximal) in einen insgesamt langsameren Verlauf übergeht. Dieses Modell ist als physikalisch sehr sinnvoll einzuschätzen, da die ansonsten benützte Annahme monodisperser, statischer Tropfenverteilungen mit Sicherheit nur in den seltensten Fällen gerechtfertigt ist. Je nachdem wie klein die kleinsten Tropfen sind, kann eine komplette Separation sehr viel länger dauern als man aus der Anfangssteigung der Sedimentationskurve annehmen würde. Sind diese Tropfen jedoch nicht zu klein und die Koaleszenztendenz stark ausgeprägt, so wird die Phasenseparationszeit um Größenordnungen verringert.

Berechnung mittels empirischer Potenzansätze

Nur am Rande seien die in der Literatur über Aqueous Two-Phase Systems gängigen [Kaul 1995], [Salamanca 1998], [Solano-Castillo 2000], [Asenjo 2002]) Potenzansätze zur Berechnung der Sedimentationskurve genannt. Asenjo beispielsweise gibt für eine Reihe von

PEG/Salz-ATPS folgende Korrelation an (in der die Grenzflächenspannung σ mittels der Luft-Wasser-Oberflächenspannung σ_w entdimensioniert wird, [Asenjo 2002]):

$$\left(\frac{dh}{dt}\right) \cdot \left(\frac{\eta_c}{\sigma}\right) = 1,435 \cdot 10^{-5} \cdot \left(\frac{\eta_c}{\eta_D}\right)^{2,148} \cdot \left(\frac{\Delta\rho}{\rho_c}\right)^{-1,062} \cdot \left(\frac{\sigma}{\sigma_w}\right)^{-0,971} \quad [\text{Gl. 3.2-38}]$$

Es fällt sofort auf, dass weder der Dispersphasenanteil noch der Durchmesser der dispersen Tropfen einfließen. Auch der negative Exponent über der Dichtedifferenz widerspricht jeglicher physikalischen Intuition, da er bedeutet, dass eine höhere Dichtedifferenz eine langsamere Sedimentation zur Folge hat. Da diese empirischen Ansätze offensichtlich nur für die Systeme und das experimentelle Equipment, welches zum Einsatz kam, anwendbar sind, sowie keine Mechanismen aufdeckbar sind, die nicht im direkten Zusammenhang mit den Stoffdaten stehen, werden sie in dieser Arbeit nicht eingesetzt.

3.2.3 Kinetik der Phasentrennung im Magnetfeld

3.2.3.1 Ableitung der Bewegungsgleichung für MEP-Tropfen

Zur Ableitung der Bewegungsgleichung für Tropfen magnetischer Extraktionsphasen (d.h. mit magnetischen Mikrosorbentien dotierter ATPS-Tropfen) wird, analog dem Stokes-Gesetz, von einer quasi-stationären Sinkgeschwindigkeit ausgegangen, welche mittels einer Kräftebilanz bestimmt werden kann. Abbildung 3-15 enthält eine Skizze mit Eintragung der Kräfte und der angenommenen Richtung der Geschwindigkeit sowie der Ortskoordinate im Magnetfeld x :

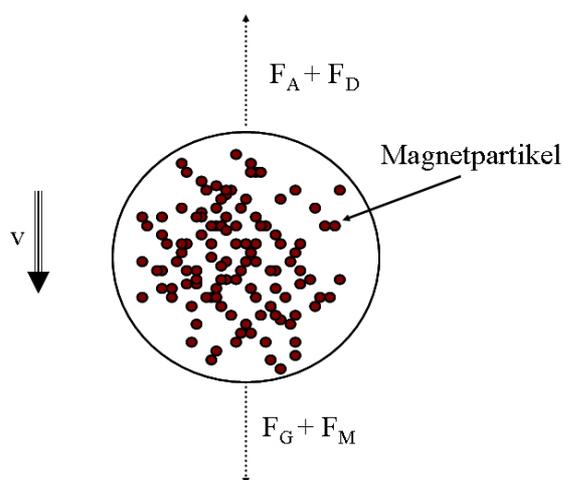


Abbildung 3-15: Skizze eines mit Magnetpartikeln dotierten ATPS-Tropfens mit Eintragung der betrachteten Kräfte, der Ortskoordinate x und der Richtung der Sedimentationsgeschwindigkeit v

Werden Trägheitskräfte vernachlässigt, d.h. die Sinkgeschwindigkeit als stationär angenommen, ergibt sich die Kräftebilanz zu:

$$F_A + F_R = F_G + F_M(x) \quad [\text{Gl. 3.2-39}]$$

Die Kräfte lassen sich mit den folgenden Annahmen wie untenstehend formulieren : (i) Die Magnetpartikel sind vollständig in der Dispersphase akkumuliert, die Partikelkonzentration in den Tropfen ergibt sich aus der Division der Gesamtpartikelkonzentration c_P durch den Dispersphasenanteil ε (=Aufkonzentrierung); (ii) Die Magnetpartikel sind homogen auf alle dispersen Tropfen verteilt; (iii) Die Volumenänderung eines dispersen Tropfens durch die Aufnahme der Magnetpartikel ist vernachlässigbar klein; die Partikelkonzentration im Tropfen (in g/L) wird so bei der Berechnung des Gewichts schlicht der Dispersphasendichte zugeschlagen; (iv) Die Reibungskraft kann mittels der von [Stokes 1845] ermittelten Zusammenhänge beschrieben werden.

Gewicht:
$$F_G = \frac{\pi}{6} \cdot g \cdot \left(\rho_D + \frac{c_P}{\varepsilon} \right) \cdot d^3 \quad [\text{Gl. 3.2-40}]$$

Auftrieb:
$$F_A = \frac{\pi}{6} \cdot g \cdot \rho_C \cdot d^3 \quad [\text{Gl. 3.2-41}]$$

Reibung:
$$F_R = 3 \cdot \pi \cdot \eta_C \cdot v \cdot d \quad [\text{Gl. 3.2-42}]$$

Magnetkraft:
$$F_M(x) = \mu_0 \cdot \frac{c_P}{\varepsilon} \cdot \frac{\pi}{6} \cdot d^3 \cdot M(x) \cdot \text{grad}H(x) \quad [\text{Gl. 3.2-43}]$$

Der Ausdruck für die Magnetkraft beinhaltet die ortsabhängige Partikelmagnetisierung $M(x)$ sowie den Feldgradienten $\text{grad}H(x)$. Die Bewegungsgleichung lässt sich nach algebraischer Umformung in einem kompakten, dem Stokes-Gesetz ähnlichen Ausdruck wiedergeben:

$$v_{MEP}(x) = \frac{g \cdot (\rho_D - \rho_C) + \gamma(x) \cdot \frac{c_P}{\varepsilon}}{18 \cdot \eta_C} \cdot d^2 \quad [\text{Gl. 3.2-44}]$$

mit:

$$\gamma(x) = g + \mu_0 \cdot M(H(x)) \cdot \text{grad}H(x) \quad [\text{Gl. 3.2-45}]$$

Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist nach Gl. 3.2-44 eine Funktion des Ortes, begründet durch die Magnetfeldgeometrie. Gl- 3.2-44 ist nur im laminaren Bereich gültig, mit Hilfe der vorher beschriebenen Turbulenzmodelle ist jedoch eine Erweiterung, falls notwendig, leicht

realisierbar. Die Korrekturen aus Schwarmverhalten und interner Zirkulation können ohne weiteres übernommen werden.

Ein Vorteil dieser Beschreibung ist, dass nur Stoffdaten benötigt werden, welche unabhängig von Sedimentationsexperimenten gemessen werden können. Als einzige Unbekannte bleibt der Tropfendurchmesser, der jedoch unabhängig von der Größe des Systems, ob Labor- oder Technikumsmaßstab, ist und somit bei definierten Mischbedingungen aus vorangegangenen Messungen für beliebige Experimente geschätzt werden kann. Tabelle 3-4 gibt einen Überblick über den für eine Berechnung benötigten Datensatz:

Tabelle 3-4: Benötigter Datensatz zur näherungsweisen Berechnung von Sedimentationsgeschwindigkeiten von MEP-Phasen in einem Spulen-Magnetfeld

Magnetfeld (Spule)	Windungszahl	n
	Strom	I
	Länge	L
	Radius	R
Magnetpartikel	Parameter (Magnetisierungskurve)	χ_1
	Parameter (Magnetisierungskurve)	χ_2
	Partikelkonzentration	c_p
Flüssigphasen	Dispersphasenanteil	ε
	Dichte Konti-Phase	ρ_C
	Dichte Dispersphase	ρ_D
	Viskosität Konti-Phase	η_C
	Viskosität Dispersphase	η_D
Tropfen	Durchmesser	d

Die Viskosität der Dispersphase wird nur dann benötigt, falls die interne Zirkulation einen nennenswerten Einfluss auf die Tropfengeschwindigkeit hat, was sich mit (Gl. 3.2-26) überprüfen lässt. Um auch noch die Koaleszenz in die Berechnung mit einfließen zu lassen, müsste das Jeelani-Modell [Jeelani 2005] auf Systeme mit ortsabhängiger Beschleunigung erweitert werden, was jedoch hier den Rahmen sprengen würde. Zudem sind Gl. 3.2-44 und 3.2-45 ausreichend, um die für die Verkürzung der Phasenseparationszeit elementar wichtigen Größen zu identifizieren, wie im folgenden Kapitel gezeigt wird.

3.2.3.2 Einflussnahme auf die Phasenseparationszeit

Um einige theoretische Überlegungen mit Praxisbezug durchzuführen, werden zunächst zwei Magnetfeldgeometrien definiert (Elektromagnetspulen mit und ohne Eisengehäuse, vgl. Kapitel 9.1) und anschließend für die gegebenen Geometrien Parametervariationen durchgeführt, um den Einfluss der Partikelkonzentration, des Spulenstroms sowie des Dispersionsanteils zu untersuchen. Diese Größen sind bei technischen Anwendungen frei wählbar, während die flüssigen Phasen sowie die Mikrosorbentien meist nach anderen Kriterien ausgewählt werden müssen und deren Stoffdaten damit vorgegeben sind. Abbildung 3-16 zeigt die Feldverläufe (hier als Flussdichte ausgedrückt) der beiden möglichen Spulen. Die zugehörige FEM-Berechnung wurde vom Hersteller der Spule (Steinert Elektromagnetbau GmbH, Köln) durchgeführt, die Anpassung an die Magnetfeldgleichung nach Michalowsky (Gl. 2.3-15) erfolgte mittels der Software TableCurve™ 2Dv3, Jandel Scientific, Version 3 für Win32, 1989-1994, der Feldverlauf der Spule ohne Gehäuse mittels Gl. 2.3-15 und den Herstellerangaben für die Spulenwicklung.

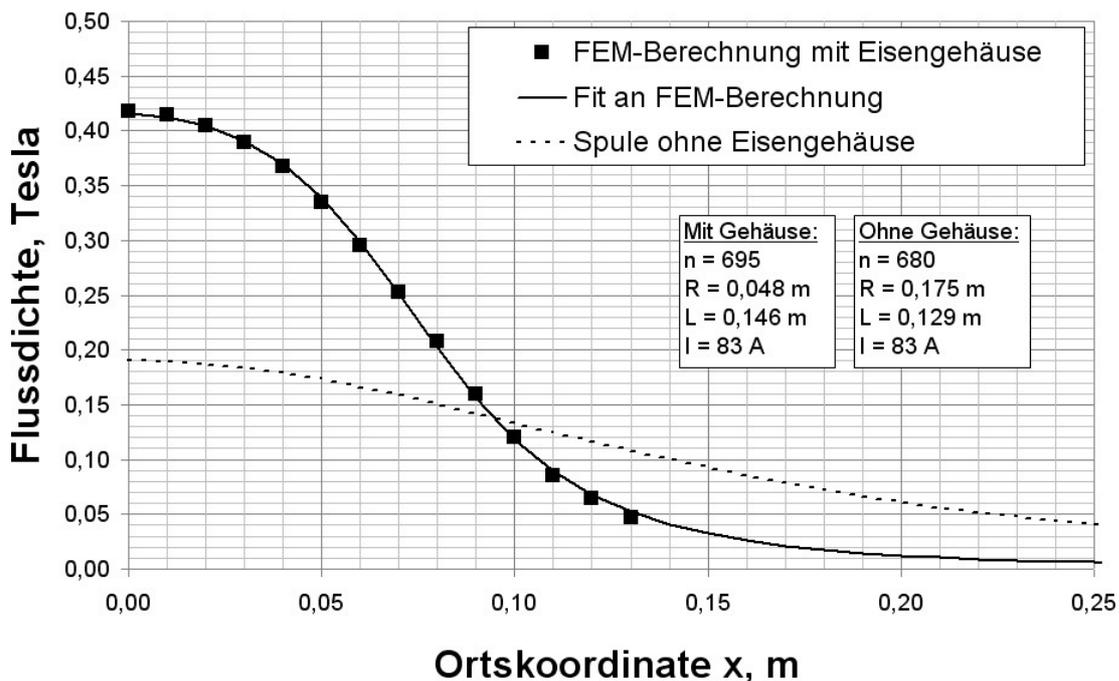


Abbildung 3-16: Theoretischer axialer Feldverlauf für zwei Magnetspulen mit gleicher Wicklung des leitenden Materials aber unterschiedlichen Gehäusen: Einmal mit und einmal ohne Eisengehäuse

Es ist aus Abbildung 3-16 ersichtlich, dass das Feld der Spule mit Eisengehäuse zur Spulenmitte ($x = 0$) hin aufkonzentriert wird, während sich ohne Gehäuse ein niedrigerer aber dafür weiter reichender Verlauf ergibt.

Zum Vergleich der Spulen und zur Untersuchung des Einflusses magnetischer Partikel werden nun beispielhaft die Sedimentationskurven für 10 cm und 20 cm hohe Dispersionen betrachtet, wobei der Endpunkt der Sedimentation ($h = 0$) dem oberen Spulenrand ($x = L/2$)

entspricht. Die Sedimentationskurve wurde mit den Gleichungen 3.2-21 und 3.2-44 bestimmt, als Korrektur wurde nur die Schwarmkorrektur (Gl. 3.2-29) berücksichtigt, die interne Zirkulation wurde dagegen vernachlässigt. Die Magnetisierungskurve der Partikel ($\chi_1 = 40 \text{ Am}^2/\text{kg}$, $\chi_2 = 25000 \text{ A/m}$) sowie die Flüssigphasenstoffdaten ($\Delta\rho = 10 \text{ g/L}$, $\eta_C = 0,003 \text{ Pa s}$) und der Dispersphasenanteil ($\epsilon = 0,1$) sind bei den folgenden Darstellungen gleich. Die Berechnungen unterscheiden sich aber durch: (i) Starthöhe der Dispersion: 20 cm (Abbildung 3-17) / 10 cm (Abbildung 3-18); (ii) Menge an Magnetpartikeln: $c_P = 0 \text{ g/L}$ / $c_P = 1 \text{ g/L}$; (iii) Stromstärke: $I = 0 \text{ A}$ / $I = 80 \text{ A}$; (iv) Spule mit / ohne Gehäuse.

Koaleszenzeffekte werden bei dieser Beispielrechnung nicht berücksichtigt, es wird von einer statischen monodispersen Tropfenverteilung mit der Größe $100 \mu\text{m}$ ausgegangen.

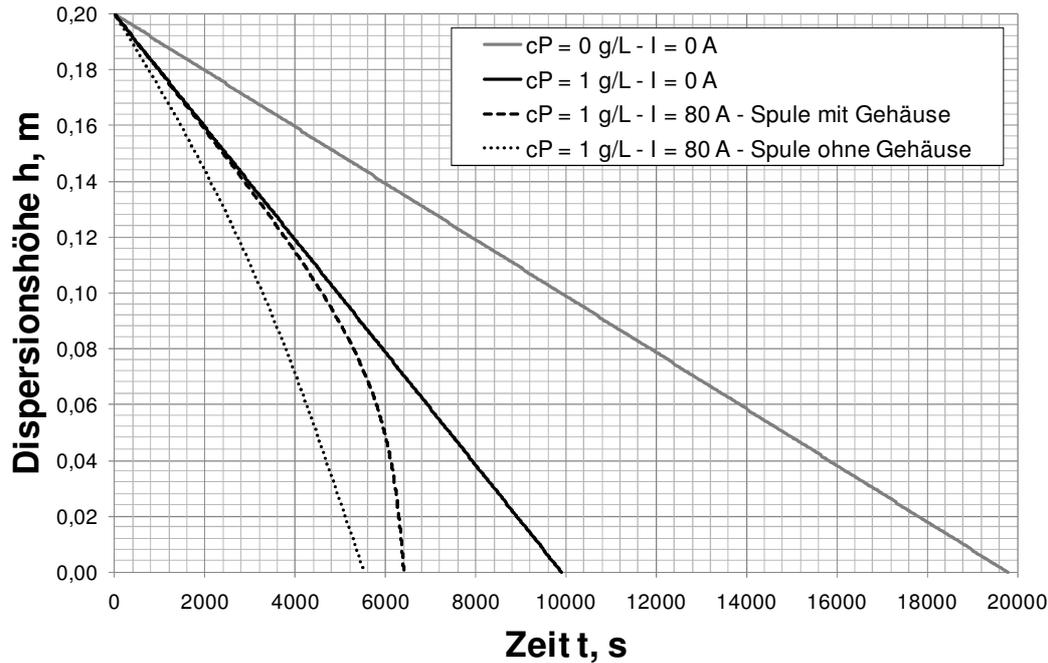


Abbildung 3-17: Sedimentationskurven von MEP für Beispielrechnungen mit einer Starthöhe von 20 cm

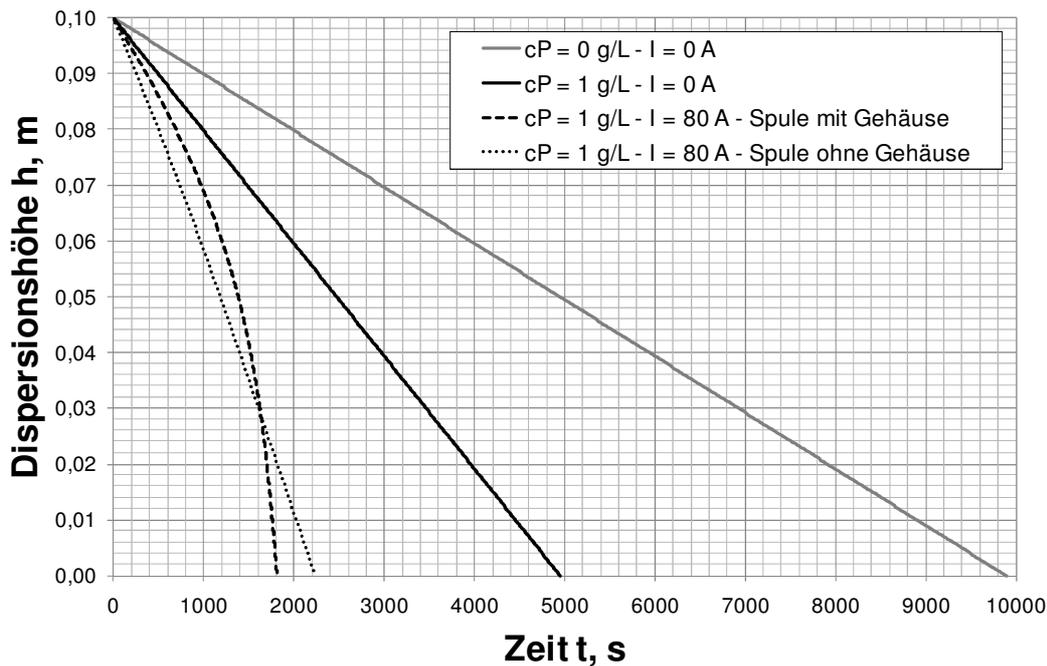


Abbildung 3-18: Sedimentationskurven von MEP für Beispielrechnungen mit einer Starthöhe von 10 cm

Das gewählte Beispiel orientiert sich stark an der Praxis im Umgang mit mizellaren ATPS. Da die Tropfen sehr klein und die Dichtedifferenzen i.d.R. sehr gering sind, dauern Phasenseparationen, je nach Dispersionshöhe, Stunden (20000 s = 5,5 h) bis Tage. Für beide Abbildungen gilt, dass die Dotierung der dispersen Tropfen mit $c_p = 1 \text{ g/L}$ Magnetpartikeln bei einem Dispersphasenanteil von $\varepsilon = 0,1$ ($c_p/\varepsilon = 10 \text{ g/L}$) eine Verdopplung der Dichtedifferenz und damit eine Halbierung der benötigten Phasenseparationsdauer bedeutet. Der

Einsatz eines magnetischen Feldes kann nun, bedingt durch die zusätzliche Kraftwirkung, die Phasenseparationszeit weiter verkürzen. Hierbei ist die Anfangshöhe der Dispersion dafür entscheidend, mit welcher Spule kürzere Phasenseparationszeiten erreicht werden können. Da der Feldverlauf der Spule mit Gehäuse außerhalb der Spule stark abfällt, wird der Beschleunigungseffekt erst ab ca. 10 cm Abstand vom Spulenrand signifikant. Die Spule ohne Gehäuse wäre im Falle von nur 10 cm Dispersionshöhe unterlegen, bei 20 cm Dispersionshöhe jedoch überlegen.

Um den Einfluss der Stromstärke zu untersuchen, wird im Folgenden nur die Spule mit Gehäuse betrachtet. In Abbildung 3-19 sind für ein gegebenes MEP-System die berechneten Sedimentationsgeschwindigkeiten über der Ortskoordinate x , d.h. der Längsachse der Spule, aufgetragen. Betrachtet werden Einzeltropfen ohne Schwarm- oder Zirkulationskorrektur, die restlichen Stoffdaten sind dieselben wie bei obigem Beispiel. Im Zentrum der Spule ($x = 0$) ist die Magnetkraft Null, da das Maximum des Feldverlaufs erreicht wird und somit der Gradient Null wird. Hier wirkt nur noch die Gravitation.

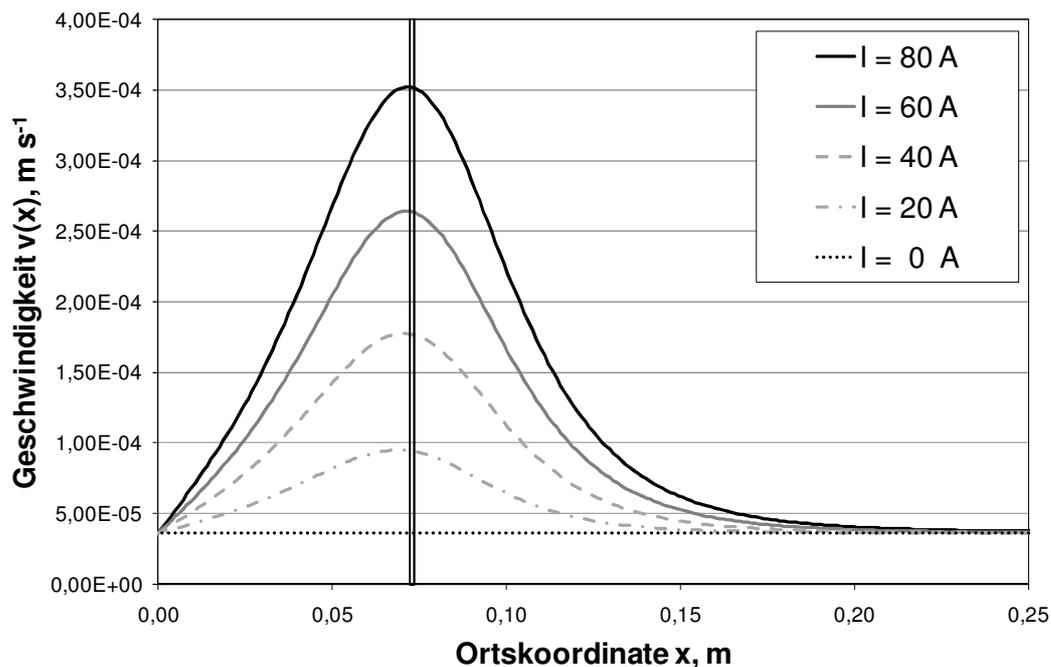


Abbildung 3-19: Geschwindigkeit von MEP-Einzeltropfen unter Variation der Stromstärke als Funktion der Ortskoordinate x (entspricht der Längsachse der Spule)

Der doppelte senkrechte Strich kennzeichnet den Spulenrand ($x = L/2$). Es wird ersichtlich, dass die Geschwindigkeit am Rand der Spule maximal wird, d.h. hier findet sich für die meisten Spulengeometrien das Maximum des Produkts von Gradient und Magnetisierung. Der Anstieg der maximalen Geschwindigkeit ist oberhalb einer gewissen Stromstärke (in diesem Beispiel ca. 10A) proportional zur Stromstärke (unterhalb ist der Anstieg überproportional, für sehr kleine Stromstärken quadratisch) bzw. der maximalen Feldstärke.

Jedoch steigt die Reichweite der Spule weitaus schwächer mit steigender Stromstärke, was die Höhe von Extraktionsgefäßen limitiert.

Interessant ist auch der Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeit von MEP-Tropfen und magnetischen Partikeln alleine. Für die Wanderungsgeschwindigkeit der magnetischen Partikel wird die Partikeldichte ρ_P benötigt, die mit 1800 kg/m^3 abgeschätzt wird (nach [Hoffmann 2003]). Die Bewegungsgleichung kann analog der Gleichung für MEP-Tropfen (Gl. 3.2-44) abgeleitet werden, hier sei jedoch nur das Endergebnis angegeben:

$$v_{\text{Partikel}}(x) = \frac{\left(g + \frac{\mu_0 \cdot M(H(x)) \cdot \text{grad}H(x)}{1 + \frac{\rho_P - \rho_C}{\rho_P}} \right) \cdot (\rho_P - \rho_C) \cdot d^2}{18 \cdot \eta_C} \quad [\text{Gl. 3.2-46}]$$

Abbildung 3-20 zeigt die berechneten Geschwindigkeitsverläufe. Die Stoffdaten sind dieselben wie gehabt, der Dispersphasenanteil $\varepsilon = 0,1$ und die Partikelkonzentration $c_P = 1 \text{ g/L}$.

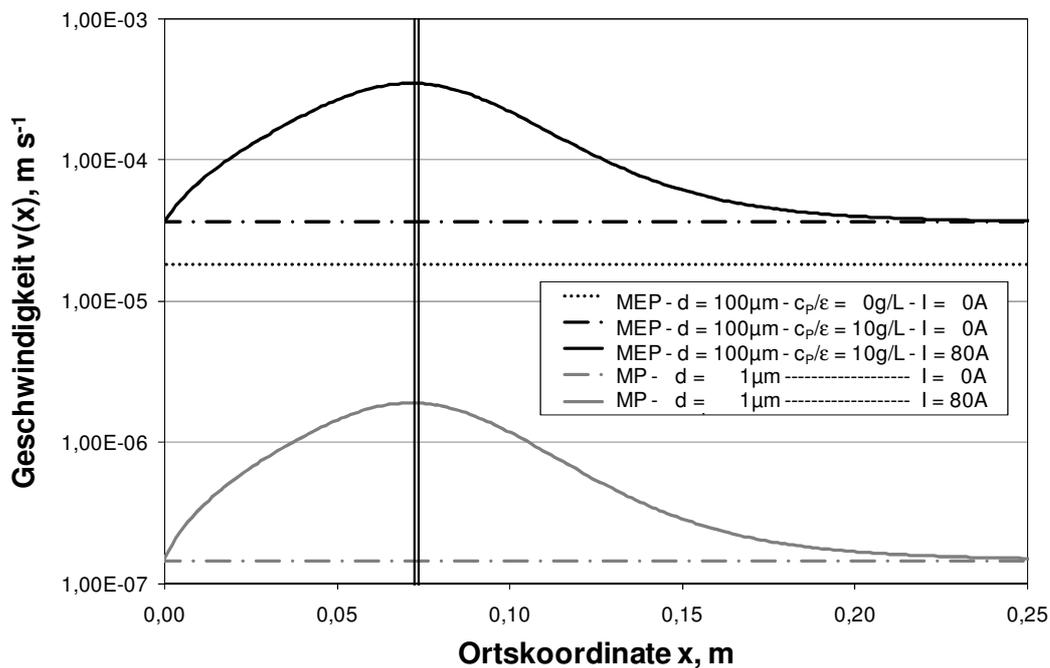


Abbildung 3-20: Geschwindigkeitsverläufe von MEP als Funktion der Ortskoordinate x (=Längsachse der Spule) für die Fälle „Nur ATPS“, d.h. $c_P = 0 \text{ g/L}$, „MEP“ mit $c_P/\varepsilon = 10 \text{ g/L}$ und „Nur Partikel“. Berechnet jeweils mit Feld an ($I = 80 \text{ A}$) und Feld aus ($I = 0 \text{ A}$)

Die MEP-Tropfen, die nur ca. 0,5 vol-% Partikel enthalten, lassen sich gegenüber dem reinen ATPS ($c_P = 0 \text{ g/L}$) signifikant beschleunigen und um ca. zwei Größenordnungen schneller als die Partikel alleine abscheiden. Der Grund liegt hauptsächlich in der geringen Partikelgröße

und dem damit verbundenen hohen spezifischen Strömungswiderstand. Für MEP-Tropfen ist der Magnetfeldeinfluss zudem unabhängig von der Größe der eingesetzten magnetischen Partikel und nur abhängig von der Massenkonzentration im Tropfen sowie der magnetischen Suszeptibilität der Partikel. Es können also prinzipiell auch magnetische Nanosorbentien eingesetzt werden, die den klassischen Mikrosorbentien in punkto Kapazität und Sorptionskinetik überlegen sind. Demgegenüber können einzelne magnetische Nanosorbentien aufgrund ihrer sehr geringen Größe jedoch nicht einmal mit Hochgradientenmagnetfiltern effektiv abgeschieden werden, was einen Einsatz bisher verhindert.

Abschließend kann gesagt werden, dass die vorgestellten Gleichungen ein geeignetes Werkzeug zur Auswahl und Auslegung der für die technische Anwendung der magnetischen Extraktionsphasen benötigten Apparate darstellen.

3.3 Gleichgewicht der Proteinextraktion

3.3.1 Definitionen

Die Definition des Verteilungskoeffizienten einer Molekülsorte zwischen der Ober- und Unterphase eines ATPS wird üblicherweise wie folgt angegeben:

$$K = \frac{c_T}{c_B} \quad [\text{Gl. 3.3-01}]$$

Das Volumenverhältnis wird analog definiert:

$$R = \frac{V_T}{V_B} \quad [\text{Gl. 3.3-02}]$$

Mittels der Massenbilanz

$$c_0 \cdot V_{Ges} = c_T \cdot V_T + c_B \cdot V_B \quad [\text{Gl. 3.3-03}]$$

und der Startkonzentration c_0 können somit die im Gleichgewicht erhaltenen Konzentrationen bestimmt werden:

$$\frac{c_T}{c_0} = \frac{K \cdot (R + 1)}{K \cdot R + 1} \quad [\text{Gl. 3.3-04}]$$

$$\frac{c_B}{c_0} = \frac{R + 1}{K \cdot R + 1} \quad [\text{Gl. 3.3-05}]$$

3.3.2 Der Partitioning-Koeffizient K

Eine thermodynamische Definition des Partitioning-Koeffizienten findet sich bei [Albertsson 1986]. Dazu formuliert er das chemische Potential einer Spezies i mit Hilfe des Aktivitätskoeffizienten γ_i :

$$\mu_i = \mu_{i,0} + RT \ln \gamma_i \cdot c_i \quad [\text{Gl. 3.3-06}]$$

Stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht dieser Spezies i zwischen den zwei Phasen T und B ein, muss die Forderung nach Gleichheit der chemischen Potentiale erfüllt sein (Gl. 3.3-07). Nach algebraischer Umformung kommt man zur Definition für den Partitioning-Koeffizienten K und erkennt, dass dieser dem Nernstschen Verteilungskoeffizient, also dem umgekehrten Verhältnis der Aktivitätskoeffizienten, entspricht.

$$\mu_{i,T} = \mu_{i,B} \quad [\text{Gl. 3.3-07}]$$

$$K = \frac{c_{i,T}}{c_{i,B}} = \frac{\gamma_{i,B}}{\gamma_{i,T}} \quad [\text{Gl. 3.3-08}]$$

Verfügt man über geeignete Aktivitätskoeffizientenmodelle, lässt sich der K -Wert der Spezies i vorhersagen. Die meisten gängigen Ansätze aus der Mischphasenthermodynamik lassen sich jedoch nur sehr begrenzt auf das Verhalten makromolekularer und kompliziert gebauter Spezies, wie z.B. Proteinen, anwenden. Einen interessanten Versuch, sich diesen Zusammenhängen zumindest qualitativ zu nähern, bieten Johansson *et al* [Johansson 1998]. Eine neuere Publikation versucht gar den Einsatz des Gruppenbeitragsmodells UNIFAC [Haghtalab 2005], jedoch müssen auch diese Modelle auf eine Fülle von Stoffdaten zurückgreifen, die oftmals nicht in ausreichendem Maße vorhanden sind.

Aufgrund dieser bis heute nicht wirklich gelösten Schwierigkeiten der Übertragung von Aktivitätskoeffizientenmodellen aus der chemischen Thermodynamik hin zur Modellierung des Partitioningverhaltens von Proteinen in ATPS, wählen die meisten Forscher einen anderen, weniger fundamentalen Weg, um sich dem Problem zu nähern. Sehr verbreitet ist die empirische Aufteilung (z.B. nach [Abbott 1990]) des K -Wertes in verschiedene Beiträge:

$$\ln K = \ln K_0 + \ln K_{\text{konf}} + \ln K_{\text{el}} + \ln K_{\text{hphob}} + \ln K_{\text{biosp}} + \dots \quad [\text{Gl. 3.3-09}]$$

Diese Aufteilung ist beliebig und oftmals reicht es aus, nur wenige vorherrschende Effekte zu berücksichtigen. Neben Struktur (=konf), Ladung (=el), Hydrophobizität (=hphob) können auch biospezifische (=biosp) Wechselwirkungen, beispielsweise über Einführung einer Affinitätsfunktion, berücksichtigt werden. Im ersten Term (=K₀) steckt im Prinzip alles, was

man nicht durch andere physikalische Effekte klären kann, z.B. die bevorzugte Wechselwirkung eines Proteins mit dem in der Phase dominanten Polymer. Der zweite Term betrachtet einen Einfluss der räumlichen Konfiguration des Proteins bzw. der Phase und wird meist schlicht mit der Größe des Proteins korreliert. Diese beiden Terme lassen sich vereinfacht mit Hilfe des Bronstedt-Zusammenhangs beschreiben [Abbott 1990].

$$K = \exp\left\{\frac{\lambda \cdot M}{k \cdot T}\right\} \quad [\text{Gl. 3.3-10}]$$

Die Wechselwirkungen zwischen Protein und Phase werden im Faktor λ zusammengefasst, M bezeichnet die Molmasse des Proteins, k ist die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur. Eine häufig bemühte Abbildung, die diesen exponentiellen Zusammenhang für eine Reihe von Proteinen in PEG-Dextran-ATPS belegt, findet sich bei Abbott *et al* [Abbott 1990].

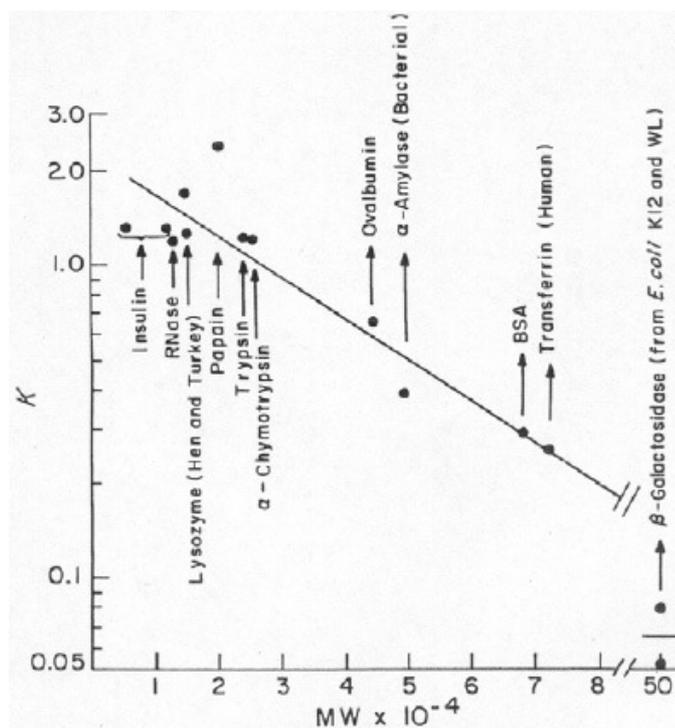


Abbildung 3-21: Zusammenhang zwischen K und dem Protein-Molekulargewicht in 7% Dextran T-500, 4,4% PEG 8000, 0,1 M NaCl oder 0,05 M Na₂SO₄, 10 mM Phosphat oder Glyzin Puffer bei 20 °C. Die durchgezogene Linie entspricht der Bronstedt-Gleichung (3.3-10)(aus [Abbott 1990])

Abbildung 3-21 zeigt sehr anschaulich die Abhängigkeit des K -Wertes von der Molmasse des Proteins für eine definierte Zusammensetzung eines PEG8000 / Dextran T-500 ATPS. Allerdings ändert sich der Wert für λ (selbst wenn die phasenbildenden Polymere beibehalten werden) und damit die Geradensteigung durch:

- Variation der Temperatur (z.B. durch Einfluss auf H-Brücken)
- Änderung der Salzsorte und des Gehalts
- Änderung der Phasenzusammensetzung, d. h. Wechsel der Konode

Manche Forscher versuchen, ausgehend von der Aminosäuresequenz, Korrelationen zu finden, um K-Werte für beliebige Proteine zu berechnen ([Berggren 2002], [Salgado 2005]). Hier ist im Allgemeinen von einer „Surface Hydrophobicity“ die Rede, jedoch kann das angewandte Parameter-Fitting andere Effekte außer der Hydrophobizität nicht ausschließen; auch ist eine Übertragbarkeit auf beliebige ATPS nicht möglich. Ist das ATPS für die Trennaufgabe jedoch streng definiert, könnten solche Korrelationen hilfreich sein, um das Verhalten verschiedener im System vorhandener Proteine zumindest qualitativ vorherzusagen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sehr schwer ist selbst gemessene K-Werte zufriedenstellend nachzumodellieren, geschweige denn vorherzusagen. Ein Forscher, der mit ATPS arbeitet, sollte sich also auf seine Intuition und seinen Erfahrungsschatz verlassen sowie empirische Faustregeln zu Rate ziehen [Kula 1999].

Um die betrachteten Terme von Gl.3.3-09 zu vervollständigen, sei angemerkt: Der elektrische Einfluss wird im kommenden Kapitel (3.3.3) separat betrachtet, bezüglich der Darstellung der üblichen Gleichungen für Affinitäts-ATPS sei an dieser Stelle nur auf die einschlägige Literatur verwiesen ([Kopperschläger 1990], [Johansson 2000]).

3.3.3 Elektrostatische Einflüsse: Das Donnan-Potential

Falls man das Partitioning eines Proteins fernab von dessen isoelektrischen Punkt betrachtet, muss man die Bestimmungsgleichung für das chemische Potential um einen elektrischen Term erweitern (nach [Albertsson 1986]),

$$\mu_i = \mu_{i,0} + RT \ln \gamma_i \cdot c_i + z_i F \psi \quad [\text{Gl. 3.3-11}]$$

wobei z_i die Ladungszahl des Proteins, F die Faraday-Konstante und ψ das elektrische Potential bezeichnet. Dies gilt nicht nur für Proteine sondern für alle ladungstragenden Spezies im System. Geht man nun davon aus, dass auch Salze unterschiedliche Tendenzen in die jeweiligen Phasen haben (vgl. [Leunissen 2007]), so kann es zur Bildung eines elektrischen Potentials an der Phasengrenze kommen, auch bekannt als Donnan-Potential ([Walter 1985], [Albertsson 1986], [Abbott 1990]). Gl. 3.3-12 gibt eine Bestimmungsgleichung für dieses Grenzflächenpotential an:

$$\Delta \psi = \frac{R \cdot T}{(z_+ + z_-) \cdot F} \cdot \ln \left(\frac{K_-}{K_+} \right) \quad [\text{Gl. 3.3-12}]$$

Der elektrische Term der empirischen Berechnung für den K-Wert (Gl. 3.3-09) beinhaltet nun neben der Nettoladung des betrachteten Proteins auch dieses Potential:

$$\ln K_{el} = \frac{F \cdot z_{\text{Protein}} \cdot \Delta\psi}{R \cdot T} \quad [\text{Gl. 3.3-13}]$$

In den letzten Jahrzehnten wurde diese Art der Beschreibung auf eine Fülle von Proteinen angewandt, allerdings hauptsächlich für PEG/Dextran-Systeme. Auch wenn die erhaltenen Korrelationen oftmals sehr schön den experimentell gefundenen Verlauf wiedergeben, gibt es doch Zweifel an dieser Art der Beschreibung. So ist zum Beispiel nicht klar, wie eine Polarisation der Grenzfläche zu einer vermehrten Aufnahme eines Proteins in der gesamten „bulk-Phase“ führen soll. Manche Forscher lehnen diese Beschreibung sogar ganz ab und schreiben die beobachteten Effekte dem veränderten Löslichkeitsverhalten der Proteine mit steigendem Salzgehalt zu [Huddleston 1991]. Diese Anschauungsweise deckt sich mit den in Kapitel 3.1 vorgestellten Ausführungen über die dielektrischen Eigenschaften einer Phase im Zusammenhang mit der elektrostatischen Selbstenergie einer geladenen Spezies.

3.3.4 Excluded Volume Theorie (für mizellare ATPS)

Die Arbeitsgruppe um Daniel Blankshtein am MIT hat sich nicht nur dem Phasengleichgewicht der mizellaren ATPS sehr erfolgreich gewidmet (Kapitel 3.2.1.3), unter den zahlreichen Arbeiten finden sich auch Aufsätze über das Verteilungsverhalten von Proteinen in diesen Systemen (z.B. [Nikas 1992], [Liu 1998, Liu 1995, 1996]). Die hier vorgestellte „Excluded-Volume-Theorie“ sagt, ähnlich wie die Bronstedt-Beziehung (Gl. 3.3-10), eine Abhängigkeit von der Größe des Proteins vorher, kann aber den Einfluss der Phasenzusammensetzung ebenfalls vorhersagen, was eine umfassende Beschreibung ermöglicht. Bei Nikas *et al* [Nikas 1992] findet sich folgender Zusammenhang für das Partitioning eines globulären Proteins in einem mizellaren, aus nichtionischen Tensiden und Wasser gebildeten ATPS:

$$K_{EV} = \exp \left\{ -(\phi_T - \phi_B) \cdot \left(1 + \frac{R_{\text{Protein}}}{R_{\text{Mizelle}}} \right)^n \right\} \quad [\text{Gl. 3.3-14}]$$

In Gl. 3.3-14 gehen einerseits die Differenz der Volumenanteile an Tensid in den jeweiligen Phasen ein, andererseits die Größe von Proteinen und Mizellen mittels des hydrodynamischen Radius. Der Exponent n ist zwei (n=2) für zylindrische Mizellen und drei (n=3) für sphärische Mizellen. Abbildung 3-22 zeigt den Verlauf von K_{EV} über dem Verhältnis von Protein- und Mizellradius für sphärische und zylindrische Mizellen. Der Mizellradius beträgt $17,8 \text{ \AA}$, die Differenz $(\phi_T - \phi_B)$ beträgt 5% (nach [Nikas 1992]).

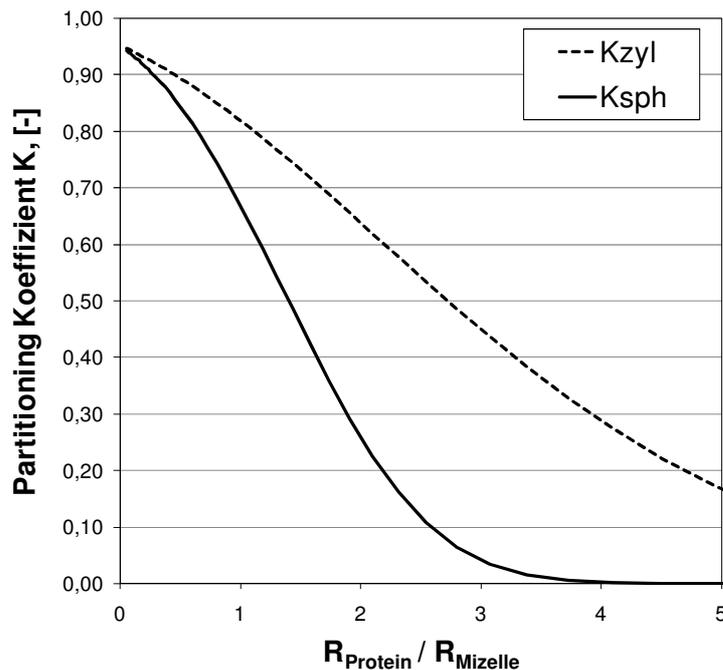


Abbildung 3-22: Verlauf des Partitioning-Koeffizienten K von globulären Proteinen in mizellaren ATPS als Funktion des Größenverhältnisses Protein / Mizelle für zylindrische und sphärische Mizellen (nach [Nikas 1992])

Es ist klar ersichtlich, dass große Proteine aus der mizellreichen Phase ausgeschlossen werden, wobei die Tendenz bei sphärischen Mizellen gegenüber den zylindrischen Mizellen stärker ausgeprägt ist.

Der fundamentale Charakter und die Flexibilität dieser Theorie zeigt sich in den Erweiterungen, welche bereits getätigt wurden, z.B. auf die Anwendung geladener Mizellen und die damit einhergehenden elektrostatischen Effekte [Rangel-Yagui 2004] oder auf den Einsatz biospezifischer Wechselwirkungen von Enzymen und Tensiden [Lam 2005].

3.4 Gleichgewicht der Proteinadsorption

3.4.1 Einstoffsystem: Langmuir Theorie

Geht man bei einem Adsorptionsprozess von einer monomolekularen Oberflächenbeladung des Sorbens durch das Sorptiv aus sowie einem dynamischen Sorptionsgleichgewicht (Index *) einer Molekülsorte, so lässt sich der Zusammenhang von pro Sorbensmasse adsorbierter Menge, d.h. der Beladung q und der Konzentration des Sorptivs in der freien Lösung c , mittels der Langmuir-Gleichung beschreiben [Langmuir 1918]:

$$q^* = q_{\max} \cdot \frac{c^*}{K_L + c^*} \quad [\text{Gl. 3.4-01}]$$

Hierbei bezeichnet q_{\max} die maximale Beladung, K_L kann als Mass für die Affinität angesehen werden und wird oftmals auch, analog dem Massenwirkungsgesetz, als Dissoziationskonstante bezeichnet. Ausgehend von der Massenbilanz lässt sich die Gleichung für die sogenannte Arbeitsgerade herleiten, welche den Zusammenhang von Beladung und Konzentration eines Systems mit definierter Sorbens- und Sorptivmenge wiedergibt (c_P bezeichnet die Sorbenskonzentration, c_0 die Startkonzentration an Sorptiv und q_0 die Startbeladung):

$$q = q_0 + \frac{c_0 - c}{c_P} \quad [\text{Gl. 3.4-02}]$$

Da im GGW sowohl Gl. 3.4-01 als auch Gl. 3.4-02 erfüllt sein müssen, lässt sich die Gleichgewichtskonzentration c^* durch Gleichsetzen und Lösen der sich nach algebraischer Umformung ergebenden quadratischen Gleichung vorhersagen (analog zu [Meyer 2007]). Die Lösung lautet:

$$c^* = -\frac{a}{2} + \sqrt{\frac{a^2}{4} - b} \quad [\text{Gl. 3.4-03}]$$

mit:

$$a = c_P \cdot (q_{\max} - q_0) + K_L - c_0 \quad [\text{Gl. 3.4-04}]$$

$$b = -K_L \cdot (c_P \cdot q_0 + c_0) \quad [\text{Gl. 3.4-05}]$$

Die Beladung kann anschließend mit der Langmuir-Gleichung bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Gleichungen kann für eine gegebene Trennaufgabe beispielsweise die erforderliche Sorbensmenge geschätzt, oder, bei maximal vorgegebener Sorbensmenge, die minimal nötige Adsorptionskapazität und Affinität bestimmt werden.

3.4.2 Zweistoffsystem: Theorie nach Butler und Ockrent

Zur Berechnung von Zweistoff-Systemen (d.h. der konkurrierenden Adsorption zweier Sorptive X und Y auf dasselbe Sorbens), in denen beide Sorptive (alleine genommen) dem Langmuir-Zusammenhang gehorchen, lässt sich die GGW-Lage mittels der von Butler und Ockrent vorgeschlagenen Gleichungen berechnen [Butler 1930]. Sie lauten:

$$q_X^* = \frac{q_{\max,X} \cdot \frac{c_X^*}{K_{L,X}}}{1 + \frac{c_X^*}{K_{L,X}} + \frac{c_Y^*}{K_{L,Y}}} \quad [\text{Gl. 3.4-06}]$$

$$q_Y^* = \frac{q_{\max,Y} \cdot \frac{c_Y^*}{K_{L,Y}}}{1 + \frac{c_X^*}{K_{L,X}} + \frac{c_Y^*}{K_{L,Y}}} \quad [\text{Gl. 3.4-07}]$$

Als Werte für $q_{\max,i}$ und $K_{L,i}$ sind die jeweiligen, aus Einzelstoffexperimenten ermittelten, Langmuir-Parameter einzusetzen. Auch hier lässt sich die Gleichgewichtslage eines definierten Systems mit Hilfe der Massenbilanzen vorausberechnen bzw. schätzen. Ein zu Kapitel 3.4.1 analoges Vorgehen führt zu einer kubischen Gleichung, die von Ebner [Ebner 2006] gelöst wurde. Auf eine Darstellung der Lösungsgleichungen an dieser Stelle wird verzichtet, da die Gleichungen von Ebner als Sonderfall der in Kapitel 3.5.2 abgeleiteten Gleichungen gesehen werden können (wie noch erläutert wird).

3.5 MEP: Kopplung von Adsorption und Extraktion

Um die gekoppelte Adsorption und Extraktion zu beschreiben, wird zunächst zwischen zwei möglichen Szenarien der Gleichgewichtseinstellung unterschieden:

- Der Sukzessive Weg (Index „Suk“), d.h. Adsorption im einphasigen Bereich, anschließend Phasentrennung mit Einstellung des Extraktionsgleichgewichts, jedoch ohne Beeinflussung des zuvor eingestellten Adsorptionsgleichgewichts
- Der Synchrone Weg (Index „Syn“), d.h. Adsorptions- und Extraktionsgleichgewicht stellen sich gleichzeitig ein. Dies könnte auch der Fall sein, wenn zwar wie oben im Einphasigen adsorbiert wurde, sich das Adsorptionsgleichgewicht jedoch bei der Phasentrennung erneut einstellt. Eine diesem Weg analoge Beschreibung geben Suzuki *et al* an [Suzuki 1995]

3.5.1 Gleichungen für Einstoffsysteme

Ausgehend von der Langmuir-Gleichung, den Massenbilanzen, den Definitionen von K und R sowie der Annahme, dass die Langmuir-Konstanten auch in den verschiedenen Phasen konstante Werte behalten, ergeben sich folgende Gleichungen:

$$c^* = -\frac{a}{2} + \sqrt{\frac{a^2}{4} - b} \quad [\text{Gl. 3.5-01}]$$

mit:

$$a = K_L + f_{Ph} \cdot (c_p \cdot q_{\max} - c_0) \quad [\text{Gl. 3.5-02}]$$

$$b = -f_{ph} \cdot K_L \cdot c_0 \quad [\text{Gl. 3.5-03}]$$

Für den Faktor f_{ph} gilt, je nach Zielphase (Index „Ph“) in der sich die Partikel anreichern:

$$f_T(K, R) = \frac{K \cdot (R+1)}{K \cdot R+1} \quad [\text{Gl. 3.5-04}]$$

$$f_B(K, R) = \frac{R+1}{K \cdot R+1} \quad [\text{Gl. 3.5-05}]$$

Um zu unterscheiden, ob der sukzessive oder der synchrone Weg eingeschlagen werden, gelten folgende Regeln:

Sukzessives Gleichgewicht:

- $f_{ph} = 1$ während der Lösung der quadratischen Gleichung
- $c_{ph} = f_{ph}(K, R) \cdot c^*$ anschließend

Synchrones Gleichgewicht:

- $f_{ph} = f_{ph}(K, R)$ während der Lösung der quadratischen Gleichung
- Die mit Gl. 3.5-01 ermittelte Konzentration c^* herrscht in der Zielphase vor. Die Konzentration der Nicht-Zielphase wird über den K-Wert berechnet

3.5.2 Gleichungen für Zweistoffsysteme

Analog der Vorausberechnung eines binären Adsorptionsgleichgewichts in einphasiger Lösung nach [Ebner 2006] wurden in dieser Arbeit Gleichungen abgeleitet, die solche Vorausberechnungen auch im Zweiphasensystem ermöglichen. Es wird dabei, wie zuvor in Kapitel 3.5.1, zwischen einer sukzessiven und einer synchronen Einstellung des Gleichgewichts unterschieden. Mittels der Butler-Ockrent-Gleichungen (Gl.3.4-07 und Gl.3.4-08) und den Massenbilanzen (hier ohne Vorbeladung)

$$q_X^* = \frac{c_{X,0} - \frac{c_X^*}{f_{X,Ph}}}{c_P} \quad [\text{Gl. 3.5-06}]$$

$$q_Y^* = \frac{c_{Y,0} - \frac{c_Y^*}{f_{Y,Ph}}}{c_P} \quad [\text{Gl. 3.5-07}]$$

lässt sich durch Gleichsetzen und Division der Gleichungen (3.5-06 / 3.5-07 = 3.4-07 / 3.4-08) folgender Zusammenhang herstellen:

$$\frac{c_{X,0} - \frac{c_X^*}{f_{X,Ph}}}{c_{Y,0} - \frac{c_Y^*}{f_{Y,Ph}}} = \frac{q_{\max,X}}{q_{\max,Y}} \cdot \frac{K_{L,Y}}{K_{L,X}} \cdot \frac{c_X^*}{c_Y^*} \quad [\text{Gl. 3.5-08}]$$

mit den jeweiligen Definitionen von f_{Ph} für die entsprechend gewählte Zielphase:

$$f_{i,T}(K_i, R) = \frac{K_i \cdot (R+1)}{K_i \cdot R+1} \quad [\text{Gl. 3.5-09}]$$

$$f_{i,B}(K_i, R) = \frac{R+1}{K_i \cdot R+1} \quad [\text{Gl. 3.5-10}]$$

Gl. 3.5-08 aufgelöst nach c_X^* lautet:

$$c_X^* = \frac{c_Y^*}{A + B \cdot c_Y^*} \quad [\text{Gl. 3.5-11}]$$

Setzt man Gl. 3.4-07 = Gl. 3.5-07 und löst nach c_X^* auf erhält man:

$$c_X^* = \frac{C \cdot (c_Y^*)^2 + D \cdot c_Y^* + E}{1 + F \cdot c_Y^*} \quad [\text{Gl. 3.5-12}]$$

Setzt man obige Ausdrücke gleich (Gl. 3.5-11 = Gl. 3.5-12), ergibt sich nach algebraischer Umformung eine in c_Y^* kubische Gleichung:

$$t \cdot (c_Y^*)^3 + u \cdot (c_Y^*)^2 + v \cdot c_Y^* + w = 0 \quad [\text{Gl. 3.5-13}]$$

Diese kubische Gleichung hat drei mögliche Lösungen:

$$(c_Y^*)_1 = \frac{2 \cdot \sqrt{-p} \cdot \cos\left(\frac{\varphi}{3}\right) - u}{3 \cdot t} \quad [\text{Gl. 3.5-14}]$$

$$(c_Y^*)_{2,3} = \frac{-2 \cdot \sqrt{-p} \cdot \cos\left(\frac{\varphi \pm \pi}{3}\right) - u}{3 \cdot t} \quad [\text{Gl. 3.5-15}]$$

Die Zusammenhänge der experimentellen Parameter und der hier gewählten Abkürzungen lauten:

$$A = \frac{q_{\max,X}}{q_{\max,Y}} \cdot \frac{K_{L,Y}}{K_{L,X}} \cdot \frac{c_{Y,0}}{c_{X,0}} \quad [\text{Gl. 3.5-16}]$$

$$B = \frac{1}{c_{X,0}} \cdot \left(\frac{1}{f_{X,Ph}} - \frac{1}{f_{Y,Ph}} \cdot \frac{q_{\max,X}}{q_{\max,Y}} \cdot \frac{K_{L,Y}}{K_{L,X}} \right) \quad [\text{Gl. 3.5-17}]$$

$$C = \frac{K_{L,X}}{K_{L,Y}} \cdot \frac{1}{f_{Y,Ph} \cdot c_{Y,0}} \quad [\text{Gl. 3.5-18}]$$

$$D = K_{L,X} \cdot \left(c_P \cdot \frac{q_{\max,Y}}{K_{L,Y} \cdot c_{Y,0}} - \frac{1}{K_{L,Y}} + \frac{1}{f_{Y,Ph} \cdot c_{Y,0}} \right) \quad [\text{Gl. 3.5-19}]$$

$$E = -K_{L,X} \quad [\text{Gl. 3.5-20}]$$

$$F = -\frac{1}{f_{Y,Ph} \cdot c_{Y,0}} \quad [\text{Gl. 3.5-21}]$$

$$t = B \cdot C \quad [\text{Gl. 3.5-22}]$$

$$u = A \cdot C + B \cdot D - F \quad [\text{Gl. 3.5-23}]$$

$$v = A \cdot D + B \cdot E - 1 \quad [\text{Gl. 3.5-24}]$$

$$w = A \cdot E \quad [\text{Gl. 3.5-25}]$$

$$\varphi = \arccos \left(\frac{-q}{2 \cdot \sqrt{-p^3}} \right) \quad [\text{Gl. 3.5-26}]$$

$$p = 3 \cdot t \cdot v - u^2 \quad [\text{Gl. 3.5-27}]$$

$$q = 27 \cdot t^2 \cdot w - 9 \cdot t \cdot u \cdot v + 2 \cdot u^3 \quad [\text{Gl. 3.5-28}]$$

Nach Lösung der kubischen Gleichung erhält man den Wert von c_Y^* (es ergibt sich nur eine physikalisch sinnvolle Lösung für die gilt $0 \leq c_Y^* \leq f_{i,Ph} \cdot c_{Y,0}$). Anschließend lässt sich c_X^* z.B. mit Gl. 3.5-11 berechnen, die Beladungen q_X^* und q_Y^* mittels der Butler-Ockrent-Gleichungen (Gl. 3.4-07 und Gl. 3.4-08). Auch hier gilt es wieder zwischen den Wegen für die Gleichgewichtseinstellung zu unterscheiden:

Sukzessives Gleichgewicht:

- $f_{i,ph} = 1$ während der Lösung der kubischen Gleichung (Anmerkung: Dies entspricht den Lösungen nach [Ebner 2006])
- $c_{i,ph} = f_{i,ph}(K_i, R) \cdot c_i^*$ anschließend

Synchrones Gleichgewicht:

- $f_{i,ph} = f_{i,ph}(K_i, R)$ während der Lösung der kubischen Gleichung
- Die ermittelten Konzentrationen c_i^* herrschen in der Zielphase vor. Die Konzentration der Nicht-Zielphase wird über die jeweiligen K-Werte berechnet

Abbildung 3-23 stellt die physikalischen Gegebenheiten, welche mit den vorgestellten Gleichungen beschrieben werden können, grafisch dar. Die Partikel befinden sich hier in der Unterphase, der umgekehrte Fall ist mit den Gleichungen ebenfalls berechenbar.

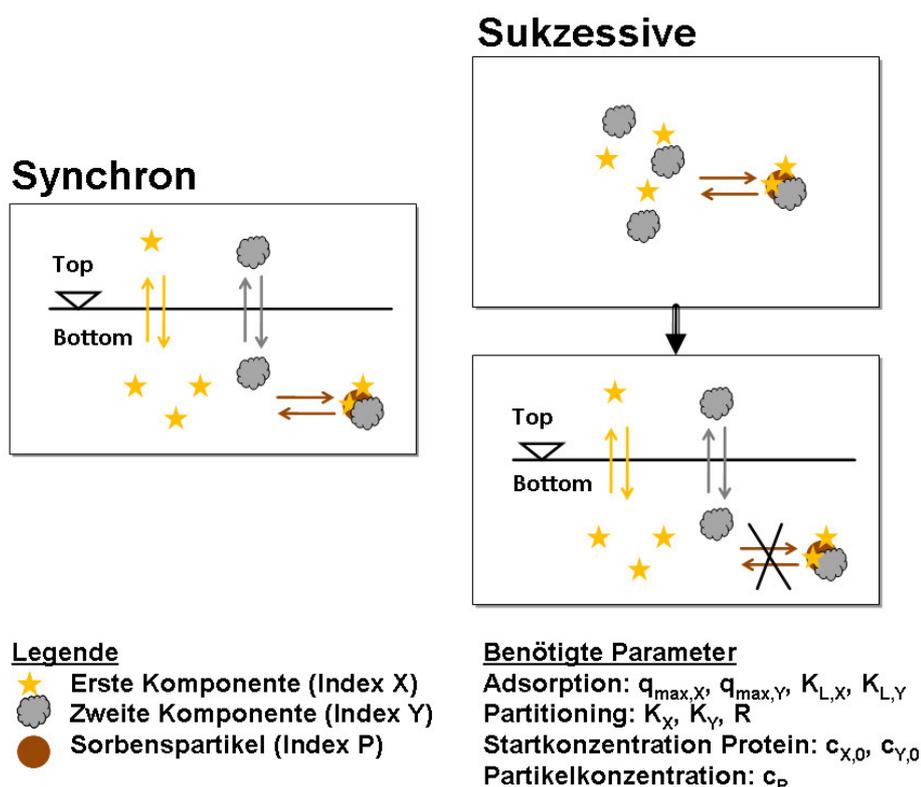


Abbildung 3-23: Schema der Gleichgewichtseinstellung für gekoppelte Adsorption und Extraktion zweier Sorptive in einem Zweiphasensystem mit Adsorbentien in der Unterphase

Die Berechnungen lassen sich mit Hilfe dieser Gleichungen mit vergleichsweise wenig Aufwand durchführen, beispielsweise mit der Software Microsoft Excel® oder einem Taschenrechner.

3.5.3 Beispielrechnungen

In diesem Abschnitt werden theoretische Berechnungen für mögliche Kombinationen von Adsorbens – ATPS – Proteinen vorgestellt, die sowohl das Potential als auch die Grenzen des vorgestellten Konzepts im Hinblick auf die maximal erreichbare Performance aufzeigen sollen. Eine Grundannahme ist hierbei, dass die Adsorbentien eines von zwei betrachteten Proteinen bevorzugt adsorbieren, während die Zielphase, in welcher sich die Adsorbentien anreichern, beide Proteine tendenziell ausschließt. Zur Einführung sei zunächst ein Beispiel gezeigt, bei dem sich das Gleichgewicht synchron einstellt und die Proteine eine leichte Präferenz für die Oberphase haben ($K_X = K_Y = 2$). Die Adsorbentien befinden sich in der Unterphase. Von den Adsorbentien wird die Komponente X bevorzugt adsorbiert, was über den K_L -Wert in die Berechnung einfließt. Die relevanten Größen betragen: $c_{X,0} = c_{Y,0} = 0,1$ g/L; $q_{\max,X} = q_{\max,Y} = 100$ mg/g; $K_{L,X} = 0,01$ g/L; $K_{L,Y} = 1$ g/L; $R = 1$. In Abbildung 3-24 werden die prozentualen Mengenanteile der Komponenten X und Y, verteilt auf die beiden flüssigen und die Sorbens-Phase, über der eingesetzten Partikelkonzentration aufgetragen. Die Summe aller Anteile ergibt hierbei stets 100%.

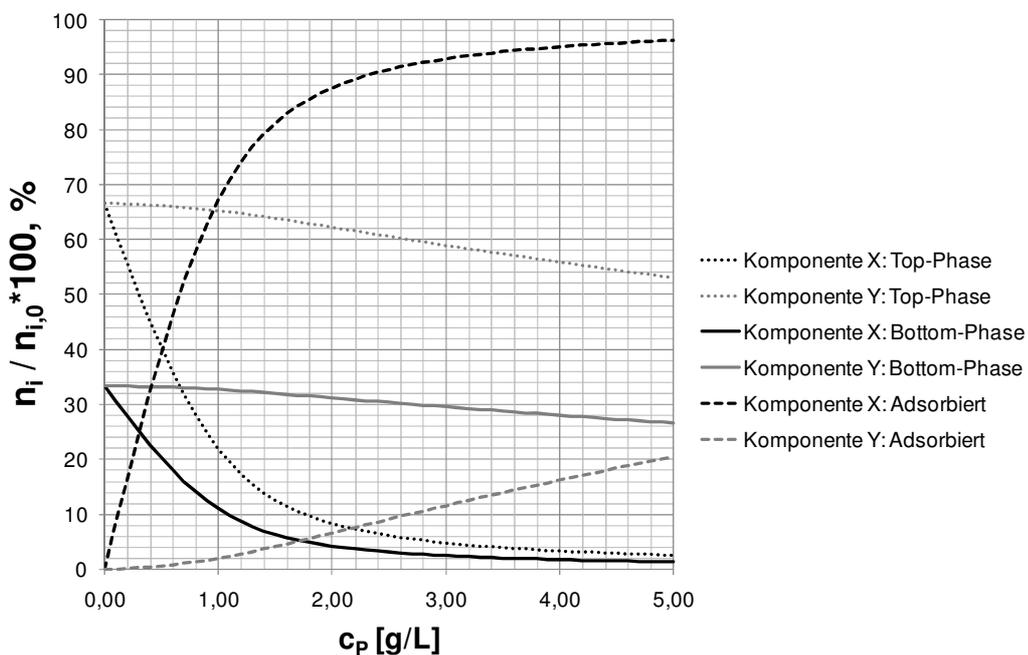


Abbildung 3-24: Verlauf der im GGW auf die verschiedenen flüssigen sowie die Sorbensphase verteilten Mengenanteile zweier Komponenten X und Y aufgetragen über der Partikelkonzentration c_p für eine Beispielrechnung der gekoppelten Adsorption und Extraktion

Mit steigender Partikelkonzentration verarmen die flüssigen Phasen zunehmend an Komponente X und diese befindet sich zunehmend auf dem Sorbens. Für hohe Konzentrationen wird auch die nicht bevorzugte Komponente Y in nennenswerten Massen sorbiert, da dann genügend Adsorptionsplätze zur Verfügung stehen. Die Berechnung aller

Konzentrationen und Beladungen sowie deren Trends sind mit den vorgestellten Gleichungen möglich, jedoch ist die in Abbildung 3-24 gewählte Darstellung nicht besonders übersichtlich. Um eine aufschlussreichere Darstellung zu erhalten, werden die in technischen Separationsprozessen wichtigen Prozessgrößen Ausbeute und Reinheit definiert. Dabei wird davon ausgegangen, dass die gesamte Menge der Spezies X, welche sich in der Zielphase (hier: Unterphase) befindet, nach dem Sorptionsschritt vollständig eluiert werden kann. Dasselbe gilt für die Verunreinigung Y, welche stellvertretend für alle möglichen Verunreinigungen in das Modell einfließt. Die Ausbeute wird mit Y (engl. „Yield“) und die Reinheit mit P (engl. „Purity“) bezeichnet.

$$Y_{X,B} = \frac{n_{X,B}}{n_{X,0}} = c_{X,B} \cdot V_B + q_X \cdot c_P \quad [\text{Gl. 3.5-29}]$$

$$P_{X,B} = \frac{n_{X,B}}{n_{X,B} + n_{Y,B}} = \frac{c_{X,B} \cdot V_B + q_X \cdot c_P}{c_{X,B} \cdot V_B + q_X \cdot c_P + c_{Y,B} \cdot V_B + q_Y \cdot c_P} \quad [\text{Gl. 3.5-30}]$$

Abbildung 3-25 und Abbildung 3-26 zeigen die theoretischen Verläufe von Ausbeute und Reinheit über der Partikelkonzentration für die oben angestellte Beispielrechnung. Hierbei wird das MEP-GGW (synchrone Gleichgewichtseinstellung) verglichen mit dem Einsatz der reinen Mikrosorbentien und dem reinen ATPS. Der Verlauf für das ATPS-Gleichgewicht ergibt hier selbstverständlich eine flache Linie, da stets der Wert für $c_P = 0$ g/L erhalten wird.

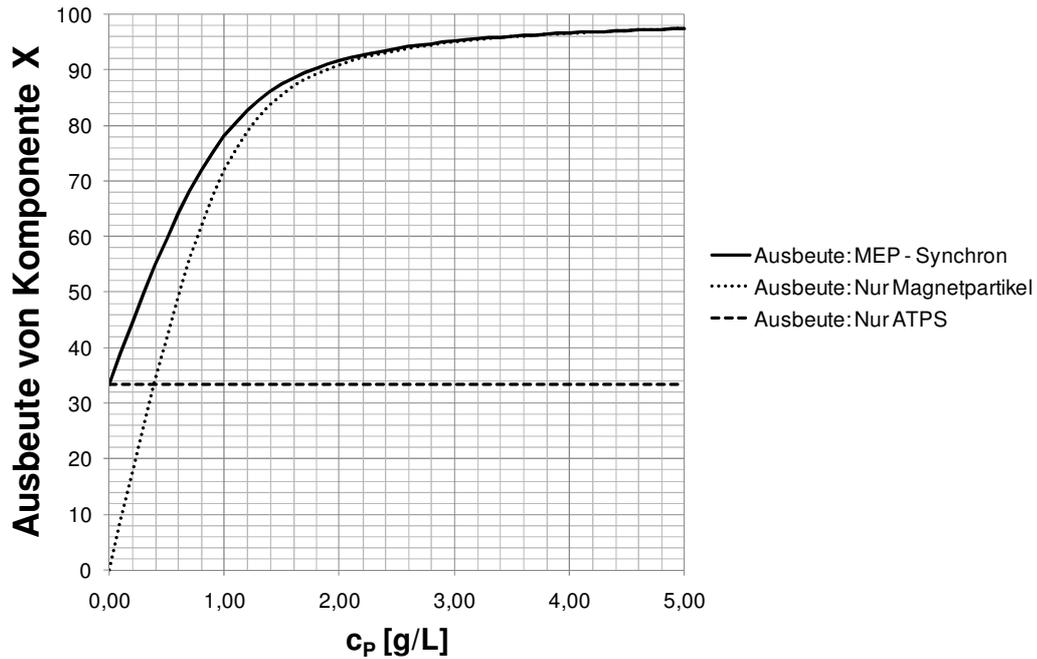


Abbildung 3-25: Exemplarischer Verlauf der Ausbeute von Komponente X über c_p für die Fälle „Nur Magnetpartikel“, „MEP-Synchron“ und „Nur ATPS“

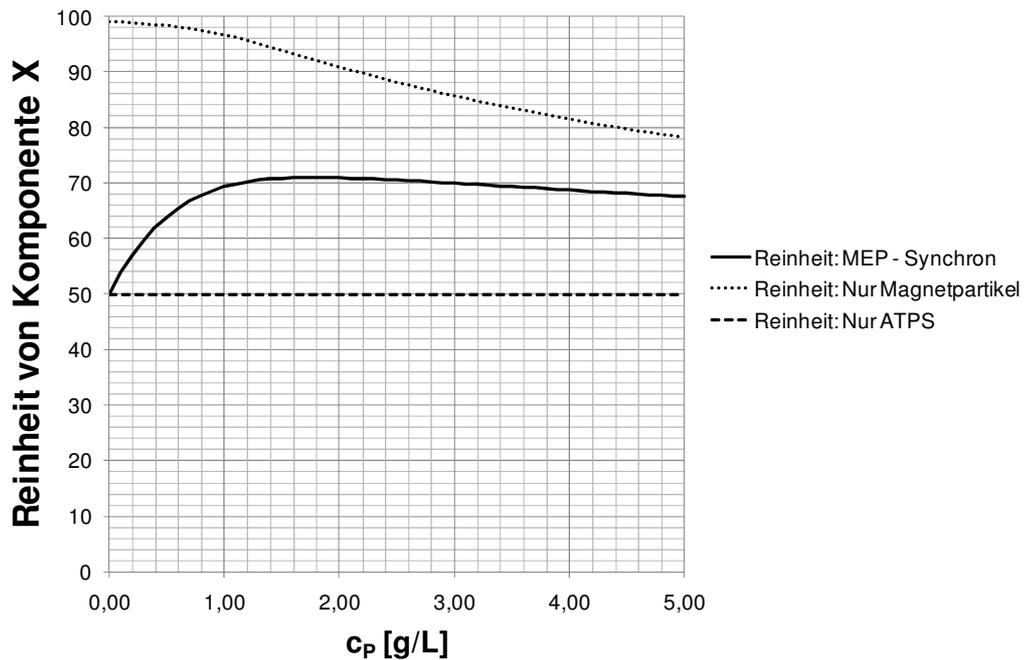


Abbildung 3-26: Exemplarischer Verlauf der Reinheit von Komponente X über c_p für die Fälle „Nur Magnetpartikel“, „MEP-Synchron“ und „Nur ATPS“

Im Fall „Nur Magnetpartikel“ steigt die Ausbeute mit zunehmender Partikelkonzentration während die Reinheit sinkt. Diesen Zusammenhang hat bereits [Ebner 2006] umfassend dargestellt und mittels Parametervariationen beschrieben. Im Fall „MEP-Synchron“ wird deutlich, dass die Ausbeute für $c_p \rightarrow 0$, verglichen mit den reinen Magnetpartikeln, zunächst

höher ist, sich dann aber angleicht. Die Überhöhung erklärt sich daraus, dass im Fall „MEP-Synchron“ sowohl die in der freien, der „Bulk-Phase“, befindlichen Moleküle als auch die adsorbierten zur Ausbeute gerechnet werden. Für hohe Partikelkonzentrationen sind die adsorbierten Zielmoleküle gegenüber den Freien in der Überzahl, weswegen sich die Kurven angleichen.

Betrachtet man die Reinheiten, so erkennt man, dass der Fall „Nur Magnetpartikel“ dem Fall „MEP-Synchron“ deutlich überlegen ist. Dies liegt an der Verunreinigung Y, die aus der MEP-Zielphase nicht effektiv ausgeschlossen wird. Verbessern kann man das Ergebnis aber beispielsweise durch Änderung des Volumenverhältnisses R. Wird dieses (in diesem Fall von $R = 1$ auf $R = 10$) vergrößert, so gibt es weniger Unterphase mit Verunreinigung, zudem wirkt sich das Phasenverhältnis auf die Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts aus.

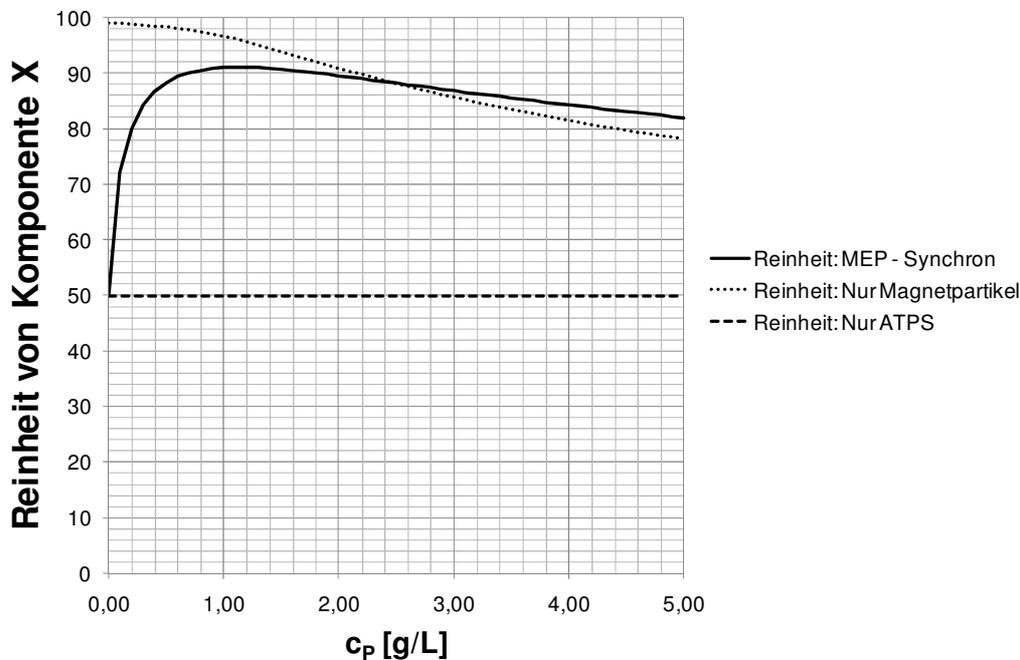


Abbildung 3-27: Verlauf der Reinheit von Komponente X über c_p für die Fälle „Nur Magnetpartikel“, „MEP-Synchron“ und „Nur ATPS“ nach Änderung des Volumenverhältnisses von $R=1$ auf $R=10$

In Abbildung 3-27 wird deutlich, dass in diesem Fall das MEP-GGW sogar die Magnetpartikel in puncto Reinheit übertreffen kann, obwohl beide Proteine in gleichem Maße aus der Zielphase ausgeschlossen werden. Allerdings wird die Ausbeute durch Vergrößerung von R leicht geringer (siehe dazu Abbildung 3-28).

Wichtige Fragen bezüglich einer späteren technischen Realisierung des Prozesses betreffen die Einstellung des Gleichgewichts: Stellt es sich synchron oder sukzessive ein? Wie unterscheiden je nachdem sich die erhaltenen Werte für Ausbeute und Reinheit?

In den folgenden Berechnungen gelten dieselben Werte wie gehabt und ein Phasenverhältnis von $R = 10$.

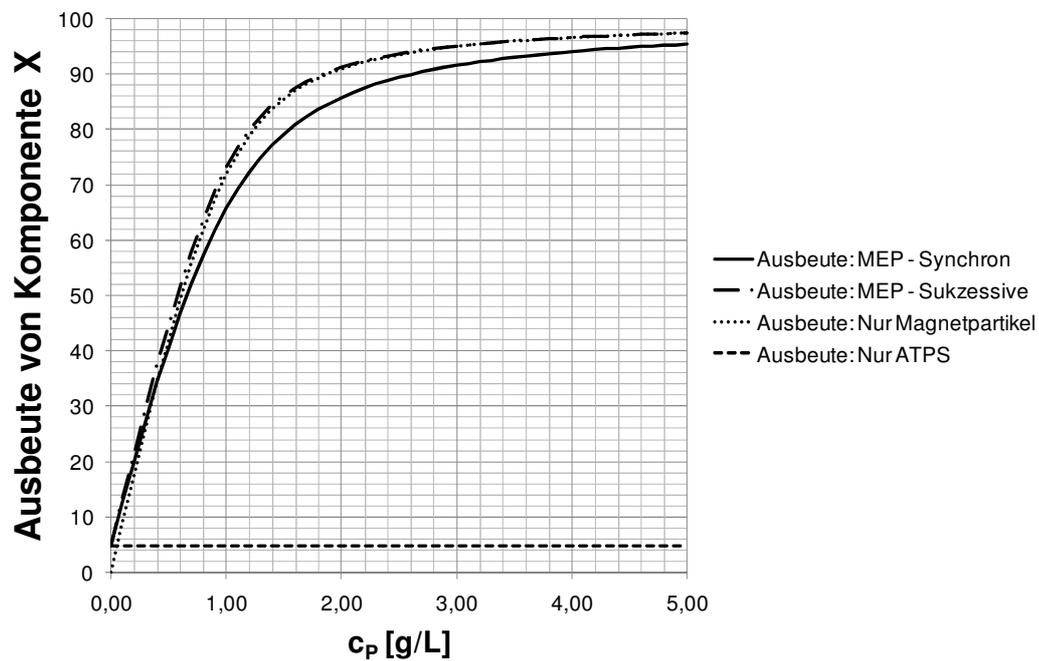


Abbildung 3-28: Exemplarischer Verlauf der Ausbeute für die Fälle „MEP-Synchron“, „MEP-Sukzessive“, „Nur Magnetpartikel“ und „Nur ATPS“

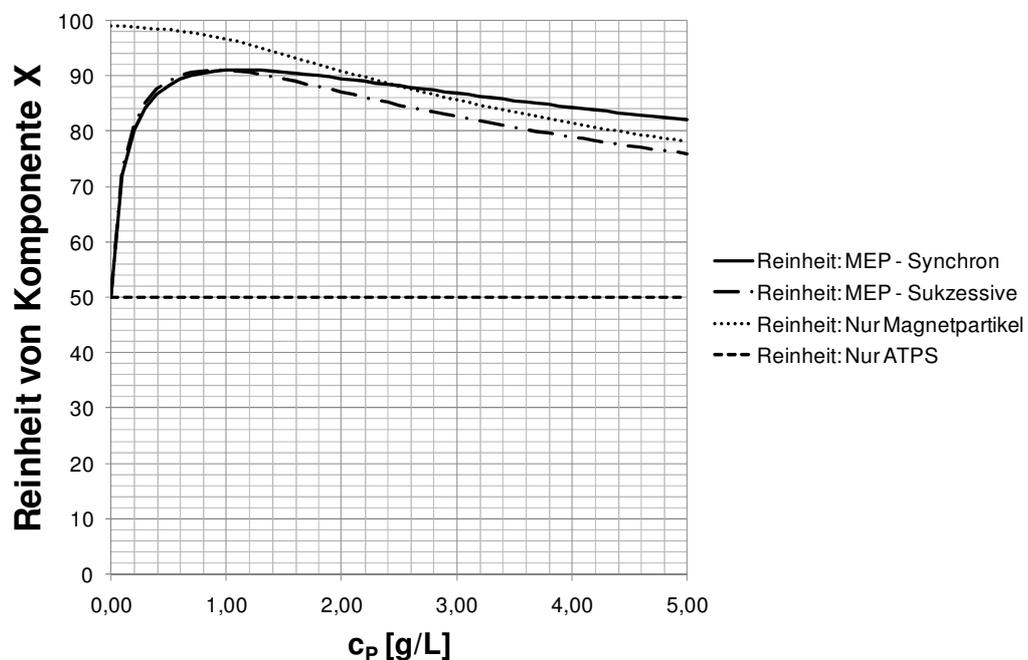


Abbildung 3-29: Exemplarischer Verlauf der Reinheit für die Fälle „MEP-Synchron“, „MEP-Sukzessive“, „Nur Magnetpartikel“ und „Nur ATPS“

Im Fall des sukzessiven Gleichgewichts gilt, dass die errechnete Beladung immer die gleiche ist als wenn nur Magnetpartikel eingesetzt würden. Die Ausbeute ist aufgrund der in der bulk-

Phase befindlichen Menge an freier Komponente X immer etwas größer, die Reinheit aufgrund der Komponente Y in derselben Phase etwas geringer. Die Zusammenhänge sind im Falle des synchronen Gleichgewichts, wie bereits dargelegt, etwas komplizierter und müssen für jeden Fall gesondert betrachtet werden. Es lässt sich hier jedoch sagen, dass eine Verbesserung der Reinheit stets zu Lasten der Ausbeute geht und vice versa. Man steht also vor einer klassischen Optimierungsaufgabe, die für jede Anwendung neu definiert werden muss und mittels der vorgestellten Gleichungen mit überschaubarem Rechenaufwand durchgeführt werden kann.

4 Experimenteller Teil

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien hatten, falls nicht anders gekennzeichnet, mindestens p.A.-Qualität (Hersteller: Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Acros Chemicals). In allen Versuchen wurde Milli-Q-Wasser eingesetzt.

4.1 Eingesetzte mizellare ATPS

Die in dieser Arbeit eingesetzten ATPS-bildenden Polymere waren nichtionische Tenside vom Typ „Polyethoxylierte Fettsäuren“ und „Polyethoxylierte Phenolate“. Nach Literatur- und Internetrecherchen sowie Gesprächen mit Herstellern wurden Triton X-114 und Aethoxal B für experimentelle Arbeiten gewählt. Triton X-114 ist ein in der Biotechnologie bekannter Stoff (u.a. [Sanchez-Ferrer 1994]), während Aethoxal B bis dato noch nicht für biotechnologische Zwecke eingesetzt wurde.

4.1.1 Aethoxal® B

Kurzschreibweise: $C_{12-14}EO_{4,5}PO_5$

Molmasse: 671 g/mol (Durchschnitt)

Vertrieb: Cognis GmbH

Darreichungsform: Viskose, durchscheinende Flüssigkeit bei RT

INCI-Bezeichnung: PPG-5-Laureth-5

Anmerkungen: Wird u.a. in Shampoos verwendet, deshalb auch die INCI-Eintragung

4.1.2 Triton® X-114

Kurzschreibweise $C_8PhenEO_{7,5}$

Molmasse: 521 g/mol (Durchschnitt)

Vertrieb: Sigma-Aldrich

Darreichungsform: Viskose, durchscheinende Flüssigkeit bei RT

INCI-Bezeichnung: keine

Anmerkungen: Wird u.a. in Farben, Lacken und Detergenzien verwendet

4.1.3 Weitere mizellare ATPS

In der Literatur finden sich noch viele mizellare ATPS, die für weitere Arbeiten interessant sein könnten, hier aber nach ersten Überprüfungen nicht gewählt wurden. Hauptsächlich sind dies Tenside vom Typ C_iEO_j (z.B. [Huibers 1997]), diese sind aber oftmals nur in hochreiner Form zu beziehen und damit sehr teuer, was sie vor allem im Hinblick auf ein Scale-Up des Prozesses uninteressant erscheinen ließ. Ein in der Literatur beschriebenes und für

großtechnische Zwecke eingesetztes Tensid (Summenformel $C_{12-18}EO_5$) ist Agrimul NRE 05 (Cognis GmbH), welches für die Forschung bereitgestellt wurde und heute leider nicht mehr erhältlich ist. Agrimul NRE 05 wurde innerhalb eines EU-Projekts des fünften Rahmenprogramms, welches unter der Koordinierung des ATPS-Experten Folke Tjerneld von der Universität Lund (Schweden) durchgeführt wurde, zur Proteinaufreinigung verwendet ([Collen 2002, Linder 2004, Selber 2002a, Selber 2002b, Selber 2004]). Diese Tatsache und die vorhandenen Literaturdaten machten dieses Tensid sehr interessant für den MEP-Prozess, auf Rückfrage beim Hersteller wurde jedoch nur die Information erteilt, dass es nicht mehr hergestellt wird. Weitere Recherchen führten zu dem, nach der Strukturformel analogen, Tensid Dehydol LT5, welches sich jedoch im Verhalten extrem von Agrimul NRE 05 unterscheidet und für unsere Zwecke unbrauchbar war.

Ebenfalls interessant waren die von Tani *et al* ([Tani 1997a, 1998, Tani 1997b, Tani 2001]) eingesetzten Pluronics®, wobei es sich um Tri-Block-Polymere aus Polypropylenoxid- und Polyethylenoxid-Untereinheiten handelt, die von der Firma BASF in großen Mengen hergestellt werden. Pluronics Tenside führten in Voruntersuchungen zu sehr starker Agglomeration der eingesetzten Partikel und wurden nicht weiter verwendet.

4.2 Eingesetzte Protein-Biosysteme

4.2.1 Hühnereiweiß: Lysozym und Ovalbumin

Lysozym aus Hühnereiweiß (E.C. 3.2.1.17; CAS 12650-88-3) wurde über Sigma-Aldrich in kristalliner Form bezogen (Best.-Nr.: Fluka 62971, ~70.000 units/mg). Lysozym ist ein einzelsträngiges, vergleichsweise kleines Enzym (ca. 14,6 kDa), das gram-positive Bakterien zerstört, indem es durch Hydrolyse die Peptidoglykan-Schicht der Zellwand schädigt. Der pI-Wert von Lysozym liegt sehr hoch und wird in der Regel zwischen 9 und 11 angegeben (z.B. 10,5 in [Guerin-Dubiard 2005] oder 10,7 in [Desert 2001]).

Albumin aus Hühnereiweiß (=Ovalbumin, CAS 9006-59-1) wurde ebenfalls über Sigma-Aldrich als lyophilisiertes Pulver bezogen (Best.-Nr.: A5503, Grade V >98% via Agarose Gelelektrophorese). Ovalbumin besitzt eine molare Masse von ca. 45 kDa, die Angabe von Sigma-Aldrich beträgt 44,287 kDa (berechnet aus der Aminosäuresequenz). Die Angaben des pI Wertes in der Literatur schwanken zwischen 4,8 und 5,4 ([Desert 2001]).

Hühnereiweiß wurde aus handelsüblichen Eiern entnommen. Nach Literaturangaben liegt der Gehalt von Albumin im Hühnereiweiß bei ca. 54%, der von Lysozym bei ca. 3,5%. Weitere Bestandteile sind Ovotransferrine (12-13%), Ovomuroid (11%), Ovoglobuline (8%) sowie Avidin, Ovoinhibitor und Flavoprotein (alle < 1%) [Desert 2001].

4.2.2 *Escherichia Coli*: 6x HIS-tagged GFP

Aus der am ITC-WGT durchgeführten Vorgängerarbeit von Dr. Niklas Ebner [Ebner 2006] stand eine größere Menge GFP-Lösung in ausreichend reiner Form (>95%) für Versuche zur Verfügung. Das GFP („Green Fluorescent Protein“) wurde als 6xHis getaggte eGFP-Variante („enhanced“) am Institut für Industrielle Genetik (IIG) der Universität Stuttgart rekombinant in der Bakterienzelle *Escherichia coli* (Stamm BW3110) hergestellt. Nach Abschluss der Fermentation wurden die Bakterienzellen mechanisch mittels einer Rührwerkskugelmühle (Dyno-Mill KDL, Firma *Bachhofen*, Basel, Schweiz) aufgeschlossen und die erhaltene Biorohsuspension mittels HGMF aufgearbeitet [Ebner 2006].

Das von Ebner zur Verfügung gestellte Eluat aus der HGMF-Aufreinigung beinhaltete das Protein GFP in einer Konzentration von ca. 3 g/L in 0,1 M Imidazol, 0,2 M NaCl bei pH 6,8. Ebenfalls vorhanden waren Kupferionen, die sich bei der Elution von den eingesetzten Metall-Chelat bildenden Magnetpartikeln ablösen. Um das Protein für eigene Versuchszwecke einzusetzen war es notwendig, es aus dem Elutionspuffer in ein anderes Puffermilieu zu überführen. Für diesen Zweck wurden Zentrifugen-Membranfiltrerröhrchen (Fa. Millipore, Amicon Ultra-5 Centrifugal Filter Units, 5kDa, Best-Nr.: UFC900524) mit einem Cut-Off bei 5 kDa eingesetzt. In dieses Röhrchen wurden 1 mL GFP-Eluatlösung und 9 mL des gewünschten Puffers gegeben. Anschließend wurde das Röhrchen bei 4.000 rpm zentrifugiert (Fa. Hettich, Zentrifuge Universal 16) bis 9 mL die Membran passiert hatten. Kleine Moleküle durchdringen die Membran, während das GFP (>>5 kDa) quantitativ im Überstand verbleibt. Anschließend wird der Überstand mit frischem Puffer erneut auf 10 mL aufgefüllt und das Röhrchen zentrifugiert. Durch fünfmaliges Wiederholen dieser Prozedur kann eine 10⁵-fache Verdünnung des Ausgangspuffers gewährleistet werden.

GFP hat bei einer Primärsequenz von 238 Aminosäuren eine Molmasse von 26,9 kDa (Wildtyp aus der Qualle *Aequorea victoria*). Die hier verwendete 6xHis getaggte Variante liegt somit bei ca. 27 kDa. Der pI-Wert von GFP liegt bei 6,8.

4.2.3 Soja Bohnen: Isoliertes Soja Protein

Von unserem Projektpartner Solae Denmark A/S wurde uns ein kommerziell vertriebenes Isolat aus Soja-Bohnen (ISP HXP 96) in Pulverform bereitgestellt. Dieses Pulver wurde mittels eines Küchenmixers bei einer Konzentration von 10% w/w in Milli-Q-Wasser dispergiert, was zu einer grau/gelblichen, trüben Proteinlösung führte. Diese Lösung wurde ohne weitere Behandlung für Separationsversuche eingesetzt.

4.3 Eingesetzte magnetische Mikrosorbentien

4.3.1 Grundpartikel und Waschmethoden

Als Grundpartikel wurden von der Firma chemagen Biopolymer AG (Baesweiler, Deutschland) hergestellte M-PVA-Beads verwendet. Diese in der Regel 1 bis 3 μm großen „Magnetbeads“ bestehen aus einer Polymermatrix (hier PVA: Polyvinylalkohol), in die Nanokristallite aus Magnetit (Fe_3O_4) eingebettet sind. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich drei, von Chemagen gelieferte, Partikel-Chargen verwendet:

- M-PVA 012; Lot-Nr. R2-221203 (aus dem Jahr 2003)
- M-PVA 011; Lot-Nr. R1-0124055 (aus dem Jahr 2005)
- M-PVA 012; Lot-Nr. R2-0109027 (aus dem Jahr 2007)

Die M-PVA 012 Chargen haben eine mittlere Partikelgröße von ca. 2 μm , die M-PVA 011 von ca. 1 μm . Obwohl die Partikel allesamt aus PVA bestehen, unterscheiden sie sich doch sehr stark in ihrem Verhalten (z.B. Agglomerationsverhalten und Dispergierbarkeit, Reaktivität bei Funktionalisierungsversuchen, Proteinbindekapazität), was auf gewisse Schwankungen im Herstellungsprozess hindeutet. Deshalb wurde selbst bei den kommerziell erhältlichen Magnetbeads stets unterschieden mit welcher Charge Funktionalisierungsversuche durchgeführt wurden. Die eingesetzten Methoden zur Charakterisierung der Partikel sind im Anhang zusammengefasst.

Gelagert wurden die Partikel meist bei 4 °C in Milli-Q-Wasser. Um sie auf Funktionalisierungsversuche vorzubereiten, wurde in Abstimmung mit unseren Projektpartnern (Universität Birmingham, Prof. O.R.T. Thomas) eine Waschprozedur entwickelt, welche garantieren sollte, dass etwaige Verunreinigungen aus dem Produktionsprozess der Magnetbeads entfernt werden. In dieser Waschprozedur wurden die Partikel mit folgenden Lösungen in Kontakt gebracht: 100% Wasser; 50% Wasser / 50% Aceton; 100% Aceton; 50% Aceton / 50% Methanol; 100% Methanol; 50% Methanol / 50% Wasser; 100% Wasser (2x); 1M NaCl; 100% Wasser (3x). Falls nicht anders gekennzeichnet, wurden die Partikel nach dieser Routine gewaschen. Die Massenangaben beziehen sich immer auf die Partikeltrockenmasse, auch wenn diese stets feucht vorgelegt wurden.

4.3.2 Hydrophobierung

Um die Partikel zu hydrophobieren, wurde als Ligand ein C8-Alkylrest gewählt, der nach einem von Xing [Xing 2006] angegebenen Protokoll aufgebracht werden sollte. Neben den M-PVA-Beads benötigt man für die Kopplungsreaktion 1-Chloroktan (Ligand), Tetrahydrofuran (Lösungsmittel), Triethylamin (Base) sowie Aceton und einen Alkohol (Waschung). Das Protokoll lautet:

- 200 mg Partikel mit 27 mL Tetrahydrofuran dispergieren
- Zufügen von 3 mL 1-Chloroktan (~ 10 facher Überschuss)
- Zufügen von 5 mL Triethylamin (als Base)
- Reaktion für 24 Stunden bei 60 °C, geschüttelt
- Dreifaches Waschen mit Aceton
- Dreifaches Waschen mit Alkohol
- Sechsfaches Waschen mit Milli-Q-Wasser

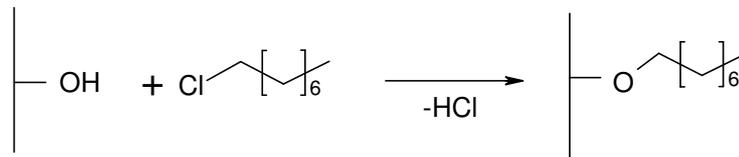


Abbildung 4-1: Funktionalisierung von M-PVA Beads mit 1-Chloroktan

Um die Reaktion möglichst wasserfrei durchzuführen, wurden die M-PVA Partikel vor der Reaktion zweimal mit dem Reaktionsmedium (Tetrahydrofuran) gewaschen. Als Alkohol wurde Methanol eingesetzt.

4.3.3 Kationenaustauscher

Zur Produktion schwachsaurer Kationenaustauscher aus M-PVA-Beads wurde eine Cerium(IV)-initiierte Acrylsäure-Polymerisation nach einem Protokoll von Brown *et al* durchgeführt [Brown 2007], wobei eine Reaktion nach Abbildung 4-2 angenommen wird:

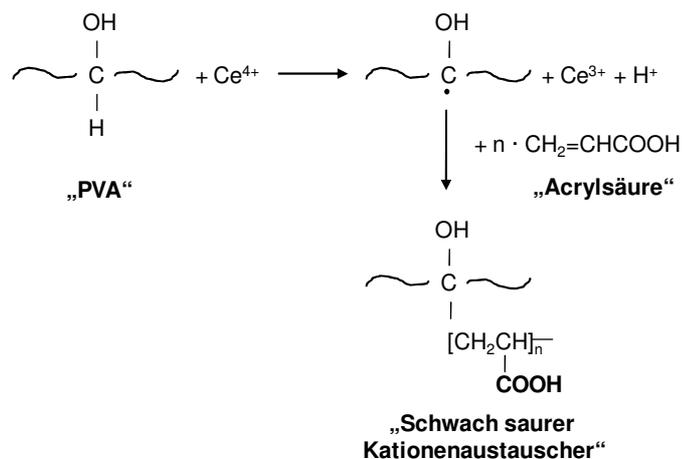


Abbildung 4-2: Cerium(IV)-initiiertes Grafting von Acrylsäure auf M-PVA-Beads

Als Grundlage der hier getätigten Versuche diente eine SOP („Standard Operation Procedure“), welche von Geoff Brown an der Universität Birmingham angefertigt wurde und hier gekürzt wiedergegeben wird.

Für die Durchführung werden folgende Chemikalien und Lösungen benötigt:

- M-PVA-Beads
- Für mindestens 20 Minuten mit N₂ entgastes Milli-Q-Wasser
- Monomer, hier: Acrylsäure (Flüssig bei RT)
- Starterlösung: (NH₄)₂Ce(NO₃)₆ in 2 M HNO₃ (SOP: c = 75,5 mg/mL)
- Stopplösung: 0,2 M Na₂SO₃ in 10% (v/v) Eisessig
- Waschlösungen: Milli-Q-Wasser und 1 M NaCl

Die Partikel (SOP: 25 mg) werden zunächst mit dem entgasten Wasser zweimal gewaschen und schließlich in Wasser (SOP: 1,5 mL) suspendiert. Nun wird diese Mischung nochmals für 10 Minuten mit N₂ entgast, dann das Monomer (SOP: 151 µL) hinzugefügt und für 5 Minuten bei RT geschüttelt. Anschließend wird die Starterlösung (SOP: 75 µL) zugegeben und die Reaktionsmischung für 3 Stunden bei RT geschüttelt. Nach diesen 3 Stunden wird der Reaktionsüberstand nach Magnetseparation abgezogen und die Partikel in der Stopplösung (SOP: 3 mL) für 30 Sekunden suspendiert (3 mL). Zum Abschluss folgen die Waschschriffe 2x Wasser, 2x 1M NaCl, 2x Wasser (SOP: je 3 mL Lösungsvolumen).

Die Partikel wurden nach der Funktionalisierung bei 4 °C in Wasser gelagert.

4.3.4 Metall-Chelatbildner

Ein in verschiedenen Vorgängerarbeiten ([Hoffmann 2003], [Meyer 2004], [Ebner 2006]) verwendeter Ligand zur Proteinaufreinigung ist mit zweiwertigen Kupferionen beladene Immino-Diessigsäure (IDA). Das Kupferion ist durch seine Eigenschaft als Lewis-Säure geeignet, freie Elektronenpaare von Stickstoffatomen koordinativ zu binden und ermöglicht damit die Adsorption von Proteinen mit exponierten Histidin-Resten oder His-Tags. Diese Technik ist als IMALT („Immobilized Metal-Ion Affinity Ligand Technology“) schon seit den 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts bekannt. Eine schematische Darstellung eines IDA – Cu²⁺ - Protein-Komplex zeigt Abbildung 4-3.

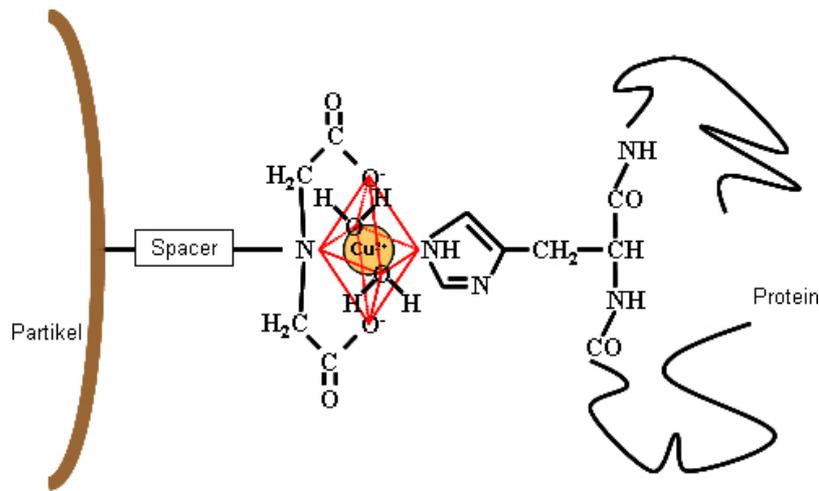


Abbildung 4-3: Struktur eines Cu^{2+} -IDA-Komplexes mit einem über einen Histidinrest gebundenen Protein (nach [Ebner 2006])

In eigenen Funktionalisierungsversuchen wurde versucht, die IMALT-Technik durch Grafting auf M-PVA-Beads zu ermöglichen. Hierzu wurde die in Kapitel 4.3.3 beschriebene Ce(IV)-Grafting Methode auf das wasserlösliche Monomer 1-Vinylimidazol angewendet (siehe Abbildung 4-4). Bislang erfolglos blieb das Vorhaben mit dem wasserunlöslichen Monomer Vinylbenzolimminodiessigsäure (VBIDA).

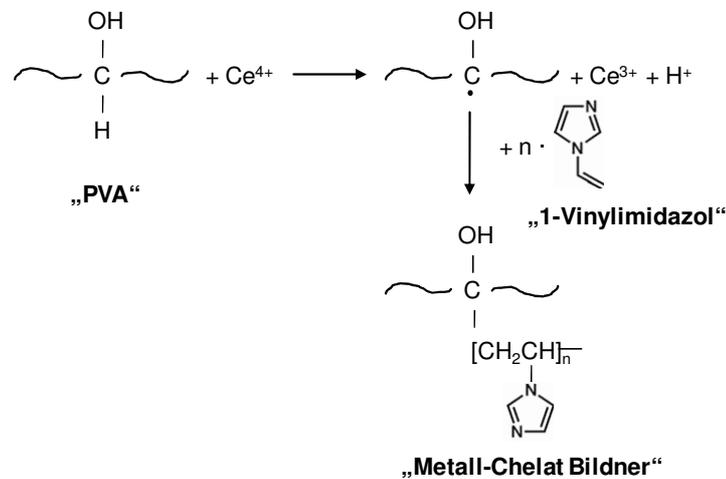


Abbildung 4-4: Cerium(IV)-initiiertes Grafting von 1-Vinylimidazol auf M-PVA-Beads

Um diese Partikel einsatzfähig zu machen, werden Partikel mit einer Konzentration $c_p = 50 \text{ g/L}$ vor Aufreinigungsversuchen mit einer Beladelösung der Zusammensetzung $0,05 \text{ M CuSO}_4$, $0,2 \text{ M NaCl}$ für 10 min kontaktiert.

4.3.5 Hybridfunktionalisierungen

Um Partikel mit multifunktionaler Oberfläche herzustellen, wurden zuvor hydrophobisierte Partikel (siehe Kapitel 4.3.2) mit Kationenaustauschergruppen versehen (nach Kapitel 4.3.3).

Die so erhaltenen Partikel wurden mit Doppelnamen versehen, für Hydrophobierung mit anschließender Kationenaustauscherfunktionalisierung ergibt sich der Name „HIKa“.

4.3.6 Weitere Funktionalisierungsversuche

Anionenaustauscher

Heeboll-Nielsen *et al* [Heeboll-Nielsen 2004b] beschreiben mehrere Kopplungsprotokolle mittels derer endständige primäre OH-Gruppen auf magnetischen Sorbentien zur Anbindung von funktionellen Gruppen mit Anionenaustauscherfunktionalisierung dienen können. Eines dieser Protokolle beschreibt die Anbindung von DEAE (Diethylaminoethan) in einer der von Xing (siehe Kapitel 4.3.2) beschriebenen ähnlichen Weise (siehe Abbildung 4-5). Allerdings wird diese Reaktion nicht in organischem Lösungsmittel, wie bei Xing, sondern in alkalischer wässriger Lösung durchgeführt. Hierzu wurde eine Lösung der Zusammensetzung 0,5 M Na₂CO₃, 1 M NaCl, pH 11,5 angesetzt, die Partikel suspendiert (25 mg / 1,5 mL) und verschiedene Mengen 2-Chlor-DEAE (Sigma-Aldrich, 2-(Diethylamino)-ethylchlorid*HCl, CAS-Nr.: 864-24-9) eingewogen und die Reaktionsmischung bei 60 °C für 15 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Partikel zweimal mit 1 M NaCl und dreimal mit Wasser gewaschen und bei 4 °C gelagert.

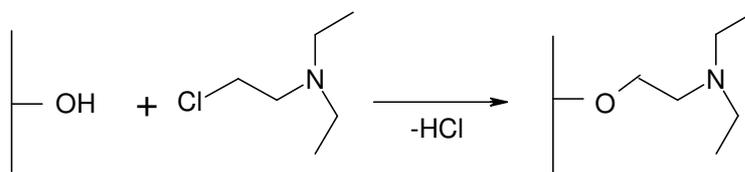


Abbildung 4-5: Funktionalisierung von M-PVA Beads mit 2-Chlor-DEAE

Dye-Liganden (Azo-Farbstoffe)

Um die Oberfläche von M-PVA-Beads mit dem Dye-Liganden Cibacron Blue 3GA (Sigma-Aldrich, CAS-Nr.: 84166-13-2) zu versehen, wurde eine Methode nach Hermanson ([Hermanson 1992]), die eigentlich für makroporöse Chromatographie-Medien entwickelt wurde, adaptiert. Die Reaktion wurde in Erlenmeyer-Kolben in einem geschüttelten Wasserbad bei 60 °C durchgeführt. Hierzu wurden Partikel (25 mg) in 8 mL Wasser vorgelegt, nach 5 Minuten 2 mL Cibacron Blue-Lösung (c= 5 mg/mL) zugegeben, nach weiteren 15 Minuten 1,17 g NaCl zugefügt und für 30 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf 80 °C geheizt, 0,1 g Na₂CO₃ zugefügt und für 60 Minuten geschüttelt. Nach Abkühlung wurden die Partikel zweimal mit 1 M NaCl sowie mehrfach mit Wasser gewaschen, mindestens so lange bis keine blaue Farbe mehr im Überstand zu erkennen war.

4.4 Eingesetzte Puffer

Tabelle 4-1 fasst die Pufferzusammensetzungen, die für unterschiedliche Binde- und Elutionsbedingungen zum Einsatz kamen, übersichtlich zusammen. Die Auswahl der Zusammensetzung erfolgte nach Erfahrungswerten aus Vorgängerarbeiten (z.B. [Ebner 2006]) und Faustregeln aus einschlägiger Literatur, z.B. [Amersham-Biosciences 2003]. Die pH-Werteinstellung bei Erstellung der Puffer wurde stets mit Säuren und Basen durchgeführt, die keine zusätzlichen Arten von Anionen oder Kationen ins System brachten.

Tabelle 4-1: Nach Anwendung sortierte Liste der eingesetzten Pufferzusammensetzungen

Wechselwirkung Sorbens - Sorptiv	Adsorption (Bindung)	Abk.	Desorption (Elution)	Abk.
Anionenaustausch	50 mM Tris-HCl pH = 8	BiAA	50 mM Tris HCl 0,5 M NaCl pH = 8	EluAA
Kationenaustausch	20 mM Na ₂ HPO ₄ pH = 6,8	BiKA	20 mM Na ₂ HPO ₄ 0,5 M NaCl pH = 6,8	EluKA
Metall-Chelat Affinität	20 mM Na ₂ HPO ₄ 0,25 M NaCl pH = 6,8	BiMCA	0,1 M Imidazol 0,25 M NaCl pH = 7,2	EluMCA
Hydrophobe WW	20 mM Na ₂ HPO ₄ 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH = 6,8	BiHI	20 mM Na ₂ HPO ₄ pH = 6,8	EluHI
Dye-Ligand Affinität	20 mM Na ₂ HPO ₄ pH = 6,8	BiDLA	20 mM Na ₂ HPO ₄ 0,5 M NaCl pH = 6,8	EluDLA

4.5 Verteilungsverhalten der Mikrosorbentien in mizellaren ATPS

4.5.1 Versuchsaufbau

Eine der Grundvoraussetzungen zur Untersuchung mizellarer ATPS, ist die Gewährleistung einer stabilen Temperierung. Hierzu wurde eine temperierbare Glasküvette gewählt (Fa. Hellma, Quarzglas SUPRASIL®, Art.-Nr.: 161-QS), welche entlang ihrer Kanten über Kanäle mit Zu- und Ablaufstutzen verfügt (siehe auch Abbildung 4-6).



Abbildung 4-6: Temperierbare Küvette im verwendeten Laboraufbau

Diese Küvette wurde mit einem mit VE-Wasser gefüllten 5L-Becherglas, welches auf einer geregelten Heizplatte (Fa. Heidolph, MR 3001 K) stand, verbunden, wodurch eine sehr schwankungsarme Temperierung erreicht werden konnte. Zur Beobachtung dienten ein Stereomikroskop (Fa. Wild, M3C) mit montierter Kamera (Fa. Basler, A602fc-2) und Lichtquelle (Fa. Schott, KL-1500 T). Die Kamera war mittels eines FireWire (IEEE 1394)-Anschlusses mit einem PC verbunden, zur Aufzeichnung der Bildinformation wurde die Software Windows MediaTM Encoder (Vers. 9.00.00.2980, 1995-2002) verwendet. Falls die Küvette von vorne beleuchtet wurde, half ein Reflektor (z.B. aus Alufolie), um ausreichend Licht und Kontrast für die mikroskopische Beobachtung zu haben. Zur Beeinflussung der magnetischen Partikel wurde ober- oder unterhalb der Küvette eine Magnetspule angebracht, mit der bei maximalem Stromfluss ein Feld von ca. 0,08 Tesla erzeugt wurde. Eine ausführliche Beschreibung der Spulengeometrie befindet sich im Anhang (Kapitel 9.1). Diese Spule war am Kreislauf des Laborkühlwassers angeschlossen, um längere Versuchsdauern zu ermöglichen. Um Vibrationen zu minimieren, wurde die Küvette samt Mikroskop und Magnetspule auf einer optischen Platte („Metrical optical performance board“) verschraubt (Fa. Thorlabs, Best.-Nr.: PBI51528), welche auf einer dämpfenden, drei cm starken Moosgummimatte auflag. Abbildung 4-7 zeigt eine Fotografie des Laboraufbaus, Abbildung 4-8 eine schematische Zeichnung der wichtigsten Komponenten. Um die Entfernungen zwischen Küvette und Magnetfeldquelle sowie die Position des Mikroskops möglichst exakt einzustellen, wurden Küvette und Spule höhenverstellbar und das Mikroskop in alle Raumrichtungen justierbar montiert. Zur Erreichung von Tiefenschärfe war die mikrometergenaue Ausrichtung des Mikroskops von besonderer Bedeutung.



Abbildung 4-7: Fotografie des verwendeten Laboraufbaus mit temperierbarer Küvette, Magnetfeldquelle, Mikroskop und Kamera

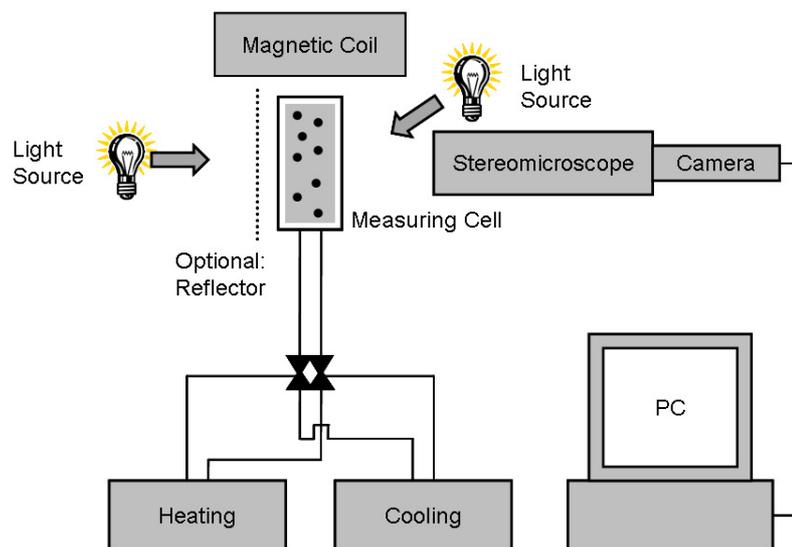


Abbildung 4-8: Schematische Zeichnung des verwendeten Laboraufbaus

Zur Durchmischung des Küvetteninhalts wurde entweder ein Vortex-Mixer eingesetzt (die Küvette konnte hierzu einfach aus dem Halter entnommen werden) oder der Inhalt wurde mit einer Eppendorf-Pipette mehrfach aspiriert. Die mit dem Mikroskop erreichbare Vergrößerung lag zwischen ein- und vierzigfach. Um die Pixelgröße zu ermitteln, wurde ein Größenstandard (ein mit linealartigen Fräsungen versehener Objektträger) bei jeder Vergrößerung fotografiert. Bei 40facher Vergrößerung betrug die Gesamtbildhöhe ca. 1 mm, was bei einer Auflösung von 640 x 480 einer Pixelgröße von etwa 2 μm entspricht.

4.5.2 Suche nach geeigneten MEP-Kombinationen

Um Systeme zu finden, bei denen sich die eingesetzten magnetischen Mikrosorbentien ohne nennenswerte Agglomeration vollständig in der dispersen Phase anreichern, wurden mögliche Kombinationen „ATPS – Puffer (pH) – Temperatur – Magnetpartikel“ hergestellt und mittels eines Mikroskopaufbaus (Kapitel 4.5.1) untersucht. Um das beobachtete Verteilungsverhalten für andere nachvollziehbar zu Papier zu bringen, wurde die Tabellenform mit drei Spalten gewählt, wie in Abbildung 4-9 dargestellt.

T: Top			Partitioning			Einteilung nach [Albertsson 1986] siehe Kapitel 3.1
I: Interface			T	I	B	
B: Bottom						
Puffer	Puffersorte	T, °C				
Partikel	Partikelsorte 1	30				a
	Partikelsorte 2	30				b
	Partikelsorte 3	30				c
	Partikelsorte 4	30				d
	Partikelsorte 5	30				e

Abbildung 4-9: Darstellungsart experimenteller Ergebnisse zum Partikelpartitioning

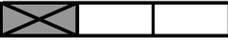
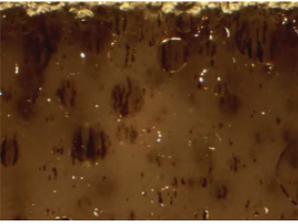
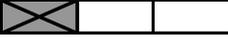
Ein doppelt durchgestrichenes Kästchen bedeutet eine stark, ein halb durchgestrichenes Kästchen eine schwach ausgeprägte Tendenz.

ATPS 1					ATPS 2						
Partitioning			Agglomeration		Partitioning			Agglomeration			
T	I	B	++	+	0	T	I	B	++	+	0

Abbildung 4-10: Exemplarische Ergebnisse des Verteilungs- und Agglomerationsverhaltens einer Partikelsorte in zwei ATPS

Die getroffene Einteilung liegt stets im Auge des Betrachters und ist keine objektive, eindeutige Messgröße. Trotzdem hat sich das gewählte Vorgehen als zweckmäßig erwiesen. Um die möglichen Unterscheidungen und die erreichbare Übersichtlichkeit zu verdeutlichen, sind in Abbildung 4-10 die exemplarischen Untersuchungsergebnisse ein und derselben Partikelsorte in zwei verschiedenen ATPS gezeigt. Im ATPS 1 akkumulieren die Partikel vollständig in der Unterphase und zeigen eine schwache bis mäßige Agglomerations Tendenz. Im ATPS 2 tendieren sie an die Phasengrenze sowie zu einem kleinen Teil in die Oberphase, das Agglomerationsverhalten ist stark ausgeprägt. Tabelle 4-2 zeigt, ebenfalls exemplarisch, verschiedene mikroskopische Aufnahmen von MEP's, wobei jeder der fünf Fälle nach Albertsson (siehe Kapitel 3.1) einmal vorkommt.

Tabelle 4-2: Exemplarische mikroskopische Fotografien verschiedener Partikel – Puffer – ATPS Kombinationen zusammen mit den erhaltenen Ergebnissen für das Verteilungs- und Agglomerationsverhalten

Information zur MEP	Fotografie	Ergebnis
Tensid: Aethoxal B Puffer: Keiner Partikel: Chemagen M-PVA 011-0124055 Temperatur: 29 °C		Partitioning T I B  Agglomeration ++ + 0 
Tensid: Aethoxal B Puffer: 20 mM NaPhosphat, pH 6,8 Partikel: Chemagen IDA (alt, ohne Lot.-Nr.) Temperatur: 29 °C		Partitioning T I B  Agglomeration ++ + 0 
Tensid: Aethoxal B Puffer: 20 mM NaPhosphat, pH 6,8 Partikel: Chemagen IDA 0124105 Temperatur: 29 °C		Partitioning T I B  Agglomeration ++ + 0 
Tensid: Aethoxal B Puffer: 20 mM NaPhosphat, 0,25 M NaCl, pH 6,8 Partikel: M-PVA mit Polyvinylimidazol Temperatur: 29 °C		Partitioning T I B  Agglomeration ++ + 0 
Tensid: Aethoxal B Puffer: 20 mM NaPhosphat, pH 6,8 Partikel: Chemagen IDA 74 Temperatur: 29 °C		Partitioning T I B  Agglomeration ++ + 0 

4.6 Versuche zur Phasentrennung von ATPS und MEP

4.6.1 Gleichgewicht

Die Bestimmung der Phasengrenzkurve von mizellaren ATPS wird üblicherweise in Messzellen durchgeführt, welche eine extrem genaue Temperierung (z.B. 0,01 °C bei [Nikas 1992]) erlauben. Hierbei wird in der Messzelle eine definierte Tensid-Lösung vorgelegt und permanent durchmischt. Die Temperatur wird aus dem einphasigen Bereich in kleinen Inkrementen erhöht und die Intensität eines die Zelle durchstrahlenden Lichtstrahls gemessen. Nimmt diese Intensität ab, durch Entstehen einer Trübung, wird das Erwärmen gestoppt und die Temperatur als T_1 notiert. Nun wird langsam gekühlt, bis die Trübung verschwindet, wobei dies bei einer Temperatur T_2 der Fall ist. Der Cloud-Point T_{CP} ist der Mittelwert dieser Temperaturen. Um die Phasengrenzkurve zu zeichnen, muss diese Prozedur über den gesamten Konzentrationsbereich durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur Bestimmung der Phasengrenzkurve entwickelt, welche bei relativ geringem experimentellem Aufwand Daten von hoher Praxisrelevanz liefern soll. Diese Methode wird im Folgenden „Tie-Line Methode“ genannt. Die Tie-Line (Konode) ist die Linie gleicher Temperatur, die zwei miteinander im GGW liegende Punkte der Binodalkurve verbindet. Zur Veranschaulichung der angewandten Methode soll Abbildung 4-11 dienen.

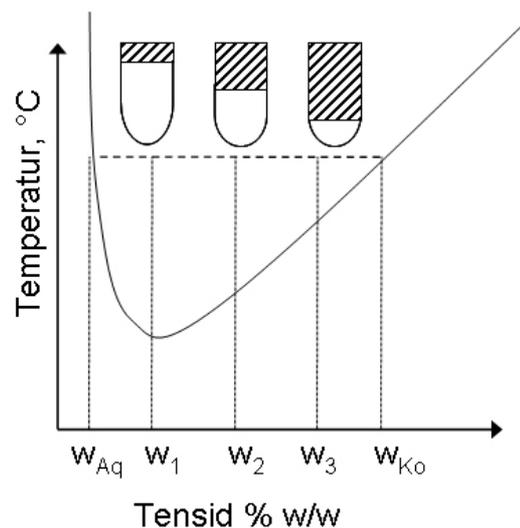


Abbildung 4-11: Phasendiagramm eines mizellaren ATPS mit exemplarischen Phasenverhältnissen

Hier sind in einem schematischen Phasendiagramm eines mizellaren ATPS (siehe auch Kapitel 3.2.1.3) drei verschiedene Zusammensetzungen w_1 , w_2 und w_3 samt der resultierenden Phasenverhältnisse skizziert. Die gestrichelte Fläche veranschaulicht hierbei den Anteil der

Koazervatphase. Nach dem Hebelgesetz (Gl. 3.2-10) gilt für die jeweiligen Dispersphasenanteile:

$$\varepsilon_i = \frac{w_i - w_{Aq}}{w_{Ko} - w_{Aq}} \quad [\text{Gl. 4.6-01}]$$

Diese hängen mit den Phasenverhältnissen R über die in Gl. 3.2-11 und Gl. 3.2-12 gezeigten Relationen zusammen, je nachdem, ob die Koazervat- die Ober- oder Unterphase bildet. Aus Gl. 4.6-01 lässt sich durch algebraische Umformung eine Geradengleichung der Form $y=m \cdot x+b$ ableiten, wobei w_{Ko} für y und w_{Aq} für x stehen:

$$w_{Ko} = \left(1 - \frac{1}{\varepsilon_i}\right) \cdot w_{Aq} + \frac{w_i}{\varepsilon_i} \quad [\text{Gl. 4.6-02}]$$

Da w_{Ko} und w_{Aq} für alle Systeme auf der gleichen Konode denselben Wert besitzen, kann man durch den Schnitt von zwei Geraden dieser Form Ausdrücke für w_{Aq} und w_{Ko} ableiten:

$$w_{Aq} = \frac{\frac{w_2}{\varepsilon_2} - \frac{w_1}{\varepsilon_1}}{\left(1 - \frac{1}{\varepsilon_1}\right) - \left(1 - \frac{1}{\varepsilon_2}\right)} = \frac{\varepsilon_1 \cdot w_2 - \varepsilon_2 \cdot w_1}{\varepsilon_1 - \varepsilon_2} \quad [\text{Gl. 4.6-03}]$$

$$w_{Ko} = \frac{(\varepsilon_1 - 1) \cdot (\varepsilon_1 \cdot w_2 - \varepsilon_2 \cdot w_1) + w_1 \cdot (\varepsilon_1 - \varepsilon_2)}{\varepsilon_1 \cdot (\varepsilon_1 - \varepsilon_2)} \quad [\text{Gl. 4.6-04}]$$

Mittels dieser Methode kann man also prinzipiell, nur durch Messung zweier im GGW erreichten Phasenverhältnisse bzw. Dispersphasenanteile, bei genauer Kenntnis des Tensidgehalts des Gesamtsystems, die Phasengrenzpunkte w_{Aq} und w_{Ko} berechnen. Allerdings kann hier ein kleiner Fehler beim Ablesen des Phasenverhältnisses oder beim Einwiegen des Tensids einen überproportional großen Effekt auf das Ergebnis haben, insbesondere auf den oft sehr kleinen Wert von w_{Aq} . Aus diesem Grund wurden immer mindestens drei Proben ins Gleichgewicht gebracht, die Dispersphasenanteile abgelesen und die resultierenden Geraden, wie in Abbildung 4-12 dargestellt, gezeichnet. Die in Abbildung 4-12 gezeichneten Geraden ergeben sich für die in Tabelle 4-3 aufgeführten, hypothetischen, Messwerte.

Tabelle 4-3: Exemplarische Ergebnisse von eingestellten Tensidgehalten und erhaltenen Dispersphasenanteilen für ein mizellares ATPS

	1	2	3
Eingestellt: w_i	0,05	0,10	0,20
Abgelesen: ε_i	0,10	0,25	0,55

Da ein exakter Schnitt von drei Geraden nie erreicht wurde, wurde die Lage des Schnittpunktes mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate unter Zuhilfenahme von in Microsoft Excel® programmierten Tabellen geschätzt. Hierzu wurde der Wert von w_{Aq} innerhalb einer Spalte in kleinen Inkrementen (0,0001) von 0 auf 100 erhöht. Für jede Probe wurden in weiteren Spalten entsprechend Gl. 4.6-02 und unter Verwendung des voreingestellten Werts w_i und des Messwerts ε_i Werte für w_{Ko} berechnet. Aus den so erhaltenen Werten für w_{Ko} wurden Mittelwert ($w_{Ko,Mittel}$) sowie die jeweiligen Abweichungen vom Mittelwert berechnet. Als Ergebnis der Anpassung war das Wertepaar von w_{Aq} und $w_{Ko,Mittel}$ angesehen, bei dem die Summe der Quadrate der Abweichungen von $w_{Ko,Mittel}$ minimal war.

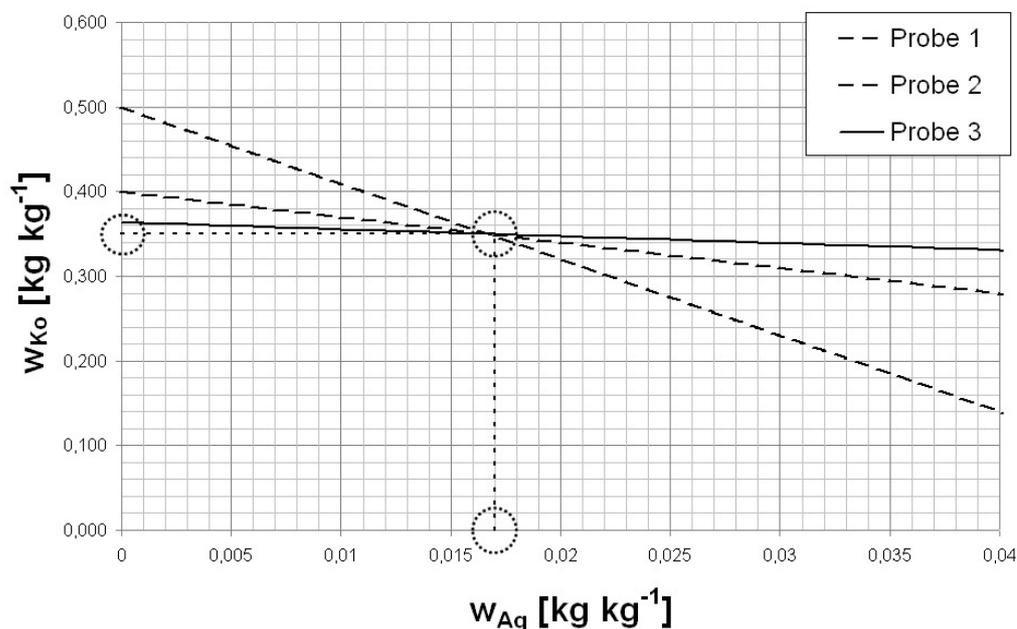


Abbildung 4-12: Veranschaulichung zur angewandten Tie-Line Methode zur grafischen Bestimmung der Phasengrenzpunkte (w_{Aq} und w_{Ko}) eines mizellaren ATPS

Der für diese Zwecke verwendete experimentelle Aufbau bestand aus einem Becken (Inhalt ca. sieben Liter), welches an ein Wasserbad (Lauda RC6 CS), ausgestattet mit externer Temperaturregelung (Thermometer: Pt-100), angeschlossen war (siehe Abbildung 4-13). Die Durchströmung des Beckens sorgte stets für eine ausreichende Durchmischung, durch

zusätzliche Isolierung der Öffnung des Beckens mit Styropor konnte die Temperatur über Tage auf $\pm 0,1$ °C gehalten werden.



Abbildung 4-13: Wasserbad mit externer Temperaturregelung samt Proberöhrchen mizellarer ATPS zur experimentellen Bestimmung des Gleichgewichts der Phasenseparation

In dieses Becken wurden Proberöhrchen mit 10 mL Volumen eingebracht, wobei die Eichung der Röhrchen eine spätere Volumenbestimmung der Phasen mit 0,05 mL Genauigkeit erlaubte. Je nachdem wie lange die Systeme zur vollständigen Phasenseparation brauchten, wurden die Röhrchen mehrere Tage bei konstanter Temperatur stehen gelassen, mindestens aber 24 Stunden.

4.6.2 Kinetik

4.6.2.1 Einzeltropfen

Zur Bestimmung der Größe und der Bewegungsgeschwindigkeit einzelner Tropfen wurde zunächst im Laboraufbau (Kapitel 4.5.1) eine Separation eines definierten MEP's durchgeführt und aufgezeichnet. Hierbei wurde der Abstand von der Magnetfeldquelle millimetergenau eingestellt und die Vergrößerung entsprechend der Tropfengröße gewählt. Anschließend wurde der erhaltene Film mittels der Software Microsoft® Windows Media™ Player (Version 9.00.00.3349, 1992-2002) abgespielt und die Bildinformation mittels Aufnahme eines „Screenshot“ (d.h. dem Befehl Alt Gr + Druck) und anschließendem Einfügen in das Programm Microsoft® Paint (Version 5.1, 1981-2001) überführt. Hier können mit Hilfe des Cursors auf der Bildoberfläche die Pixel-Koordinaten direkt abgelesen werden. Wurde ein Tropfen gewählt, so wurden Durchmesser und Position markiert und die

Pixel abgelesen, der Film dann für eine gewisse Zeit (z.B. 10 s) weiterlaufen gelassen und erneut die Position abgelesen⁵. Da die verstrichene Zeit ebenfalls notiert wurde, können aus diesen Informationen der Tropfendurchmesser sowie seine Sedimentationsgeschwindigkeit bestimmt werden. Eine Beschreibung dieser Methode findet sich auch in der Diplomarbeit von Henrich ([Henrich 2006]).

Um zu gewährleisten, dass die ermittelte Geschwindigkeit nicht allzu stark von der eines einzelnen, in einem unendlich ausgedehnten Fluid sedimentierenden Tropfen abweicht, wurde meist ein später Zeitpunkt der Separation gewählt, an dem die Schwarmeffekte sichtbar zurückgegangen waren. Auch musste sich der Tropfen geradlinig und gleichmäßig schnell bewegen, er sollte nicht koaleszieren, d.h. andere Tropfen einsammeln oder eingesammelt werden, und nicht an der Gefäßwand haften. Abbildung 4-14 zeigt exemplarisch einen gefundenen experimentellen Datensatz, wobei vierzig Messpunkte aufgenommen und ihre Geschwindigkeit über dem Tropfendurchmesser aufgetragen wurden.

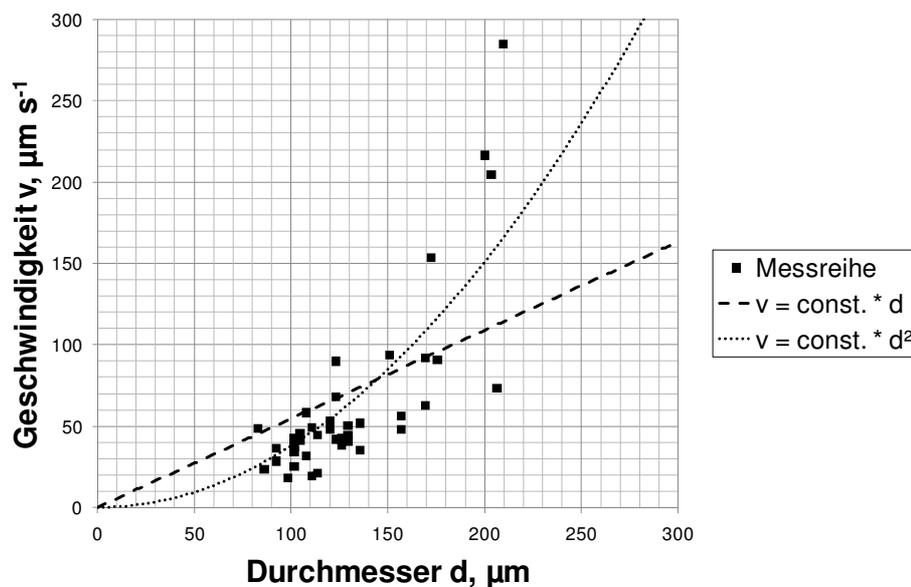


Abbildung 4-14: Experimentell gefundene Tropfengeschwindigkeiten aufgetragen gegen den Tropfendurchmesser (exemplarisch)

Trotz der Schwankungsbreite der Messpunkte wird der Trend, dass die Geschwindigkeit überproportional mit dem Tropfendurchmesser zunimmt, hier mit einem quadratischen

⁵ Um zu gewährleisten, dass der in Paint gezeigte Screenshot parallel zum Film weiterläuft, muss die Videobeschleunigung im Windows® Media Player im Menü Extras→Optionen→Leistung auf „maximal“ gesetzt werden; möchte man nur eine einzelne Fotografie exportieren, so muss man die Videobeschleunigung auf „minimal“ setzen.

Verlauf angedeutet, sichtbar. Die Konstante in diesem quadratischen Potenzgesetz sollte, bei der Annahme kugelförmiger Körper und laminarer Umströmung, aus dem Stokes-Gesetz (Gl. 3.2-22) zu ermitteln sein und somit nur von den Stoffdaten sowie der Erdbeschleunigung abhängen. Um den Wert dieser Konstanten mit geringem rechnerischem Aufwand zu ermitteln, wurden die Geschwindigkeiten über dem Quadrat des Durchmessers mittels Microsoft® Excel aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Abbildung 4-15 zeigt so eine Auftragung mit Regressionsgerade und erhaltenen Parametern. Der Regressionskoeffizient R^2 von 0,6394 in diesem Beispiel zeigt, wie stark die Werte um diesen Trend schwanken.

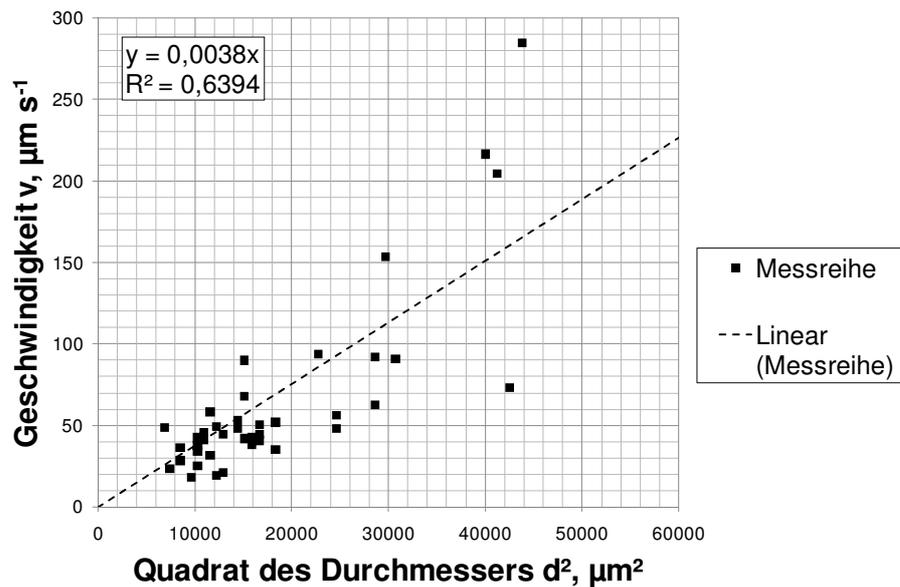


Abbildung 4-15: Experimentell gefundene Tropfengeschwindigkeiten aufgetragen gegen das Quadrat des Tropfendurchmessers (exemplarisch)

Die Steigung der Gerade entspricht dem Quotienten von Geschwindigkeit und Quadrat des Durchmessers, wie er aus der Stokes-Gleichung (Gl.3.2-22) ermittelt werden kann (siehe Gl. 4.6-05).

$$\frac{v_{Stokes}}{d^2} = \frac{g \cdot \Delta\rho}{18 \cdot \eta_c} \quad [Gl. 4.6-05]$$

Führt man eine Separation unter Einflussnahme eines magnetischen Feldes durch, so benötigt man die genaue Ortsangabe (Koordinate x im eindimensionalen Fall) innerhalb eines Feldes mit bekannter Geometrie. Analog zu Gl. 4.6-05 lässt sich aus den Gleichungen 3.2-44 und 3.2-45 folgender Ausdruck ableiten:

$$\frac{v_{MEP}(x)}{d^2} = \frac{g \cdot (\rho_D - \rho_C) + \frac{c_P}{\epsilon} \cdot [g + \mu_0 \cdot M(x) \cdot gradH(x)]}{18 \cdot \eta_C} \quad [Gl. 4.6-06]$$

Hat man also Separationen eines definierten MEP's in verschiedenen Abständen von der Magnetfeldquelle durchgeführt, lassen sich die Ergebnisse aus den Einzelerperimenten (Steigung der Geraden analog Abbildung 4-15) über der Ortskoordinate x auftragen und mit mittels Gl. 4.6-06 berechneten Kurve vergleichen.

4.6.2.2 Tropfenschwärme

Zur Charakterisierung kompletter Phasenseparationen, also der ganzheitlich betrachteten Tropfenschwärme im Gegensatz zu einzelnen Tropfen, wurde versucht die Sedimentationskurve und/oder die Koaleszenzkurve (siehe Kapitel 3.2.2) experimentell zu bestimmen. Da sich mizellare ATPS besonders langsam trennen und sich die Sedimentationsfront mit bloßem Auge nur erahnen lässt, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Spektroskopie unseres Instituts ein Aufbau entworfen und konstruiert, bei dem ein Laserstrahl die Messzelle (siehe Kapitel 4.5.1) kontinuierlich über der gesamten Höhe abrastert, die Lichtintensität auf der Austrittsseite gemessen und die Messsignale mittels eines Dataloggers in einen PC gespeist werden. Auf eine detaillierte Darstellung wird hier aus Platzgründen verzichtet, diese findet sich bei [Henrich 2006]. Durch den Einsatz von magnetischen Partikeln wurde der Einsatz des Lasers jedoch unmöglich, da die Lösungen zu trüb und lichtundurchlässig wurden. Hier half nur die Betrachtung mit dem Mikroskop. In den meisten betrachteten Fällen war die Messung der Koaleszenzfront, dass heißt der ausgeschiedenen dispersen Phase, mit dem Mikroskop möglich. Die quantitative Auswertung erfolgte ebenfalls mittels Microsoft Paint (siehe auch Kapitel 4.6.2.1).

4.7 Gleichgewicht der Proteinextraktion

4.7.1 Versuchsdurchführung

Um mizellare ATPS mit definiertem Tensid- und Proteingehalt sowie exakter Pufferzusammensetzung und pH-Wert herzustellen, wurden zunächst konzentrierte Stammlösungen der einzelnen Komponenten angesetzt und anschließend nach einem vorausberechneten Schema gemischt. Das Gesamtvolumen betrug am Ende meist 1 mL (in 1,5 oder 2,0 mL Eppendorf-Tubes), wobei das Phasenverhältnis einen Wert erreichen musste, bei dem aus beiden Phasen ausreichend Probe entnommen werden konnte. Zum Mischen und Temperieren wurden die Proben-Tubes auf einen Thermomixer (Fa. Eppendorf, Thermomixer comfort) gestellt und bei einer festen Temperatur ($T > T_{CP}$) für mindestens 10 Minuten ins GGW geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden die Tubes entnommen und in einer heiz- und

kühlbaren Zentrifuge (Fa. Eppendorf, 5702 RH) für 15 bis 60 Minuten (je nach ATPS) bei 4.400 rpm zentrifugiert. Wenn die Phasen klar und durchscheinend waren, wurden die Tubes zurück in den Thermomixer gestellt (ohne Schütteln), um während der gesamten Dauer der Probennahme die Temperatur stabil zu halten. Diese Stabilität ist besonders wichtig, da die verwendeten ATPS extrem temperatursensitiv sind und sich die Phasen nach Temperaturschwankungen erneut eintrüben können. Durch einen Temperatur-Shift verursacht man das Erreichen einer anderen Konode im Phasendiagramm und damit neue Gleichgewichtszusammensetzungen der Phasen, welche wiederum auf das Extraktionsgleichgewicht Auswirkungen haben. Die Messwerte können also nur als valide angesehen werden, wenn die Temperaturstabilität gewährleistet ist.

Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 4-16 eine Fotografie von 3 Proben in 2 mL Eppendorf-Tubes gezeigt. Im ersten befindet sich eine reine Proteinlösung, im zweiten ein reines, vollständig separiertes ATPS und im dritten ein ATPS mit Protein, wobei sich das Protein im Verteilungsgleichgewicht nahezu vollständig in der Unterphase akkumuliert. Die Grünfärbung des Luft-Flüssigkeitsmeniskus der dritten Probe kommt in dieser Fotografie nur durch Lichtreflexion zustande. Je nach Analytik wurden nun z.B. 10 μ L (für SDS-PAGE, siehe Anhang 9.2.1) oder 200 μ L (für Fluoreszenzmessungen, siehe Anhang 9.2.1) aus beiden Phasen entnommen. Bei der Entnahme der Proben war genau darauf zu achten, dass nur die gewollte Phase eingesaugt wurde. Schwierig war dies vor allem für den Fall, in dem die Koazervatphase die Oberphase bildete. Die Koazervatphase ist in der Regel um Größenordnungen viskoser und damit schwieriger einzusaugen als die Unterphase. Wenn zu schnell gesaugt wurde, konnte man eine Kanalbildung beobachten. Die Unterphase wurde durch den Kanal eingesaugt, obwohl die Pipettenspitze oder Kanüle in die Oberphase eingetaucht war.

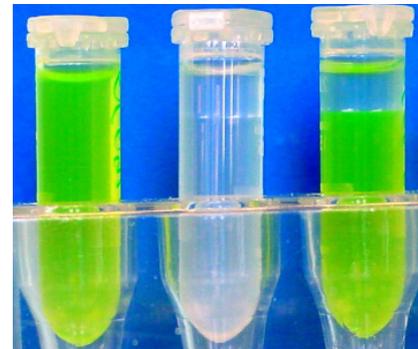


Abbildung 4-16: v.l.n.r.: GFP-Lösung, Aethoxal® B ATPS, GFP in einem Aethoxal® B ATPS; die Oberphase des ATPS ist die Koazervatphase

4.7.2 Auswertemethoden incl. Fehlerbetrachtung

Um den Verteilungskoeffizienten in wässrigen Zwei-Phasensystemen zu bestimmen, reicht es für gewöhnlich aus, die Gleichgewichtskonzentration des Zielmoleküls in der oberen und unteren Phase zu messen und die erhaltenen Werte durcheinander zu teilen (siehe Gl. 3.3-01). Allerdings ergeben sich in der Realität oftmals folgende Fragestellungen und/oder Probleme:

- Sind Analytikmethoden für beide Phasen (sowohl wässrig als auch tensidreich) und den darin anzutreffenden Proteinkonzentrationsbereich etabliert?

- Wie groß sind die zu erwartenden Messfehler in der jeweiligen Phase?
- Ist der K-Wert eine Funktion der Gesamtkonzentration, z.B. durch Sättigungseffekte in einer der Phasen? Wird er damit auch zur Funktion des Phasenverhältnisses?

Die Methode der Wahl sollte die Erstellung einer Messreihe mit steigender Proteinstartkonzentration c_0 sein. Können die Konzentrationen in beiden Phasen gemessen werden, so können durch Auftragung von c_T über c_B und anschließender linearer Regression der K-Wert bestimmt und die Messfehler abgeschätzt werden. Zudem wird eindeutig sichtbar, ob der K-Wert abhängig von den jeweiligen Konzentrationen ist, nämlich dann, wenn die Auftragung keine Gerade ergibt.

Dieselbe Methode kann auch angewandt werden falls die Proteinkonzentration nur in einer Phase messbar ist. Dann muss jedoch zusätzlich die Massenbilanz zur Hilfe genommen werden. Zur Veranschaulichung wird hier eine simulierte Messreihe mit den Startwerten $c_0 = 1$ bis 5; $K = 2$ und $R = 3$ gezeigt. Die aus den Vorgaben resultierenden Werte können mit den Gleichungen 3.3-04 und 3.3-05 berechnet werden, anschließend wird mit der Funktion „Zufallsbereich“ von Microsoft® Excel eine Messwert-Streuung mit einer Abweichung von Δc_{\max} (Messung) = 10% zugefügt. Das Ergebnis samt Regressionsgeraden ist in Abbildung 4-17 dargestellt.

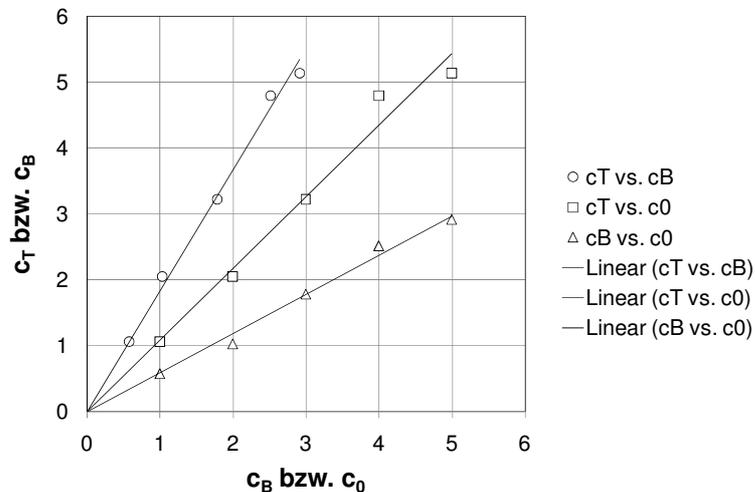


Abbildung 4-17: Exemplarische Darstellung der Ermittlung von Verteilungskoeffizienten aus Proteinkonzentrationen in Ober- und Unterphase eines ATPS in verschiedenen Auftragungen

Bei bekanntem Phasenverhältnis R können die K -Werte aus den in Abbildung 4-17 gezeigten Regressionsgeraden mit Hilfe der folgenden Gleichungen berechnet werden.

$$K = \frac{dc_T}{dc_B} \quad [\text{Gl. 4.7-01}]$$

$$K = \frac{\frac{dc_T}{dc_0}}{1 + R \cdot \left(1 - \frac{dc_T}{dc_0}\right)} \quad [\text{Gl. 4.7-02}]$$

$$K = \frac{1 + \frac{1}{R} \cdot \left(1 - \frac{dc_B}{dc_0}\right)}{\frac{dc_B}{dc_0}} \quad [\text{Gl. 4.7-03}]$$

Welche der drei obigen Anpassungsmethoden gewählt werden sollte hängt also zum einen davon ab, ob das Protein in beiden oder nur einer Phase messbar ist und zum anderen auch davon, wie groß die Zahlenwerte von K und R sind. So kann durch Fehlerbetrachtungen gezeigt werden, dass es im Falle extremer K -Werte (z.B. $K > 100$) günstiger ist K nur mit den Werten der an Protein verarmten Phase (für $K > 100$ also der Unterphase) anzupassen. Ausführlicher dargestellt ist dieser Sachverhalt in Abbildung 4-18. Dort sind die zu erwartenden Fehlerstreuungen von K bei Bestimmung nach einer der Gleichungen 4.7-01 bis 4.7-03 über K , für verschiedene Werte von R , aufgetragen. Bei der Berechnung wird stillschweigend vorausgesetzt, dass R mit ausreichend hoher Genauigkeit bekannt ist. Der angenommene Messfehler beträgt bei dieser Berechnung wie oben je 10% pro Phase (Δc_{\max} (Messung) = 10%).

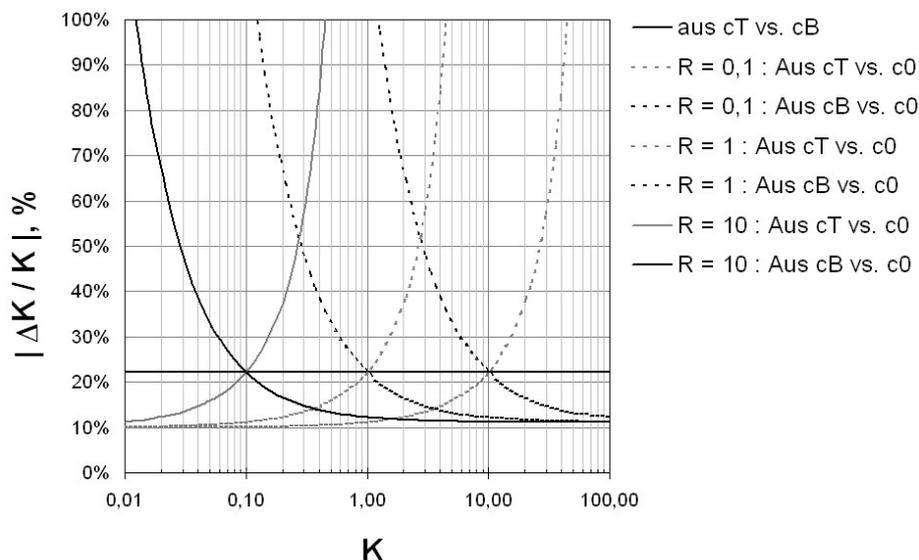


Abbildung 4-18: Prozentuale Streuung der experimentell bestimmten K -Werte in Abhängigkeit von K , R und der gewählten Auswertungsmethode

Die nach der Methode c_T vs. c_B bestimmten K -Werte streuen in etwa mit der Summe beider Messfehler und sind unabhängig von R . Die drei Methoden sind für einen festen Wert von R jeweils gleichwertig, an dem gilt $K \cdot R = 1$. Für den Fall $K \cdot R < 1$ ist es günstiger nach c_T vs.

c_0 anzupassen, für $K \cdot R > 1$ nach c_B vs. c_0 . Wird nicht nach diesen Kriterien angepasst, kann der Fehler extrem groß werden, da sich Differenzen großer Zahlen ergeben. Je nach verwendeter Protein-ATPS-Kombination ist es möglich, dass die Anwendung bestimmter analytischer Methoden nur auf eine der beiden Phasen möglich ist, was wiederum die Wahl der Anpassungsmethode determiniert. Hier kann man aber mit Hilfe von Abbildung 4-18 den R-Wert entsprechend wählen, um die K-Wertbestimmung mit maximaler Genauigkeit vorzunehmen. Sind die Proteinkonzentrationen in beiden Phasen messbar, sollten in jedem Fall beide gemessen werden, um zu überprüfen, ob sich die Massenbilanz schließt. Die Anpassungsmethode sollte jedoch dann, wie oben diskutiert, passend ausgewählt werden.

4.8 Gleichgewicht der Proteinadsorption

4.8.1 Adsorptions-Gleichgewicht

Zur Ermittlung der Lage des Adsorptionsgleichgewichts („Adsorptionsisotherme“) einer definierten Kombination Sorptiv (Protein) – Sorbens (Magnetpartikel) und Lösungszusammensetzung (Puffer, pH, Störstoffe) können unterschiedliche Strategien gewählt werden⁶. Zur Erläuterung, welche Strategie warum gewählt wurde, werden an dieser Stelle zunächst die Langmuir-Gleichung (Gl. 3.4-01) sowie die Massenbilanz (Gl.3.4-02) wiederholt:

$$q^* = q_{\max} \cdot \frac{c^*}{K_L + c^*} \quad [\text{Gl. 3.4-01}]$$

$$q = q_0 + \frac{c_0 - c}{c_p} \quad [\text{Gl. 3.4-02}]$$

Anhand Gl. 3.4-02 kann verdeutlicht werden, dass prinzipiell drei Größen variiert werden können, um einen Satz von GGW-Daten zu erhalten: Die Vorbeladung der Partikel q_0 , die Partikelkonzentration c_p und die Proteinkonzentration c_0 . Je nach Strategie kommt man idealerweise auf unterschiedlichen Wegen zur gleichen Lage der Adsorptionsisotherme, was in Abbildung 4-19 angedeutet ist. Die vorliegenden Abbildungen wurden mit Simulationsrechnungen erstellt, wobei die Gleichungen 3.4-03 bis 3.4-05 zum Einsatz kamen, die Langmuir-Parameter festgelegt und die oben angesprochenen Größen q_0 , c_p und c_0 variiert

⁶ Die Frage, mit welcher Theorie die erhaltenen GGW-Daten am besten angepasst werden, wird in dieser Arbeit nicht behandelt. Alle Anpassungen beruhen aus Gründen der Vergleichbarkeit auf der Theorie nach Langmuir [Langmuir 1918] (siehe auch Kapitel 3.4.1).

wurden. (Anm.: Diese Simulationsrechnungen sind sehr nützlich falls nur wenige Punkte der Isotherme bekannt sind, da mit ihrer Hilfe experimentelle Bedingungen gefunden werden können, um ein vollständiges Bild zu erhalten. Mittels der Gleichungen 3.5-06 bis 3.5-28 kann dieses Vorgehen auch auf Zwei-Stoffsysteme angewandt werden.)

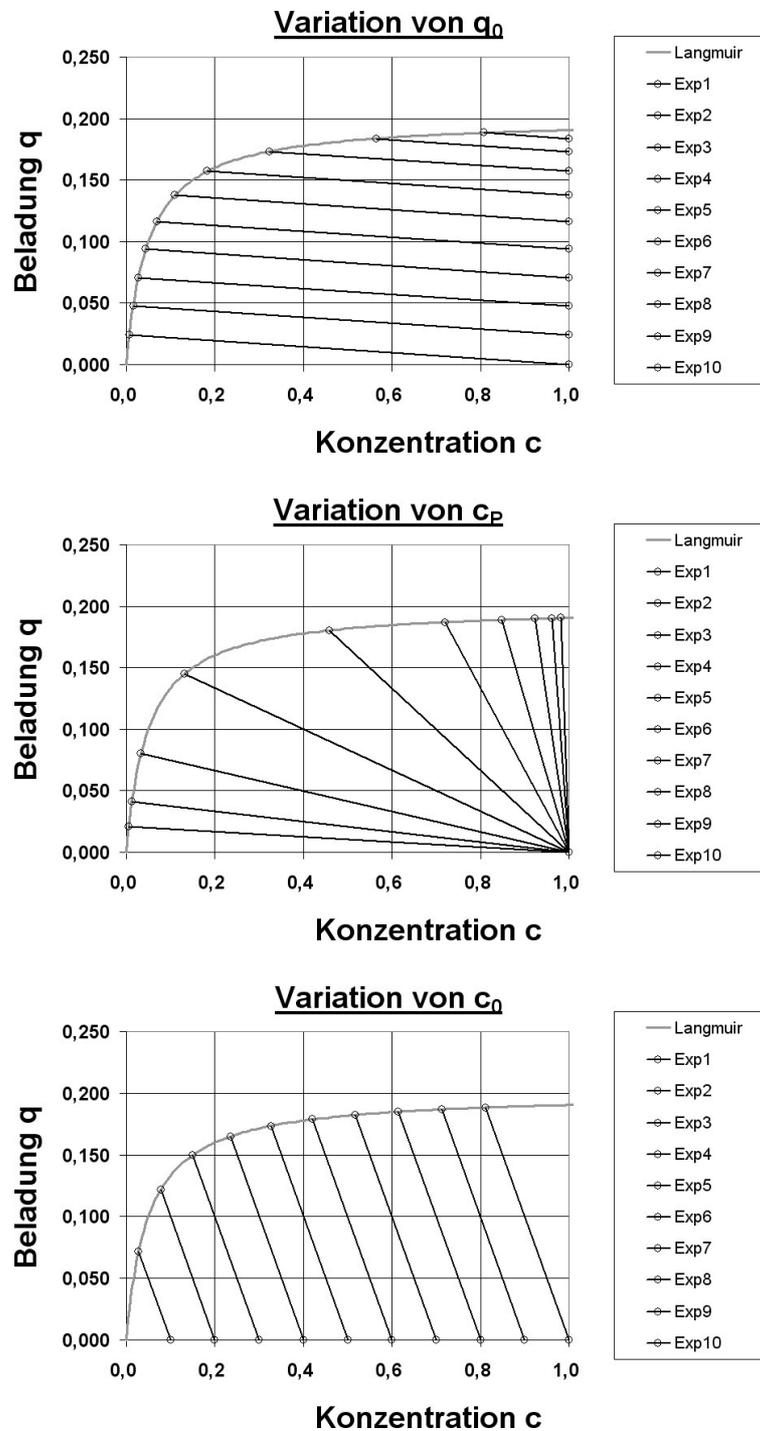


Abbildung 4-19: Strategien zur Bestimmung einer Adsorptionsisotherme incl. eingetragener Arbeitsgeraden

Experimentell kommt in allen Fällen prinzipiell das gleiche Vorgehen zum Einsatz. Zunächst wird eine bestimmte Masse an Partikeln vorgelegt, wobei im Falle magnetischer Mikro-

sorbentien sinnvoller Weise nicht trocken eingewogen sondern feucht pipettiert wird. Da die Partikelkonzentration der Stammlösung bekannt ist, kann die Masse über das Volumen, beispielsweise mit einer Pipette, eingestellt werden (hierbei ist darauf zu achten, dass die Stammlösung stets gut durchmischt ist). Nach mindestens zweimaliger 10-minütiger Equilibrierung der Partikel mit Bindepuffer wird ein definiertes Volumen an Protein-stammlösung hinzupipettiert und gegebenenfalls mit Puffer und/oder Wasser auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach einer gewissen Kontaktzeit und Durchmischung werden die Partikel magnetisch separiert (z.B. mit Hilfe eines Handmagneten) und die überstehende Lösung abgezogen und analysiert. Mittels Gl. 3.4-02 kann anschließend die GGW-Beladung q^* zur gemessenen Konzentration c^* berechnet werden.

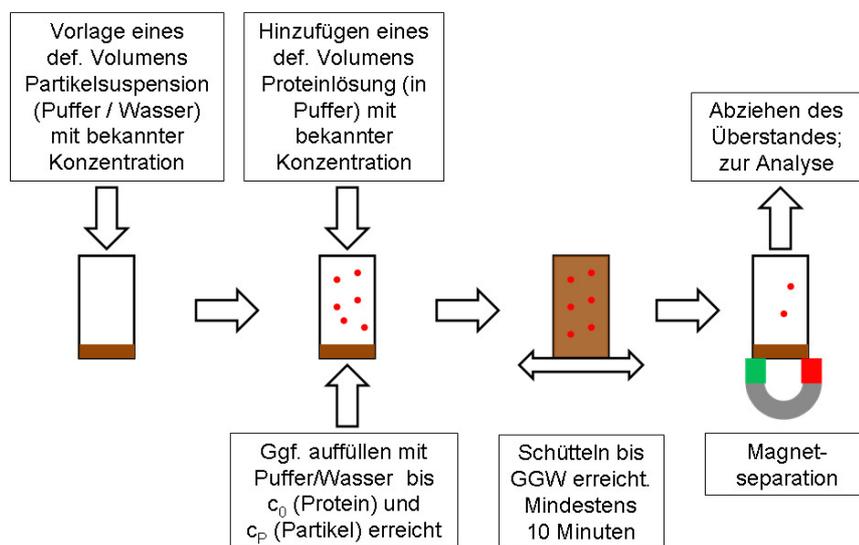


Abbildung 4-20: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung zur Bestimmung einer Adsorptionsisotherme eines Proteins auf Magnetpartikel

Abbildung 4-20 fasst diese Schritte übersichtlich zusammen. Die in Abbildung 4-19 skizzierten Strategien unterscheiden sich durch:

- Variation q_0 : Es werden immer die gleichen Partikel nach und nach mit Lösungen konstanter oder auch steigender Proteinkonzentration gesättigt.
- Variation c_p : Es werden mehrere Proben angesetzt, wobei immer unterschiedliche Mengen an Partikeln vorgelegt werden.
- Variation c_0 : Es werden mehrere Proben mit der gleichen Menge an Partikeln angesetzt, nur die Konzentration an Protein wird variiert.

In dieser Arbeit wurde meist c_0 variiert, da bei Variation von q_0 Verschleppungseffekte von proteinhaltiger Lösung zu fehlerhaften Ergebnissen führen können und bei Variation von c_p ein viel größerer Einsatz an Partikeln notwendig wird.

Die unbeladenen Partikel ($q_0 = 0$ mg/g) wurden meist mit $c_p = 1$ g/L in 1,5 mL Tubes vorgelegt und die Proteinkonzentration c_0 zwischen 0,1 und 1 g/L variiert. Nur für den Fall, dass die erhaltenen GGW-Daten kein vollständiges Bild ergaben, d.h. Anstiegs- oder Sättigungsbereich der Isotherme nicht hinreichend erfasst waren, wurden andere Werte verwendet. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgte für mindestens 10 min bei RT in einem Thermomixer. Nach Separation der Partikel mit Handmagneten oder in vorgefertigten, magnetischen Racks (Fa. Chemagen Biopolymer AG) wurde der Überstand abgezogen und mit adäquaten Methoden analysiert (siehe Kapitel 9.2). Die mathematische Anpassung der Gleichgewichtsdaten an das Langmuir-Modell erfolgte mittels nichtlinearer Regression, durchgeführt mit implementierten Algorithmen der Programme SigmaPlot (Version 8.0, © SPSS Inc. 1986-2001) oder TableCurveTM 2Dv3 (Version 3 für Win32, Jandel Scientific Software 1989-1994).

4.8.2 Desorptions-Gleichgewicht

Für Desorptionsuntersuchungen wurde eine definierte Menge Adsorbens bis zur Sättigung mit Protein beladen. Anschließend wurden die gesättigten Partikel gewaschen und mit Elutionspuffer in Kontakt gebracht, wobei das Vorgehen dasselbe wie bei der Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts war. Nach einfacher oder mehrfacher Elution wurden alle Überstände analysiert und die einzelnen sowie die Gesamt-Elutionseffizienzen mittels Massenbilanzen berechnet.

4.9 MEP: Untersuchungen zur Kopplung von Adsorption und Extraktion

Um die Kopplung der Adsorption und Extraktion zu untersuchen, wurde ein Vorgehen gewählt, das weitestgehend dem schematischen Verfahrensfließbild des MEP-Prozesses, wie in Abbildung 2-14 gezeigt, entspricht. Die verwendete Methode beinhaltet sechs Schritte, denen das Mischen aller Komponenten vorausgeht:

1. Adsorption: Diese erfolgt im einphasigen Bereich, d.h. unterhalb der Cloud-Point Temperatur des ATPS. Um das GGW zu erreichen, wird die Probe für 10 Minuten bei dieser Temperatur (z.B. 20 °C) geschüttelt.
2. Bildung des ATPS: Die Probe wird für 10 min. unter Schütteln bis zur vollständigen Ausprägung des ATPS und Einstellung des Partitioning-GGW auf eine höher liegende Temperatur (z.B. 30 °C) erhitzt.
3. Phasenseparation: Um die Phasen zu trennen, kann nun ein Handmagnet eingesetzt werden, wobei in den Fällen, in denen die Koazervatphase die Unterphase bildete, eine temperierte Zentrifuge zum Einsatz kam, um Fehler durch nicht saubere Trennung auszuschließen. Allerdings sollte nicht zu schnell zentrifugiert werden, um eine die

Resuspendierung der Partikel erschwerende Kompaktierung des sich am Boden bildenden Partikel-Pellet zu vermeiden. Die wässrige Phase wird anschließend abgezogen und analysiert.

4. Desorption: Nach Zugabe des Elutionspuffers wird die gesamte Probe gekühlt und für 10 Minuten ins Gleichgewicht geschüttelt. Durch die Zusammensetzung des Puffers ist meist mit einem Shift der Phasengrenzkurve zu rechnen. Im Falle der Kationenaustauscher-Elution z.B. musste die Temperatur fünf Grad kühler als zur Adsorption gewählt werden.
5. Bildung des ATPS: Analog Schritt 2.
6. Phasenseparation: Analog Schritt 3.

Abbildung 4-21 fasst diese sechs Schritte zusammen:

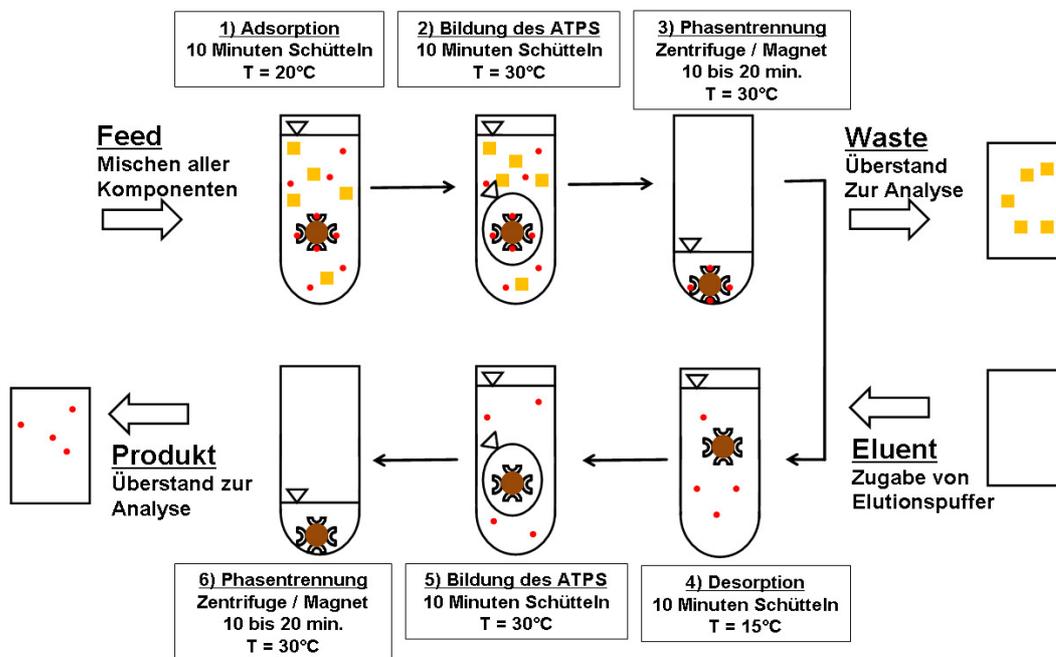


Abbildung 4-21: Schema eines Proteinseparationsversuchs mittels MEP im Labormaßstab

Die nach der Elution verbleibende tensidreiche Phase wurde nicht durch weitere Schritte vollständig eluiert. Die Analytik beschränkte sich in dieser Arbeit auf die wässrige Phase. Die analytischen Ergebnisse der wässrigen Phasen können jedoch unter Zuhilfenahme der Massenbilanzen zur Charakterisierung der Adsorptions-, Elutions- und Aufreinigungseffizienz herangezogen werden. Zum Beispiel lässt sich nach Gl. 4.9-01 die Ausbeute an Protein in der mizellreichen Phase berechnen.

$$Y = 1 - \frac{c_{\text{Wässrige Phase}}}{c_0} \cdot \frac{R}{R+1} \quad [\text{Gl. 4.9-01}]$$

4.10 MEP: Verfahrenstechnische Untersuchungen im halbtechnischen Maßstab

Die wesentlichen zu kontrollierenden Parameter, um erfolgreiche MEP-Versuche in einem größeren als dem 1 mL-Maßstab durchzuführen, sind: Temperierung, Dispergierung, Magnetfeldgeometrie sowie Zu- und Abflüsse. Als Magnetfeldquelle stand ein Elektromagnet der Fa. Steinert Elektromagnetbau GmbH (Köln) zur Verfügung, welcher im Anhang näher beschrieben ist (Kapitel 9.1). Das MEP-Reaktionsgefäß (Abbildung 4-22) musste in seiner Geometrie an die zur Verfügung stehende Raumlufthohlung des Magneten (120 mm) angepasst werden, wobei ein Außendurchmesser von 100 mm gewählt wurde. Um eine stabile Temperierung zu gewährleisten, wurde der wasserdurchströmte Mantel mit 20 mm dimensioniert, wodurch sich ein Durchmesser der innen liegenden Reaktionskammer von 60 mm ergab. Mit 120 mm Höhe dieser Reaktionskammer stand somit ein maximales Reaktionsvolumen von 340 mL zur Verfügung. Der aus Glas gefertigte MEP-Reaktor wurde von oben befüllt und anschließend mit einem Stopfen verschlossen. Die Unterseite war mit einem Drehhahn-Ventil versehen.

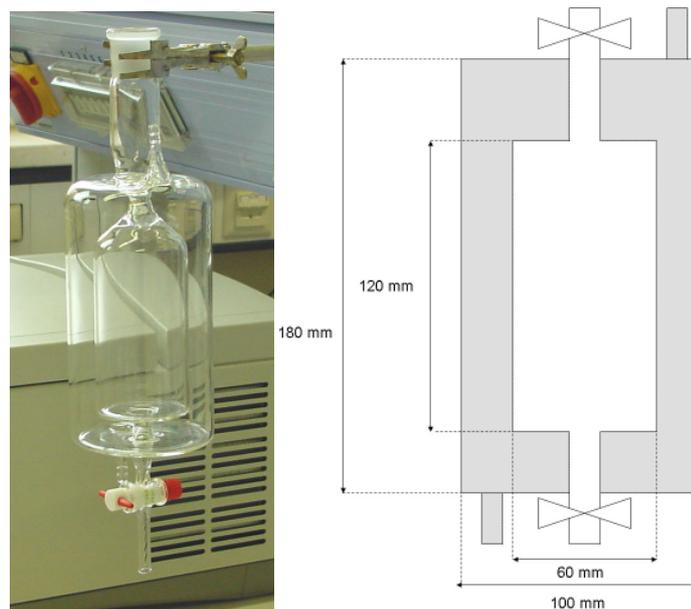


Abbildung 4-22: Fotografie und Bemaßungsskizze des in den Technikumsversuchen eingesetzten MEP-Reaktionsgefäß

Zum Erreichen einer stabilen Temperierung, mit der Möglichkeit eines schnellen Wechsels zwischen zwei Temperatur-Niveaus, wurden zwei große Wasserbäder (Fa. Lauda) eingesetzt, die über T-Ventile (vgl. Abbildung 4-8) an das Reaktionsgefäß angeschlossen waren. Diese Ventile (an Zu- und Abfluss des Gefäßes) wurden während der Versuche manuell gestellt. Die Temperatur im Inneren der Reaktionskammer wurde permanent durch ein ins Flüssigkeitsvolumen getauchtes Thermometer (Drahtförmiges Thermoelement) gemessen und

notiert. Dispergiert wurde mit einem Flügelrührer. Ein solcher wurde eingesetzt, um ihn durch die eng gewählte obere Öffnung des Gefäßes einzuführen.

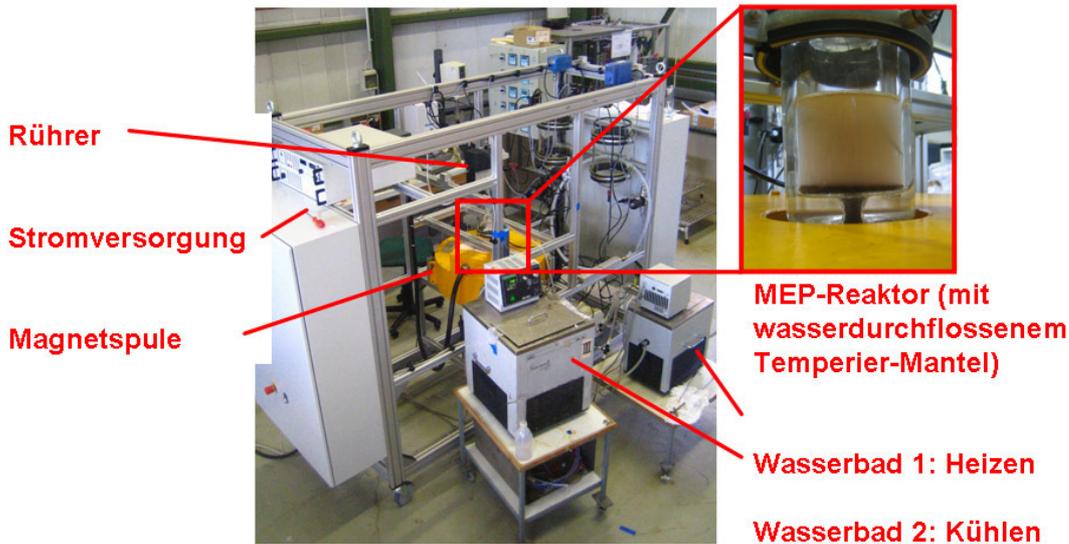


Abbildung 4-23: Aufbau für Bioseparationsversuche mittels MEP im Technikumsmaßstab: 200mL MEP-Reaktor, Wasserbäder zum Heizen und Kühlen, Magnetspule in Eisengehäuse

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde als AMTPS-bildendes Polymer das nichtionische Tensid Triton X-114 eingesetzt, welches die Unterphase als tensidreiche Phase bildet. Aufgrund der rheologischen Eigenschaften der hochviskosen tensidreichen Phase ist es nicht möglich, diese Phase ohne Kontamination durch die Oberphase durch das Drehhahn-Ventil abzulassen. Die Oberphase bahnt sich einen Kanal und durchströmt die Unterphase. Aus diesem Grund wurde die Abtrennung der wässrigen Oberphase durch Absaugen mit einem Schlauch durchgeführt. Durch dieses Vorgehen verblieben zwar stets einige mL Oberphase im Reaktor, der Verlust bewegte sich jedoch im Normalfall im Bereich weniger Prozent (< 3%).

Das grundsätzlich gewählte Versuchsablaufschemata orientierte sich an dem in Kapitel 2.4.2 gezeigten Verfahrensschema (Abbildung 2-14) bzw. den im Labormaßstab durchgeführten Versuchen (Kapitel 4.9, Abbildung 4-21). Nach der Abtrennung der wässrigen Phase (Waste- oder Produkt) wurde stets auf das zuvor vorhandene Volumen, i.d.R. 200 mL, aufgefüllt. Zur Elution wurde der in zweifach konzentrierter Form angesetzte Elutionspuffer zugegeben und mit Bindepuffer bzw. Wasser aufgefüllt, um exakt die gewünschten Elutionsbedingungen zu erhalten. Verblieben z.B. 20 mL Koazervatphase im MEP-Reaktor, wurden 100 mL zweifach konzentrierter Elutionspuffer und 80 mL Bindepuffer zugegeben.

Als Dauer der Aufheiz- und Kühlvorgänge wurde nach Vorversuchen zehn Minuten festgelegt. Die Equilibrierungszeiten für Adsorptions- und Desorptionsvorgänge betragen ebenfalls zehn Minuten, die Phasenseparation im Magnetfeld wurde innerhalb von zwanzig

Minuten abgeschlossen. Zusammen mit den Zeiten für die Entnahme der wässrigen Phase betrug die Dauer eines Gesamtzyklus ca. 120 Minuten, wie es auch Tabelle 4-4 zu entnehmen ist.

Tabelle 4-4: Einzelvorgänge incl. Dauer sowie Betriebszustand von Rührer und Magnetspule innerhalb eines Zyklus des MEP-Prozesses im halbtechnischen Maßstab

Vorgang	Dauer	Rührer	Magnetspule
Befüllen	0 Minuten	Aus	Aus
Adsorption	10 Minuten	An	Aus
Aufheizen	10 Minuten	An	Aus
Phasenseparation	20 Minuten	Aus	An
Entnahme der wässrigen Phase (Waste)	10 Minuten	Aus	Aus
Befüllen und Abkühlen	10 Minuten	An	Aus
Desorption	10 Minuten	An	Aus
Aufheizen	10 Minuten	An	Aus
Phasenseparation	20 Minuten	Aus	An
Entnahme der wässrigen Phase (Waste)	10 Minuten	Aus	Aus
Abkühlen (evt. Befüllen mit neuem Feed)	10 Minuten	An	Aus
Total	120 Minuten		

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Verteilungsverhalten der Mikrosorbentien in mizellaren ATPS

Die Arbeit mit magnetischen Extraktionsphasen nach dem in Kapitel 2.4.2 eingeführten Verfahrensschema setzt voraus, dass die verwendeten magnetischen Mikrosorbentien stets vollständig in der Koazervatphase des eingesetzten mizellaren ATPS akkumulieren. Diese Forderung muss sowohl im Fall beladener- als auch freier Oberflächen der Sorbentien (Binde- bzw. Elutionsschritt) erfüllt sein. Um eine erste Auswahl an geeigneten Kombinationen von AMTPS und Mikrosorbentien zu finden, wurden verschiedenste Kombinationen hergestellt und mittels des in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Mikroskopaufbaus untersucht. Die Auswahl des Puffers beschränkte sich hierbei in der Regel auf den für die Sorbentien jeweils geeigneten Bindepuffer (vgl. Tabelle 4-1, Seite 93). Systematische Parametervariationen zum MEP-Screening wurden unter anderem innerhalb zweier Diplomarbeiten durchgeführt ([Henrich 2006] und [Raffelt 2008]), aus Platzgründen werden die Ergebnisse jedoch an dieser Stelle nicht vollständig wiedergegeben.

Eine der lehrreichsten Schlussfolgerungen aus den experimentellen Ergebnissen war die Erkenntnis, dass das Partitioning magnetischer Mikrosorbentien in mizellaren ATPS bei scheinbar gleicher Oberflächenchemie der Sorbentien starken Schwankungen unterworfen sein kann. Abbildung 5-1 zeigt übersichtlich die Ergebnisse von insgesamt acht M-PVA-IDA Batches desselben Herstellers (chemagen Biopolymer AG, Baesweiler), die in dem AMTPS Aethoxal B – Wasser mit BiMCA-Puffer (vgl. Kapitel 4.4) bei 30 °C getestet wurden.

		ATPS		Aethoxal B					
T: Top				Partitioning			Agglomeration		
I: Interface				T	I	B	++	+	0
B: Bottom									
Puffer	20 mM NaPhosphat; 250 mM NaCl; pH = 6.8		T, °C						
Partikel	M-PVA-IDA 0114125		30						
	M-PVA-IDA 74_a		30						
	M-PVA-IDA 99		30						
	M-PVA-IDA 74_b		30						
	M-PVA-IDA 01161025		30						
	M-PVA-IDA 73		30						
	M-PVA-IDA 0124105		30						
	M-PVA-IDA Chemagen_alt		30						

Abbildung 5-1: Verteilungs- und Agglomerationsverhalten von M-PVA-IDA Proben in Aethoxal B - AMTPS

Nur einer dieser acht Batches (ohne Lot-Nr., deshalb hier mit „Chemagen_alt“ bezeichnet) akkumuliert in der Koazervatphase und ist damit prinzipiell einsetzbar, wobei hier die stark ausgeprägte Agglomerationsneigung sowie die leichte Tendenz zur Akkumulation an der

Phasengrenze einem verfahrenstechnischen Einsatz entgegenwirken würden. Alle anderen Proben zeigen eine Tendenz in die wässrige Phase, wobei auch hier teilweise stark unterschiedliches Verhalten beobachtet werden konnte. Woher diese Abweichungen im Falle der M-PVA-IDA Partikel im Einzelnen kommen, konnte nicht vollständig geklärt werden. Gründe dürften Variationen beim Herstellungsprozess sowie unterschiedliche chemische Ankergruppen für die Liganden sein⁷. Des Weiteren kommen Alterungseffekte, Verunreinigungen der Partikeloberfläche aber auch Variationen in den Funktionalisierungsgraden, d.h. der Belegung der Oberfläche mit Liganden, in Frage. Letzterer Zusammenhang konnte am Beispiel eigens funktionalisierter Kationenaustauscher (siehe Kapitel 4.3.3) sichtbar gemacht werden. Vergleicht man die in Abbildung 5-2 dargestellten Ergebnisse für die Basispartikel (Lot R2-221203) und die daraus abgeleiteten Kationenaustauscher (KA_JSB-01_a bis _c) wird eine Tendenz zum Verlassen der Koazervatphase eines Aethoxal B AMTPS mit zunehmendem Funktionalisierungsgrad deutlich.

T: Top I: Interface B: Bottom	ATPS		Aethoxal B					
		T, °C	Partitioning			Agglomeration		
			T	I	B	++	+	0
Puffer	20 mM Naphosphat, pH = 6.8	T, °C						
Partikel	Chemagen M-PVA C8	30						
	Chemagen M-PVA 012 Lot R2-221203	30						
	KA_JSB-01_a (geringer Funktionalisierungsgrad)	30						
	KA_JSB-01_b (mittlerer Funktionalisierungsgrad)	30						
	KA_JSB-01_c (hoher Funktionalisierungsgrad)	30						
	HI_JSB-03_a	30						
	HI_JSB-03_b	30						
	HIKA_JSB-01_a	30						
	HIKA_JSB-01_b	30						

Abbildung 5-2: Verteilungs- und Agglomerationsverhalten von auf verschiedene Weise funktionalisierten M-PVA-Beads in einem Aethoxal B - AMTPS

Die hydrophobierten, d.h. die auf ihrer Oberfläche mit C8-Gruppen belegten, Partikel (siehe Kapitel 4.3.2) zeigen eine klare Tendenz in die Koazervatphase. Wird ihre Funktionalisierung jedoch hybrid auf Kationenaustausch (siehe Kapitel 4.3.5) erweitert, lässt sich diese Tendenz umkehren. Im Falle des Triton X-114 ATPS (Abbildung 5-3) lässt sich zum Teil ähnliches Verhalten beobachten, wobei die hoch funktionalisierten Kationenaustauscher nicht vollständig aus der Koazervatphase (in diesem Fall die Unterphase) herausgedrängt werden, sondern praktisch komplett an der Phasengrenze akkumulieren. Ein weiterer Unterschied, der geringere Funktionalisierungsgrad der Charge HIKA_JSB-01_a gegenüber HIKA_JSB-01_b,

⁷ Die M-PVA-IDA Partikeln waren zu Forschungszwecken bereitgestellt und nicht kommerziell erhältlich.

bewirkt im Falle des Aethoxal B – AMTS nur ein leicht unterschiedliches Agglomerationsverhalten, im Triton X-114 AMTPS jedoch eine Inversion des Verteilungsverhaltens. Diese Inversion des Partitionings verwundert umso mehr, da weder die hydrophobierten Partikel noch die Kationenaustauscher eine Tendenz in die wässrige Phase gezeigt haben, die Kombination beider in diesem einen Fall aber doch.

ATPS			Triton X-114					
T: Top			Partitioning			Agglomeration		
I: Interface			T	I	B	++	+	0
B: Bottom								
Puffer	20 mM Naphosphat, pH = 6.8	T, °C						
Partikel	Chemagen M-PVA C8	30		X				X
	Chemagen M-PVA 012 Lot R2-221203	30			X		X	
	KA_JSB-01_a (geringer Funktionalisierungsgrad)	30		X			X	
	KA_JSB-01_b (mittlerer Funktionalisierungsgrad)	30		X			X	
	KA_JSB-01_c (hoher Funktionalisierungsgrad)	30			X	X		
	HI_JSB-03_a	30			X			X
	HI_JSB-03_b	30			X			X
	HIKA_JSB-01_a	30		X			X	
	HIKA_JSB-01_b	30	X				X	

Abbildung 5-3: Verteilungs- und Agglomerationsverhalten von auf verschiedene Weise funktionalisierte M-PVA-Beads in einem Triton X-114 - AMTPS

Eine Interpretation für den jedoch gemeinhin „sanften“ Übergang von der Koazervat- in die wässrige Phase mit ansteigendem Funktionalisierungsgrad erhält man durch eine energetische Betrachtung nach [Hoeben 2004] (siehe dazu Kapitel 3.1).

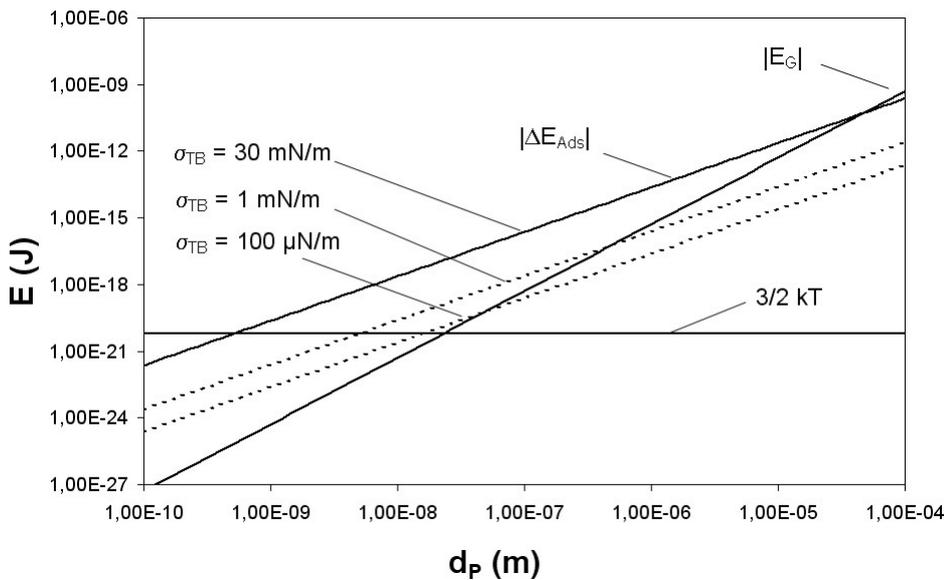


Abbildung 5-4: Absolutwerte von ΔE_G und ΔE_{Ads} für die Entfernung eines runden Partikels von einer horizontalen Phasengrenze aufgetragen gegen den Partikeldurchmesser (nach [Hoeben 2004]) für verschiedene Werte der Grenzflächenspannung σ_{TB}

Aus Abbildung 5-4 wird deutlich, dass gerade für die bei AMTPS zu erwartenden geringen Grenzflächenspannungen im $\mu\text{N/m}$ -Bereich [Minuth 1997] die Tendenz zur Adsorption an der Phasengrenze schwach ausgeprägt sein sollte und schon leichte Änderungen der Oberflächenchemie zur Bevorzugung der jeweils anderen Phase und damit einer Inversion des Verteilungsverhaltens führen können. Diese Sensitivität könnte jedoch, auch wenn sie bei der Anwendung von MEP-Phasen Schwierigkeiten bereitet, zu neuen analytischen Anwendungen in der Charakterisierung von Oberflächen partikulärer Systeme genutzt werden. Aus verfahrenstechnischer Sicht ist die schwach ausgeprägte Tendenz an die Grenzfläche von Vorteil, da sowohl die volle Volumenkapazität eines MEP-Tropfens bei vollständiger Akkumulation genutzt wird als auch Emulsions-Stabilisierende Effekte (vgl. „Pickering-Emulsions“, [Pickering 1907]) seltener auftreten werden. Nichts desto trotz tritt die „Grenzflächenaktivität“ häufiger auf als erwartet. Neben der oben erwähnten Grenzflächenspannung kann natürlich auch eine Polarisierung der Phasengrenze (vgl. Kapitel 3.3.3) zu einem Festhalten geladener Partikel führen.

Bei alleiniger Berücksichtigung des Partitionings der getesteten Magnetpartikel, führt sowohl die Kombination der eigens hydrophobierten M-PVA-Beads mit beiden AMTPS, als auch die der schwächer funktionalisierten Kationenaustauscher mit einem Triton X-114 AMTPS zu magnetischen Extraktionsphasen. Vom verfahrenstechnischen Standpunkt ist der Einsatz hydrophober Liganden im Zusammenspiel mit Tensiden jedoch fraglich, da Tenside zum Teil in der Hydrophobic Interaction Chromatography („HIC“) zur vollständigen Regeneration der Chromatographiemedien zum Elutionspuffer gegeben werden, also hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Adsorbentien für gewöhnlich unterdrücken [Amersham-Biosciences 2003]. Eine solche gegenseitige Beeinflussung ist jedoch für die Kombination Kationenaustauscher – nichtionisches Tensid nicht zu erwarten. Auch die erfolgreiche Funktionalisierung weiterer Batches aus anderen Basispartikeln (Chemagen M-PVA 012 R2-0109027 zu KA_JSB-04) und das geeignete Partitioning mit und ohne Proteinbeladung unter Bindungs- und Elutionsbedingungen lenkte den Fokus auf die Kombination Triton X-114 // M-PVA-KA. Aus diesen Gründen wurden Versuche zur Bioseparation im weiteren Verlauf der Arbeit hauptsächlich mit diesem System durchgeführt.

Weitere Funktionalisierungsversuche zur Herstellung von M-PVA-MCA-Beads (Kapitel 4.3.4) brachten Teilerfolge, wie in Abbildung 5-5 zu sehen ist. So könnten durch weitere Anstrengungen in Richtung Hybridfunktionalisierung oder auch durch bloße Änderungen des Funktionalisierungsprotokolls, mit Vinyl-Imidazol funktionalisierte magnetische Metall-Chelatbildner für den Einsatz in Triton X-114 AMTPS angepasst werden; erste eigene Versuchsergebnisse waren hier viel versprechend. Die Zugabe von Nanopartikeln, wenn auch unfunktionalisiert, war in beiden getesteten AMTPS erfolgreich, d.h. es wurde jeweils eine vollständige Akkumulation in der Koazervatphase beobachtet.

ATPS			Aethoxal B			Triton X-114		
T: Top			Partitioning			Partitioning		
I: Interface								
B: Bottom			T	I	B	T	I	B
	BiKA	T, °C						
M-PVA	Chemagen M-PVA 011 Lot R1-0124055	30						
	BiKA	T, °C						
HI	Chemagen M-PVA-C8	30						
	M-PVA-C8, funktionalisiert von Lot R2-0109027	30						
	BiMCA	T, °C						
MCA	M-PVA-IDA Chemagen_alt	30						
	M-PVA-IDA 01161025	30						
	MCA_JSB-01 unbeladen	30						
	MCA_JSB-01 beladen mit CuSO4	30						
	MCA_JSB-01 beladen mit CuSO4 + 0,1 g/L GFP	30						
	BiKA	T, °C						
KA	KA_JSB-04	30						
	KA_JSB-04 + 0,25 g/L Lysozyme	30						
	BiKA	T, °C						
NANO	Aminosilanisierter Magnetit (d ≈ 50 nm)	30						

Abbildung 5-5: Verteilungsverhalten von auf verschiedene Weise funktionalisierten und un-funktionalisierten magnetischen Partikeln in Aethoxal B - und Triton X-114 – AMTPS. Die Umrahmung deutet auf die jeweilige Koazervatphase.

Aus theoretischen Überlegungen mittels der Excluded-Volume-Theorie (Kapitel 3.3.4) ließe sich im Grunde für alle AMTPS die Tendenz zum Ausschluss von Partikeln im Größenbereich weniger μm aus der tensidreichen Phase erwarten. Da jedoch viele Partikelspezies mit umgekehrter Tendenz gefunden wurden, lässt sich folgern, dass andere starke Effekte die sonst sehr wirksamen Excluded-Volume-Interaktionen zu überwiegen vermögen. Ein möglicher Kandidat sind die hydrophoben Wechselwirkungen. Werden wiederum Partikel durch Funktionalisierung hydrophiler, kann auch dieser Effekt unterdrückt werden. Im Fall ladungstragender Partikel kann die Hydrophilizität mit energetischen Überlegungen nachvollzogen werden. Der vollständige Ausschluss nahezu aller ladungstragenden Partikel-Spezies aus der Koazervatphase des Aethoxal B – AMTPS hängt so vermutlich mit dem sehr geringen Wasseranteil eben dieser Phase und der damit als niedrig zu erwartenden Dielektrizitätskonstante ϵ zusammen. Nach dem in Kapitel 3.1 vorgestellten Zusammenhang (Gl. 3.1-08) steigt die elektrische Selbstenergie eines ladungstragenden Teilchens mit sinkendem ϵ und der Verbleib in so einer Umgebung wird energetisch ungünstig. Der Nachweis, dass die Unterschiede in den Wassergehalten der Koazervatphasen beider verwendeter AMTPS sehr groß sein können, erfolgt in Kapitel 5.2.1.

5.2 Phasentrennung von ATPS und MEP

5.2.1 Gleichgewicht

Zur erfolgreichen Arbeit mit mizellaren ATPS ist die Kenntnis der Lage des Zweiphasengebiets und der umhüllenden Binodalkurve essentiell, da sich hieraus Informationen gewinnen lassen über: (i) die Temperatur bei der eine mizellare Lösung bestimmter Konzentration in zwei Phasen zerfällt; (ii) die Konzentrationen der entstehenden Phasen; (iii) das zu erwartende Volumenverhältnis zwischen mizellreicher und wässriger Phase. Welche Phase die Ober- und welche die Unterphase bildet, kann aus der Binodalkurve nicht abgelesen werden und wurde experimentell bestimmt. Die mizellreiche Phase ist hierbei durch die für gewöhnlich vielfach erhöhte Viskosität gegenüber der wässrigen Phase vergleichsweise einfach zu erkennen. Binodalkurven wurden für die zwei nichtionischen Tenside Triton X-114 und Aethoxal B unter Zugabe verschiedener Puffer bestimmt. In allen Fällen wurde im Falle der Triton X-114 AMTPS die mizellreiche Phase als Unterphase erhalten, für Aethoxal B AMTPS war es die Oberphase. Um ein vollständigeres Bild zu erhalten, wurden die experimentell erhaltenen Werte mittels der in Kapitel 3.2.1.3 vorgestellten Theorie unter Verwendung der Software MathCad®2000 Professional, MathSoft Inc. (Quellcode im Anhang 9.5) angepasst. Abbildung 5-6 zeigt die experimentell bestimmten und theoretisch angepassten Ergebnisse für ein ungepuffertes AMTPS aus Triton X-114 und Wasser.

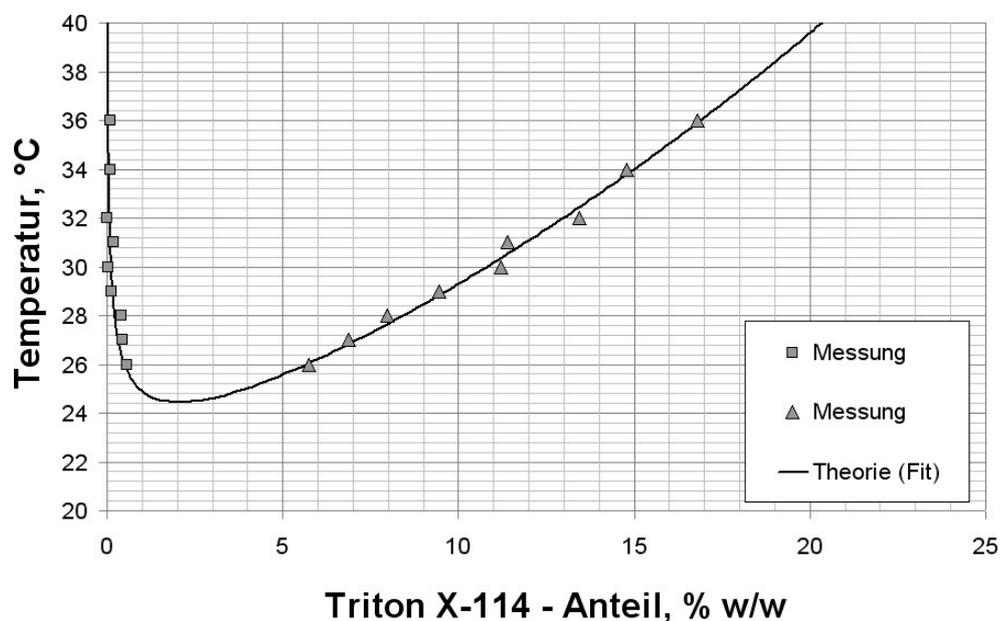


Abbildung 5-6: Experimentell gefundene Binodalkurve eines ungepufferten AMTPS aus Triton-X-114 und Wasser. Die theoretische Anpassung erfolgte nach Kapitel 3.2.1.3

Hierbei lässt sich eine gute Übereinstimmung des theoretisch angepassten mit dem experimentell gefundenen Verlauf sowohl für die mizellreiche als auch die wässrige Phase feststellen. Es wird für die weiteren Überlegungen angenommen, dass, zumindest im

gezeigten Temperaturfenster, sowohl die Interpolation der experimentellen Daten als auch die Extrapolation zulässig ist. Der auf diese Weise gefundene kritische Punkt liegt bei einem Massenanteil von 2,1 % (w/w) Tensid und einer Temperatur von 24,2 °C. Mit steigender Temperatur steigt der Tensidanteil in der mizellreichen Phase auf bis zu 20,3 % (w/w) bei 40 °C und sinkt auf ca. 0,03 % (w/w) in der wässrigen Phase bei derselben Temperatur.

Unter dem Einsatz von Aethoxal B lässt sich ebenfalls eine Binodale im Einklang mit Blankschteins Theorie mizellarer ATPS (Kapitel 3.2.1.3) erhalten, allerdings mit einem deutlich ausladenderen Verlauf (siehe Abbildung 5-7) als im Falle des Triton X-114. Der kritische Punkt wird hier bei einem Massenanteil von 8,2 % (w/w) Tensid und einer Temperatur von 26,6 °C vorhergesagt. Bei 40°C befinden sich in der mizellreichen Phase 73 % (w/w) des Tensids, während in der wässrigen Phase nur 0,09 % (w/w) berechnet werden.

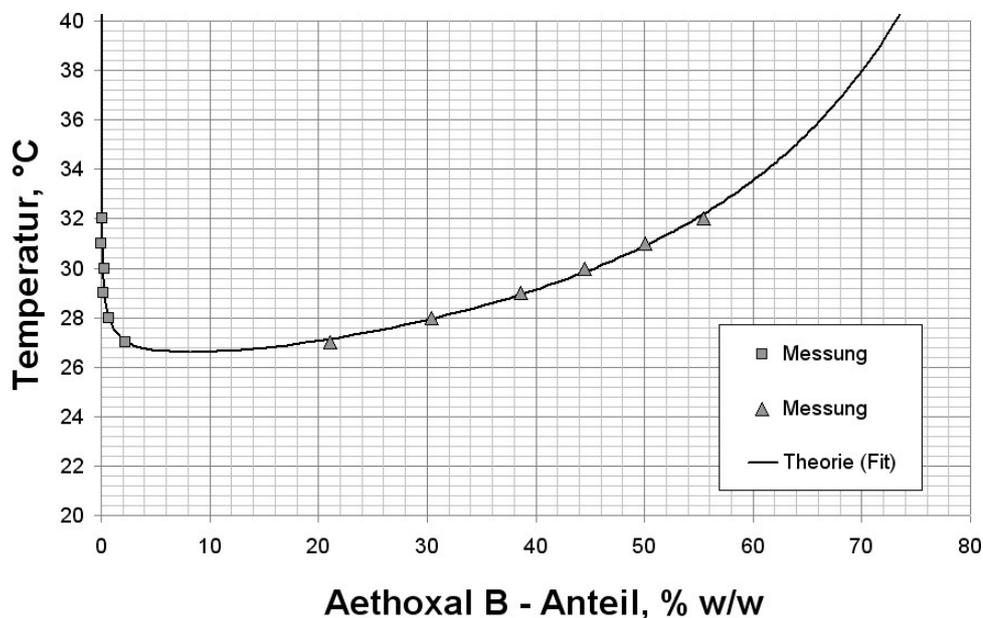


Abbildung 5-7: Experimentell gefundene Binodalkurve eines ungepufferten AMTPS aus Aethoxal B und Wasser. Die theoretische Anpassung erfolgte nach Kapitel 3.3.4

Abbildung 5-8 dient zur Verdeutlichung des gewaltigen Unterschieds der Binodalkurven von Triton X-114 und Aethoxal B. Obwohl die kritischen Punkte bei einer vergleichbaren Temperatur zwischen 24 °C und 27 °C liegen, reichert sich Aethoxal B weit stärker in der gebildeten Koazervatphase an. Auch wenn der Begriff „wässriges“ Zweiphasensystem bei Wassergehalten < 50 % unpassend erscheinen mag, wird er auch in diesem Fall beibehalten.

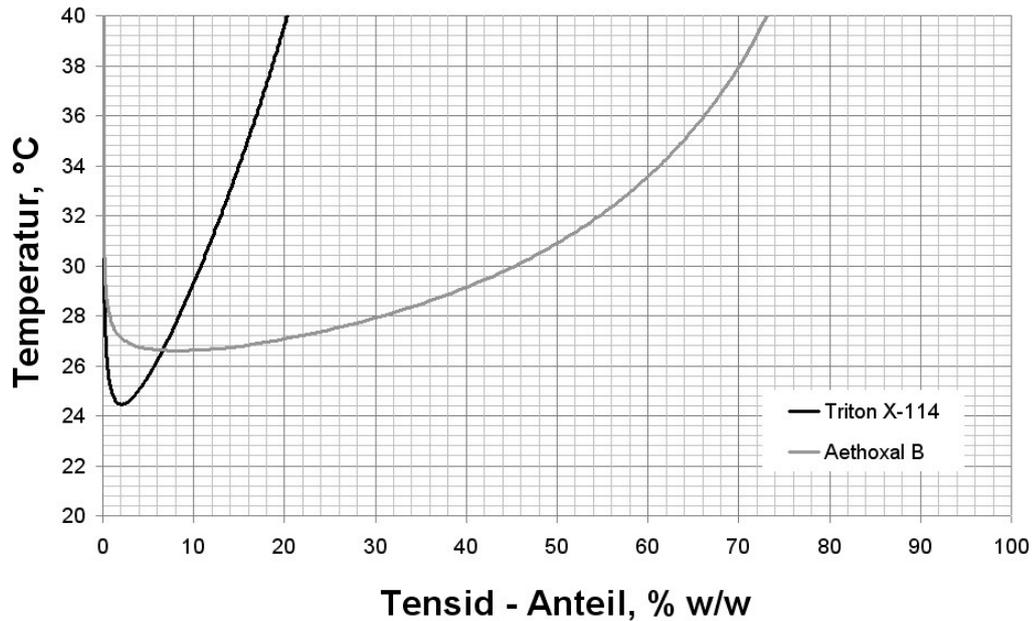


Abbildung 5-8: Direkter Vergleich der oben gezeigten Binodalkurven

Es sei jedoch angemerkt, dass teilweise auch unterhalb der kritischen Temperatur keine homogenen Lösungen hergestellt werden konnten. Beobachtete Schlierenbildungen können vermutlich auf die breite Molmassenverteilung der Tenside zurückgeführt werden, was eine Aufweichung der Grenzkurve zu einem Grenzgebiet zur Folge hat. Trotz dieses Sachverhalts werden die Volumenverhältnisse innerhalb des Zweiphasengebiets durch die berechneten Kurven gut wiedergegeben.

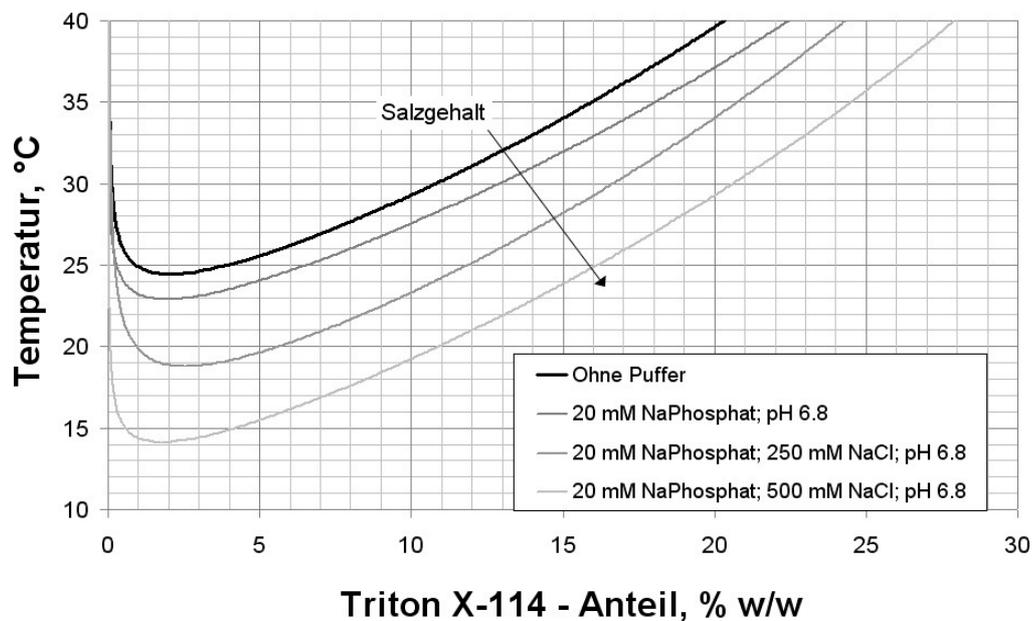


Abbildung 5-9: Binodalkurven für Triton X-114 – Wasser AMTPS für verschiedene Puffer- und Salzgehalte

Die Zugabe von Puffern und anderen Salzen verändert die Lage der Binodalkurve drastisch. Dieser Zusammenhang wird in der einschlägigen Literatur oft durch die Absenkung des

Cloud-Points einer definierten Tensidlösung durch steigende Salzgehalte dargestellt (z.B. [Selber 2000b] und [Tani 1997b]). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die kompletten Binodalkurven für die eingesetzten Puffer und Salzgehalte bestimmt, da diese zur Berechnung der Volumenverhältnisse nötig sind und somit helfen, leichter geeignete Betriebspunkte für Extraktionsprozesse zu finden. Abbildung 5-9 stellt die erhaltenen Ergebnisse für unterschiedlich gepufferte Triton X-114 AMTPS übersichtlich zusammen, wobei auf eine Darstellung der experimentellen Punkte verzichtet wird und nur die theoretisch angepassten Kurven gezeigt werden. Die in der Literatur beschriebene Absenkung des Cloud-Points mit Erhöhung des Salzgehalts lässt sich klar nachvollziehen, im Falle des Puffers EluKA (vgl. Tabelle 4-1 auf Seite 93) mit 0,5 M NaCl wird eine Absenkung um über 10°C erreicht. Die Kenntnis der veränderten Lage der Binodalkurve ist für den MEP-Prozess und insbesondere für die im einphasigen Bereich durchgeführten Schritte relevant, da dort weit genug abgekühlt werden muss um die Einphasigkeit zu gewährleisten. Auch im Falle des Aethoxal B (siehe Abbildung 5-10) ergeben sich starke Verschiebungen mit steigendem Salzgehalt, so werden Tensidgehalte in der mizellreichen Phase bis zu 90 % (w/w) berechnet.

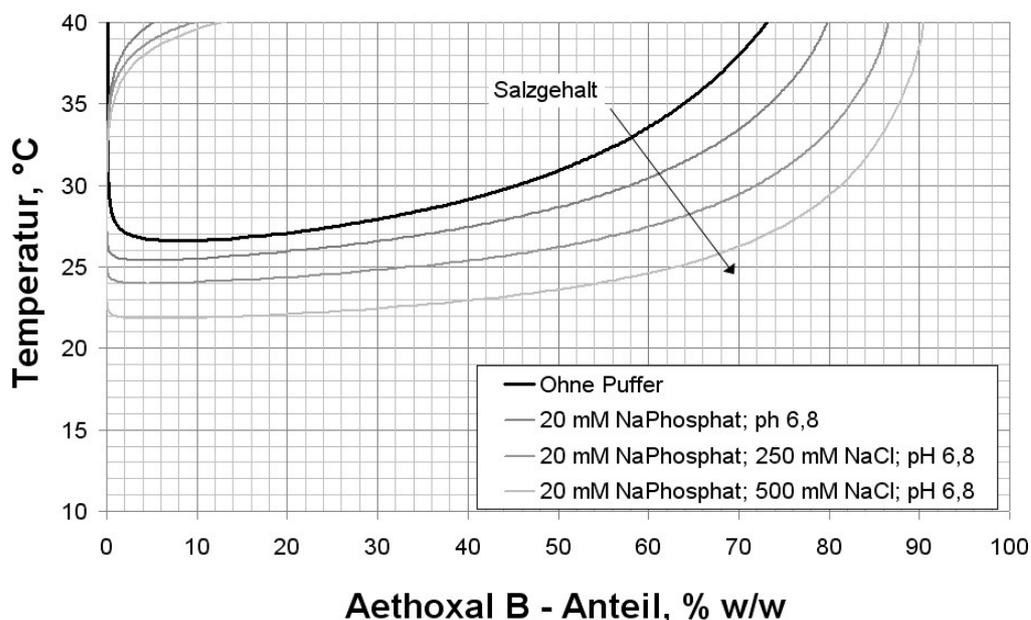


Abbildung 5-10: Binodalkurven für Aethoxal B – Wasser AMTPS für verschiedene Puffer- und Salzgehalte

Eine weitere Besonderheit im Falle der Aethoxal B AMTPS ist das Ansteigen des Tensidgehalts in der wässrigen Phase bei höheren Temperaturen. Theoretisch werden sogar geschlossene Zweiphasengebiete mit unterem und oberem kritischen Punkt berechnet. Dieses „retrograde“ Verhalten zeigt auch das aus der Literatur entnommene und in Kapitel 3.2.1.3 gezeigte allgemeine Phasendiagramm für mizellare ATPS (Abbildung 3-8).

5.2.2 Kinetik

5.2.2.1 Einzeltropfen

Im Falle des Aethoxal B – AMTPS, welches als mizellreiche Phase die Oberphase bildet, erfolgten kinetische Messungen unterhalb der Spule, so dass die durch die Zugaben von Magnetpartikeln gebildeten MEP-Phasen im Magnetfeld flotieren konnten. Abbildung 5-11 zeigt die experimentell gefundenen Tropfengeschwindigkeiten im Vergleich mit den nach Gl. 3.2-44 theoretisch berechneten Ergebnissen für eine aus Aethoxal B und M-PVA-C8 (chemagen biopolymer AG, Baesweiler) Partikeln gebildete magnetische Extraktionsphase. Jeder experimentelle Punkt wurde aus 20 bis 40 Einzelmessungen nach dem in Kapitel 4.6.2.1 beschriebenen Vorgehen gemittelt. Als Zahlenwerte für die theoretische Berechnung dienten (i) die Parameter der Magnetisierungskurve (gemessen nach Kapitel 9.4.2, angepasst nach Gl. 2.3-09) mit Zahlenwerten von $\chi_1 = 25 \text{ Am}^2/\text{kg}$, $\chi_2 = 26800 \text{ A/m}$; (ii) die nach Kapitel 9.3.1 gemessenen Flüssigphasendichten $\rho_D = 995 \text{ g/L}$ und $\rho_C = 997 \text{ g/L}$; (iii) eine aus Experimenten ohne Partikel und Magnetfeldeinfluss geschätzte Viskosität der wässrigen Phase von $\eta_C = 0,003 \text{ Pa s}$; (iv) ein Dispersphasenanteil von $\varepsilon = 0,13$, aus der Binodalkurve ohne Puffer (vgl. Abbildung 5-7) für 5% (w/w) Aethoxal B in Wasser bei $T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$ berechnet; (v) die Spulengeometrie der verwendeten Laborspule (siehe Kapitel 9.1.1); (vi) eine Stromstärke von $I = 7,6 \text{ A}$ für den Modus Feld an und $I = 0$ für den Modus Feld aus.

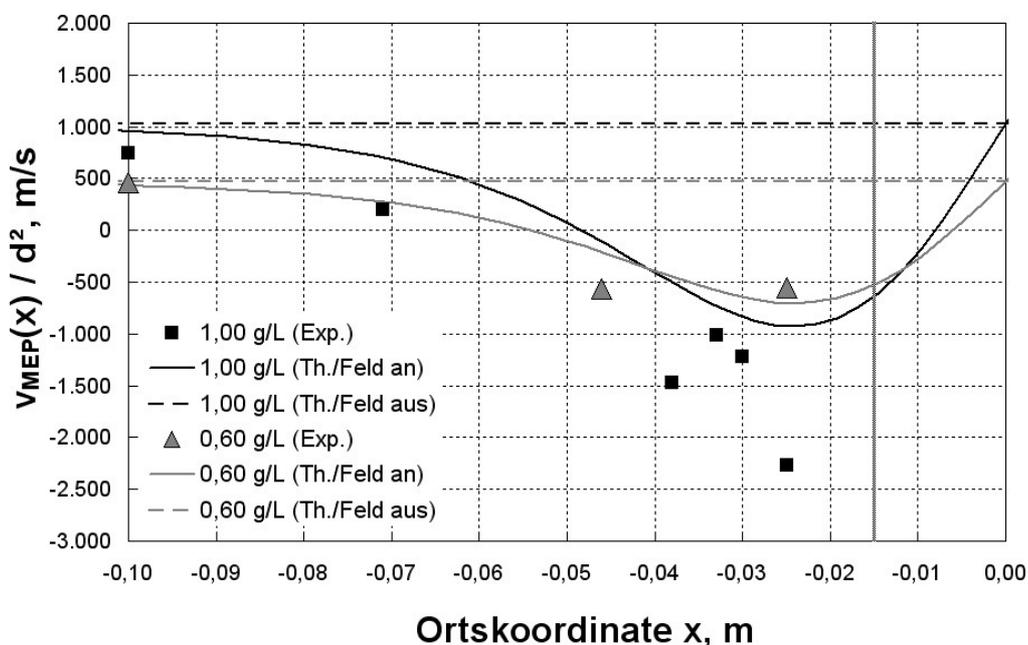


Abbildung 5-11: Experimentell bestimmte durchschnittliche Wanderungsgeschwindigkeiten (geteilt durch das Quadrat des Tropfendurchmessers) einzelner Tropfen für ein mit M-PVA-C8 Partikeln dotiertes Aethoxal B – AMTPS als Funktion des Ortes. Die gestrichelten und durchgezogenen Linien wurden mit Gleichung 3.2-44 berechnet

In Abbildung 5-11 bezeichnet $x = 0$ m das Spulenzentrum, der senkrechte Strich bei $x = -0,015$ m soll den Spulenrand andeuten. Die Beobachtungen erfolgten in Abständen zwischen 2,5 cm und 10 cm (entlang der Spulenchse) vom Spulenzentrum, wobei sich nach der Definition der Ortskoordinate (siehe Abbildung 2-10, Seite 24) für Beobachtungen unterhalb der Spule negative Zahlenwerte für x ergeben. Entsprechend der Definition der Geschwindigkeit v (siehe Abbildung 3-15, Seite 59) ergeben sich für eine Sedimentation positive und für eine Flotation negative Zahlenwerte.

Aus den gewonnenen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die magnetischen Kräfte für weite Entfernungen von der Magnetfeldquelle, in diesem Fall 10 cm, vernachlässigbar klein werden und die Kurven für den Modus „Feld an“ gegen die Linien „Feld aus“ konvergieren. Die experimentell gefundenen Geschwindigkeiten bestätigen diesen Befund, bemerkenswert ist zudem, dass die Zugabe der Magnetpartikel zum ATPS eine Umkehr der effektiven Dichtedifferenz bewirkt und die mizellreiche Phase sedimentieren lässt. Wird der Abstand jedoch weniger als 5 cm, reichen die Magnetkräfte aus um eine Flotation zu erreichen, wobei dieser Abstand selbstverständlich für ein gegebenes MEP-System vom Spulenstrom und der Spulengeometrie abhängig ist. Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Schnittpunkt der theoretisch berechneten Kurven. An diesem Punkt (x^*) gilt:

$$\gamma(x^*) = g + \mu_0 \cdot M(x^*) \cdot \text{grad}H(x^*) = 0 \quad [\text{Gl. 5.2-01}]$$

Nur falls der Abstand vom Spulenzentrum kleiner ist als dieser Abstand x^* lässt sich überhaupt eine Flotationsgeschwindigkeit erreichen, die die des reinen ATPS ohne Magnetpartikel übertrifft. Dieser Punkt hängt zwar von der Art der Magnetpartikel (Magnetisierungskurve), aber nicht von deren Konzentration im System ab. Dieser Zusammenhang lässt sich aus Gleichung 3.2-44 direkt ablesen für $\gamma(x) = 0$. Auf diese Weise lässt sich recht schnell abschätzen, ob der Einsatz von Magnetfeldern zur Beschleunigung der Flotation eines gegebenen ATPS überhaupt geeignet ist und wenn ja, wie das Magnetfeld dimensioniert sein sollte bzw. welche magnetischen Eigenschaften der Partikel erforderlich sind.

Insgesamt werden Trend und Größenordnung der experimentellen Werte durch die theoretischen Berechnungen in guter Näherung wiedergegeben. Vergleichbares lässt sich auch im Falle eines aus Triton X-114 und M-PVA Partikeln gebildeten MEP-Systems feststellen (siehe Abbildung 5-12).

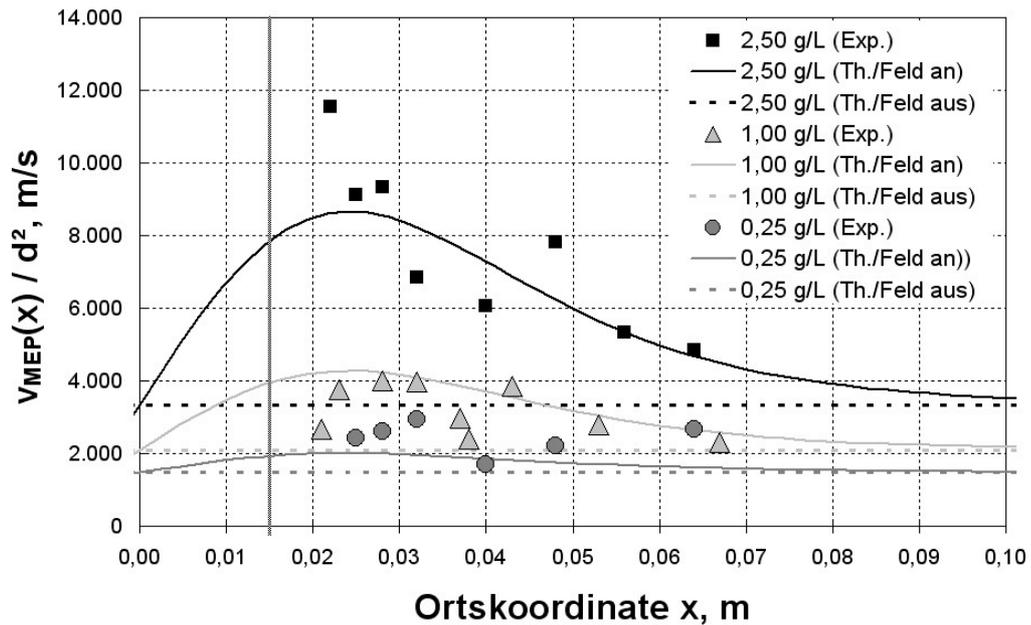


Abbildung 5-12: Experimentell bestimmte durchschnittliche Wanderungsgeschwindigkeiten (geteilt durch das Quadrat des Tropfendurchmessers) einzelner Tropfen für ein mit M-PVA Partikeln dotiertes Triton X-114 – AMTPS als Funktion des Ortes. Die gestrichelten und durchgezogenen Linien wurden mit Gleichung 3.2-44 berechnet

Dieses System wurde mittels dreier verschiedener Partikelkonzentrationen systematisch untersucht, wobei für die theoretischen Berechnungen folgende Zahlenwerte verwendet wurden (die Bestimmungen erfolgten analog zum oben beschriebenen System mit Aethoxal B): $\chi_1 = 44 \text{ Am}^2/\text{kg}$, $\chi_2 = 24200 \text{ A/m}$, $\rho_D = 1006 \text{ g/L}$, $\rho_C = 999 \text{ g/L}$, $\eta_C = 0,003 \text{ Pa s}$, $\varepsilon = 0,22$ (2,5% (w/w) Triton X-114 in Wasser bei $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$), $I = 7,6 \text{ A}$; Spulengeometrie der verwendeten Laborspule (siehe Kapitel 9.1.1).

Die Übereinstimmung von Praxis und Theorie ist hier deutlich gegeben, für Konzentrationen von 1 g/L und $0,25 \text{ g/L}$ werden sogar die theoretisch vorhergesagten Maximumsverläufe beobachtet. Für $2,5 \text{ g/L}$ wird nahe an der Spule eine signifikante Überhöhung der gemessenen Geschwindigkeit gegenüber der vorhergesagten gefunden (ähnlich auch für Aethoxal B mit 1 g/L , siehe. Abbildung 5-11), was vermutlich mit einer durch die magnetische Kraftwirkung hervorgerufenen Deformation der zuvor kugelförmigen Tropfen zu ellipsoiden Körpern zusammenhängt. Abbildung 5-13 zeigt mikroskopische Aufnahmen solcher beobachteter Ellipsoide. Durch eine bessere Stromlinienform bewegen sich solche Körper mit geringerem Widerstand als Kugeln durch ein umgebendes Medium, was die Überhöhung gegenüber der auf der Stokes-Gleichung (Gl. 3.2-22) fußenden Berechnung erklärt. Abweichungen durch nicht-



Abbildung 5-13: Zu Ellipsoiden verformte MEP-Tropfen; $d \approx 100 \mu\text{m}$

laminare Strömungsverhältnisse sind aufgrund der sehr geringen beobachteten Tropfengröße (i.d.R. $< 500 \mu\text{m}$) und damit kleinen Reynoldszahlen nicht zu erwarten, wobei der Umschlag in eine turbulente Umströmung die Bewegung verlangsamen anstatt beschleunigen würde.

Durch die vorgestellten Ergebnisse wird deutlich, dass eine Beschleunigung sowohl von Sedimentation als auch Flotation von MEP-Systemen im Magnetfeld experimentell beobachtet werden konnte. Die dabei gefundenen Zahlenwerte der Tropfengeschwindigkeiten stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit abgeleiteten Bewegungsgleichungen. Neben den zahlreichen Fehlerquellen durch die vielen in die Berechnung einfließenden Stoffdaten und den notwendigen Kompromissen bei der Durchführung der Experimente (vgl. Kapitel 4.6.2.1) können auch Deformationen der sonst kugelförmigen Tropfen Abweichungen zwischen Experiment und Theorie erklären.

5.2.2.2 Tropfenschwärme

In Abbildung 5-14 sind einige ausgewählte Ergebnisse der, mit dem in Kapitel 4.6.2.2 erwähnten Laseraufbau erhaltenen, Transmissionssignal-Profile über der Höhe einer 18 mm hohen Dispersion eines Aethoxal B – AMTPS gezeigt. Für den Höhenbereich, in dem sich die mizellreiche Phase sammelt (ca. 16,5 bis 18 mm), wird schon nach 2 Minuten eine Erhöhung des Signals durch Abschwächung der Trübung festgestellt, nach 30 Minuten hat sich die Zone schon beträchtlich geklärt.

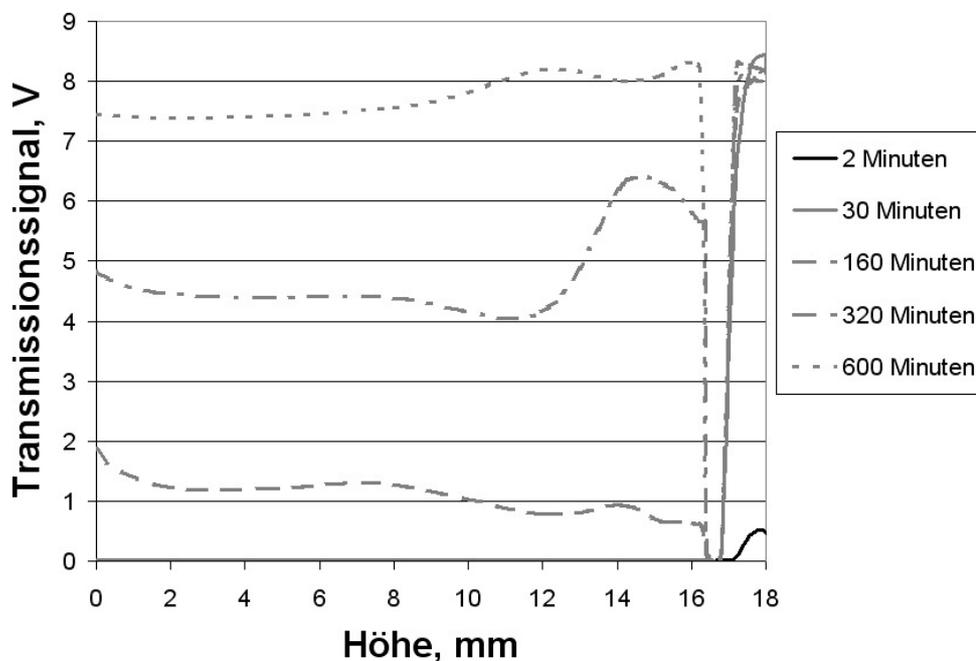


Abbildung 5-14: Höhenprofile des Laser-Transmissionssignals für verschiedene Zeiten eine Phasenseparation eines Aethoxal B – AMTPS ($\epsilon = 0,05$, $T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$)

Durch die relativ grobe Rasterung kann die Abscheidung der mizellreichen Phase kaum näher beschrieben werden, außer der Tatsache, dass das Signal nach 160 min unverändert bleibt. Für die wässrige Phase setzt ca. ab diesem Zeitpunkt eine nennenswerte Klärung ein, die erst nach insgesamt 600 min als abgeschlossen angesehen werden kann. Hier scheinen sehr fein verteilte Disperstropfen, die nur einen Bruchteil der gesamten mizellreichen Phase ausmachen, eine lang anhaltende Trübung zu verursachen. Mit Hilfe der Stokes-Gleichung (Gl. 3.2-22) und der Stoffdaten $\rho_D = 995 \text{ g/L}$ und $\rho_C = 997 \text{ g/L}$ und $\eta_C = 0,003 \text{ Pa s}$ lässt sich für einen Tropfen, welcher zum Zurücklegen von 18 mm eine Zeit von 600 min benötigt, ein Durchmesser von $37 \mu\text{m}$ errechnen⁸. Dieses Ergebnis stellt, bestätigt durch die mikroskopischen Betrachtungen, durchaus eine realistische Größe dar. Die, im Gegensatz zur lang anhaltenden Trübung, vergleichsweise rasch erfolgte Abscheidung der mizellreichen Phase lässt sich nur durch die Annahme einer breiten Tropfengrößenverteilung zu Beginn des Versuchs, oder, was physikalisch sinnvoller ist, mittels des von Jeelani [Jeelani 2005] vorgeschlagenen Koaleszenzmechanismus, erklären (vgl. Kapitel 3.2.2.5).

Um einen etwas tieferen Einblick in die tatsächliche Separationsgeschwindigkeit der mizellreichen Dispersphase zu erhalten, wurden mikroskopische Betrachtungen angestellt, bei denen die Lage des Flüssigkeitsmeniskus genauer verfolgt werden konnte. Abbildung 5-15 zeigt zusammenfassend Ergebnisse für verschiedene ATPS und MEP-Phasen. Im Falle des Aethoxal B bildet sich in den ersten zwanzig Minuten kaum Zielphase, während in den darauf folgenden zwanzig Minuten ca. 75% abgeschieden werden. Nach 60 Minuten und 80 Prozent endet die Darstellung. Mehr als 95% sind nach ca. drei Stunden abgeschieden, ab dann wird die Messung zu unsicher, wie oben diskutiert scheiden sich die letzten Reste erst innerhalb der nächsten 7 Stunden ab (die vollständigen Ergebnisse finden sich bei [Henrich 2006]). Der rasante Anstieg der Separationsgeschwindigkeit ist durch eine einsetzende, sich selbst beschleunigende Koaleszenz zu erklären. Nach 40 Minuten sind jedoch die größten Tropfen bereits abgeschieden, kleine bleiben zurück und die Separationsgeschwindigkeit wird langsamer.

⁸ Schwarmeffekte werden in der folgenden Diskussion nicht berücksichtigt, da stets Systeme mit ähnlich großem Dispersphasenanteil verglichen werden.

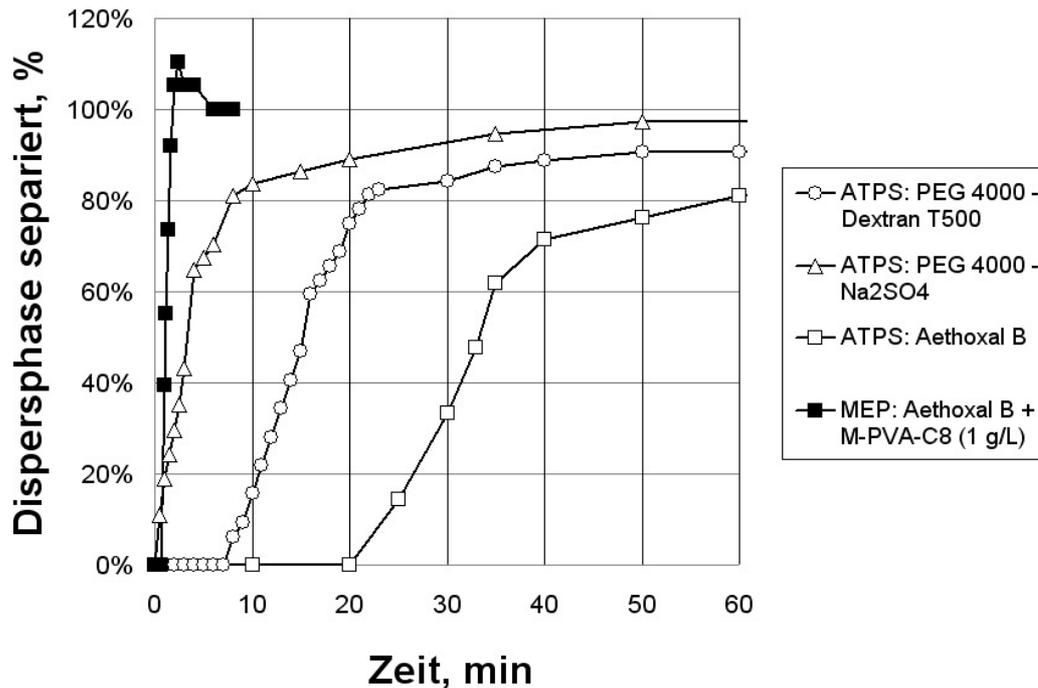


Abbildung 5-15: Separationskurven ausgewählter ATPS und MEP-Systeme ($\epsilon = 0,05$)

Zum Vergleich wurden auch Separationsversuche mit klassischen ATPS (PEG/Dextran und PEG/Salz) durchgeführt, jeweils mit einer Dispersionshöhe von 20 mm. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Abbildung 5-15 dargestellt. Das langsamste System ist mit Abstand das ATPS mit Aethoxal B, gefolgt von PEG/Dextran. Sehr viel schneller separiert das PEG/Salz-System. Das sonst so langsame Aethoxal B – ATPS wird jedoch durch die Dotierung mit Magnetpartikeln und den Einsatz eines Magnetfeldes (vergleichbar mit den Versuchsbedingungen in Kapitel 5.2.2.1) schneller als alle anderen Systeme. Die Separation ist so schnell, dass die ankommenden Tropfen nicht schnell genug koaleszieren können und Fremdphase eingeschlossen wird, die jedoch langsam wieder ausgeschieden wird. Nur so ist die Überhöhung der Separation über 100% zu erklären. Dieses „Entrainment“ der Fremdphase ist ein oft in der einschlägigen Literatur zur Extraktionstechnik beschriebenes Phänomen ([Henschke 2002]). Nur durch die magnetische Kraftwirkung und die ohnehin stattfindende Koaleszenz ist eine derart starke Beschleunigung nicht zu erklären, jedoch durch die magnetische Polarisierung der Tropfen und eine durch gegenseitige Anziehungskräfte induzierte Koaleszenz. Zur Veranschaulichung dient eine in Abbildung 5-16 gezeigte Fotoserie. In dieser Abbildung sind auch sehr schön Partikelketten zu erkennen, welche sich entlang der magnetischen Feldlinien ausrichten. Diese Kettung ist im Hinblick auf die Berechnung der effektiven Magnetisierung wichtig, da hierdurch die ansonsten für einzelne Kugeln zu berücksichtigende Demagnetisierung (siehe Kapitel 2.3.1) keine Rolle spielt.

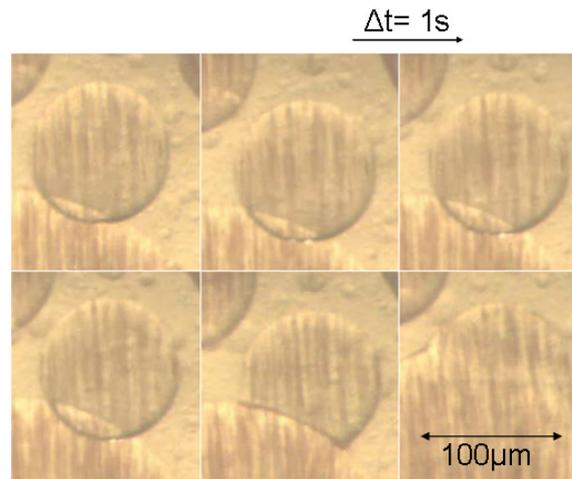
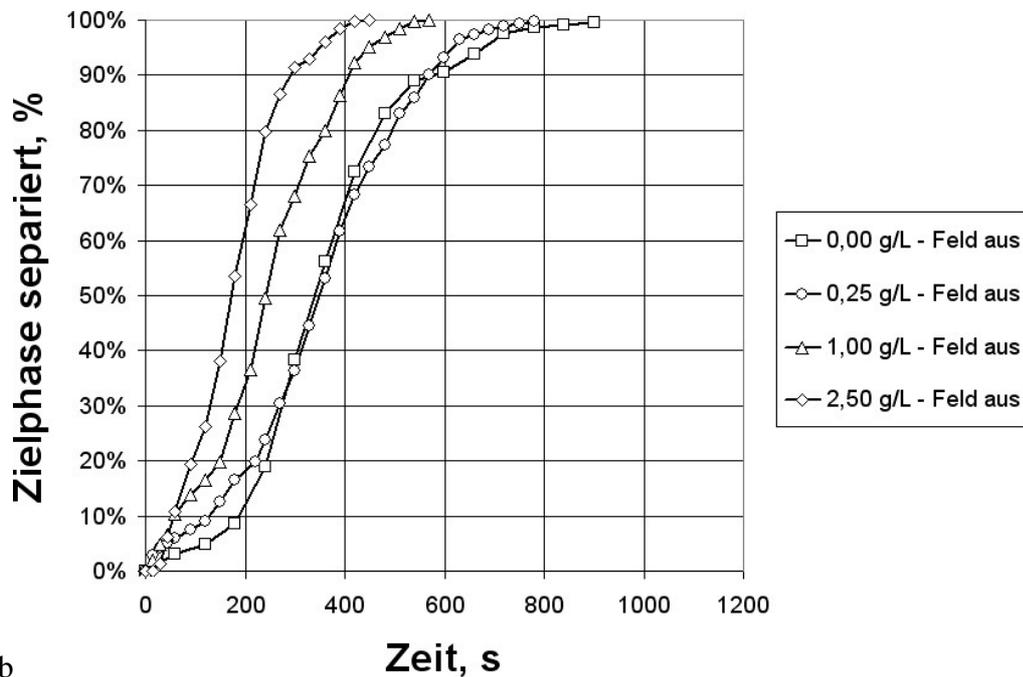


Abbildung 5-16: Koaleszierende Tropfen eines Aethoxal B AMTPS; Serie von sechs mikroskopischen Fotografien

Systematische Untersuchungen der Abhängigkeit der Separationsgeschwindigkeit vom Ort des MEP im Magnetfeld sowie der eingesetzten Partikelmasse wurden für das AMTPS Triton X-114 im Zusammenspiel mit M-PVA Partikeln mit Hilfe des Mikroskopaufbaus durchgeführt. Die Dispersionshöhe betrug 10 mm.



Ab

Abbildung 5-17: Separationsgeschwindigkeit von Triton X-114 – M-PVA Systemen (MEP) bei Variation der eingesetzten Partikelkonzentration ($\epsilon = 0,22$)

Die Kurven in Abbildung 5-17 zeigen alle den typischen S-Verlauf für koaleszierende Systeme. Die Separation ist vergleichsweise schnell (< 10 min), ein direkter Vergleich mit den eben diskutierten Beispielen ist jedoch durch die geringere Dispersionshöhe nur bedingt möglich. Eindeutig erkennbar wird die Beschleunigung durch steigende Partikelkonz-

entrationen, welche eine Vergrößerung der Dichtedifferenz bewirken. Eine weitere Steigerung der Geschwindigkeit wird durch das Magnetfeld erreicht, siehe Abbildung 5-18. Auch der Effekt einer Annäherung an die Magnetfeldquelle in einen Bereich höherer Feldstärke und eines höheren Gradienten (der in Millimeter angegebene Wert bezeichnet den Abstand der Dispersion vom Spulenrand, zum Zentrum fehlen also hier weitere 15 mm). Der Beschleunigungseffekt ist jedoch bei weitem nicht so stark ausgeprägt wie im Falle des MEP mit Aethoxal B. Daher kann angenommen werden, dass die beobachtete Beschleunigung nur durch die Schwer- und Magnetkraft bedingt wird. Warum die Koalszenzneigung im Falle des Triton X-114 im Vergleich zum Aethoxal B soviel schwächer ausgeprägt ist, ist unbekannt.

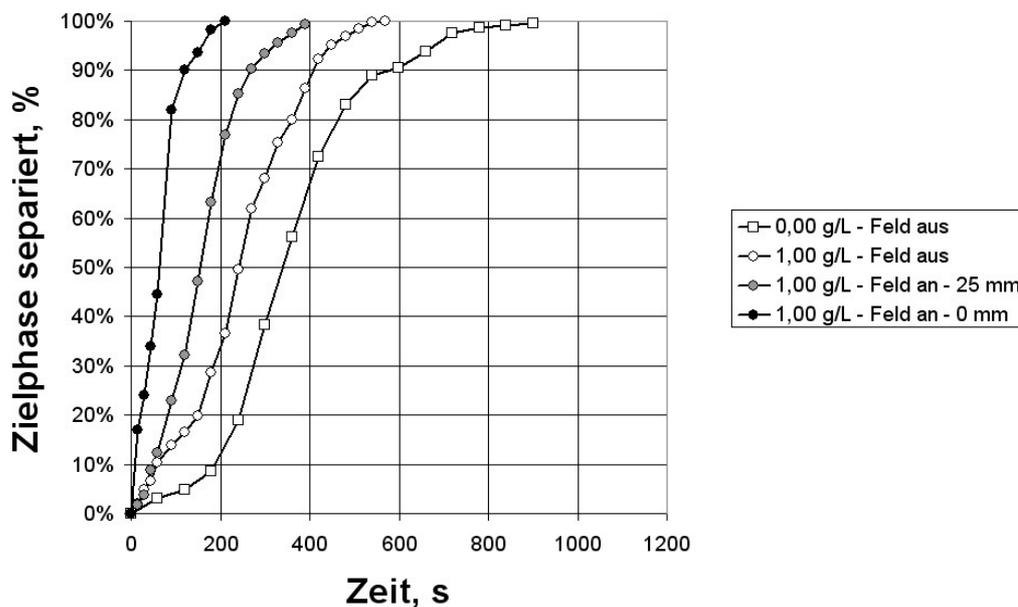


Abbildung 5-18: Separationsgeschwindigkeit von Triton X-114 – M-PVA Systemen (MEP) bei Variation des Ortes im Magnetfeld und einer Partikelkonzentration von 1 g/L ($\epsilon = 0,22$)

Die erreichten Beschleunigungen der Phasenseparation zu beziffern gestaltet sich schwierig, da oftmals kein eindeutiger Endpunkt definiert werden kann bzw. die Trennungsdauer von der Dispersionshöhe abhängt. Von dieser Dispersionshöhe wiederum hängt die für die Koaleszenz verfügbare Zeit ab, deren Geschwindigkeit aber die Dauer drastisch verkürzen kann, wenn sie Zeit zur Entfaltung hat. Es sind hier also mehrere komplex zusammenhängende Faktoren zu berücksichtigen, was durch die Ortsabhängigkeit der Magnetfeldstärke und der auch dadurch teilweise induzierten Koaleszenz weiter verkompliziert wird.

Für die betrachteten Größen der Gefäße und Magnetfeldstärken kann jedoch zusammenfassend gesagt werden, dass im Falle von Triton X-114 eine Verkürzung um den Faktor 10 erreicht werden kann, während dieser Faktor für Aethoxal B, bewirkt durch die Koaleszenz, eher 100 beträgt.

5.3 Gleichgewicht der Proteinextraktion

5.3.1 Einzelstoffe

Das Verteilungsverhalten von Proteinen in ATPS ist den unterschiedlichsten Einflüssen unterworfen, wie bereits in Kapitel 3.3 erläutert wurde. Um mit den elektrostatischen WW einen der wichtigsten Einflüsse auszuschalten, wurden Versuche mit dem Protein GFP aus *E.Coli* bei einem pH-Wert von 6,8 durchgeführt, der dem isoelektrischen Punkt von GFP entspricht [Ebner 2006]. Diese Versuche wurden in zwei AMTPS (Triton X-114 und Aethoxal B) bei verschiedenen Temperaturen und Salzkonzentrationen durchgeführt. Diese Variation zielte auf eine Beeinflussung der Gleichgewichtslage der Binodalkurve der AMTPS, wie sie in Kapitel 5.2.1 dargestellt ist, ab. Eine veränderte Lage der Binodale führt zu veränderten Tensidanteilen in Ober- und Unterphase, welche nach Gleichung 5.3-01 direkt in den Wert des Verteilungskoeffizienten K einfließen. Gl. 5.3-01 ergibt sich aus Gl. 3.3-14 durch Ersetzen der Volumenbrüche durch Massenbrüche (Gl. 3.2-04) und der Festlegung des Exponenten n auf 3, was gleichbedeutend mit der Annahme sphärischer Mizellen ist.

$$K_{EV} = \exp \left\{ - (w_T - w_B) \cdot \left(1 + \frac{R_{\text{Protein}}}{R_{\text{Mizelle}}} \right)^3 \right\} \quad [\text{Gl. 5.3-01}]$$

Der für die Berechnung benötigte hydrodynamische Radius des hier verwendeten 6xHIS getaggen GFP ist nicht bekannt und wurde deshalb unter Zuhilfenahme von Literaturdaten für Ovalbumin ($R_{\text{Ova}} = 29 \text{ \AA}$, [Nikas 1992]) und der Annahme einer Proportionalität zwischen dem Molgewicht und der dritten Potenz des Radius geschätzt (Gl. 5.3-02).

$$R_2 = R_1 \cdot \sqrt[3]{\frac{M_2}{M_1}} \quad [\text{Gl. 5.3-02}]$$

Mit $M_{\text{GFP}} = 27,6 \text{ kDa}$ und $M_{\text{Ova}} = 45 \text{ kDa}$ ergibt sich ein Wert von $R_{\text{GFP,6xHIS-tagged}} = 24,6 \text{ \AA}$. Dieser Wert liegt wie erwartet leicht über einem Literaturwert für den GFP-Wildtyp von $R_{\text{GFP, Wildtyp}} = 23 \text{ \AA}$ [Lam 2005]. Die benötigten Mizellradien (und Formen) sind ebenfalls unbekannt, sollten jedoch für den angenommenen Fall sphärischer Mizellen größer als der für das kleinere Tensid C_{10}EO_4 bei [Nikas 1992] angegebene Wert von $R_{\text{Mizelle}} = 17,8 \text{ \AA}$ sein.

Abbildung 5-19 zeigt die gemessenen Verteilungskoeffizienten von GFP in Triton X-114 AMTPS als Funktion der Differenz der Tensidanteile in Ober- und Unterphase. Die Auftragung erfolgt über dem Betrag, da die Differenz für Systeme, in denen die mizellreiche Phase die Unterphase bildet, negativ ist. Die Zahlenwerte für $w_T - w_B$ wurden aus den zuvor beschriebenen Binodalkurven für die jeweilige Temperatur und Pufferzusammensetzung berechnet. Der betrachtete Temperaturbereich betrug $26 \text{ }^\circ\text{C} - 34 \text{ }^\circ\text{C}$.

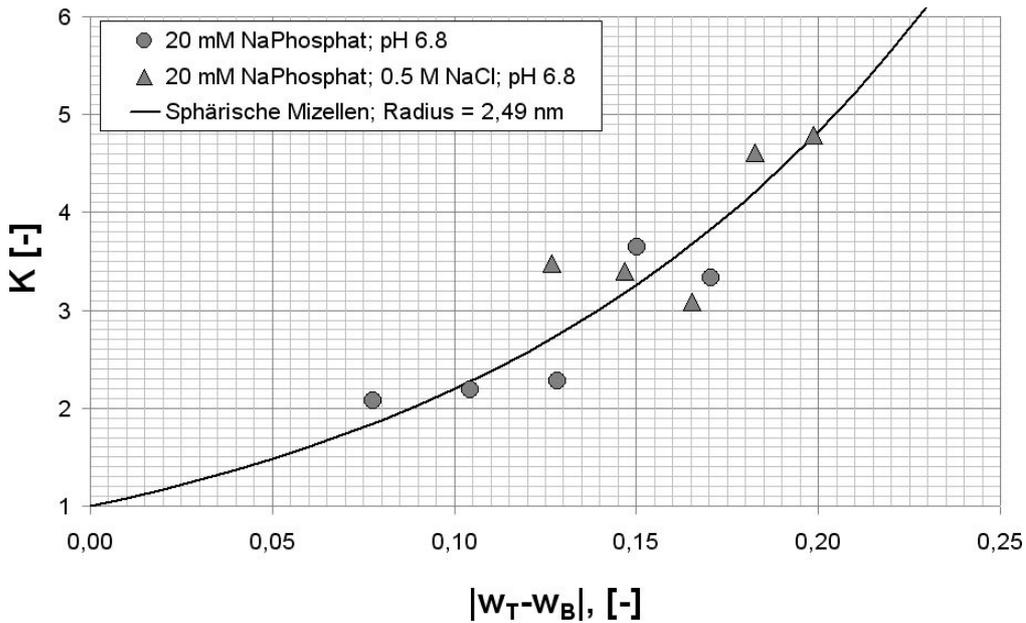


Abbildung 5-19: Verteilungskoeffizienten von 6xHIS-GFP von *E.Coli* in einem Triton X-114 AMTPS aufgetragen über der Differenz der Tensidanteile von Ober- und Unterphase

Ein durch nichtlineare Regression an die Messwerte angepasster Wert für den Mizellradius von 2,49 nm kann den experimentell gefundenen Trend gut abbilden. Die gefundene Übereinstimmung für den betrachteten Bereich von $K = 2$ bis $K = 5$ spricht für den Sachverhalt, dass die Excluded-Volume-Interaktionen in der gewählten experimentellen Anordnung dominieren und Temperatur- sowie Puffereinflüsse mit Kenntnis der Binodalkurve vollständig erfasst sind. Weitere Ergebnisse mit Aethoxal B AMTPS zeigt Abbildung 5-20.

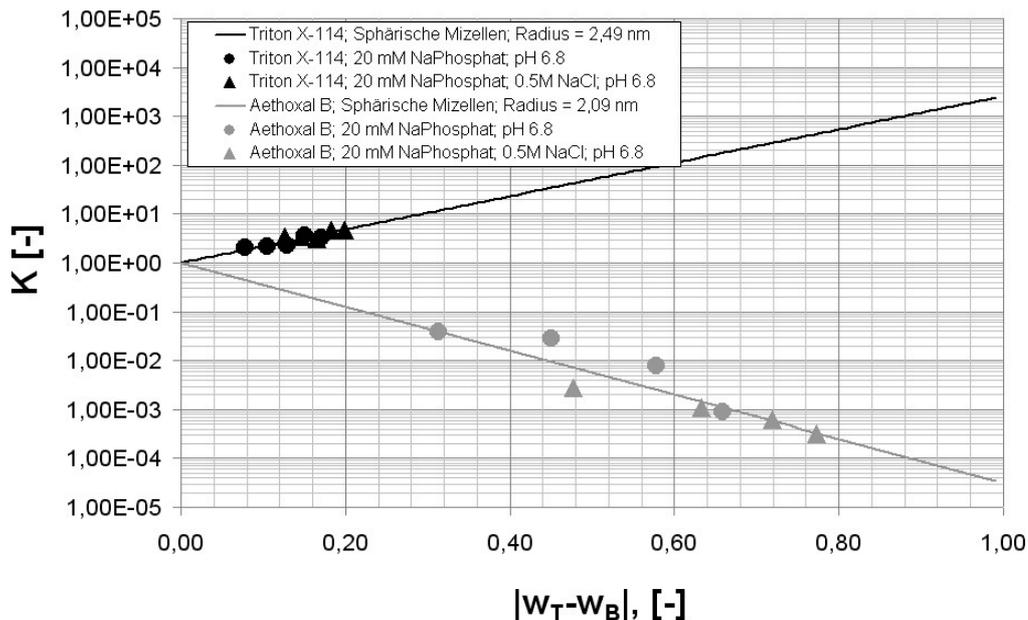


Abbildung 5-20: Logarithmische Auftragung der Verteilungskoeffizienten von 6xHIS-GFP aus *E.Coli* in AMTPS von Triton X-114 und Aethoxal B

Hier wurde eine logarithmische Auftragung gewählt, da die K-Werte im Falle des Aethoxal B sehr viel kleiner als 1 sind (Anm.: Auch beim Aethoxal B handelt es sich um einen Ausschluss des Proteins aus der mizellreichen Phase, welche jedoch die Oberphase darstellt). Ein angepasster Wert für den Mizellradius von 2,09 nm gibt auch hier eine sehr gute Übereinstimmung mit dem experimentell gefundenen Verlauf. Das extreme Verteilungsverhalten im Falle des Aethoxal B – AMTPS liegt zum einen an der, im direkten Vergleich, kleineren Mizellgröße, hauptsächlich aber an den hohen Tensidgehalten in der mizellreichen Phase des gebildeten AMTPS. Ein Vergleich von Abbildung 5-8 (Seite 123) und Abbildung 5-20 veranschaulicht diesen Zusammenhang recht eindrucksvoll.

Die extremen K-Werte für Aethoxal B lassen sich auch mit dem Protein Lysozym aus Hühnereiweiß beobachten, jedoch entsprechend der kleineren Größe des Proteins im Vergleich mit GFP weniger ausgeprägt. Der Radius von Lysozym lässt sich mit der oben vorgestellten Methode (Gl. 5.3-02) bezogen auf Ovalbumin auf einen Wert von 1,90 nm schätzen. Die in Abbildung 5-21 gezeigten experimentellen Ergebnisse wurden nicht selbst zur erneuten Anpassung eines hypothetischen Mizellradius verwendet, sondern der aus den GFP-Experimenten ermittelte Wert von 2,09 nm wurde zur K-Wert Berechnung weiter verwendet.

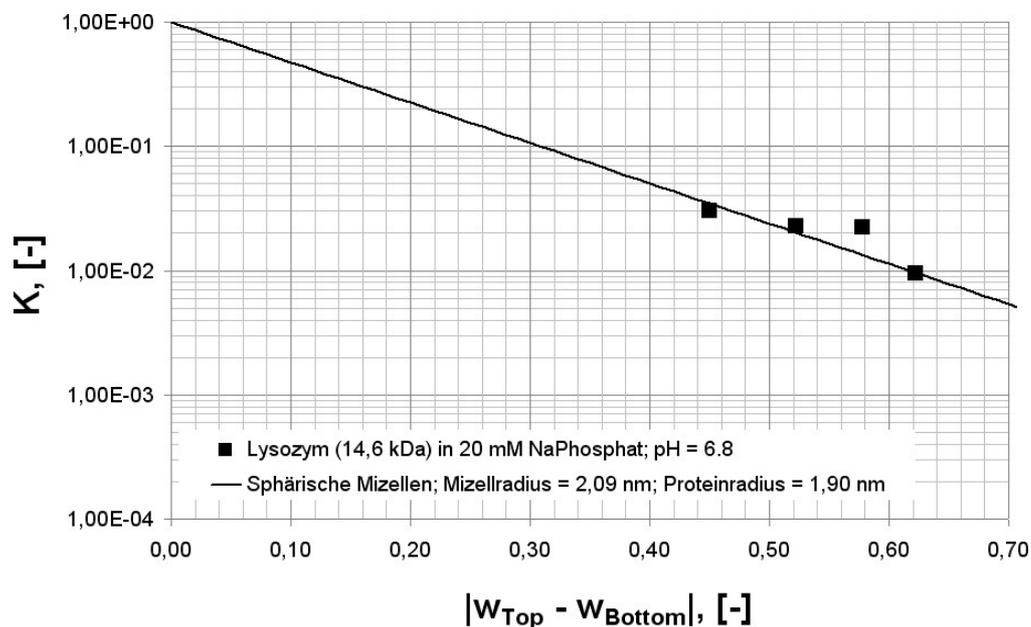


Abbildung 5-21: Verteilungskoeffizienten von Lysozym aus Hühnereiweiß in einem Aethoxal B AMTPS aufgetragen über der Differenz der Tensidanteile von Ober- und Unterphase

Es kann eine sehr gute Übereinstimmung beobachtet werden, obwohl das Lysozym bei dem getesteten pH-Wert stark positiv geladen ist ($pI \approx 11$). Die Excluded-Volume-Interaktionen dominieren auch hier deutlich über allen anderen denkbaren. Etwas anders verhält es sich jedoch im Falle des Triton X-114. Hier wurden Verteilungskoeffizienten für ein negativ (Ovalbumin, $pI \approx 5,4$) und ein positiv geladenes (Lysozym, s.o.) Protein bestimmt.

In Abbildung 5-22 sind die Ergebnisse zusammen mit gestrichelt eingezeichneten hypothetischen K-Wert Verläufen, dargestellt. Die Steigungen wurden auch hier mit dem oben gefundenen Mizellradius von $R = 2,49$ nm berechnet, jedoch können die experimentell gefundenen Verläufe nur wiedergegeben werden, wenn die Geraden parallel verschoben werden. Eine solche Verschiebung entspricht physikalisch dem Hinzutreten mindestens eines weiteren Terms in Gleichung 3.3-09 (siehe Kapitel 3.3.2).

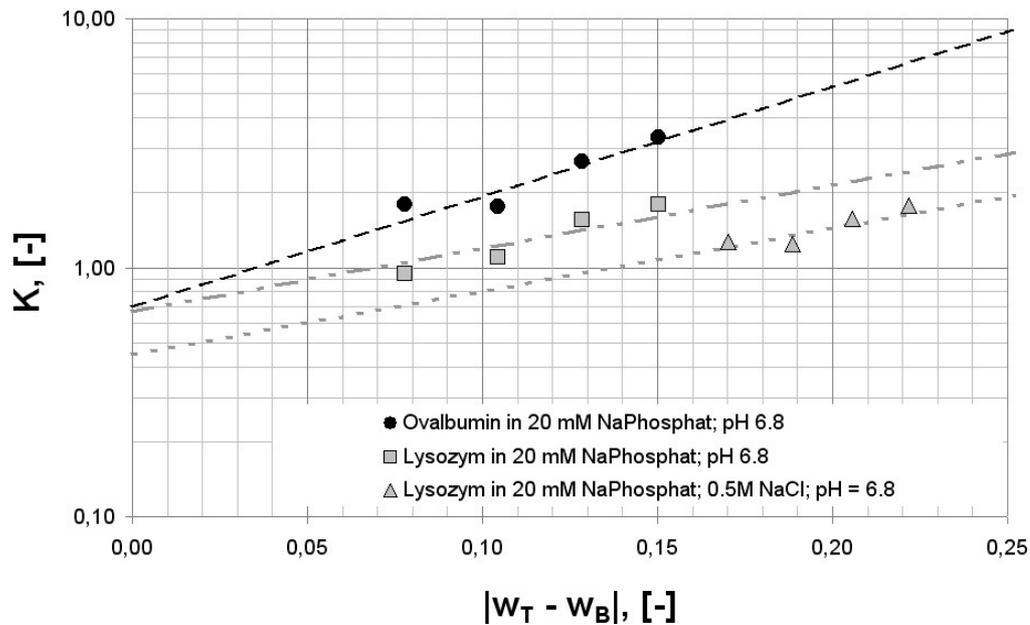


Abbildung 5-22: Verteilungskoeffizienten von Lysozym und Ovalbumin aus Hühnereiweiß in einem Triton X-114 AMTPS aufgetragen über der Differenz der Tensidanteile von Ober- und Unterphase mit gestrichelten Linien für angepasste K-Werte

Ein elektrostatischer Term, der je nach Pufferzusammensetzung unterschiedlich groß ist, kann hier eine Erklärung liefern. Widersprüchlich ist nur, dass beide Proteine, d.h. sowohl das positiv geladene Lysozym als auch das negativ geladene Ovalbumin, weniger stark als durch die reine Excluded-Volume-Theorie vorhergesagt aus der Koazervatphase ausgeschlossen werden. Den klassischen Theorien (siehe Kapitel 3.3.3) für das Protein-Partitioning in ATPS folgend, müssten die unterschiedlichen Vorzeichen der Ladungszahlen der Proteine gegenläufige Auswirkungen haben. Auch wenn die Beobachtung hier auf nur wenigen Daten beruht, widerspricht der experimentelle Befund der klassischen Interpretation, bei der die Polarisierung der Phasengrenze zur Berechnung der „bulk“-Größe Verteilungskoeffizient herangezogen wird (diese Problematik wurde bereits von Huddleston *et al* [Huddleston 1991] diskutiert). Die Wirkung der Salze und Puffer kann auch durch die Änderung der elektrostatischen Selbstenergie der Proteine (vgl. Kapitel 3.1) erklärt werden. Die Salzwirkung scheint die Löslichkeit von elektrisch geladenen Proteinen in der Koazervatphase von AMTPS durch Absenken der Selbstenergie, unabhängig vom Vorzeichen der Ladung, zu erhöhen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die von [Nikas 1992] eingeführte Excluded-Volume-Theorie ein hervorragendes Werkzeug im Umgang mit AMTPS darstellt. Werden jedoch weitere Einflüsse wirksam, was in salzhaltigen Multikomponenten-Systemen praktisch immer der Fall ist, weichen Beobachtung und Vorhersage zum Teil erheblich voneinander ab. Die Ermittlung eines K-Werts sollte also stets durch experimentelle Arbeiten gestützt werden.

5.3.2 Komplexe Mischungen

Um das Verteilungsverhalten realer Protein-Mischungen in AMTPS zu untersuchen, diente u.a. ein Protein-Isolat aus Soja-Bohnen (vgl. Kapitel 4.2.3), welches freundlicher Weise von der Firma Solae (Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt wurde. Interessant sind vor allem die Ergebnisse, welche mit dem AMTPS Aethoxal B gewonnen wurden. Hierzu wurden 100 mg einer 10%-igen, wässrigen Proteinlösung mit Tensid und Puffer auf 1 g aufgefüllt und auf 30 °C temperiert, so dass sich ein Phasenverhältnis von ca. $R = 1$ einstellte. Um den Einfluss des Puffers zu untersuchen, wurden in einem Experiment 6 verschiedene, gängige biotechnologische Puffer verwendet. Die Konzentrationen betragen zwischen 20 und 50 mM. Abbildung 5-23 zeigt die gefundenen Ergebnisse anhand eines Elektrophorese-Gels.

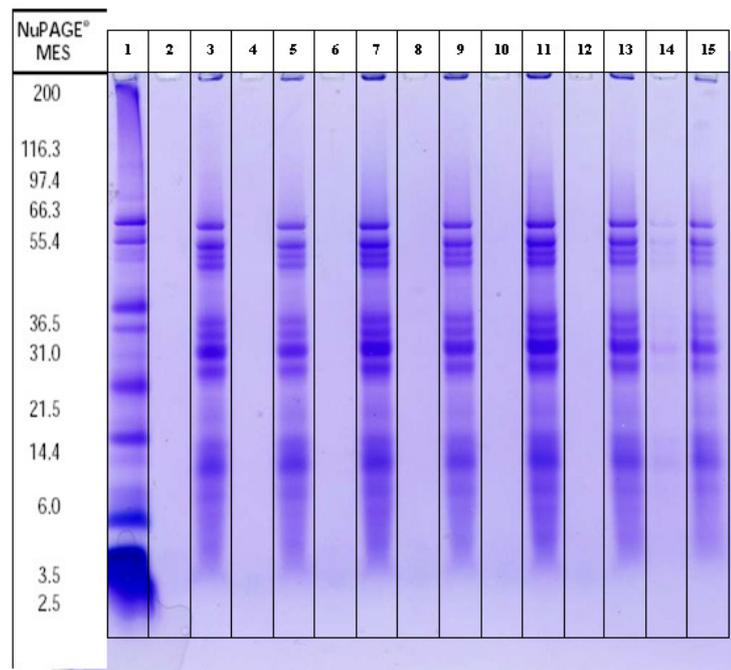


Abbildung 5-23: Coomassie Blue® gefärbtes SDS-PAGE Gel mit Verteilungsergebnissen von Soja ISP HXP 96 in Aethoxal B AMTPS und sechs verschiedenen Puffern (Reihe 2 - 13); Reihe 1: Protein-Standard; Reihe 14 und 15: Soja-Standard-Lösungen

Hierbei befinden sich in den geradzahligen Bahnen jeweils Proben der mizellreichen Phase, rechts daneben solche der wässrigen Phase (Reihe 2 bis 13). Reihe 1 zeigt eine „Protein-leiter“, die Reihen 14 und 15 beinhalten Soja Lösungen mit um den Faktor 10 unterschiedlichen Protein-Konzentrationen. Puffer waren (i) kein Puffer (ii) Acetat Puffer, pH 4,7 (iii)

NaPhosphat, pH 6,8 (iv) McIlvaine's⁹ Buffer, pH 7,2 (v) MOPS, pH 7,2 (vi) HEPES, pH 7,5. Es wird deutlich, dass, unabhängig vom Puffer, keine Proteine in der mizellreichen Phase nachgewiesen werden können. Auch eine anschließende Silberfärbung des Gels machte keine Proteinspuren sichtbar. Die Verteilungskoeffizienten aller Proteine sind demnach kleiner als $K < 0,1$, welcher mit den Reihen 14 und 15 nachgestellt wurde, und den Ergebnissen der Silberfärbung nach wohl auch kleiner als $K < 0,01$. Das im vorangegangenen Kapitel anhand der Proteine GFP und Lysozym nachgewiesene extreme Verteilungsverhalten in Aethoxal B AMTPS lässt sich demnach auf eine Reihe weiterer Proteine übertragen.

Für das AMTPS Triton X-114 war das experimentell gefundene Verhalten nicht so extrem, es ließen sich aber auch hier keine Bevorzugungen einzelner Proteine aus der Soja-Mischung in die mizellreiche Phase feststellen.

5.4 Gleichgewicht der Proteinadsorption

5.4.1 Einzelstoff-Adsorption und Elution

5.4.1.1 Adsorptionsisothermen

Um durch Kombination von AMTPS und magnetischen Mikrosorbentien magnetische Extraktionsphasen herzustellen, muss, neben dem Verteilungsverhalten der Partikel (Kapitel 5.1), zunächst das Adsorptionsverhalten von Proteinen auf den Sorbentien hinsichtlich der Kapazität und Selektivität für das Zielprotein charakterisiert werden. Hierzu dient in aller Regel die Bestimmung von Sorptionsisothermen. Werden die erhaltenen experimentellen GGW-Daten mittels der Langmuir-Gleichung (Kapitel 3.4.1) angepasst, kann die Kapazität durch den Parameter q_{\max} , d.h. der maximal erreichbaren Oberflächenbeladung, beschrieben werden. Die Ursprungssteigung der Isotherme q_{\max} / K_L dient als Maß für die Bindungsstärke der Adsorption. Vergleicht man die Ursprungssteigungen der Sorptionsisothermen zweier Proteine, wird das mit der steileren Steigung bevorzugt. Abbildung 5-24 zeigt die experimentell ermittelte Isotherme von Lysozym auf der Partikelcharge KA_JSB-04. Die Anpassung der Messwerte an die Langmuir-Gleichung mittels nichtlinearer Regression ergab die Parameter $q_{\max} = 65 \text{ mg/g}$ und $K_L = 2,8 \text{ mg/L}$. Dies entspricht einer Ursprungssteigung von $q_{\max} / K_L = 23,2 \text{ L/g}$. Das im gewählten Modell konkurrierende Protein Ovalbumin zeigte auf dieser Partikelcharge keine messbare Adsorptionsneigung. In Langmuir-Parametern ausgedrückt bedeutet dies entweder $q_{\max} = 0 \text{ mg/g}$ oder $K_L \rightarrow \infty \text{ L/g}$.

⁹ McIlvaine's Buffer: 16,4 mM Na₂HPO₄ und 1,82 mM Zitronensäure bei pH 7,2 [Rangel-Yagui 2004]

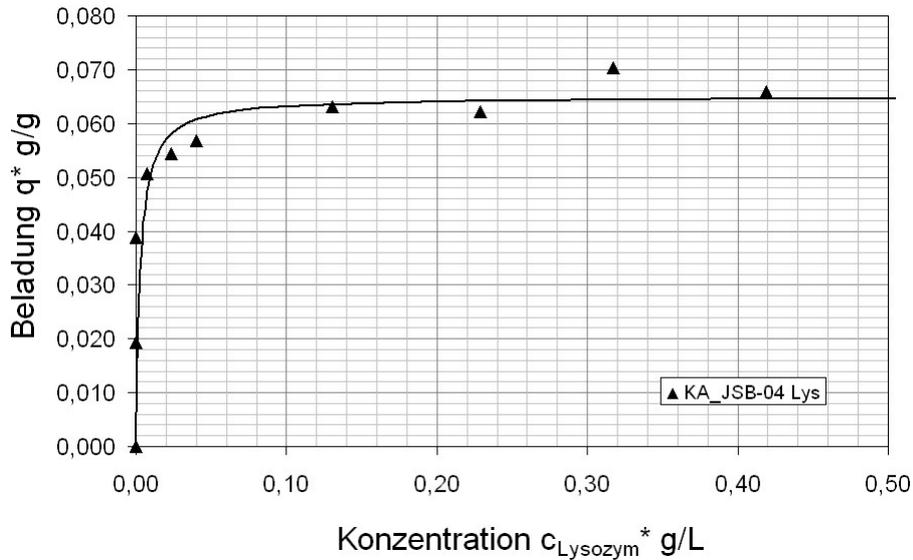


Abbildung 5-24: Adsorptionsisotherme von Lysozym aus Hühnereiweiß auf nach Kapitel 4.3.3 funktionalisierte Kationenaustauscher in 20 mM NaPhosphatpuffer, pH 6,8

Diese Partikelcharge zeigte, neben einer mittleren Kapazität und hohen Selektivität für das Zielprotein (=Lysozym), ein positives Verteilungsverhalten in Triton X-114 AMTPS und wurde daher in späteren MEP-Laborversuchen eingesetzt (\rightarrow Kapitel 5.5.1). Weiterführende Arbeiten zur Herstellung von größeren Partikelchargen zur Übertragung des Verfahrens in einen größeren Maßstab, erwiesen sich trotz Verwendung eines analogen Protokolls als schwierig. Abbildung 5-25 zeigt exemplarisch Isothermen für verschiedene, in weiteren Funktionalisierungsversuchen erhaltene Chargen.

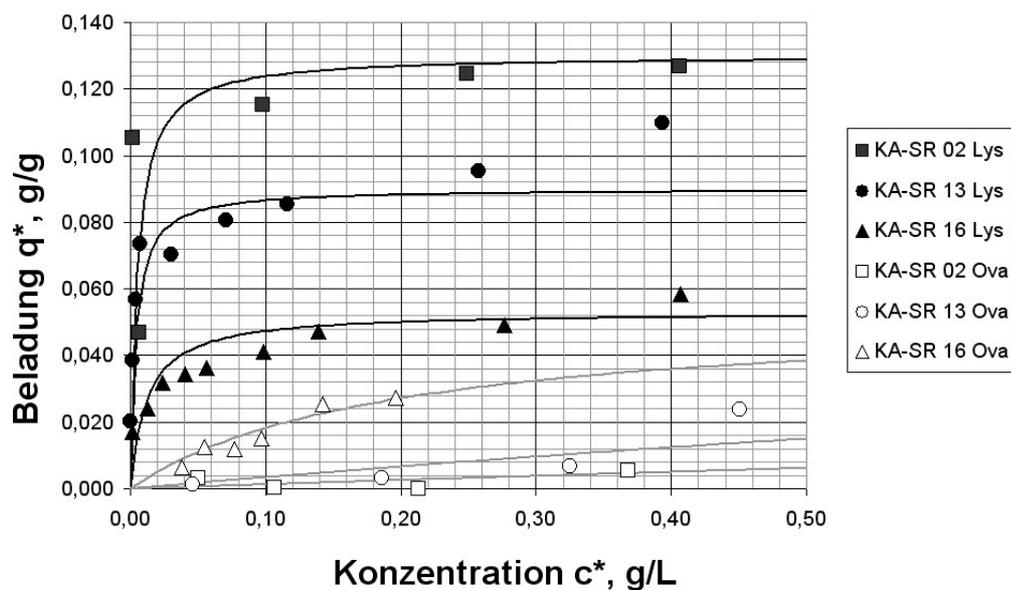


Abbildung 5-25: Adsorptionsisothermen von Lysozym und Albumin aus Hühnereiweiß auf nach Kapitel 4.3.3 funktionalisierte Kationenaustauscher in 20 mM NaPhosphatpuffer, pH 6,8

Die Größe der Reaktionsansätze variierte hierbei maximal um den Faktor 10 (zwischen 25 mg und 250 mg Partikel pro Charge). Die Ergebnisse streuen unsystematisch, was wohl auf

Unzulänglichkeiten im Funktionalisierungsprotokoll zurückzuführen ist. Von besonderer Tragweite für den MEP-Prozess ist der Umstand, dass zwischen dem Adsorptionsvermögen der Kationenaustauscher und dem Partitioning der Partikel in AMTPS der Zusammenhang derart gestaltet erscheint, dass Partikel mit zu hoher Kapazität in der Regel nicht verwendbar sind, da sie nicht in die mizellreiche Phase tendieren (vgl. hierzu Kapitel 5.1). Von den drei in Abbildung 5-25 gezeigten Partikelchargen tendiert nur die Charge KA_SR-16, also die mit der geringsten Kapazität (und Selektivität) für Lysozym, in die mizellreiche Phase. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass zu viele Ladungen auf der Oberfläche die Partikel zu hydrophil für die Koazervatphase von AMTPS werden lassen, d.h. die elektrische Selbstenergie der Partikel dominiert und sie die Umgebung mit der größten Dielektrizitätskonstante suchen. Unterschiede in der Anzahl der Ladungen können zum einen durch verschiedene Belegungsgrade der Oberfläche, aber auch durch unterschiedliche Längen der Polyacrylsäureketten kommen.

Die hohe Selektivität bei mittlerer Kapazität kombiniert mit der Anreicherung in der Koazervatphase bei der Charge KA_JSB-04 (Abbildung 5-24) spricht für eine hohe Ligandendichte mit kurzer Kettenlänge. Ähnlich verhält sich, jedoch mit geringerer Selektivität, die Charge KA_SR-16 (Abbildung 5-25), was auf eine geringe Ligandendichte mit großer Kettenlänge hindeutet. Die Charge KA_SR-02 (ebenfalls Abbildung 5-25) müsste demnach eine hohe Ligandendichte mit langer Kettenlänge aufweisen, denn diese Partikel sind selektiv, reichern sich aber in der wässrigen Phase des Triton X-114 AMTPS an. Um die angedeuteten Zusammenhänge in Zukunft weiter aufzuklären, sollten weitere Charakterisierungsmethoden der Partikeloberflächen zum Einsatz kommen, wie z.B. ζ -Potential- oder TOF-SIMS¹⁰ Messungen. Auch die Partikelgrößenverteilung spielt eine Rolle, denn kleinere Partikel können auch mit schlechteren Funktionalisierungsgraden höhere Kapazitäten erreichen, bedingt durch die größere spezifische Oberfläche. Von größter Wichtigkeit ist aber hier die Weiterentwicklung des Funktionalisierungsprotokolls, um neben einer kontrollierteren Reaktionsführung auch Methoden für die möglichst optimale Vor- und Nachbehandlung der Partikel zu erreichen. Nur durch reproduzierbar einstellbare Partikeleigenschaften ließen sich weitergehende, systematische Untersuchungen auf ein sicheres Fundament stellen.

Neben den oben gezeigten Kationenaustauschern zeigten auch andere untersuchte Arten von Liganden vielversprechende Ergebnisse. Abbildung 5-26 zeigt Adsorptionsisothermen von Ovalbumin auf hydrophobisierte M-PVA Beads (HI_JSB-02 0 bis c).

¹⁰ Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy

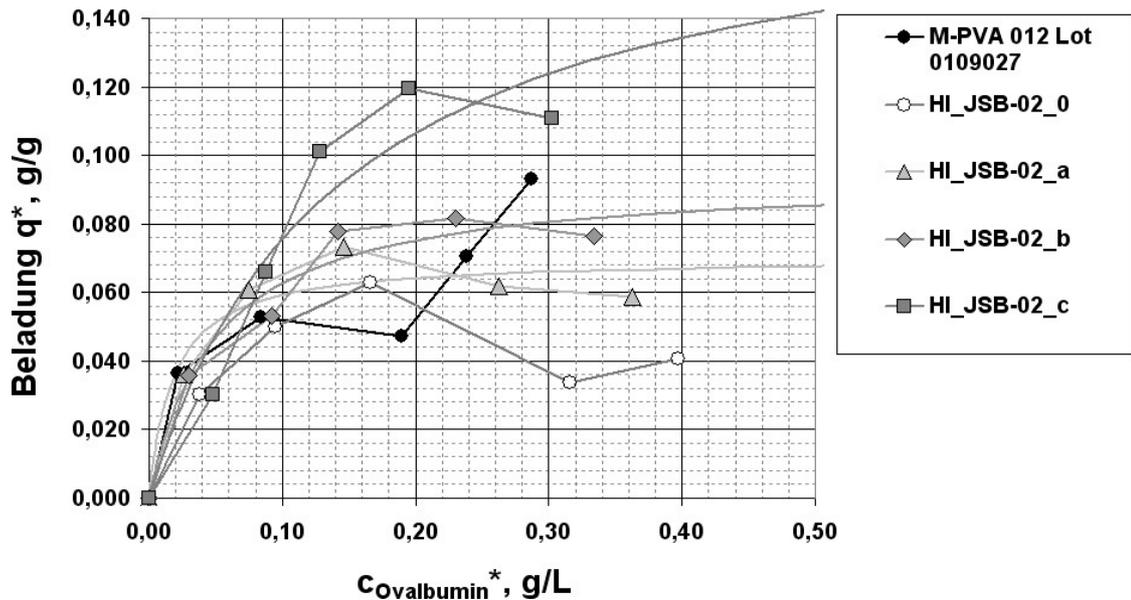


Abbildung 5-26: Adsorptionsisothermen von Albumin aus Hühnereiweiß auf nach Kapitel 4.3.2 funktionalisierte hydrophobe Partikel in 20 mM NaPhosphat, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 6,8

Der Index 0 bezeichnet hierbei eine Charge, die zwar den Reaktionsbedingungen (d.h. Lösemittel THF und Temperatur von 60°C) unterzogen wurde, bei der aber kein Ligand zur Reaktionsmischung zugegeben wurde. Der Anteil an zugefügtem Ligand wurde zwischen den Chargen a bis c sukzessive erhöht. Zunächst fällt in Abbildung 5-26 eine nicht zu vernachlässigende Adsorption des Proteins auf den Basispartikeln (M-PVA 012 Lot 0109027) auf, welche mit hoher Ursprungssteigung zunächst abflacht und anschließend wieder ansteigt, wie es für eine Mehrschichtadsorption typisch ist (vgl. BET-Isotherme, [Sontheimer 1985]). Die Charge HI_JSB-0 zeigt ähnliches Verhalten, wenngleich auf niedrigerem Niveau, und das obwohl diese Charge aufgrund der Reaktionsbedingungen mit THF mit einem inerten Lösungsmittel „gewaschen“ wurde. Mit steigendem Ligandenanteil steigt die Adsorptionskapazität, aber die Affinität (entsprechend der Ursprungssteigung) sinkt. Ebenso weisen alle ermittelten Isothermen ein Maximum in der Kapazität auf. Es scheint, dass das Langmuir-Modell aufgrund komplexerer Zusammenhänge hier nicht zu einer treffenden physikalischen Interpretation führen kann. Festzuhalten bleibt aber, dass die Basispartikel gerade für hydrophobe Wechselwirkungen als anfällig erscheinen, was bei der Aufarbeitung realer Zuläufe zu Problemen durch eine hohe Hintergrundbindung führen kann. Die Unterschiede in der Adsorptionsneigung zwischen Basispartikeln, gewaschenen und funktionalisierten, können an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Ein weiterer getesteter Ansatz betraf die Bindung von Proteinen durch Metall-Chelatbildner als Liganden. Die Probleme im Umgang mit Immino-Diessigsäure (IDA) als Ligand wurden in Kapitel 5.1 dargelegt, nämlich das unkontrollierbare Verteilungsverhalten in AMTPS. Aus diesem Grund wurde das Funktionalisierungsprotokoll für Kationenaustauscher adaptiert und

die darin verwendete Acrylsäure durch Vinyl-Imidazol ersetzt. Die so erhaltenen Partikel wurden mit Kupfersulfat beladen und die Isotherme für 6xHIS tagged GFP aus *E.Coli* als Modellprotein bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigt Abbildung 5-27.

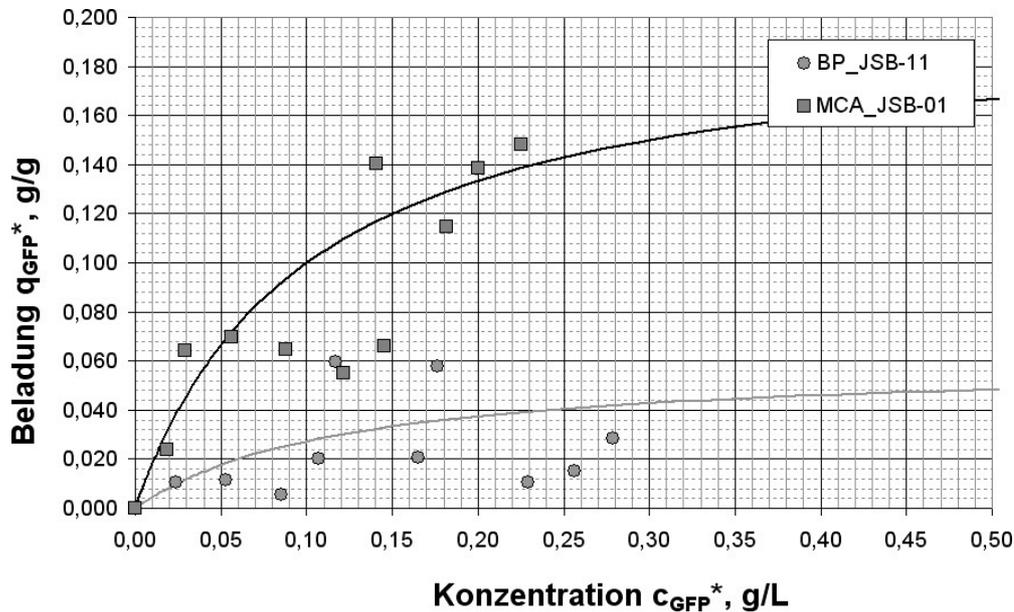


Abbildung 5-27: Adsorptionsisothermen von 6xHIS-tagged GFP aus *E.Coli* auf nach Kapitel 4.3.4 funktionalisierten Metall-Chelatbildner in 20 mM NaPhosphat, 250 mM NaCl, pH 6,8

Auch hier weisen die Basispartikel (Blindprobe, Partikel wurden ebenfalls mit Kupfersulfat beladen) eine nennenswerte Kapazität auf. Die Kapazität der funktionalisierten Charge übertrifft diese jedoch bei weitem, was für eine erfolgreiche Funktionalisierung spricht. Allerdings sprechen die teils erheblichen Abweichungen für Inhomogenitäten in der produzierten Partikelcharge und/oder Stabilitätsprobleme derselben. Da das Partitioning der Partikel in Triton X-114 erfolgreich war (vgl. Abbildung 5-5, Seite 120), könnten diese Partikel durch Verbesserungen des Funktionalisierungsprotokolls in Zukunft zu brauchbaren MEP-Systemen führen. In dieser Arbeit endete der Einsatz dieser Partikel an dieser Stelle und alle weiteren Arbeiten wurden mit dem bevorzugten System Kationenaustauscher – Triton X-114 durchgeführt.

Weitere Funktionalisierungsversuche (Kapitel 4.3.6) erbrachten keine Sorbentien mit nennenswerten Adsorptionskapazitäten, weshalb auf eine Darstellung der Ergebnisse an dieser Stelle verzichtet wird.

5.4.1.2 Elutionsversuche

Im Falle der verwendeten Kationenaustauscher sollte die Elution der Zielmoleküle durch Anwendung hoher Ionenstärken herbeigeführt werden, was hier schlicht durch die Zugabe von 0,5 M NaCl zum Bindepuffer versucht wurde. Hierzu wurde eine kleine Menge Partikel (Charge KA_JSB-04) mit Lysozym bis fast zur Sättigung beladen ($q / q_{max} \approx 0,92$). Diese

Menge wurde nun aufgeteilt und ein Teil zweimal mit Elutionspuffer, der andere zweimal mit Bindepuffer behandelt. Die Ergebnisse in Form der Wiederfindungsraten bzw. der Elutionseffizienzen zeigt Abbildung 5-28.

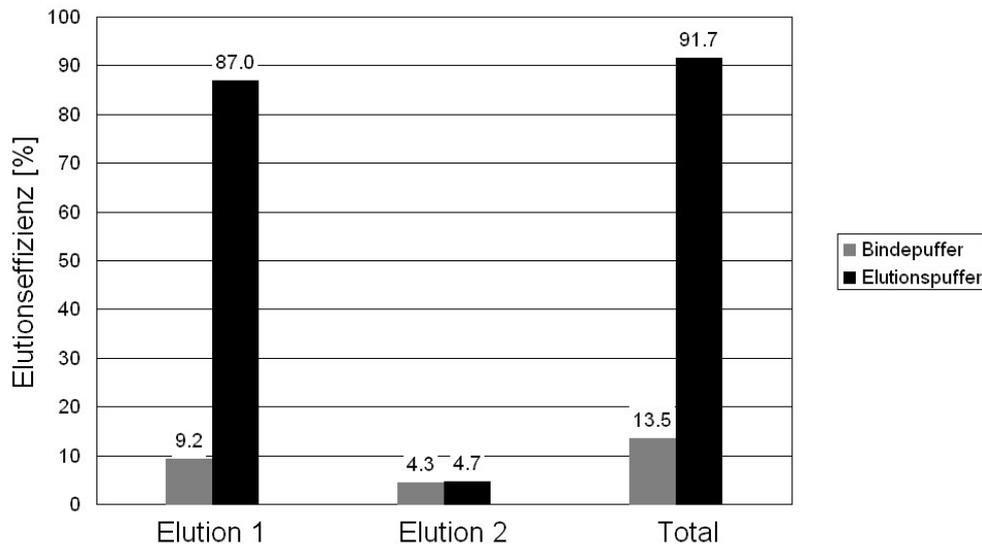


Abbildung 5-28: Ergebnisse bei der Elution von Lysozym von Hühnereiweiß von magnetischen Kationenaustauschern (KA_JSB-04)

Es wird ersichtlich, dass durch den Einsatz von 0,5 M NaCl nahezu 90% des Lysozyms in einem Schritt abgelöst werden können, was für die weiteren Zwecke als ausreichend erachtet wurde.

5.4.1.3 Temperatureinfluss auf die Lage des Adsorptionsgleichgewichts

Da im vorgestellten MEP-Prozess-Schema (Abbildung 2-14, Seite 35) einige der Prozessschritte auf unterschiedlichen Temperaturniveaus erfolgen, wurde der Temperatureinfluss auf die Adsorption durch das Erstellen zweier Adsorptionsisothermen von Lysozym an ein und dieselbe Charge Kationenaustauscher bei 20°C und 30°C untersucht [Raffelt 2008]. Die Werte der erhaltenen Langmuir-Parameter betragen (Partikelcharge KA_SR-15):

- 20°C: $q_{\max} = 40 \text{ mg/g}$; $K_L = 0,004 \text{ g/L}$
- 30°C: $q_{\max} = 42 \text{ mg/g}$; $K_L = 0,004 \text{ g/L}$

Die so erhaltenen Ergebnisse sind praktisch identisch, womit von einem vernachlässigbaren Einfluss der Temperatur auf das hier vorliegende System im relevanten Temperaturbereich ausgegangen werden kann.

5.5 MEP: Bioseparation unter Einsatz magnetischer Extraktionsphasen

5.5.1 Arbeiten im Labormaßstab

5.5.1.1 Separation der Modellproteine Lysozym und Ovalbumin

Zur Untersuchung der Gleichgewichtslage der im MEP-Prozess vorgesehenen Kombination aus Adsorption und Extraktion wurden magnetische Kationenaustauscher zusammen mit einem AMTPS aus dem nichtionischen Tensid Triton X-114 und Wasser eingesetzt. Als Modellproteine dienten Lysozym und Ovalbumin, wobei Lysozym mit seiner positiven Nettoladung beim gewählten pH-Wert von 6,8 als Zielprotein galt. In einem nach Abbildung 4-21 (Seite 112) durchgeführten Laborversuch (ohne Elution) kam eine Mischung beider Proteine mit je 0,1 g/L Endkonzentration zum Einsatz. Als Adsorbentien dienten Partikel der Charge KA_JSB-04 (siehe auch Abbildung 5-24, Seite 139) mit Konzentrationen zwischen 0 und 4 g/L. Das Phasenverhältnis R hatte bei der Temperatur $T = 30^{\circ}\text{C}$, einem Tensidgehalt von 2,5% (w/w) und dem gewählten Puffer (BiKA, vgl. Kapitel 4.4) einen Wert von 4,29. Die nach erfolgter Phasentrennung erhaltenen (wässrigen) Oberphasen wurden mittels Gelelektrophorese (mit anschließender quantitativer densitometrischer Auswertung) analysiert (siehe Abbildung 5-29).

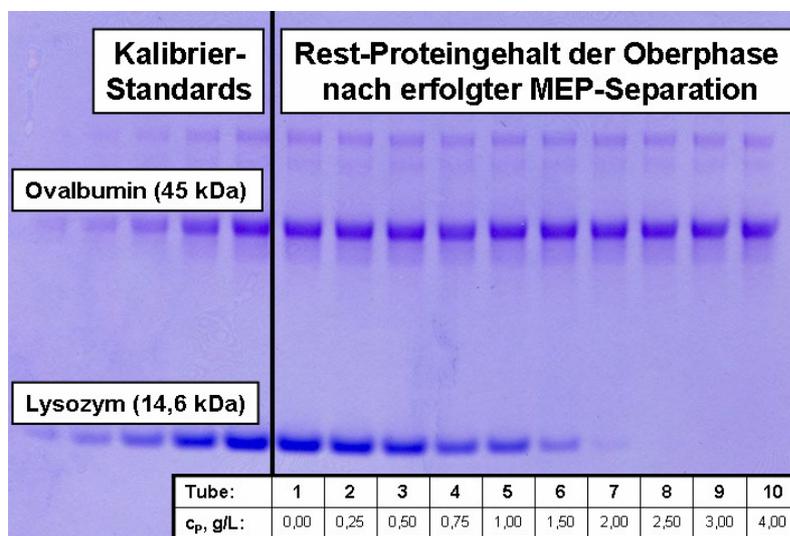


Abbildung 5-29: Coomassie Blue® gefärbtes SDS-PAGE Gel mit (v.l.n.r.) fünf Kalibrierstandards sowie zehn Proben der jeweils wässrigen Phasen aus MEP-Versuchen mit Lysozym und Ovalbumin bei steigendem Partikelgehalt c_p

In Abbildung 5-29 ist die erwartete Abreicherung des Zielproteins Lysozym mit steigendem Partikelgehalt deutlich erkennbar, ebenso der Verbleib des Nicht-Zielproteins Ovalbumin in der wässrigen Phase. Um die so erhaltenen Messwerte darzustellen und zu interpretieren, wird im folgenden angenommen, dass alles, was sich nicht in der wässrigen Phase nachweisen lässt, sich in der mizellreichen Phase befindet. Zur Berechnung von Ausbeute und Reinheit

dienen Gl. 3.5-29 und Gl. 3.5-30 (Kapitel 3.5.3), welche auf der Grundannahme einer möglichen vollständigen Elution beruhen. Ferner kommen zur theoretischen Vorhersage der Gleichgewichtslage die beiden in Kapitel 3.5 eingeführten hypothetischen Mechanismen „synchrones“ und „sukzessives“ Gleichgewicht, in der für Zweistoffsysteme abgeleiteten mathematischen Form (Kapitel 3.5.2), zum Einsatz. Zur Berechnung der Ausbeute dient Gleichung 4.9-01 (Kapitel 4.9) unter Verwendung der jeweiligen Proteinkonzentration in der Oberphase c_T . Desweiteren fließen folgende Werte in die Berechnung ein: (i) die Verteilungskoeffizienten $K_{Lys} = 1,53$ und $K_{Ova} = 2,72$ (ii) die Startkonzentrationen $c_{Lys,0} = c_{Ova,0} = 0,1$ g/L; (iii) die Isothermenparameter¹¹ $q_{max,Lys} = q_{max,Ova} = 65$ mg/g, $K_{L,Lys} = 2,8$ mg/L, $K_{L,Ova} = 100$ g/L; (iv) das Phasenverhältnis $R = 4,29$ und (v) die jeweilige Partikelkonzentration c_P in g/L. Abbildung 5-30 stellt die experimentell¹² und theoretisch erhaltenen Werte gemeinsam dar.

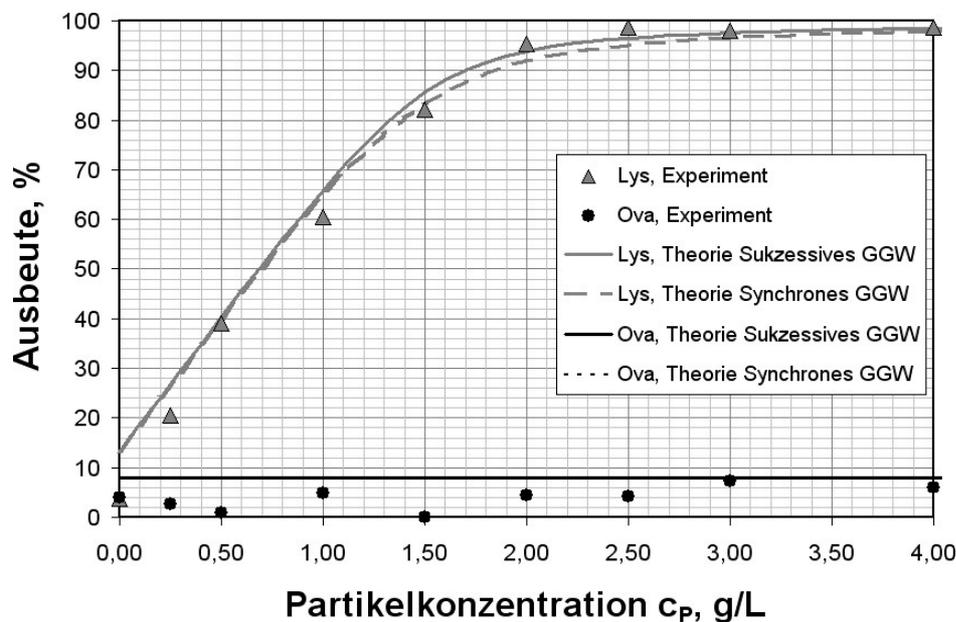


Abbildung 5-30: Experimentell gefundene und theoretisch vorhergesagte Ausbeuten an Lysozym und Ovalbumin in der mizellreichen Phase des MEP-Systems Triton X-114 + Magnetische Kationenaustauscher KA_JSB-04 als Funktion der Partikelkonzentration c_P

Wie in Abbildung 5-30 ersichtlich ist, unterscheiden sich die beiden hypothetischen Mechanismen für die GGW-Einstellung in ihrer Vorhersage kaum, was an dem Verteilungs-

¹¹ Ein hypothetischer Wert für $K_{L,Ova}$ von 100 g/L wurde gewählt, um der experimentell gefundenen Nicht-Adsorbierbarkeit des Ovalbumins auf die verwendeten Partikel Rechnung zu tragen. Für q_{max} wird jeweils der für das Zielprotein gefundene Wert eingesetzt, da angenommen wird, dass der Platz auch der Verunreinigung zur Verfügung steht; die Selektivität geht also nur über die Langmuir-Konstante K_L in die Berechnung ein.

¹² Die Ergebnisse für $c_P = 0,75$ g/L werden aufgrund starker Abweichungen von der Betrachtung ausgeklammert.

koeffizient von Lysozym liegt, der mit einem Wert von 1,53 nahe bei 1 liegt. Beide Mechanismen sagen den experimentell gefundenen Verlauf jedoch mit guter Genauigkeit voraus. Es können für Partikelkonzentrationen $> 2,5$ g/L mehr als 98% des eingesetzten Lysozyms in die mizellreiche Phase überführt werden, ohne Partikel waren es nur ca. 12%. Die Ovalbumin-Ausbeute liegt für alle Partikelkonzentrationen sogar noch unter der theoretisch erwarteten Ausbeute von 8%. Hier liegen die zum Teil erheblichen Schwankungen der experimentellen Werte mit ziemlicher Sicherheit an der Auswertemethode, die eine Differenz großer Zahlen verwendet um eine kleine Zahl zu berechnen, wobei Ergebnisse kleiner als null gleich null gesetzt wurden. Für die Ovalbumin-Ausbeute lässt sich trotzdem ein leichter Anstiegstrend mit steigendem c_P erahnen.

Eine Umrechnung des gefundenen Verteilungsverhaltens in Reinheiten (Annahme auch hier: vollständige Elution), mit der Definition des Aufreinigungsfaktors als Quotient aus Anfangs- und Endreinheit, führt zur Darstellung in Abbildung 5-31 (zusätzlich wurde das Produkt aus Ausbeute und Reinheit dargestellt, als GGW-Mechanismus wurde der „Sukzessive“ gewählt).

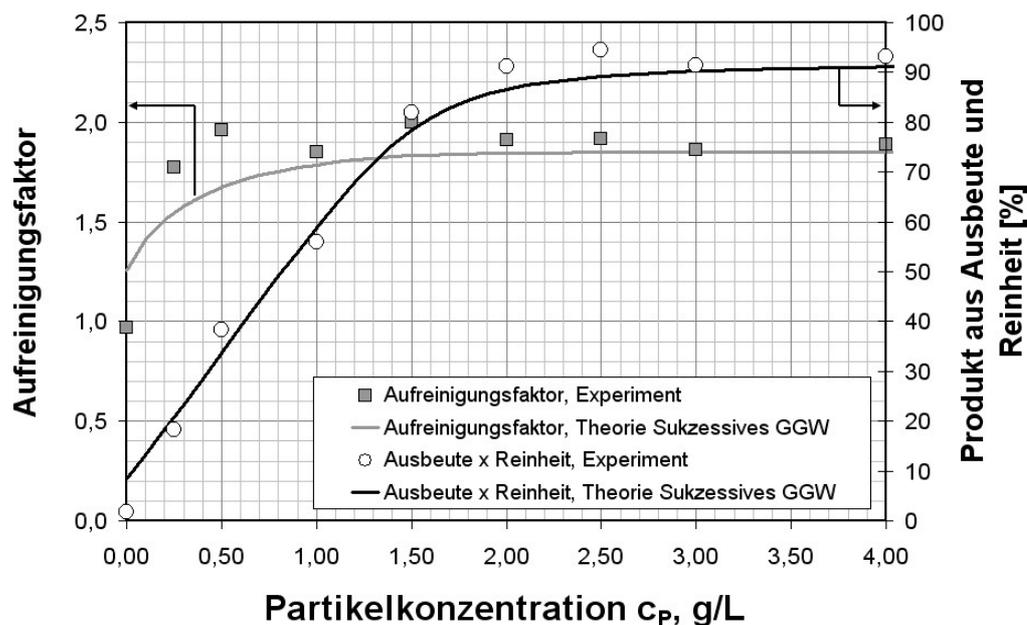


Abbildung 5-31: Experimentell gefundene und theoretisch vorhergesagte Aufreinigungsfaktoren sowie das Produkt aus Ausbeute und Reinheit für Lysozym und Ovalbumin im MEP-System Triton X-114 + magnetische Kationenaustauscher KA_JSB-04 als Funktion der Partikelkonzentration c_P

Der maximal mögliche Aufreinigungsfaktor von 2 wird in einigen Fällen nahezu, in den Fällen mit $Y_{Ova} = 0$ sogar absolut, erreicht. Der scheinbare Maximumsverlauf im Aufreinigungsfaktor, welcher sich auch im Produkt aus Ausbeute und Reinheit leicht verschoben ausmachen lässt (derartige Zusammenhänge werden bei [Ebner 2006] ausführlich diskutiert), deutet auf eine leicht zunehmende Adsorption des Ovalbumins bei hohen Partikelkonzentrationen hin. Theoretisch wird dieses Maximum hier nicht wiedergegeben, da die Isothermenparameter 100%-ige Selektivität voraussagen.

Insgesamt treffen die Vorhersagen, auch bei der hier gegebenen Ununterscheidbarkeit von synchronem und sukzessivem Gleichgewicht, das Separationsverhalten bezüglich des Zielproteins Lysozym sehr gut. Bei den Werten für den Aufreinigungsfaktor ergeben sich durch Schwankungen der Messwerte des Ovalbumins zum Teil deutliche Abweichungen im Bereich kleiner Partikelkonzentrationen.

5.5.1.2 Elutionsversuche

In einem weiteren Versuch wurde das in Abbildung 4-21 (Seite 112) gezeigte Schema bis zur Elution durchgeführt, wobei in einer Probe nur magnetische Adsorbentien (MA), in einer das AMTPS und in einer dritten die Kombination beider, also die magnetischen Extraktionsphasen (MEP), zum Einsatz kamen. Im Falle des AMTPS und der MEP wurden nach beiden Phasenseparationsschritten jeweils Proben der mizellreichen und der wässrigen Phasen gezogen und analysiert. Die Ergebnisse in Form eines SDS-PAGE Gels zeigt Abbildung 5-32.

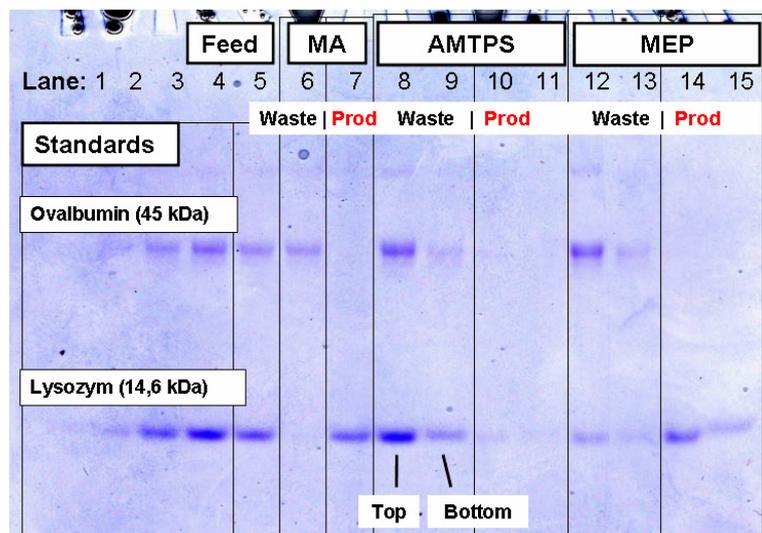


Abbildung 5-32: Adsorptions- und Elutionsversuch von Lysozym und Ovalbumin mittels magnetischer Adsorbentien (MA), AMTPS und MEP

Die Startkonzentration an Protein betrug 0,25 g/L je Protein. Eluiert wurde durch eine Erhöhung des Salzgehalts auf 0,5 M NaCl (EluKA). Für den Fall MA ist die Fraktionierung der Proteine deutlich erkennbar: Der Feed-Strom (Lane 5) enthält beide Proteine, der Waste-Strom (Lane 6) nur Ovalbumin und der Produkt-Strom (Lane 7) nur Lysozym. Im AMTPS ohne Partikel werden beide Proteine entsprechend dem Phasenverhältnis und ihren Verteilungskoeffizienten in der wässrigen Phase (Lane 8) aufkonzentriert, was die Verstärkung der Banden erklärt. Es verbleibt jedoch auch Protein in der mizellreichen Phase (Lane 9). Das verbleibende Protein verteilt sich im Produktschritt wiederum auf die wässrige und die mizellreiche Phase, diesmal jedoch soweit verdünnt, dass praktisch nichts mehr auf diesem Weg nachweisbar ist (Lane 10 und 11).

Im Fall MEP verhält sich das Ovalbumin vergleichbar mit dem Fall AMTPS, das Lysozym taucht jedoch hauptsächlich in der wässrigen Phase des Produktschritts auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Elution aus der Koazervatphase möglich und damit der MEP-Betrieb nach dem in Abbildung 2-14 (Seite 35) gezeigten Schema prinzipiell machbar ist. Da Elutionsgrade um die 90% recht einfach zu erreichen sind (vgl. Kapitel 5.4.1.2), scheint auch eine Wiederverwendbarkeit der Partikel und damit ein zyklischer MEP-Betrieb möglich. Die Tatsache, dass sich auch nach erfolgter Elution eine gewisse Lysozym-Konzentration in der mizellreichen Phase (Lane 15) einstellt liegt an dem Verteilungsverhalten und ist durch den K-Wert vorgegeben. Dieser liegt im Falle des Triton X-114 sowohl im Binde- als auch im Elutionsschritt nahe bei 1 (vgl. Abbildung 5-22, Seite 136).

Würde sich im zyklischen Betrieb direkt an den Elutionsschritt ein erneuter Bindschritt anschließen, verbliebe das Protein im Prozess und könnte wieder gebunden werden. Nur für den Fall eines notwendigen Wasch- bzw. Stripping-Schrittes wäre das in der mizellreichen Phase verbleibende Protein für den Prozess verloren. Jedoch kann durch die entsprechende Wahl des Phasenverhältnisses und damit verbundenem kleinen Volumen der mizellreichen Phase, auch bei unzureichendem Ausschluss des Proteins, eine Optimierung der Ausbeute bzw. eine Begrenzung der Verluste erfolgen.

5.5.1.3 Versuche mit realen Biosystemen

Von den drei in dieser Arbeit näher betrachteten Biosystemen Soja-Protein (Kapitel 4.2.3), Homogenisat von *E.Coli* (Kapitel 4.2.2) und Hühnereiweiß (Kapitel 4.2.1) schieden die beiden Ersteren für systematische Versuche mit MEP-Phasen aus. Für das Soja-Protein und potentielle enthaltene Zielproteine war kein geeigneter Ligand vorhanden. Im Falle des 6xHIS getaggten GFP aus *E.Coli* war zwar mit IDA (siehe Kapitel 4.3.4) ein möglicher Ligand und ebenso gebrauchsfertige Partikel vorhanden, diese zeigten jedoch bei Partitioningversuchen in AMTPS ein unsystematisches und schwer reproduzierbares Verhalten (Kapitel 5.1). Weiterführende Arbeiten zur Synthetisierung von Partikeln mit dem alternativen Liganden Vinyl-Imidazol waren zwar vielversprechend, konnten jedoch nicht bis zur Einsatzreife der Partikel fortgeführt werden.

Experimente zur Übertragung der in Kapitel 5.5.1.1 dargestellten, anhand des Modellsystems Lysozym und Ovalbumin gewonnenen, ermutigenden Ergebnisse auf das korrespondierende reale System Hühnereiweiß blieben jedoch leider ohne Erfolg. Bei den hierzu durchgeführten Laborexperimenten stellte sich bei der Anwendung des Hühnereiweiß (Verdünnung 1:2 bis 1:20 in Bindepuffer) eine Inversion des Verteilungsverhaltens der Partikel ein, d.h. eine Akkumulation der Sorbentien in der mizellreichen Phase fand nicht mehr statt. Welche physikalischen Zusammenhänge diese Inversion hervorriefen, konnte nicht geklärt werden.

Aus diesem Grund wurde beschlossen, die im Folgenden beschriebenen Versuche in vergrößertem Maßstab unter Anwendung des Modellsystems durchzuführen.

5.5.2 Halbtechnischer Maßstab

5.5.2.1 Ergebnisse der Bioseparationsexperimente

Bevor Bioseparationsversuche in dem in Kapitel 4.10 beschriebenen Aufbau durchgeführt werden konnten, wurde die Dauer der einzelnen Prozessschritte anhand der Ergebnisse einfacher Vorversuche zu den erreichbaren Heiz- und Kühlraten sowie den Phasenseparationszeiten [Raffelt 2008] festgelegt (siehe auch Tabelle 4-4, Seite 115). Obwohl in keinem Versuch innerhalb der vorgegebenen 20 min eine vollständige Klärung der wässrigen Oberphase erreicht werden konnte, wurde diese Dauer als ausreichend angesehen, da (i) praktisch alle Partikel bereits vorher abgeschieden werden konnten und (ii) aus Laborversuchen bekannt war, dass deutlich sichtbare Trübungen nicht zwangsläufig mit hohen Gehalten an mizellreicher Phase einhergehen (siehe dazu auch Kapitel 5.2.2.2). Abbildung 5-33 zeigt Fotografien eines im 200 mL Maßstab durchgeführten Experiments, wobei die Phasenseparation für 20 min im angeschalteten Magnetfeld erfolgte. Die verbleibende Rest-Trübung der Oberphase ist hier deutlich erkennbar, jedoch keine Braunfärbung, wie sie von verbleibenden Partikeln hervorgerufen würde. Die tatsächlichen Verluste an Tensid wurden durch Beprobung und Analysen der wässrigen Phase ermittelt, wie es im Folgekapitel (Kapitel 5.5.2.2) diskutiert wird.

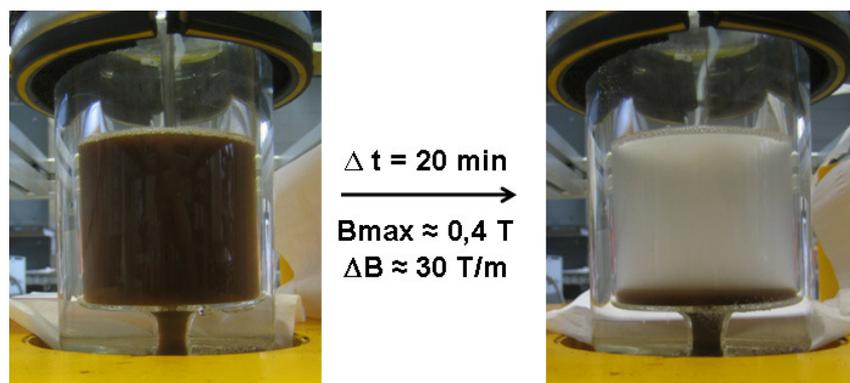


Abbildung 5-33: Fotografien eines zunächst durchmischten und dann nahezu vollständig separierten MEP-Systems im Technikumsversuch. $V = 200 \text{ mL}$, Triton X-114 – AMTPS + magnetische Kationenaustauscher (2 g/L)

Um die Performance des Prozesses bezüglich der Proteinfractionierung zu beurteilen, wurden die Proben der wässrigen Oberphase ebenfalls auf die Gehalte an Lysozym und Ovalbumin hin analysiert und deren Konzentrationen mittels Gelelektrophorese quantitativ bestimmt. Als Sorbentien kamen für den im Folgenden beschriebenen, über drei komplette Zyklen geführten Versuch magnetische Kationenaustauscher der Charge KA_SR-16 (siehe auch Abbildung

5-25, Seite 139) zur Anwendung. Diese Partikel besitzen nur eine moderate Selektivität für Lysozym, waren aber die einzige in der benötigten Menge von 400 mg Partikeln vorliegende Charge mit günstigem Verteilungsverhalten in einem Triton X-114 AMTPS. Diese Partikel wurden mit einer Konzentration von 2 g/L eingesetzt, die beiden Proteine jeweils mit 50 mg/L. Tabelle 5-1 fasst die für die Durchführung und mathematische Modellierung des Versuchs relevanten Parameter zusammen.

Tabelle 5-1: Für die Modellierung des mehrzyklischen Technikumsversuchs relevante Prozessparameter

	$q_{\max, X}$	$q_{\max, Y}$	$K_{L, X}$	$K_{L, Y}$	K_X	K_Y	$c_{0, X}$	$c_{0, Y}$	R	c_P
	g/g	g/g	g/L	g/L	-	-	g/L	g/L	-	g/L
Bindung (Waste)	0,053	0,053	0,012	0,19	1,53	2,72	0,05	0,05	9,0	2
Elution (Produkt)	0,053	0,053	100	100	1,58	2,72 ¹³		-	14,8	2

Die Phasenverhältnisse R wurden aus den in Abbildung 5-9 (Seite 123) gezeigten Binodalcurven für $T = 30^\circ\text{C}$ und $w_{\text{Tensid}} = 1,33\%$ (w/w) berechnet. Die Unterschiede ergeben sich durch den zur Elution benötigten Salzgehalt, der zudem die Einstellung einer Desorptionstemperatur von 15°C erforderte, um die Einphasigkeit des Systems zu erreichen (der Adsorptionsschritt erfolgte bei 20°C). Der Punkt im Phasendiagramm für 15°C und $1,33\%$ (w/w) liegt zwar knapp innerhalb des Zweiphasengebiets, wies aber im Versuch keinen Phasenerfall auf.

Die theoretische Berechnung der Proteinmengen in den wässrigen Phasen erfolgte mittels der Annahme einer sukzessiven Einstellung der Gleichgewichte von kombinierter Adsorption und Extraktion sowie den Gleichungen für Zweistoff-Systeme (siehe Kapitel 3.5.2). Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde die Darstellung im Balkendiagramm gewählt, wobei die Balken den Messwerten und die zusätzlich eingetragenen Dreiecke den theoretisch vorhergesagten Werten entsprechen. Zur Berechnung der Elution wurde von 100%-iger Elution ausgegangen (erreicht durch Setzen der Langmuir-Parameter K_L auf 100 g/L, siehe Tabelle 5-1), wobei das sich einstellende Verteilungsgleichgewicht innerhalb des AMTPS berücksichtigt wurde, d.h. die Annahme einer 100%-igen Elution von den Partikeln nicht gleichbedeutend mit einer vollständigen Wiederfindung des desorbierten Proteins in der wässrigen Phase ist. Abbildung 5-34 zeigt die auf diesem Weg theoretisch vorhergesagten Werte

¹³ Geschätzter Wert. Aufgrund der hohen Tensid- und geringen Proteinkonzentration blieben Versuche zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Ovalbumin unter Elutionsbedingungen (vgl. Kapitel 5.3.1 und Kapitel 9.2) ohne Erfolg.

gemeinsam mit den im ersten Zyklus erhaltenen experimentellen Werten im Balkendiagramm. Zusätzlich dazu sind die Zahlenwerte in tabellarischer Form aufgeführt.

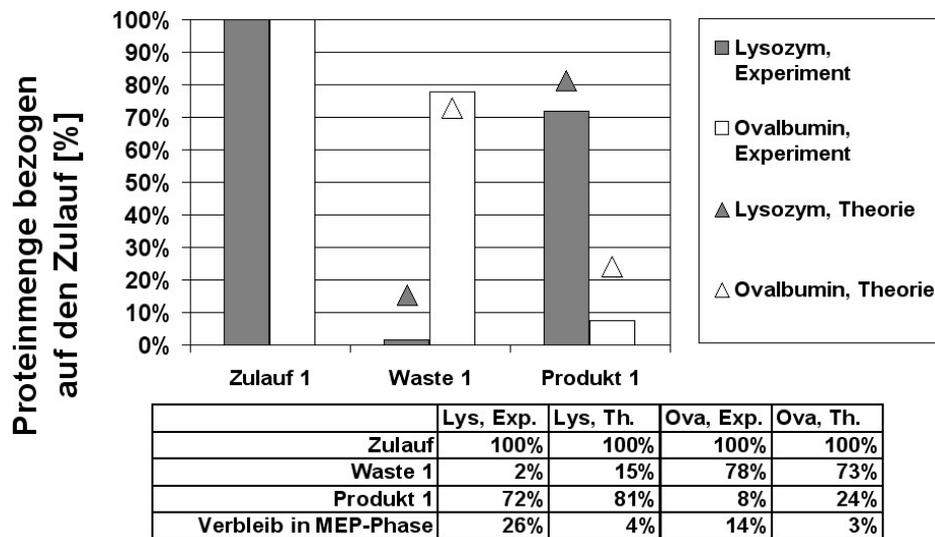


Abbildung 5-34: Experimentell erhaltene und theoretisch vorhergesagte Werte der Proteinfractionierung innerhalb des ersten Zyklus des MEP-Versuchs im 200 mL-Maßstab

Die Ergebnisse zeigen, dass die theoretischen Werte zwar die Größenordnung und relative Lage der experimentellen Ergebnisse vorhersagen, bei den Zahlenwerten jedoch zum Teil stark abweichen. So ist die aus dem Zulauf entfernte Menge Lysozym zwar größer als erwartet, trotzdem trifft der Wert im Produktstrom die Erwartung recht gut. Im Fall des Ovalbumins wird etwa der erwartete Anteil in die mizellreiche Phase aufgenommen, aber nicht im Elutionsschritt zurückgewonnen. Die Tatsache, dass die Aufnahme von Lysozym besser als berechnet ist, kann an falschen, dem Berechnungsmodell zu Grunde liegenden, Annahmen liegen, z.B. der angenommenen Konkurrenz der Proteine um die gleichen Sorptionsplätze (siehe dazu Kapitel 3.5.2). Aufgrund des niedrigen pI-Werts von Ovalbumin ist eine Adsorption an die negativ geladenen Polyacrylsäureketten praktisch auszuschließen, dieses Protein wird vermutlich eher an unfunktionalisierte Bereiche der Partikeloberfläche adsorbieren. Im Gegensatz dazu kann das Lysozym prinzipiell sowohl an funktionalisierte als auch an unfunktionalisierte Bereiche adsorbieren¹⁴. Zu weiteren Abweichungen zwischen Theorie und Realität führen die zum Teil in den nächsten Schritt verschleppten Reste der wässrigen Phase, falls diese nicht vollständig abgesaugt werden konnte oder Teile der mizellreichen Phase mit abgesaugt wurden. Insgesamt war die Phasenseparation allerdings

¹⁴ In diesem Fall könnte beispielsweise das Modell von Jain und Snoeyink [Jain 1973] dem gewählten von Butler und Ockrent [Butler 1930] überlegen sein.

zufrieden stellend, wie sich leicht beim Vergleich der Zahlenwerte der theoretisch erwarteten und praktisch erhaltenen Volumina feststellen lässt (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2: Gemessene Leitfähigkeiten sowie theoretisch erwartete und durch Absaugung praktisch erhaltene Volumina der wässrigen Phasen

	Waste 1	Produkt 1a	Produkt 1b	Waste 2	Produkt 2a	Produkt 2b	Strip	Waste 3	Produkt 3
Volumen (Binodale), mL	180	187	187	180	187	187	180	180	187
Volumen (abgesaugt), mL	172	181	185	181	187	186	186	176	185
Leitfähigkeit, mS/cm	2,3	40,7	48,0	6,1	44,0	48,1	6,5	3,5	40,6

Von beiden Proteinen verbleibt deutlich mehr als vorhergesagt in der mizellreichen Phase, vermutlich im an die Partikel adsorbierten Zustand. Aus diesem Grund wurde ein zweiter Elutionsschritt durchgeführt, die Ergebnisse sind als „Produkt 1b“ in Abbildung 5-35, gemeinsam mit den restlichen Ergebnisse aller drei Zyklen, dargestellt.

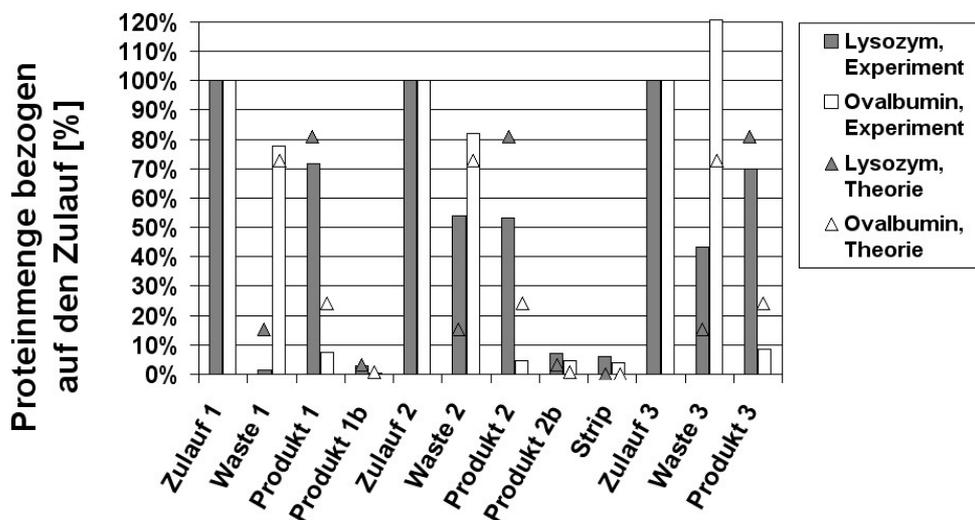


Abbildung 5-35: Experimentell erhaltene und theoretisch vorhergesagte Werte der Proteinfraktionierung innerhalb aller Zyklen des MEP-Versuchs im 200 mL-Maßstab

Die im „Produkt 1b“ gefundenen niedrigen Proteingehalte stützen die Vermutung, dass das für die Schließung der Massenbilanz fehlende Protein sich nach der ersten Elution noch immer im adsorbierten Zustand befand und auch durch die zweite Elution nicht desorbiert wurde. Möglicherweise sind die, zuvor für eine andere Partikelcharge untersuchten, Elutionsbedingungen nicht stark genug oder das Protein bindet nach einem weiteren, unbekanntem Mechanismus. Im sich anschließenden zweiten Zyklus ist die Ovalbumin-Bindung leicht geringer als im ersten Zyklus, die Kapazität für Lysozym sinkt dagegen drastisch. Neben einer Verringerung der Kapazität durch unvollständige Elution ist dieser Sachverhalt wohl auf, aus

dem vorangegangenen Elutionsschritt, verschlepptes Salz zurückzuführen. Anhand der in den wässrigen Phasen gemessenen Leitfähigkeiten (siehe Tabelle 5-2) kann diese Vermutung bestätigt werden. Durch reinen Phosphatpuffer im Bindeschritt wird eine Leitfähigkeit von 2,3 mS/cm hervorgerufen (Waste 1), im Bindeschritt nach vorangegangener Elution sind dies 6,1 mS/cm. An das Ende des zweiten Zyklus wurde deshalb ein Waschschrift (Strip) angefügt, wodurch die Leitfähigkeit auf einen Wert von 3,5 mS/cm im Bindeschritt des dritten Zyklus reduziert werden konnte. Durch diese Maßnahme konnte die Abtrennung des Lysozyms im dritten Zyklus gegenüber dem zweiten Zyklus wieder verbessert werden, d.h. im Produkt 3 wurde eine vergleichbare Ausbeute bei ähnlicher Reinheit wie im Produkt 1 erhalten. Besonders interessant ist die im Waste 3 beobachtete deutliche Überhöhung der Ovalbumin-Konzentration. Diese Überhöhung spricht für eine erfolgte Verdrängung durch frisch adsorbiertes Lysozym.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier gezeigte Separationsperformance, bedingt durch eine nur moderate Selektivität der Partikel, zwar in die richtige Richtung weist, aber für technische Prozesse nicht ausreichend wäre. Die Beeinflussung der Selektivität der Partikel zusammen mit einem günstigen Verteilungsverhalten in AMTPS bleibt damit die größte Herausforderung für den vorliegenden Prozess. Die gezeigten Ergebnisse zeigen jedoch klar, dass der Prozess machbar und auch ein mehrzyklischer Betrieb möglich ist.

5.5.2.2 Bestimmung von Tensid- und Partikelverlusten

Nach Zentrifugation bei 30°C von 10 mL Probe einer wässrigen Phase aus dem im vorangegangenen Kapitel diskutierten Versuch wurden ca. 0,03 mL mizellreiche Phase zusammen mit einigen Magnetpartikeln als Bodensatz erhalten (siehe Abbildung 5-36). Wäre die Probe vor der Phasenseparation gezogen worden, hätte das Volumen der mizellreichen Phase 1 mL betragen ($R = 9$), d.h. 97% der Phase wurden während des Versuchs abgetrennt und nur 3% verbleibende Dispersphase rufen die in Abbildung 5-33 (Seite 149) sichtbare Trübung hervor.

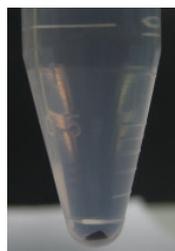


Abbildung 5-36: Zentrifugierte Probe einer, innerhalb der Technikumsversuche gewonnenen, wässrigen Phase. Der Ausschnitt zeigt ca. 1 mL (von insgesamt 10 mL Probe) samt ca. 0,03mL mizellreicher Phase

Nach den aus der Binodal-Kurve (Abbildung 5-9, Seite 123) zu entnehmenden Daten hat die wässrige Phase des Triton X-114 AMTPS bei 30°C und BiKA-Puffer einen Tensidgehalt von $w_{\text{Aq}} = 0,048\%$ und die mizellreiche Phase einen Tensidgehalt von $w_{\text{Ko}} = 12,88\%$. Der Gesamtgehalt in 200 mL Reaktionsansatz betrug 1,33%, das entspricht einer Einwaage von 2,66 g Tensid. Bei einer Phasenseparation mit dem Phasenverhältnis $R = 9$ beträgt das Volumen der wässrigen Phase 180 mL, ein Gehalt von $w_{\text{Aq}} = 0,048\%$ (w/w) entspricht somit 86,4 mg Tensid. Eine Menge in dieser Größenordnung verliert man, je nach Lage der Binodalkurve, immer. Ein Recycling des Tensids aus dem Waste-Strom wäre mit Sicherheit unverhältnismäßig aufwendig. Die die Trübung verursachenden 3 Prozent fein verteilte Dispersphase entsprechen 0,6 mL Koazervatphase ($= 3\% \cdot 20 \text{ mL}$), und damit bei einem Tensidgehalt von $w_{\text{Ko}} = 12,9\%$ (w/w) 77,4 mg Tensid.

Nach dieser Rechnung gehen pro Phasenseparation etwa $(86,4 \text{ mg} + 77,4 \text{ mg}) / 2,66 \text{ g}$, d.h. ca. 6% des Tensids verloren, wobei hier die geringe Anfangskonzentration des Tensids von 1,33 % (w/w) beachtet werden muss. Der absolute Verlust an dem ohnehin preisgünstigen Tensid ist somit gering. Durch Optimierungsarbeiten bei der Magnetfeldgeometrie und/oder der Partikelmagnetisierung sind zudem die Verluste über die mizellreiche Phase mit Sicherheit noch weiter zurückzudrängen. Jedoch scheint ein verfahrenstechnischer Einsatz der magnetischen Extraktionsphasen auch bei unvollständiger Phasenseparation, und dem damit verbundenen teilweisen Tensidverlust, nicht in seiner Wirtschaftlichkeit gefährdet.

Die Abscheideeffizienz für die Magnetpartikel kann mit $> 99\%$ angegeben werden. Auch hier können Verluste durch Optimierungsarbeiten bei der Phasenseparation weiter zurückgedrängt werden. Im Gegensatz zum Tensid ist sogar eine 100%-ige Abscheideeffizienz theoretisch denkbar. Wird innerhalb des MEP-Prozess keine derart hohe Abscheidung erreicht, so können die Magnetpartikel (bei ausreichender Größe) durch nachgeschaltete Hochgradientenmagnetfilter [Franzreb 2003] eingefangen werden und gingen damit nicht verloren. Was die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens betrifft, sind die Partikel gegenüber dem Tensid mit Sicherheit der weitaus kritischere Bestandteil, jedoch ist auch hier ein Betrieb mit den erreichten Abscheidegraden denkbar.

6 Fazit und Ausblick

„Wer nichts weiß, muss alles glauben.“

Marie von Ebner-Eschenbach (1830 – 1916)

öst. Schriftstellerin

Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Verfahrenskonzept zur primären Bioprodukt-aufarbeitung erarbeitet, welches die Behandlung großer Volumina wässriger Produktströme mit relativ geringem apparativen und stofflichen Aufwand denkbar erscheinen lässt. Der hierfür herangezogene kombinierte Einsatz von magnetischen Mikrosorbentien und mizellaren Zweiphasensystemen erbringt, zum einen durch die magnetische Suszeptibilität der Sorbentien und zum anderen durch die temperaturabhängige Schaltbarkeit der Zweiphasensysteme, zwei Freiheitsgrade die, gegenüber herkömmlichen Verfahren, völlig neue Wege in der Prozessführung ermöglichen. Schwierigkeiten im Umgang mit den einzelnen Komponenten, Magnetpartikel bzw. Zweiphasensystem, können durch eine geeignete Kombination eliminiert und neue Synergien gewonnen werden.

Um einen künftigen technischen Einsatz der auf diesem Wege erhaltenen „Magnetischen Extraktionsphasen“ zu ermöglichen, wurden grundlegende Arbeiten zu den als maßgeblich erachteten Teilaspekten des Verfahrens durchgeführt. Zu diesen Aspekten zählen: (i) die Lage des Gleichgewichts des temperaturinduzierten Phasenzfalls, (ii) die Kinetik der Separation der gebildeten flüssigen Phasen unter Anwendung magnetischer Felder sowie (iii) die Gleichgewichtslage von gekoppelter Adsorption und Extraktion der Zielmoleküle in magnetischen Extraktionsphasen. Im Hinblick auf ein tiefer gehendes Verständnis sowie der mathematischen Beschreibbarkeit der einzelnen Punkte konnten zum Teil aus der Literatur bekannte Theorien übernommen und erfolgreich angewendet werden. Für die Kinetik der Phasentrennung im Magnetfeld sowie der Gleichgewichtslage der Proteinseparation (hier anhand von Zweistoffsystemen betrachtet) wurden eigene Modellvorstellungen entwickelt und die zugehörigen mathematischen Ausdrücke abgeleitet.

Erste Machbarkeitsstudien des neuen Verfahrens wurden durch den Einsatz selbst funktionalisierter magnetischer Kationenaustauscher, welche zusammen mit dem Tensid Triton X-114 die Extraktionsphase bildeten, anhand synthetischer Mischungen der beiden Proteine Lysozym und Albumin aus Hühnereiweiß sowohl im Labor- als auch im halbtechnischen Maßstab (200 mL), durchgeführt. In diesen Versuchen konnten die Tenside und Magnetpartikel über drei vollständige Verfahrenszyklen erfolgreich mit hohen Ausbeuten recycelt werden. Die oben genannten mathematischen Modelle zeigten sich sowohl zur Festlegung der zu verwendenden Prozessparameter Temperatur, Partikelkonzentration und Dauer der Einzelschritte, als auch zur Interpretation der erhaltenen Ergebnisse als gut geeignet.

Eines der größten im Verlauf der Arbeit aufgetretenen Probleme waren unsystematische Schwankungen im Verteilungsverhalten der magnetischen Mikrosorbentien auf die flüssigen

Phasen von Zweiphasensystemen, d.h. in ihrer Tendenz in einer der beiden Phasen oder an der Phasengrenze zu akkumulieren. Aufgetretene Unregelmäßigkeiten beim Wechsel zwischen verschiedenen Partikel-Chargen derselben Funktionalisierung können hierbei u.a. von Variationen im Herstellungsprozess oder von falscher bzw. zu langer Lagerung herrühren. Einige Beobachtungen sprechen auch für Zonen unterschiedlicher Funktionalisierungsgrade auf den Partikeloberflächen, welche die Vorhersagbarkeit des Systemverhaltens bezüglich Adsorption, Agglomeration und der Verteilung auf flüssige Phasen stark einschränken würden.

Anhand bekannter Theorien zum Verteilungsverhalten von Feststoffen in Systemen mehrerer koexistierender flüssiger Phasen konnten mittels physikochemischer Überlegungen zumindest einige der experimentell beobachteten Effekte nachvollzogen werden, womit eine Basis für fortführende Untersuchungen auf diesem, für eine erfolgreiche technische Realisierung des Verfahrens essentiell wichtigen Aspekt, geschaffen wurde.

Ausblick

Das vorgestellte Verfahren birgt große Potenziale im Hinblick auf den technischen Einsatz magnetischer Mikrosorbentien und Sorbentien im Nanometer-Maßstab. Deren große spezifische Oberfläche führt neben einer vorteilhaften Adsorptionskinetik zu vergleichsweise hohen Adsorptionskapazitäten. Ein technischer Einsatz von Nanosorbentien ist demnach wünschenswert, jedoch momentan noch nicht wirtschaftlich zu realisieren.

Für einen technischen Einsatz ist die Kenntnis der, die Verteilung der Partikel auf die flüssigen Phasen dominierenden, Mechanismen von fundamentaler Bedeutung. Ein Aufklären der Zusammenhänge von Excluded-Volume-Interaktionen, hydrophoben Wechselwirkungen sowie elektrischer und sterischer Effekte könnte in Zukunft zum Design multifunktionaler Sorbentien mit maßgeschneiderten Liganden zur Adsorption einerseits und der Steuerung des Partitionings andererseits führen. Auch im Hinblick auf eine Übertragung der bislang nur anhand von Modellsystemen gewonnenen Erkenntnisse auf komplexe biologische Produktströme sind weiterführende Arbeiten von größter Wichtigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich mit verdünnten Modellsystemen (ca. 0,1 g/L Protein) gearbeitet. Eine Übertragung auf konzentriertere Systeme könnte durch die Herstellung von Sorbentien mit höherer Kapazität oder dem Einsatz höherer Partikelkonzentrationen erfolgen und erscheint als durchaus realistisch.

Als letzter Punkt soll an dieser Stelle eine Möglichkeit aufgezeigt werden, wie das für den absatzweisen Betrieb vorgestellte und getestete Verfahren in einen kontinuierlich arbeitenden Prozess überführt werden könnte. Ein schematisches Fließbild zur näheren Erläuterung zeigt Abbildung 6-1.

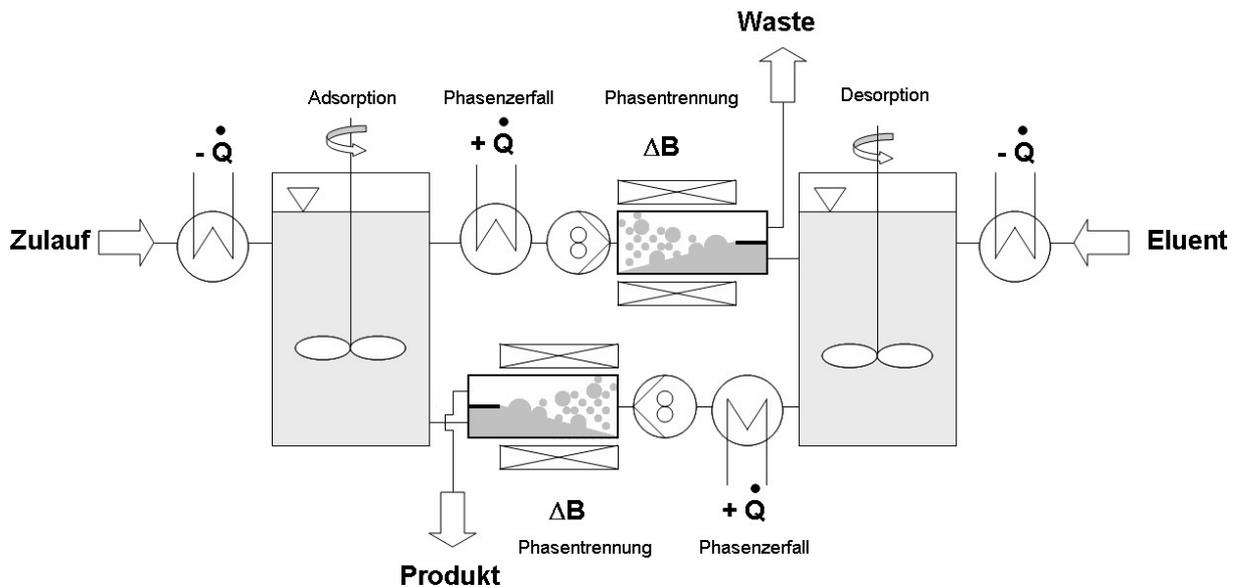


Abbildung 6-1: Schematisches Fließbild für eine kontinuierliche Verfahrensführung des MEP-Prozesses

In einem ersten Behälter, der als kontinuierlich durchströmter Rührkessel betrieben wird, findet die Adsorption des Zielmoleküls an magnetische Sorbentien in einer homogenen wässrigen Lösung statt. Der Zulauf wird vor Eintritt gekühlt, um eine Temperatur unterhalb des Zweiphasengebiets des AMTPS einzustellen. Der Ablauf wird in einem Wärmetauscher erwärmt, wodurch der Phasenerfall induziert wird. Die makroskopische Trennung in zwei flüssige Phasen findet in einem Strömungsrohr statt, welches sich in einem Magnetfeld befindet. Die dort abgetrennte, warme Koazervatphase fließt in einen zweiten Rührkessel, der kontinuierlich mit vorgekühltem Elutionsmittel beschickt wird. Die zweite, das Strömungsrohr verlassende flüssige Phase wird als Waste-Strom abgezogen. Im Ablauf des zweiten Rührkessels findet eine erneute Erwärmung mit sich anschließender Phasenseparation statt. Nach erfolgter Separation kann einerseits der Produktstrom gewonnen und andererseits der Kreislauf von Sorbentien und phasenbildenden Tensiden durch Rückführung der Koazervatphase in den ersten Rührkessel geschlossen werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lassen solch ein Verfahren als technisch durchaus machbar erscheinen. An einigen wichtigen Stellen wurden durch experimentelle und theoretische Arbeiten bereits die erforderlichen Grundlagen geschaffen. Die nächsten Schritte müssen nun durch die Weiterentwicklung der Partikelfunktionalisierung erfolgen, sowohl um höhere Kapazitäten und Selektivitäten als auch besser reproduzierbare Partikeleigenschaften einstellen zu können. Ein tieferes Verständnis des Partikel-Partitionings sollte zudem helfen, die Partikel für den Einsatz in Zweiphasensystemen zu optimieren. Können diese Hürden genommen werden, wäre der Weg für die Weiterentwicklung der magnetischen Extraktionsphasen hin zu einem technisch anwendbaren Prozess frei.

7 Literaturverzeichnis

- Abbott, N.L., Blankschtein, D. and Hatton, T.A. (1990) "On protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems", *Bioseparation*, 1, 191-225
- Abbott, N.L. and Hatton, T.A. (1988) "Liquid-Liquid extractions for protein separations", *Chem. Eng. Prog.*, 31, 31-41
- Albertsson, P.-A. (1956) "Chromatography and Partition of Cells and Cell Fragments", *Nature*, 177, 771-774
- Albertsson, P.-A. (1986) "Partition of cell particles and macromolecules", third ed., John Wiley & Sons, New York
- Amersham-Biosciences (2003) "Protein Separations Handbook Collection"
- Ananthapadmanabhan, K.P. and Goddard, E.D. (1987) "Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems", *Langmuir*, 3 (1), 25-31
- Asenjo, J.A., Mistry, S.L., Andrews, B.A. and Merchuk, J.C. (2002) "Phase separation rates of aqueous two-phase systems: Correlation with system properties", *Biotechnol. Bioeng.*, 79 (2), 217-223
- Augier, F., Masbernat, O. and Guiraud, P. (2003) "Slip Velocity and Drag Law in a Liquid-Liquid Homogenous Dispersed Flow", *AIChE J.*, 49 (9), 2300-2316
- Banik, R.M., Santhiagu, A., Kanari, B., Sabarint, C. and Upadhyay, S.N. (2003) "Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems", *World J. Microb. Biot.*, 19, 337-348
- Baskir, J.N., Hatton, T.A. and Suter, U.W. (1989) "Affinity Partitioning in Two-Phase Aqueous Polymer Systems: A Simple Model for the Distribution of the Polymer-Ligand Tail Segments near the Surface of a Particle", *J. Phys. Chem.-US*, 93, 969-976
- Beijerinck, M.W. (1896) "Über eine Eigentümlichkeit der löslichen Stärke", *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, 2, 697-699
- Bensch, M., Selbach, B. and Hubbuch, J. (2007) "High throughput screening techniques in downstream processing: Preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems", *Chem. Ing. Sci.*, 62 (7), 2011-2021
- Berensmeier, S. (2006) "Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids", *Appl. Microbiol. Biot.*, 73 (3), 495-504
- Berggren, K., Veide, A., Nygren, P.-A. and Tjerneld, F. (1999) "Genetic engineering of protein-peptide fusions for control of protein partitioning in thermoseparating aqueous two-phase systems", *Biotechnol. Bioeng.*, 62 (2), 135-144
- Berggren, K., Wolf, A., Asenjo, J.A., Andrews, B.A. and Tjerneld, F. (2002) "The surface exposed amino acid residues of monomeric proteins determine the partitioning in aqueous two-phase systems", *BBA-Protein Struct. M.*, 1596 (2), 253-268
- Bhavasari, P.M., Jafarabad, K.R., Pandit, A.B., Sawant, S.B. and Joshi, J.B. (1996) "Drop Volumes and Terminal Velocities in Aqueous Two Phase Systems", *Can. J. Chem. Eng.*, 74, 852-860
- Bhawsari, P.C.M., Pandit, A.B., Sawant, S.B. and Joshi, J.B. (1994) "Enzyme mass transfer coefficient in a sieve plate extraction column", *Chem. Eng. J.*, 55, B1-B17
- Binks, B.P. and Lumsdon, S.O. (2000) "Influence of Particle Wettability on the Type and Stability of Surfactant Free Emulsions", *Langmuir*, 16 (23), 8622-8631

- Blankschtein, D., Thurston, G.M. and Benedek, G.B. (1986) "Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions", *J. Chem. Phys.*, 85 (12), 7268-7288
- Böhm, D. and Vob, H. (1999) "Einsatz von magnetischen Mikropartikeln in der chemischen Technik", *Chem. Ing. Tech.*, 71, 43-51
- Bolognese, B., Nerli, B. and Pico, G. (2005) "Application of the aqueous two-phase systems of ethylene and propylene oxide copolymer-maltodextrin for protein purification", *J. Chromatogr. B*, 814 (2), 347-353
- Bordier, C. (1981) "Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution", *J. Biol. Chem.*, 256, 1604-1607
- Bridges, N.J., Gutowski, K.E. and Rogers, R.D. (2007) "Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS)", *Green Chem.*, 9, 177-183
- Brown, G.N. and Thomas, O.R.T. (2007) "Cerium (IV) mediated fimbriation with polyacrylic acid delivers magnetic adsorbents with ultra-high protein binding capacity", Präsentation im Rahmen der 13th European Congress on Biotechnology, Barcelona, Spain, September 16th-19th
- Butler, J.A.V. and Ockrent, C. (1930) "Studies in Electrocapillarity. III", *J. Phys. Chem.-US*, 34 (12), 2841-2859
- Cabezas Jr., H. (1996) "Theory of phase formation in aqueous two-phase systems", *J. Chromatogr. B*, 680 (1-2), 3-30
- Chase, H.A. (2000) "AFFINITY SEPARATION | Biochemical Engineering Aspects of Affinity Separations", in: Wilson, I.D. (Ed.) Encyclopedia of Separation Science, Elsevier Science Ltd, Oxford, pp. 246-252
- Chaudhuri, J.B. (1995) "Separations in biotechnology", *Trends Biotechnol.*, 13 (1), 12-14
- Chethana, S., Rastogi, N.K. and Raghavarao, K.S.M.S. (2006) "New aqueous two phase system comprising polyethylene glycol and xanthan", *Biotechnol. Lett.*, 28, 25-28
- Clift, R., Grace, J.R. and Weber, M.E. (1978) "Bubbles, Drops and Particles", Academic Press, New York
- Clonis, Y.D., Labrou, N.E., Kotsira, V.P., Mazitsos, C., Melissis, S. and Gogolas, G. (2000) "Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification", *J. Chromatogr. A*, 891 (1), 33-44
- Collen, A., Selber, K., Hyytiä, T., Persson, J., Nakari-Setälä, T., Bailey, M., Fagerström, R., Kula, M.-R., Penttilä, M., Stalbrand, H. and Tjerneld, F. (2002) "Primary recovery of a genetically engineered *Trichoderma reesei* endoglucanase I (Cel 7B) fusion protein in cloud point extraction systems", *Biotechnol. Bioeng.*, 78 (4), 385-394
- Cunha, T. and Aires-Barros, M.R. (2002) "Large-Scale Extraction of Proteins", *Mol. Biotechnol.*, 20 (1), 29-40
- da Silva, L.H.M. and Meirelles, A.J.A. (2001) "Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous mixtures of maltodextrin with polypropylene glycol", *Carbohydr. Polym.*, 46 (3), 267-274
- Daugulis, A.J. (1997) "Partitioning bioreactors", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8 (2), 169-174
- de Palma, A. (2007) "Designing Better Purification Schemes", *Genetic Engineering & biotechnology News*, 27 (13)

- Denizli, A. and Piskin, E. (2001) "Dye-ligand affinity systems", *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 49 (1-3), 391-416
- Desert, C., Guerin-Dubiard, C., Nau, F., Jan, G., Val, F. and Mallard, J. (2001) "Comparison of Different Electrophoretic Separations of Hen Egg White Proteins", *J. Agr. Food Chem.*, 49 (10), 4553-4561
- Doroschuk, V.O., Kulichenko, S.A. and Lelyushok, S.O. (2005) "The influence of substrate charge and molecular structure on interphase transfer in cloud point extraction systems", *J. Colloid Interf. Sci.*, 291 (1), 251-255
- Dreyer, S. and Kragl, U. (2007) "Application of ionic liquids for aqueous two phase extraction", Präsentation im Rahmen der 14th International Conference on Biopartitioning and Purification, Lisbon, Portugal, June 17th-20th
- Dunnill, P. and Lilly, M.D. (1974) "Purification of enzymes using magnetic bio-affinity materials", *Biotechnol. Bioeng.*, 16 (7), 987-990
- Ebner, N. (2006) "Einsatz von Magnettrenntechnologie bei der Bioproduktaufarbeitung", PhD-Thesis, University of Karlsruhe (TH)
- Estela da Silva, M. and Teixeira Franco, T. (2000a) "Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing", *Braz. J. Chem. Eng.*, 17 (1), 1-17
- Estela da Silva, M. and Teixeira Franco, T. (2000b) "Purification of soybean peroxidase (Glycine max) by metal affinity partitioning in aqueous two-phase systems", *J. Chromatogr. B*, 743 (1-2), 287-294
- Everberg, H., Leiding, T., Schioth, A., Tjerneld, F. and Gustavsson, N. (2006) "Efficient and non-denaturing membrane solubilization combined with enrichment of membrane protein complexes by detergent/polymer aqueous two-phase partitioning for proteome analysis", *J. Chromatogr. A*, 1122 (1-2), 35-46
- Fernandes, S., Kim, H.-S. and Hatti-Kaul, R. (2002) "Affinity Extraction of Dye- and Metal Ion-Binding Proteins in Polyvinylpyrrolidone-Based Aqueous Two-Phase System", *Protein. Expres. Purif.*, 24 (3), 460-469
- Fexby, S. and Bülow, L. (2004) "Hydrophobic peptide tags as tools in bioseparation", *Trends Biotechnol.*, 22 (10), 511-516
- Flanagan, S.D. and Barondes, S.H. (1975) "Affinity Partitioning: A method for purification of proteins using polymer-ligands in aqueous polymer two-phase systems", *J. Biol. Chem.*, 250 (4), 1484-1489
- Flygare, S., Wikström, P., Johansson, G. and Larsson, P.-O. (1990) "Magnetic aqueous two-phase separation in preparative applications", *Enzyme Microb. Tech.*, 12, 95-103
- Franzreb, M. (2003) "Magnettechnologie in der Verfahrenstechnik wässriger Medien", Habilitation-Thesis, University of Karlsruhe (TH)
- Franzreb, M., Ebner, N., Siemann-Herzberg, M., Hobbey, T.J. and Thomas, O.R.T. (2006a) "Product recovery by high-gradient magnetic fishing (HGMF)", in: Etzel, M. et al. (Eds.) Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry, CRC Press LLC
- Franzreb, M., Siemann-Herzberg, M., Hobbey, T.J. and Thomas, O.R.T. (2006b) "Protein purification using magnetic adsorbent particles", *Appl. Microbiol. Biot.*, 70 (5), 505-516
- Frerix, A., Schönwald, M., Geilenkirchen, P., Müller, M., Kula, M.-R. and Hubbuch, J. (2006) "Exploitation of the Coil-Globule Plasmid DNA Transition Induced by Small

- Changes in Temperature, pH Salt, and Poly(ethylene glycol) Compositions for Directed Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems", *Langmuir*, 22 (9), 4282-4290
- Ghaedi, M., Shokrollahi, A., Ahmadi, F., Rajabi, H.R. and Soylak, M. (2008) "Cloud point extraction for the determination of copper, nickel and cobalt ions in environmental samples by flame atomic absorption spectrometry", *Journal of Hazardous Materials*, 150 (3), 533-540
- Giuliano, K.A. (1991) "Aqueous two-phase protein partitioning using textile dyes as affinity ligands", *Anal. Biochem.*, 197 (2), 333-339
- Gore, M. and Sethi, K.K. (2004) "Separating biomolecules & cells with magnetic particles", *Int. Biotechnol. Lab.*, Februar
- Gouveia, T. and Kilikian, B.V. (2000) "Bioaffinity extraction of glucoamylase in aqueous two-phase systems using starch as free bioligand", *J. Chromatogr. B*, 743, 241-246
- Greve, A. and Kula, M.-R. (1991) "Recycling of salts in partition protein extraction processes", *J. Chem. Technol. Biot.*, 50, 27-42
- Guerin-Dubiard, C., Pasco, M., Hietanen, A., Quiros del Bosque, A., Nau, F. and Croguennec, T. (2005) "Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1090 (1-2), 58-67
- Gullickson, N.D., Scamehorn, J.F. and Harwell, J.H. (1989) "Liquid-Coacervate Extraction", in: Scamehorn, J.F. and Harwell, J.H. (Eds.) Surfactant Based Separation Processes, Marcel Dekker, New York, pp. 139-153
- Gupta, M.N. (Ed.) (2002a) "Methods for Affinity-Based Separations of Enzymes and Proteins", *Methods and tools in biosciences and medicine*, Birkhäuser Verlag, Basel
- Gupta, V., Nath, S. and Chand, S. (2002b) "Role of water structure on phase separation in polyelectrolyte-polyethyleneglycol based aqueous two-phase systems", *Polymer*, 43 (11), 3387-3390
- Haghtalab, A. and Mokhtarani, B. (2005) "The UNIFAC-NRF activity coefficient model based on group contribution for partitioning of proteins in aqueous two phase (polymer + salt) systems", *J. Chem. Thermodyn.*, 37 (3), 289-295
- Hatti-Kaul, R. (Ed.) (2000) "Aqueous Two-Phase Systems - Methods and Protocols", *Methods in Biotechnology*, vol. 11, Humana Press, Totowa
- Hatti-Kaul, R. (2001) "Aqueous Two-Phase Systems: A General Overview", *Mol. Biotechnol.*, 19 (3), 269-277
- Hedman, P.O. and Gustafsson, J.-G. (1984) "Protein adsorbents intended for use in aqueous two-phase systems", *Anal. Biochem.*, 138 (2), 411-415
- Heeboll-Nielsen, A., Justesen, S.F.L., Hobley, T.J. and Thomas, O.R.T. (2004a) "Superparamagnetic Cation-Exchange Adsorbents for Bioproduct Recovery from Crude Process Liquors by High-Gradient Magnetic Fishing", *Separ. Sci. Technol.*, 39 (12), 2891 - 2914
- Heeboll-Nielsen, A., Justesen, S.F.L. and Thomas, O.R.T. (2004b) "Fractionation of whey proteins with high-capacity superparamagnetic ion-exchangers", *J. Biotechnol.*, 113 (1-3), 247-262
- Helfrich, M.R., El-Kouedi, M., Etherton, M.R. and Keating, C.D. (2005) "Partitioning and Assembly of Metal Particles and Their Bioconjugates in Aqueous Two-Phase Systems", *Langmuir*, 21, 8478-8486

- Henrich, C. (2006) "Untersuchungen an neuartigen Extraktionssystemen für den Einsatz in der Bioverfahrenstechnik", Master-Thesis, FH-Bingen
- Henschke, M., Schlieper, L.H. and Pfennig, A. (2002) "Determination of a coalescence parameter from batch-settling experiments", *Chem. Eng. J.*, 85 (2-3), 369-378
- Hermanson, G.T., Krishna Mallia, A. and Smith, P.K. (1992) "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press Inc., San Diego
- Hilbrig, F. and Freitag, R. (2003) "Protein purification by affinity precipitation", *J. Chromatogr. B*, 790, 79-90
- Hirschbein, B.L., Brown, D.W. and Whitesides, G.M. (1982) "Magnetic separations in chemistry and biochemistry", *CHEMTECH*, March 1982, 172-179
- Hoeben, M.A., van der Lans, R. and van der Wielen, L.A.M. (2004) "Kinetic model for separation of particle mixtures by interfacial partitioning", *AIChE J.*, 50 (6), 1156-1168
- Hoffmann, C. (2003) "Einsatz magnetischer Separationsverfahren zur biotechnologischen Produktaufarbeitung", PhD-Thesis, University of Karlsruhe (TH)
- Hubbuck, J., Matthiesen, D.B., Hobley, T.J. and Thomas, O.R.T. (2001) "High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: a first principle comparison", *Bioseparation*, 10, 99-112
- Hubbuck, J. and Thomas, O.R.T. (2002) "High-Gradient Magnetic Affinity Separation of Trypsin from Porcine Pancreatin", *Biotechnol. Bioeng.*, 79 (3), 301-313
- Huddleston, J., Veide, A., Köhler, K., Flanagan, J., Enfors, S.-O. and Lyddiatt, A. (1991) "The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems", *Trends Biotechnol.*, 9, 381-388
- Huibers, P.D.T., Shah, D.O. and Katritzky, A.R. (1997) "Predicting Surfactant Cloud Point from Molecular Structure", *J. Colloid Interf. Sci.*, 193 (1), 132-136
- Hustedt, H. (1986) "Extractive enzyme recovery with simple recycling of phase forming chemicals", *Biotechnol. Lett.*, 8, 791-796
- Ishii, M. and Zuber, N. (1979) "Drag coefficient and relative velocity in bubbly, droplet or particulate flows", *AIChE J.*, 25 (5), 843-855
- Jain J. S., Snoeyink V. L. (1973) "Adsorption from Bisolute Systems on Active Carbon", *Journal WPCF*, 45 (12), 2463-2479
- Jafarabad, K.R., Patil, T.A., Sawant, S.B. and Joshi, J.B. (1992a) "Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems--II. York-Scheibel extraction column", *Chem. Ing. Sci.*, 47 (1), 69-73
- Jafarabad, K.R., Sawant, S.B., Joshi, J.B. and Sikdar, S.K. (1992b) "Enzyme and protein mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems--I. Spray extraction columns", *Chem. Ing. Sci.*, 47 (1), 57-68
- Janson, J.-C. (1984) "Large-scale affinity purification -- state of the art and future prospects", *Trends Biotechnol.*, 2 (2), 31-38
- Jeelani, S.A.K., Hosig, R. and Windhab, E.J. (2005) "Kinetics of Low Reynolds Number Creaming and Coalescence in Droplet Dispersions", *AIChE J.*, 51 (1), 149-161
- Johansson, G. (2000) "AFFINITY SEPARATION | Affinity Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems", in: Wilson, I.D. (Ed.) Encyclopedia of Separation Science, Elsevier Science Ltd, Oxford, pp. 235-246

- Johansson, G. and Joelsson, M. (1989a) "Effect of polymer structure on affinity partitioning of lactate dehydrogenase in polymer-water two-phase systems", *J. Chromatogr.*, 411, 161-166
- Johansson, G. and Tjerneld, F. (1989b) "Affinity partition between aqueous phases -- a tool for large-scale purification of enzymes", *J. Biotechnol.*, 11 (2-3), 135-141
- Johansson, H.-O., Karlstrom, G., Tjerneld, F. and Haynes, C.A. (1998) "Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems", *J. Chromatogr. B*, 711 (1-2), 3-17
- Kalyanpur, M. (2002) "Downstream processing in the biotechnology industry", *Mol. Biotechnol.*, 22 (1), 87-98
- Kaul, A., Pereira, R.A.M., Asenjo, J.A. and Merchuk, J.C. (1995) "Kinetics of Phase Separation for Polyethylene Glycol-Phosphate Two-Phase Systems", *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 246-256
- Keller, K., Friedmann, T. and Boxman, A. (2001) "The bioseparation needs for tomorrow", *Trends Biotechnol.*, 19 (11), 438-441
- Kepka, C., Rhodin, J., Lemmens, R., Tjerneld, F. and Gustavsson, P.-E. (2004) "Extraction of plasmid DNA from Escherichia coli cell lysate in a thermoseparating aqueous two-phase system", *J. Chromatogr. A*, 1024 (1-2), 95-104
- Kondo, A., Kaneko, T. and Higashitani, K. (1993) "Purification of fusion proteins using affinity microspheres in aqueous two-phase systems", *Appl. Microbiol. Biot.*, 40 (2-3), 365-369
- Kopperschläger, G. and Birkenmeier, G. (1990) "Affinity partitioning and extraction of proteins", *Bioseparation*, 1, 235-254
- Ku, C.-A., Henry Jr., J.D. and Blair, J.B. (1989a) "Affinity-Specific protein separations using ligand-coupled particles in aqueous two-phase systems: I. Process concept and enzyme binding studies for pyruvate kinase and alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnol. Bioeng.*, 33 (9), 1081-1088
- Ku, C.-A., Henry Jr., J.D. and Blair, J.B. (1989b) "Affinity-Specific protein separations using ligand-coupled particles in aqueous two-phase systems: II. Recovery and purification of pyruvate kinase and alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnol. Bioeng.*, 33 (9), 1089-1097
- Kula, M.-R. (1985) "Liquid-Liquid extraction of Biopolymers", in: Humphrey, A. and Cooney, C.L. (Eds.) Comprehensive Biotechnology, Pergamon Press, Oxford, pp. 451-471
- Kula, M.-R. and Selber, K. (1999) "Protein Purification, Aqueous Liquid Extraction", in: Flickinger, M.C. and Drew, S.W. (Eds.) Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation, Wiley, New York, pp. 2179-2191
- Kwon, J.Y. and Hatti-Kaul, R. (1999) "Protein separation using metal ion-bound particles in aqueous two-phase system", *Biotechnol. Tech.*, 13 (2), 145-148
- Labrou, N.E. (2003) "Design and selection of ligands for affinity chromatography", *J. Chromatogr. B*, 790 (1-2), 67-78
- Lam, H., Kavooosi, M., Haynes, C.A., Wang, D.I.C. and Blankschtein, D. (2005) "Affinity-enhanced protein partitioning in decyl β -D-glucopyranoside two-phase micellar systems", *Biotechnol. Bioeng.*, 89 (4), 381-392

- Langmuir, I. (1918) "The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Glass, Mica and Platinum", *J. Am. Chem. Soc.*, 40, 1361-1403
- Larsson, P.-O. (1994) "Magnetically enhanced phase separation", in: Walter, H. and Johansson, G. (Eds.) *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 112-117
- Lee, C.-K. and Su, W.-D. (1999) "Nonionic Surfactant-Mediated Affinity Cloud-Point Extraction of Vancomycin", *Separ. Sci. Technol.*, 34 (16), 3267-3277
- Leser, E.W. and Asenjo, J.A. (1992) "Rational design of purification processes for recombinant proteins", *J. Chromatogr. B*, 584 (1), 43-57
- Leunissen, M.E., Zwanikken, J., van Roij, R., Chaikin, P.M. and van Blaaderen, A. (2007) "Ion partitioning at the oil-water interface as a source of tunable electrostatic effects in emulsions with colloids", *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9 (48), 6405-6414
- Levine, S., Bowen, B.D. and Partridge, S.J. (1989) "Stabilization of Emulsions by Fine Particles .1. Partitioning of Particles between Continuous Phase and Oil-Water Interface", *Colloid Surface*, 38 (4), 325-343
- Linder, M.B., Qiao, M., Laumen, F., Selber, K., Hyytiä, T., Nakari-Setälä, T. and Penttilä, M.E. (2004) "Efficient Purification of Recombinant Proteins Using Hydrophobins as Tags in Surfactant-Based Two-Phase Systems", *Biochemistry-US*, 43, 11873-11882
- Liu, C.-L., Kamei, D.T., King, J.A., Wang, D.I.C. and Blankschtein, D. (1998) "Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems", *J. Chromatogr. B*, 711 (1-2), 127-138
- Liu, C.-L., Nikas, Y.J. and Blankschtein, D. (1995) "Partitioning of proteins using two-phase aqueous surfactant systems", *AIChE J.*, 41, 991
- Liu, C.-L., Nikas, Y.J. and Blankschtein, D. (1996) "Novel Bioseparations Using Two-Phase Aqueous Micellar Systems", *Biotechnol. Bioeng.*, 52, 185-192
- Löffler, F. and Raasch, J. (1992) "Grundlagen der mechanischen Verfahrenstechnik", Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig
- Lu, J., Lin, D.-Q. and Yao, S.-J. (2006) "Preparation and Application of Novel EOPO-IDA-Metal Polymer as Recyclable Metal Affinity Ligand in Aqueous Two-Phase Systems", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45 (5), 1774-1779
- Materna, K., Miesiac, I., Cote, G. and Szymanowski, J. (2001) "Removal of Phenols from Aqueous Streams by the Cloud Point Extraction Technique with Oxyethylated Methyl Dodecanoates As Surfactants", *Environ. Sci. Technol.*, 35 (11), 2341-2346
- Materna, K., Schaadt, A., Bart, H.-J. and Szymanowski, J. (2005) "Dynamics of surfactant-rich phase separation from solutions containing non-ionic and zwitterionic surfactants", *Colloid Surface A*, 254, 223-229
- Mattiasson, B. and Ling, T.G.I. (1986) "Efforts to integrate affinity interactions with conventional separation technologies - Affinity partition using biospecific chromatographic particles in aqueous two-phase systems", *J. Chromatogr. B*, 376, 235-243
- Melle, S., Lask, M. and Fuller, G.G. (2005) "Pickering Emulsions with Controllable Stability", *Langmuir*, 21, 2158-2162
- Meyer, A. (2004) "Einsatz magnetischer Trennverfahren zur Aufbereitung von Molkereiprodukten", PhD-Thesis, University of Karlsruhe (TH)

- Meyer, A., Berensmeier, S. and Franzreb, M. (2007) "Direct capture of lactoferrin from whey using magnetic micro-ion exchangers in combination with high-gradient magnetic separation", *React. Funct. Polym.*, 67, 1577-1588
- Meyer, A., Hansen, D.B., Gomes, C.S.G., Hobley, T.J., Thomas, O.R.T. and Franzreb, M. (2005) "Demonstration of a Strategy for Product Purification by High-Gradient Magnetic Fishing: Recovery of Superoxide Dismutase from Unconditioned Whey", *Biotechnol. Prog.*, 21 (1), 244-254
- Michalowsky, L., Heinecke, U., Schneider, J. and Wich, H. (1995) "Magnetetechnik: Grundlagen und Anwendungen", second ed., Fachbuchverlag Leipzig GmbH, Leipzig
- Minuth, T., Gieren, H., Pape, U., Rath, H.C., Thömmes, J. and Kula, M.-R. (1997) "Pilot scale processing of detergent-based aqueous two-phase systems", *Biotechnol. Bioeng.*, 55 (2), 339-347
- Minuth, T., Thömmes, J. and Kula, M.-R. (1995) "Extraction of cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* using a nonionic surfactant-based aqueous two-phase system", *J. Biotechnol.*, 38 (2), 151-164
- Minuth, T., Thömmes, J. and Kula, M.-R. (1996) "A closed concept for purification of the membrane-bound cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* by surfactant-based cloud-point extraction, organic-solvent extraction and anion-exchange chromatography", *Biotechnol. Appl. Bioc.*, 23, 107-116
- Mondal, K. and Gupta, M.N. (2006) "The affinity concept in bioseparation: Evolving paradigms and expanding range of applications", *Biomol. Eng.*, 23 (2-3), 59-76
- Nagaraj, N., Chethana, S. and Raghavarao, K.S.M.S. (2005) "Electrokinetic demixing of aqueous two-phase polymer/salt systems", *Electrophoresis*
- Nagaraj, N., Narayan, A.V., Srinivas, N.D. and Raghavarao, K.S.M.S. (2003) "Microwave-field-assisted enhanced demixing of aqueous two-phase systems", *Anal. Biochem.*, 312 (2), 134-140
- Nikas, Y.J., Liu, C.-L., Srivastava, T., Abbott, N.L. and Blankschtein, D. (1992) "Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions", *Macromolecules*, 25, 4797-4806
- Nikolov, Z.L. and Woodard, S.L. (2004) "Downstream processing of recombinant proteins from transgenic feedstock", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15 (5), 479-486
- O'Brien, S.M., Thomas, O.R.T. and Dunnill, P. (1996) "Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption", *J. Biotechnol.*, 50 (1), 13-25
- Onken, U. (1989) "Physikalisch-chemische Trennverfahren in der Biotechnologie", *Chem. Ing. Tech.*, 61 (5), 395-402
- Paleologos, E.K., Giokas, D.L. and Karayannis, M.I. (2005) "Micelle-mediated separation and cloud-point extraction", *TrAC - Trend. Anal. Chem.*, 24 (5), 426-436
- Panayotova, S. and Bivas, I. (2004) "Borders of the Liquid Crystalline Phase in the Triton X-114 - Water Binary System", *Bulg. J. Phys.*, 31, 83-86
- Papamichael, N., Borner, B. and Hustedt, H. (1992) "Continuous aqueous phase extraction of proteins: automated processing and recycling of process chemicals", *J. Chem. Technol. Biot.*, 54, 47-55

- Patil, T.A., Jafarabad, K.R., Sawant, S.B. and Joshi, J.B. (1991) "Enzyme Mass Transfer Coefficient in Aqueous Two Phase System Using a Packed Extraction Column", *Can. J. Chem. Eng.*, 69, 548-556
- Pawar, P.A., Parasu Veera, U., Sawant, S.B. and Joshi, J.B. (1997) "Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems: modified spray extraction columns", *Can. J. Chem. Eng.*, 75 (August), 751-758
- Persson, J., Johansson, H.-O., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. and Tjerneld, F. (2000a) "Aqueous polymer two-phase systems formed by new thermoseparating polymers", *Bioseparation*, 9, 105-116
- Persson, J., Johansson, H.-O. and Tjerneld, F. (1999) "Purification of protein and recycling of polymers in a new aqueous two-phase system using two thermoseparating polymers", *J. Chromatogr. A*, 864 (1), 31-48
- Persson, J., Kaul, A. and Tjerneld, F. (2000b) "Polymer recycling in aqueous two-phase extractions using thermoseparating ethylene oxide-propylene oxide copolymers", *J. Chromatogr. B*, 743 (1-2), 115-126
- Pickering, S.U. (1907) "Emulsions", *J. Chem. Soc., Trans.*, 91, 2001-2021
- Plunkett, S.D. and Arnold, F.H. (1990) "Metal affinity extraction of human hemoglobin in an aqueous polyethylene glycol-sodium sulfate two-phase system", *Biotechnol. Tech.*, 4 (1), 45-48
- Przybycien, T.M., Pujar, N.S. and Steele, L.M. (2004) "Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15 (5), 469-478
- Puvvada, S. and Blankschtein, D. (1990) "Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants", *The Journal of Chemical Physics*, 92 (6), 3710-3724
- Queiroz, J.A., Tomaz, C.T. and Cabral, J.M.S. (2001) "Hydrophobic interaction chromatography of proteins", *J. Biotechnol.*, 87 (2), 143-159
- Quina, F.H. and Hinze, W.L. (1999) "Surfactant-Mediated Cloud Point Extractions: An Environmentally Benign Alternative Separation Approach", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 38, 4150-4168
- Raffelt, S. (2008) "Verfahrenstechnische Untersuchungen zur Proteinseparation mittels magnetischer Extraktionsphasen", Master-Thesis, University of Karlsruhe (TH)
- Raghavarao, K.S.M.S., Doddamane, S.N., Sampangi, C. and Todd, P.W. (2002) "Field-assisted extraction of cells, particles and macromolecules", *Trends Biotechnol.*, 20 (2), 72-78
- Raghavarao, K.S.M.S., Rastogi, N.K., Gowthaman, M.K. and Karanth, N.G. (1995) "Aqueous Two-Phase Extraction for Downstream Processing of Enzymes/Proteins", in: Neidleman, S.L. and Laskin, A.I. (Eds.) *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, San Diego, pp. 97-171
- Rahimpour, F., Feyzi, F., Maghsoudi, S. and Hatti-Kaul, R. (2006) "Purification of plasmid DNA with polymer-salt aqueous two-phase system: Optimization using response surface methodology", *Biotechnol. Bioeng.*, 95 (4), 627-637
- Ramelmeier, R.A., Terstappen, G.C. and Kula, M.-R. (1991) "The partitioning of cholesterol oxidase in Triton X-114-based aqueous two-phase systems", *Bioseparation*, 2, 315-324

- Rangel-Yagui, C.O., Pessoa Jr., A. and Blankschtein, D. (2004) "Two-phase aqueous micellar systems - an alternative method for protein purification", *Braz. J. Chem. Eng.*, 21 (4), 531-544
- Rito-Palomares, M. (2004) "Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products", *J. Chromatogr. B*, 807 (1), 3-11
- Robinson, P.J., Dunnill, P. and Lilly, M.D. (1973) "The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors", *Biotechnol. Bioeng.*, 15 (3), 603-606
- Rodenbrock, A., Selber, K., Egmond, M.R. and Kula, M.-R. (2001) "Extraction of peptide tagged cutinase in detergent-based aqueous two-phase systems", *Bioseparation*, 9, 269-276
- Roobol-Boza, M., Dolby, V., Doverskog, M., Barrefelt, A., Lindqvist, F., Oppermann, U.C., Köhler Van Alstine, K. and Tjerneld, F. (2004) "Membrane protein isolation by in situ solubilization, partitioning and affinity adsorption in aqueous two-phase systems Purification of the human type 1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase", *J. Chromatogr. A*, 1043, 217-223
- Safarik, I. and Safarikova, M. (2002) "Magnetic Nanoparticles and Biosciences", *Monatsh. Chem.*, 133, 737-759
- Safarik, I. and Safarikova, M. (2004) "Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides", *BioMagn. Res. Technol.*, 2
- Safarik, I., Safarikova, M. and Forsythe, S.J. (1995) "The application of magnetic separations in applied microbiology", *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 575-585
- Saitoh, T. and Hinze, W.L. (1995a) "Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins", *Talanta*, 42 (1), 119-127
- Saitoh, T., Tani, H., Kamidate, T. and Watanabe, H. (1995b) "Phase separation in aqueous micellar solutions of nonionic surfactants for protein separation", *TrAC - Trend. Anal. Chem.*, 14 (5), 213-217
- Saiyed, Z.M., Telang, S.D. and Ramchand, C.N. (2003) "Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine", *BioMagn. Res. Technol.*, 1
- Salamanca, M.H., Merchuk, J.C., Andrews, B.A. and Asenjo, J.A. (1998) "On the kinetics of phase separation in aqueous two-phase systems", *J. Chromatogr. B*, 711 (1-2), 319-329
- Salgado, J.C., Rapaport, I. and Asenjo, J.A. (2005) "Is it possible to predict the average surface hydrophobicity of a protein using only its amino acid composition?", *J. Chromatogr. A*, 1075 (1-2), 133-143
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. and Garcia-Carmona, F. (1994) "Phase separation of biomolecules in polyoxyethylene glycol nonionic detergents", *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 29 (4), 275-313
- Sawant, S.B., Sikdar, S.K. and Joshi, J.B. (1990) "Hydrodynamics and mass transfer in two-phase aqueous extraction using spray columns", *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 109-115
- Schindler, J. and Nothwang, H.G. (2006) "Aqueous polymer two-phase systems: Effective tools for plasma membrane proteomics", *PROTEOMICS*, 6 (20), 5409-5417
- Schultz, N., Syldatk, C., Franzreb, M. and Hobley, T.J. (2007) "Integrated processing and multiple re-use of immobilised lipase by magnetic separation technology", *J. Biotechnol.*, 132 (2), 202-208

- Scopes, R.K. (1996) "Protein purification in the nineties", *Biotechnol. Appl. Bioc.*, 23, 197-204
- Selber, K., Collen, A., Hyytiä, T., Penttilä, M., Tjerneld, F. and Kula, M.-R. (2002a) "Parameters influencing protein extraction for whole broths in detergent based aqueous two-phase systems", *Bioseparation*, 10, 229-236
- Selber, K., Müller, S., Gieren, H., Thömmes, J., Sottmann, T., Strey, R. and Kula, M.-R. (2002b) "Physical properties of detergent-based aqueous two-phase systems", *Bioseparation*, 10, 243-253
- Selber, K., Tjerneld, F., Collen, A., Hyytiä, T., Nakari-Setälä, T., Bailey, M., Fagerström, R., Kan, J., van der Laan, J., Penttilä, M. and Kula, M.-R. (2004) "Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems", *Process Biochem.*, 39, 889-896
- Setchell, C.H. (1985) "Magnetic Separations in Biotechnology - a Review", *J. Chem. Technol. Biot.*, 35 B, 175-182
- Shaeiwitz, J.A. and Henry, J.D.J. (1988) "Biochemical Separations", in: Gerhartz, W. (Ed.) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Siklosi, T. (2005) "Manufacturing of Biopharmaceutical Proteins: Process Design and Implementation of Viral Clearance", *Genetic Engineering & biotechnology News*, 25 (17)
- Sivars, U., Abramson, J., Iwata, S. and Tjerneld, F. (2000) "Affinity partitioning of a poly(histidine)-tagged integral membrane protein, cytochrome bo3 ubiquinol oxidase, in a detergent-polymer aqueous two-phase system containing metal-chelating polymer", *J. Chromatogr. B*, 743 (1-2), 307-316
- Solano-Castillo, C. and Rito-Palomares, M. (2000) "Kinetics of phase separation under different process and design parameters in aqueous two-phase systems", *J. Chromatogr. B*, 743, 195-201
- Sontheimer, H., Frick, B., Fettig, J., Hörner, G., Hubele, C., Zimmer, G. (1985) "Adsorptionsverfahren zur Wasseraufreinigung", DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut, Universität Karlsruhe (TH), Karlsruhe
- Spalding, B.J. (1991) "Downstream processing: key to slashing production costs 100 fold", *Biotechnology (N.Y.)*, 9, 229-233
- Srinivas, N.D., Barhate, R.S., Raghavarao, K.S.M.S. and Todd, P. (2000) "Acoustic demixing of aqueous two-phase systems", *Appl. Microbiol. Biot.*, 53 (6), 650-654
- Stokes, G.G. (1845) "On the theories of the internal friction of fluids in motion, and of the equilibrium and motion of elastic solids", *Cambridge Trans.*, 8, 287-305
- Storhas, W. (2003) "Bioverfahrensentwicklung", Wiley-VCH
- Sutherland, I.A. (2007a) "Recent progress on the industrial scale-up of counter-current chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1151 (1-2), 6-13
- Sutherland, I.A., Bourton, E.C., Hewitson, P. and Fisher, D. (2007b) "Promising results from a new centrifugal partition chromatography (CPC) instrument with a series of double-cascade chambers for enhanced mixing", Präsentation im Rahmen der 14th International Conference on Biopartitioning and Purification, Lisbon, Portugal, June 17th-20th

- Suzuki, M., Kamihira, M., Shiraishi, T., Takeuchi, H. and Kobayashi, T. (1995) "Affinity Partitioning of Protein A Using a Magnetic Aqueous Two-Phase System", *J. Ferment. Bioeng.*, 80 (1), 78-84
- Svoboda, J. (Ed.) (1987) "Magnetic Methods for the Treatment of Minerals", *Developments in Mineral Processing, vol. 8*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
- Takerkart, G., Segard, E. and Monsigny, M. (1974) "Partition of trypsin in two-phase systems containing a diamidino-[alpha], [omega]-diphenylcarbonyl poly (ethylene glycol) as competitive inhibitor of trypsin", *FEBS Lett.*, 42 (2), 218-220
- Tani, H., Kamidate, T. and Watanabe, H. (1997a) "Micelle-mediated extraction", *J. Chromatogr. A*, 780 (1-2), 229-241
- Tani, H., Kamidate, T. and Watanabe, H. (1998) "Aqueous Micellar Two-Phase Systems for Protein Separation", *Anal. Sci.*, 14, 875-888
- Tani, H., Matsuda, A., Kamidate, T. and Watanabe, H. (1997b) "Extraction of Proteins Based on Phase Separation in Aqueous Triblock Copolymer Surfactant Solutions", *Anal. Sci.*, 13, 925-929
- Tani, H., Suzuki, Y., Matsuda, A. and Kamidate, T. (2001) "Enhancement of the excluded-volume effect in protein extraction using triblock copolymer-based aqueous micellar two-phase systems", *Anal. Chim. Acta*, 429 (2), 301-309
- Tatara, E., Materna, K., Schaadt, A., Bart, H.-J. and Szymanowski, J. (2004) "Dynamics of nonionic surfactant-rich phase separation and recovery of dyes", *J. Colloid Interf. Sci.*, 277 (2), 443-449
- Tatara, E., Materna, K., Schaadt, A., Bart, H.-J. and Szymanowski, J. (2005) "Cloud Point Extraction of Direct Yellow", *Environ. Sci. Technol.*, 39, 3110-3115
- Teixeira Franco, T., Galaev, I.Y., Hatti-Kaul, R., Holmberg, N., Bülow, L. and Mattiasson, B. (1997) "Aqueous two-phase system formed by thermoreactive vinyl imidazole/vinyl caprolactam copolymer and dextran for partitioning of a protein with a polyhistidine tail", *Biotechnol. Tech.*, 11 (4), 231-236
- Teotia, S. and Gupta, M.N. (2001a) "Reversibly soluble macroaffinity ligand in aqueous two-phase separation of enzymes", *J. Chromatogr. A*, 923 (1-2), 275-280
- Teotia, S., Lata, R. and Gupta, M.N. (2001b) "Free Polymeric Bioligands in Aqueous Two-Phase Affinity Extractions of Microbial Xylanases and Pullulanase", *Protein. Expres. Purif.*, 22 (3), 484-488
- Terpe, K. (2003) "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems", *Appl. Microbiol. Biot.*, 60 (5), 523-533
- Terstappen, G.C. and Kula, M.-R. (1990) "Selective Extraction and Quantitation of Polyoxyethylene Detergents and its application in Protein Determination", *Anal. Lett.*, 23 (12), 2175-2193
- Terstappen, G.C., Ramelmeier, R.A. and Kula, M.-R. (1993) "Protein partitioning in detergent-based aqueous two-phase systems", *J. Biotechnol.*, 28 (2-3), 263-275
- Thornton, J.D. (Ed.) (1992) "Science and Practice of Liquid-Liquid Extraction", *Oxford Engineering Science Series, vol. 1*, Oxford University Press, Oxford
- Trakultamapatam, P., Scamehorn, J.F. and Osuwan, S. (2004a) "Scaling Up Cloud Point Extraction of Aromatic Contaminants from Wastewater in a continuous Rotating Disk Contactor. I. Effect of Disk Rotation Speed and Wastewater to Surfactant Ratio", *Separ. Sci. Technol.*, 39 (3), 479-499

- Trakultamupatam, P., Scamehorn, J.F. and Osuwan, S. (2004b) "Scaling Up Cloud Point Extraction of Aromatic Contaminants from Wastewater in a continuous Rotating Disk Contactor. II. Effect of Operating Temperature and Added Electrolyte", *Separ. Sci. Technol.*, 39 (3), 501-516
- van Berlo, M., Luyben, K.C.A.M. and van der Wielen, L.A.M. (1998) "Poly(ethylene glycol)-salt aqueous two-phase systems with easily recyclable volatile salts", *J. Chromatogr. B*, 711 (1-2), 61-68
- Veide, A., Lindback, T. and Enfors, S.-O. (1984) "Continuous extraction of [beta]-galactosidase from *Escherichia coli* in an aqueous two-phase system: effects of biomass concentration on partitioning and mass transfer", *Enzyme Microb. Tech.*, 6 (7), 325-330
- Walter, H., Brooks, D.E. and Fisher, D. (Eds.) (1985) "Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems", Academic Press, London
- Wan, Y., Lu, J. and Cui, Z. (2006) "Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration", *Separation and Purification Technology*
- Separation and Purification in the Food Industry*, 48 (2), 133-142
- Watanabe, H. and Tanaka, H. (1978) "A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol", *Talanta*, 25 (10), 585-589
- Wheelwright, S.M. (1989) "The design of downstream processes for large-scale protein purification", *J. Biotechnol.*, 11 (2-3), 89-102
- Wikström, P., Flygare, S., Gröndalen, A. and Larsson, P.-O. (1987) "Magnetic Aqueous Two-Phase Separation: A New Technique to Increase Rate of Phase-Separation, Using Dextran-Ferrofluid or Larger Iron Oxide Particles", *Anal. Biochem.*, 167, 331-339
- Wikström, P., Flygare, S. and Larsson, P.-O. (1989) "Magnetically Enhanced Aqueous Two-Phase Separation", in: Fisher, D. and Sutherland, I.A. (Eds.) Separations Using Aqueous Phase Systems, Pienum Publishing Corporation, pp. 445-461
- Wu, Y.-T., Pereira, M., Venancio, A. and Teixeira, J. (2001) "Separation of endopolygalacturonase using aqueous two-phase partitioning", *J. Chromatogr. A*, 929 (1-2), 23-29
- Xing, J. (Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe, 2006)
- Xu, Y., Souza, M., Pontes, M., Vitolo, M. and Pessoa Jr., A. (2003) "Liquid-Liquid Extraction of Enzymes by Affinity Aqueous Two-Phase Systems", *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 46 (4), 741-750
- Xu, Y., Vitolo, M., Northfleet Albuquerque, C. and Pessoa Jr., A. (2002) "Affinity partitioning of glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in aqueous two-phase systems with free triazine dye ligands", *J. Chromatogr. B*, 780 (1), 53-60
- Zaslavsky, B.Y. (1995) "Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications", Marcel Dekker Inc., New York
- Zaslavsky, B.Y., Mikheeva, L. and Chait, A. (2007) "Structure-focused proteomics: aqueous two-phase partitioning for discovery and monitoring protein biomarkers", Präsentation im Rahmen der 14th International Conference on Biopartitioning and Purification, Lisbon, Portugal, June 17th-20th
- Zimmels, Y. (1988) "Sedimentation", in: Gerhartz, W. (Ed.) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Zulqarnain, K. (1999) "Scale-Up of affinity separation based on magnetic support particles",
PhD-Thesis, University College London

8 Formelzeichen und Symbole

Naturkonstanten

c_0	$2,998 * 10^8 \text{ m s}^{-1}$	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
e	$1,602 * 10^{-19} \text{ C}$	Elementarladung
ϵ_0	$8,854 * 10^{-12} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$	Dielektrizitätskonstante des Vakuums
F	$96485,34 \text{ A s mol}^{-1}$	Faraday Konstante
g	$9,807 \text{ m s}^{-2}$	Erdbeschleunigung
k	$1,38065 * 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$	Boltzmann Konstante
μ_0	$1,257 * 10^{-6} \text{ V s A}^{-1} \text{ m}^{-1}$	Permeabilitätskonstante des Vakuums
R	$8,314472 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	Allgemeine Gaskonstante

Lateinische Formelzeichen

a	[m]	Ionenradius
A	[m ²]	Fläche
B	[Tesla]	Magnetische Flussdichte
c	[g L ⁻¹]	Massenkonzentration
c	[mol L ⁻¹]	Stoffmengenkonzentration
C	[J]	Maß für intermizellare Anziehungskräfte
d	[m]	Durchmesser
D_m	[-]	Demagnetisierungsfaktor
E	[J]	Energie
F	[N]	Kraft
G	[J]	Gibbssche Energie (=freie Enthalpie)
h	[m]	Dispersionshöhe
H	[A m ⁻¹]	Magnetische Feldstärke
H	[J]	Enthalpie
I	[A]	Stromstärke
J	[Tesla]	Polarisation

K	[-]	Verteilungs-(= Partitioning)Koeffizient
K	[-]	Korrekturfaktor
K_L	[g L ⁻¹]	Langmuir-Konstante
L	[m]	Länge
m	[kg]	Masse
M	[g mol ⁻¹]	Molgewicht
M	[A m ⁻¹]	Magnetisierung
M	[A m ² kg ⁻¹]	Spezifische Magnetisierung
n	[mol]	Stoffmenge
n	[-]	Windungszahl
P	[-]	Reinheit (von engl: Purity)
q	[mg g ⁻¹]	Beladung
q_{\max}	[mg g ⁻¹]	Maximale Beladung (für Langmuir-Gleichung)
Q	[J]	Wärme
R	[m]	Radius
R	[-]	Volumenverhältnis
S	[J K ⁻¹]	Entropie
t	[s]	Zeit (von engl: Time)
T	[K]	Absolute Temperatur
v	[m s ⁻¹]	Geschwindigkeit (von engl: Velocity)
V	[m ³]	Volumen
w	[kg kg ⁻¹]	Massenanteil
x	[-]	Kartesische Koordinate
x	[mol mol ⁻¹]	Molenbruch
Y	[-]	Ausbeute (von engl: Yield)
z	[-]	Ladungszahl

Griechische Formelzeichen

χ_1	[A m ² kg ⁻¹]	Anpassungsparameter
χ_2	[A m ⁻¹]	Anpassungsparameter
$\Delta\mu$	[J]	Maß für die Wachstumstendenz von Mizellen
ϕ	[-]	Volumenbruch
γ	[-]	Aktivitätskoeffizient
γ	[-]	Volumenverhältnis von Tensid und Solvent
γ	[m s ⁻²]	Beschleunigung im Magnetfeld
λ	[J mol g ⁻¹]	Anpassungsparameter für Bronstedt-Theorie
μ_r	[-]	Permeabilitätszahl
μ	[J]	Chemisches Potential
Π	[-]	Pi-Produkt; Dimensionslose Kennzahl
ϵ	[A s V ⁻¹ m ⁻¹]	Dielektrizitätskonstante
ϵ	[-]	Dispersphasenanteil
η	[kg m ⁻¹ s ⁻¹]	Viskosität
κ	[-]	Magnetische Volumenssuszeptibilität
κ	[-]	Viskositätsverhältnis
ρ	[kg m ⁻³]	Dichte
σ	[J m ⁻²]	Grenzflächenspannung bzw. -energie
ψ	[V]	Elektrisches Potential

Indizes

*	Thermodynamisches Gleichgewicht
0	Anfangswert
0	Konstante Größe bezogen auf Zeit und Raum
A	Auftrieb
Ads	Adsorbiert
Aq	Wässrige Phase (von engl: „Aqueous“)

B	Unterphase (von engl: „Bottom“)
biosp	Biospezifisch
C	Koerzitiv(-feldstärke)
C	Kontinuierliche Phase (von engl: „Continuous“)
CP	Cloud Point
D	Dispersphase
el	Elektrisch
G	Gewicht
Ges	Gesamt
hphob	Hydrophob
HR	Hadamard-Rybczynski bzw. interne Zirkulation in Tropfen
Ko	Koazervatphase (= mizellreich)
konf	Konfiguration bzw. Struktur
L	Langmuir
M	Magnetisch
max	Maximal
MEP	Magnetische Extraktionsphasen
min	Minimal
P	Partikel
PB	Partikel – Bottom
Ph	Phase bzw. Zielphase
PT	Partikel – Top
r	Relativ
R	Reibung
R	Remanenz
Reg	Regression
S	Schwarm
S	Sättigung

Sup	Überstand (von engl: „Supernatant“)
T	Oberphase (von engl: „Top“)
TB	Top – Bottom
W	Widerstand
W	Wasser
X	Komponente X in einem Mehrstoffsystem
Y	Komponente Y in einem Mehrstoffsystem

Dimensionslose Kennzahlen

Ar	Archimedes-Zahl	$Ar = \frac{g \cdot \Delta\rho \cdot \rho_c \cdot d^3}{\eta_c^2}$
c_w	Widerstandsbeiwert	$c_w = \frac{F_w}{\frac{1}{2} \cdot \rho_c \cdot v^2 \cdot A}$
Eö	Eötvos-Zahl	$Eö = \frac{g \cdot \Delta\rho \cdot d^2}{\sigma}$
M	Mortimer-Zahl	$M = \frac{g \cdot \Delta\rho \cdot \eta_c^4}{\rho_c^2 \cdot \sigma^3}$
Re	Reynolds-Zahl	$Re = \frac{v \cdot \rho_c \cdot d}{\eta_c}$
κ	Viskositätsverhältnis	$\kappa = \frac{\eta_D}{\eta_c}$

Abkürzungen

AA	Anionenaustausch
ADH	Alkohol Dehydrogenase
AGM	Alternating Gradient Magnetometer
AMTPS	Aqueous Micellar Two-Phase Systems
ATPS	Aqueous Two-Phase Systems
CCC	Counter Current Chromatography

CMC	Critical Micellar Concentration
CP	Cloud Point
DLA	Dye-Ligand-Affinität
EBA	Expanded Bed Adsorption
EO	Ethylenoxid
EOPO	Blockpolymer aus Ethylenoxid- und Propylenoxid-Einheiten
GFP	Green Fluorescent Protein
GGW	Gleichgewicht
HGMF	High Gradient Magnetic Fishing
HI	Hydrophobic Interaction
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTS	High Throughput Screening
IDA	Imminodiessigsäure
IMALT	Immobilized Metal-Ion Affinity Ligand Technology
KA	Kationenaustausch
Konz	Konzentration
Lys	Lysozym
MCA	Metall-Chelat-Affinität
MEP	Magnetische Extraktionsphasen
MP	Magnetpartikel
Ova	Ovalbumin
PEG	Polyethylenglycol bzw. Polyethylenoxid
PO	Propylenoxid
SOP	Standard Operation Procedure

9 Anhang

9.1 Verwendete Magnetfeldquellen

9.1.1 Elektromagnetspulen

Für Laborarbeiten kam eine wassergekühlte Kupferdrahtspule zum Einsatz (siehe auch Abbildung 4-7, Seite 95). Für Technikumsarbeiten wurde eine ungekühlte, in Eisen eingehaute Aluminiumband-Spule der Firma Steinert Elektromagnetbau, Köln (siehe auch Abbildung 4-23, Seite 114) verwendet. Eine Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Spulen-Kenndaten bietet Tabelle 9-1.

Tabelle 9-1: Kenndaten der verwendeten Elektromagnetspulen

Spule	R_{Bohrung}	R_i	$(R_i + R_a)/2$	L_{Bohrung}	L_{Wicklung}	n_{Wicklung}	I_{max}	B_{max}
	cm	cm	cm	cm	cm	[-]	A	Tesla
Labor	3,5	5,0	7,0	3,6	3,0	650	7,6	0,06
Technikum	6,25	7,15	17,5	18,4	12,9	680	83	0,42
Technikum (hypothetisch)	##	4,8	##	##	14,6	695	##	##

Aufgrund der Einhausung in magnetisierbarem Eisen erfolgt im Falle der Technikumsspule eine Aufkonzentrierung des Felds in die Raumlufthohlung der Spule hinein. Der durch die Aufkonzentrierung zu erwartende Feldverlauf wurde vom Hersteller mittels FEM-Berechnungen quantifiziert, zusätzlich wurde der Feldverlauf mittels der in Kapitel 2.3.2 vorgestellten Gleichungen unter Verwendung des Mittelwerts $(R_i + R_a / 2)$ von innerem und äußerem Spulenradius berechnet (siehe Abbildung 3-16, Seite 62), wobei sich aber erhebliche Abweichungen ergaben. Eine Anpassung der FEM-Daten mittels der Software TableCurveTM 2Dv3 (Jandel Scientific, Version 3 für Win32, 1989-1994) führte zu den für weitere Berechnungen verwendeten „hypothetischen“ Werten für die Spulengeometrie.

Wird der Feldverlauf jedoch mit dem inneren Spulenwicklungsradius R_i berechnet, sind die Abweichungen weit weniger stark ausgeprägt. Aus diesem Grund wurde für Magnetfeldberechnungen im Falle der Laborspule stets der innere Radius R_i verwendet, was auch meist zu einer guten Übereinstimmung mit den experimentell gefundenen Daten führte.

9.1.2 Permanentmagnete

Für Laborarbeiten kamen NdFeB-Handmagnete mit Magnetisierungen zwischen 0,4 und 1,0 Tesla zum Einsatz.

9.2 Proteinanalytik incl. Probenvorbereitung

9.2.1 Umgang mit Störeinflüssen der verwendeten nichtionischen Tenside

Aufgrund der aus der einschlägigen Literatur bekannten Störeinflüsse nichtionischer Tenside (wie Triton X-114) auf gängige Protein-Nachweismethoden wurden grundsätzlich zwei Wege eingeschlagen, um tensidhaltige Proben auf ihren Proteingehalt hin zu analysieren:

- 1) Falls die Nachweismethode bekanntermaßen eine gewisse Konzentration an Tensid ohne nennenswerte Beeinflussung vertrug, wurde die Probe verdünnt, bis die aus der Binodalkurve bekannte Tensidkonzentration unter dieser Marke lag.
- 2) Fiel das Protein durch die oben genannte Verdünnung unter die eigene Nachweisgrenze, wurde das Tensid mittels einer von Terstappen *et. al* ([Terstappen 1990], [Terstappen 1993]) adaptierten Methode unter Zuhilfenahme des Lösemittels 1,2-Dichlorethan extraktiv entfernt. Dazu wurden Probe und Lösemittel im Verhältnis 1:1 gemischt und für 10 min. geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte in einer Zentrifuge. Diese Methode konnte jedoch nicht für das Protein Albumin aus Hühnereiweiß verwendet werden, da dieses scheinbar selbst durch das Lösemittel extrahiert wird. Für Lysozym aus Hühnereiweiß war diese Methode geeignet, wobei bei quantitativen Messungen zu beachten war, dass die Protein-Konzentration in der nach erfolgter Lösemittel-Extraktion verbleibenden wässrigen Phase höher liegt als zuvor. Die Aufkonzentrierung kann jedoch bei Kenntnis des zuvor vorhandenen Tensidgehalts näherungsweise berechnet werden.

Nach den oben genannten Vorbehandlungsschritten erfolgte die Analytik tensidhaltiger Proben stets mittels Gelelektrophorese, da die eingesetzten Gele und Puffer von Tensidgehalten bis zu ca. 2 % w/w nicht beeinträchtigt wurden. Einzig im Falle der für das Protein GFP aus *E.Coli* angewandten Fluoreszenz-Spektroskopie war keine Vorbehandlung der Proben notwendig. Diese Methode zeigte bis zu getesteten Tensidgehalten von 50% w/w keine Beeinflussung des Messsignals. Andere photometrische Methoden konnten aufgrund erheblicher Störungen auch dann nicht eingesetzt werden, wenn die Tensidkonzentration nur sehr gering (<0,01% w/w) war.

Proben die nur eine einzelne Proteinsorte und kein Tensid enthielten, z.B. bei der Ermittlung von Adsorptionsisothermen, wurden mittels der, im Gegensatz zur Gelelektrophorese wesentlich weniger aufwendigen, UV-VIS-Spektroskopie gemessen.

Eine für das Protein Lysozym getestete quantitative Messmethode, die auf der enzymatischen Zerstörung der Zellwände von *Micrococcus lysodeikticus* beruht, konnte aufgrund unsys-

tematischer Störeinflüsse der Tenside auf die Messung sowie einer zu erwartenden Denaturierung nach Behandlung mit 1,2-Dichlorethan, nicht erfolgreich eingesetzt werden.

9.2.2 Gelelektrophorese

SDS-PAGE

Praktisch alle Geräte und Verbrauchsmaterialien im Zusammenhang mit SDS-PAGE (bis auf gängige Laborchemikalien) wurden von der Firma Invitrogen, Carlsbad CA, USA, bezogen.

Apparatur: XCell® SureLock, Invitrogen

Gele: Novex Precast Gels, NuPAGE Bis-Tris (10%) 15 Well, 1.0 mm, Invitrogen

Laufpuffer: MES 97,6g, Tris Base 60,6g, SDS 10g, EDTA 3g mit Wasser auf 500 mL aufgefüllt (20-fach konzentriert)

Probenpuffer: NuPAGE LDS-Sample Buffer, Invitrogen

Standard: Mark12® unstained Protein Standard, Invitrogen

Coomassie® Staining:

- Färbepuffer: 0.1% Coomassie® R-250 in 40% Ethanol und 10% Essigsäure
- Entfärbepuffer: 10% Ethanol und 7.5% Essigsäure

Rest jeweils VE-Wasser

Silver-Staining:

- SilverExpress® Staining Kit, Invitrogen

Quantitative Auswertung von SDS-PAGE Gelen

Vor ihrer quantitativen Auswertung wurden die Gele zunächst mit hoher Auflösung (2048 x 1536 Pixel) gescannt und im TIFF-Format gespeichert. Die computer-gestützte densitometrische Auswertung erfolgte mittels der Software LumiAnalyst® (v3.1.00.00, Roche Diagnostics GmbH / Media Cybernetics LP, 1999). Eine quantitative Auswertung erfolgte jedoch nur für Coomassie® gefärbte Gele, da sich nur hier ein linearer Zusammenhang zwischen der Proteinmenge und dem zugehörigen Messsignal (in Boehringer Light Units, BLU) herstellen ließ. Die Kalibrierung erfolgte hierbei stets neu auf jedem Gel, das ausgewertet wurde und zwar mit drei bis fünf Protein-Standards bekannter Konzentration.

9.2.3 Photometrische Methoden

UV-VIS-Spektroskopie

Die Messung von Proteingehalten in Einstoffsystemen ohne Tensidgehalt, z.B. bei Bestimmungen von Adsorptionsisothermen, erfolgte in einem Spektral-Fotometer HP 8453 der Firma Agilent Technologies, USA, bei einer Wellenlänge von 280 nm. Als Küvetten kamen Quarzglas-Küvetten der Firma Hellma, Müllheim, oder Plastikkuvetten aus PMMA der Marke Plastibrand® von Brand, Wertheim, zum Einsatz. Um zufällige Schwankungseinflüsse zu minimieren, wurde als Messwert stets die Differenz zwischen der Höhe des Peaks bei 280 nm und der Basislinie, meist bei 900 nm, verwendet.

Fluoreszenz-Spektroskopie

Zur Messung der GFP-Konzentrationen diente ein Fotometer der Marke Flouroskan Ascent der Firma Thermo LabSystems, Vantaa, Finnland. Die Messung erfolgte stets in 96-Wellplatten bei einem Füllvolumen von 200 µL pro well. Die Anregung erfolgt hier bei 485 nm und die Emission bei 538 nm Wellenlänge, die Ausgabe des Messsignals erfolgt in „counts“. Für Proteingehalte < 0,5 g/L steigt das Messsignal linear mit der Proteinkonzentration an, wobei der Kalibrierfaktor von 0,0002095 (g/L) / (count) aus einer Vorgängerarbeit [Ebner 2006] übernommen wurde

Weitere photometrische Methoden

Sowohl die für Proteingemische gängige photometrische Methode nach Bradford als auch die BCA-Methode konnten aufgrund zu starker Einflüsse der verwendeten Tenside Triton X-114 und Aethoxal B bereits in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen ($\approx 0,01$ % w/w) nicht eingesetzt werden.

9.3 Stoffdatenbestimmung der flüssigen Phasen

9.3.1 Dichte

Messungen von Flüssigphasen-Dichten erfolgten mit einem DMA 35 Handmessgerät der Firma Anton Paar GmbH, Österreich.

9.3.2 Viskosität

Messungen von Flüssigphasen-Viskositäten erfolgten mittels eines Rotations-Viskosimeters CSL 100 von Carri-Med Ltd., UK. Die Messung erfolgte stets in Doppelspalt-Einsätzen. Da die Messung der zuvor separierten Phasen von AMTPS eine hochgenaue Temperierung erforderte, konnte dieses Rheometer nicht für diesen Zweck eingesetzt werden. Schwankungen in der Temperatur führen bei AMTPS, durch die neue Lage im Phasendiagramm und damit den Wechsel zu einer neuen Konode, zur Ausscheidung frischer Dispersphase. Hier ist zu erwarten, dass das disperse System aufgrund veränderter rheologischer Eigenschaften eine gegenüber dem homogenen System veränderte Viskosität aufweist. Aus diesem Grund wurde die für kinetische Berechnungen notwendige Viskosität der wässrigen Phase anhand von Literaturdaten und eigener Messdaten geschätzt.

9.4 Charakterisierung der magnetischen Mikrosorbentien

9.4.1 Konzentrationsmessung

Zur Messung der Partikelkonzentration (in g/L) wurde zunächst ein Glasgefäß ($V = 1 \text{ mL}$) getrocknet und trocken ausgewogen. In dieses Gefäß wurde anschließend $100 \text{ }\mu\text{L}$ Partikel-Suspension (abgemessen mit einer Eppendorf-Pipette) eingefüllt. Diese Probe wurde nun mehrfach mit der Hilfe von Handmagneten mit VE-Wasser gewaschen, um gelöste Bestandteile zu entfernen. Danach wurde die Probe über Nacht bei 60°C im Trockenschrank getrocknet, am nächsten Tag erneut gewogen und aus der Differenz der Wägungen sowie dem Probevolumen, die Konzentration berechnet.

9.4.2 Magnetisierungskurve

Zur Bestimmung der Magnetisierungskurve wurde die Partikelprobe über mehrere Tage schonend im Ekksikator getrocknet. Anschließend wurden ca. 2 mg der Probe in ein Glasröhrchen ($d \approx 1 \text{ mm}$, $L \approx 5 \text{ mm}$) eingebracht und mit Sekundenkleber darin fixiert. Die Messung der Magnetisierungskurve erfolgte mittels eines Alternating Gradient Magnetometer (AGM) MICROMAG 2900 der Firma Princeton Measurement Corporation, USA.

Zur Anpassung der Magnetisierungskurve an Gl. 2.3-09 (siehe Kapitel 2.3.1) wurden die Daten des ersten Quadranten der erhaltenen Hystereseurve (Polarisation gegen Feldstärke, vgl. Abbildung 2-7, Seite 20) ausgelesen und mittels der Software TableCurveTM 2Dv3 (Jandel Scientific, Version 3 für Win32, 1989-1994) angepasst.

9.5 MathCad Quellcode zur Anpassung der theoretischen Binodalkurve

Theorie nach Blankschtein et al., aus Lam (2005) entnommen

Variablen:

Y = Molenbruch des Tensids in der Mizellarmen Phase

Z = Molenbruch des Tensids in der Mizellreichen Phase

Parameter:

C ist ein Mass für die intermizellaren Anziehungskräfte = $f(Y,Z)$

$\Delta\mu$ ist ein Mass für die Wachstumstendenz der Mizellen = $f(Y,Z)$

γ ist das Volumenverhältnis von Tensid und Solvent (Wasser)

T ist die absolute Temperatur

Konstanten:

k_B ist die Boltzmann-Konstante

M_w ist die Molmasse von Wasser

M ist die Molmasse des Tensids

Annähernde Annahmen:

- Das Volumenverhältnis der Moleküle γ entspricht etwa dem Molmassenverhältnis
- Die Dichte bleibt näherungsweise konstant

Tensid:

Triton X-114

$M = 521 \text{ g/mol}$

Zahlenwerte:

$M_w := 18$

$M := 521$

$k_B := 1.38 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$

Umrechnung Massenprozent - Molenbruch

$$X(w) := \frac{\frac{w}{M}}{\frac{w}{M} + \frac{1-w}{Mw}}$$

$$W(x) := \frac{x \cdot M}{x \cdot M + (1-x) \cdot Mw}$$

Umrechnung Grad Celsius - Kelvin

$$T(^{\circ}\text{C}) := 273.15\text{K} + ^{\circ}\text{C}$$

Bestimmungsgleichungen:

$$\gamma := \frac{M}{Mw}$$

$$C(Y,Z,^{\circ}\text{C}) := \frac{k_B \cdot T(^{\circ}\text{C})}{\gamma} \cdot \left(1 + \frac{3\gamma - 2}{3}\right) \cdot \left[2 \cdot (\sqrt{Y} + \sqrt{Z})^2 - 3\sqrt{Y \cdot Z}\right]$$

$$\Delta\mu(Y,Z,^{\circ}\text{C}) := k_B \cdot T(^{\circ}\text{C}) \cdot \ln \left[\frac{\left(\frac{6}{3\gamma - 2}\right)^2}{Y \cdot Z \cdot (\sqrt{Y} + \sqrt{Z})^6} \right]$$

Binodale aus Experiment:

Zeilen := 9

T wy wz

Mess :=	(26	0.0058	0.0575)
		27	0.0045	0.0688	
		28	0.0042	0.0798	
		29	0.0014	0.0945	
		30	0.0004	0.1122	
		31	0.0020	0.1141	
		32	0.0001	0.1346	
		34	0.0009	0.1480	
		36	0.0008	0.1680)

$$vx := \text{Mess}^{(0)} \cdot K$$

$$vCy := \begin{cases} \text{for } i \in 0, 1 \dots \text{Zeilen} - 1 \\ \text{Mat}_i \leftarrow \frac{C(X(\text{Mess}_{i,1}), X(\text{Mess}_{i,2}), \text{Mess}_{i,0} \cdot K)}{kB} \\ \text{return Mat} \end{cases}$$

$$v\Delta\mu y := \begin{cases} \text{for } i \in 0, 1 \dots \text{Zeilen} - 1 \\ \text{Mat}_i \leftarrow \frac{\Delta\mu(X(\text{Mess}_{i,1}), X(\text{Mess}_{i,2}), \text{Mess}_{i,0} \cdot K)}{kB} \\ \text{return Mat} \end{cases}$$

$$vx = \begin{pmatrix} 26 \\ 27 \\ 28 \\ 29 \\ 30 \\ 31 \\ 32 \\ 34 \\ 36 \end{pmatrix} K \quad vCy = \begin{pmatrix} 1.592 \\ 1.832 \\ 2.11 \\ 2.353 \\ 2.75 \\ 2.939 \\ 3.344 \\ 3.86 \\ 4.487 \end{pmatrix} K \quad v\Delta\mu y = \begin{pmatrix} 7.853 \times 10^3 \\ 7.814 \times 10^3 \\ 7.707 \times 10^3 \\ 8.005 \times 10^3 \\ 8.28 \times 10^3 \\ 7.68 \times 10^3 \\ 8.561 \times 10^3 \\ 7.724 \times 10^3 \\ 7.642 \times 10^3 \end{pmatrix} K$$

Lineare Regression über der Temperatur:

$$m1 := \text{neigung}(vx, vCy)$$

$$b1 := \text{achsenabschn}(vx, vCy)$$

$$m2 := \text{neigung}(vx, v\Delta\mu y)$$

$$b2 := \text{achsenabschn}(vx, v\Delta\mu y)$$

R²

$$C_{\text{reg}}(^{\circ}\text{C}) := kB \cdot (m1 \cdot ^{\circ}\text{C} + b1)$$

$$\text{korr}(vx, vCy)^2 = 0.998$$

$$\Delta\mu_{\text{reg}}(^{\circ}\text{C}) := kB \cdot (m2 \cdot ^{\circ}\text{C} + b2)$$

$$\text{korr}(vx, v\Delta\mu y)^2 = 3.395 \times 10^{-3}$$

Binodalkurve durch Lösen eines Gleichungssystems nichtlinearer Gleichungen:**Zunächst: iteratives Bestimmen der kritischen Punkte (von Hand)****Temperatur**

$$^{\circ}\text{C} := 24.43884\text{K}$$

$$\text{Tkrit unter: } T_{\min} := 24.43884$$

$$\text{Tkrit ober: } T_{\max} := 40$$

Schätzwerte

$$Y := X(\text{Mess}_0,1)$$

$$Z := X(\text{Mess}_0,2)$$

Berechnung

Vorgabe

$$\frac{C(Y,Z,^{\circ}\text{C})}{\text{kB}} = \frac{C_{\text{reg}}(^{\circ}\text{C})}{\text{kB}}$$

$$\frac{\Delta\mu(Y,Z,^{\circ}\text{C})}{\text{kB}} = \frac{\Delta\mu_{\text{reg}}(^{\circ}\text{C})}{\text{kB}}$$

$$\text{Vek} := \text{Suchen}(Y,Z)$$

Ergebnis / Ausgabe

$$w_y := W(\text{Vek}_0) \quad w_z := W(\text{Vek}_1)$$

$$\text{AUS} := \left(\begin{array}{c} ^{\circ}\text{C} \\ \text{K} \end{array} \quad w_y \quad w_z \right)$$

$$\text{AUS} = (24.43884 \quad 0.02039 \quad 0.02052)$$

Ausgabe in Tabelle**Lösungsblock:**

Vorgabe

$$\frac{C(Y,Z,^{\circ}\text{C})}{\text{kB}} = \frac{C_{\text{reg}}(^{\circ}\text{C})}{\text{kB}}$$

$$\frac{\Delta\mu(Y,Z,^{\circ}\text{C})}{\text{kB}} = \frac{\Delta\mu_{\text{reg}}(^{\circ}\text{C})}{\text{kB}}$$

$$\text{Lösung}(Y,Z,^{\circ}\text{C}) := \text{Suchen}(Y,Z)$$

$$\text{interv} := 0.1$$

```

Binodale(s, e, i) :=
  e1 ← floor(s + 1)
  count ← 0
  j ← s
  for j ∈ s, s + i .. e1
    °C ← j · K
    Matrixcount,0 ← j
    Matrixcount,1 ← W(Lösung(Y, Z, °C)0) · 100
    Matrixcount,2 ← W(Lösung(Y, Z, °C)1) · 100
    count ← count + 1
  k ← e1
  for k ∈ e1, e1 + i .. e
    °C ← k · K
    Matrixcount,0 ← k
    Matrixcount,1 ← W(Lösung(Y, Z, °C)0) · 100
    Matrixcount,2 ← W(Lösung(Y, Z, °C)1) · 100
    count ← count + 1
  °C ← e · K
  Matrixcount,0 ← e
  Matrixcount,1 ← W(Lösung(Y, Z, °C)0) · 100
  Matrixcount,2 ← W(Lösung(Y, Z, °C)1) · 100
  Matrix

```

Binodale(Tmin, Tmax, interv) =

	0	1	2
0	24.439	2.039	2.052
1	24.539	1.486	2.743
2	24.639	1.291	3.074
3	24.739	1.156	3.346
4	24.839	1.051	3.587
5	24.939	0.965	3.808
6	25	0.919	3.936
7	25.1	0.853	4.137
8	25.2	0.795	4.328
9	25.3	0.744	4.513
10	25.4	0.698	4.691
11	25.5	0.657	4.864
12	25.6	0.62	5.032
13	25.7	0.586	5.197
14	25.8	0.555	5.358
15	25.9	0.527	5.516

9.6 Aus der Arbeit bislang hervorgegangene Publikationen und Patente

Patente

- Franzreb, M. and Becker, J. (2007)
Deutsche Patentanmeldung Nr. 10 2007 020 220.4-44
"Verfahren zur magnetisch gestützten Extraktion"

Aufsätze in Zeitschriften

- Becker, J., Raffelt, S. und Franzreb, M. (2008)
"Untersuchungen zur Proteinseparation mittels magnetischer Mikrosorbentien in Kombination mit wässrigen Zweiphasen-Systemen"
Chemie Ingenieur Technik, 80 (6) 847 - 853
- Becker, J.S., Thomas, O.R.T. und Franzreb, M. (2008)
"Protein separation with magnetic adsorbents in micellar aqueous two-phase systems"
Separation and Purification Technology, 65 (1, 2) 46-53

Konferenzbeiträge

- Becker, J. und Franzreb, M. (2007)
"Proteinseparation aus feststoffhaltigen Suspensionen mittels magnetischer Extraktionsphasen"
Vortrag im Rahmen der „Dechema/GVC Vortrags- und Diskussionstagung 'Aufarbeitung biotechnologischer Produkte'“, Osnabrück, Germany, 13. – 16. Mai
- Becker, J. und Franzreb, M. (2007)
"A new concept to combine aqueous two-phase partitioning and magnetic separation for downstream processing of biological material"
Vortrag im Rahmen der „14th International Conference on Biopartitioning and Purification“, Lissabon, Portugal, 17. – 20. Juni
- Franzreb, M. und Becker, J. (2008)
"New hybrid process for bioproduct isolation by magnetic micro-adsorbents and magnetically enhanced aqueous two-phase partitioning"
Vortrag im Rahmen der „Recovery Conference XIII“ Québec City, Québec, Kanada, 22. – 27. Juni

9.7 Lebenslauf

Name

Jörg Sebastian Becker

* 22. März 1979 in Karlsruhe, deutsch

Beruf

(seit April 2008)

Evonik Röhm GmbH, Darmstadt

Verfahrensentwicklung im Bereich Methacrylat-Monomere

Schule und Studium

- 02/2005 – 03/2008 **Forschungszentrum Karlsruhe GmbH /
Universität Karlsruhe (TH)**
Anfertigung einer Dissertation über das Thema: „Einsatz magnetischer Extraktionsphasen zur Bioproduktaufarbeitung“ unter PD Dr.-Ing. habil M. Franzreb. Die Arbeit wurde gefördert innerhalb des 6. Rahmenprogramms der Europäischen Kommission als Teil des Projekts STREP 013469: „Magnetic Field Assisted Biomaterials Processing – NanoBioMag“
- 09/2004 **Universität Karlsruhe (TH)**
Diplom mit Auszeichnung bestanden (Gesamtnote: 1,2); Verleihung des Emil-Kirschbaum-Preises für herausragende Leistungen in der Diplomhauptprüfung
- 03 – 09/2004 **Forschungszentrum Karlsruhe GmbH /
Universität Karlsruhe (TH)**
Diplomarbeit über das Thema: „Regeneration schwermetallbeladener magnetischer Mikro-Anionenaustauscher mit Hilfe von Komplexbildnern“ unter Prof. W. H. Höll
- 04/2002 **Universität Karlsruhe (TH)**
Vordiplom; Gesamtnote: 2,1
- 10/1999 – 09/2004 **Universität Karlsruhe (TH)**
Studium des Chemieingenieurwesens
Hauptfächer: Technische Thermodynamik und Wassertechnologie
- 09/1998 – 09/1999 **Ersatzdienst, Arbeiterwohlfahrt Rastatt**
Mobiler sozialer Hilfsdienst
- 1989 - 1998 **Tulla Gymnasium Rastatt**
Abitur (Leistungsfächer: Mathematik, Chemie); Gesamtnote: 2,1

Praktika

10 – 12/2004 **Fortu® PowerCell GmbH, Karlsruhe**
Zehnwöchiges Praktikum im Bereich F&E; u.a. Erarbeitung eines
Konzepts zur fachgerechten Behandlung und Entsorgung der
Laborabwässer

Auslandsaufenthalte

01 – 03/2007 **University of Birmingham, UK**
Sechswöchiger Gastforscheraufenthalt im Rahmen der Dissertation im
Department for Biochemical Engineering unter Prof. O. R. T. Thomas

Berufliche Weiterbildung und Qualifikationen

Kurse	Projektmanagement Workshop (06/2006) Projektmanagement Grundlagen (11/2005) Intercultural Training (04/2005) Prozesssimulation mit Aspen Plus® (Sommersemester 2002)
Sprachen	Deutsch (Muttersprache); Englisch (fließend in Wort und Schrift); Französisch (Grundkenntnisse aus fünf Schuljahren)
IT-Kenntnisse	MS-Office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook); MathCad; Programmieren in C++
Sonstiges	Staatlich anerkannter Dirigent für Zupforchester (seit 2004) Staatlich anerkannter Ausbilder für Mandoline (seit 1997)