



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 6915

# **Einsatz magnetischer Separationsverfahren zur biotechnologischen Produktaufarbeitung**

**C. Hoffmann**

Institut für Technische Chemie

September 2003



Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6915

Einsatz magnetischer Separationsverfahren zur  
biotechnologischen Produktaufarbeitung

Christian Hoffmann

Institut für Technische Chemie

von der Fakultät für **Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik**  
der Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2003

**Impressum der Print-Ausgabe:**

**Als Manuskript gedruckt  
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

**ISSN 0947-8620**

## **Kurzfassung**

Magnetische Separationsverfahren können unter Verwendung spezieller magnetischer Mikrosorbentien in der biotechnologischen Produktaufarbeitung dafür eingesetzt werden, Bioproducte in *einem* Prozessschritt selektiv hinsichtlich gelöster *und* feststoffhaltiger Störstoffe aus einer komplex zusammengesetzten Biosuspension zu extrahieren. Hierfür wurden in der Arbeit geeignete Magnetseparatoren ausgelegt und konstruiert, die in der Lage sind, Partikeln im Mikrometermaßstab selektiv von Zellen und Zelldebris zu trennen. Mathematische Beschreibungen des Separationsvorgangs wurden entwickelt, Möglichkeiten zur Herstellung geeigneter magnetischer Mikrosorbentien aufgezeigt und das Separationsverhalten der Magnetseparatoren, die Sorptionseigenschaften der Partikeln und schließlich, an einem Beispiel, die Leistungsfähigkeit des Gesamtverfahrens charakterisiert.

Im Rahmen der Arbeit wurden die magnetischen Separationsverfahren der Hochgradientenmagnetseparation (HGMS), der Offenen-Gradienten-Magnetseparation (OGMS) sowie ein neuartiges Verfahren (Repulsive-Mode Magnetseparation, RMMS) zur Separation magnetischer Mikrosorbentien untersucht, optimiert und verglichen. Die HGMS wurde eingehender untersucht und für eine Verwendung in der Bioproduktaufarbeitung optimiert, wobei wesentliche Fortschritte hinsichtlich der erreichbaren Partikelkapazität und Rückspüleffizienz erzielt werden konnten. Um die Leistungsfähigkeit der Magnetseparation vorauszuberechnen, wurden zusätzlich theoretische Ansätze entwickelt und mit experimentellen Daten korreliert.

Magnetische Mikrosorbentien wurden im Gramm-Maßstab hergestellt und für die Verwendung als magnetische Affinitätsorbentien optimiert. Die Sorptionseigenschaften, wie Kapazität und Kinetik, der hergestellten Partikeln wurden anhand weniger Modellproteine untersucht, wobei es gelang, hohe Sorptionskapazitäten und Affinitäten zu erzielen. Schließlich wurde aufbauend auf den HGMS-Untersuchungen eine optimierte Anlage entwickelt und charakterisiert, die eine Integration der Affinitätsorption, der Magnetseparation und der erforderlichen Wasch- und Elutionsschritte ermöglicht. Unter Verwendung einer *E. coli*-Kultur wurde die Leistungsfähigkeit dieses neuartigen Separationssystems für die Bioproduktaufreinigung demonstriert, wobei eine komplette Zellabtrennung und hohe Produktreinheit des Zielmoleküls erreicht wurden. Mit der vorliegenden Arbeit wurden somit wesentliche Voraussetzungen dafür geschaffen, magnetische Separationsverfahren als neuartigen Verfahrensschritt in der primären industriellen Bioproduktaufarbeitung einsetzen zu können.

## **Use of magnetic separation processes for the purification of bio-products**

### **Abstract**

Magnetic separation processes can be used in combination with magnetic adsorbent particles to purify bio-products in a *single* processing step from dissolved *and* particulate impurities out of a complex biosuspension. In this work, different types of magnetic separators have been designed and built which were able to selectively separate micron-sized particles from cells and cell debris. Mathematical separation models have been developed and possibilities for the manufacture of appropriate magnetic adsorbents have been shown. The magnetic separation performance, adsorption properties and the performance of the overall process have been characterized.

The different magnetic separation technologies of High Gradient Magnetic Separation (HGMS), Open Gradient Magnetic Separation (OGMS) and of a new magnetic separation technology Repulsive Mode Magnetic Separation (RMMS) have been characterized, optimized and compared for their separation performance. HGMS has been investigated in more detail and optimized for the purification of biomolecules. Using HGMS particle holding capacity as well as rinsing efficiency have been considerably improved. In order to predict the magnetic separation performance, theoretical models have been developed and were correlated with experimental data.

Magnetic adsorbents particles were produced in gram scale and were optimized for use as magnetic affinity adsorbents. Adsorption properties of the produced particles including capacity and kinetics, were characterized using model proteins. High adsorption capacities and affinities were achieved with the fabricated magnetic particles. Based on the HGMS results an optimized process was developed and characterized that allows an integration of adsorption, magnetic separation and the necessary wash and elution steps. The performance of this novel separation system was demonstrated using an *E.coli* cell culture. A complete cell removal and high product purity could be achieved using the optimized process developed in this work. In conclusion, important preconditions have been created in this work in order to establish magnetic separation technology in primary industrial downstream processing of bio-products.



# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis, Zusammenfassung

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	
2.1	Grundproblem	4
2.2	Konventionelle Verfahren zur Bioproduktaufarbeitung	4
2.3	Direkte Bioproduktabtrennung aus rohen Biosuspensionen	6
2.3.1	Expanded Bed Adsorption (EBA)	7
2.3.2	Magnetically Stabilized Fluidized Bed (MSFB)	8
2.3.3	Aqueous Two Phase Systems (ATPS)	9
2.3.4	Magnetseparation in der Biotechnologie	9
2.4	Immobilisierte Affinitätsliganden-Technologie (IALT)	11
2.4.1	Einleitung	11
2.4.2	Das Prinzip	12
2.4.3	Die Matrix	13
2.4.4	Aktivierungsmethoden	15
2.4.5	Immobilisierung des Liganden	17
2.4.6	Affinitätsliganden	18
2.4.6.1	Allgemeines	18
2.4.6.2	Monospezifische Affinitätssorbentien	19
2.4.6.3	Gruppenspezifische Affinitätssorbentien	20
2.4.7	Elution des Zielmoleküls	24
2.4.8	Poröse und kompakte Matrices	25
2.4.8.1	Stofftransport und Kapazität	25
2.4.8.2	Fouling	26
2.5	Grundlagen des Magnetismus und der Magnetseparation	27
2.5.1	Definition magnetischer Kenngrößen	27
2.5.2	Physikalische Grundlagen der Magnetseparation	31
2.5.3	Grundprinzip der Hochgradientenmagnetseparation (HGMS)	31
2.5.4	Grundprinzip der Offenen-Gradienten Magnetseparation (OGMS)	33
2.5.5	Grundprinzip der Repulsive-Mode Magnetseparation (RMMS)	34
<b>3</b>	<b>Konstruktiver Teil</b>	
3.1	Verwendete Magnetfeldquellen	37
3.1.1	Supraleitende Solenoidspule	37
3.1.2	Permanentmagnet	39
3.2	Zylindrischer HGMS-Laborseparator für longitudinale Anordnung	40
3.3	HGMS-Typ HGF-10	41
3.3.1	Berechnung der Magnetfeldverteilung	42
3.3.2	HGF-10 Separationsmatrix	44
3.3.3	Filtergehäuse und Ultraschalleinheit	45
3.4	OGMS-Separatoren	46
3.4.1	OGMS-Laborseparator	46
3.4.2	OGMS-Separator mit Schlammräumer-Konstruktion	47
3.5	Repulsive-Mode Magnetseparator (RMMS)	48
3.5.1	Konstruktion des RMMS-Laborseparators	48
3.5.2	Auslegung der RMMS-Trennwandposition	49
3.5.3	Auslegung der RMMS-Separatorlänge	51

## 4 Theoretischer Teil

4.1	Durchbruchskurven für zyklisch arbeitende Magnetseparatoren (HGMS)	52
4.1.1	Bestimmung des Einfangradius eines Einzeldrahtes	52
4.1.2	Berechnung von Filterdurchbruchskurven	53
4.2	Kennzahl zur Charakterisierung der OGMS	54
4.3	Massenbilanzen für kontinuierliche Magnetseparatoren (OGMS, RMMS)	57
4.3.1	Bilanz für eine kontinuierliche Separationsstufe	57
4.3.2	Bilanz für zwei kontinuierliche Separationsstufen	57
4.3.3	Bilanz für zwei kontinuierliche Separationsstufen mit Rückführung	58
4.4	Modellrechnungen für die RMMS	60
4.4.1	Feldverteilung um einen zylindrischen Einzeldraht	60
4.4.2	Feldverteilung um zwei magnetisierte Drähte (Doppeldraht)	62
4.4.2.1	Feldberechnung durch Superposition	62
4.4.2.2	Feldberechnung durch Finite-Element-Methode (FEM)	63
4.4.3	Partikelbahnen im RMMS	65
4.4.4	Berechnung des Abscheidegrads	67
4.4.4.1	Maximaler Abscheidegrad	68
4.4.4.2	Gesamtabscheidegrad	70
4.4.4.3	Einfluss der Feldstärke auf den Abscheidegrad	74
4.4.4.4	Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf den Abscheidegrad	75
4.4.4.5	Einfluss der Partikelgröße auf den Abscheidegrad	76

## 5 Experimenteller Teil

5.1	Chemikalien	77
5.2	Herstellung von magnetischen IMALT-Mikrosorbentien	77
5.2.1	Magnetische Partikelseparation	77
5.2.2	Herstellung von synthetischem Magnetit (Mm)	77
5.2.3	Herstellung aminosilanisierter Magnetbeads (MJH)	78
5.2.4	PGA-Beschichtung von aminosilanisierten Magnetbeads	79
5.2.5	Immobilisierung von IDA an PGA-beschichtete Magnetpartikeln	80
5.2.6	Epoxy-aktivierte Polyvinylalkohol-Magnetbeads (PVA)	82
5.2.7	Synthese von magnetischen Polymermikropartikeln	82
5.2.7.1	Herstellung eines magnetischen Gels	82
5.2.7.2	Herstellung eines magnetischen Fluids	83
5.2.7.3	Emulsionspolymerisation	83
5.2.7.4	Funktionalisierung der emulsionspolymerisierten Magnetbeads	83
5.2.8	MagPrep Silica Beads	84
5.2.9	Beladung von IDA-funktionalisierten Magnetpartikeln mit Cu(II)-Ionen	84
5.3	Partikeleigenschaften	85
5.3.1	Größe, Form und spezifische Oberfläche der Partikeln	85
5.3.2	Sedimentationsmessungen	87
5.3.3	pH-Werteinfluss auf die Sedimentationsgeschwindigkeit	89
5.3.4	Magnetische Eigenschaften	90
5.3.5	Zusammenfassung der Partikeleigenschaften	93
5.4	Verwendete Modellproteine	93
5.5	Bestimmung von Sorptionsisothermen	94
5.5.1	Beladung mit Metallionen	94
5.5.2	Sorption von Protein	94
5.5.3	Elution gebundenen Proteins	94
5.6	Magnetseparation	95



---

5.6.1	Bestimmung der Partikelkonzentration .....	95
5.6.2	Labor-HGMS-Anlage.....	96
5.6.3	HGMS-Anlage HGF-10 .....	97
5.6.4	HGMS-Versuche und Auswertung.....	98
5.6.4.1	Versuchsdurchführung.....	98
5.6.4.2	Filterdurchbruchskurven.....	99
5.6.4.3	Ermittlung des Abscheidegrads .....	99
5.6.4.4	Ermittlung der Filterbeladung.....	100
5.6.4.5	Filterkoeffizient .....	100
5.6.5	OGMS-Anlage.....	100
5.6.6	RMMS-Anlage .....	100
<b>6</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	
6.1	Hochgradientenmagnetseparation (HGMS).....	101
6.1.1	Labor-HGMS.....	101
6.1.1.1	Filtermatrix und Reproduzierbarkeit.....	101
6.1.1.2	Einfluss der Filterlänge .....	104
6.1.1.3	Einfluss der Partikelkonzentration .....	106
6.1.1.4	Einfluss der Filtergeschwindigkeit.....	108
6.1.1.5	Einfluss der magnetischen Flussdichte .....	110
6.1.1.6	Filter-Konfigurationen .....	111
6.1.1.7	Verschiedene Partikeltypen .....	112
6.1.1.8	Partikelwiedergewinnung .....	114
6.1.1.9	HGMS von Hefe-/Magnetit-Suspensionen .....	117
6.1.2	Integriertes HGMS-System HGF-10 .....	121
6.1.2.1	Vergleich zwischen HGF-10 und Labor-HGMS .....	121
6.1.2.2	Partikelwiedergewinnung (HGF-10).....	122
6.2	Offene-Gradienten Magnetseparation (OGMS).....	124
6.2.1	Absatzweise betriebene OGMS (ohne Konzentratabzug) .....	124
6.2.1.1	Variation der Einbauhöhe .....	124
6.2.1.2	Einfluss der Filtrationsgeschwindigkeit und der Flussdichte.....	125
6.2.1.3	Verschiedene Partikelsorten.....	127
6.2.2	Kontinuierliche Separation .....	131
6.2.2.1	OGMS-Separator mit Schlammräumer-Konstruktion .....	132
6.2.3	Separation von Magnetit von Hefezellen.....	133
6.3	Repulsive-Mode Magnetseparation (RMMS).....	135
6.3.1	Qualitative Überprüfung des Modells .....	135
6.3.2	Einfluss der Partikelkonzentration.....	135
6.3.3	Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit.....	136
6.3.4	Einfluss des Konzentratanteils.....	139
6.3.5	Kaskadierung von zwei Separationsstufen .....	141
6.4	Proteinsorption an magnetische IMA-Mikrosorbentien.....	143
6.4.1	Sorption von Kupferionen an IMA-Träger.....	143
6.4.2	Sorption von Hämoglobin (Hb).....	144
6.4.2.1	Sorptionskinetik .....	144
6.4.2.2	Gleichgewicht der Sorption von Hämoglobin.....	147
6.4.2.3	Nicht-selektive Bindung von Hämoglobin.....	150
6.4.2.4	Elution von Hämoglobin.....	151
6.4.2.5	Zusammenfassung der Hämoglobin-Experimente .....	153
6.4.3	Sorption von $\alpha$ -Chymotrypsinogen .....	154
6.4.4	Sorption von Hb/Chy-Mischungen.....	155

---

6.4.5	Aufreinigung von rekombinantem his-getagtem GFP aus E.coli-Homogenisat.....	156
6.4.5.1	Sorption und Elution aus zellfreiem E.coli-Homogenisat.....	156
6.4.5.2	Aufreinigung aus ungeklärtem E.coli-Homogenisat.....	162
6.4.5.3	Automatisierte Aufreinigung von GFP mittels des HGF-10-System.....	164
7	<b>Fazit und Ausblick</b> .....	166
8	<b>Anhang</b>	
8.1	Berechnungen.....	169
8.1.1	Herleitung der magnetischen Geschwindigkeit.....	169
8.1.2	Trajektorie für einen Einzeldraht in axialer Anordnung.....	170
8.1.3	Feldberechnungen über Finite-Element-Methode (FEM).....	172
8.2	Verwendete Modellproteine.....	173
8.2.1	Hämoglobin.....	173
8.2.2	Chymotrypsinogen.....	174
8.2.3	Green Fluorescent Protein (GFP).....	174
8.2.3.1	Allgemeines.....	174
8.2.3.2	GFP-Fermentation in E.coli.....	175
8.2.4	Proteinanalytik.....	176
8.2.4.1	Gesamtproteinbestimmung.....	176
8.2.4.2	Gel-Elektrophorese.....	176
8.2.4.3	Hämoglobin-Bestimmung.....	177
8.2.4.4	GFP-Bestimmung.....	178
8.3	Formelzeichen und Symbole.....	179
8.4	Verwendete Abkürzungen.....	181
8.5	Literaturverzeichnis.....	182

„Das ist so die Art der Natur: Sie übt sich an kleinen Dingen und bietet im Geringsten Beispiele für Gewaltigstes.“  
*Lucius Annaeus Seneca, 4-65 n. Chr., römischer Philosoph*

## Zusammenfassung

Magnetische Separationsverfahren können unter Verwendung spezieller magnetischer Mikrosorbentien in der biotechnologischen Produktaufarbeitung („Downstream Processing“) dafür eingesetzt werden, Bioprodukte in *einem* Prozessschritt selektiv hinsichtlich gelöster *und* feststoffhaltiger Störstoffe aus einer komplex zusammengesetzten Biosuspension zu extrahieren. Da bis heute allerdings nur wenige ernsthafte Versuche unternommen wurden, ein Upscaling dieses im Labormaßstab routinemäßig eingesetzten Verfahrens der „Magnetoaffinitätsextraktion“ durchzuführen, wurden in dieser Arbeit die Voraussetzungen hierfür erarbeitet. Ziel war die Entwicklung eines neuartigen Verfahrens, das durch die Kombination von Magnetseparationschritten und hochselektiven Affinitäts-Sorptionstechniken eine Integration mehrerer konventioneller Prozessstufen der primären Bioproduktaufarbeitung wie Fest-Flüssig-Trennung, Aufkonzentrierung und Aufreinigung ermöglicht.

Hierfür wurden im Rahmen der Arbeit geeignete Magnetseparatoren ausgelegt und konstruiert, die in der Lage sind, Partikeln im Mikrometermaßstab selektiv von Zellen und Zelldebris im gleichen Größenbereich zu trennen (siehe Kapitel 3), mathematische Beschreibungen des Separationsvorgangs entwickelt (Kapitel 4), Möglichkeiten zur Herstellung geeigneter magnetischer Mikrosorbentien aufgezeigt (Kapitel 5) und das Separationsverhalten der Magnetseparatoren, die Sorptionseigenschaften der Partikeln und schließlich, an einem Beispiel, die Leistungsfähigkeit des Gesamtverfahrens charakterisiert (Kapitel 6).

Im Rahmen der Arbeit wurden die verschiedenen bereits bekannten magnetischen Separationsverfahren, wie die Hochgradientenmagnetseparation (HGMS) und die Offene-Gradienten-Magnetseparation (OGMS) zur Separation magnetischer Mikrosorbentien anhand eines Modellsystems mit Partikelgrößen unterhalb 3  $\mu\text{m}$  untersucht, optimiert und verglichen. Da das mit preiswerten Permanentmagneten realisierbare HGMS-Prinzip nur halbkontinuierlich umgesetzt werden kann und das vollkontinuierliche OGMS-Verfahren den Einsatz von aufwendigen und teuren Supraleitermagnetspulen erforderlich macht, wurde zusätzlich ein neuartiges Verfahren entwickelt, das eine vollkontinuierliche Separation unter Verwendung von Permanentmagneten ermöglicht („Repulsive-Mode Magnetseparation“, RMMS).

In den experimentellen Untersuchungen der drei Verfahren erwies sich die HGMS aufgrund ihrer hohen Abscheideeffizienz, der hohen möglichen Filtergeschwindigkeiten und des einfachen und kostengünstig realisierbaren Aufbaus trotz ihres diskontinuierlichen Charakters für eine erste industrielle Einführung des Verfahrens als am Aussichtsreichsten. Den aufwendigeren Verfahren der OGMS und RMMS werden aber für solche Anwendungen ein hohes Potential zugemessen, bei denen das Grundprinzip der magnetischen Affinitätsextraktion in großem Prozessmaßstab in ein vollkontinuierliches Verfahren einschließlich kontinuierlicher Fermentation umgesetzt werden soll.

Die HGMS wurde in Folge dessen eingehender untersucht und für eine Verwendung in der Bioproduktaufarbeitung optimiert, wobei wesentliche Fortschritte hinsichtlich der erreichbaren Partikelkapazität im Vergleich zu jüngsten Veröffentlichungen erzielt werden konnten. Durch die Anwendung einer neuartigen ultraschall-unterstützten Kreislauf-Filterrückspülung konnten weiterhin klare Verbesserungen hinsichtlich der Partikelwiedergewinnung nach erfolgter HGMS erzielt werden.

Um die Leistungsfähigkeit der Magnetseparation vorausberechnen und den Einfluss der physikalischen Grundgrößen quantifizieren zu können, wurden zusätzlich theoretische Ansätze zur Beschreibung der Vorgänge in den verwendeten Magnetseparatoren entwickelt. Insbesondere für das neuartige RMMS-Verfahren wurden theoretische Simulationsmethoden entwickelt, die eine Vorausberechnung des Abscheidegrads ermöglichen. Alle drei untersuchten Verfahren lassen sich hinsichtlich der Abhängigkeit ihrer Einflussgrößen gut mathematisch beschreiben. Durch Verwendung dimensionsanalytisch gebildeter Kennzahlen lässt sich die Anzahl der Einflussparameter dabei reduzieren. Eine vollständige Vorausberechnung des Separationsverhaltens ohne Verwendung experimenteller Daten erscheint jedoch zweifelhaft, da insbesondere eine mögliche Partikelagglomeration und die Größenverteilungsfunktion der entstandenen Agglomerate unter Einfluss des Magnetfelds, der Strömungsbedingungen und des komplex zusammengesetzten Mediums inklusive der interpartikulären Wechselwirkungen nicht ohne weitere Anpassungsparameter beschrieben werden können. Lediglich für die HGMS erhält man für die in der Arbeit untersuchten Bedingungen eine hinreichend gute Übereinstimmung zwischen den theoretisch und experimentell ermittelten Abscheidegraden auch ohne Anpassungsparameter. Allerdings lässt sich die Kapazität des Separators nur bei bekannter Porosität der Anlagerungsbereiche abschätzen, die z.B. durch ein einfaches HGMS-Experiment ermittelt werden kann. Für die OGMS und die RMMS ist der effektive Partikelagglomeratdurchmesser als Anpassungsparameter zu verstehen, der jedoch für ein gewähltes Partikel-Fluid-System als konstant angenommen werden und ebenfalls durch ein einzelnes Experiment bestimmt werden kann.

Aufgrund der erheblichen Kosten kommerziell erhältlicher magnetischer Mikrosorbentien wurden eigene magnetische Mikrosorbentien im Gramm-Maßstab hergestellt und für die Verwendung als magnetische Affinitätssorbentien optimiert. Aufgrund der zahlreichen Anforderungen, die an die Partikeln gestellt werden müssen (wie beispielsweise eine Partikelgröße im Mikrometerbereich bei enger Größenverteilung, eine hohe Sättigungsmagnetisierung ohne Remanenz, eine hohe Selektivität und Bindekapazität für das Zielprotein, eine gute Biokompatibilität und geringe Foulinganfälligkeit), wurden mehrere Partikelarten auf mineralischer und Polymer-Basis hergestellt und deren Oberflächen funktionalisiert. Als breit einsetzbare Affinitätsliganden wurden dabei Metallchelatabbildner ausgewählt und mittels geeigneter chemischer Methoden kovalent auf die Partikeloberflächen immobilisiert.

Die Sorptionseigenschaften (wie Kapazität und Kinetik) der hergestellten Partikeln wurden anhand weniger Modellproteine untersucht, wobei es gelang, hohe Sorptionskapazitäten und Affinitäten für Rinder-Hämoglobin (Hb) zu erzielen. In weitergehenden Untersuchungen

wurde ein in einer rekombinanten *E. coli*-Kultur exprimiertes Fusionsprotein (GFP) als Modellsystem untersucht, das eine speziell für die Aufreinigung in die Proteinstruktur eingefügte Histidin-Sequenz („His-Tag“) besitzt und exemplarisch für eine Vielzahl rekombinanter Proteinprodukte angesehen werden kann. Hierbei wurden hohe Sorptionskapazitäten und Affinitäten zu den magnetischen Trägerpartikeln gefunden und hohe Aufreinigungsfaktoren und Produktausbeuten bei gleichzeitiger Aufkonzentrierung des Produkts erzielt.

Schließlich wurde aufbauend auf den HGMS-Untersuchungen eine optimierte Anlage entwickelt und charakterisiert, die eine Integration der Affinitätssorption, der Magnetseparation und der erforderlichen Wasch- und Elutionsschritte ermöglicht. Hierfür wurde ein im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Forschungszentrum Karlsruhe und der Firma Elektromagnetbau Steinert GmbH entwickelter, neuartiger Hochgradientenmagnetseparator eingesetzt. Dieser HGMS basiert auf der Verwendung eines Permanentmagneten, ist scale-up-fähig, transportabel und besitzt die für einen Permanentmagneten ungewöhnliche Eigenschaft, das Magnetfeld ein- und ausschalten zu können. Anhand des Beispiels unter Verwendung einer *E. coli*-Kultur wurde die Leistungsfähigkeit dieses neuartigen Separationssystems für die Bioproduktaufreinigung demonstriert, wobei eine komplette Zellabtrennung und hohe Produktreinheit des Zielmoleküls erreicht wurden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden somit wesentliche Voraussetzungen dafür geschaffen, magnetische Separationsverfahren als neuartigen Verfahrensschritt in der primären industriellen Bioproduktaufarbeitung einsetzen zu können. Damit steht ein neuartiges Verfahren zur Verfügung, das bisher unabhängige Grundoperationen des Downstream Processings, wie die Zellabtrennung, die Reduktion des Ausgangsvolumens und die Erzielung einer hohen Produktreinheit, in sich vereint.

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Mehrheit biotechnologischer Prozesse für die Herstellung pharmazeutischer oder diagnostischer Produkte beinhaltet die Reinigung („Downstream Processing“) von Proteinen und Peptiden aus einer Vielzahl von Quellen. Dazu zählen Kulturmedien mit Bakterien, Hefen und tierischen Zellen. Insbesondere in der Produktion pharmazeutischer und technischer Proteine ist die Aufarbeitung durch die Notwendigkeit vieler aufeinanderfolgender „Unit operations“ gekennzeichnet, was einerseits maßgeblich zu den Investitions- und Betriebskosten beiträgt, in hohem Maße aber auch die Gesamtausbeute bezüglich des Zielproteins verringert. Aus diesem Grund können bis zu 80 % der Gesamtkosten einer Proteinproduktion durch die Aufreinigung verursacht werden. Insbesondere in der Anfangsphase der Aufarbeitungskette von Bioprodukten besteht dabei ein allgegenwärtiges Problem in der Isolierung der löslichen Zielsubstanz aus einer komplexen, feststoffhaltigen Mischung, was sich in signifikanten Verlusten der Gesamtausbeute niederschlagen kann.

Zahlreiche aktuelle Forschungen der Bioverfahrenstechnik gehen daher in die Richtung so genannter integrierter Aufbereitungsverfahren, die versuchen ursprünglich unabhängige Verfahrensschritte in einer gemeinsamen Stufe zu kombinieren. Hierzu zählen die „Expanded Bed Adsorption“ (EBA), die wässrige Zweiphasenextraktion (ATPS) und die Magnetseparation (HGMS) unter Verwendung spezieller magnetischer Affinitätssorbentien (siehe *Kapitel 2*). Diese neuartigen Techniken haben zum Ziel, die lösliche Zielkomponente (z.B. ein Protein) in der Anfangsphase des Downstream Processings in *einem* Schritt aus einer komplexen, feststoffhaltigen Mischung (i) von Feststoffen und Kontaminationen zu befreien, (ii) stark aufzukonzentrieren und (iii) die Produktreinheit bereits deutlich zu erhöhen.

Während die EBA und die ATPS bereits ihren Weg in die industrielle Anwendung zur Herstellung von Bioprodukten gefunden haben, sind auf Magnetpartikeln basierende Separationen bis heute ausschließlich eine verbreitete und routinemäßig angewandte Laboranwendung zur einfachen, schnellen und schonenden Aufreinigung einer großen Anzahl feststoffhaltiger Proben für vorrangig analytische Zwecke. Durch Immobilisierung so genannter Affinitätsliganden auf magnetischen Partikeln und Einmischen der entstandenen magnetischen Affinitätssorbentien in die Probe erreicht man hierbei die hochselektive Sorption einer Zielkomponente aus einer rohen, zellhaltigen Biosuspension. Danach können die Mikrosorbentien mittels einfacher Handmagnete magnetisch aus der Suspension separiert und nach Entfernung des unerwünschten Überstands die Zielkomponente in konzentrierter und reiner Form eluiert werden. Hierdurch eröffnet sich die Möglichkeit, Biomoleküle in einem Schritt selektiv hinsichtlich gelöster und feststoffhaltiger Störstoffe aus einer komplexen Biosuspension zu extrahieren.

Bis heute wurden allerdings nur wenige ernsthafte Versuche unternommen, ein Upscaling dieses Verfahrens der „Magnetoaffinitätsextraktion“ unter Verwendung von aus der Mineralaufarbeitung lange bekannter und dort im Tonnen-Maßstab angewandter Magnetseparationsverfahren durchzuführen.

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Voraussetzungen für ein neuartiges Verfahren zu entwickeln, das durch die Kombination von Magnetseparations-schritten und hochselektiven Affinitäts-Sorptionstechniken eine Integration mehrerer konventioneller Prozessstufen der primären Bioproduktaufarbeitung wie Fest-Flüssig-Trennung, Aufkonzentrierung und Aufreinigung ermöglicht. Zu den benötigten Voraussetzungen zählen die Auslegung und Konstruktion geeigneter Magnetseparatoren, die in der Lage sind, Partikeln im Mikrometermaßstab selektiv von Zellen und Zell-Debris im gleichen Größenbereich zu trennen (siehe *Kapitel 3*), die mathematische Beschreibung des Separationsvorgangs (*Kapitel 4*), das Aufzeigen von Möglichkeiten zur Herstellung geeigneter magnetischer Mikropartikeln (*Kapitel 5*) sowie die Charakterisierung der Sorptionseigenschaften der Partikeln, der Separationseffizienzen der Separatoren und schließlich, an einem Beispiel, der Leistungsfähigkeit des Gesamtverfahrens (*Kapitel 6*).

Im Rahmen der Arbeit sollten die verschiedenen bereits bekannten magnetischen Separationsverfahren, wie die Hochgradientenmagnetseparation (HGMS) und die Offene-Gradientenmagnetseparation (OGMS) zur Separation magnetischer Mikrosorbentien anhand eines Modellsystems mit Partikelgrößen unter  $3\ \mu\text{m}$  untersucht, optimiert und verglichen werden. Während dabei das mit preiswerten Permanentmagneten realisierbare HGMS-Prinzip nur halbkontinuierlich umgesetzt werden kann, hat das vollkontinuierliche OGMS-Verfahren den Nachteil, dass es den Einsatz von vergleichsweise aufwendigen und teuren Supraleitermagnetspulen erforderlich macht. Es wurde deshalb zusätzlich die Entwicklung ein neuartiges Verfahren angestrebt, das eine vollkontinuierliche Separation unter Verwendung von Permanentmagneten ermöglicht.

Zusätzlich bestand der Wunsch, mit theoretischen Ansätzen zur Beschreibung der Vorgänge in den verwendeten Magnetseparatoren, die Separationseffizienz vorausberechnen zu können und den Einfluss der physikalischen Grundgrößen auf die Magnetseparation quantifizieren zu können.

Aufgrund der erheblichen Kosten kommerziell erhältlicher magnetischer Mikrosorbentien (die bisher ausschließlich für oben genannte analytische Zwecke im  $\mu\text{g}$ -Maßstab Verwendung finden), bestand die Notwendigkeit zur Herstellung eigener magnetischer Mikrosorbentien im Gramm-Maßstab. Für die Verwendung als magnetische Affinitätssorbentien mussten diese zahlreichen Anforderungen genügen, wie beispielsweise eine Partikelgröße im Mikrometerbereich bei enger Größenverteilung, eine hohe Sättigungsmagnetisierung ohne Remanenz, eine hohe Selektivität und Bindekapazität für das Zielprotein, eine gute Biokompatibilität und geringe Foulinganfälligkeit.

Die Sorptionseigenschaften (wie Kapazität und Kinetik) der hergestellten Partikeln sollten schließlich anhand weniger Modellproteine untersucht und die Separationseigenschaften der Partikeln für ein diskontinuierliches (HGMS) und zwei kontinuierliche Magnettrennverfahren (OGMS und RMMS) beschrieben werden. Schließlich sollte unter Verwendung der sich am Besten eignenden Sorbentien und des aussichtsreichsten Magnetseparationsverfahren eine optimierte Anlage entwickelt und charakterisiert werden, die eine Integration der Affinitätssorption, der Magnetseparation und des Wasch- und Elutions-schritts ermöglicht.



## 2 Grundlagen

### 2.1 Grundproblem

Ein allgegenwärtiges Problem bei biotechnologischen Separationen besteht in der Isolierung löslicher Substanzen (z.B. Proteine) von komplexen, feststoffhaltigen Mischungen (Hirschbein 1982). Dazu zählen:

- Die primäre Enzym-/Proteingewinnung bei Anwesenheit von Zelldebris (Hirschbein 1982, O'Brien 1996, Amersham Pharmacia 1997, 1999b, Thömmes 1997)
- die Rückgewinnung von Enzymen, die als Katalysator in organischen Synthesen bzw. in der Lebensmittelverfahrenstechnik verwendet werden (Hirschbein 1982)
- die DNA-Isolierung direkt aus Zellsuspensionen für analytische und diagnostische Anwendungen (Böhm 1999, Dynal 1998) und zur Gentherapie (Ribeiro 2001)

### 2.2 Konventionelle Verfahren zur Bioproduktaufarbeitung

Konventionell wird der erste Reinigungsschritt des Zielmoleküls häufig über Adsorptionschromatographie im Festbett realisiert, wobei dies jedoch eine vollständige Entfernung aller suspendierter Feststoffanteile aus der Biosuspension voraus setzt. Hierfür notwendige Standardmethoden für die Entfernung von Zellen bzw. Zelldebris sind die Zentrifugation und Mikrofiltration (Amersham Pharmacia 1997). Im Falle der Zentrifugation hängt die stationäre Sinkgeschwindigkeit und damit die Effizienz von der Partikelgröße, der Dichtedifferenz zwischen Partikel und umgebendem Medium sowie der Viskosität der Suspension ab. Insbesondere für kleine Zellen (wie *E.coli*) oder Zellhomogenisate führen kleine Partikelgrößen und hohe Viskositäten zu langen Zentrifugations(raum-)zeiten oder gar zu nicht vollständig geklärten Flüssigkeiten. Um dennoch eine partikelfreie Lösung zu erhalten, muss in diesen Fällen der Zentrifugation ein Mikrofiltrationsschritt nachgeschaltet werden (Amersham Pharmacia 1997). Obwohl sich hierdurch partikelfreie Lösungen gewinnen lassen, entstehen hierbei häufig Probleme durch einen mit zunehmender Filtrationszeit stark anwachsenden Druckverlust über die Membran und einen dadurch bedingten Rückgang des Filtratvolumenstroms. Außerdem stellt das Membranfouling ein weiteres Problem dar, das zu höheren Betriebskosten beiträgt. Die Kombination von Zentrifugation und Filtration führt häufig zu langen Prozesszeiten bzw. zur Notwendigkeit von vergleichsweise großen Apparaten verbunden mit hohen Investitionen und Wartungskosten. Zusätzlich kann eine weitere Reduzierung der Produktausbeute durch lange Kontaktzeit mit in der Biosuspension enthaltenen Proteasen oder Glykosidasen verursacht werden. Eine schnelle Produktabtrennung von produktzersetzenden Enzymen, von Feststoffen, Zellen, Wasser und von den Hauptmengen an Protein, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten ist für viele Produkte daher eine entscheidende Anforderung (Amersham Pharmacia 1997). Eine Vorstellung des Ausmaßes des Verlusts an Produkt in Folge vielstufiger Aufreinigungsverfahren gibt der in Abb. 2-1

dargestellte theoretische Zusammenhang zwischen der Anzahl der Aufreinigungsschritte, der Effizienz pro Schritt und der Produktausbeute (Fish 1984, Amersham Pharmacia 1999b)

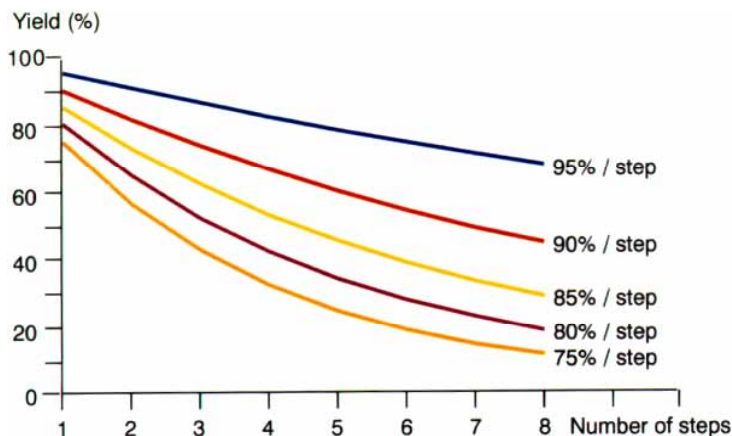


Abb. 2-1: Auswirkung der Anzahl an Aufreinigungsschritten auf die Produktausbeute

In Abb. 2-2 sind die prinzipiellen Aufreinigungsschritte für den Fall der Proteinaufreinigung bis zur Erzielung pharmazeutischer Reinheiten in vier Hauptphasen eingeteilt: Einer Präparationsphase, bei der Zellaufschluss und Fest-Flüssigtrennung stattfinden, einer ‚primary capture‘-Phase zur Konzentrierung, Stabilisierung und Primäraufreinigung, einer ‚intermediate‘-Phase zur Entfernung der Hauptverunreinigungen und der ‚Polishing‘-Phase bei der die Endreinheit erzeugt wird. Eine etwas konkretere Vorstellung der dabei auftretenden Verfahrensschritte liefert Abb. 2-3, in der ein allgemeines Schema des konventionellen „Downstream Processings“ in Abhängigkeit vom Zielprodukt der Fermentation dargestellt ist.

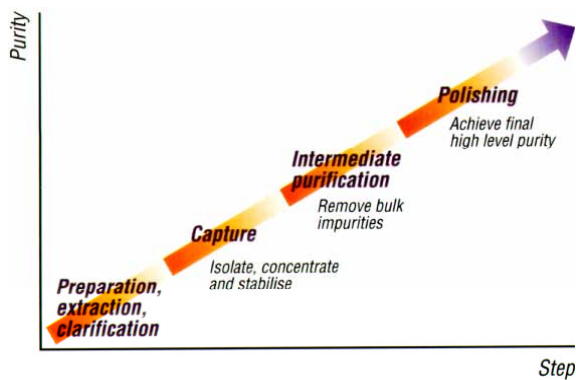


Abb. 2-2 (oben) Vier Hauptphasen der Protein-aufreinigung; nach Amersham Pharmacia (1999b)

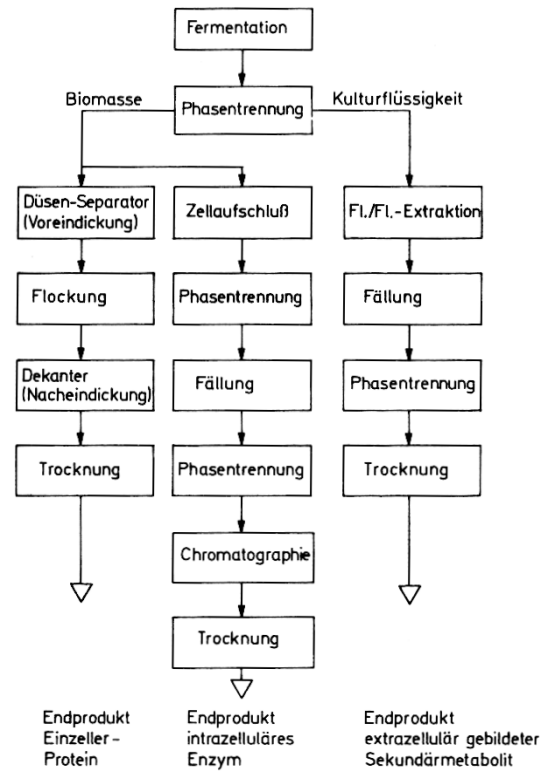


Abb. 2-3 (rechts): Allgemeines Schema der konventionellen Aufarbeitung von Bioprodukten in Abhängigkeit des Zielproduktes der Fermentation; nach Weide (1991)

### 2.3 Direkte Bioproduktabtrennung aus rohen Biosuspensionen

Der kommerzielle Erfolg biotechnologischer Produktionen hängt zu einem hohen Anteil von den Kosten ab, die mit der Bioproduktaufarbeitung (Downstream Processing, DSP) verbunden sind (Spalding 1991). Insbesondere in der Produktion pharmazeutischer und technischer Proteine ist die Aufarbeitung durch die Notwendigkeit vieler aufeinanderfolgender ‚Unit operations‘ gekennzeichnet, was einerseits maßgeblich zu den Investitions- und Betriebskosten beiträgt, in hohem Maße aber auch die Gesamtausbeute bezüglich des Zielproteins verringert. Aus diesem Grund können bis zu 80% der Gesamtkosten einer Proteinproduktion durch die Aufreinigung verursacht werden. Mit zukünftig verbesserter Proteinexpression rekombinanter Organismen erhöht sich der Anteil der Aufarbeitung aufgrund verringerter Fermentationskosten weiter (Fish 1984).

Zahlreiche aktuelle Forschungsarbeiten in der Bioverfahrenstechnik gehen daher in die Richtung so genannter integrierter Aufbereitungsverfahren, die versuchen, ursprünglich unabhängige Verfahrensschritte in einer neuen Stufe zu kombinieren. Der gesamte Aufbereitungsprozess wird dadurch verkürzt und die Gesamtausbeute erhöht. Neuere Ansätze für eine integrierte Bioproduktaufarbeitung werden im Folgenden erläutert und diskutiert.

### 2.3.1 Expanded Bed Adsorption (EBA)

Eine Möglichkeit der Sorption von Zielmolekülen ohne vorherige Abtrennung suspendierter biogener Feststoffe besteht in der Verwendung der Fluidbett-Adsorption (EBA, expanded bed adsorption) (Thömmes 1997, Amersham Pharmacia 1997). Dieses Verfahren erlaubt die Sorption von Zielmolekülen direkt aus der partikelhaltigen Biosuspension ohne vorherige Klärung, Aufkonzentrierung oder Vorreinigung (Amersham Pharmacia 1997). Durch die aufwärtsgerichtete Anströmung der Sorbenspartikeln erreicht man bei der EBA eine Expansion des Bettes und dadurch einen gegenüber dem Festbett erhöhten und einstellbaren Hohlraumvolumenanteil, wodurch Zellen und Zellbestandteile ungehindert das Bett durchströmen können, ohne zu einer Verstopfung zu führen. Durch die Verwendung von Sorbenspartikeln mit definierter Größen- und Dichteverteilung erreicht man ihre Klassierung innerhalb des Wirbelbetts und somit eine eingeschränkte Beweglichkeit innerhalb des Betts. Dies ist zur Reduzierung der axialen Dispersion und zur Erhöhung der Anzahl theoretischer Trennstufen des Fluidbetts erforderlich (Thömmes 1997, Hubbuch 2001a). Nach einer Waschphase kann das Zielprotein eluiert werden, und ein gereinigtes und geklärtes Produkt wird in *einer* Prozessstufe erhalten. Das Prinzip ist in Abb. 2-4 schematisch dargestellt.

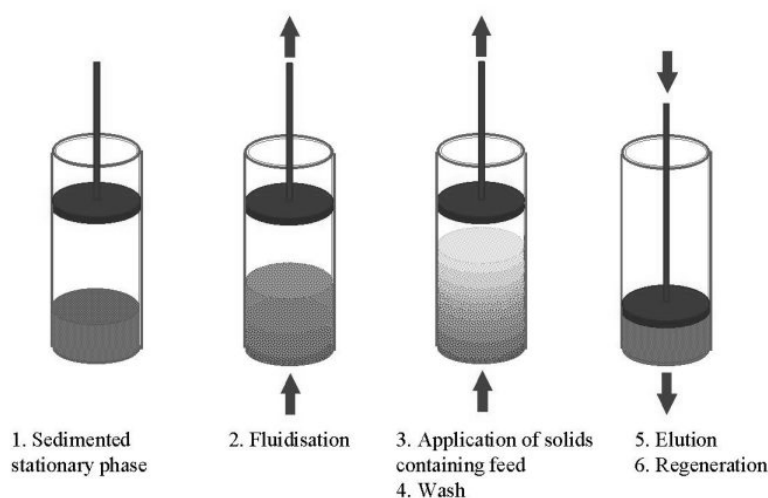


Abb. 2-4: Prinzip der Proteinaufreinigung mittels EBA; (nach Thömmes 1997)

Nachteilig bei diesem Verfahren ist ein eventueller Austrag von Partikelfeinanteilen. Außerdem müssen mit zunehmendem Durchsatz größere Partikeln verwendet werden, um nicht das komplette Bett auszutragen. Dies führt bei nicht-porösen Sorbentien zu immer geringeren spezifischen Partikeloberflächen und somit zu geringen Sorptionsleistungen. Bei der Verwendung makroporöser Sorbentien können sich dagegen Probleme wie Fouling und ineffiziente Kapazitätsausnutzung ergeben (vgl. Kapitel 2.4.8). Weiterhin sind Probleme wie auftretende Kanalbildung innerhalb des Bettes und Rückvermischungseffekte, insbesondere bei großen Bettdurchmessern (über  $\sim 1\text{m}$ ) und hohen Biomassekonzentrationen, bisher nicht hinreichend gelöst. Die maximale Biomassekonzentration im Zulauf beträgt etwa 10 bis 15% Biofeuchtmasse. Die bisher übliche Verwendung von perforierten Plattendistributoren (Porendurchmessern  $60\text{-}70\mu\text{m}$ ) zur homogenen Suspen-

sionsverteilung führt zudem zur allmählichen Ansammlung von partikulären Stoffen, Zellen und Nukleinsäuren unterhalb des Distributors und somit zu einem Anstieg des Druckverlusts, Verstopfung des Distributors und ungleichmäßiger Flüssigkeitsverteilung (Anspach 1999).

Trotz dieser Nachteile erscheint das EBA-Verfahren aufgrund der bereits frühen Einführung in den 1950er Jahren (Barthels 1958) die besten Erfolgsaussichten in der unmittelbaren Zukunft aufzuweisen und wurde bereits in der industriellen Produktion von rekombinantem humanem Serumalbumin (rHSA) implementiert (Hubbuch 2001a, Kasumasa 1996). Eine erster Vergleich zwischen der Hochgradientenmagnetseparation (HGMS) und EBA zur Bioproduktaufarbeitung findet sich bei Hubbuch *et al.* (2001a).

### **2.3.2 Magnetically Stabilized Fluidized Bed (MSFB)**

Partikelrückvermischungen innerhalb des Bettes bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung einer Wirbelschicht lassen sich in einer so genannten magnetisch stabilisierten Wirbelschicht (MSFB, magnetically stabilized fluidized bed) vollständig unterdrücken. Hierbei wird im Vergleich zur EBA durch das zusätzliche Anlegen eines parallel zur Strömung gerichteten homogenen Magnetfeldes unter Verwendung von magnetischen Partikeln ein expandiertes Bett ohne Partikeldispersion erzeugt (Hausmann 2000). Nachteilig sind die auch hier auftretende Kanalbildung, die Schwierigkeit eines Upscalings und die Notwendigkeit der vergleichsweise aufwendigen und teuren Erzeugung des homogenen Magnetfeldes über elektrische Spulen (Amersham Pharmacia 1997).

### **2.3.3 Aqueous Two Phase Systems (ATPS)**

Wässrige Phasensysteme sind seit Mitte der fünfziger Jahre als biokompatibles Extraktionssystem bekannt. Löst man zwei hydrophile Polymere (z.B. Polyethylenglykol und Dextran) oder ein hydrophiles Polymer und ein lyotrophes Salz (z.B. Polyethylenglykol und Kaliumphosphat) oberhalb gewisser Konzentrationen in Wasser, so tritt ein Phänomen auf, das mit dem Begriff ‚Inkompatibilität‘ umschrieben werden kann. Es entstehen zwei Phasen, die überwiegend Wasser enthalten (> 70%), und die eine der phasenbildenden Komponenten jeweils anreichern. Im Falle von Polyethylenglykol und Kaliumphosphat entstehen beispielsweise eine Polyethylenglykol-reiche Oberphase und eine salzreiche Unterphase. Die Konzentrationen, oberhalb derer die Phasenbildung auftritt, sind eine Funktion einer Reihe von Parametern. Als wichtige Größen sind das Molekulargewicht des Polymers, der Typ des eingesetzten Salzes, die Temperatur, sowie der pH Wert zu nennen. Die beiden Phasen unterscheiden sich signifikant in ihren physikochemischen Eigenschaften und eignen sich daher ausgezeichnet als Extraktionssystem. Durch dessen überwiegend wässrige Natur werden die Vorteile einer Extraktion (wie schneller Stoffübergang, hohe Kapazität, leichte Maßstabsvergrößerung, Toleranz gegenüber der Anwesenheit von Feststoffen) mit der Biokompatibilität vereint (Kula 1999).

Eine für die Aufarbeitung von Proteinen besonders wichtige Eigenschaft ist die Fähigkeit, partikuläre Bestandteile – beispielsweise Zellen oder Zelltrümmer – in die Unterphase solcher Extraktionssysteme zu verteilen. Auf diese Art und Weise wird die Fest-Flüssig-Trennung signifikant erleichtert, da Biomasse und Zielprotein in zwei unterschiedliche Phasen verteilt werden können. Man erhält somit eine ‚thermodynamisch kontrollierte Trennung‘ von Feststoff und Zielkomponente. Dies ist insbesondere für schwer separierbare Systeme, wie z.B. Zellhomogenisate, hilfreich. Derartige Systeme lassen sich mit konventionellen Methoden wie Filtration und Zentrifugation infolge der geringen Partikelgröße in Homogenisaten nur sehr schwierig klären. Abb. 2-5 fasst diese Vorgehensweise schematisch zusammen.

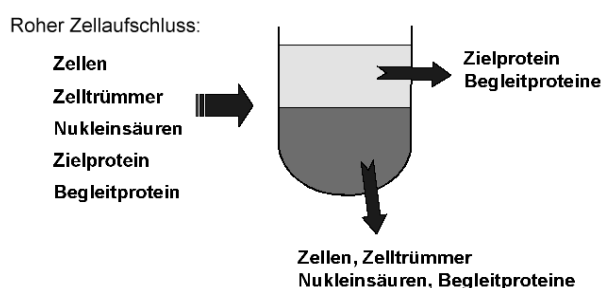


Abb. 2-5: Prinzip der wässrigen Zweiphasenextraktion zur Aufreinigung eines Zielproteins aus roher Biosuspension; nach (Kula 1999)

Vorteile des Verfahrens sind eine schnelle Stoffübergangskinetik (Phasengleichgewicht nach maximal 80 Sekunden erreicht), ein geringer Rührleistungseintrag (gute Durchmischung und Bildung kleinster Tropfen) und die Möglichkeit der Verwendung hoher Biomassekonzentrationen (bis 50% w/w BFM).

Nachteil der ATPS-Extraktion sind die meist geringen Verteilungskoeffizienten (1.1 bis 10) und die damit verbundene Notwendigkeit einer vielstufigen Extraktion. Weiterhin ist das Verteilungsverhalten wenig vorhersehbar und die Optimierung des Verfahrens sehr zeitaufwendig, da weitgehend nur heuristisch möglich (Selber 2000). Für jede Stufe sind aufgrund des geringen Dichteunterschieds der beiden Phasen (0.1 bis 5%) aufwendige Mixer-Settler-Extraktoren (z.B. Disk-Stack-Zentrifugen, Extraktionsdekanter) notwendig, die hohe Kosten verursachen. Schließlich entstehen aufgrund des hohen Chemikalienbedarfs hohe Betriebskosten und Entsorgungsprobleme für die verbrauchten Lösungen (Kroner 1982).

### 2.3.4 Magnetseparation in der Biotechnologie

Auch der Einsatz magnetischer Mikrosorbentien in Kombination mit Magnettrenntechnologie stellt im Labormaßstab eine bekannte Technik zur direkten Biomolekülabtrennung aus ungeklärten Suspensionen dar und wurde erstmals von Dunnill, Lilly und Mitarbeitern beschrieben (Dunnill 1974). Abb. 2-6 zeigt für den Anwendungsfall der Isolierung eines Biomoleküls schematisch die dabei auftretenden Arbeitsschritte.

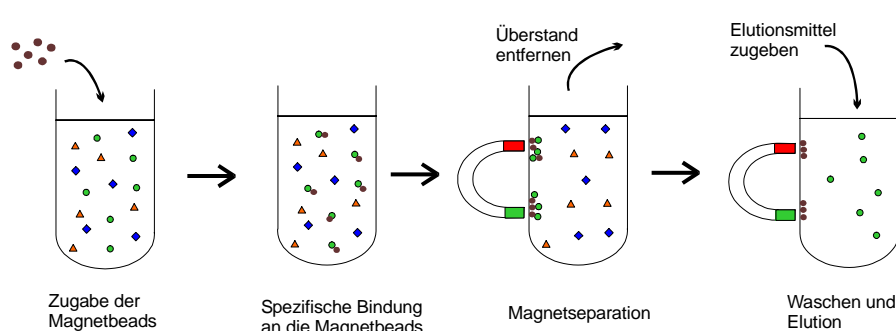


Abb. 2-6: Prinzip der Magnettrenntechnik im Milliliter-Maßstab.

Die Anwendungsbereiche im Labormaßstab für diese Technik sind dabei vielfältig, wie folgende Liste zeigt:

- Isolierung, Sequenzierung und Amplifizierung von Nukleinsäuren (Olsvik 1994, Dynal 1998)
- Isolierung von Proteinen (Halling 1980, Hirschbein 1982, Morgan 1996, O'Brien 1996, 1997, Theodossiou 1997, Abudiab 1998, Schuster 2000, Hubbuch 2001a)
- Immobilisierung von Enzymen (Munro 1977, Halling 1979, Prenosil 1989, Pieters 1992)
- Zellsortierung (Ugelstad 1988, Dynal 1996, Miltenyi 2000) und Zelltypisierung (Olsvik 1994) (vgl. Abb. 2-7)
- Immunoassays (Immunomagnetic separation-enzyme linked immunosorbent assay, IMS-ELISA) (z.B. Cudjoe 1991, Gundersen 1992, Olsvik 1994, Dynal 1996)

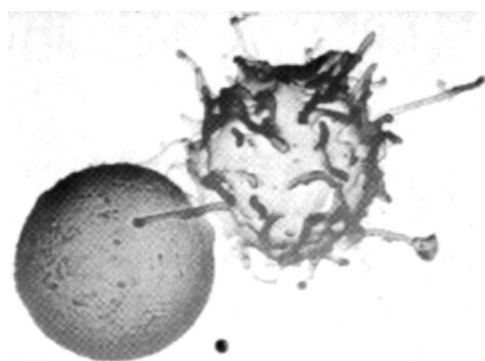


Abb. 2-7: Eine an ein Magnetpartikel gebundene Blutzelle (nach Dynal AS 1999)

Die Abtrennung der magnetischen Partikeln kann im Labormaßstab je nach Anzahl der zu prozessierenden Proben mit Hilfe von einfachen Stab-Handmagneten (Halling 1980), mit magnetischen Racks oder im Fall einer Hochdurchsatzanalytik voll automatisiert in Mikrotiterplatten (Vettese-Dadey 1999) erfolgen.

Während die spezifische Bindung von Biomolekülen an Magnetbeads sowie die Wasch- und Elutionsschritte dabei im Prinzip direkt auf den technischen Maßstab übertragbar sind, lässt sich eine Abtrennung von Magnetbeads mit Durchmessern von etwa 1  $\mu\text{m}$  im großen Maßstab sicherlich nicht über das einfache Anbringen eines Permanentmagnetes an ein Rührgefäß bewerkstelligen. Während sich aufgrund der geringen Partikelgröße auch magnetische Trommelseparatoren für solche Abtrennungen nicht eignen, ist die Anwend-

barkeit so genannter Hochgradienten-Magnetseparatoren (HGMS) zur industriellen Abtrennung magnetischer Mikropartikeln aus der Erzaufbereitung und der Umwelttechnologie bekannt (Dixon 1980, Svoboda 1987, Bolto 1990). Eine direkte Übertragbarkeit der dort eingesetzten Hochgradienten-Magnetseparatoren auf die Biotechnologie ist jedoch aufgrund der stark differierenden magnetischen Eigenschaften und Anforderungen nicht gegeben.

Umfangreiche Darstellungen zum Einsatz der Magnetseparation in der Biotechnologie finden sich unter anderem bei Whitesides 1983, Setchell 1985, Pieters, 1992, O'Brien 1996 und Böhm 1999.

## **2.4 Immobilisierte Affinitätsliganden-Technologie (IALT)**

### **2.4.1 Einleitung**

Affinitätsligandenmethoden stellen die zur Zeit wirksamste Trennmethode von Biomolekülen dar. Affinitätsverfahren (z.B. die Affinitätschromatographie) beruhen auf der biospezifischen Bindung zwischen den Komponenten eines biologischen Systems, z.B. Antigen-Antikörper, Enzym-Inhibitor, Rezeptor-Hormon. Wird ein solcher Ligand (z.B. ein Inhibitor) kovalent an die stationäre Trägerphase gebunden, so werden beim Trennvorgang lediglich Enzymproteine sorbiert, die eine spezifische Affinität zum Liganden haben. Die Elution kann beispielsweise durch den Wechsel des pH-Wertes oder der Ionenstärke erfolgen (Hirschbein 1982, Weide 1991)

Affinitätsverfahren nehmen eine herausragende Rolle im Bereich der Separationstechnik ein, da es die einzige Technik ist, die eine Aufreinigung vom Biomolekülen aufgrund ihrer biologischen Funktion oder individuellen chemischen Struktur erlaubt (Amersham Pharmacia 1999a). Affinitätsverfahren stellen das mächtigste Werkzeug im Bereich der Bioproduktaufreinigung (Downstream-Processing, DSP) sowohl hinsichtlich Selektivität als auch Ausbeute dar (O'Brien 1996). Die Technik steht seit den 1980er Jahren für routinemäßige Anwendungen zur Verfügung und wird mittlerweile in jedem Labor, das sich mit der Aufreinigung biologischer Substanzen beschäftigt, angewandt. Dies zeigt, dass mit der Anwendung von Affinitätsverfahren schnelle Separationen ermöglicht werden, die bei der Verwendung anderer Techniken zeitaufwendig, schwierig oder gar unmöglich sind (Amersham Pharmacia 1999a).

Während in den Anfängen der IALT die Affinitäts-Chromatographie im Vordergrund stand, ist der chromatographische Aspekt inzwischen nur einer von vielen Anwendungsgebieten. Die Verwendung der IALT lässt sich in vier Hauptanwendungsfelder untergliedern (Hermanson 1992, Amersham Pharmacia 1997):



- Aufreinigungssysteme zur Isolierung von Zielmolekülen aus komplexen Suspensionen und Lösungen (insbesondere für hohe Reinheitsanforderungen und/oder geringen Reinheiten und Konzentrationen des Zielmoleküls in der Ausgangslösung)
- Verwendung als Fängerreagenzien (Scavengers) zur Entfernung unerwünschter Kontaminationen
- Chemische Modifikationen oder Katalyse zur Erzielung spezifischer Transformationen (Enzym- oder Zellimmobilisierung)
- Trennmethode für analytische Anwendungen

Der Aufreinigungsfaktor liegt häufig im Bereich mehrerer Tausend und die Produktausbeuten sind generell sehr hoch. Affinitätsverfahren haben eine Aufkonzentrierungswirkung, wodurch die Reinigung großer Volumina ermöglicht wird. Die hohe Selektivität liegt in den natürlichen Spezifitäten der wechselwirkenden Moleküle begründet. Aus diesem Grunde kann die Affinitätssorption dafür verwendet werden, um Substanzen aus komplexen biologischen Mischungen zu separieren oder um nur kleine Mengen einer Substanz aus großen Mengen von Kontaminationen zu gewinnen (Amersham Pharmacia 1999a).

#### 2.4.2 Das Prinzip

Bei der Affinitätssorption wird das zu reinigende Zielmolekül (S) spezifisch und reversibel an eine komplementäre Bindesubstanz (den Liganden L) gebunden, der auf einem festen Träger (der Matrix M) immobilisiert wurde. Das Prinzip von Affinitätsverfahren ist in Abb. 2-8 zu erkennen. Eine erfolgreiche Separation erfordert also einen biospezifischen Liganden und die Möglichkeit, diesen möglichst kovalent an eine geeignete Träger-substanz zu immobilisieren. Weiterhin ist wichtig, dass der Ligand seine spezifische Bindefähigkeit durch den Immobilisierungsprozess nicht einbüßt und dass Methoden zu Verfügung stehen, um die gebundene Substanz in einer aktiven Form selektiv vom Träger zu eluieren, nachdem ungebundenes Material und Kontaminationen durch Waschschritte entfernt wurden.

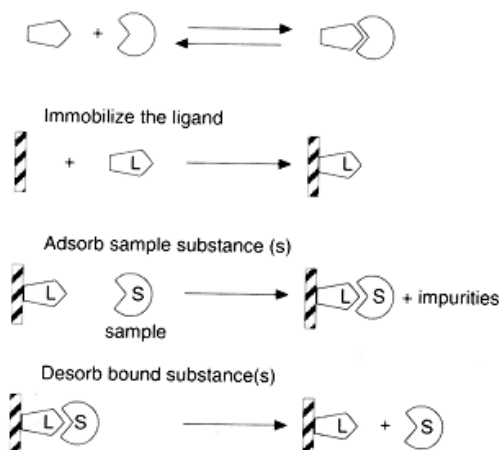


Abb. 2-8: Das Prinzip von Affinitätssorptionen (nach Belter 1988, Amersham Pharmacia 1999a).

Biologische Systeme, für die Affinitätsverfahren am Häufigsten verwandt werden, sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt und werden nachfolgend eingehender behandelt.

Tabelle 2-1: Beispiele für Affinitätsliganden und zugehörige Bindesubstanzen

<i>Ligand</i>	<i>Gegenligand</i>
Enzyme:	Substrat-Derivate, Inhibitoren, Kofaktoren
Antikörper:	Antigene, Viren, Zellen
Lektine:	Polysaccharide, Glyco-Proteine, Zelloberflächenrezeptoren, Zellen
Nukeinsäuren:	Komplementäre Basensequenzen, Histone, Nukleinsäure-Polymerase
Hormone, Vitamine:	Rezeptoren, Trägerproteine
Zellen:	Lektine, Zelloberflächenspezifische Proteine

### 2.4.3 Die Matrix

Unter "Matrix" versteht man in diesem Zusammenhang jedes Material, an das ein biospezifischer Ligand (im Allgemeinen kovalent) gebunden werden kann. Das Material sollte unlöslich sein, wobei es sich in den meisten Fällen um einen Feststoff handelt (Hermanson 1992). Hunderte von Substanzen wurden bisher als Träger verwendet, darunter gemahlene Krabbenschalen (Chitin), Glas, aufbereiteter Extrakt aus Meertang (Agarose) und viele synthetische Materialien.

Die Anforderungen an eine Matrix für die IALT sind (Buchholz 1997, Subramanian 1998):

- Mechanische Festigkeit
- Hydrophilie
- Chemische Resistenz
- Hohe spezifische Oberfläche (durch kleine Partikelgröße oder hohe Porosität)
- Große Porengröße (für poröse Träger)
- Hohe Dichte an chemisch modifizierbaren Gruppen
- Die "nicht-spezifische" Bindungsfähigkeit ("non-specific binding") muss gering sein. Dafür ist es essentiell, dass die Separation alleine aufgrund der Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand stattfindet. Die Matrix selbst sollte sich idealerweise völlig inert verhalten, was im realen Fall nicht immer zutrifft. Hydrophobe Bereiche auf der Matrix adsorbieren viele Proteine bei hohen Salzkonzentrationen *unselektiv* - also genau bei Bedingungen, bei denen Proteine häufig von Affinitätsorbentien eluiert werden. Deshalb besteht die ideale Matrix aus einer komplett hydrophilen, ungeladenen Oberfläche mit einer hohen Dichte an polaren (Hydroxyl-)gruppen (Subramanian 1998).

Weiterhin können Eigenschaften wie Quellfähigkeit, mikrobiologische Stabilität, morphologische Eigenschaften wie Partikelgröße und Größenverteilung, Porengröße,

Druckfestigkeit und Elastizität je nach Anwendung eine entscheidende Rolle spielen. Bei der spezifischen Oberfläche ist darauf zu achten, dass die Oberfläche für den zu immobilisierten Liganden und das Zielmolekül auch zugänglich sein muss. Maßgeblich ist deshalb nicht die etwa nach dem BET-Verfahren (DIN66132, 1975) gemessene innere Oberfläche, sondern die zugängliche Oberfläche (Buchholz 1997).

**Natürliche Matrices** sind beispielsweise

- Agarose; Agarose quervernetzt
- Cellulose
- Glas mit kontrollierter Porengröße (controlled pore glass, CPG), nichtporöses Glas und andere mineralische Träger wie Silika, Aluminiumoxid und Magnetit.

Mineralische Trägermaterialien haben gegenüber weichen Gelen wie Agarose und Cellulose den Vorteil hoher mechanischer Festigkeit.

Beispiele für poröse oder nicht-poröse Träger auf Basis **synthetischer Matrices** sind:

- Polyacrylamid
- Methacrylat-Derivate (PMA, PMMA)
- HEMA-Copolymer
- Eupergit der Firma Rohm Pharma, Darmstadt (epoxyaktiviertes Copolymer; 250, 150 und 30  $\mu\text{m}$  porös und 1  $\mu\text{m}$  kompakt)
- Polystyrol und Derivate (PerSeptive, Cambridge, Mass.)

Nähere Informationen zu Herstellungsmethoden bzw. Bezugsquellen, mechanischen Eigenschaften, Partikel- und Porengrößen, Quellung, Aktivierungs- und Immobilisierungsmethoden, Stabilität und Handling sind in der Literatur eingehend beschrieben (Hermanson 1992, Amersham Pharmacia 1999a). Inzwischen existieren zahlreiche Veröffentlichungen über die Verwendung von magnetischen Trägern für die IALT (Robinson 1973, Munro 1977, Halling 1979, Dekker 1989, Pieters 1992, O'Brien 1994, 1996, 1997, Morgan 1996, Theodossiou 1997).

Exemplarisch ist in Abb. 2-9 die Struktur der am Häufigsten verwendeten Agarose gezeigt. Vorhandene Hydroxylgruppen der Zuckermonomere können leicht zur kovalenten Anbindung eines Liganden derivatisiert werden (Amersham Pharmacia 1999a). Kugelförmige Agarose ist sehr oft das Mittel der Wahl für IALT, da sie eine Reihe von Vorteile in sich vereint.

- Die Oberfläche ist hoch hydrophil mit wenigen (nicht-spezifischen) Ionenaustauschgruppen.
- Es ist eine Vielzahl von funktionellen (Hydroxyl-)gruppen zur Immobilisierung vorhanden (Subramanian 1998).

- Bis zu 50  $\mu\text{mol}$  Ligand je Gramm Partikel können immobilisiert werden (Subramanian 1998).
- Die offene Porenstruktur erlaubt ein Eindringen von Molekülen mit Molmassen bis zu 1 Million Dalton (Subramanian 1998) bzw. bis 20 Millionen Dalton (Amersham Pharmacia 1999a).
- Agarose ist chemisch resistent gegenüber allen Prozessschritten, die für eine wiederverwendbare Affinitätsmatrix notwendig sind, wie die Verwendung 1-molarer Natronlauge zur Depyrogenation und Sterilisierung. Agarose ist stabil gegenüber polaren Lösungsmitteln wie Ethanol, Isopropanol, Aceton, Dioxan und Dimethylformamid (DMF) (Subramanian 1998).

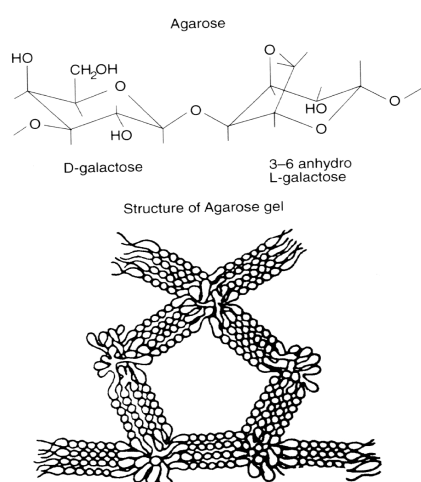


Abb. 2-9: Ausschnitt aus der Struktur von Agarose, nach (Amersham Pharmacia 1999a)

#### 2.4.4 Aktivierungsmethoden

Unter Aktivierung versteht man den Prozess der chemischen Modifizierung der Matrix, wobei sich bei der Aktivierung im Allgemeinen eine kovalente Bindung mit dem gewählten Liganden ausbildet. Die gewählte Aktivierungsmethode muss sowohl mit der Matrix als auch mit dem gewählten Liganden kompatibel sein. Das Ziel der Aktivierung ist die effektive und feste Bindung eines biospezifischen Liganden an eine unlösliche Matrix, so dass weder die Matrix noch der Ligand in seinen Eigenschaften negativ verändert wird. Außerdem darf der Aktivierungsprozess keinerlei nicht-selektive Bindecharakteristiken hervorrufen (Hermanson 1992). Bei der Verwendung von Enzymen als Liganden darf keine Inaktivierung des Enzyms durch den Aktivierungsprozess entstehen (Buchholz 1997).

Aufgrund der Vielzahl an verfügbaren Matrices und der großen Anzahl an verschiedenen Affinitätsliganden werden in der Literatur zahlreiche Aktivierungsmethoden beschrieben (z.B. Buchholz 1979, Hermanson 1992, Amersham Pharmacia 1999a). In Abb. 2-10 sind Möglichkeiten zur Aktivierung Amin- und Aldehyd-terminierter Matrices aufgezeigt.

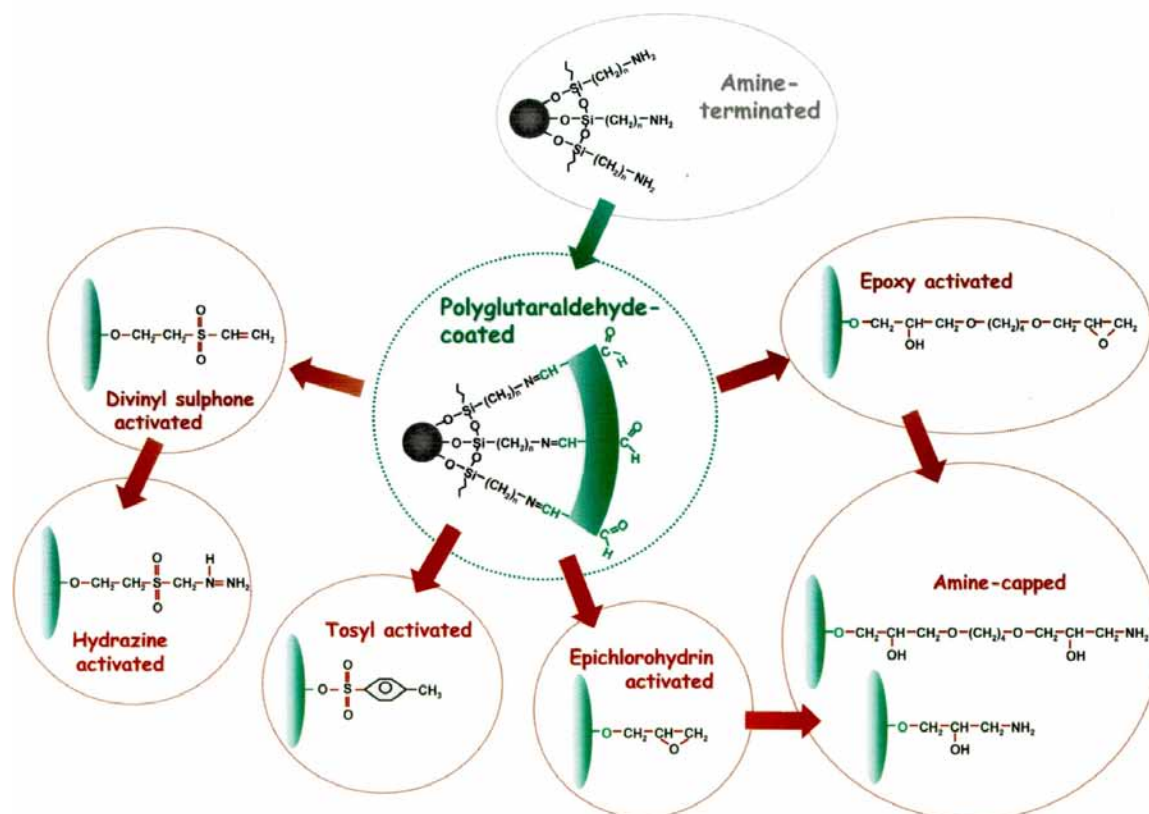


Abb. 2-10: Methoden zur Derivatisierung von Amin- oder Aldehyd-terminierter Affinitäts-Matrices; nach Thomas, 2002

Einige Aktivierungsmethoden (wie die so genannte Carbodiimidmethode) führen zu einer direkten Anbindung des Liganden an die Matrixoberfläche, während andere Methoden gleichzeitig zur Einführung eines „Spacers“ zwischen Matrix und Ligand führen (Hermanson 1992). Wie Abb. 2-11 deutlich macht, ist die Einführung eines Spacer-Arms für einige Ligand-Zielmolekül-Interaktionen erforderlich.

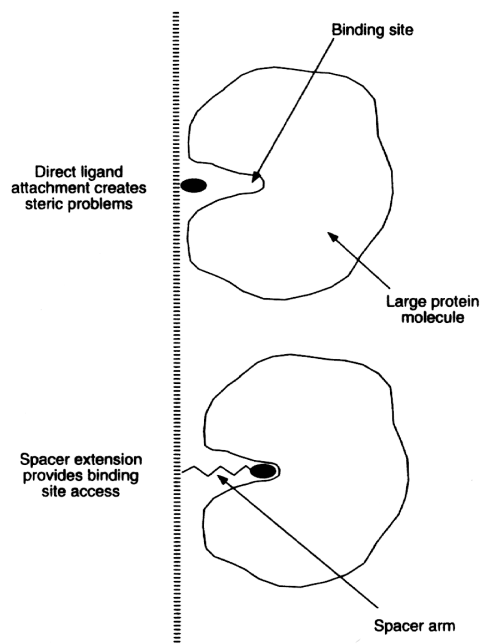


Abb. 2-11: Verbesserung der Zugänglichkeit des Liganden zur Bindestelle des Zielmoleküls durch Benutzung eines Spacer-Arms (Hermanson 1992).

### 2.4.5 Immobilisierung des Liganden

Die Immobilisierung kann physikalischer oder chemischer Natur sein, wobei auch gemischte Formen möglich sind. Man unterscheidet folgende grundlegende Methoden, die zum Teil in Abb. 2-12 schematisch aufgezeigt sind:

- Das Vernetzen ("Crosslinking") von Liganden untereinander mit bifunktionalen Reagenzien,
- die Adsorption des Liganden an die Matrix; eine anschließende kovalente Immobilisierung mit bifunktionalen Substanzen ist möglich
- der Einschluss ("Entrapment") des Liganden in ein polymeres Gel,
- der Einschluss des Liganden in Mikrokapseln ("Encapsulation") oder in Membranen,
- die kovalente Bindung des Liganden an die Matrix über reaktive funktionelle Gruppen, die nach der Aktivierung auf der Matrixoberfläche vorhanden sind.

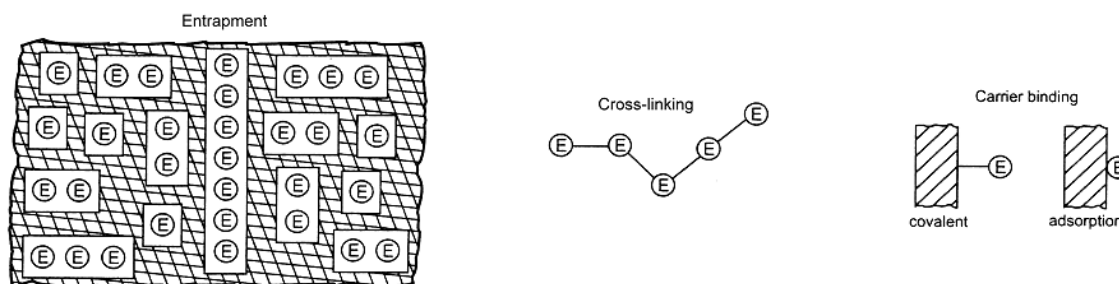


Abb. 2-12: Verschiedene Immobilisierungsmethoden für ein Enzymmolekül (E) bzw. Ligand (nach Liese 2000)

Die kovalente Bindung an die Matrix geschieht unter der Verwendung reaktiver Seitengruppen des Liganden (z.B. Amino-, Hydroxyl-, Thiol- oder Phenylgruppen), die nicht an einem seiner funktionellen oder aktiven Zentren beteiligt sind. Die kovalente Anbindung beinhaltet die größte Anzahl an veröffentlichten Immobilisierungsmethoden (Prenosil 1989). Unter normalen Bedingungen bleibt die kovalente Bindung stabil, so dass kein Ligand remobilisiert werden kann ("Leakage").

## 2.4.6 Affinitätsliganden

### 2.4.6.1 Allgemeines

Die Auswahl eines geeigneten Affinitätsliganden ist von besonderer Bedeutung, da er die Bindspezifität und die Kosten der Affinitätsmatrix bestimmt. Die Anforderungen an den Liganden können folgendermaßen zusammengefasst werden:

- Der Ligand muss eine spezifische und reversible Bindeaffinität für das Zielmolekül aufweisen (Amersham Pharmacia 1999a)
- Der Ligand muss einfach derivatisierbar sein, um ihn an die Matrix zu binden, ohne dass die Affinität zum Zielmolekül negativ beeinflusst wird (Subramanian 1998, Amersham Pharmacia 1999a).
- Der Ligand muss hinreichend stabil sein, um die Bedingungen der Kopplungsreaktion zu überstehen (Subramanian 1998).
- Die Dissoziationskonstante  $K_d$  des binären Ligand-Zielmolekül-Komplexes (L-S-Komplex) muss unterhalb  $10^{-4}$  mol/L liegen, um eine ausreichende Bindefähigkeit zum Sorbens zu garantieren (Subramanian 1998, Amersham Pharmacia 1999a). Die Dissoziationskonstante des L-S-Komplexes bestimmt den nicht-gebundenen Anteil des Zielmoleküls im Gültigkeitsbereich der Langmuir-Sorptionsisotherme, die man oft für nicht zu hohe Gleichgewichtskonzentrationen  $c^*$ , d.h. solange keine Mehrschichten-Adsorption auftritt, anwenden kann:

$$q^* = \frac{q_{\max} \cdot c^*}{K_d + c^*}$$

Gleichung 2-1

- Die Dissoziationskonstante  $K_d$  sollte oberhalb  $10^{-8}$  mol/L liegen, um eine noch effektive Desorption des Zielmoleküls zu ermöglichen (Subramanian 1998, Amersham Pharmacia 1999a).
- Die Ligandendichte auf der Matrix muss so hoch wie möglich angestrebt werden, da die Affinitätsorption auf spezifischen Wechselwirkungen des Liganden mit dem Zielmolekül beruht (Amersham Pharmacia 1999a). Bei geringer Ligandendichte treten häufig unerwünschte nicht-selektive Wechselwirkungen auf. Umgekehrt ist die nicht-spezifische Bindekapazität bei hoher Ligandendichte gering. Die unterschiedlichen Sorptionsmechanismen, die bei hoher und niedriger Ligandendichte auftreten, sind in Abb. 2-13 am Beispiel einer immobilisierten Metall-Chelat-Affinitäts-Matrix gezeigt. Cytochrom c ist hierbei das Zielmolekül.

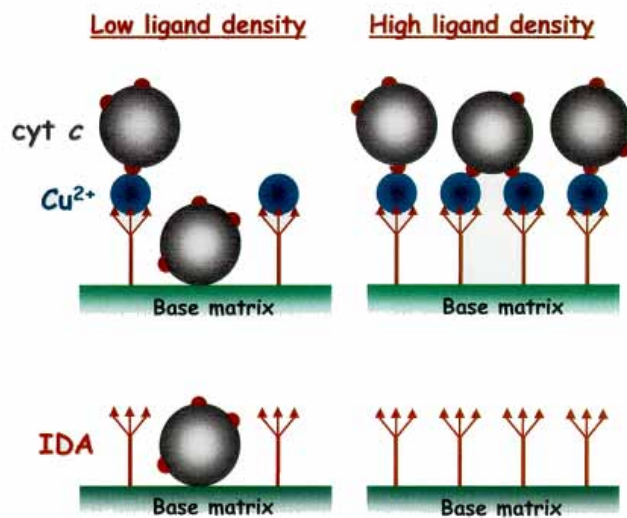


Abb. 2-13: Sorptionsmechanismus von Cytochrom c (und anderer Proteine) an eine Metall-Chelat-Affinitäts-Matrix mit unterschiedlicher Ligandendichte (nach Thomas 2002).

oben: Mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen beladene Matrix  
 unten: Ohne  $\text{Cu}^{2+}$ -Beladung

- Mehrschichtadsorption ("Multi-layer binding"), das bei ungünstigen Verhältnissen von Affinitätsmatrix und Zielmolekül (Sorbens) auftritt, muss vermieden werden, da in diesem Fall nicht-selektive Wechselwirkungen der Zielmoleküle untereinander oder von gebundenen Zielmolekülen mit Kontaminationen zum Tragen kommen. Ein Verlust an Produkt beim Waschen des Trägers im Anschluss an den Sorptionsschritt oder eine Sorption von Kontaminationen können die Folge sein.

Im Folgenden werden die verschiedenen Gruppen der verwendeten Affinitätsliganden kurz vorgestellt. Oft werden Verfahren bei denen Antikörper und Antigene als Liganden und Zielmoleküle eingesetzt werden als "echte" Affinitätsverfahren oder "Immuno-Affinitäts-Verfahren" bezeichnet. Hierzu zählt auch die Wechselwirkung zwischen Hormon und zugehörigem Rezeptor. Die Wechselwirkung der beiden Partner ist *monospezifisch*, d.h. für einen bestimmten Antikörper kommt nur ein einziges Antigen als Bindepartner in Frage. Viele anderen Affinitätsorbentien haben eine Affinität zu einer ganzen Substanzgruppe und werden deshalb häufig als "*Gruppenspezifische* Adsorbentien" oder "*Pseudo-Affinitäts-Sorbentien*" bezeichnet (Amersham Pharmacia 1999a).

#### 2.4.6.2 Monospezifische Affinitätsorbentien

Generell binden monospezifische Affinitätsliganden ihren Gegenliganden fester als gruppenspezifische Liganden. Raue Elutionsbedingungen sind deshalb häufig notwendig. Beispiele für ausgesprochen stark bindende monospezifische Liganden sind Steroide und ihre zugehörigen Rezeptoren mit Dissoziationskonstanten von  $10^{-8}$  bis  $10^{-10}$  mol/L (Janson 1998). Ein weiteres Beispiel mit sehr hoher Affinität ist das kleine (244 Dalton) Vitamin Biotin, das seinen Gegenliganden Avidin (oder auch Streptavidin) mit einer Dissoziationskonstante von  $10^{-15}$  mol/L bindet (Janson 1998). Es ist die stärkste (bisher bekannte) nicht-kovalente Bindung (Falbe 1995).



Immunoaffinitätsverfahren nutzen immobilisierte Antigene oder Antikörper als Adsorbentien und werden oft als Immunosorbentien bezeichnet. Monoklonale Antikörper sind zur Aufreinigung von Antigenen ausgesprochen nützlich, insbesondere wenn zur Aufreinigung kein anderer komplementärer Ligand vorhanden ist. Viele traditionelle Immunosorbentien die auf der Verwendung polyklonaler Antikörper basierten, sind heute durch monoklonale Antikörper ersetzt. Der Antigen-Antikörper-Komplex besitzt im Allgemeinen eine sehr hohe Affinität ( $K_d$  von  $10^{-6}$  bis  $10^{-9}$  mol/L (Janson 1998)) und erfordert in Folge dessen extreme Elutionsbedingungen. Eluierte Substanzen müssen deshalb nach der Elution sofort wieder in normale Bedingungen zurückgeführt werden. Häufig wird zur Elution eine pH-Wert-Absenkung auf 1.5-3 verwendet. Nähere Informationen über die Verwendung monoklonaler Antikörper für Affinitätsverfahren sind in der Literatur zu finden (Amersham Pharmacia 1999a, Goding 1986).

### **2.4.6.3 Gruppenspezifische Affinitätssorbentien**

Als Liganden für Affinitätssorptionen bieten gruppenspezifische Affinitätssorbentien oft Vorteile gegenüber Immunoaffinitätsliganden. Es sind meist kleine, billige und chemisch stabile Moleküle, die über einfache Kopplungsreaktionen mit hoher Ligandendichte an Matrixoberflächen immobilisiert werden können. Man erhält dadurch sehr hohe Bindekapazitäten. Darüber hinaus kann die Elution meist unter milden Bedingungen durchgeführt werden (O'Brien 1996). Im Folgenden werden die am Häufigsten verwendeten gruppenspezifischen Affinitätsliganden kurz vorgestellt.

#### **2.4.6.3.1 Immobilisiertes Protein A und Protein G**

Protein A und Protein G sind bakterielle Proteine (aus *Staphylococcus* bzw. *Streptococcus*), die selektiv an die Fc-Region von Antikörpern vom IgG-Typ binden. In immobilisierter Form stellen sie ausgesprochen nützliche, einfach handhabbare Sorbentien mit hoher Kapazität dar, die für viele Routineanwendungen geeignet sind, wie die Aufreinigung monoklonaler IgG-Antikörper.

Protein G bindet gegenüber Protein A eine größere Anzahl von Proteinen verschiedener Herkunft (Amersham Pharmacia 1999a). Die Elution geschieht durch einen pH-Wechsel von neutral nach 3.0-2.5.

#### **2.4.6.3.2 Immobilisierte Lektine**

Lektine stellen eine Gruppe von Proteinen dar, die die bemerkenswerte Eigenschaft besitzen, reversibel und spezifisch an Zuckermoleküle gebunden zu werden. Die Separation von Glykoproteinen, Glykolipiden, Polysacchariden, subzellulären Partikeln oder ganzer Zellen ist hierdurch möglich. Insbesondere können Tumorzellen selektiv gebunden werden (Amersham Pharmacia 1999a).

Immobilisierte Lektine finden breite Anwendung bei einer Vielzahl von Separationsproblemen. Die Bindereaktion eines Lektins mit einem Zuckerrest ist analog zur Wechselwirkung eines Antikörpers mit einem Antigen. Die Elution gebundener Substanzen geschieht im Allgemeinen durch Aufprägung eines Ionenstärkegradienten oder durch Zugabe einer kompetitiven Bindesubstanz (Affinitätselution) (Amersham Pharmacia 1999a).

#### **2.4.6.3.3 Immobilisierte Farbstoffe (Dyes)**

Bestimmte synthetische, polyzyklische Farbstoffe stellen eine weitere Klasse gruppenspezifischer Affinitätssorbentien dar. Die im Bereich der Affinitätsverfahren meist verwandten sind Cibacron Blue und Procion Red. Diese Liganden zeigen bestimmte strukturelle Ähnlichkeiten mit natürlich vorkommenden Molekülen wie die Cofaktoren  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$ . Dies ermöglicht eine starke und spezifische Bindung an Proteine, die diese Cofaktoren benötigen, z.B. Kinasen und Dehydrogenasen (Amersham Pharmacia 1999a, Shannessy 1996). Die Elution geschieht durch Zugabe des freien Cofaktors oder durch Änderung des pH-Wertes bzw. der Ionenstärke.

#### **2.4.6.3.4 Immobilisiertes Heparin**

Heparin ist ein Polysaccharid mit der Fähigkeit, an eine große Anzahl von Biomolekülen zu binden. Dazu gehören Enzyme, Serinprotease-Inhibitoren, Wachstumsfaktoren, nukleinsäurebindende Proteine (Restriktions-Endonucleasen, DNA Ligasen, DNA und RNA Polymerasen), Hormonrezeptoren und Lipoproteine. Heparin interagiert auf zwei Weisen mit Proteinen: Als Affinitätsligand und aufgrund seiner hohen Anzahl an Sulfatgruppen auch als Kationenaustauscher. Dadurch kann es beispielsweise die polyanionische Struktur von Nukleinsäuren nachahmen. Da individuelle Proteine oft aufgrund einer einmaligen Kombination von Affinität und Ionenaustausch binden, sind Trennungen aufgrund nur kleiner Unterschiede in der Proteinstruktur möglich.

Die Elution kann durch Zugabe von freiem Heparin erfolgen, wenn die Bindung vornehmlich auf der Affinität beruht. In Fällen bei denen Heparin als Kationenaustauscher fungiert, erhöht man zweckmäßigerweise die Ionenstärke durch Zugabe von  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  oder  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  auf 1.5 bis 2.0 mol/L (Amersham Pharmacia 1999a).

#### **2.4.6.3.5 Immobilisierte kleine Liganden**

Einige sehr kleine Moleküle (so genannte ‚small ligands‘) besitzen eine hohe Affinität zu Biomolekülen hoher Molmasse. Benzamidin (para-Aminobenzoamidin) wird beispielsweise zur Isolierung von Trypsin und Trypsin-ähnlichen Serin-Proteasen verwendet. Es kann für "positive" Affinitätsverfahren, d.h. zur Isolierung der Protease als Produkt, oder für die "negative" Affinitätssorption, also zur Entfernung von Proteasen als Kontamination dienen. Lysin wird als Ligand zur Isolierung von Plasminogen (löst Blutgerinnsel auf),

Plasminogen Aktivator, ribosomaler RNA und doppelsträngiger DNA verwendet (Amersham Pharmacia 1999a).

#### 2.4.6.3.6 Metall-Chelat Affinitätsverfahren

Bei den so genannten Metall-Chelat Affinitätsorptionen werden Proteine und Peptide aufgrund ihrer Affinität zu Metallionen separiert, die zuvor an chelatbildende Ionenaustauscher immobilisiert wurden. Bestimmte Aminosäuren (insbesondere Histidin) im Protein bilden zusammen mit dem Metallion Komplexe bei pH-Werten zwischen 6 und 8 (vgl. Abb. 2-14). Die Anzahl der an der Moleküloberfläche gelegenen Histidine im Protein ist für die Bindefähigkeit zum Metallion verantwortlich. Dadurch eignet sich das Verfahren insbesondere zur Reinigung rekombinanter Proteine mit Poly-Histidin-Gruppen (so genannte "His-tags") (Amersham Pharmacia 1999a). Das Adsorbens wird durch kovalente Kopplung eines chelatbildenden Liganden (wie Iminodiessigsäure, IDA) an die Matrix und anschließender Beladung mit Metallionen hergestellt. Als Metallionen kommen  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Fe^{2+}$  in Frage. Die Bindung ist pH-abhängig und eluiert wird durch pH-Absenkung und Erhöhung der Ionenstärke oder durch Affinitätselution (z.B. mit EDTA oder Imidazol) (Spalding 1991, Janson 1998, Amersham Pharmacia 1999a).

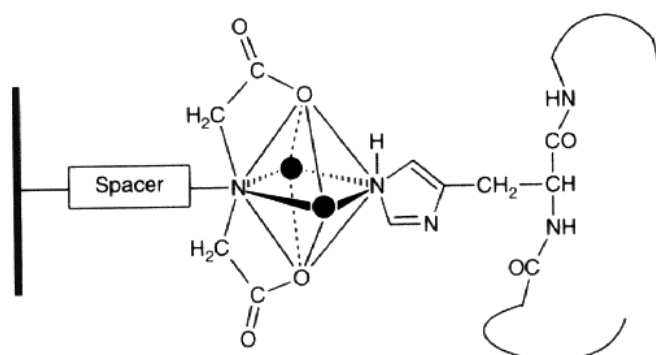


Abb. 2-14: Bindemechanismus eines Proteins an einen IMALT-Träger über einen oberflächennahen Histidinrest. Das Metallion befindet sich im Zentrum des Oktaeders (in der Abbildung nicht dargestellt); nach Deckwer 1999.

Die Anwendung der so genannten Immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) hat sich als hilfreiche und vielseitig verwendbare Technik zur Isolierung und Aufreinigung von Proteinen erwiesen (Arnold 1991, Todd 1994, Martin 1994, O'Brien 1994, 1996, Janson 1998, Abudiab 1998, Jakubith 1998, Amersham Pharmacia 1999a). Als Liganden für Affinitätsorptionen bieten die als Liganden verwendeten Metallionenkomplexe wichtige Vorteile gegenüber biologischen Affinitätsliganden wie Inhibitoren oder Antikörper (siehe Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: Vergleich der IMALT mit "biospezifischen" Affinitätsverfahren; nach Arnold 1991.

<i>Eigenschaft</i>	<i>IMALT</i>	<i>"Biospezifisch"</i>
Liganden-Stabilität	hoch	gering
Protein-Beladung	hoch	gering
Elutionsbedingungen	mild	oft extrem
Ligandenwiedergewinnung nach Regeneration	komplett	i.A. inkomplett
Selektivität	gering - hoch	hoch
Kosten	gering	hoch

Aufgrund der hohen Affinität der hierbei verwendeten Liganden zu ihren Zielmolekülen, lässt sich die Sorption auch absatzweise betreiben, wobei nur *eine* theoretische Trennstufe ausgenutzt wird. Der Vorteil dieser Betriebsweise besteht in erster Linie in der Möglichkeit, auch komplexe, feststoffhaltige Biosuspensionen direkt, d.h. ohne vorherige Abtrennung von Feststoffen und ohne viskositätserniedrigende Maßnahmen, aufzureinigen zu können. Dadurch gelingt es, die Anzahl der benötigten Stufen zur Aufreinigung von Proteinen zu reduzieren und so höhere Gesamtausbeuten zu erzielen. In der Erweiterung der IMAC auf nicht-chromatographische Prozesse werden diese Verfahren im Folgenden unter dem Begriff "Immobilisierte Metall-Affinitätsliganden-Technologie" (IMALT) zusammengefasst.

Die IMALT stellt insbesondere für rekombinante, d.h. gentechnisch hergestellter Proteine, eine neue Dimension der Proteinaufreinigung dar (Arnold 1991). Hierbei kommen gentechnisch erzeugte Hybrid-Proteine zum Einsatz, die speziell zu Aufreinigungszwecken maßgeschneidert werden. Diese enthalten neben dem eigentlichen Zielprotein ein (oligo-) Histidin-Affinitäts-Peptid („His-Tag“) zur selektiven Bindung an IMALT-Sorbentien. Zu den neueren Anwendungen der IMALT zählen die Aufreinigung von rekombinantem menschlichem Wachstumshormon (r-HGH), Gewebefibrinolyseaktivator (TPA),  $\alpha$ -Amylasen, Glykophorine und die Separation ganzer Zellen (Arnold 1991).

Für Metall-Chelat Affinitätsverfahren kommen unterschiedliche meist zweiwertige Metallionen zum Einsatz, die eine unterschiedlich starke Affinität zum Zielprotein aufweisen können. Allgemein gültige Regeln für beliebige Proteine lassen sich jedoch nicht aufstellen. Ausgewählte Beispiele an Proteinen sowie den verwendeten Metallionen, Binde- und Elutionspuffern finden sich z.B. bei Janson und Rydén (1998). Tabelle 2-3 zeigt qualitativ den Einfluss der für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren und den Metallionen, die eine Sorption ermöglichen.

Tabelle 2-3: Vergleich der Metallionen, die eine Sorption von Proteinen bewirken; nach Janson 1998

<i>Präsenz von Histidin oder Tryptophan an der Protein-Oberfläche</i>	<i>Metallionen, die Sorption bewirken</i>
Kein His/Trp	–
Ein His	Cu <sup>2+</sup>
Mehrere His	Cu <sup>2+</sup> (starke Adsorption), Ni <sup>2+</sup>
His-Tag	Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>
Mehrere Trp, kein His	Cu <sup>2+</sup>

#### 2.4.7 Elution des Zielmoleküls

Es gibt kein allgemein gültiges Elutionsschema für alle Affinitätssorbentien. Die Elution kann prinzipiell selektiv oder nicht-selektiv sein. Bei hoch selektiven Adsorbentien ist im Allgemeinen keine selektive Elution notwendig, während bei so genannten gruppenspezifischen Adsorbentien, die eine ganze Zielmolekülklasse zu sorbieren vermag, häufig selektiv eluiert wird (Amersham Pharmacia 1999a). Oft muss ein Kompromiss zwischen extremen Elutionsbedingungen und dem Risiko der Denaturierung des Zielmoleküls gefunden werden. Die Elution kann durch eine schlagartige oder kontinuierliche Änderung der Bedingungen erfolgen. Möglich sind hierbei:

- Eine pH-Wert-Änderung. Hierdurch kann die Änderung der Ladung bestimmter Gruppen sowohl am Liganden als auch am Zielmolekül erfolgen. Diese Änderung kann die Affinität der Bindestelle direkt oder indirekt durch Konformationsänderung herabsetzen. Die chemische Stabilität der Matrix, des Liganden und des Zielmoleküls begrenzt den pH-Bereich, der verwendet werden kann.
- Die Änderung der Ionenstärke: Die Ionenstärke wird hierbei im Allgemeinen durch Zugabe von NaCl erhöht, wodurch Proteine meist bei Salzkonzentrationen unterhalb 1 mol/L eluieren. Bei sehr kleinen Dissoziationskonstanten von  $K_d < 10^{-10}$  mol/L muss unter Umständen ein chaotropes Ion wie SCN<sup>-</sup> oder I<sup>-</sup> verwendet werden.
- Eine Affinitätselution: Selektive Elutionsmittel werden häufig dann verwendet, wenn ein gruppenspezifisches Adsorbens verwendet wurde oder wenn die Affinität gering ist ( $K_d$  zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-3}$  mol/L). Selektiv gebundene Zielmoleküle werden häufig bereits durch gering konzentrierte Elutionssubstanzen, oft unterhalb 10 mmol/L, verdrängt.
- Die Zugabe polaritätsreduzierender Substanzen (wie Dioxan) führt durch Änderung hydrophober Wechselwirkungen zur Elution von z.B. Antikörpern.
- Weitere Spezialmethoden für Fälle, in denen die oben genannten Methoden nicht zum gewünschten Ziel führen, sind in der Literatur beschrieben (Amersham Pharmacia 1999a).

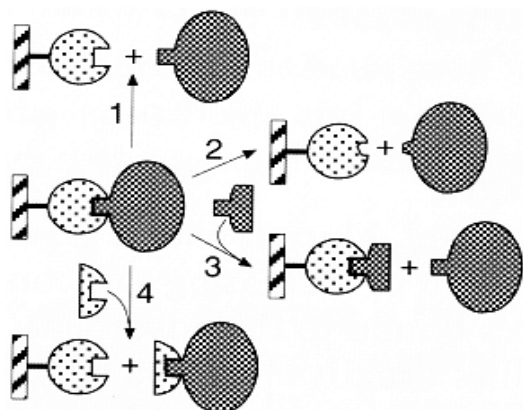


Abb. 2-15: Elutionsmethoden für das Zielmolekül.

Idealerweise reicht eine Änderung der Pufferzusammensetzung zur Elution des gebundenen Zielmoleküls, ohne dass es selbst oder der Ligand geschädigt wird (1). Extreme Elutionsbedingungen (2) können permanente oder vorübergehende Schäden hervorrufen. Die spezifische Elution (3,4) durch Zugabe einer Substanz, die selbst eine hohe Affinität zur Bindung aufweist, erhöht die Gesamtselektivität. Nach Amersham Pharmacia 1999a.

## 2.4.8 Poröse und kompakte Matrices

### 2.4.8.1 Stofftransport und Kapazität

Der Transport von Molekülen durch die Poren eines konventionellen makroporösen Materials wird (bis auf den Fall der Durchströmung einer Membran) durch Diffusion kontrolliert (Svec 1996). Makromoleküle diffundieren dabei ausgesprochen langsam aus einer freien Lösung in die Poren eines porösen Trägers, wo sie von einem (Affinitäts-)liganden gebunden werden (vgl. Abb. 2-16). Sind die Sorptionszeiten zu kurz gewählt, werden nur die Liganden beladen, die nahe an der Kornoberfläche liegen. Ebenso können sterische Behinderungen das Vordringen von Makromolekülen an tiefer gelegene Sorptionsstellen verhindern, so dass die theoretische Gesamtkapazität nur zu einem Bruchteil ausgenutzt wird.

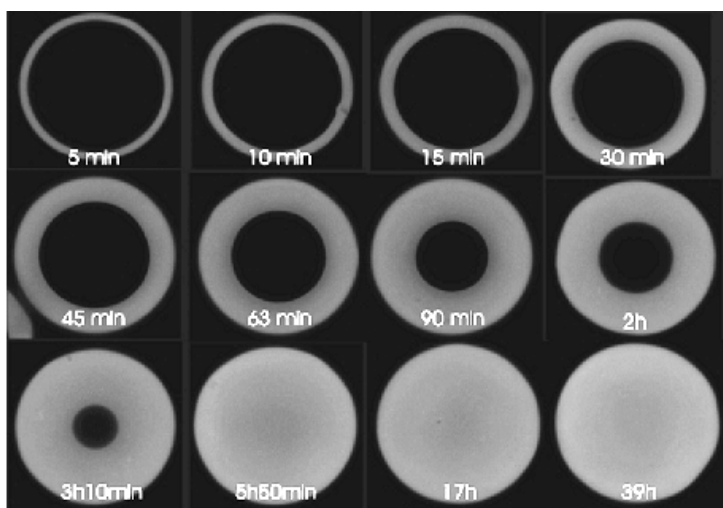


Abb. 2-16: Ein poröses Kationenaustauscherpartikel (70µm) sättigt sich mit Rinderserumalbumin; konfokalmikroskopische Aufnahme; nach Ljunglöf 1998.

Die Verwendung nicht-poröser, kompakter Partikeln ist eine mögliche Lösung dieses Problems. Da kompakte Partikeln keine Poren aufweisen, treten auch keine intrapartikulären Diffusionslimitierungen auf. Leider ist mit einer geringen Porosität jedoch in der Regel gleichzeitig eine geringe Kapazität verbunden. Um die typischen spezifischen Oberflächen von makroporösen Polymeren (10 bis einige 100 m<sup>2</sup>/g) auch mit

kompakten Partikeln zu erreichen, sind ausgesprochen kleine Partikeln von Nöten: Für eine spezifische Oberfläche von  $100 \text{ m}^2/\text{g}$  ist bei der Verwendung kompakter, kugelförmiger Magnetit-Partikeln beispielsweise ein Partikeldurchmesser von nur 12 nm notwendig.

Derart kleine Partikeln können nicht in einem Festbett durchströmt werden, da der hohe Druckverlust nur extrem kleine Durchflussraten zulassen würde. Selbst 2 bis 5  $\mu\text{m}$  große kompakte Adsorbentien sind gepackt in Säulen ausschließlich für analytische Anwendungen von Nutzen (Svec 1996).

#### 2.4.8.2 Fouling

Die starke Neigung kommerziell erhältlicher poröser Trägermaterialien zum "Fouling" aufgrund der Anwesenheit biologischer Bestandteile und die Schwierigkeit, derartige Verunreinigungen wieder zu entfernen, schränkt die Verwendung poröser Matrices vielfach ein (Munro 1977, Halling 1979, O'Brien 1996). Nicht-poröse Partikeln sind im Vergleich dazu weniger fouling-anfällig, leichter zu reinigen und daher deutlich besser für eine Aufreinigung aus komplexen Biosuspensionen geeignet (Munro 1977, O'Brien 1996).

Zwei Arten des Foulings werden unterschieden, nämlich (i) intrapartikuläres Fouling poröser Träger und (ii) interpartikuläres Fouling von sowohl porösen als auch kompakten Trägern (Munro 1977). Für Festbetten ist (ii) oft dominierend. Auf der Oberfläche der Materialien anhaftendes Foulingmaterial reichert sich mit der Zeit aufgrund geringer Scherkräfte an und kann schließlich die Partikelzwischenräume ausfüllen. Dies führt unter anderem zu Kanalströmungen mit hoher axialer Dispersion (und als Folge zu einer Reduzierung der Anzahl theoretischer Trennstufen), einem Anstieg des Druckverlusts und einer Verringerung der Sorptionskapazität. Festbett-Chromatographiesäulen können deshalb nicht mit ungeklärten Biosuspensionen beaufschlagt werden.

In stark fluidisierten Wirbelschichten mit hoher Partikelrückvermischung ist interpartikuläres Fouling sehr unwahrscheinlich, während es in Fluidbetten stark vom Grad der Fluidisierung abhängt (Munro 1977). Die im 'Downstream Processing' eingesetzten stabilisierten Wirbelschichten EBA und MSFB (vgl. Abschnitt 2.3.1 und 2.3.2) streben allerdings eine weitgehende Unterdrückung der Partikelrückvermischung bei einer vergleichsweise geringen Bettexpansion an, wodurch interpartikuläres Fouling begünstigt wird. Ameskamp *et al.* (1999) berichten über eine Biomasserückhaltung innerhalb des Betts während der Beladungsphase einer EBA-Aufreinigung des Immunglobulins IgG1 aus einer Hybridoma-Zellkultur. Die Biomasse konnte auch im Waschschrift nicht vollständig entfernt werden. Ein Großteil der verbleibenden Partikeln gelangte ins Eluat, so dass das gereinigte Antikörperkonzentrat immer noch Partikeln enthielt und einer weitergehenden Klärung unterzogen werden musste, bevor weitere Aufreinigungsschritte erfolgen konnten.

In Rührbehältern tritt interpartikuläres Fouling nicht auf. Munro *et al.* (1977) charakterisierten ein fortschreitendes Fouling gerührter poröser und nicht-poröser Träger durch den enzymatischen Aktivitätsverlust des zuvor auf den Trägern immobilisierten Chymotrypsins. Während bei kompakten Nickelpartikeln, die über 48 Stunden in Vollmilch gerührt wurden, kein signifikanter Aktivitätsrückgang zu verzeichnen war, ging die Aktivität bei porösen Cellulose-basierten Partikeln innerhalb 6 Stunden auf 53% der Ausgangsaktivität zurück. Nach 48 Stunden betrug die Aktivität nur noch 40% des Anfangswerts. Ähnliche Aktivitätsverluste ergaben sich für die porösen Cellulose-Partikeln, wenn sie statt in Milch in einem geklärten Hefehomogenisat suspendiert wurden.

## 2.5 Grundlagen des Magnetismus und der Magnetseparation

Im folgenden Kapitel werden zunächst für die Magnetseparation wichtige physikalische Grundgrößen sowie das Verhalten von Materialien im Magnetfeld kurz erläutert. Die physikalischen Erklärungen für die verschiedenen Erscheinungsformen des Magnetismus finden sich in Lehrbüchern und sollen hier nicht wiederholt werden (z.B. Gerthsen 1993). In den darauf folgenden Abschnitten werden die Grundprinzipien der in der Arbeit untersuchten magnetischen Separationsverfahren dargestellt.

### 2.5.1 Definition magnetischer Kenngrößen

#### *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:

$$B = \frac{F}{I \cdot L} \quad \text{Gleichung 2-2}$$

nennt man den Betrag der magnetischen Induktion oder Flussdichte des magnetischen Felds. Wenn ein Leiter der Länge  $L = 1 \text{ m}$ , der von einem Strom  $I = 1 \text{ A}$  durchflossen wird, in einem Magnetfeld die Kraft  $1 \text{ N}$  erfährt, so besitzt das Feld die Stärke  $1 \text{ Tesla}$ . 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. Für die Einheit der magnetischen Flussdichte folgt demnach:

$$1 \frac{\text{N}}{\text{A} \cdot \text{m}} = 1 \frac{\text{V} \cdot \text{s}}{\text{m}^2} \hat{=} 1 \text{ Tesla} \quad \text{Gleichung 2-3}$$



### *Magnetische Feldstärke und Permeabilität*

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

$$H = I \cdot \frac{n}{L} \quad \text{Gleichung 2-4}$$

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:

$$B = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot H \quad \text{Gleichung 2-5}$$

Dabei ist  $\mu_0$  die magnetische Feldkonstante (auch Vakuumpermeabilität genannt) und  $\mu_r$  die Permeabilitätszahl.  $\mu_r$  ist eine Maßzahl und beschreibt den verstärkenden oder abschwächenden Einfluss der innerhalb der Spule befindlichen Materie. Liegt innerhalb der Spule Vakuum vor, wird die Permeabilitätszahl zu eins.

### *Polarisation und Suszeptibilität*

Bringt man eine Substanz in ein magnetisches Feld, so ändert sich die magnetische Flussdichte innerhalb der Materie von dem Anfangswert  $B_{\text{Vakuum}}$  auf einen neuen Wert  $B_{\text{Materie}}$ . Je nachdem, ob die magnetische Flussdichte innerhalb des Stoffes erhöht oder erniedrigt wird, bezeichnet man den Stoff als paramagnetisch oder als diamagnetisch. Die Änderung der magnetischen Induktion  $\Delta B$  wird magnetische Polarisation  $J$  genannt. Es gilt:

$$J = B_{\text{Materie}} - \mu_0 \cdot H \quad \text{Gleichung 2-6}$$

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

$$J = \kappa \cdot \mu_0 \cdot H \quad \text{Gleichung 2-7}$$

Der Proportionalitätsfaktor heißt magnetische Suszeptibilität  $\kappa$ :

$$\kappa = \mu_r - 1 \quad \text{Gleichung 2-8}$$

Je nach Größe der Permeabilitätszahl  $\mu_r$  werden die Stoffe mit konstanter Suszeptibilität 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 großen Feldstärken einem Maximalwert zu. Die Permeabilitätszahl  $\mu_r$  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.

$$M = \Delta H = H_{\text{Materie}} - H_{\text{Vakuum}} \quad \text{Gleichung 2-9}$$

Die Einheit der Magnetisierung ist A/m. Den Maximalwert der Polarisation bzw. Magnetisierung bei ferro- bzw. ferrimagnetischen Stoffen bezeichnet man als Sättigungspolarisation  $J_s$  bzw. Sättigungsmagnetisierung  $M_s$ . Er kommt durch eine vollständige Ausrichtung der atomaren magnetischen Dipole unter der magnetischen Kraftwirkung des Magnetfeldes zustande. Die Magnetisierung wächst mit zunehmender Feldstärke so lange, 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 Abb. 2-17 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.

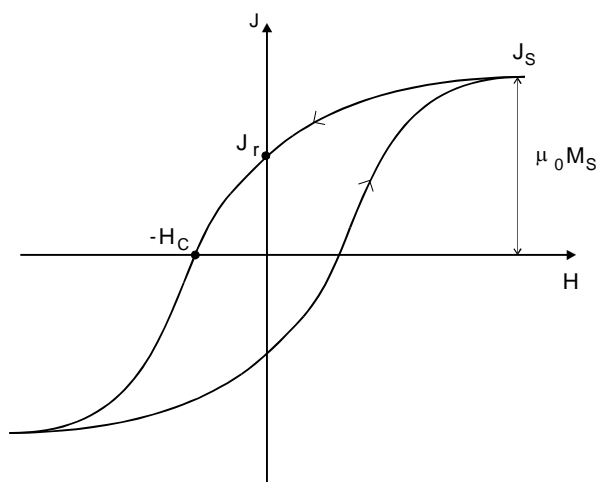


Abb. 2-17: Magnetisierungskurve einer ferromagnetischen Substanz ausgehend vom Zustand der magnetischen Sättigung.

### *Einfluss der Partikelform*

Unter Einwirkung eines äußeren homogenen Magnetfelds der Stärke  $H_0$  ergibt sich für ein isotropes Material im einfachsten Fall folgende Magnetisierung bzw. Polarisation entlang der Feldrichtung:

$$M = \kappa \cdot H_0 \quad \text{Gleichung 2-10}$$

bzw.

$$J = \mu_0 \cdot \kappa \cdot H_0 \quad \text{Gleichung 2-11}$$

Die Suszeptibilität ist hierbei jedoch keine reine Stoffeigenschaft, sondern sie ist neben der Partikelgröße auch von der Partikelform abhängig. Die Formabhängigkeit wird über den so genannten Demagnetisierungsfaktor  $D_m$  beschrieben, wobei gilt:  $0 < D_m < 1$ . Eine Auswahl von Demagnetisierungsfaktoren verschiedener Körper finden sich bei Svoboda (1987).

Die Suszeptibilität eines Probekörpers lässt sich bei Kenntnis des Demagnetisierungsfaktors wie folgt aus der intrinsischen Suszeptibilität berechnen:

$$\kappa = \frac{\kappa_i}{1 + D_m \kappa_i} \quad \text{Gleichung 2-12}$$

Die intrinsische Suszeptibilität  $\kappa_i$  entspricht der Suszeptibilität, die an einem Probekörper gemessen wird, der keinerlei Selbstmagnetisierung zeigt. Beispiele hierfür sind ein in axialer Richtung magnetisierter, sehr langer Zylinder oder ein aus dem Probenmaterial bestehender geschlossener Ring. Aus Gleichung 2-12 ergeben sich folgende Grenzfälle für ein stark magnetisches Material wie Magnetit:

$$H_0 \ll \frac{J_s}{\mu_0} \quad \Rightarrow \quad \kappa_i \gg \frac{1}{D_m} \quad \Rightarrow \quad \kappa \approx \frac{1}{D_m}$$

$$H_0 \gg \frac{J_s}{\mu_0} \quad \Rightarrow \quad \kappa_i \ll \frac{1}{D_m} \quad \Rightarrow \quad \kappa \approx \kappa_i$$

### **2.5.2 Physikalische Grundlagen der Magnetseparation**

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:

$$F_m = \mu_0 V_p M_p \nabla H \quad \text{Gleichung 2-13}$$

mit der Permeabilitätskonstante des Vakuums  $\mu_0$ , dem Partikelvolumen  $V_p$ , der Partikelmagnetisierung  $M_p$  und dem Gradienten der magnetischen Feldstärke  $\nabla H$  am Ort des Partikels. Die Partikelmagnetisierung lässt sich wiederum über die magnetische Volumensuszeptibilität  $\kappa$  und die magnetische Feldstärke  $H$  ausdrücken:

$$M_p = \kappa H$$

Gleichung 2-14

wobei die Volumenssuszeptibilität  $\kappa$  für dia- und paramagnetische Substanzen im interessierenden Feldbereich eine Konstante darstellt, wogegen sie für ferri- und ferromagnetische Substanzen unter anderem eine Funktion der Partikelform und -größe sowie der Feldstärke ist. Für unterschiedliche Substanzen variieren die Volumenssuszeptibilitäten über mehrere Größenordnungen. Da die Art der abzutrennenden Partikeln in der Regel vorgegeben ist, bilden die Einflussgrößen auf die innerhalb eines Separators erzielbare Magnetkraft die vorherrschende Feldstärke und insbesondere deren Gradient (siehe Gleichung 2-13).

### 2.5.3 Grundprinzip der Hochgradientenmagnetseparation (HGMS)

Das in Abb. 2-18 erläuterte Grundprinzip der Hochgradienten-Magnetseparation ist einfach und 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 Partikeln stark anziehend wirken. Die Partikeln werden an die Oberfläche der Matrix angelagert und die gereinigte Suspension verlässt das System. Die Form der Anlagerungsbereiche ist in Abb. 2-20 für die so genannte transversale Filteranordnung an einem magnetisierten Einzeldraht zu erkennen. Die Abmessungen übersteigen im Allgemeinen den Drahtquerschnitt um ein Vielfaches. Ist die Aufnahmekapazität der gesamten Filtermatrix erschöpft, wird die Zufuhr der Suspension gestoppt, der Magnet ausgeschaltet und die abgeschiedenen Partikeln werden (im Allgemeinen im Gegenstrom) ausgespült. Anschließend kann ein neuer Abscheidezyklus beginnen.

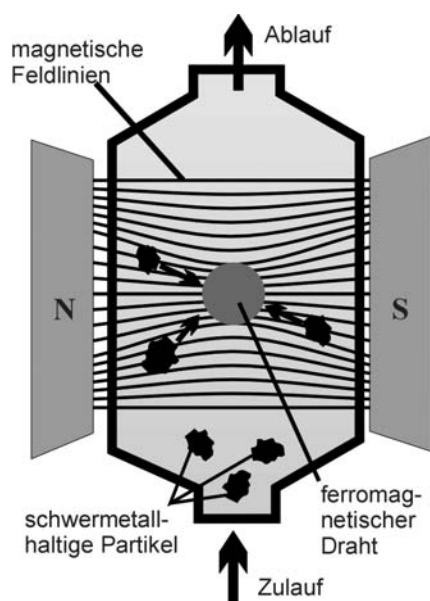


Abb. 2-18: Grundprinzip der Hochgradienten-Magnetseparation

Nachdem mit dem Frantz-Scheider (Frantz 1937) und dem Jones-Separator (Iannicelli 1976) bereits seit den 1940-er bzw. 60-er Jahren Vorläufer dieser Technik bekannt waren, wurde der erste wirkliche Hochgradienten-Magnetseparator mit einer Abscheidematrix aus feinen Filamenten eines ferromagnetischen Materials Anfang der 70-er Jahre von Kolm vorgeschlagen (Kolm 1971). Bereits rasch nach der Entwicklung des Prinzips wurden erste Bautypen zur Kaolin-Reinigung, zur Wasseraufbereitung in Stahlwerken, zum Kondensatpolishing in Kraftwerken und zur Anreicherung schwach magnetischer Erze eingesetzt. Gute Übersichten zu den Grundlagen der Hochgradienten-Magnetseparation und ihrer Anwendung in den genannten Anwendungsgebieten finden sich unter anderem bei Pfister (1979), Gerber (1983) und Svoboda (1987).

Hinsichtlich der Anordnung zwischen Flüssigkeitsströmung, Draht und Magnetfeld lassen sich prinzipiell 3 Konfigurationen unterscheiden (Svoboda 1987). In einer so genannten *longitudinalen* Anordnung verläuft die Strömung parallel zur Magnetfeldrichtung, die wiederum senkrecht auf der Drahtachse steht. Die induzierten Magnetpole des Drahts liegen damit zentral auf der strömungszugewandten bzw. der strömungsabgewandten Drahtseite, wobei es im Falle nicht zu hoher Reynoldszahlen nahezu ausschließlich zu Partikelanlagerung auf der Staustromseite kommt (siehe Abb. 2-19). Neben der longitudinalen Anordnung sind als Grenzfälle des geometrischen Aufbaus in HGMS noch die transversale und die axiale Anordnung zu nennen. Bei der *transversalen* Anordnung stehen die Strömungsrichtung, das Magnetfeld und die Drahtachse jeweils senkrecht aufeinander. Die Partikelabscheidung erfolgt in diesem Fall in zwei Anlagerungsbereichen, die gegenüber dem Staupunkt an der strömungszugewandten Drahtseite um  $\pm 90^\circ$  verdreht sind. Abb. 2-20 zeigt ein Foto der Anlagerungsbereiche an einem magnetisierten Einzeldraht in transversaler Anordnung. Schließlich ist eine Partikelabscheidung auch bei *axialer* Anordnung möglich, bei der die Strömung parallel zur Drahtachse verläuft. Die Anlagerungen bilden sich hierbei in der Magnetfeldebene entlang des Drahts.

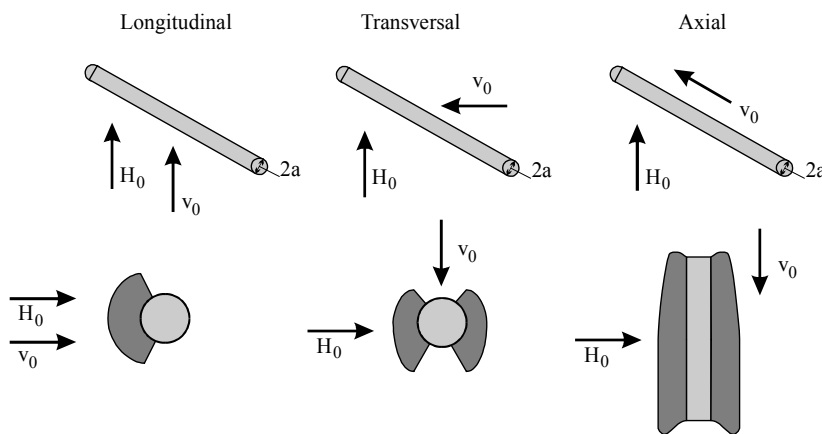


Abb. 2-19: Geometrische Grundkonfigurationen der Anordnung zwischen Draht, Magnetfeld und Strömungsrichtung sowie zugehörige Partikelanlagerungsbereiche.

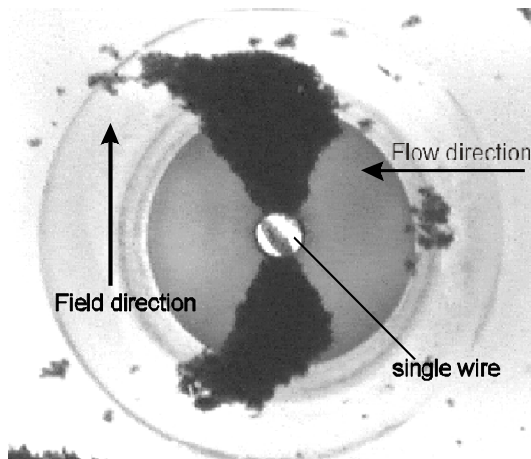


Abb. 2-20: Foto der Anlagerungsbereiche von magnetithaltigen Kupferhydroxidflocken an einem magnetisierten Einzeldraht (der hier nur im Querschnitt zu sehen ist) in transversaler Anordnung (Franz 1997).

### 2.5.4 Grundprinzip der Offenen-Gradienten Magnetseparation (OGMS)

Im Unterschied zu Hochgradienten-Magnetseparatoren besitzen so genannte Offene-Gradienten Magnetseparatoren (OGMS) keine Abscheidematrix, sondern die auf die Partikeln wirkende Magnetkraft basiert allein auf der Feldstärke und dem Gradienten des *äußeren* Magnetfelds. In der Regel werden dabei magnetische bzw. unmagnetische Partikeln entlang ihrer Strömungs- oder Flugbahn unterschiedlich ausgelenkt und dadurch separiert. Ein "Open Gradient"-Magnetscheider hat also einen Zulauf aber zwei oder mehr Abläufe. Bei der OGMS handelt es sich um ein echt kontinuierliches Verfahren, da es innerhalb des Magnetscheiders zu keiner Partikelakkumulation kommt. Den in der Erzaufbereitung und der Mülltrennung eingesetzten, trocken arbeitenden OGMS ist dabei gemeinsam, dass zumindest eine Teilkomponente der aus den Feldgradienten resultierenden Magnetkraft senkrecht zu den Flugbahnen des aufgegebenen Partikelgemischs wirkt. Hierdurch kommt es innerhalb des OGMS zu einer allmählichen Entmischung magnetischer und unmagnetischer Komponenten.

Ein von diesem Prinzip abweichender OGMS wurde erstmals von van Kleef (1984) vorgestellt. Bei dem von ihm beschriebenen, einfachen Aufbau wirkt die Magnetkraft innerhalb einer gewissen Zone antiparallel zur Strömungsrichtung (siehe Abb. 2-21).

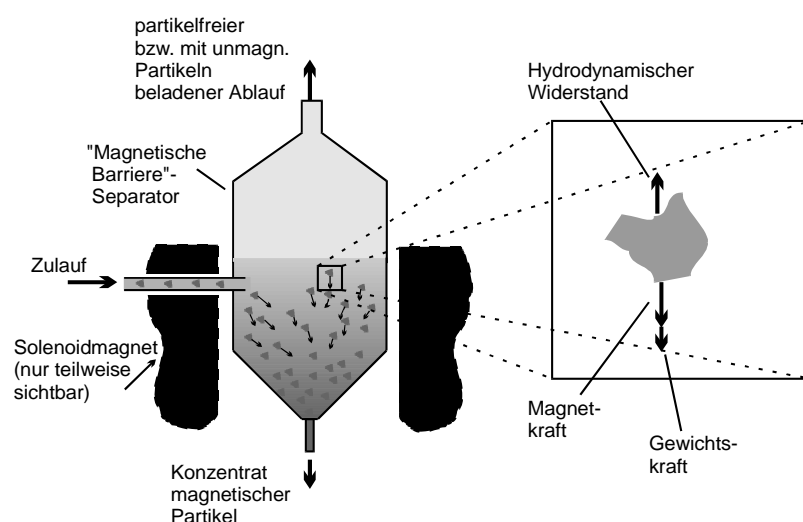


Abb. 2-21: Grundprinzip der Offenen-Gradienten Magnetseparation (nach dem Prinzip der magnetischen Barriere).

Übersteigt die auf ein Partikel einwirkende Magnetkraft die entgegengesetzten hydrodynamischen Widerstandskräfte, wird das Partikel innerhalb des Magnetfeldbereichs zurückgehalten. Die Zone hoher Magnetkräfte wirkt auf diese Partikeln wie eine Barriere, die nicht überwunden werden kann, weshalb von Franzreb *et al.* für diese Art von Magnetseparator der Begriff „Magnetische Barriere“ gewählt wurde (Franzreb 1997, 1998). Während des Betriebs reichern sich die magnetisierbaren Partikeln innerhalb des Magnetseparators immer mehr an. Aufgrund der dadurch stark zunehmenden Kollisionswahrscheinlichkeit zwischen den Partikeln bewirkt die Magnetische Barriere neben der eigentlichen Abtrennung auch eine Verbesserung der Agglomeration und damit eine weitere Erhöhung des Abscheidegrads. Um einen stationären Betrieb des Separators zu erreichen, ist es notwendig, die akkumulierten Partikeln über einen Konzentratabzug aus dem Magnetfeldbereich abzuziehen. Hierbei ergibt sich das Problem, dass auch im Verlauf des Konzentratabzugs die Partikeln eine Magnetische Barriere überwinden müssen. Dieses Problem wird dadurch gelöst, dass der Querschnitt des Konzentratabzugs sehr klein gegenüber dem Separatorquerschnitt gewählt wird, wodurch die aus der hohen Strömungsgeschwindigkeit resultierenden starken hydrodynamischen Widerstandskräfte die Magnetkräfte überwinden können.

### 2.5.5 Grundprinzip der Repulsive-Mode Magnetseparation (RMMS)

Wird ein ferromagnetischer zylindrischer Draht in ein Magnetfeld gebracht, so wird das Feld dadurch stark verzerrt und es bilden sich in Feldrichtung Zonen aus, die auf para- und ferromagnetische Partikeln *anziehend* wirken. Dieses Prinzip wird zur Abscheidung von Partikeln in der Hochgradientenmagnetseparation (HGMS) angewendet.

Gleichzeitig bilden sich senkrecht zur Feldrichtung Zonen verringerter Feldstärke aus, die auf ferromagnetische Partikeln *abstoßend* wirken. Unter Ausnutzung dieser abstoßenden Bereiche magnetisierter Drähte kann ein kontinuierliches Magnetseparationsverfahren realisiert werden, bei dem kontinuierlich ein mit Partikeln abgereichertes 'Filtrat' und mit magnetischen Partikeln angereichertes 'Konzentrat' anfällt (Takayasu 1984, Gerber 1989, Franzreb 1999). Dieses Verfahren wird als kontinuierliche axiale Hochgradientenmagnetseparation (Gerber 1989) oder im Folgenden mit Repulsive-Mode Magnetseparation (RMMS) bezeichnet.

Abb. 2-22 zeigt das Grundprinzip des Verfahrens. Ein Strömungskanal wird in der Nähe des abstoßenden Bereichs eines magnetisierten Drahts/Stabs angeordnet. Der Kanal verhindert, dass Partikeln in den anziehenden Bereich des Stabs kommen und dadurch abgeschieden werden können. Wird eine Suspension durch den Kanal geleitet, so werden para- und ferromagnetische Partikeln vom Stab abgestoßen. Durch den Einbau von Trennwänden am Ende der Separationsstrecke erhält man eine Filtrat- und Konzentratfraktion.

Ebenso kann das Verfahren zur selektiven Separation unterschiedlicher Feststoffe aus Suspensionen verwendet werden. Takayasu *et al.* (2000) berichten über die kontinuierliche Separation zwischen weißen und roten Blutzellen über einen RMMS mit 3.6 m Länge. Hierbei werden paramagnetische rote Blutzellen vom Draht abgestoßen, während diamagnetische weiße Blutzellen angezogen werden.

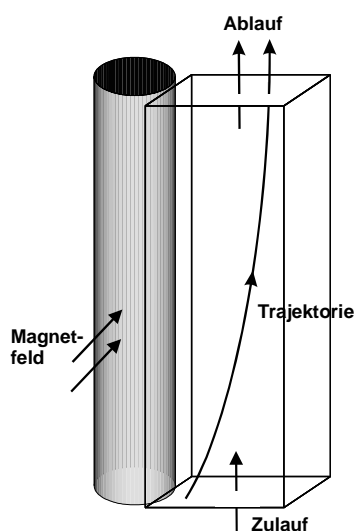


Abb. 2-22: Grundprinzip der Repulsive-Mode Magnetseparation (RMMS).

Die Strömung verläuft parallel zu einem senkrecht dazu magnetisierten Draht, wodurch eine Kraft auf magnetisierbare Partikeln senkrecht zu Strömung und Magnetfeld hervorgerufen wird.

In einem neuartigen Verfahren wird ein Strömungskanal zwischen *zwei* magnetisierten Stäben angeordnet (Franzreb 1999). Werden magnetisierbare Partikeln in den Bereich zwischen den Drähten eingebracht, so bewegen sie sich aus dem abstoßenden Bereich heraus in Richtung der anziehenden Bereiche. Durch diese Anordnung werden magnetisierbare Partikeln zunächst abgestoßen, so dass sie ins Zentrum des Strömungskanals



gelangen. Aufgrund des Einflusses der anziehenden Bereiche der Stäbe werden die Partikeln aber zusätzlich zur Seite ausgelenkt, so dass die Trennwände zur Aufteilung der Fraktionen anders angeordnet werden müssen (vgl. Kapitel 3). Zum genauen Verständnis des Verlaufs der Partikelbahnen innerhalb des RMMS ist die Berechnung der Feldverteilung um die beiden magnetisierten Drähte notwendig. Hierauf wird im Kapitel 4 näher eingegangen. Im Rahmen der Arbeit wurde ein diesem Prinzip folgender RMMS gefertigt und hinsichtlich seiner Eignung zur Separation magnetischer Mikropartikeln untersucht.

### 3 Konstruktiver Teil

In diesem Kapitel werden die in der Arbeit verwendeten Magnetseparationssysteme von der konstruktiven Seite her vorgestellt. Hierzu zählen insbesondere neue Separatorentwicklungen für die drei untersuchten Separationsverfahren HGMS, OGMS und RMMS, die hierfür verwendeten Magnetfeldquellen und Berechnungen zur Auslegung der Systeme.

#### 3.1 Verwendete Magnetfeldquellen

##### 3.1.1 Supraleitende Solenoidspule

Um den Einfluss auch vergleichsweise hoher Magnetfelder auf die Magnetseparation (HGMS und OGMS) magnetischer Mikrosorbentien untersuchen zu können, wurde ein supraleitendes Magnetsystem verwendet, das maximale Flussdichten bis 5 Tesla ermöglicht (Fa. Cryogenic Ltd., England). Das System besteht aus einer (unterhalb etwa 14 K) supraleitenden Nb<sub>3</sub>Sn-Spule, die sich in einem evakuierten Kryostaten befindet. Die Kühlung erfolgt ohne Verwendung von flüssigem Helium („cryogenfree“) unter Einsatz eines so genannten Gifford-McMahon-Cryocoolers. Die technischen Daten des Magnetsystems sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Spezifikationen des verwendeten supraleitenden Magnetsystems

Zentrales Feld (Feldkonstante)	0.0444 T/Ampère
Maximaler Strom innerhalb der Spule	120 Ampère
Maximales Feld	5.0 Tesla
Anzahl der Wicklungen	6900
Durchmesser der Raumtemperatur-Bohrung	80 mm
Durchmesser der Magnetspule	204 mm
Länge der Magnetspule	175mm
Zeit zum Erreichen der maximalen Flussdichte	45 sec
Durchmesser des Kryostaten	510 mm
Höhe des Kryostaten	268 mm

Das verwendete System ist in Abb. 3-1 schematisch im Querschnitt und in der Aufsicht dargestellt.

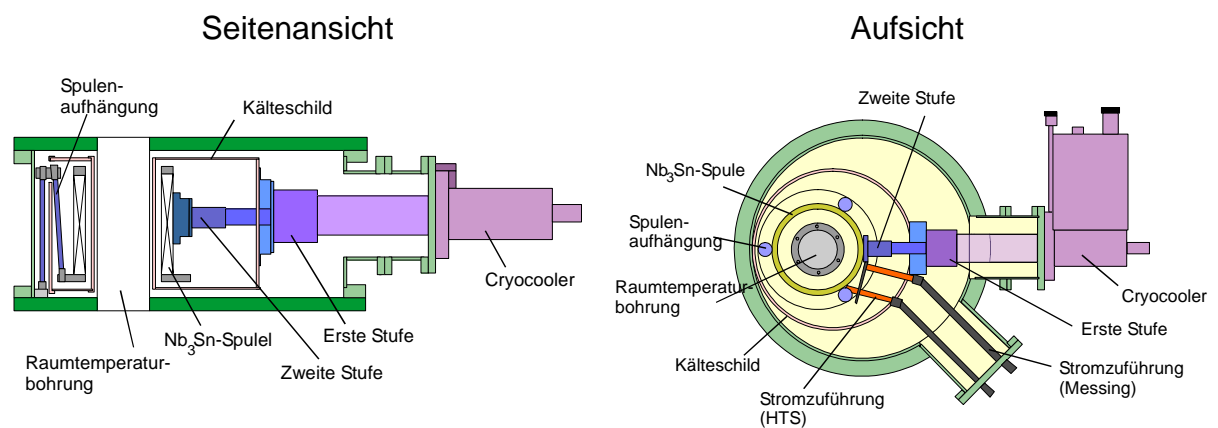


Abb. 3-1: Schematische Seitenansicht und Aufsicht des supraleitenden Magnetsystems

Eine genaue Berechnung des Feldverlaufs gestattet es, den durch die Spule erzeugten Feldgradienten und damit die im Falle der OGMS auf magnetische Partikeln einwirkende Magnetkraft zu berechnen. Die Berechnung der Flussdichte entlang der Achse der Raumtemperaturbohrung lässt sich aus der Integration des Biot-Savart'schen Gesetzes vereinfacht berechnen gemäß (Michalowsky 1995):

$$B(z) = \frac{1}{2} \mu_0 I \frac{n}{2b} \left( \frac{b-z}{\sqrt{a^2 + (b-z)^2}} + \frac{b+z}{\sqrt{a^2 + (b+z)^2}} \right) \quad \text{Gleichung 3-1}$$

mit der Stromstärke  $I$ , der Windungszahl  $n$ , dem mittleren Spulenradius  $a$  und der halben Spulenlänge  $b$ . Die Flussdichte entlang der Spulenchse, der Flussdichtegradient, und das für die Magnetkraft maßgebliche Produkt der beiden Größen ist für die supraleitende Spule in Abb. 3-2 dargestellt.

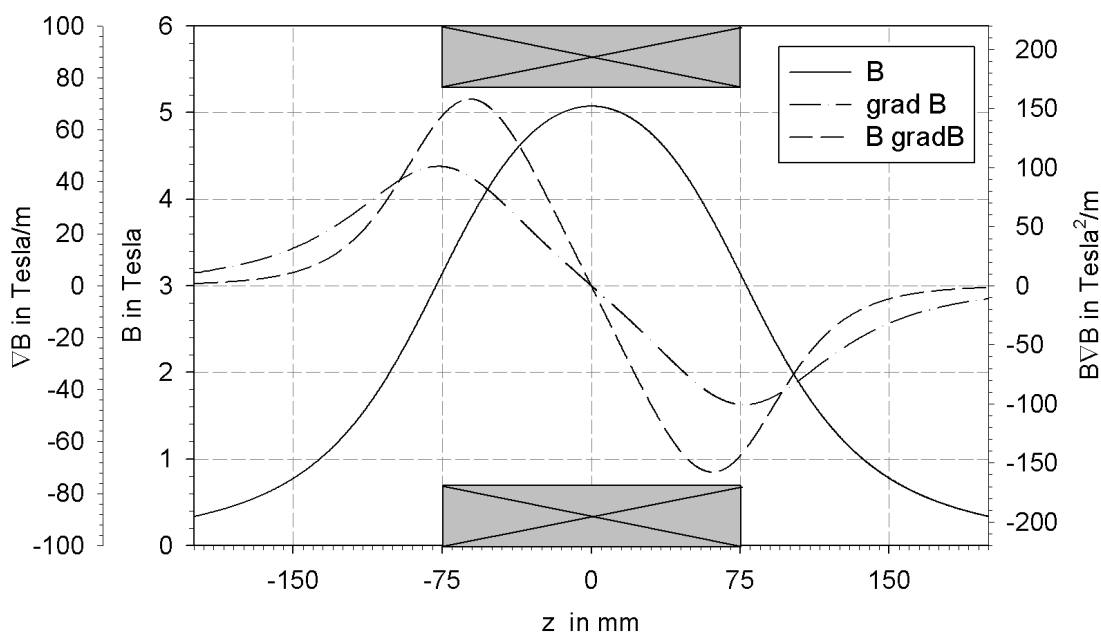


Abb. 3-2: Flussdichte, Flussdichtengradient und ihr Produkt entlang der Spulenachse für den maximalen Spulenstrom von 120 Ampère.

Die Verbreitung supraleitender Systeme für Aufgaben der Magnetseparation ist bisher gering, da die Vorteile von Flussdichten über 2 Tesla oftmals den zusätzlichen Aufwand nicht rechtfertigen. Zum Einen erreichen ferro- und ferrimagnetische Substanzen schon bei geringeren Feldstärken ihre magnetische Sättigung, zum Anderen lassen sich höhere Magnetkräfte neben einer Erhöhung der Feldstärke auch durch eine Erhöhung des Gradienten des magnetischen Feldes erzielen. Ein Gebiet auf dem zukünftig supraleitende Systeme an Interesse gewinnen werden, ist die Offene-Gradienten-Magnetseparation, da in diesem Fall der verfügbare Feldgradient proportional zur Feldstärke ansteigt.

### 3.1.2 Permanentmagnet

Für Versuche mit dem ‚Repulsive mode‘ Magnetseparator und für wenige HGMS-Versuche wurde ein Hufeisen-Permanentmagnetsystem mit Eisenjoch und NdFeB-Permanentmagneten verwendet. Die technischen Daten sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Tabelle 3-2: Technische Daten des verwendeten Permanentmagneten

Maximale Flussdichte der Seltenerdmete	0.5 Tesla
Flussdichte im Zentrum des Luftspalts	0.43 Tesla
Energieprodukt des NdFeB-Werkstoffs	270-320 kJ/m <sup>3</sup>
Polfläche	150×102 mm
Polabstand	62 mm

### 3.2 Zylindrischer HGMS-Laborseparator für longitudinale Anordnung

Für Versuche mit einem HGMS-Laborseparator wurde ein zylindrisches Filtergehäuse aus Messing oder Plexiglas mit Innendurchmesser 30 mm mit so genannten Filterronden dicht befüllt. Das Filtergehäuse wurde mit gedichteten Stutzen beiderseits verschlossen und die Anordnung nach Anschluss des Zu- und Ablaufschlauchs coaxial und mittig in die supraleitende Spule eingebracht. Es standen Filtergehäuse mit verschiedenen Längen zur Verfügung. Die Filterronden wurden aus ferromagnetischem Edelstahl (X8Cr17 entsprechend DIN 1.4016 bzw. AISI SS430) gefertigt und mit einer 3 mm breiten Aluminium-Einfassung versehen (s. Abb. 3-3). Standardmäßig wurde ein Gewebe mit lichter Maschenweite 1 mm und Drahtdurchmesser 0.224 mm verwendet. Die Rondendicke betrug 1.25 mm. Die effektive Filterfläche ergibt sich zu  $4.53 \text{ cm}^2$ . Die gemessene Magnetisierungskurve des Materials ist in Abb. 3-4 gezeigt.



Abb. 3-3: (links) Separator mit Matricelementen., hier nur zum Teil gefüllt; 1. Zulaufstutzen, 2. Innenraum mit Filterelementen, 3. Ablaufstutzen. (rechts) Filterrunde

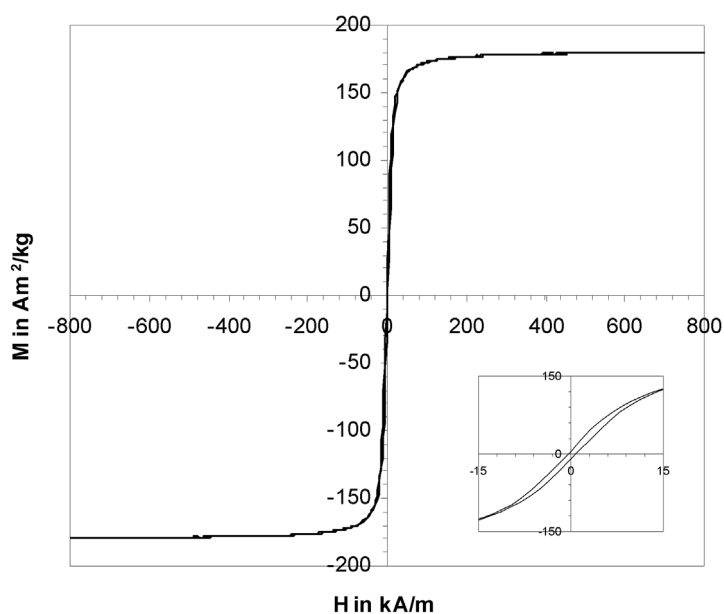


Abb. 3-4: Magnetisierungskurve des Matrixmaterials vom Typ X8Cr17 entsprechend DIN 1.4016.

(Die gemessene Probe war ein 5 mm langer Draht vom Durchmesser 0.224 mm, Masse 1.898 mg, Draht parallel zur Feldrichtung)

$$M_s = 179 \text{ Am}^2/\text{kg}, M_r/M_s \approx 3\%$$

### 3.3 HGMS - Typ HGF-10

Zum Zeitpunkt der Arbeit verfügte das Institut für Technische Chemie des Forschungszentrums Karlsruhe bereits über mehrjährige Erfahrungen in der Entwicklung und Anwendung kontinuierlich arbeitender so genannter Karussell-HGMS unter Verwendung von Permanentmagneten (Franzreb 1998, 2000). Um die hierfür notwendige gleichzeitige Filtration und Filtrerrückspülung an unterschiedlichen Stellen zu ermöglichen, muss dabei die rotierende Filtermatrix an zahlreichen Stellen abgedichtet werden. In Anbetracht der für biotechnologische Herstellungsprozesse geltenden strengen GMP-Anforderungen (good manufacturing practice) der FDA (US food and drug administration) und der EU (US-CFR-21, 2001 und ICH-Guideline 2000) erschien das Design eines Karussell-HGMS mit großflächigen Dichtungen und Toträumen jedoch ungeeignet. Deshalb wurde in der Arbeitsgruppe ‚Magnetseparation‘ ein neuer Typ eines Hochgradientenmagnetseparators entwickelt, der einen ‚schaltbaren‘ Permanentmagneten als Feldquelle benutzt (Franzreb 2001a, 2001b, Hoffmann 2002). Der Separator arbeitet diskontinuierlich und ist insbesondere für geringe und mittlere Feststoffkonzentrationen geeignet. Abb. 3-5 zeigt eine schematische Darstellung der Separators im Querschnitt. Der Hauptteil ähnelt einem konventionellen Permanentmagneten mit Eisenjoch. Zwischen die Polschuhe wird ein rechteckiges Filtergehäuse eingebracht, in das wiederum die eigentliche Filtermatrix eingesetzt wird. Diese besteht aus einem Stapel aus Drahtnetzgewebe.

Im Betrieb wird die Suspension durch den Filter geleitet, bis ein beginnender Filterdurchbruch auftritt. Der Zufluss wird daraufhin gestoppt, das Magnetsystem wird ‚ausgeschaltet‘ und die Filtermatrix wird durch einen kurzen Spülstoß gereinigt. Das Magnetsystem wird wieder ‚angeschaltet‘ und ein neuer Filtrationszyklus beginnt.

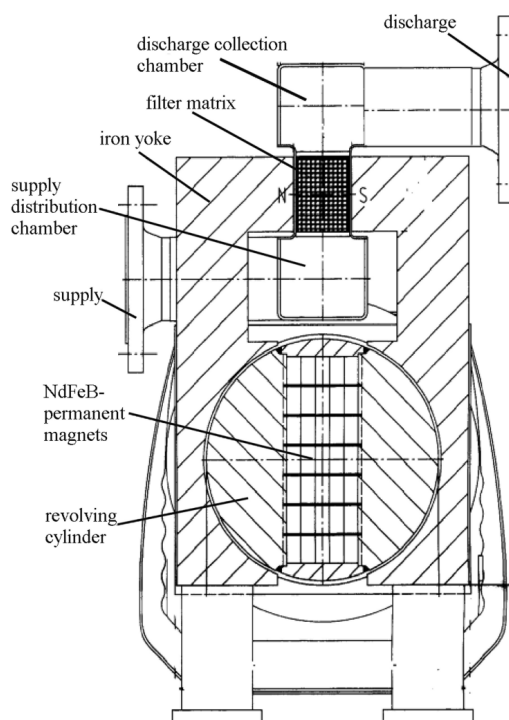


Abb. 3-5: Schematische Darstellung des schaltbaren Permanentmagnetsystems

Im Gegensatz zu dem von Watson (1997) beschriebenen Prinzip wird die ungewöhnliche Eigenschaft, einen Permanentmagneten ein- und auszuschalten dadurch erreicht, dass die eigentlichen Magneteinheiten im Zentrum eines Zylinders angeordnet sind, der um seine Achse gedreht werden kann. Die Fotos in Abb. 3-6 und Abb. 3-7 zeigen die beiden, von der Firma Steinert Elektromagnetbau GmbH, Köln, gefertigten, Separatortypen HGF-10 und HGF-50 zusammen mit Antrieb und Getriebe.

Der Separatortyp HGF-50 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet, die Konstruktion und erste Versuche mit diesem industriellen Typ zeigen jedoch, dass ein Upscaling des Grundprinzips eines schaltbaren Permanentmagneten als kostengünstige Magnetfeldquelle möglich ist.

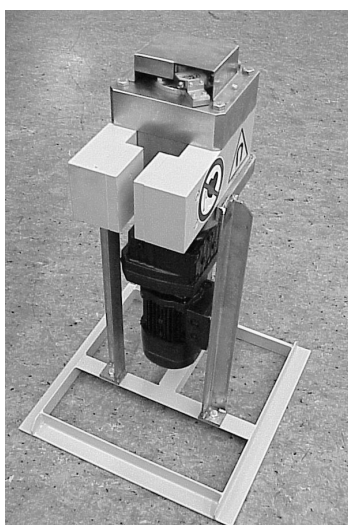


Abb. 3-6: HGMS auf Permanentmagnetbasis (Steinert HGF-10); Polabstand 25 mm; Polschuhfläche 120×80 mm; Gewicht 60 kg; Motorleistung 0.12 kW.

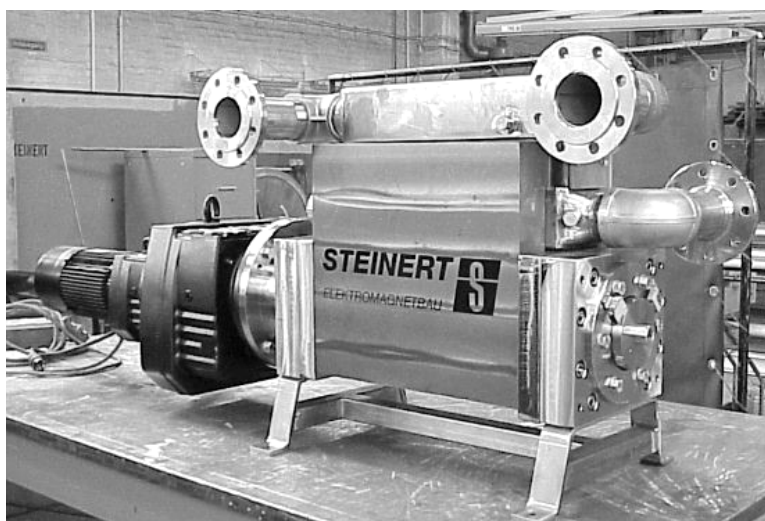


Abb. 3-7: Industrieller Typ (Steinert HGF 50) nach gleichem Funktionsprinzip; Polabstand 65 mm; Polschuhfläche 505×80 mm; Gewicht 1300 kg; Motorleistung 2.2 kW.

### 3.3.1 Berechnung der Magnetfeldverteilung

Berechnungen der Magnetfeldverteilung wurden für die beiden Separatortypen HGF-10 und HGF-50 mit dem Finiten Elemente Programm QuickField™ (Tera Analysis Ltd. Svendborg, Dänemark) durchgeführt. Der Effekt der Drehung der Magneten ist aus den Abb. 3-8 und Abb. 3-9 zu erkennen, in denen die räumliche Flussdichteverteilung für die ‚Feld an‘ und ‚Feld aus‘ Position dargestellt ist. In der ‚an‘ Position gleicht das System einem herkömmlichen Permanentmagneten mit einer Flussdichten von etwa 400 mT zwischen den Polschuhen. Wird dagegen der Zylinder um 90° verdreht, so werden die Nord- und Südpole der Magneten über den Zylinder und das Eisenjoch kurzgeschlossen. Nahezu alle Feldlinien verlaufen dadurch durch den hinteren Teil des Magnetjochs. Zusätzlich sind die schwachen verbleibenden Pole, die an der Stelle der Abscheidematrix

noch vorhanden sind, vom gleichen Vorzeichen, d.h. die Feldlinien werden aus diesem Bereich verdrängt. Aus Abb. 3-9 wird ersichtlich, dass das geringste Feld in der unmittelbaren Umgebung des Systems genau an der Stelle der Abscheidematrix auftritt.

Das über eine Hall-Sonde (Typ FH51, Fa. Magnetphysik-Steingroever, Deutschland) gemessene Feld im Zentrum des Luftspalts ist in Abb. 3-10 dargestellt. Das Verhältnis der gemessenen maximalen und minimalen Flussdichte im Abscheidebereich beträgt somit mehr als 1000. Beim Vergleich mit den berechneten Flussdichten fällt auf, dass sowohl die Flussdichte für die ‚an‘ als auch für die ‚aus‘ Position in den Berechnungen etwas überschätzt wird. Aufgrund der nur zweidimensionalen Feldberechnung gelten diese exakt nur für sehr tiefe Magnetjochs. Für kurze Jochs (hier 12 cm) liefern die 2D-Berechnungen dagegen etwas überschätzte Flussdichten. Für das längere Joch des Typs HGF-50 mit 50 cm Jochtiefe ist die Diskrepanz zwischen mittels 2D-FEM berechnetem und gemessenem Feld vernachlässigbar.

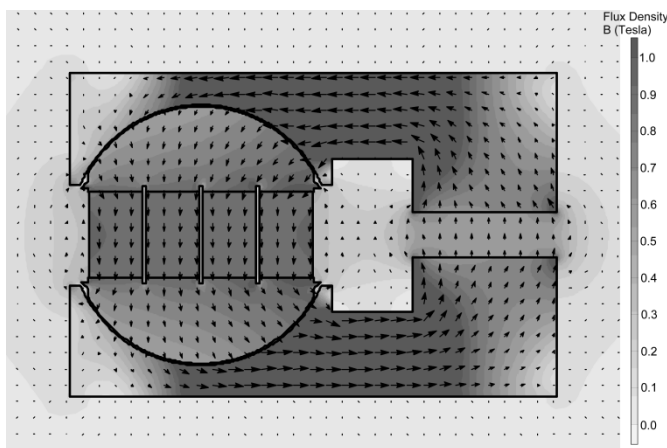


Abb. 3-8: Magnetfeldverteilung für die ‚Feld an‘-Position. Skalierung 0-1000 mT.

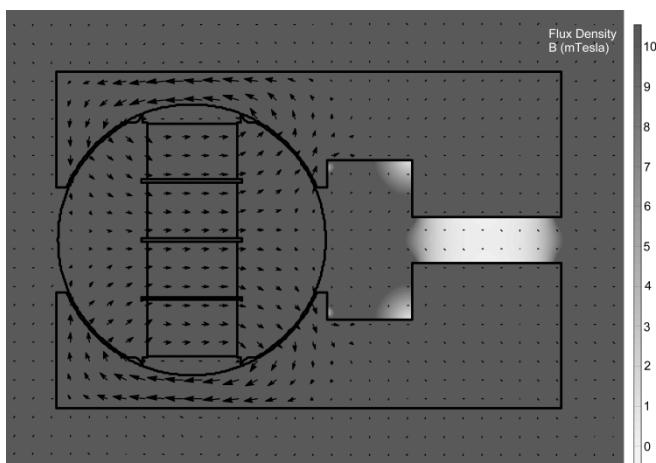


Abb. 3-9: Magnetfeldverteilung für die ‚Feld aus‘-Position. Skalierung 0-10 mT.





Abb. 3-10: Gemessene Flussdichte im Zentrum des Luftspalts in Abhängigkeit der Winkelstellung des Zylinders. Die maximale Flussdichte beträgt 322 mT und ist damit über 1200 mal so hoch wie die minimal gemessene Flussdichte. Die eingesetzte Grafik vergrößert den Bereich um 90°.

### 3.3.2 HGF-10 - Separationsmatrix

Im Gegensatz zum Labor-HGMS mit longitudinaler Filterkonfiguration (Feldlinien verlaufen parallel zur Strömung) wurde für den Permanentmagnet-basierten Separator HGF-10 eine andere Anordnung gewählt. Der Aufbau eines longitudinalen Systems in einem Permanentmagneten ist zwar prinzipiell möglich, führt aber aufgrund der notwendigen zweimaligen Fluidumlenkung innerhalb des Felds zu einer schlechten Ausnutzung des Feldvolumens. Um eine maximale Ausnutzung des Feldvolumens zu erzielen, wurde für die Matrix des HGF-10 eine ‚transversale‘ Anordnung gewählt. Realisiert wurde die Filtermatrix durch abwechselndes Schichten von ferromagnetischem Drahtgewebe (DIN1.4016 von Haver&Boecker, Deutschland) und Abstandsrahmen aus unmagnetischem Edelstahl. Die Drahtdicke betrug 0.224 mm, die Dicke der Abstandsrahmen entsprach der Maschenweite des Drahtgewebes vom 1 mm. Die Schichten wurden am Rand durch Laserschweißen zu einem kompakten und mechanisch stabilen Matrixpaket mit den Abmessungen 19×80×120 mm (Filtervolumen 182 mL, Filterfläche 15.2 cm<sup>2</sup>) zusammengeheftet (vgl. Abb. 3-11).

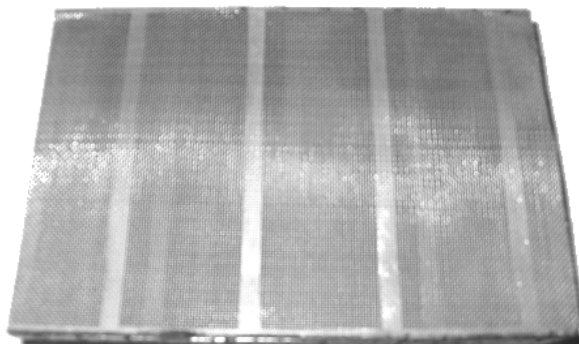


Abb. 3-11: Foto eines Matrixpakets (Aufsicht)

### 3.3.3 Filtergehäuse und Ultraschalleinheit

Das Filtergehäuse samt Gehäusedeckeln wurde aus V4A-Stahl (DIN 1.4571) gefertigt. Abb. 3-12 zeigt eine Zeichnung des Filtergehäuses mit genauen Abmessungen. Um eine verbesserte Rückgewinnung der Partikeln während der Rückspülphase zu erzielen, wurde seitlich an das Separatorgehäuse über ein Feingewinde ein Ultraschallwandler (vgl. Tabelle 3-3) angebracht. Das Filtergehäuse fungiert dadurch als Sonotrode des Schallwandlers und überträgt die Schalleistung ins Innere des Filtergehäuses.

Tabelle 3-3: Eigenschaften des Ultraschallprozessors

Hersteller	Dr. Hilscher, Teltow, Deutschland
Typ	Industrieprozessor UIP 250
Nennleistung	250 W
Frequenz	24 kHz
Max. Amplitude	1.4 – 2.5 µm (gemessen: Oberfläche Separatorgehäuse)

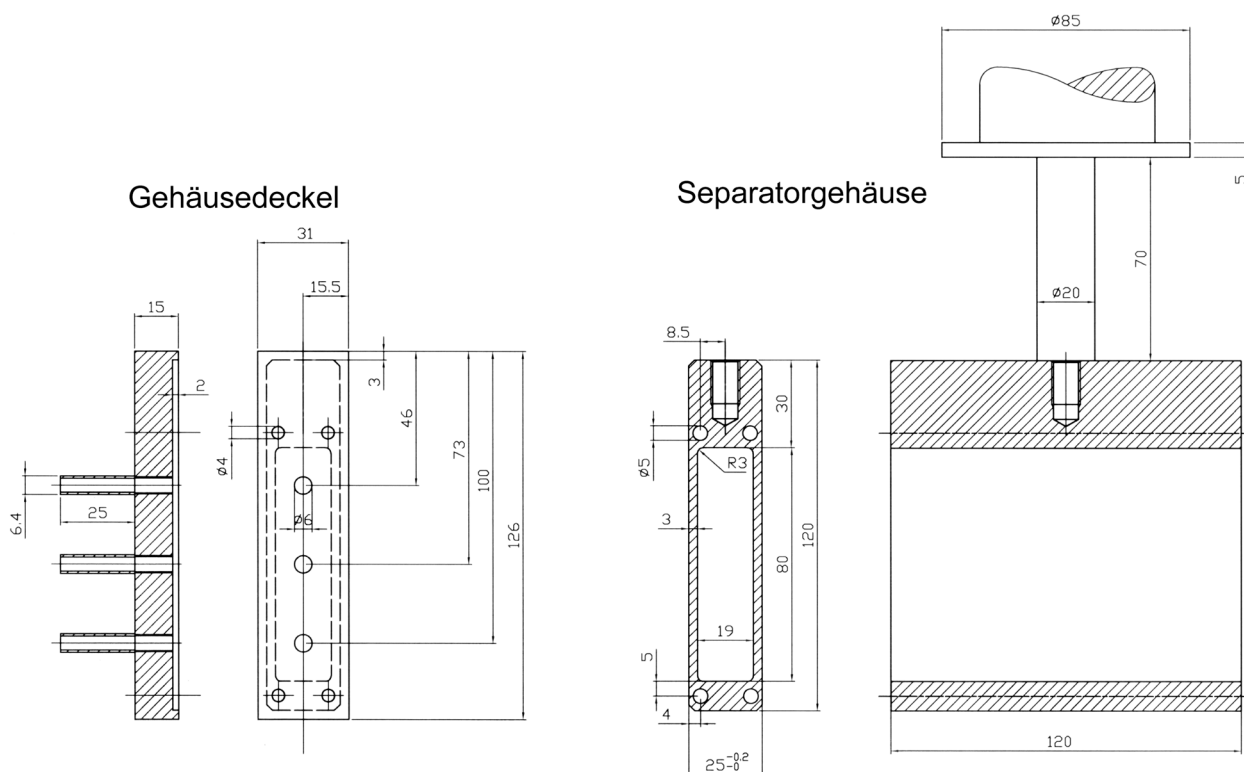


Abb. 3-12: Zeichnung des Filtergehäuses des HGF-10 mit angeschraubtem Ultraschallprozessor (nur angedeutet)



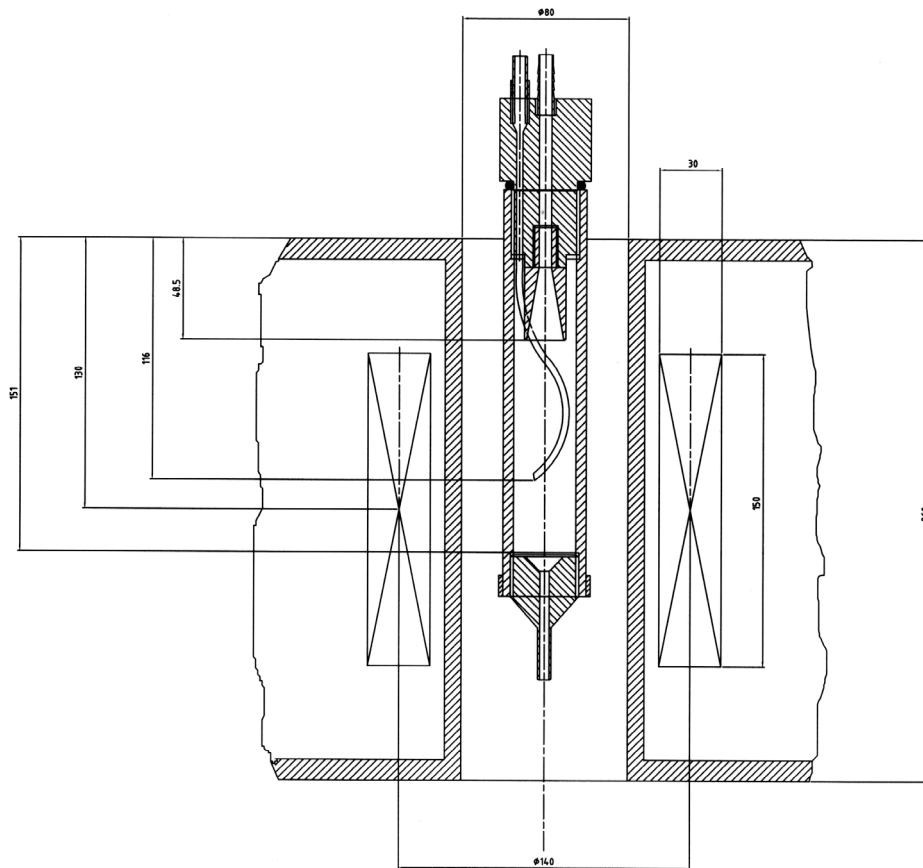


Abb. 3-14: OGMS-Separator  $\varnothing$  33mm und Standard-Einbauposition im Supraleiter.

### 3.4.2 OGMS-Separator mit Schlammräumer-Konstruktion

Um die starken Schwankungen der Konzentration unter der Verwendung des OGMS-Laborseparators zu beheben, wurden Versuche mit einem OGMS-Separator durchgeführt, der eine Schlammräumer-Konstruktion gemäß Abb. 3-15 besitzt. Durch das rotierende Räumerschild am unteren Ende des Separators sollen am Boden anhaftende Partikeln in den Konzentratanzug befördert werden (Franzreb 1998b).

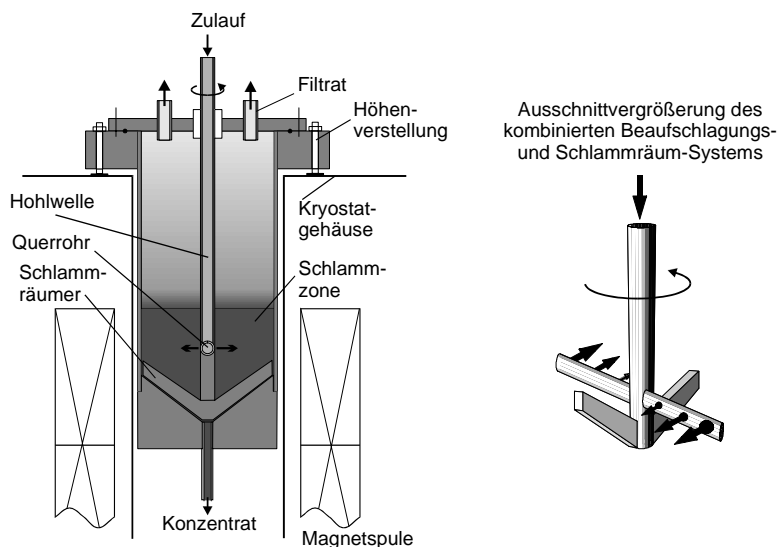


Abb. 3-15: OGMS mit Hohlwelle und Schlammräumerkonstruktion.

Innendurchmesser: 74 mm;  
 Vertikaler Abstand von Spulenoberkante bis Schlammabzug: 75 mm;  
 Maximalhöhe innen: 162 mm;  
 Konusöffnungswinkel: 108°.

### 3.5 Repulsive Mode Magnetseparator (RMMS)

Im Rahmen der Arbeit wurde ein neuartiger kontinuierlicher Magnetseparator nach dem Prinzip der RMMS entwickelt und konstruktiv in einem Laborseparator umgesetzt (Franzreb 1999).

#### 3.5.1 Konstruktion des RMMS-Laborseparators

Abb. 3-16 zeigt ein Foto des entwickelten RMMS-Laborseparators mit zwei Drähten von je 5 mm Durchmesser und einem dazwischen liegenden Strömungskanal mit ebenfalls 5 mm Innendurchmesser. In Abb. 3-17 ist der Aufbau im Längs- und Querschnitt dargestellt.

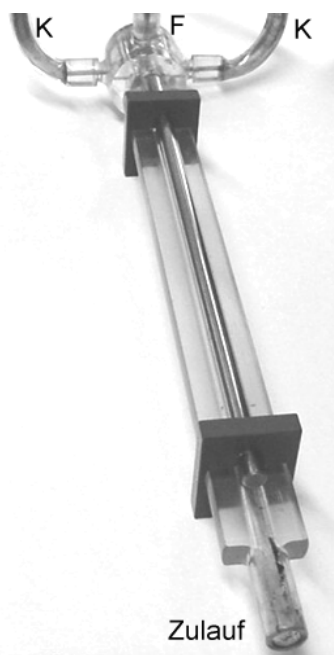


Abb. 3-16: Fotografie des Labor-, 'Repulsive Mode' Magnetseparators. Im Bild ist ein ferromagnetischer Draht mit Durchmesser 5 mm zu erkennen. Unterhalb des Strömungskanals befindet sich symmetrisch angeordnet ein zweiter Draht. Die zulaufende Suspension wird beim Durchlaufen des Separators in ein Filtratfraktion (F) und zwei Konzentratfraktionen (K) aufgetrennt.

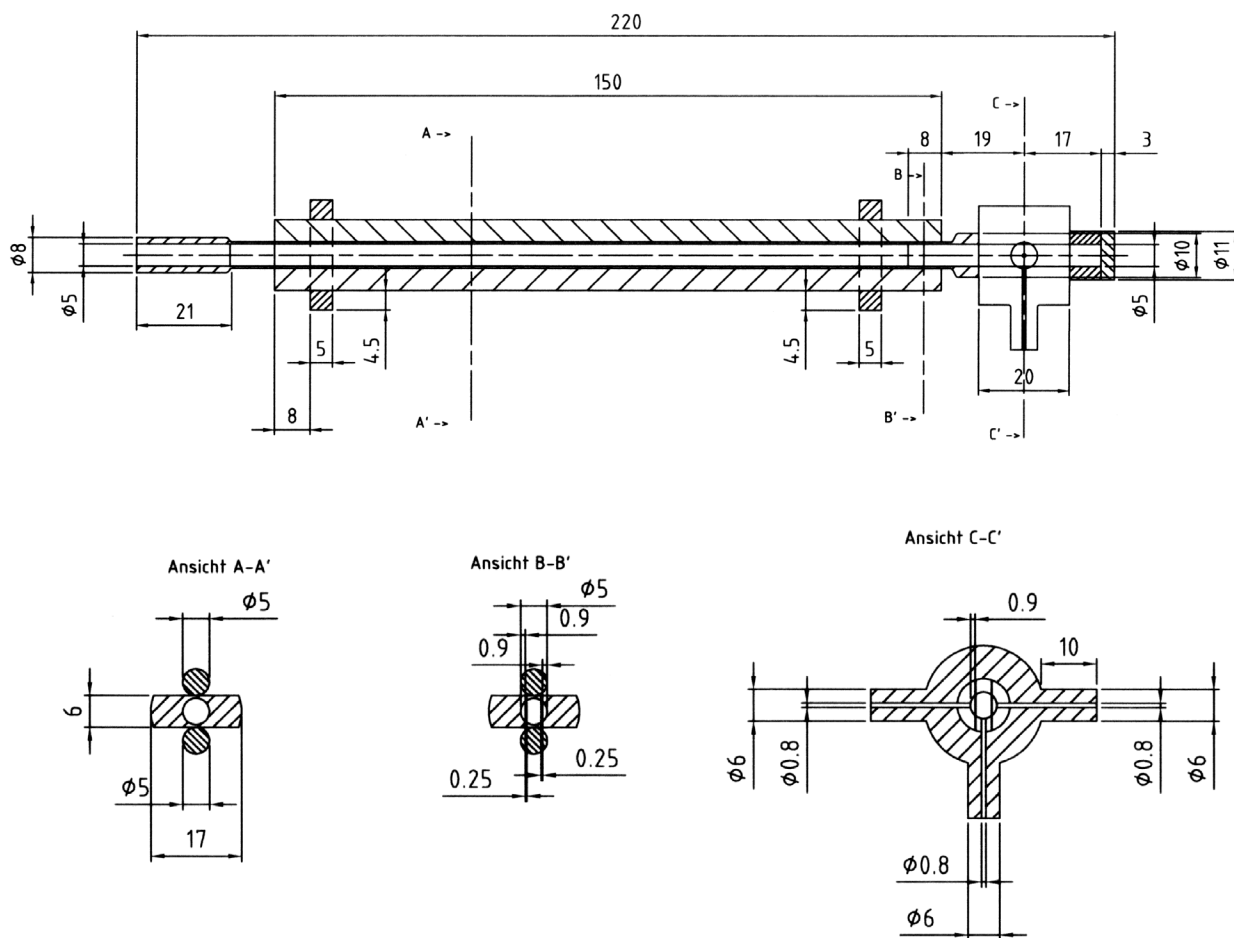


Abb. 3-17: Aufbau des Repulsive Mode Magnetseparators mit einem Strömungrohr und zwei magnetisierbaren Drähten.

### 3.5.2 Auslegung der RMMS-Trennwandposition

Um eine möglichst hohe Aufkonzentrierung der dem RMMS zulaufenden Suspension zu erreichen, sollte der Konzentratvolumenstromanteil am Gesamtvolumenstrom möglichst klein sein. Wird der Konzentratvolumenstrom allerdings zu gering gewählt, besteht die Gefahr der Verstopfung des Konzentratablaufs. Nimmt man beispielsweise einen Konzentratanteil am Gesamtvolumenstrom von 20% an, so lässt sich unter Annahme eines laminaren Strömungsprofils innerhalb des Separators die Position der Trennwände berechnen. Abb. 3-18 zeigt schematisch den Querschnitt des Strömungskanals im Bereich der Trennwände.

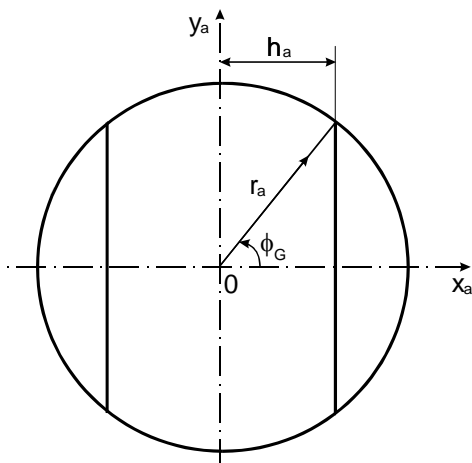


Abb. 3-18: Querschnittsgeometrie des RMMS im Bereich der Trennzonen (Schnitt B-B' in Abb. 3-17)

In kartesischen normierten Koordinaten gilt für die Strömungsgeschwindigkeit  $v$  bezogen auf die mittlere Strömungsgeschwindigkeit

$$\frac{v(x_a, y_a)}{\bar{v}} = \begin{cases} 2 \cdot (1 - x_a^2 - y_a^2) & \text{für } (x_a^2 + y_a^2 < 1) \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

Der Volumenstrom durch das Filtrat abführende Mittelsegment (MS) des Separators ergibt sich hieraus zu

$$\dot{V}_{MS} = \int_0^1 \int_0^{h_a} v(x_a, y_a) dx_a dy_a \quad \text{Gleichung 3-3}$$

Der Anteil am Gesamtvolumenstrom hängt demnach von der Position der Trennwand ab gemäß

$$v_F = \frac{\dot{V}_{MS}}{\dot{V}} = \frac{2\bar{v} \int_0^1 \int_0^{h_a} \frac{v(x_a, y_a)}{\bar{v}} dx_a dy_a}{\bar{v} \cdot \frac{\pi}{4}} = \frac{8}{\pi} \int_0^1 \int_0^{h_a} \frac{v(x_a, y_a)}{\bar{v}} dx_a dy_a \quad \text{Gleichung 3-4}$$

Um 20% des Gesamtvolumenstroms als Konzentrat abzuziehen ( $v_F = 0.8$ ), ergibt sich somit ein Abstand der Trennwand vom Rohrmittelpunkt von  $h_a = 0.54$ . Die Position einer 0.25 mm starken Trennwand bei 5 mm Rohrdurchmesser liegt dann bei  $h_a = 0.59$ . Die zugehörige Winkelposition bei der die Trennwand bei  $r_a = 1$  in die Separatorwand einmündet, wird im Folgenden als Grenzwinkel  $\phi_G$  bezeichnet. Dieser ergibt sich zu

$$\phi_G = \arccos(h_a) = 54^\circ \quad \text{Gleichung 3-5}$$

### 3.5.3 Auslegung der RMMS-Separatorlänge

Die Länge der Einlaufstrecke  $L_{\text{ein}}$  gibt eine minimale Separatorlänge vor, um eine ausgebildete laminare Strömung realisieren zu können. Für die laminare Strömung gilt (Zierep 1993):

$$L_{\text{ein}} \approx 0.03 \cdot \text{Re}_D \quad \text{mit} \quad \text{Re}_D = \frac{\bar{v} \cdot D}{\nu} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

Bei einem Rohrdurchmesser von 5 mm findet für Wasser als Medium der Umschlag zur turbulenten Rohrströmung erst bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 1660 m/h (542 mL/min) statt. Da derart hohe Strömungsgeschwindigkeiten zu keiner sinnvollen Separationsleistung mehr führen, kann durchweg ein laminares Rohrströmungsprofil angenommen werden.

Für eine Strömungsgeschwindigkeit von 100 m/h (entspricht 33 mL/min) ergibt sich eine Einlaufstrecke von 21 mm. Die Länge der Drähte wurde zu 150 mm, entsprechende 60 Drahradien gewählt, so dass der Anteil Einlaufstrecke mit 14 % vergleichsweise gering bleibt. Bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten erhöht sich der Anteil der Einlaufstrecke an der Separationslänge allerdings bis dieser bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 720 m/h (235 mL/min) eins wird. Der Druckverlust für die ausgebildete Strömung innerhalb des Separationsrohrs ergibt sich bei dieser Geschwindigkeit zu:

$$\Delta p = \frac{\rho}{2} \bar{v}^2 \frac{L_{\text{fil}}}{D} \frac{64}{\text{Re}_D} \approx 38 \text{ Pa} \quad \text{Gleichung 3-7}$$

bzw. zu

$$\Delta p = 3 \frac{\rho}{2} \bar{v}^2 \approx 60 \text{ Pa} \quad \text{Gleichung 3-8}$$

für die nicht ausgebildete Strömung (unter Berücksichtigung des Einlaufdruckverlustes) und kann somit vernachlässigt werden.



## 4 Theoretischer Teil

Mit theoretischen Ansätzen zur Beschreibung der Vorgänge in einem Magnetseparator wird letztlich das Ziel verfolgt, die Separationseffizienz vorauszuberechnen, zumindest aber den Einfluss der Variation einer Einflussgröße quantifizieren zu können. Im folgenden Kapitel werden bekannte und neuartige mathematische Ansätze zur Berechnung der Abscheideeffizienz der untersuchten magnetischen Separationsverfahren HGMS, OGMS und RMMS vorgestellt und diskutiert.

### 4.1 Durchbruchskurven für zyklisch arbeitende Magnetseparatoren (HGMS)

Unter dem Einfangradius  $R_c$  eines Einzeldrahts versteht man nach Watson (1973) den Abstand zwischen der Staustromlinie und der Grenzpartikelbahn, die *gerade noch* auf der Drahtoberfläche endet (vgl. Abb. 4-1). Der Abstand wird dabei in einem weit vom Draht entfernten Bereich definiert, in dem sämtliche Partikelbahnen noch parallel verlaufen. Alle Partikelbahnen mit einem geringeren Abstand von der Staustromlinie als  $R_c$  enden auf der Drahtoberfläche, die anderen passieren den Draht. Der Einfangradius  $R_c$  ist damit eine wichtige Größe, mit der bei gegebener Zulauf suspension und Filtergeschwindigkeit  $v_0$  Aussagen über den Abscheidegrad eines noch unbeladenen HGMS gemacht werden können.

#### 4.1.1 Bestimmung des Einfangradius eines Einzeldrahts

Neben einer gewissen Abhängigkeit von dem Abstand  $x_{ai}$  vom Drahtmittelpunkt, für den  $R_c$  bestimmt wird (vgl. Abb. 4-1), ist der Einfangradius insbesondere vom Verhältnis zwischen der so genannten magnetischen Geschwindigkeit  $v_m$  und der Filtergeschwindigkeit  $v_0$  abhängig. Die magnetische Geschwindigkeit  $v_m$  ergibt sich aus einer näherungsweise Berechnung der maximalen Magnetkraft in unmittelbarer Drahtnähe und der unter Annahme der Gültigkeit des Stokes'schen Gesetzes (Stokes 1851) daraus resultierenden Relativgeschwindigkeit zwischen Partikel und Fluid (Herleitung siehe Anhang der Arbeit):

$$v_m = \frac{2}{9} \cdot \mu_0 \cdot \Delta\kappa \cdot M_{s,d} \cdot H_0 \cdot \frac{b^2}{a \cdot \eta} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

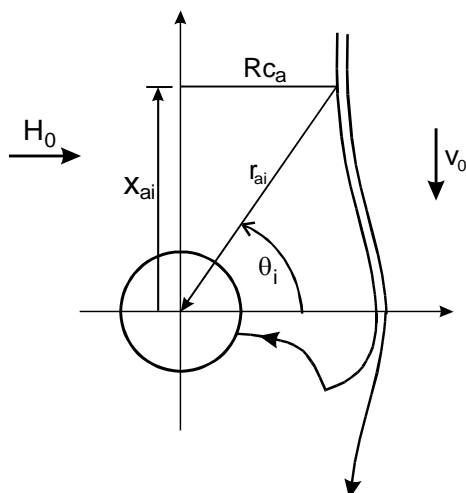


Abb. 4-1: Definition des Einfangradius  $R_{c_a}$  für den Fall einer transversalen Anordnung.

Unter Verwendung von auf den Drahtradius  $a$  normierten Größen (Index ‚a‘) ergibt sich für die schleichende Zylinderumströmung nach Franz (1997) folgende implizite Näherungslösung für den Einfangradius:

$$2 \cdot R_{c_a} \cdot \ln\left(\sqrt{x_{ai}^2 + R_{c_a}^2}\right) - R_{c_a} + \frac{R_{c_a}}{x_{ai}^2 + R_{c_a}^2} - \Re \cdot \left| \frac{v_m}{v_0} \right| \cdot \frac{2 \cdot x_{ai} \cdot R_{c_a}}{(x_{ai}^2 + R_{c_a}^2)^2} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

$$= \left( 3 \cdot r_{as} \cdot \ln r_{as} - \frac{1}{2} \cdot r_{as} + \frac{1}{2 \cdot r_{as}} \right) \cdot \sin \theta_s$$

mit:

$$2 \cdot r_{as}^6 \cdot (\ln r_{as})^2 + r_{as}^6 \cdot \ln r_{as} - r_{as}^4 \cdot \ln r_{as} - 2 \cdot \Re^2 \left( \frac{v_m}{v_0} \right)^2 = 0 \quad \text{Gleichung 4-3}$$

$$\cos \Theta_s = - \left| \frac{v_0}{v_m} \right| \frac{1}{4 \cdot \Re} \cdot r_{as}^3 \left[ 2 \cdot \ln r_{as} + 1 - \frac{1}{r_{as}^2} \right] \quad \text{Gleichung 4-4}$$

$$\Re = 2 - \ln Re_d \quad \text{Gleichung 4-5}$$

$$x_{ai}^2 + R_{c_a}^2 = r_{ai}^2 \quad \text{Gleichung 4-6}$$

#### 4.1.2 Berechnung von Filterdurchbruchskurven

Die Modellvorstellung zur Berechnung von Filterdurchbruchskurven (DBK) basiert auf einer Verknüpfung globaler Massenbilanzen mit einer Theorie zur Berechnung der Partikelbahnen in der Nähe eines ferromagnetischen Drahtes. Unter Vernachlässigung der Dispersion ergibt sich die folgende Partikelmassenbilanz für ein differentielles Filterelement:

$$\frac{\partial \sigma}{\partial \tau} + v_0 \frac{\partial c}{\partial z} = 0 \quad \text{Gleichung 4-7}$$

mit

$$\tau = \frac{\sigma_s}{c_0 v_0 \lambda_0} \quad \text{Gleichung 4-8}$$

Als kinetischer Ansatz wird ein aus der Modellierung von Tiefenfiltern bekannter Zusammenhang verwendet, wonach die Beladungszunahme direkt proportional der pro Zeiteinheit in ein Filterelement eintretenden Partikelmenge ist (Iwasaki 1937):

$$\frac{\partial \sigma}{\partial \tau} = \lambda \cdot v_0 \cdot c \quad \text{Gleichung 4-9}$$

Die Proportionalitätskonstante  $\lambda$  ist ein Maß für die Filterwirksamkeit und wird als Filterkoeffizient bezeichnet. Der Filterkoeffizient ist dabei jedoch keine Konstante, sondern er ist zumindest von der Matrixbeladung und damit von der betrachteten Filterposition und der Zeit abhängig. Unter der Annahme, dass der Filterkoeffizient unabhängig von der Partikelkonzentration ist, ergeben sich nach einer Einlaufphase Konzentrations- und Beladungsprofile mit konstantem Muster. Im einfachsten Fall lässt sich eine lineare Abhängigkeit formulieren:

$$\lambda = \lambda_0 \left( 1 - \frac{\sigma}{\sigma_s} \right) \quad \text{Gleichung 4-10}$$

Die dimensionslose Konzentration am Filterende lässt sich in diesem Fall wie folgt beschreiben:

$$\frac{c}{c_0} = \frac{\exp \{ \sigma_s^{-1} c_0 v_0 \lambda_0 \tau \}}{\exp \{ \sigma_s^{-1} c_0 v_0 \lambda_0 \tau \} + \exp \{ \lambda_0 L \} - 1} \quad \text{Gleichung 4-11}$$

Für die relative Durchbruchkonzentration zu Beginn der Filtration erhält man hieraus:

$$\left. \frac{c}{c_0} \right|_{t=0} = \exp \{ -\lambda_0 L \} \quad \text{Gleichung 4-12}$$

Um diese Gleichungen jedoch zu einer Vorhersage des Filterverhaltens zu nutzen, muss zusätzlich ein Zusammenhang zwischen dem Filterkoeffizienten und den magnetischen Eigenschaften des Filters und der Partikeln gefunden werden. Auch für diesen Zusammenhang existieren zahlreiche Modellvorstellungen und empirische Ansätze. Für eine geordnete Matrix ergibt sich beispielsweise nach Watson (Watson 1973) und Svoboda (Svoboda 1987) sowohl für longitudinale als auch für die transversale Anordnung:

$$\lambda_0 = \frac{2}{\pi} \cdot (1 - \varepsilon_F) \cdot \frac{Rc_a}{a} \quad \text{Gleichung 4-13}$$

In Abb. 4-2 sind exemplarisch die relativen Filtratkonzentrationen zu Beginn der Filtration, d.h. für einen vollkommen unbeladenen HGMS als Funktion der Filtergeschwindigkeit für verschiedene Partikelgrößen im Mikrometerbereich dargestellt. Möchte man einen

Anfangsabscheidegrad von mindestens 99.9% erreichen, so sollte für ein  $1\ \mu\text{m}$  großes Partikel unter den gegebenen Bedingungen eine Filtergeschwindigkeit von etwa  $25\ \text{m/h}$  nicht überschritten werden. Für größere Partikeln lassen sich entsprechend höhere Filtergeschwindigkeiten realisieren.

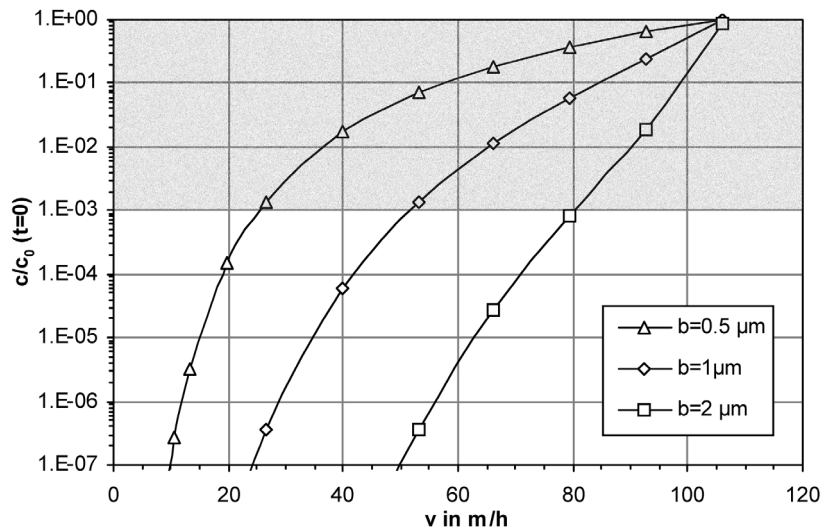


Abb. 4-2: Berechnete Anfangsdurchbruchskonzentration in Abhängigkeit der Filtergeschwindigkeit  $v$  und des Partikelradius  $b$  mit folgenden Daten:  
 $B_0 = 0.4\ \text{T}$ ,  $a = 125\ \mu\text{m}$ ,  
 $M_p = 34\ \text{Am}^2/\text{kg}$ ,  
 $J_{s,d} = 1.7\ \text{T}$ ,  $L = 40\text{mm}$ ,  
 $\varepsilon_F = 0.96$ ,  $\eta = 1\text{mPas}$

Abb. 4-3 zeigt Berechnungen der kompletten Durchbruchkurven für die selben Bedingungen bei einer Filtergeschwindigkeit von  $24\ \text{m/h}$ . Zu erkennen ist der starke Einfluss der Partikelgröße auf das Separationsverhalten. Partikeln unterhalb  $1\ \mu\text{m}$  Durchmesser lassen sich unter den gegebenen Bedingungen nicht mehr effektiv separieren.

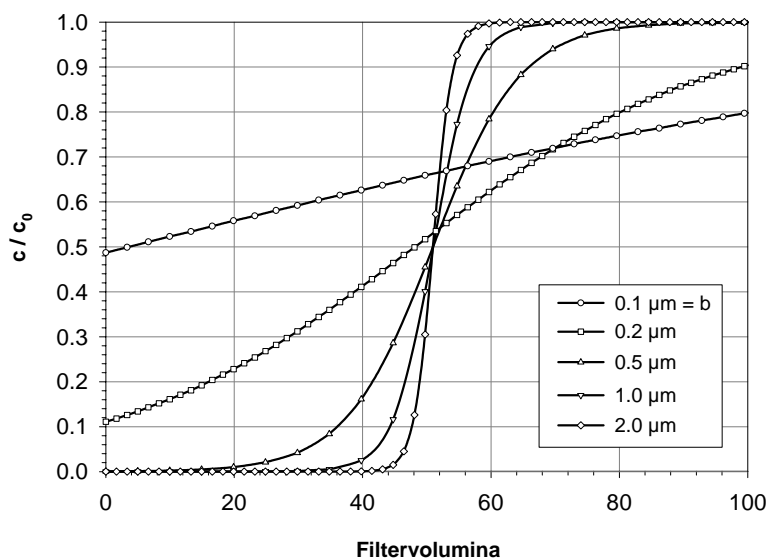


Abb. 4-3: Berechnete DBK in Abhängigkeit des Partikelradius  $b$  für  $v = 24\ \text{m/h}$ ,  
 $B_0 = 0.4\ \text{T}$ ,  $a = 125\ \mu\text{m}$ ,  
 $M_p = 34\ \text{Am}^2/\text{kg}$ ,  
 $J_{s,d} = 1.7\ \text{T}$ ,  $L = 40\text{mm}$ ,  
 $\varepsilon_F = 0.96$ ,  $c_p = 2\ \text{kg/m}^3$ ,  
 $\sigma_s = 100\ \text{kg/m}^3$ ,  $\eta = 1\text{mPas}$

## 4.2 Kennzahl zur Charakterisierung der OGMS

Anhand theoretischer Überlegungen lässt sich zeigen, dass die Strömungsgeschwindigkeit und die magnetische Flussdichte in einem OGMS nicht als unabhängige Einflussgrößen bezüglich des Abscheidegrads betrachtet werden müssen. Wie im Folgenden gezeigt wird,

lassen sich die beiden Einflüsse durch *eine* (neu zu definierende) dimensionslose Kennzahl beschreiben.

Für die auf eine Partikel wirkende Magnetkraft gilt:

$$\mathbf{F}_m = \frac{V_p \chi_p}{\mu_0} \cdot \mathbf{B} \cdot \nabla \mathbf{B} \quad \text{Gleichung 4-14}$$

Die Suszeptibilität  $\chi_p$  ist im Falle ferrimagnetischer Partikeln nicht konstant, sondern hängt selbst von der Feldstärke ab. Näherungsweise gilt:

$$M_p = \chi_p H_0 = \begin{cases} D_m \cdot H_0 & \text{für } H_0 < D_m \cdot M_{s,p} \\ M_{s,p} & \text{für } H_0 \geq D_m \cdot M_{s,p} \end{cases} \quad \text{Gleichung 4-15}$$

mit dem Demagnetisierungsfaktor  $D_m = 1/3$  für kugelförmige Partikeln.

Legt man für die Sättigungsmagnetisierung der Partikeln den Literaturwert von Magnetit von 475 kA/m (95 Am<sup>2</sup>/kg) zu Grunde, so befinden sich die Partikeln ab einer Feldstärke von 158 kA/m bzw. ab einer Flussdichte von 0.2 T in der magnetischen Sättigung. Für höhere Feldstärken als  $D_m \cdot M_{s,p}$  hängt die abscheidende Kraft also nur noch vom Flussdichtegradienten  $\nabla B$  ab. Gemäß Gleichung 3-1 nimmt der Flussdichtegradient der Spule ebenso wie die Flussdichte selbst an jedem festen Ort linear mit dem Spulenstrom zu.

Für ferrimagnetische Partikeln überwiegt der Einfluss der Magnetkraft gegenüber der Gewichtskraft um ein Vielfaches, so dass im stationären Fall nur die hydrodynamische Widerstandskraft als der Magnetkraft entgegenwirkende Kraft berücksichtigt werden muss. Es gilt:

$$F_W = \frac{\rho_f}{2} v_{rel}^2 \cdot \pi b^2 \cdot c_w (Re) \quad \text{Gleichung 4-16}$$

bzw. für laminare Strömung mit Reynoldszahlen unterhalb eins gilt mit  $c_w = 24 Re^{-1}$ :

$$F_W = 6\pi\eta b v_{rel} \quad \text{Gleichung 4-17}$$

Für Flussdichten oberhalb 0.2 T ist also eine lineare Zunahme der Magnetkraft mit der Flussdichte gegeben. Die Widerstandskraft auf die Partikeln steigt hingegen bei laminarer Strömung linear mit der Relativgeschwindigkeit zwischen Fluid und Partikel.

Um eine allgemeine Beschreibung der Abscheideeffizienz im Falle der OGMS nach dem Prinzip der Magnetischen Barriere zu erzielen, wird eine dimensionslose Kennzahl **M** eingeführt, die aus dem Verhältnis aus maximaler Magnetkraft und hydrodynamischer Widerstandskraft gebildet wird. Somit ergibt sich:

$$\mathbf{M} = \frac{2b^2 M_{s,p} (\nabla B)_{max}}{9\eta v_0} \quad \text{Gleichung 4-18}$$

Die Kennzahl wird in Kapitel 6.2 zur einheitlichen Darstellung der Ergebnisse der OGMS verwendet.

### 4.3 Massenbilanzen für kontinuierliche Magnetseparatoren (OGMS, RMMS)

#### 4.3.1 Bilanz für eine kontinuierliche Separationsstufe

Zur Charakterisierung der Leistung einer Separationsstufe werden der Konzentrierungsfaktor  $C_K$  und die relative Filtratkonzentration  $C_F$  definiert gemäß:

$$C_K = \frac{c_K}{c_0}, \quad C_F = \frac{c_F}{c_0} \quad \text{Gleichung 4-19}$$

wobei  $c_0$  die Zulaufkonzentration darstellt. Mit dem einstellbaren Konzentratvolumenanteil

$$v_K = \frac{\dot{V}_K}{\dot{V}} \quad \text{Gleichung 4-20}$$

und der Verweilzeit  $\tau$  im Separator

$$\tau = \frac{V}{\dot{V}} \quad \text{Gleichung 4-21}$$

ergibt sich damit für die Massenbilanz:

$$v_K C_K + (1 - v_K) C_F = 1 - \left[ \frac{\tau}{c_0} \frac{dc}{dt} \right] \quad \text{Gleichung 4-22}$$

Im stationären Zustand ist  $C_K$  über  $v_K$  mit der relativen Filtratkonzentration  $C_F$  gekoppelt. Es gilt:

$$C_F = \frac{1 - v_K C_K}{1 - v_K} \quad \text{Gleichung 4-23}$$

#### 4.3.2 Bilanz für zwei kontinuierliche Separationsstufen

Um das Konzentrat einer Separationsstufe weiter aufzukonzentrieren, bzw. das Filtrat weiter von Partikeln zu befreien, können mehrere Separationsstufen in Serie geschaltet werden. Im Folgenden wird ein System aus drei kontinuierlichen Separatoren im stationären Zustand, die gemäß Abb. 4-4 verschaltet sind, betrachtet. Der Konzentrierungsfaktor  $C_K$  und der Konzentratanteil  $v_K$  seien für alle drei Separatoren gleich.

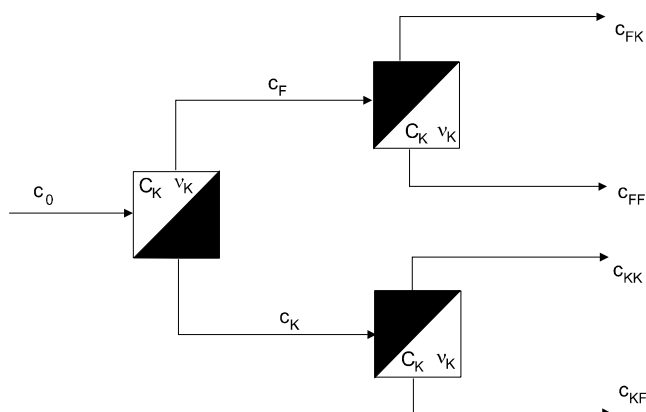


Abb. 4-4: Zweistufige Anordnung mit Filtrat- und Konzentratsnachbehandlung

Die Volumenströme des zweifachen Konzentrats  $\dot{V}_{KK}$  bzw. Filtrats  $\dot{V}_{FF}$  ergeben sich zu:

$$\dot{V}_{KK} = v_K^2 \dot{V}_0 \tag{Gleichung 4-24}$$

$$\dot{V}_{FF} = (1 - v_K)^2 \dot{V}_0 \tag{Gleichung 4-25}$$

Für die relativen Ablaufkonzentrationen des zweifachen Konzentrats  $C_{KK}$  bzw. Filtrats  $C_{FF}$  erhält man:

$$C_{KK} = C_K^2 \text{ bzw.} \tag{Gleichung 4-26}$$

$$C_{FF} = \left( \frac{1 - v_K C_K}{1 - v_K} \right)^2 \tag{Gleichung 4-27}$$

### 4.3.3 Bilanz für zwei kontinuierliche Separationsstufen mit Rückführung

Da auch bei zwei Separationsstufen in der Regel nur je ein Filtrat- und Konzentratstrom gewonnen werden soll, ist es sinnvoll die beiden Ströme FK und KF zurückzuführen. Dies kann z.B. so geschehen, wie in Abb. 4-5 dargestellt.

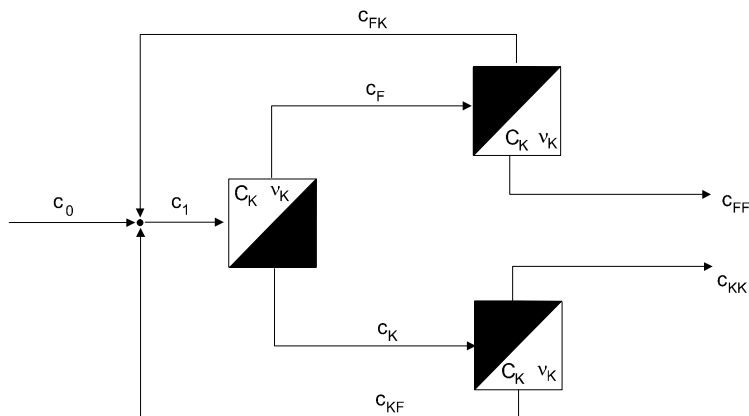


Abb. 4-5: Zweistufige Anordnung mit Filtrat- und Konzentratsnachbehandlung und Rückführung

Aus der Volumenstrombilanz um den Knotenpunkt:

$$\dot{V}_1 = \dot{V}_0 + (1 - v_K)v_K \cdot \dot{V}_1 + v_K(1 - v_K) \cdot \dot{V}_1 \quad \text{Gleichung 4-28}$$

ergibt sich

$$\frac{\dot{V}_0}{\dot{V}_1} = 1 - 2(1 - v_K)v_K \quad \text{Gleichung 4-29}$$

und für die Volumenströme nach der zweiten Stufe gilt analog zum Fall ohne Rückführung

$$\dot{V}_{KK} = v_K^2 \dot{V}_1 \quad \text{Gleichung 4-30}$$

$$\dot{V}_{FF} = (1 - v_K)^2 \dot{V}_1 \quad \text{Gleichung 4-31}$$

Für die Konzentration am Knotenpunkt gilt damit

$$C_1 = \frac{(\dot{V}_0 / \dot{V}_1)}{1 - 2v_K(1 - v_K C_K)C_K} \quad \text{Gleichung 4-32}$$

Für die relativen Ablaufkonzentrationen des zweifachen Konzentrats  $C_{KK}$  bzw. Filtrats  $C_{FF}$  erhält man damit:

$$C_{KK} = C_1 \cdot C_K^2 \quad \text{bzw.} \quad \text{Gleichung 4-33}$$

$$C_{FF} = C_1 \cdot \left( \frac{1 - v_K C_K}{1 - v_K} \right)^2 \quad \text{Gleichung 4-34}$$

In Abb. 4-6 sind die berechneten relativen Ablaufkonzentrationen für eine und zwei Stufen, mit und ohne Rückführung für  $v_K = 20\%$  dargestellt. Die Konzentratkonzentration mit Rückführung erreicht für diesen Fall höhere Werte solange  $C_K$  unterhalb 4 liegt. Aus der Bedingung  $C_1=1$  (d.h.  $c_1 = c_0$ ) ergibt sich diese Grenze allgemein gemäß:

$$C_K = \frac{1}{2v_K} \left( 1 + \sqrt{1 - 4v_K(1 - v_K)} \right) \quad \text{Gleichung 4-35}$$



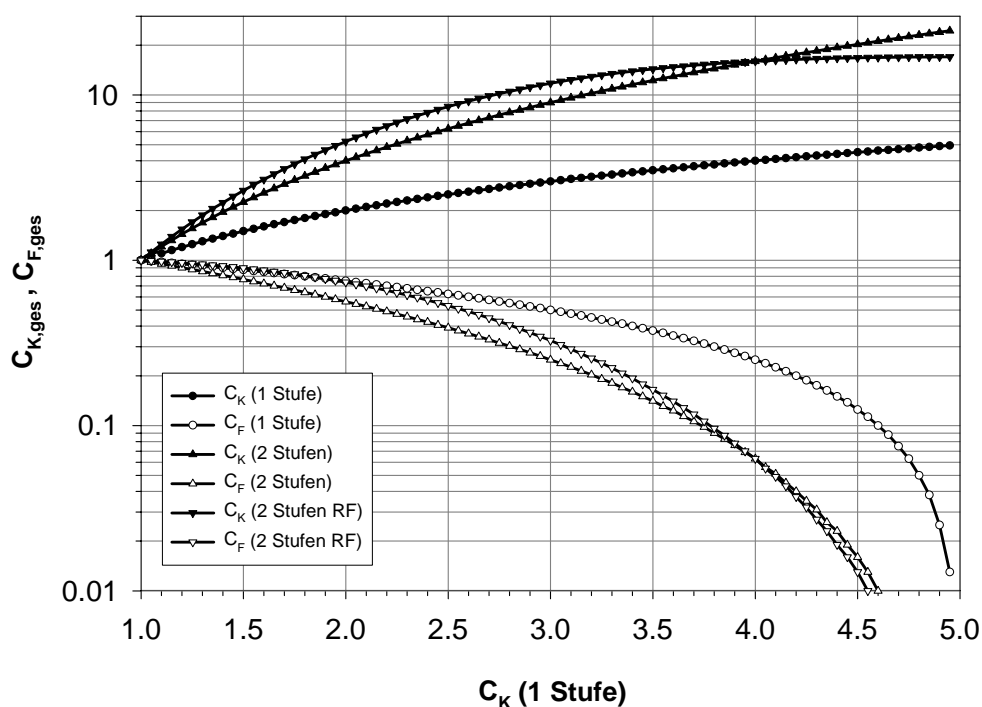


Abb. 4-6: Berechnete relative Ablaufkonzentrationen für eine und zwei Stufen, mit und ohne Rückführung (RF) für  $v_K = 20\%$ .

#### 4.4 Modellrechnungen für die RMMS

Das stark inhomogene Magnetfeld, das durch das Einbringen magnetisierbarer Drähte in ein homogenes Hintergrundmagnetfeld hervorgerufen wird, ist die Ursache der Magnetkraft im HGMS und RMMS (vgl. Kapitel 2.5.2). Aus der Kenntnis der Magnetfeldverteilung lassen sich die Trajektorien magnetisierbarer Partikeln unter dem Einfluss des Magnetfelds berechnen. Im folgenden Abschnitt werden die Magnetfeldverteilungen um magnetisierte Drähte berechnet, die resultierenden Partikelbahnen und Abscheidegrade ermittelt und Einflussfaktoren diskutiert. Berechnungsgrundlagen der Magnetfeldverteilung sind hierbei die analytische Lösung für den magnetisierten Einzeldraht bzw. Finite-Element-Berechnungen (FEM) für komplexere Anordnungen.

##### 4.4.1 Feldverteilung um einen zylindrischen Einzeldraht

Für die Komponenten des Magnetfeldes außerhalb eines zylindrischen Einzeldrahtes gilt in normierter x- und y-Richtung (Straton 1941, Svoboda 1987):

$$H_x(x_a, y_a) = H_0 + \frac{M_d}{2} \frac{x_a^2 - y_a^2}{(x_a^2 + y_a^2)^2} \quad \text{Gleichung 4-36a}$$

$$H_y(x_a, y_a) = M_d \cdot \frac{x_a \cdot y_a}{(x_a^2 + y_a^2)^2} \quad \text{Gleichung 4-36b}$$

Für die Magnetisierung  $M_d$  eines zylindrischen Drahtes aus einem Material mit Sättigungsmagnetisierung  $M_{s,d}$  gilt hierbei näherungsweise:

$$M_d(H_0) = \begin{cases} \frac{H_0}{D_{m,Zyl}} & \text{für } H_0 < D_{m,Zyl} \cdot M_{s,d} \\ M_{s,d} & \text{sonst} \end{cases} \quad \text{mit } D_{m,Zyl} = \frac{1}{2} \quad \text{Gleichung 4-37}$$

Für den Betrag des Magnetfeldes gilt:

$$H(x_a, y_a) = \sqrt{H_x^2 + H_y^2} \quad \text{Gleichung 4-38}$$

Abb. 4-7 zeigt die Flussdichteverteilung um einen zylindrischen Einzeldraht gemäß Gleichung 4-36 bei den in den Experimenten verwendeten Bedingungen. In Abb. 4-8 ist die Flussdichte entlang der beiden Symmetrieebenen durch den Draht dargestellt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse einer Vergleichsrechnung mittels FEM dargestellt, die eine gute Übereinstimmung mit der analytischen Feldberechnung aufweisen.

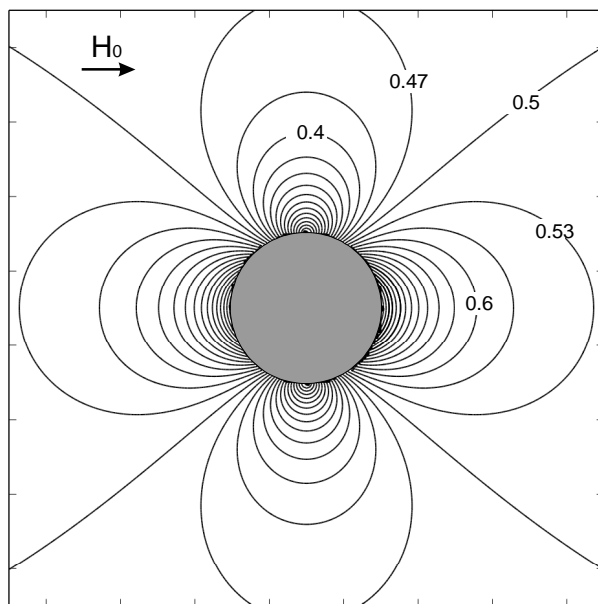


Abb. 4-7: Berechnetes Magnetfeld um einen magnetisierten Einzeldraht. Dargestellt sind Linien gleicher Flussdichte  $B$  für  $B_0 = 0.5 \text{ T}$ ;  $J_{s,d} = 1.7 \text{ T}$ .

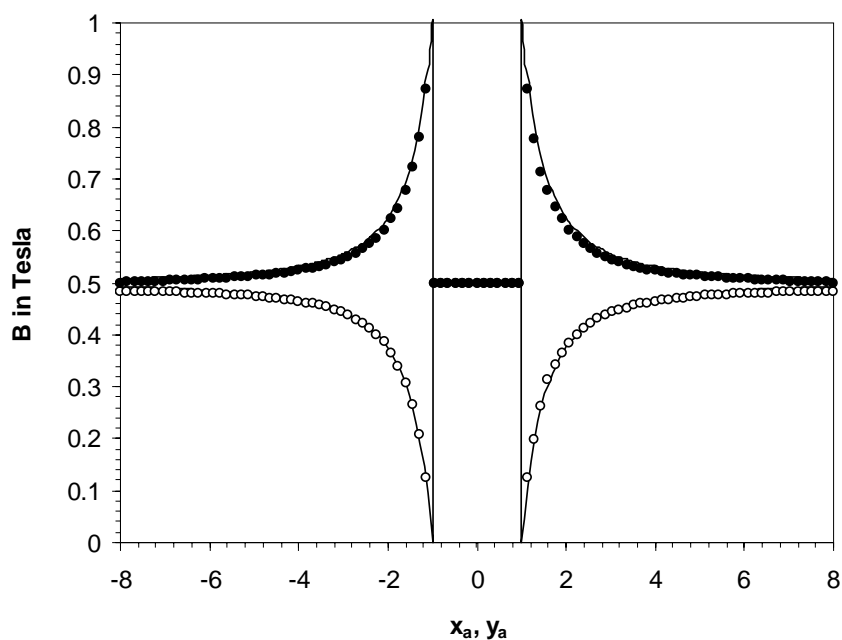


Abb. 4-8: Feld entlang der Symmetrieachsen durch den Einzeldraht mit Hintergrundfeld  $B_0 = 0.5 \text{ T}$ . Linien: Berechnet nach Gleichung 4-36, Punkte sind über FEM berechnet. (●) parallel zu  $B_0$ , (○) senkrecht zu  $B_0$

#### 4.4.2 Feldverteilung um zwei magnetisierte Drähte (Doppeldraht)

##### 4.4.2.1 Feldberechnung durch Superposition

Zur Berechnung von Partikelbahnen im Repulsive-Mode Magnetseparator ist die Kenntnis der (ebenen) Magnetfeldverteilung  $H_0(x, y)$  wichtig. Zunächst wurde die Feldverteilung durch vektorielle Superposition der Felder zweier Einzeldrähte approximiert. Für die Komponenten der Feldstärke in der Umgebung einer Doppeldrahtanordnung mit einem Abstand der Drähte von  $2a$  ergibt sich:

$$H_x^{00}(x, y) = H_x(x_a - 2, y) + H_x(x_a + 2, y) - H_0 \quad \text{Gleichung 4-39a}$$

$$H_y^{00}(x, y) = H_y(x_a - 2, y) - H_y(x_a + 2, y) \quad \text{Gleichung 4-39b}$$

$$H^{00}(x_a, y_a) = \sqrt{(H_x^{00})^2 + (H_y^{00})^2} \quad \text{Gleichung 4-40}$$

In der folgenden Abb. 4-9 ist die durch Superposition berechnete Feldverteilung anhand Linien gleicher Flussdichte dargestellt:

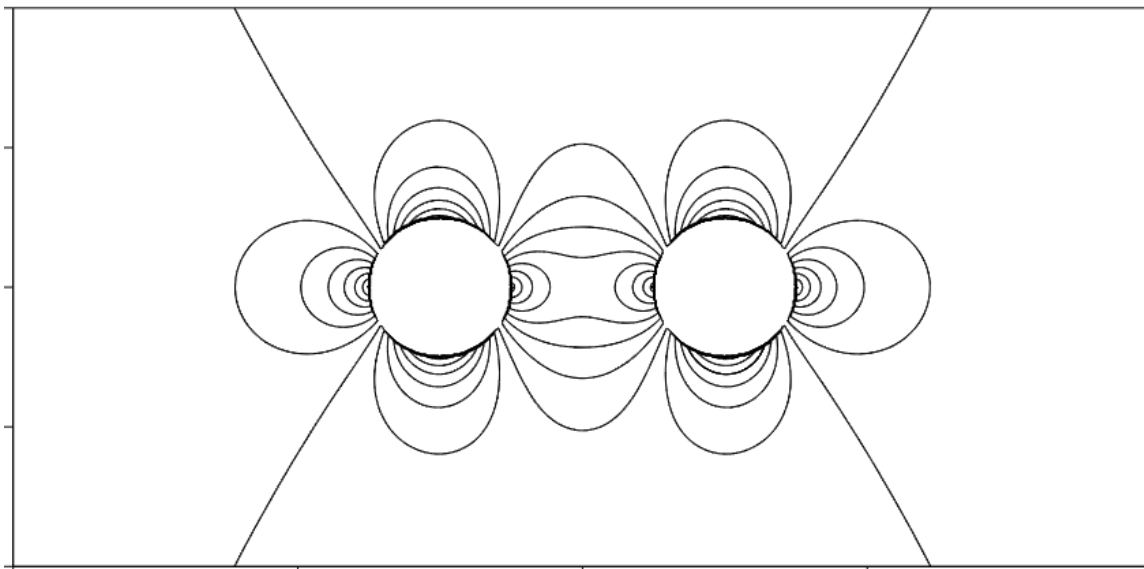


Abb. 4-9: Durch Superposition berechnete Feldverteilung für zwei magnetisierte Drähte im Abstand  $2a$ ,  $B_0 = 0.5$  T.

#### 4.4.2.2 Feldberechnung durch Finite-Element-Methode (FEM)

Zur Berechnung der Magnetfeldverteilung über die Finite-Element-Methode (FEM) wurde die kommerzielle Software Quickfield™ (Tera Analysis, USA) verwendet. Die Software berechnet zweidimensionale Grenzwertprobleme für so genannte elliptische partielle Differentialgleichungen (siehe Anhang). Abb. 4-10 zeigt die Magnetfeldverteilung um den Doppeldraht.

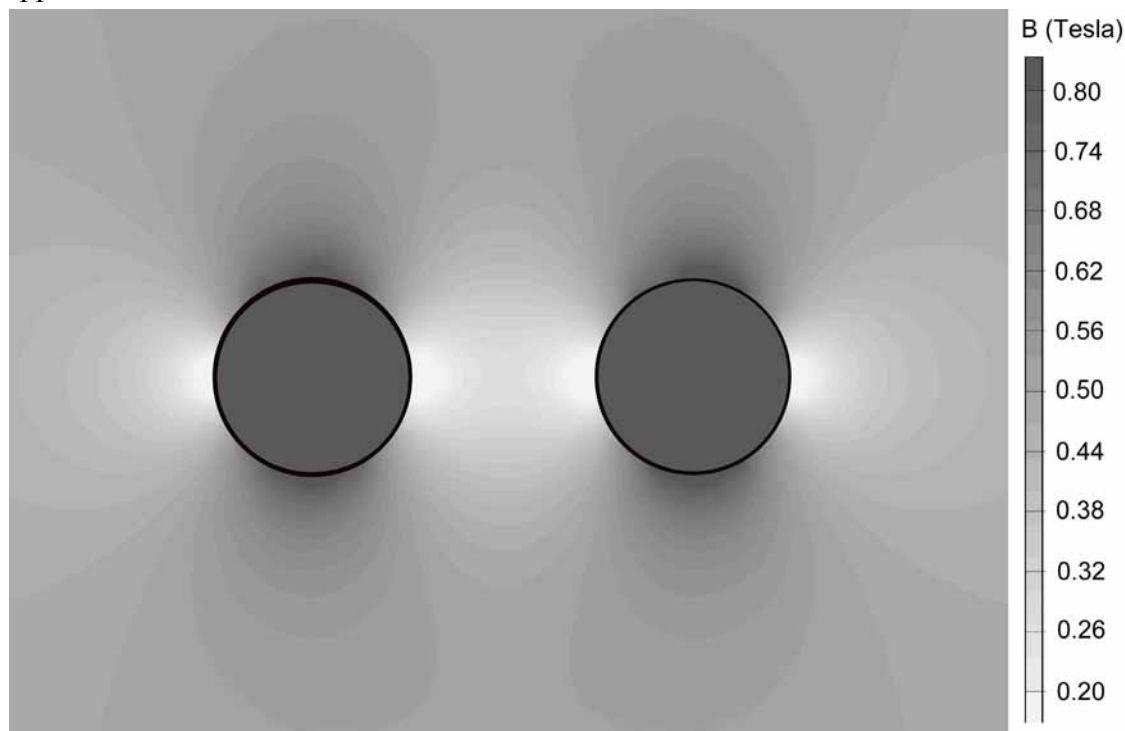


Abb. 4-10: Berechnete Verteilung der magnetischen Flussdichte (FEM),  $B_0 = 0.5$  T

Die folgenden Abbildungen zeigen einen Vergleich der Feldberechnungen durch Superposition bzw. FEM entlang der in Abb. 4-11 skizzierten Schnittebenen. Abb. 4-12 stellt die Flussdichte entlang der Verbindungslinie der beiden Drähte dar, Abb. 4-13 zeigt den Feldverlauf entlang der beiden vertikalen Schnitte. Die durch Superposition berechnete Feldverteilung des Doppeldrahts stimmt in hinreichender Entfernung des jeweils anderen Drahts sehr gut mit der genaueren FEM-Berechnung überein. Insbesondere in Bereichen zwischen den Drähten treten dagegen Abweichungen der beiden Berechnungen auf, was auf die gegenseitige Beeinflussung des Magnetfelds eines Drahts auf die Magnetisierung des jeweils Anderen zurückzuführen ist. Dieser Einfluss wird nur in der FEM-Berechnung berücksichtigt. Wie aus den Abbildungen ersichtlich wird, ist dieser Einfluss aber geringfügig, so dass die Verwendung der analytisch darstellbaren superpositionierten Feldverteilung zur Berechnung der Partikelbahnen im RMMS gerechtfertigt erscheint.

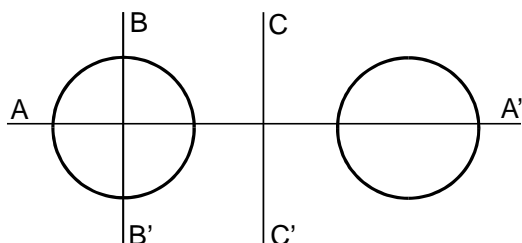


Abb. 4-11: Schnittebenen durch die Doppeldrahtanordnung für den Vergleich der beiden Berechnungsmethoden.

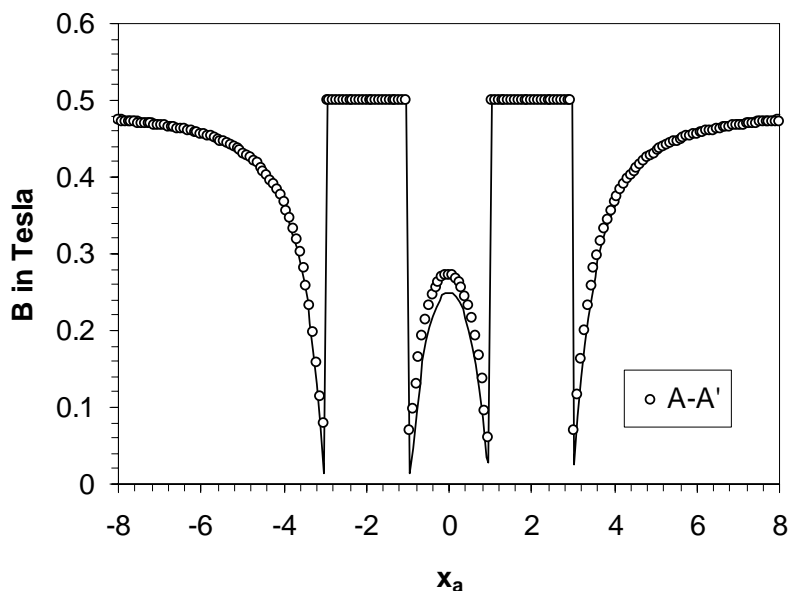


Abb. 4-12: Feld entlang der Verbindungslinie zweier Drähte (A-A'), senkrecht zum Hintergrundfeld von  $B_0 = 0.5 \text{ T}$ .  
Linie: Berechnet durch Superposition; Punkte: FEM

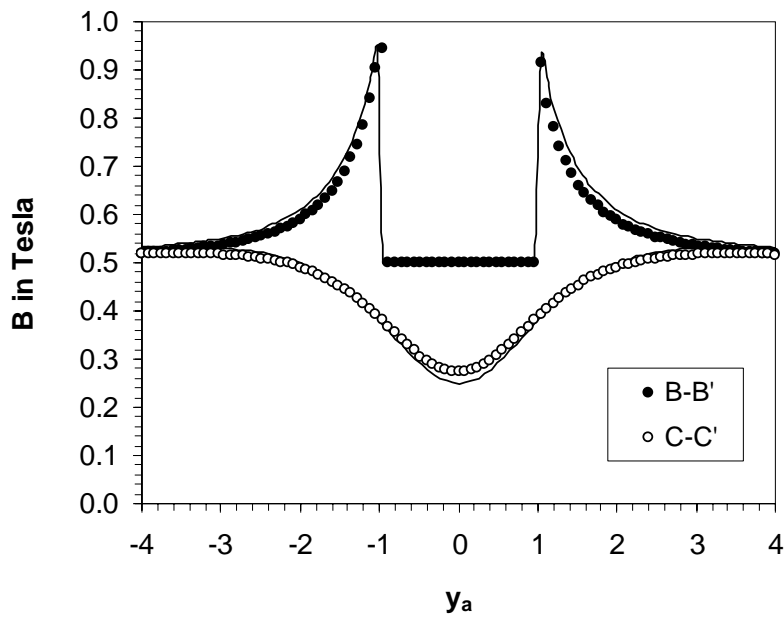


Abb. 4-13: Magnetfeld entlang Linien parallel zum Hintergrundfeld  $B_0$ ; Linien: Berechnet durch Superposition, Punkte sind über FEM berechnet.

#### 4.4.3 Partikelbahnen im RMMS

Die Berechnung von Partikelbahnen innerhalb eines RMMS verläuft bis zu einem bestimmten Punkt analog zur Berechnung der Partikelbahnen im Bereich eines Einzeldrahts mit axialer Anordnung (Birss 1976; Uchiyama 1976, 1977, siehe auch Anhang der Arbeit). In beiden Fällen besitzt die Magnetkraft keine Komponente in Strömungsrichtung, so dass eine zunächst vereinfachte Berechnung der Projektion der Partikelbahnen in die  $xy$ -Ebene möglich ist (siehe Abb. 4-14). Im Unterschied zu den bekannten Einzeldrahtlösungen aus der Literatur müssen für die Betrachtung eines RMMS jedoch das Magnetfeld eines Doppeldrahtsystems sowie die Strömungsbedingungen innerhalb eines zwischen den Drähten angeordneten Rohrs betrachtet werden.

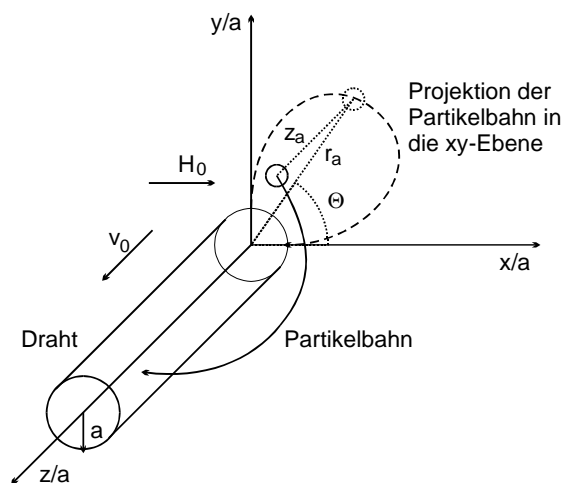


Abb. 4-14: Definition des Koordinatensystems für axiale Anordnung.

Unter Vernachlässigung der Partikelträgheit ergibt sich in der  $xy$ -Ebene für beliebiges  $z$ :

$$0 = \vec{F}_m + \vec{F}_w$$

Gleichung 4-41

d.h. die Magnetkraft und die hydrodynamische Widerstandskraft sind vom Betrag her gleich und entgegengesetzt gerichtet. Hierbei gilt in x-Richtung:

$$F_{W,x} = -6\pi\eta b \cdot \frac{dx}{dt} \quad \text{Gleichung 4-42}$$

$$F_{m,x}(x, y) = V_p \mu_0 M_{ps} \frac{\partial}{\partial x} H(x, y) \quad \text{Gleichung 4-43}$$

Die analogen Gleichungen gelten in y-Richtung. Es ergibt sich folgendes ebenes Differentialgleichungssystem für die Partikelbahn:

$$\frac{dx_a}{dt} = V_p \mu_0 M_{ps} \frac{1}{6\pi\eta b a} \frac{\partial H(x_a, y_a)}{\partial x_a} \quad \text{Gleichung 4-44}$$

$$\frac{dy_a}{dt} = V_p \mu_0 M_{ps} \frac{1}{6\pi\eta b a} \frac{\partial H(x_a, y_a)}{\partial y_a} \quad \text{Gleichung 4-45}$$

In den folgenden Abbildungen sind die numerisch berechneten Trajektorien für die Flussdichten 2, 1 und 0.5 Tesla für jeweils die gleichen Startpositionen dargestellt. Mit abnehmender Feldstärke erfahren die Partikeln in der Nähe des abstoßenden Bereichs eines Drahtes geringere Magnetkräfte und werden in Folge dessen weniger stark vom Draht abgestoßen. Die Partikelbahnen verlaufen entsprechend flacher. Diese Tatsache hat insbesondere einen Einfluss auf die Grenzpartikelbahn und damit auf den maximal möglichen Abscheidegrad des RMMS.

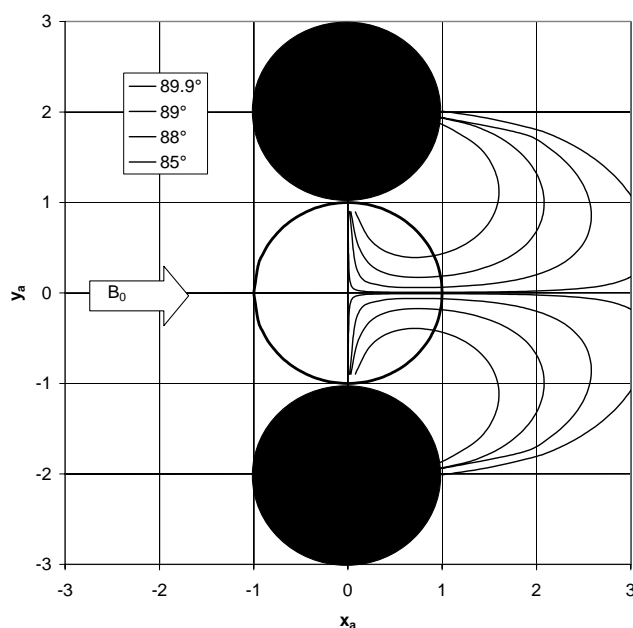


Abb. 4-15: Projektion von Partikelbahnen in die xy-Ebene; Anfangswerte:  $r_{a0} = 0.9$ . Der Winkel  $\theta_0$  ist in der Legende angegeben.  $B_0 = 2$  Tesla

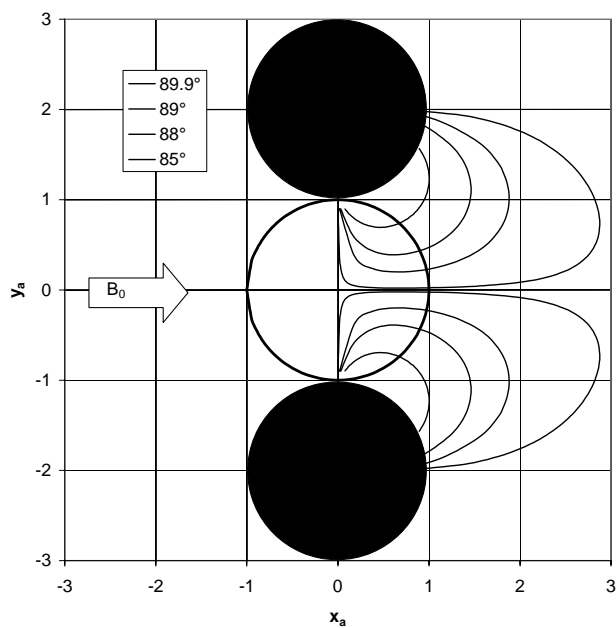


Abb. 4-16: Projektion von Partikelbahnen in die xy-Ebene;  $B_0 = 1$  Tesla

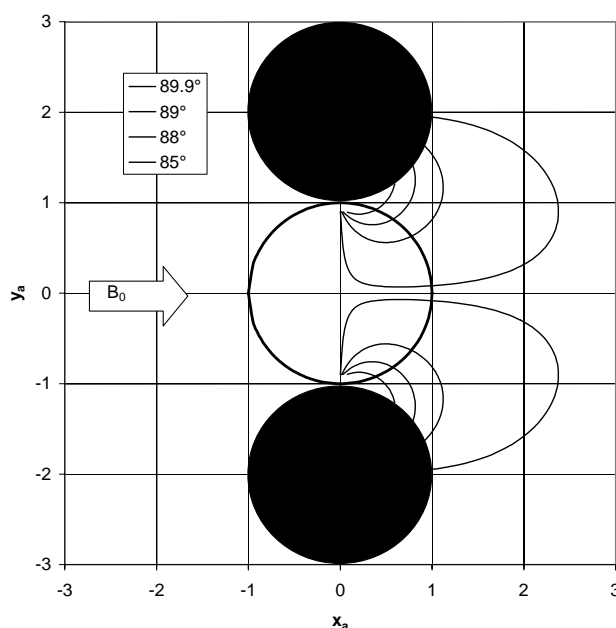


Abb. 4-17: Projektion von Partikelbahnen in die xy-Ebene;  $B_0 = 0.5$  Tesla

#### 4.4.4 Berechnung des Abscheidegrads

Magnetpartikeln, die dem Repulsive-Mode Magnetseparator zulaufen, sollen möglichst vollständig ins Konzentrat gelangen, das Filtrat hingegen sollte weitgehend keine Magnetpartikeln enthalten. Damit ein in den RMMS eintretendes Partikel während seiner Aufenthaltszeit im Separator ins Konzentrat gelangen kann, muss es am Ende der Separationsstrecke radial möglichst nahe an die Separatorwand gewandert sein ( $r_a \approx 1$ ), zusätzlich muss seine Winkelkoordinate aber auch unterhalb dem Grenzwinkel  $\phi_G$  liegen (vgl. Abschnitt 3.5.2).

Partikeln werden als abgeschieden betrachtet, sofern sie am Ende des Separators (bei Beginn der Trennwände für Konzentrat und Filtrat) folgende Bedingungen erfüllen :



$$r_a = 1 \quad \text{und} \quad \theta < \theta_G$$

Gleichung 4-46

Für die weiteren Überlegungen genügt die Betrachtung eines Quadranten, da die Anordnung bezüglich beider Achsen symmetrisch ist. Weiterhin kommt es zu keinen Überschneidungen der in die xy-Ebene projizierten Partikelbahnen.

Wird ein Partikel nicht abgeschieden, so können dafür zwei Mechanismen verantwortlich sein:

- Die Projektion der Partikelbahn in die xy-Ebene endet nicht im Winkelbereich, der durch die Trennwände festgelegt ist. Der Abscheideanteil unter Berücksichtigung nur dieses Mechanismus ist folglich unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit. Es resultiert der maximale Abscheidegrad bei gegebener Feldstärke.
- Die Partikelposition bei Erreichen der Trennwände erreicht in radialer Richtung nicht den Bereich des Konzentratabzugs. Der Abscheideanteil kann in diesem Fall durch eine Verringerung der Strömungsgeschwindigkeit erhöht werden.

Interessanterweise sind die beiden Mechanismen voneinander unabhängig, sofern nicht so hohe Strömungsgeschwindigkeiten gewählt werden, die nur noch zu einem minimalen Gesamtabscheidegrad führen würden. Dies liegt daran, dass Partikeln, die bei einer Winkelkoordinate größer  $\theta_G$  auf die Separatorwand auftreffen nur eine geringe Strecke in z-Richtung zurücklegen, während Partikeln, die bei kleiner Winkelkoordinate in die Konzentratzone gelangen würden, eine lange Strecke in z-Richtung benötigen, um an die Separatorwand zu gelangen (und in Folge dessen ins Filtrat ausgetragen werden können). Bei den Partikeln, die in Folge eines der beiden Mechanismen nicht in die Konzentratzone gelangen, handelt es sich also um unterschiedliche Teilmengen ohne Überschneidung, so dass bei der Berechnung des Abscheidegrads die beiden Mechanismen additiv verknüpft werden können.

#### 4.4.4.1 Maximaler Abscheidegrad

Zur Bestimmung des bei gegebener Feldstärke maximal möglichen Abscheidegrads genügt die zweidimensionale Betrachtung des Problems in der xy-Ebene. Da es nicht zu Überschneidungen von einzelnen Partikelbahnen kommen kann, können bestimmte Partikeln, die sich zwischen der Separatorwand und einer Grenzpartikelbahn befinden, prinzipiell nicht in die Konzentratzone gelangen. In Abb. 4-18 sind berechnete Grenzpartikelbahnen für drei unterschiedliche magnetische Flussdichten dargestellt.

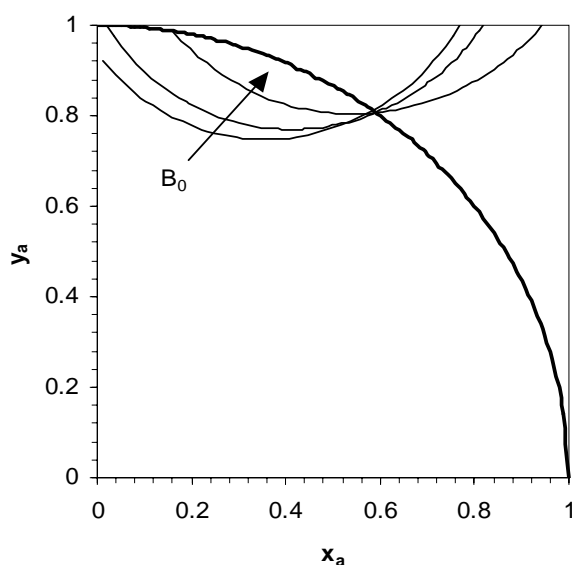


Abb. 4-18: Einfluss der Flussdichte auf die Grenzpartikelbahn. Dargestellt sind die Grenzpartikelbahnen für 0,5, 1 und 2 Tesla.

Der prinzipiell nicht abscheidbare Anteil der Partikeln ist abhängig von der Feldstärke und vom Grenzwinkel  $\theta_G$ . Die entsprechende Grenzpartikelbahn verschiebt sich mit zunehmender Flussdichte zur Separatorwand. Da damit der Anteil der Fläche zwischen Separatorwand und Grenzpartikelbahn abnimmt, verringert sich der nicht abscheidbare Anteil der Partikeln und verbessert sich entsprechend der Abscheidegrad. Aufgrund des parabolischen Geschwindigkeitsprofils ist der nicht-abscheidbare Anteil der Partikeln nicht identisch mit dem Flächenanteil des von der Grenzpartikelbahn und der Separatorwand abgegrenzten Fläche bezogen auf die Fläche des Viertelkreises. Vielmehr ist dieser Anteil aufgrund der geringeren Strömungsgeschwindigkeit am Rohrrand geringer.

Der Einfluss der Flussdichte auf den nicht-abscheidbaren Anteil der Partikeln im Zulaufstrom ist in Abb. 4-19 dargestellt. Er ergibt sich aus dem Volumenstromanteil, der durch die von Grenzpartikelbahn und Separatorwand abgegrenzten Fläche fließt bezogen auf den Gesamtvolumenstrom. Somit gilt für den Maximalabscheidegrad  $\varphi_{\max}$  :

$$1 - \varphi_{\max} = \frac{4}{\pi} \int_{A_G} \frac{v}{\bar{v}} dA_G \quad \text{Gleichung 4-47}$$

Dabei muss über die durch die von Grenzpartikelbahn und Separatorwand abgegrenzten Fläche integriert werden;  $v$  stellt die lokale Strömungsgeschwindigkeit gemäß Gleichung 4-48 dar.

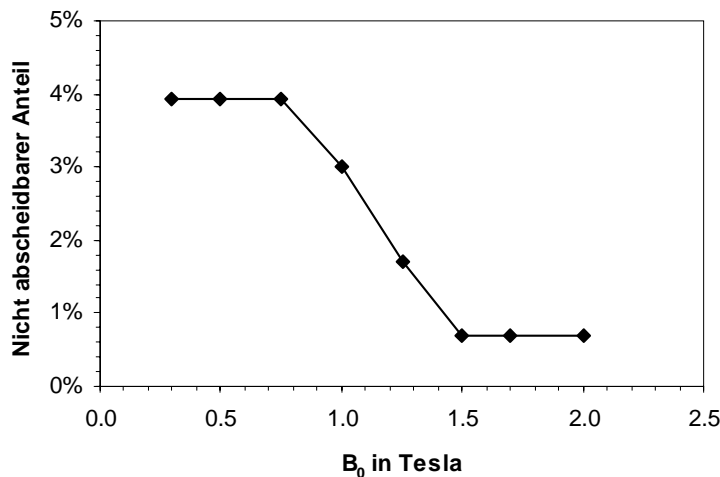


Abb. 4-19: Der nicht abscheidbare Anteil der Partikeln in Abhängigkeit der Flussdichte. Hieraus ergibt sich der maximale Abscheidegrad, der bei sehr geringen Strömungsgeschwindigkeiten erreicht wird.

Modellparameter:  $b = 12.5 \mu\text{m}$ ,  
 $J_{s,d} = 1.7 \text{ T}$ ,  $J_{s,p} = 0.15 \text{ T}$ ,  
 Berechnungsgitter  $10 \times 10$

#### 4.4.4.2 Gesamtabscheidegrad

Um den Gesamtabscheidegrad berechnen zu können, spielt außer der ebenen Bewegung der Partikeln die Frage eine Rolle, ob ein betrachtetes Partikel während seiner Aufenthaltszeit im Separator überhaupt die Separatorwand erreicht und damit als abgeschieden gelten kann. Wird die Strömungsgeschwindigkeit zu hoch gewählt, so reicht die Zeit zum Erreichen der Konzentrationszone nicht aus, und das Partikel gelangt in den Filtratstrom.

Um diese Frage beantworten zu können, muss die Partikelbahn im dreidimensionalen Raum berechnet werden. Im engen Querschnitt kann selbst bei sehr hohen Strömungsgeschwindigkeiten (bis etwa 1700 m/h) ein laminares Strömungsprofil angenommen werden. In z-Richtung wirkt keine Magnetkraft auf das Partikel, so dass folgende Differentialgleichung resultiert. Die Differentialgleichungen in x- und y- Richtung bleiben unverändert gültig.

$$\frac{dz_a}{dt} = \begin{cases} v_{\max} (1 - x_a^2 - y_a^2) & \text{für } (x_a^2 + y_a^2 < 1) \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad \text{mit } v_{\max} = 2 \bar{v} \quad \text{Gleichung 4-48}$$

Die dreidimensionale Partikelbahn lässt sich aus dem Differentialgleichungssystem und entsprechenden Anfangswerten  $(t_0, x_0, y_0, z_0)$  numerisch berechnen. Eine über ein Runge-Kutta-Verfahren 4. Ordnung berechnete Partikelbahn und die entsprechende Projektion in die xy-Ebene ist in Abb. 4-20 exemplarisch dargestellt.

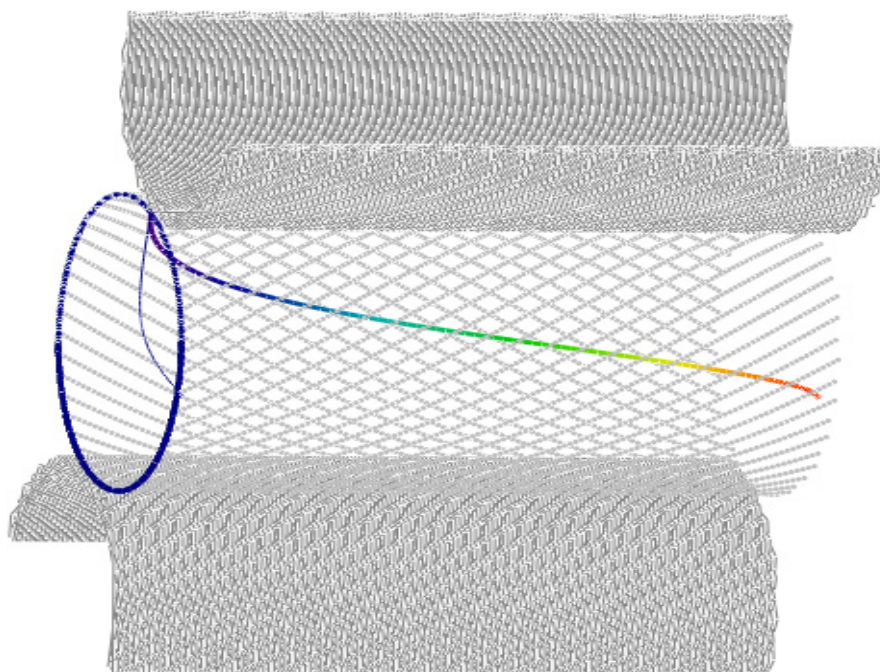


Abb. 4-20: Partikelbahn innerhalb des RMMS, Anfangsbedingungen:  $r_{a0}=1$ ,  $\theta_0=1^\circ$ ,  $z_{a0}=0$ . Die beiden Drähte oberhalb und unterhalb des Strömungskanals sind im Bild nur angedeutet.

Nimmt man eine Gleichverteilung der Partikeln über den Eintrittsquerschnitt des RMMS an, so können durch eine Monte-Carlo-Simulation die Koordinaten bei Auftreffen auf die Separatorwand für eine Vielzahl von Partikeln berechnet werden. Da die genaue Endposition jedes Partikels am Austrittsquerschnitt bekannt ist, lässt sich hierdurch bei gegebenen Randbedingungen sowohl der maximale Abscheidungsgrad als auch der von der Strömungsgeschwindigkeit abhängige Gesamtabscheidungsgrad bestimmen. Die Verteilung der Partikeln über den Eintrittsquerschnitt kann dabei rein zufällig erfolgen oder über ein Raster, das die Partikeln homogen über die Querschnittsfläche verteilt. Für einen großen Stichprobenumfang ergeben sich für beide Methoden die gleichen Abscheidungsgrade. Für einen geringeren Stichprobenumfang erscheint jedoch die Vorgabe eines homogenen Rasters die geeignetere Methode, da keine zufälligen Ungleichverteilungen auftreten. In Abb. 4-21 sind die Koordinaten von 294 Partikeln im Eintrittsquerschnitt und kurz vor Auftreffen auf die Separatorwand dargestellt. Abb. 4-22 zeigt zusätzlich die Winkelpositionen am Endpunkt der Partikelbahn in Abhängigkeit von der Winkelposition am Separatoreintritt für das gleiche Partikelkollektiv. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Partikeln maximal ihre Winkelposition beibehalten, vielfach jedoch eine kleinere Winkelposition anstreben und somit in die Konzentratzone gelangen.

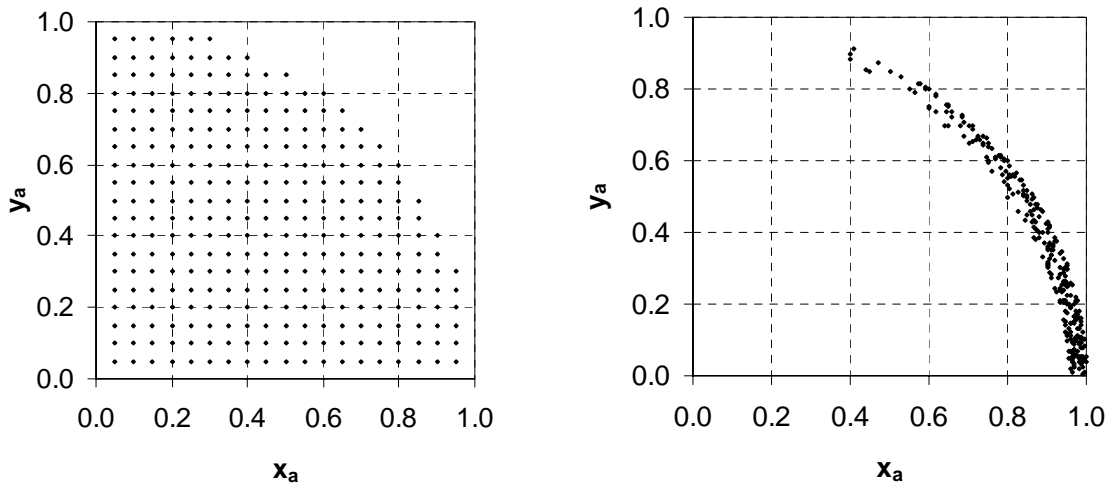


Abb. 4-21: Position von 294 Partikeln am Separatoreingang (links) und kurz vor ihrem Auftreffen auf die Separatorwand (rechts).  $B_0 = 2 \text{ T}$ ,  $v = 305 \text{ m/h}$ ,  $b = 12.5 \text{ }\mu\text{m}$ ; 4.1 % der Partikeln treffen in einem Winkel größer als der Grenzwinkel auf. 19.7 % der Partikeln treffen nicht innerhalb der vorgegebenen Separatordlänge von  $z_a = 60$  auf. Der berechnete Gesamtabscheidegrad beträgt 76.2 %.

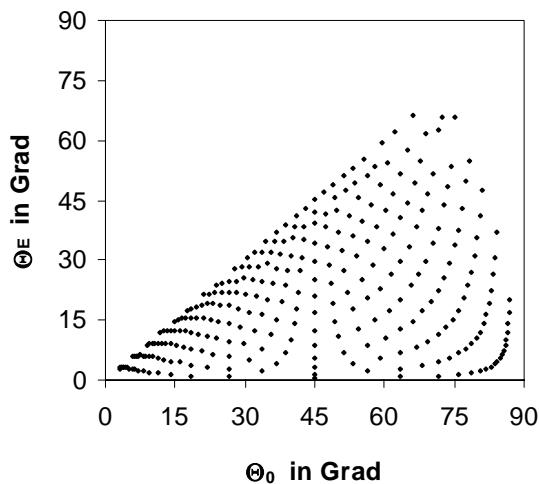


Abb. 4-22: Auftreffwinkel  $\theta_E$  in Abhängigkeit vom Startwinkel  $\theta_0$

In den beiden folgenden Abbildungen sind der Auftreffwinkel (Abb. 4-23) und die z-Koordinate am Auftreffpunkt (Abb. 4-24) in Abhängigkeit der Startkoordinaten  $(x_{a0}, y_{a0}, 0)$  dargestellt. Kleine Endwinkel  $\theta_E$  erreichen insbesondere Partikeln mit Startpositionen entlang der Achsen bzw. im Zentrum des Querschnitts. Kleine  $z_{a,E}$ -Koordinaten erreichen dagegen verstärkt Partikeln, die sich zu Beginn am Rohrrand befinden. Partikeln im Rohrzentrum legen den längsten Weg in axialer Richtung zurück und laufen Gefahr, ins Filtrat zu gelangen.

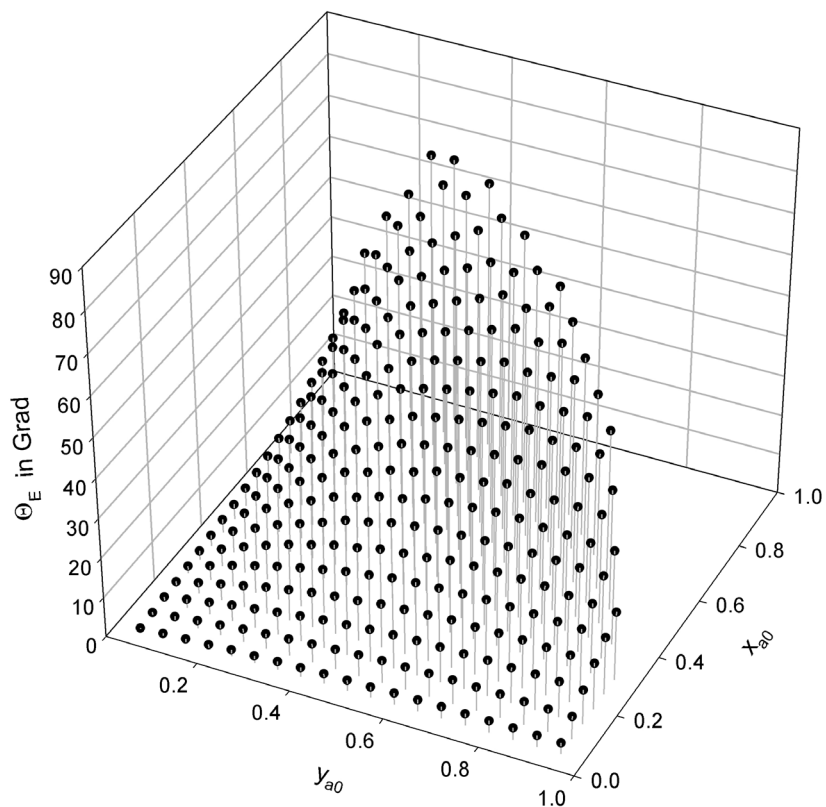


Abb. 4-23: Auftreffwinkel in Abhängigkeit von der Position am Separatoreintritt.

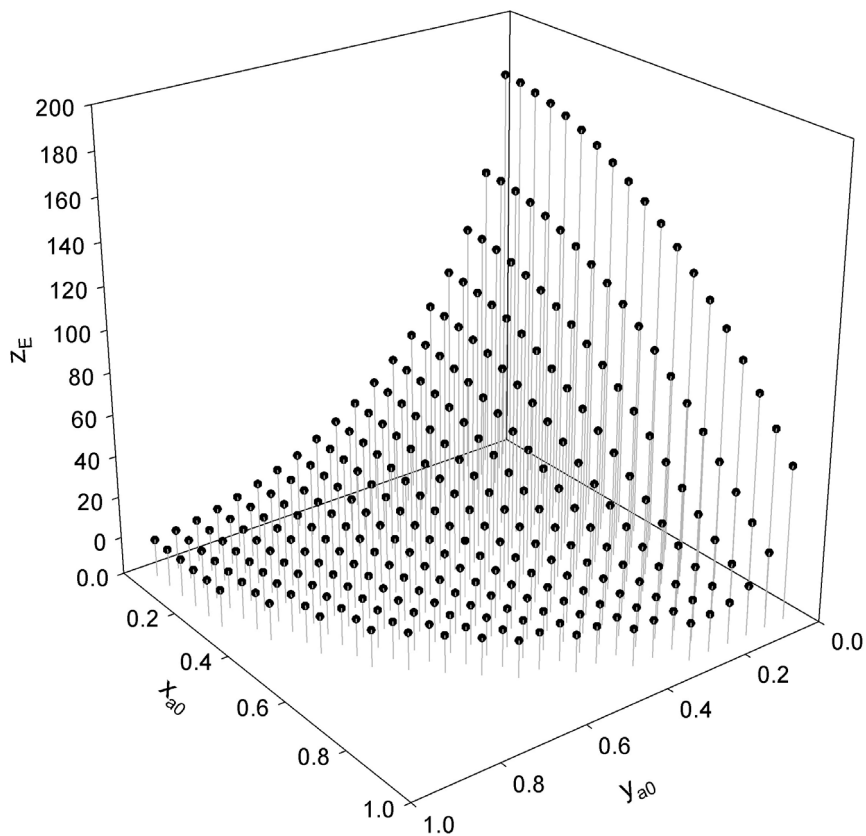


Abb. 4-24: z-Koordinate des Auftreffpunkts in Abhängigkeit von der Position am Separatoreintritt.

Grundlage der theoretischen Bestimmung jedes Abscheidegrads ist die dreidimensionale Berechnung von je  $n = 69$  Einzelpartikelbahnen, deren Startpositionen (,Index 0') über ein  $10 \times 10$ -Raster gleichverteilt über den Eintritt des Separators angeordnet sind. Die Koordinaten am Separatorende sind mit ,E' indiziert. Zur Berücksichtigung der parabolischen Geschwindigkeitsverteilung wurde jedes dieser Partikeln bei der Berechnung des Abscheidegrads mit seiner Geschwindigkeit am Eintrittsquerschnitt  $v_{z,0}$  bezogen auf die mittlere Strömungsgeschwindigkeit  $\bar{v}$  gewichtet. Für den Gesamtabscheidegrad  $\phi$  ergibt sich demnach der Ausdruck:

$$\phi = 1 - \frac{1}{n} \left[ \frac{v_{z,0}}{\bar{v}} \sum_n \{(\theta_E > \theta_G) \cdot (r_{a,E} < 1)\} \right] \quad \text{Gleichung 4-49}$$

wobei die boole'schen Ausdrücke  $(\theta_E > \theta_G)$  und  $(r_{a,E} < 1)$  für jede Partikelbahn den Wert 0 oder 1 annehmen können.

#### 4.4.4.3 Einfluss der Feldstärke auf den Abscheidegrad

Wie bereits dargestellt, hat die magnetische Feldstärke Einfluss auf den Verlauf der Grenzpartikelbahn, so dass sich der Anteil der Partikeln, die den Grenzwinkel überschreiten mit zunehmender Feldstärke verringert. Aber auch der Anteil der ins Filtrat ausgetragenen Partikeln hängt stark von der Feldstärke ab, wie aus Abb. 4-25 ersichtlich wird. Der Rückgang dieses Anteils lässt sich direkt aus dem mit zunehmender Feldstärke veränderten Verlauf der Partikelbahnen erklären. Wie aus den Abb. 4-15 bis Abb. 4-17 ersichtlich wird, verlaufen die Partikelbahnen mit zunehmender Feldstärke immer steiler vom abstoßenden Bereich der Drähte weg und gelangen damit verstärkt in die Konzentrationzone. Bei sehr hohen Feldstärken über etwa 1 Tesla werden wieder etwas mehr Partikeln ins Filtrat ausgetragen, was dadurch zu erklären ist, dass sich Partikeln auf sehr steil verlaufenden Bahnen längere Zeit benötigen um die Separatorwand zu erreichen, was die Wahrscheinlichkeit eines Austrags erhöht.

Der in Abb. 4-26 dargestellte Gesamtabscheidegrad lässt sich direkt aus den beiden Anteilen berechnen.

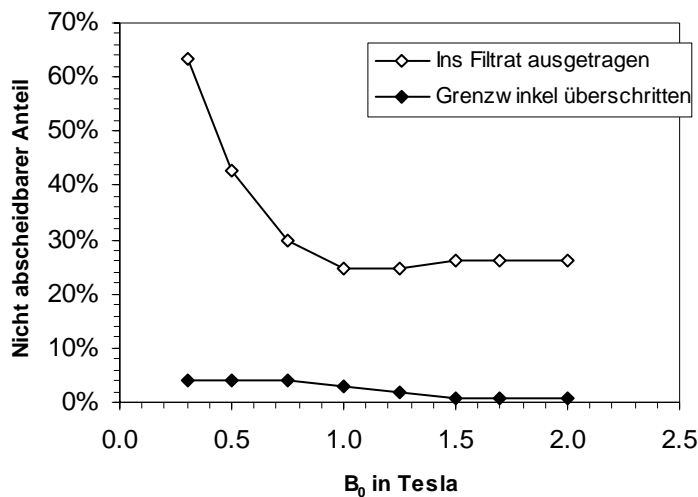


Abb. 4-25: Nicht abscheidbarer Anteil der Partikel in Abhängigkeit der Flussdichte – aufgeteilt nach den Mechanismen, die zu einer Nichtabscheidung führen.

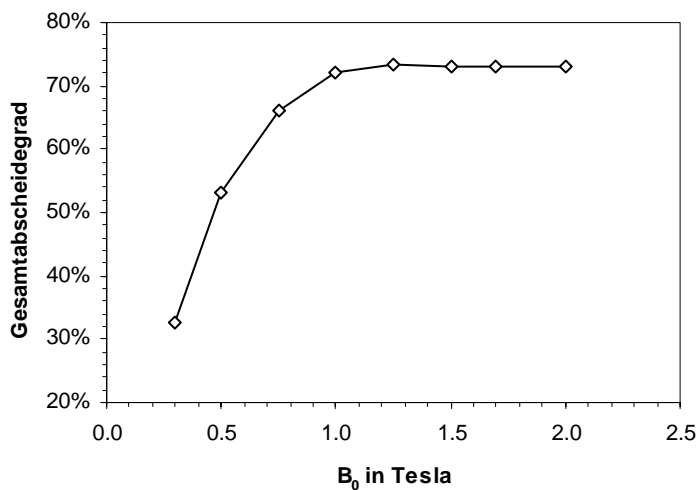


Abb. 4-26: Berechneter Gesamtabscheidegrad in Abhängigkeit der Flussdichte  $B_0$  für  $v = 300$  m/h,  $b = 12.5$   $\mu\text{m}$ .,  $J_{s,d} = 1.7$  T,  $J_{s,p} = 0.15$  T,  $\eta = 1$  mPas, Berechnungsgitter  $10 \times 10$ .

#### 4.4.4.4 Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf den Abscheidegrad

Der maximale Abscheidegrad wird nur bei vergleichsweise geringen Strömungsgeschwindigkeiten erreicht. Ab einer Grenze, die unter anderem von Partikelgröße und Feldstärke abhängt, kann der Gesamtabscheidegrad durch den Austrag von Partikeln ins Filtrat merklich zurückgehen. Der Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf den Gesamtabscheidegrad wurde exemplarisch für eine Flussdichte von 0.5 Tesla und einen Partikelradius von  $12.5$   $\mu\text{m}$  berechnet und ist in Abb. 4-27 dargestellt. Für die gewählten Bedingungen wird ab einer Strömungsgeschwindigkeit von etwa  $75$  m/h ein Teil der Partikeln ins Filtrat ausgetragen. Der Rückgang des Abscheidegrads mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit lässt sich näherungsweise durch einen exponentiellen Abfall beschreiben. In Abb. 4-28 sind die Anteile der abgeschiedenen, ausgetragenen und oberhalb des Grenzwinkels auftreffenden Partikeln für verschiedene Strömungsgeschwindigkeiten gezeigt.



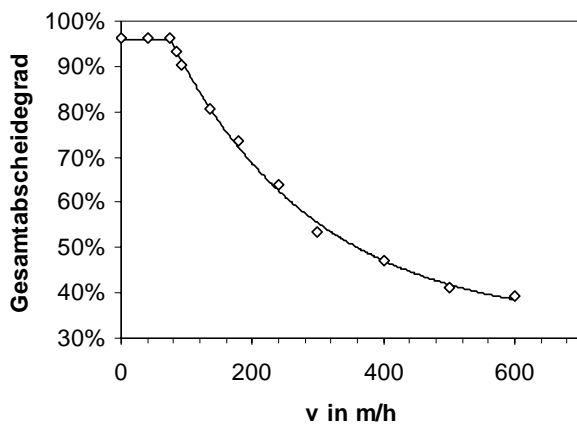


Abb. 4-27: Berechneter Gesamtabscheidegrad in Abhängigkeit der Strömungsgeschwindigkeit.

$B_0 = 0.5 \text{ T}$ ,  $J_{s,d} = 1.7 \text{ T}$ ,  $J_{s,p} = 0.15 \text{ T}$ ,

$b = 12.5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $\eta = 1 \text{ mPas}$ ,

Berechnungsgitter  $10 \times 10$ .

Punkte berechnet, Linie gefittet:

$y = y_0 + a \cdot \exp(-bx)$  mit  $y_0 = 0.328$ ,  $a = 0.889$ ,  
 $b = 0.046$ ,  $R^2 = 0.998$ .

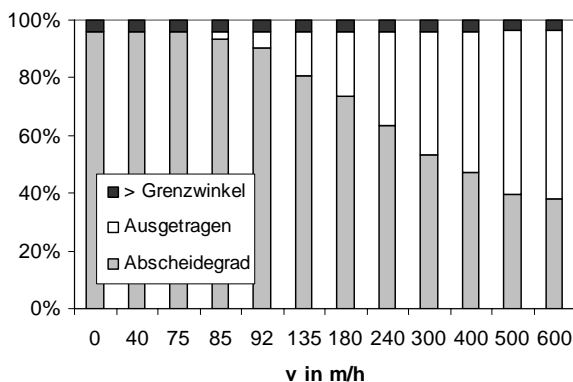


Abb. 4-28: Die nicht ins Konzentrat gelangenden Partikeln treffen entweder in einem Winkel größer als der Grenzwinkel auf die Separatorwand auf oder die Partikeln werden aufgrund zu geringer Aufenthaltszeit im Separator ausgetragen.

#### 4.4.4.5 Einfluss der Partikelgröße auf den Gesamtabscheidegrad

Der Einfluss der Partikelgröße auf den Gesamtabscheidegrad ist in Abb. 4-29 aufgezeigt. Näherungsweise ergibt sich eine quadratische und somit starke Abhängigkeit des Abscheidegrads vom Partikelradius  $b$ . Dies spiegelt die quadratische Abhängigkeit der Relativgeschwindigkeit eines Partikels im Magnetfeld wider, die aus der  $b^3$ -Abhängigkeit der Magnetkraft und der  $b^1$ -Abhängigkeit der hydrodynamischen Widerstandskraft im Stokes-Bereich herrührt.

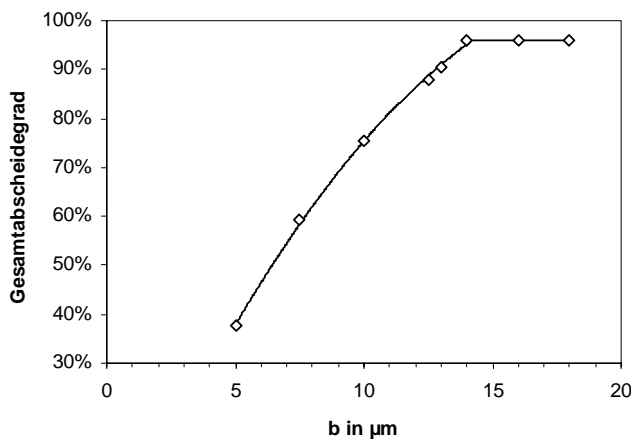


Abb. 4-29: Einfluss der Partikelgröße auf den Gesamtabscheidegrad.

$B_0 = 0.5 \text{ T}$ ,  $v = 100 \text{ m/h}$ ,  $J_{s,d} = 1.7 \text{ T}$ ,

$J_{s,p} = 0.15 \text{ T}$ ,  $\eta = 1 \text{ mPas}$ ,

Berechnungsgitter  $10 \times 10$ .

Punkte berechnet,

Linie gefittet:  $y = y_0 + a \cdot x + b \cdot x^2$  mit  
 $y_0 = -0.133$ ,  $a = 0.117$ ,  $b = 0.028$ ,  
 $R^2 = 0.999$

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Chemikalien

Die Materialien 3-Aminopropyltriethoxysilan (A3640), Iminodiessigsäure (Dinatriumsalz, I7881), Imidazol (I0125), Ethanolamin (E9508), Bradfordreagenz (B6916), N-Bromosuccinimid (B9252), Dimethylsulfoxid (D5879) wurden von Sigma Chemical Co. Ltd. bezogen. Glutardialdehyd (34085-5), 1,4-Butandiol diglycidylether (22089-2), Glycerin 99+% (13487-2) wurden von Aldrich Chemicals bezogen. BSA Albumin (Fraction V, >96%) wurde von Carl Roth GmbH, Deutschland bezogen. Allyl-glycidylether (05959) wurde von Fluka Chemie AG, Deutschland bezogen. Weitere Chemikalien waren von Merck KGaA, Darmstadt. Sämtliche Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

### 5.2 Herstellung von magnetischen IMALT-Mikrosorbentien

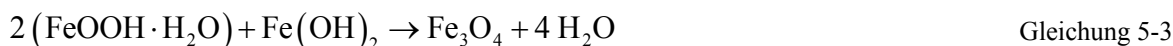
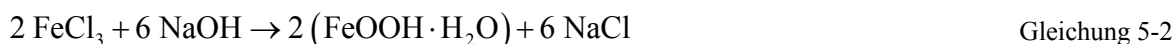
#### 5.2.1 Magnetische Partikelseparation

Magnetische Trägerpartikeln wurden sowohl in allen Präparationsstufen als auch in der Verwendung als Affinitätssorbentien im mL-Maßstab mittels Magnetseparationsracks (Merck KGaA, Darmstadt) wiedergewonnen. Die Racks sind mit Neodym-Eisen-Bor-Permanentmagneten ausgestattet und führen zu einer optisch vollständigen Abscheidung der Magnetpartikeln in einem 2 mL-Reaktionsgefäß innerhalb etwa 2 Minuten. In allen Schritten wurden Abscheidezeiten von 10 Minuten eingehalten.

Für die Herstellung in Suspensionsvolumina oberhalb 2 mL wurde eine Magnetplatte (30×30cm) aus Neodym-Eisen-Bor-Permanentmagneten (Eigenanfertigung) mit einer maximalen Flussdichte an der Oberfläche von 0.6 Tesla verwendet. Um eine irreversible Aggregation der Magnetpartikeln zu vermeiden, wurde stets ein Mindestabstand von 30 mm von der Plattenoberfläche eingehalten.

#### 5.2.2 Herstellung von synthetischem Magnetit (Mm)

Synthetischer Magnetit (Bezeichnung ‚Mm‘) wurde routinemäßig in einem gerührten 5L-Glasreaktor mit einer theoretischen Ausbeute von 154 g hergestellt. Hierzu wurde eine Lösung aus Fe(III)- und Fe(II)-Salzen mit einem molaren Fe(III)/Fe(II)-Verhältnis von 2 durch Zugabe von Natronlauge auf etwa pH 12 gebracht (Welo 1925). Der so hergestellte Magnetit ist aufgrund der schnellen Fällung wenig kristallin und teilweise zu Maghämite oxidiert (Schwertmann 1991) und erreicht deshalb nicht die Sättigungsmagnetisierung von reinem Magnetit. Die folgenden Reaktionsgleichungen zeigen die Magnetitbildung aus einer Mischfällung von Eisen(II)- und Eisen(III)-hydroxid vereinfacht:



Als Nettoreaktion ergibt sich also:



185.3 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  und 360.4 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  wurden in deionisiertem Wasser gemeinsam unter Rühren gemischt und gelöst. Die Lösung wurde in den 5L-Reaktor überführt und unter Rühren mit deionisiertem Wasser auf 4.5 L aufgefüllt. Die rotbraune Lösung wurde unter heftigem Rühren zügig mit 550 mL Natronlauge (11 mol/L) versetzt. Eisen(II)- und Eisen(III)-ionen reagieren spontan mit den zugegebenen Hydroxidionen zu schwarzem Magnetit. Nach 5-minütigem Weiterrühren wurde die Suspension aus dem Reaktor in mehrere Imhoff-Trichter abgelassen. Nach erfolgter Sedimentation der Partikeln wurde der Überstand dekantiert und verworfen und die Partikeln 5-6 mal mit deionisiertem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Überstandes auf etwa 8-9 abgesenkt war. Die Partikeln wurden in einen 5L-Maßkolben überführt, mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und die Konzentration für den Ansatz gravimetrisch ermittelt.

### 5.2.3 Herstellung aminosilanisierter Magnetbeads (MJH)

Aminosilanisierte Magnetbeads wurden routinemäßig in einem Ansatz von 10 g hergestellt. Diese Partikeln vom Typ ‚MJH‘ besitzen einen Kern aus superparamagnetischen Eisenoxidkristallen und eine kovalent gebundene Beschichtung aus einem Aminosilan-Polymer, an das durch weitergehende Aktivierungsreaktionen Liganden gebunden werden können (Whitehead, 1993). Die Eisenoxidkristalle entsprachen in ihren wesentlichen Eigenschaften denen des Typs Mm, stellen also keinen reinen Magnetit dar.

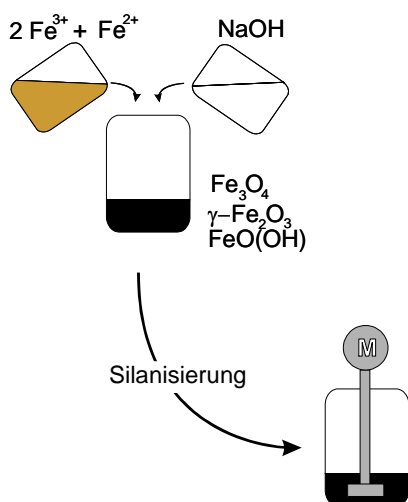


Abb. 5-1: Prinzip der Herstellung aminosilanisierter Magnetpartikeln vom Typ ‚MJH‘

Eine Lösung S1 wurde angesetzt aus 200 mL 0.25 mol/L  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  und 0.5 mol/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Eine Lösung S2 bestand aus 200 mL 5 mol/L NaOH, entsprechend einem 2.5-fachen stöchiometrischen Überschuss. 100 mL deionisiertes Wasser wurde im Becherglas intensiv gerührt und gleichzeitig S1 und S2 zügig eingegossen, worauf sofort schwarzer Magnetit ausfiel. Nach 5-minütigem Rühren wurden die Partikeln durch magnetisches Abscheiden und Zugabe von Wasser gewaschen. Dieser Waschschrift wurde solange wiederholt bis der hohe pH-Wert auf etwa 8 abgesunken war. Zum Schluss wurde mit 1 L Kochsalzlösung (0.2 mol/L) gewaschen. Das Volumen wurde auf 800 mL reduziert und mit 1 L Methanol aufgefüllt. Das Methanol wurde abdekantiert und die Partikeln zwei weitere Male mit Methanol gewaschen. Durch die Methanolwaschungen sollte eine Wasserrestkonzentration von unter 1 % erreicht werden. Die Partikeln wurden schließlich in 250 mL Methanol aufgenommen, und bei 2000 U/min in einem Rotor-Stator-System (Polytron PT6100, Kinematica AG, Schweiz) mit Dispergieraggregat 40 mm (Stator-Außendurchmesser 40 mm, 2-Zähne-Rotor, maximaler Umfangsgeschwindigkeit 36 m/s, Kinematica AG, Schweiz) homogenisiert (vgl. Abb. 5-1). Es wurden 5 mL Eisessig zugegeben, dann 10 mL 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES). Die Mischung wurde 10 Minuten lang bei 13000 U/min homogenisiert. Anschließend wurde für 120 Minuten bei 6000 U/min homogenisiert.

Ein Becherglas wurde mit 200 ml Glycerin gefüllt. Die Partikelsuspension wurde zugegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde unter Stickstoffatmosphäre weitere 12 Stunden bei 110°C gerührt. Das Methanol verdampfte dabei vollständig und die Partikeln wurden in Glycerin überführt. Durch die Behandlung bei hoher Temperatur reagiert APTES mit der Partikeloberfläche wodurch die Partikeln silanisiert und gleichzeitig Aminogruppen eingeführt wurden. Die Mischung wurde anschließend 30 Minuten lang auf 160°C aufgeheizt, wodurch überschüssiges APTES verdampfte. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und 5 mal mit 1 L Wasser gewaschen. Die so erhaltenen „Magnetbeads“ ermöglichen über weitergehende Funktionalisierungsreaktionen eine Immobilisierung von aktiven Gruppen auf der Oberfläche.

#### 5.2.4 PGA-Beschichtung von aminosilanisierten Magnetbeads

Aminogruppen-terminierte Trägerpartikeln MJH wurden mit einer Schicht Polyglutaraldehyd (PGA) beschichtet, analog zur von Halling und Dunnill (1979) beschriebenen Methode (vgl. Abb. 5-2). Obwohl auch Liganden direkt an amino-terminierte Partikeln gekoppelt werden können, erwies sich die Kopplung an PGA-beschichtete Partikeln als deutlich langzeitstabiler (Halling 1980).

10 g silanisierte Partikeln wurden in 1.75 L wässriger 2%-ige (v/v) Glutaraldehydlösung bei Raumtemperatur im Abzug gerührt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH-Lösung (1 mol/L) konstant auf 11 gehalten. Nach Ablauf der Reaktion wurde weitere 60 Minuten weitergerührt. Der Überstand wurde verworfen und die Partikeln vier weitere Male mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die Partikeln wurden zwei weitere Male mit

1.0-molarer NaCl-Lösung und zwei weitere Male mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die Partikeln wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

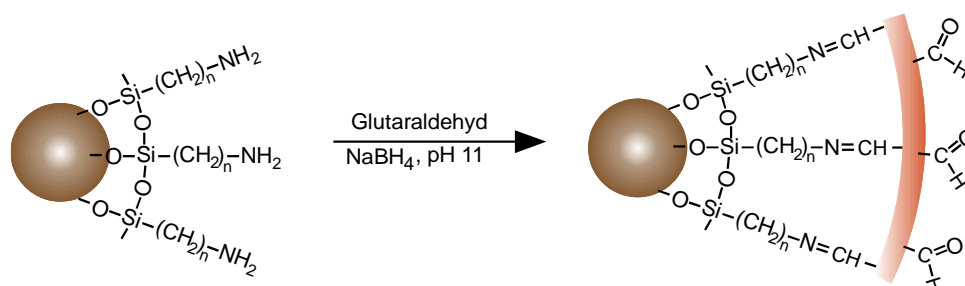


Abb. 5-2: Polyglutaraldehyd-Coating von aminosilanisiertem Magnetit MJH

### 5.2.5 Immobilisierung von Iminodiacetat (IDA) an PGA-beschichtete Magnetpartikeln

Polyglutaraldehyd-beschichtete Magnetpartikeln wurden auf zwei verschiedene Arten mit IDA funktionalisiert. Der Unterschied zwischen den resultierenden Metallchelate-Sorbentien besteht primär in der Aktivierungsschemie und in der Länge des eingeführten ‚Spacer-Arms‘ zwischen Matrixoberfläche und Affinitätsligand (11 bzw. 7 Atome).

#### a) Epoxy-Aktivierung mittels BDE

Das Ziel der Epoxy-Aktivierung ist die Bereitstellung reaktiver Epoxy-Gruppen auf der Partikeloberfläche zur Immobilisierung von Affinitätsliganden.

Gleichzeitig wird ein 11-atomiger Spacer-Arm eingeführt. Verschiedene Methoden zur Epoxidierung von mit PGA beschichteten Partikeln wurden von O'Brien *et al.* (1996) untersucht. Die höchsten Bindekapazitäten für bovines Hämoglobin von 105 mg/g fanden die Autoren bei der so genannten direkten Epoxidierungsmethode. Hierbei geschieht die Reduktion der Aldehyd- zu Hydroxylgruppen und die Addition des homofunktionalen Reagenzes 1,4-Butandiol-Diglycidylether (BDE) nicht nacheinander sondern in einem Schritt. In Folge dessen wurde hier ausschließlich diese direkte Methode angewandt. Als Reduktionsmittel wurde Natriumborhydrid verwendet.

Standardmäßig wurden 25 mg Partikeln in 0.75 mL 1-molarer NaOH mit 1.34 mg/mL NaBH<sub>4</sub> suspendiert. Es wurden 0.75 mL 90% (v/v) BDE zugesetzt und genau 6 Stunden bei Raumtemperatur intensiv geschüttelt (Eppendorf Thermomixer comfort, 1000 rpm). Die Partikeln wurden 8 mal intensiv mit Wasser gewaschen, dann 2 mal mit einem Puffer der 20 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.8 und 1 mol/L NaCl enthielt. Die Kopplung von Amino-terminierten Liganden sollte möglichst umgehend nach der Präparation erfolgen, da die Epoxy-Gruppen in wässrigen Medien hydrolysieren und somit die erreichbare Ligandendichte abnimmt.

Im Anschluss an die Epoxy-Aktivierung wurde der Chelatbildner IDA an die Magnetpartikeln gebunden. Hierzu wurden die Partikeln in einer Lösung aus Dinatrium-IDA (30%

w/v), 0.8 mol/L Natriumcarbonat und 0.6 mg/mL NaBH<sub>4</sub> bei 60°C für 24 Stunden in einem thermostatisierten Mixer (Eppendorf Thermomixer) bei 1000 rpm geschüttelt. Das Reaktionsschema zur Immobilisierung nach Epoxy-Aktivierung ist in Abb. 5-3 dargestellt.

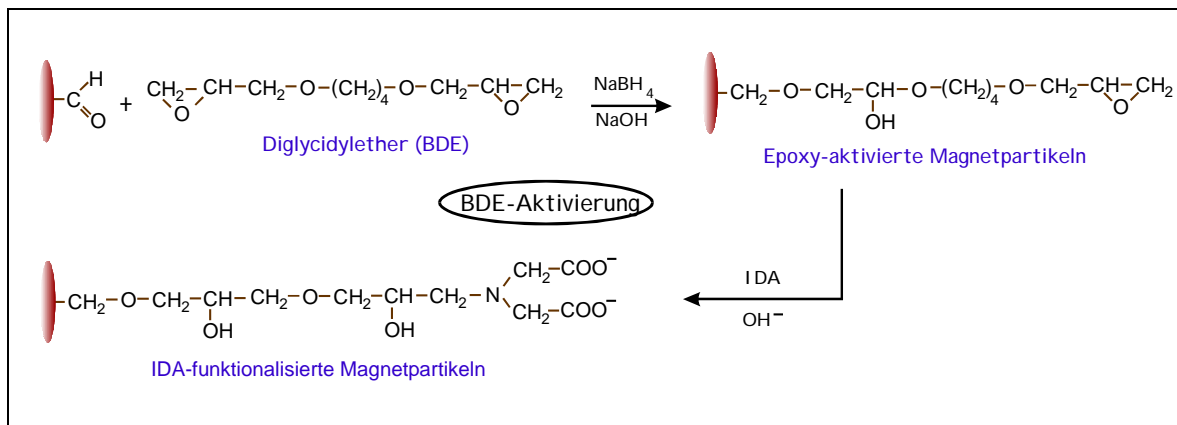


Abb. 5-3: Reaktionsschema zur Immobilisierung von IDA an magnetische Mikropartikeln mittels BDE

### b) Allyl-Aktivierung mittels AGE

In einer weiteren Aktivierungsmethode wurde IDA an Polyglutaraldehyd-beschichtete Partikeln über einen 7-atomigen hydrophilen Spacer-Arm gebunden (Thomas 2002). Die dafür notwendigen Reaktionsschritte umfassten:

- Allyl-Aktivierung unter basischen, reduzierenden Bedingungen: PGA-beschichtete Partikeln (2.2 g) wurden in 120 mL einer Mischung aus 50%(v/v) Allyl-glycidyl-ether (AGE), 75 mmol/L NaOH, 25%(v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) und 11.4 mmol/L NaBH<sub>4</sub> für 48 h bei Raumtemperatur gerührt.
- Bromierung der eingeführten Allylgruppen mit N-Bromo-Succinimid (NBS): Nach intensivem Waschen der Partikeln (10 mal mit Wasser) wurden die AGE-aktivierten Partikeln bromiert durch Rühren in 200 mL NBS (28.1 mmol/L) für 1 Stunde bei Raumtemperatur, so dass eine Bromhydrin-Funktion erhalten wurde. Die Partikeln wurden intensiv gewaschen (4 mal mit Wasser, 3 mal mit Puffer)
- IDA-Kopplung: AGE-aktivierte Partikeln wurden durch nukleophile Substitution der Bromhydrin-Funktion mit IDA gekoppelt. Hierfür wurden die bromhydrin-aktivierten Partikeln (~25 g/L) in 1.75 mol/L IDA, 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsschema zur Immobilisierung mittels AGE ist in Abb. 5-4 gezeigt:

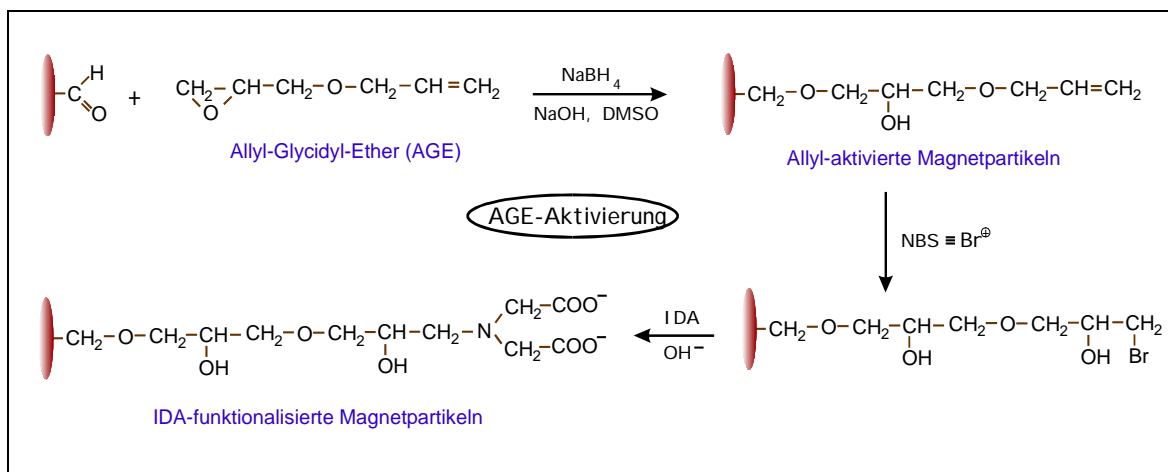


Abb. 5-4: Reaktionsschema zur Immobilisierung von IDA an magnetische Mikropartikeln mittels AGE

Alle IDA-gekoppelten Träger wurden zwei mal mit Wasser gewaschen. Überschüssige reaktive Gruppen wurden durch Resuspendierung in 1-molarer Ethanolamin-Lösung für 48-72 Stunden bei  $4^\circ\text{C}$  "blockiert". Danach wurde überschüssiges Ethanolamin durch dreimaliges Waschen mit Wasser entfernt. Der Träger wurde bis zur Verwendung in wässrigem Phosphatpuffer (20 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 6.8 und 1 mol/L  $\text{NaCl}$ ) bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

### 5.2.6 Epoxy-aktivierte Polyvinylalkohol-Magnetbeads (PVA)

Kommerziell erhältliche Polyvinylalkohol-Magnetbeads (M-PVA) mit Epoxy-Gruppen (Fa. Chemagen, Aachen) wurden ebenfalls untersucht. Diese wurden in Aceton suspendiert in 10 mL-Chargen in einer Konzentration von 50 mg/mL angeliefert und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die Funktionalisierung mit IDA erfolgte wie für BDE-funktionalisierte Magnetpartikeln (vgl. Abschnitt 5.2.5).

### 5.2.7 Synthese von magnetischen Polymermikropartikeln (PMA, PMMA und PVAc) durch Emulsionspolymerisation

#### 5.2.7.1 Herstellung eines magnetischen Gels

In einem 1L Erlenmeyerkolben, der mit einer Heizplatte, Flügelrührer und Stickstoffanschluss versehen war, wurde eine Mischung aus Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat (8.6g), Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat (23.5 g) bei  $70^\circ\text{C}$  in 500 mL deionisiertem Wasser unter Rühren gelöst und ständig unter Stickstoffatmosphäre gehalten. 30 mL Ammoniaklösung (25% w/v) wurde schnell und unter intensivem Rühren zugegeben. Sofort wurde über eine Bürette langsam Ölsäure zur Magnetitsuspension zugegeben bis ein klarer Überstand gebildet war. Die Zugabe dauerte etwa 10 min und die zugegebene Menge an Ölsäure betrug etwa 10-12 mL. Anschließend wurde die Suspension für 25 min auf  $90^\circ\text{C}$  erhitzt.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Überstand dekantiert und das schwarze magnetische Gel wurde 5 mal mit deionisiertem Wasser gewaschen.

### 5.2.7.2 Herstellung eines magnetischen Fluids

Zur Herstellung eines stabilen *öl-basierten* magnetischen Fluids wurden 3 g des magnetischen Gels in einem organischen Lösungsmittel (z.B. 20 mL Hexan) unter Rühren aufgelöst.

Zur Herstellung eines stabilen *wasser-basierten* magnetischen Fluids wurden Ammoniak (25%) oder ein Tensid (wie Ölsäure oder Natriumdodecylsulfat, SDS) langsam zu der Mischung aus magnetischem Gel (3g) und Wasser (50mL) unter Rühren und Beheizen auf 50°C zugegeben bis das magnetische Gel sich komplett gelöst hatte. Zur Kontrolle wurde ein NdFeB-Permanentmagnet für 1 min über die Lösung gehalten. Hierbei darf keine Separation von Partikeln von der Lösung auftreten, so dass ein stabiles magnetisches Kolloid in wässriger Phase gewonnen wurde.

### 5.2.7.3 Emulsionspolymerisation

Zur Herstellung der *Wasserphase* wurden in einen zylindrischen 1L 4Hals-Glasreaktor, der mit Strombrechern, Heizplatte, Flügelrührer und Rückflusskühler, Thermometer und Stickstoffbegasung ausgestattet war, 5 g Polyvinylalkohol als Stabilisator (PVA,  $M=22000$  g/mol, Hydratationsgrad 88%) in 500mL Wasser bei 60°C aufgelöst und intensiv für 30min gerührt.

Für die *Ölphase* wurden 10 g des magnetischen Gels in der Mischung aus 90 mL hydrophobem Monomer und 10-20 mL Crosslinker (55% Divinylbenzol) durch Rühren bei Raumtemperatur suspendiert, so dass ein öl-basiertes magnetisches Fluid gebildet wurde.

Die Öl-in-Wasser-Emulsion wurde durch Mischen und intensives Rühren der beiden Phasen bei 60°C gewonnen. Die Emulsionspolymerisation wurde im gleichen Glasreaktor durchgeführt. Der wasserlösliche Inhibitor Methylenblau (10 mg) und der öllösliche Initiator Benzylperoxid (8g, BDO) wurden bei 60°C zur Emulsion zugegeben und anschließend für 4 Stunden bei 80°C und 2 weitere Stunden bei 90°C intensiv unter Stickstoff gerührt. Nach der Polymerisation wurden die magnetischen Polymermikropartikeln durch magnetische Separation abgetrennt und mehrfach mit Ethanol und heißem Wasser gewaschen.

### 5.2.7.4 Funktionalisierung der emulsionspolymerisierten Magnetbeads

#### a) PMMA Magnetbeads

Zur Durchführung einer Esteraustauschreaktion wurden 5 g magnetische PMMA-Mikropartikeln in 100 mL Ethylenglykol resuspendiert, 1 g Natriummethanolat ( $\text{CH}_3\text{ONa}$ ) wurde als Katalysator zugegeben und unter Unterdruck für 8 Stunden bei 90°C gerührt.



Zur Epoxyaktivierung wurden 5 g der nun hydroxyl-terminierten Partikeln zu 100 mL einer Reaktionsmischung aus 50 mL Epichlorhydrin, 50 mL Dimethylformamid (DMF) oder Aceton und 1 g NaOH gegeben. Die Reaktion wurde bei 35°C für 24 Stunden ausgeführt.

Zur Kopplung von Iminodiessigsäure (IDA) wurden 5 g epoxy-aktivierte Magnetpartikeln zu einer wässrigen Lösung zugegeben, die aus 10 g IDA und 0.5 g NaOH bestand. Die Reaktionsmischung wurde für 8 Stunden bei 70°C gehalten.

#### **b) PVAc Magnetbeads**

In einer Alkoholysereaktion wurden 5 g magnetischer PVAc-Mikropartikeln in einer Reaktionsmischung aus 96 mL Ethanol, 6 mL Wasser und 15 g NaOH resuspendiert. Die Mischung wurde 6 Stunden bei 50°C gerührt.

Die weiteren Funktionalisierungsschritte zur Kopplung von IDA entsprechen den Schritten der PMMA-Partikeln.

#### **b) PMA Magnetbeads**

In einer Ammonolysereaktion wurden 5 g magnetischer PMA-Mikropartikeln in 100 mL Ethylendiamin für 8 Stunden bei 100 °C gerührt.

Über eine IDA-Synthesereaktion wurden im Anschluss 5 g der nun aminotermi- nierten PMA-Partikeln in 100 mL wässriger Lösung resuspendiert, die 20 g des Natriumsalzes von Chloressigsäure und 1 g NaOH enthielt. Die Reaktionsmischung wurde für 8 Stunden bei 60 °C gehalten.

### **5.2.8 MagPrep Silica Partikeln**

Magnetische ‚MagPrep Silica‘ Partikeln wurden von der Firma Merck KGaA (Darmstadt) zur Verfügung gestellt. Genaue Informationen zur Herstellung liegen nicht vor. Bekannt ist, dass ihr Durchmesser zwischen 0.5 und 5µm liegt und sie zu 80% aus Eisenoxid bestehen. Sie werden benutzt, um DNA und RNA an sich zu binden und dadurch aufzureinigen, da sie aufgrund ihrer Silica-Oberflächenbeschichtung dafür sehr gut geeignet sind. 10µL einer Suspension dieser Partikel ( $c = 50 \text{ mg/mL}$ ) binden 2 µg DNA an sich.

### **5.2.9 Beladung von IDA-funktionalisierten Magnetpartikeln mit Cu(II)-Ionen**

Aufgrund der stets in der Pufferlösung vorhandenen hohen NaCl-Konzentration liegt die chelatbildende IDA-Gruppe nach der Präparation in der  $\text{Na}^+$ -Form vor. Zur Erzeugung eines für Histidin-Reste selektiven Sorbens, muss der Träger mit zweiwertigen Metallionen beladen werden. Im Rahmen der Arbeit wurden ausschließlich Kupferionen zur Beladung des IDA-Supports verwendet, da diese in vielen Untersuchungen bessere Bindecharakteristika als Ni- und Zn-Ionen aufwiesen (vgl. Kapitel 2.4.6).

Die Trägerpartikeln wurde durch magnetisches Abtrennen vom Lagerpuffer befreit, gewaschen und in 0.1 mol/L Natriumacetatpuffer pH 3.8 mit 1 mol/L NaCl überführt.

10 mg Trägerpartikeln wurden durch Resuspendierung in 1.5 mL 0.1-molarer Natriumacetatlösung, pH 3.8, 1 mol/L NaCl, 5 mg/mL  $\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (21 mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$ ) mit Kupferionen beladen. Zur Einstellung des Gleichgewichts wurde die Suspension 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Der beladene Träger wurde drei mal mit dem entsprechenden Kupfer-freien Acetatpuffer gewaschen um nichtgebundene Kupferionen zu entfernen. Vor dem Einsatz wurde der Träger in 20 mmol/L Natriumphosphatpuffer pH 6.8 mit 1.0 mol/L NaCl überführt. Kontrollversuche wurden stets der gleichen Prozedur unterzogen, wobei keine Kupferionen zugesetzt wurden.

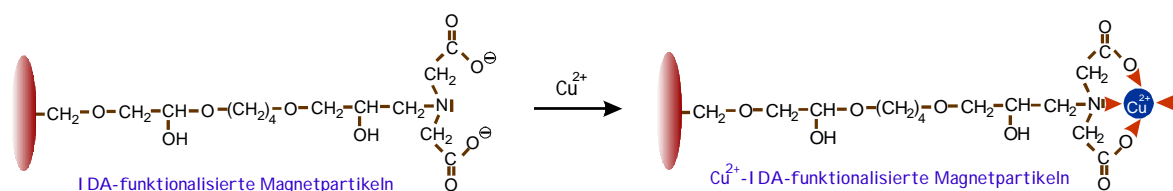


Abb. 5-5: Beladung von IDA-Supports mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen (am Beispiel BDE-funktionalisierter Magnetpartikeln)

### 5.3 Partikeleigenschaften

Für Immobilisierungs-, Sorptions- und Separationsversuche wurden jeweils unterschiedliche magnetische Mikropartikelarten untersucht. Einige Partikelarten wie "Mm" sind für eine Immobilisierung und Sorption nicht direkt zugänglich, da sie keine modifizierbaren Oberflächengruppen aufweisen. Sie stellen allerdings hinsichtlich ihres magnetischen Separationsverhaltens – wie im Folgenden noch dargestellt – eine gute Modellsubstanz für viele kommerziell erhältliche "Magnetbeads" dar, die aus Kostengründen oder des bisher nicht gelösten Upscalings der Herstellung nicht für eine halotechnische Magnetseparationsanlage verwendet werden konnten. In Tab. 4-1 sind die verwendeten Partikelsorten aufgelistet. Im Folgenden werden die Partikeln eingehender charakterisiert, um eine Ausgangsbasis für eine Modellierung der Magnetseparation zu erhalten.

Tabelle 5-1: Verwendete Magnetpartikeln

<i>Bezeichnung</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
Mm	Synthet. Magnetit, hergestellt durch Mischen von $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , NaOH
MJH	superparamagnetischer Magnetit, silanisiert mit 3-APTES
MJH-PGA	MJH, Polyglutaraldehyd gecoatet
M-PVA	Superparamagnetische Polyvinylalkohol-Partikeln der Fa. Chemagen
Silica	Silica-Magnetit-Einkristalle der Fa. Merck KGaA

### 5.3.1 Größe, Form und spezifische Oberfläche der Partikeln

Um einen Eindruck über Partikelgröße und Form zu gewinnen, wurden licht- und rasterelektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Abb. 5-6 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme PGA-beschichteter MJH-Partikeln und eine REM-Aufnahme eines Einzelpartikels. Die enge Partikelgrößenverteilung und die aus Einzelkristallen aufgebaute Struktur der Partikeln sind gut zu erkennen. In Abb. 5-7 zeigt sich dagegen der deutlich erhöhte Feinanteil des nicht-agglomerierten synthetischen Magnetits Mm gegenüber den beschichteten MJH-Partikeln in Abb. 5-8. Die emulsionspolymerisierten Magnetpartikeln sind durchweg sphärisch, wie man am Beispiel der PVA-Partikeln in Abb. 5-9 erkennt. Die Silica Magnetit-Partikeln der Firma MERCK (Abb. 5-10) sind oktaedrisch geformte Magnetiteinkristalle mit deutlich größerer Kristallitgröße ( $\sim 300$  nm) als die selbst erzeugten synthetischen Magnetite ( $\sim 10$  nm). Die Kristallitgröße von etwa 10 nm für Mm- und MJH-Partikeln ergibt sich dabei nicht aus REM-Aufnahmen, sondern aufgrund der superparamagnetischen Eigenschaften dieser Partikeln (siehe Abschnitt 5.3.4). Die sich aus der Partikelgröße und Oberflächenstruktur ergebenden Eigenschaften werden nachfolgend genauer diskutiert.

Für einige Partikeln wurden die spezifischen Oberflächen durch Stickstoffadsorption nach der Methode von Haul und Dümbgen (Haul 1975) ermittelt. Partikeln vom Typ Mm wiesen eine Oberfläche von  $56 \text{ m}^2/\text{g}$  auf. Partikeln vom Typ ‚MJH‘ wiesen je nach Präparationsstufe eine Oberfläche von 93 (nach der Fällung), 123 (nach der Silanisierung) und  $110 \text{ m}^2/\text{g}$  nach der PGA-Beschichtung auf. Durch den Homogenisierungsschritt wird die Oberfläche also trotz gleichzeitig stattfindender Agglomeration vergrößert, durch die PGA-Beschichtung allerdings wieder etwas reduziert. Durch die stärkere Übersättigung im Fällungsschritt der MJH-Partikeln im Vergleich zu den Mm-Partikeln werden kleinere Primärkristalle und somit höhere Oberflächen gebildet. Alle Partikeln weisen eine deutliche höhere spezifische Oberfläche auf als kommerziell erhältlicher Magnetit mit 1.8 (Aldrich Chemicals) und Magnetit aus einer natürlichen Lagerstätte von  $4.9 \text{ m}^2/\text{g}$ .

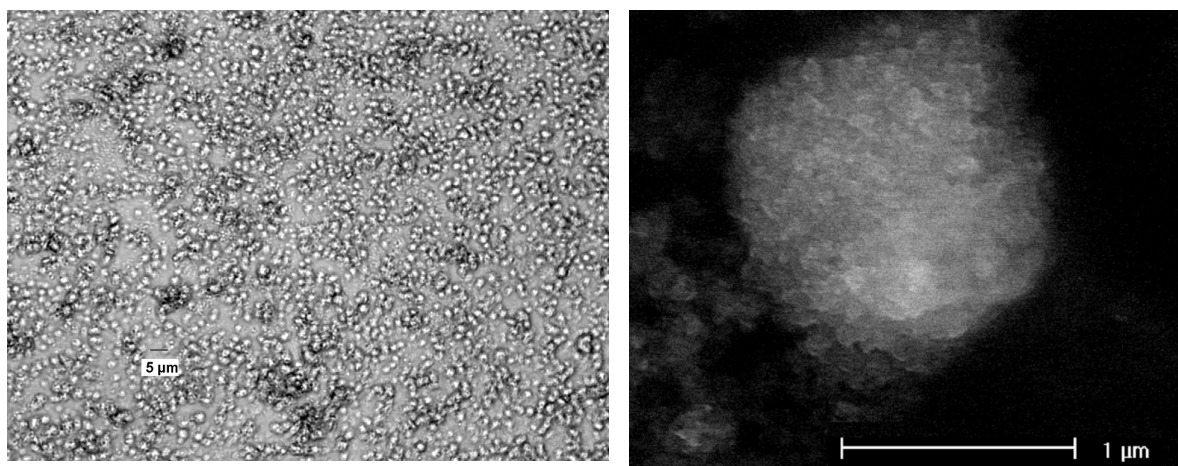


Abb. 5-6: Lichtmikroskopische Aufnahme der MJH-Partikeln (links) und elektronenmikroskopische Aufnahme eines MJH-Einzelpartikels (rechts).

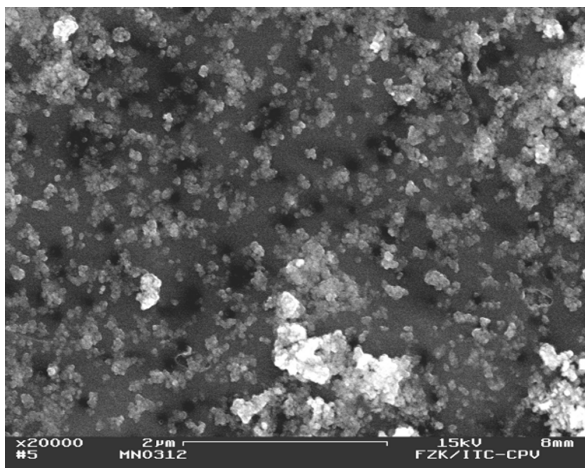


Abb. 5-7: Mm-Partikeln (REM)

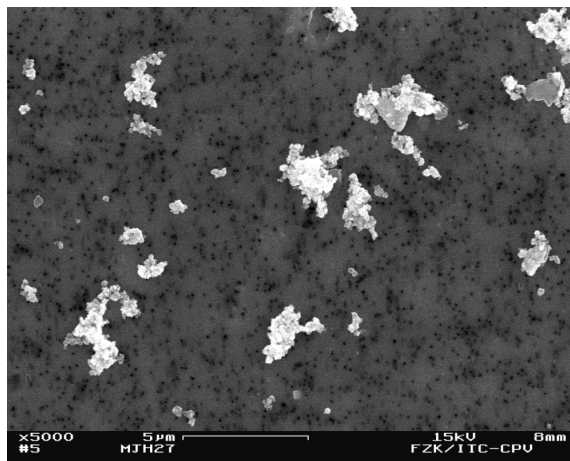


Abb. 5-8: MJH-Partikeln (REM)

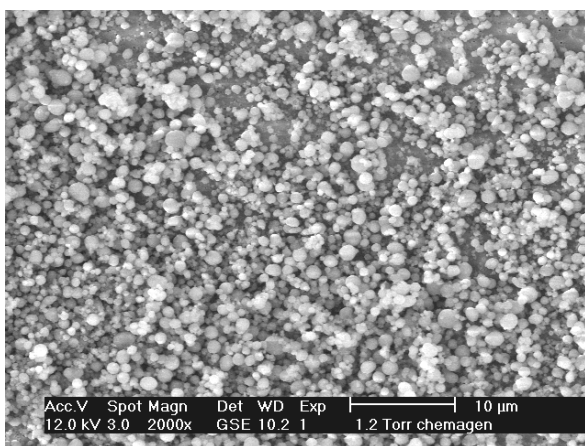


Abb. 5-9: Chemagen M-PVA-N12 (REM)

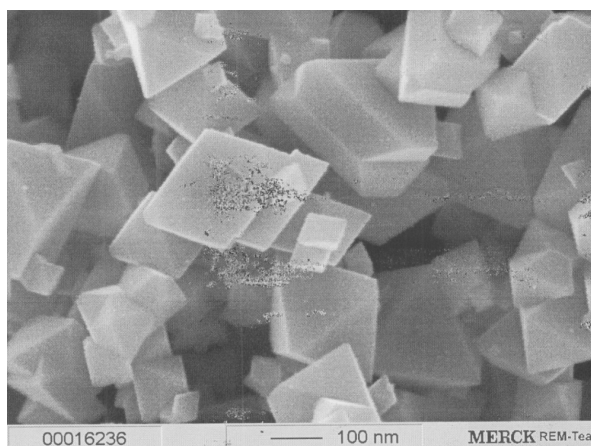


Abb. 5-10: MERCK MagPrep Silica-Partikeln (REM)

### 5.3.2 Sedimentationsmessungen

Um eine besser quantifizierbare Aussage hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung zu gewinnen, wurde ein Verfahren entwickelt, um die Sedimentationsgeschwindigkeit in 3 mL-Photometerküvetten verfolgen zu können.

Bernhardt (1990) liefert unter Annahme eines über den Größenbereich hinweg konstanten Extinktionskoeffizienten eine einfache Beziehung für die Oberflächenverteilung. Da die in dieser Arbeit verwendeten Mikropartikeln stets relativ enge Partikelgrößenverteilungen aufweisen (gilt für "Mm" eingeschränkt), erscheint die Annahme eines konstanten Extinktionskoeffizienten gerechtfertigt. Zur Kontrolle wurden Messungen durch Laserbeugung (LALLS) durchgeführt und hinreichend genaue Übereinstimmungen gefunden. Für konstante Extinktionskoeffizienten gilt:

$$Q_2(x) = \frac{\ln(I_\infty / I(t))}{\ln(I_\infty - I_0)} = \frac{E(t) - E_\infty}{E_0 - E_\infty} \tag{Gleichung 5-5}$$

Aus der Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Extinktion, z.B. bei 500 nm, kann also die Verteilungsfunktion des Flächenäquivalentdurchmessers ermittelt werden. Da die

Sedimentationszeiten für Partikeln unterhalb 0.5  $\mu\text{m}$  sehr groß werden (>18 h), konnten nur Partikelgrößen oberhalb etwa 0.5  $\mu\text{m}$  erfasst werden. Die Sedimentationsmessungen wurden für jede Partikelsorte einmal mit unmagnetisierten Partikeln und einmal mit 1 Tesla aufmagnetisierten Partikeln gemessen. Die gewonnenen Größendichteverteilungen sind in Abb. 5-11 dargestellt.

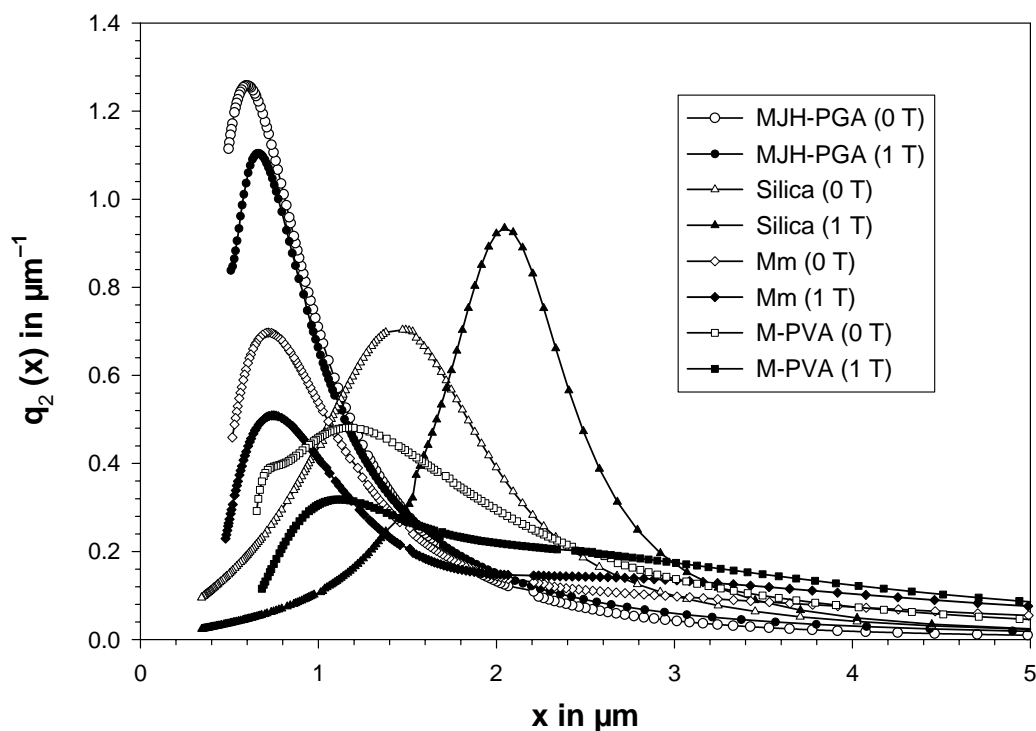


Abb. 5-11: Partikelgrößen-Dichteverteilungen des Flächenäquivalentdurchmessers verschiedener Magnetpartikeln; mit und ohne Vormagnetisierung; Partikelkonzentration 30 mg/L; Suspensionsvolumen 3.0 mL in 0.1 mol/L Natriumphosphatpuffer; pH 7.0 bei 25.0 °C; Sedimentationsweg 15 mm

Ausgehend von den Verteilungsfunktionen wurden Kenngrößen der Verteilung ermittelt. Diese sind im Wesentlichen der Sauter-Äquivalentdurchmesser bzw. die daraus ableitbare spezifische Oberfläche des Partikels und die Verteilungsbreite bzw. Varianz der Verteilung. Es gelten folgende Zusammenhänge:

$$M_{k,2} = \sum_v \bar{x}_v^k q_2(\bar{x}_v) \Delta x_v \quad \text{Gleichung 5-6}$$

$$s^2 = \sum_v (\bar{x}_v - \bar{x}_{1,2})^2 q_2(\bar{x}_v) \Delta x_v = M_{2,2} - M_{1,2}^2 \quad \text{Gleichung 5-7}$$

Der Sauter-Äquivalentdurchmesser  $M_{1,2}$  gibt den Durchmesser einer oberflächengleichen Kugel an. Für die spezifische Oberfläche gilt:

$$S = \frac{6}{\rho_p \cdot M_{1,2}} \quad \text{Gleichung 5-8}$$

Insbesondere für die Silica-Partikeln zeigt sich nach einmaligem Aufmagnetisieren eine Verschiebung des Maximums der Verteilungsdichtefunktion  $x_{\max}$  um 40% hin zu größeren Partikelgrößen, was auf eine irreversible Agglomeration hinweist.

Tabelle 5-2: Parameter der Größenverteilungen für unmagnetisierte und aufmagnetisierte Partikeln aus Sedimentationsmessungen; die Werte in Klammern wurden aus LALLS-Laserbeugungsmessungen (MALVERN Mastersizer) gewonnen.

Partikelsorte	Magneti- sierungsfeld	$x_{\max}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$M_{1,2}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$\sigma^2$ [ $\mu\text{m}^2$ ]	S [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]
Mm	0 T	0.72 (1.50)	2.5 (2.3)	5.1	0.68
	1 T	0.75 (2.00)	3.1 (3.5)	5.8	0.56
MJH-PGA	0 T	0.60 (2.65)	1.3 (3.5)	1.2	1.66
	1 T	0.66	1.5	1.8	1.43
Silica	0 T	2.21	2.3	3.5	0.53
	1 T	3.05	2.8	2.9	0.43
M-PVA N12	0 T	1.17	2.5	3.5	1.31
	1 T	1.12	3.4	5.1	0.98

### 5.3.3 pH-Wert-Einfluss auf die Sedimentationsgeschwindigkeit

Für polyglutaraldehyd-beschichtete MJH-Beads wurde der Einfluss des pH-Wertes bei konstanter Temperatur und Ionenstärke auf die Sedimentationsgeschwindigkeit untersucht. Hieraus kann eine unter Umständen auftretende Aggregation der Partikeln durch Neutralisation der Oberflächenladungen erkannt werden. pH-Bereiche bei denen eine Aggregation auftritt, sind für den Sorptions- und Elutionsvorgang zu meiden, da die Partikeln fein dispergiert vorliegen sollen, um eine maximale spezifische Oberfläche zu erreichen.

In Abb. 5-12 wurde die gemessene Extinktion bezogen auf die Extinktion zum Zeitpunkt null bei 500 nm Wellenlänge und einer Partikelkonzentration von 30 mg/L in 0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7.0 bei 25.0°C dargestellt. Wie zu erkennen, unterscheidet sich das Sedimentationsverhalten auch über lange Zeiträume von bis zu 18 Stunden kaum voneinander. Nur bei pH 5.0 tritt vermutlich eine geringe Agglomeration ein. Da Proteine häufig im sauren pH-Bereich vom Träger eluiert werden, kann durch eine Partikelaggregation unter Umständen die Elutionseffizienz verschlechtert werden. Dies sollte von Fall zu Fall überprüft werden und gegebenenfalls eine andere Elutionsmethode, z.B. eine Affinitätselution, gewählt werden.

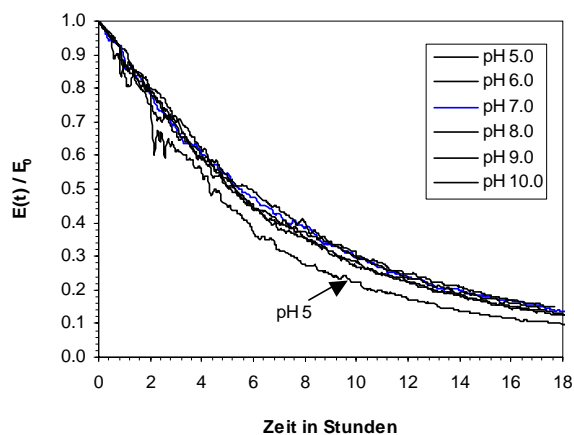


Abb. 5-12: Sedimentation von MJH-PGA-Partikeln mit einer Partikelkonzentration von 30 mg/L. Suspensionsmedium: 0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7.0; 25°C; Messwellenlänge 500 nm

### 5.3.4 Magnetische Eigenschaften

Die Partikelmagnetisierungen in Abhängigkeit der angelegten Feldstärke wurden mit einem Alternating-Gradient Magnetometer (AGM) gemessen (Typ. Micromag 2900, Fa. Princeton, NJ, USA).

MERCK MagPrep Silica Partikeln sind ausgesprochen gut magnetisierbar. Die Sättigungsmagnetisierung liegt mit  $89 \text{ Am}^2/\text{kg}$  nahe am Literaturwert für reinen Magnetit ( $92\text{--}93 \text{ Am}^2/\text{kg}$  nach Svoboda (1987) und gemessene Mössbauerspektren (Ergebnisse nicht dargestellt) zeigen, dass es sich um nahezu reinen Magnetit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  handelt. Hinsichtlich der Separationseffizienz sollten diese Partikeln also ideale Eigenschaften aufweisen. Diese Silica-gecoateten Partikeln weisen sogar eine höhere Magnetisierung auf als der untersuchte kommerzielle Magnetit (Fa. Aldrich, WI, USA) mit  $84 \text{ Am}^2/\text{kg}$  und einer Remanenz von 22 % der Sättigungsmagnetisierung.

Jedes einzelne Partikel besteht, wie auf den REM-Aufnahmen zu erkennen, aus einem einzigen oktaedrischen Kristalliten. Aufgrund dieser vergleichsweise großen Kristallitgröße weisen die Partikeln eine hohe Remanenz von bis zu 33 % der Sättigung auf (siehe Abb. 5-13). Diese Eigenschaft erweist sich als ausgesprochen ungünstig für die Wiederverwendung der Partikeln, da sie nach dem Aufmagnetisieren irreversibel magnetisch aggregieren und an nutzbarer Oberfläche verlieren. Außerdem wird die Abreinigung einer HGMS-Matrix durch die magnetische Wechselwirkung zwischen Matrix und abgeschiedenen Partikeln deutlich erschwert.

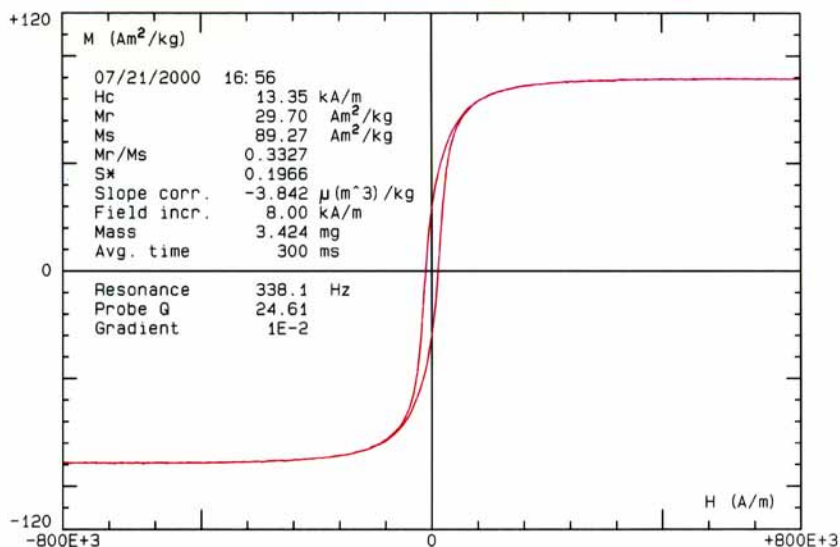


Abb. 5-13: Magnetisierungskurve für Merck MagPrep Silica Beads

Für die selbst hergestellten silanisierten und polyglutaraldehyd-beschichteten Magnetitpartikeln MJH-PGA ergibt sich ein grundlegend verschiedenes Bild. Wie in Abb. 5-14 zu erkennen, beträgt die Sättigungsmagnetisierung nur knapp 40 % des reinen grobkristallinen Magnetits. Der geringere Wert kann durch deutlich geringere Kristallitgröße von nur wenigen Nanometern, aber auch durch Beimengungen an anderen Eisenoxiden, insbesondere Maghämmit, herrühren. Obwohl der Durchmesser des Magnetpartikels im Mikrometerbereich liegt, konnten die superparamagnetischen Eigenschaften, die nur unterhalb einer kritischen Partikelgröße von wenigen Nanometern auftreten, erhalten werden. Die Verbundpartikeln weisen keine (messbare) remanente Magnetisierung auf, was sowohl für die Wiedergewinnung der Partikeln nach der Magnetseparation als auch für die Wiederverwendung als Sorbens nach der Aufmagnetisierung von essentieller Bedeutung erscheint.



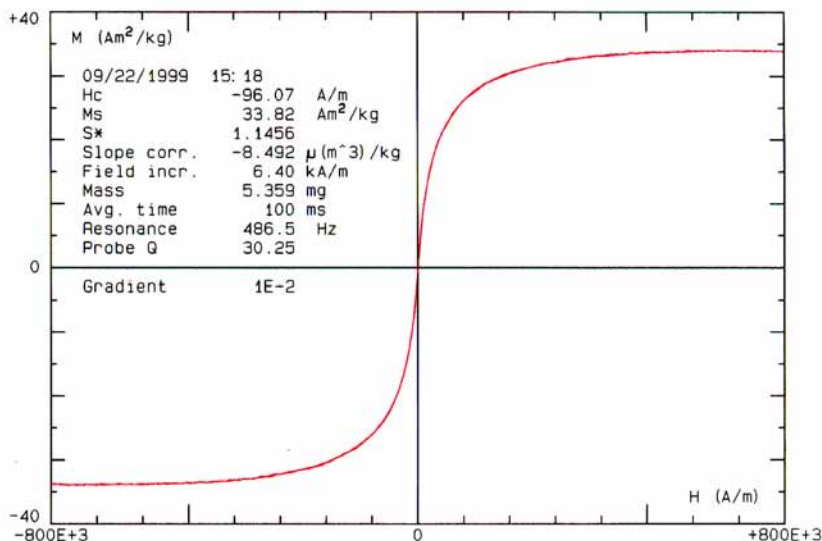


Abb. 5-14: Magnetisierungskurve für superparamagnetische Magnetpartikeln MJH-PGA

Da die superparamagnetischen Partikeln bisher nur im Produktionsmaßstab weniger Gramm herzustellen sind, wurde für Separationsversuche im halbtechnischen Maßstab nach einer Modellsbstanz gesucht, die ähnliche magnetische und hydrodynamische Eigenschaften aufweist wie diese so genannten "Magnetbeads".

Durch Mischen von Eisen(II) und Eisen(III)-salzen und Zugabe von Natronlauge gelang es reproduzierbar Magnetit in einem Suspensionsvolumen von 5 L und einer Ausbeute an Magnetpartikeln von 150 g zu erzeugen, die ähnliche Eigenschaften aufweisen wie Magnetbeads auf anorganischer oder Polymerbasis. Die Partikeln besitzen eine Restremanenz von etwa 1%, das für einen verfahrenstechnischen Einsatz als hinreichend gering erachtet werden kann. Die Verwendung dieser mit "Mm" bezeichneten Partikeln lässt eine "worst case" - Abschätzung zu, da die Partikelgrößenverteilung breiter ist, ein höherer Feinanteil vorliegt und die Remanenz höher ist als für "echte" Magnetbeads. Die Sättigungsmagnetisierung liegt hingegen auf ähnlichem Niveau wie handelsübliche Magnetbeads.

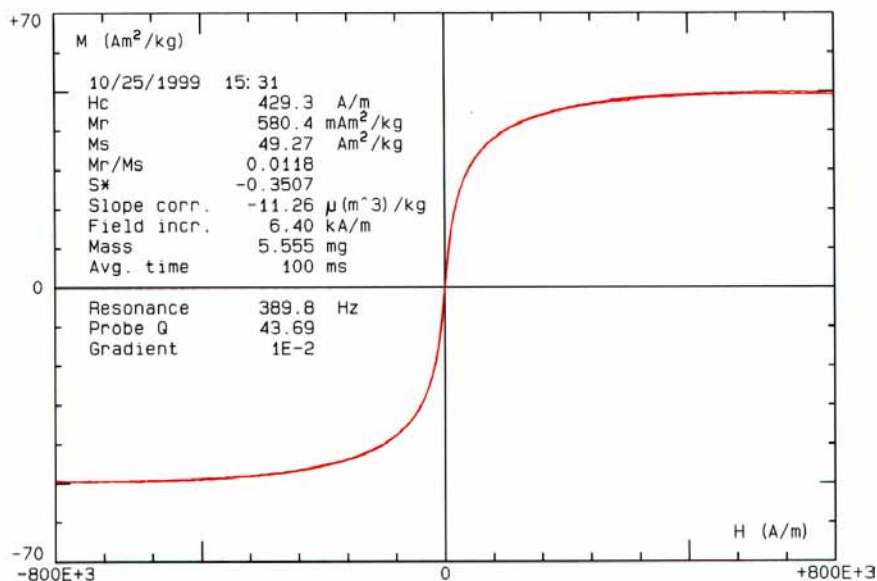


Abb. 5-15: Magnetisierungskurve für ferrimagnetischen synthetischen Magnetit Mm

### 5.3.5 Zusammenfassung der Partikeleigenschaften

Die wichtigsten Partikeleigenschaften der untersuchten magnetischen Mikropartikel auf Magnetit-Basis sind in Tabelle 5-3 zusammengefasst.

Tabelle 5-3: Zusammenfassung wichtiger Partikeleigenschaften der untersuchten Magnetbeads

Funktion	Einheit	Mm	MJH	MJH-PGA	M-PVA	Silica
Produktionsansatz		150g	10g	10g	500 mg	50 mg VE
$M_s$	$\text{Am}^2/\text{kg}$	49.3	33.8	33.8	42.8	89.3
$M_r/M_s$	–	0.012	–	–	0.010	0.297
$d_p (x_{1,2})$	$\mu\text{m}$	1.70	2.20	2.75	1–2	0.2
Dichte	$\text{kg}/\text{m}^3$	3500	2800	2800	1800	5000
S (BET)	$\text{m}^2/\text{g}$	56	123	110	n.b.	20
Aminierungsgrad	$\mu\text{mol}/\text{g}$	–	100	–	60	–
$q_{\text{mon}}$ (Protein)	$\text{mg}/\text{g}$	–	~100	~100	3-15	–
q (Plasmid-DNA)	$\text{mg}/\text{g}$	–	–	–	–	~50

### 5.4 Verwendete Modellproteine

Als Modellproteine für die Charakterisierung der Sorption an die hergestellten magnetischen Affinitätsorbentien wurden Rinder-Hämoglobin (Hb),  $\alpha$ -Chymotrypsinogen aus Rinderpankreas (Chy) und ein selbst fermentiertes und in *E.coli* exprimiertes rekombinantes Grün-Fluoreszierendes Protein (GFP) verwendet. Nähere Einzelheiten zu den verwendeten Proteinen und die verwendeten Bestimmungsmethoden finden sich im Anhang der Arbeit.

## 5.5 Bestimmung von Sorptionsisothermen

Alle Proteinlösungen wurden in Binde-/Equilibrierpuffer (20 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mol/L NaCl, pH 6.8) bei Raumtemperatur angesetzt.

### 5.5.1 Beladung mit Metallionen

Zur Beladung mit Metallionen wurden die Metallchelate-Trägerpartikeln zunächst magnetisch abgetrennt und der überstehende Aufbewahrungspuffer verworfen. Die Partikeln wurden in Natriumacetatpuffer (0.1 mol/L Natriumacetat, 1 mol/L NaCl, pH 3.8) resuspendiert. Nach Magnetseparation wurden die Partikeln in dem gleichen Natriumacetatpuffer resuspendiert, der zusätzlich 20.6 mmol/L CuCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O enthielt. Als Kontrolle wurden parallel Partikeln nicht mit Kupfer beladen und stattdessen erneut mit dem Natriumacetatpuffer versetzt. Die Partikeln wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Partikeln 3 mal mit Wasser gewaschen und schließlich mit Bindepuffer equilibriert.

### 5.5.2 Sorption von Protein

Zur Sorption von Protein wurden jeweils 1.5 mL Proteinlösung unterschiedlicher Konzentration zu je 1-2 mg Partikeln gegeben. Die Partikeln wurden intensiv resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Partikeln wurden danach magnetesepariert und der Überstand auf Protein analysiert. Die Menge an gebundenem Protein wurde aus der Differenz von zugegebenem und überstehendem Protein errechnet. Wenn möglich wurden Adsorptionsisothermen gezeichnet. Im Bereich geringerer Gleichgewichtskonzentrationen konnte vielfach ein Sorptionsverhalten nach Langmuir zur Beschreibung der Gleichgewichtsbeladung verwendet werden:

$$q^* = \frac{q_{\max} \cdot c^*}{K_d + c^*} \quad \text{Gleichung 5-9}$$

Bei höheren Gleichgewichtskonzentrationen wurde eine Mehrschichtadsorption ("multi-layer-binding") beobachtet. Um diesen Bereich mathematisch beschreiben zu können, wurde die Sorptionsisotherme nach Brunauer-Emmett-Teller (BET) verwendet:

$$q^* = \frac{q_{\text{mon}} \cdot K \cdot c_{\max} \cdot c^*}{(c_{\max} - c^*)(c_{\max} - c^* + K \cdot c^*)} \quad \text{Gleichung 5-10}$$

### 5.5.3 Elution gebundenen Proteins

Zur Elution des gebundenen Proteins wurden die Partikeln zwei mal mit Bindepuffer gewaschen, um ungebundenes oder nur schwach gebundenes Protein zu entfernen. Die Waschüberstände wurden auf Protein analysiert. Schließlich wurde als Elutionsmittel 100 mmol/L Imidazolpuffer pH 7.0 mit 1 mol/L NaCl zugegeben, die Partikeln resuspendiert und 30 min lang geschüttelt. Dieser Schritt wurde 1-2 weitere Male durchgeführt. Die Elutionsüberstände wurden auf Protein untersucht.

## 5.6 Magnetseparation

### 5.6.1 Bestimmung der Partikelkonzentration

#### *Gravimetrische Bestimmung*

Zur gravimetrischen Bestimmung der Gesamtpartikelkonzentration wurde ein definiertes Volumen der zu messende Suspension unter Wasserstrahlvakuum durch Membranfilter aus Cellulosenitrat mit 0.45 µm Porenweite filtriert. Aus der Differenz der leeren Filtermasse und der Masse des luftgetrockneten beladenen Filters wurde die Partikelmasse der Probe bestimmt. Keine der filtrierten Proben zeigte ein Durchbruch durch diese Filter, während Filter mit 0.8 µm Porenweite, die versuchsweise verwendet wurden, für Partikeln vom Typ „Mm“ einen Feinanteil ins Filtrat entließen. Dies wurde durch Braunfärbung sichtbar.

#### *Nephelometrische Bestimmung*

Um eine genauere zeitliche Auflösung des Durchbruchverhaltens bei der HGMS bzw. der Filtratkonzentration bei der OGMS zu erhalten, wurde zusätzlich zu den gravimetrischen Proben kontinuierlich die Trübung des Filtrats gemessen und über einen Rechner protokolliert. Die Trübungsmessung hat den weiteren Vorteil, dass sie insbesondere im unteren Konzentrationsbereich von wenigen mg/L sehr empfindlich ist. Die Trübungsmessung versagt bei höheren Konzentrationen im Bereich von g/L, da dann das Messsignal, die Lichtintensität, zu stark gedämpft wird. In diesem Bereich ist die Gravimetrie sehr genau, so dass sich die beiden Verfahren sehr gut ergänzen. Anhand der gemessenen Trübungswerte (OD, optical density) lässt sich näherungsweise die relative Partikelkonzentration ermittelt:

$$\frac{c}{c_0} \approx \frac{OD - OD_0}{OD_\infty - OD_0} \quad \text{Gleichung 5-11}$$

$OD_0$  bezeichnet hierbei die Trübung, die für Wasser gemessen wurde,  $OD_\infty$  bezeichnet den Trübungswert, der nach vollständigem Durchbruch des HGMS erreicht wurde. Der Zusammenhang zwischen Partikelkonzentration und Trübung ist allerdings über einen größeren Bereich hinweg nicht-linear. Die relative Filtratkonzentration bei beginnendem Durchbruch (bei niedrigen Filtratkonzentrationen) wird durch Gleichung 5-11 dadurch etwas überbewertet.

#### *Eisenbestimmung*

Zur sehr genauen Bestimmung der Filtereffizienz in der Anfangsphase eines Filtrationszyklus eignet sich die Bestimmung der Eisenionen nach Auflösen der Magnetpartikeln in 65%-iger  $\text{HNO}_3$  mittels Atomemissionsspektroskopie (ICP-OES). Sind in der Suspension neben magnetischen Partikeln auch unmagnetische Partikeln vorhanden, so lassen sich durch die Methode in Kombination mit der gravimetrischen Analyse beide Anteile bestimmen.

Die Eisenbestimmung versagt im Falle hydrophober magnetithaltiger Polymerpartikeln, da diese durch Salpetersäure nicht vollständig aufgelöst werden und die Säure den Eisenanteil auf Grund des hydrophoben Charakters des Polymers auch nicht zu eluieren vermag.

### 5.6.2 Labor-HGMS-Anlage

Mit Hilfe einer Labor-HGMS Anlage konnte der Einfluss von Strömungsgeschwindigkeit, Feldstärke, Partikelkonzentration, Filterlänge, Matrixmaterial, Partikelart und weiterer Einflussgrößen auf Separationseffizienz und Filterkapazität charakterisiert werden. Abb. 5-16 zeigt ein Fließbild und eine Fotografie der verwendeten Anlage.

Das zylindrische Separatorgehäuse wurde vor einem Versuch mit den Filterelementen dicht gefüllt, verschlossen und dann koaxial und symmetrisch bezüglich der Spulennittelebene in die Raumtemperaturbohrung des Supraleiters eingebaut. Die Anschlüsse des Separatorgehäuses wurden entsprechend dem Fließbild mit Schlauchpumpe und Trübungsmessgerät verbunden. Die Filtrationsrichtung war stets von unten nach oben. Der gerührte Vorlagebehälter wurde mit der zu separierenden Suspension und ein weiterer Behälter mit Wasser gefüllt. Der Separator konnte durch Umschalten eines Ventils wahlweise mit Suspension oder Wasser beaufschlagt werden. Der Ablauf des HGMS wurde durch ein Trübungsmessgerät und ein Durchflussmessgerät geleitet. Beide Messgeräte waren mit einem Computer verbunden, der die Messdaten zeitlich aufnehmen konnte.

Vor Einschalten der Stromversorgung des Supraleiters wurde mit Hilfe eines integrierten Thermoelements die Temperatur die Spulentemperatur überprüft. Diese darf, um den supraleitenden Zustand zu erhalten, eine Temperatur von etwa 12 Kelvin nicht überschreiten. War die korrekte Spulentemperatur vorhanden, wurde der Magnet „hochgefahren“, d.h. der Strom durch die Spule von einem Netzteil langsam gesteigert, bis die gewünschte magnetische Flussdichte erreicht war.

Die Partikelrückgewinnung konnte durch Kreislaufspülen unter hoher Strömungsgeschwindigkeit im Gleich- oder Gegenstrom bezüglich der Filtrationsrichtung erfolgen. Für das ultraschall-unterstützte Rückspülen des HGMS wurde ein handelsübliches Labor-Ultraschallbad (Fa. Retsch, Deutschland) mit einem Fassungsvermögen von etwa 1.5 L, einer Frequenz von 35 kHz und gemessener elektrischer Leistungsaufnahme von 60 W verwendet.

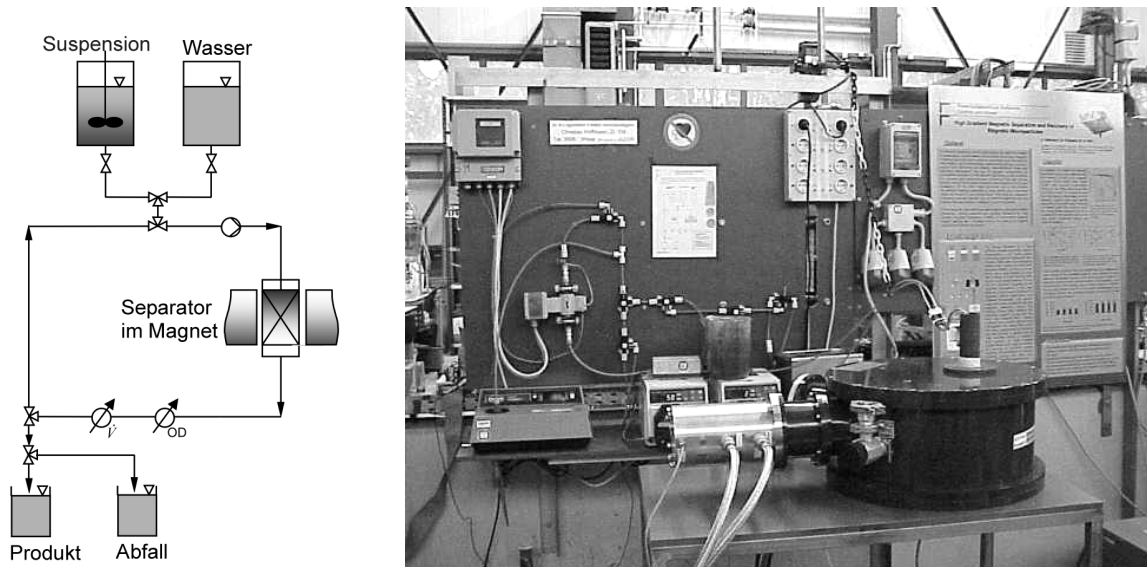


Abb. 5-16: Fließbild und Fotografie der Labor-HGMS-Anlage mit Supraleiterspule

### 5.6.3 HGMS-Anlage HGF-10

Abb. 5-17 zeigt das Fließbild und ein Foto der HGMS-Anlage HGF-10 einschließlich Schlauchpumpe, Magnetventilen, Ultraschallwandler und Schaltelektronik. Die Elektronik des Magneten erlaubt zusammen mit Antrieb, zwei Endschaltern und Motorbremse ein gezieltes und genaues Anfahren zweier Endpositionen des drehbar gelagerten Zylinders, in dem NdFeB-Permanentmagnete angeordnet sind. Die Endpositionen entsprechen der „Feld an“ bzw. „Feld aus“-Position des Systems. Der Antrieb des schaltbaren Magneten, Pumpe, Schallwandler und sämtliche Ventile sind über eine Schnittstelle durch einen Computer steuer- und regelbar. Dadurch sind unterschiedliche Prozessschritte programmierbar, die z.B. der Filtrationsphase, der Rückspülphase, Wasch- oder Elutionsphase entsprechen. Die Programmierung der Prozessschritte erfolgte mit dem kommerziellen Softwarepaket Labview 7.0 (Fa. National Instruments, Austin, TX, USA). Für das ultraschall-unterstützte Rückspülen des HGMS wurde ein an das Filtergehäuse fest montierter Industrieprozessor (Typ UIP250, Fa. Hilscher, Teltow, Deutschland) verwendet. Nähere Angaben hierzu finden sich im konstruktiven Teil der Arbeit. Die Anlage wurde bewusst kompakt und mobil gehalten, um einen industriellen Testbetrieb zu ermöglichen.

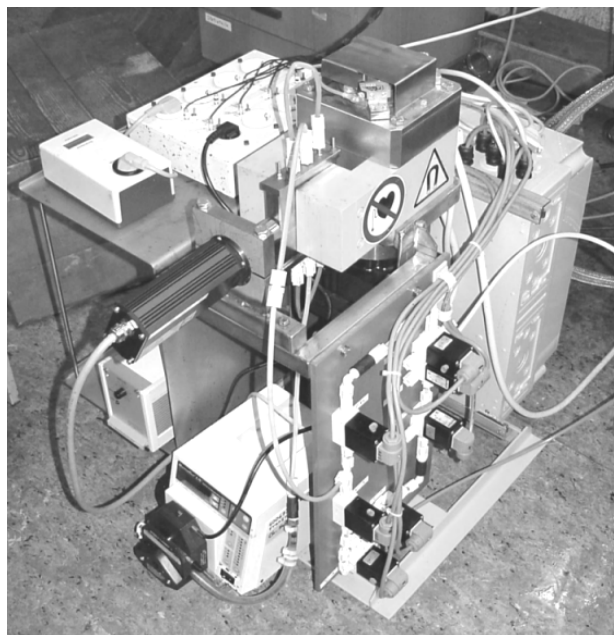
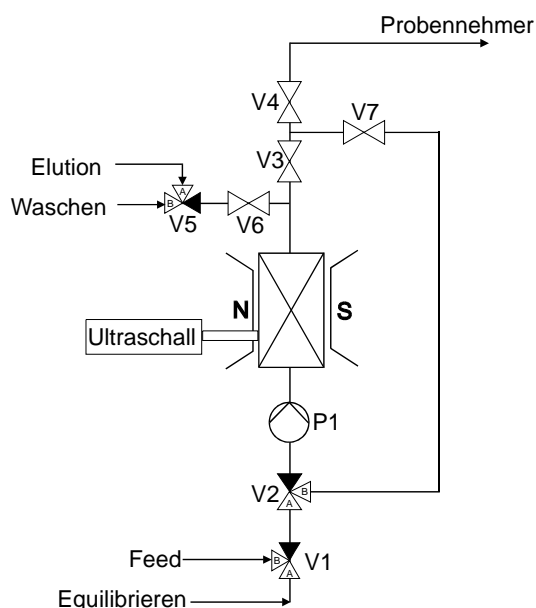


Abb. 5-17: Fließbild und Fotografie der HGF-10 Magnetseparationsanlage

## 5.6.4 HGMS-Versuche und Auswertung

### 5.6.4.1 Versuchsdurchführung

Nach Montage der Filterkammer innerhalb des Supraleiters wurde am Netzteil die gewünschte Feldstärke und an der Pumpe der gewünschte Volumenstrom eingestellt. Um die Leitungen der Anlage und die Filterkammer vollständig luftfrei zu bekommen, wurde zuerst 2 min lang Wasser bei hoher Strömungsgeschwindigkeit durch die Anlage gepumpt. Erst dann wurde die zu separierende Suspension durch den Magnetseparator geleitet und die Messdatenerfassung gestartet. Die Suspension gelangt über den Zulaufstutzen in den Separator, wobei sich die Feststoffteilchen auf den Drähten der magnetisierten Filterelemente anlagern. Das so gereinigte Filtrat wird über den Ablaufstutzen abgezogen, durch ein Trübungs- und Durchflussmessgerät geleitet und anschließend im Filtratbehälter aufgefangen. Während des Versuches wurden mehrfach Proben des Filtrats genommen, um den Verlauf der Separation verfolgen zu können. Zur Aufnahme kompletter Durchbruchkurven blieb die Anlage solange in Betrieb, bis die Filterelemente vollkommen beladen waren. Danach wurde das System bei eingeschaltetem Magnetfeld noch solange mit Wasser durchgespült, bis es partikelfrei war. Dann wurde das Magnetfeld heruntergefahren und die Leitungen und der Separator 4 mal je 1 min lang mit Wasser im Kreislauf gespült, um die Matrix weitgehend von den Partikeln zu befreien. Anschließend wurde mit einem definierten Volumen von z.B. 200 mL ausgespült. Am Ende wurde die Filterkammer ausgebaut und die verbleibenden Partikeln aufgefangen. Hierzu wurden die Filterelemente im Ultraschallbad gereinigt.

### 5.6.4.2 Filterdurchbruchskurven

Zur Charakterisierung des Filtrationsverhaltens wurden Durchbruchskurven (DBK) aufgenommen und unter Konstanthaltung übriger Einflussgrößen die zu untersuchende Einflussgröße variiert. Die Konzentrationen im Zu- und Ablauf des Filters wurde nach Zweckmäßigkeit nephelometrisch, gravimetrisch oder über Eisenbestimmung nach Auflösen der Partikeln bestimmt (siehe Abschnitt 5.6.1). Zur Charakterisierung von Proben mit magnetischen und unmagnetischen Partikeln wurden aus Kombination von Gravimetrie und Eisenbestimmung die Konzentrationen der beiden Fraktionen ermittelt.

Die auf die Zulaufkonzentration bezogenen Ablaufkonzentrationen ( $c/c_0$ ) wurden nach Zweckmäßigkeit über der Filtrationszeit  $t$  oder über den durchgesetzten Filtrervolumina (BV) aufgetragen. Es gilt der Zusammenhang:

$$BV = \frac{\dot{V} \cdot t}{V} = \frac{v \cdot t}{L} \quad \text{Gleichung 5-12}$$

Zur Ermittlung der Filtrationszeit  $t$  wurde die Versuchszeit stets um die Totzeit  $t_T$  reduziert. Die Totzeit  $t_T$  ergibt sich aus dem „toten“ Volumen der Rohrleitungen  $V_T$  (vom Vorlagebehälter bis zum Trübungsmessgerät) und dem Volumenstrom gemäß:

$$t_T = \frac{V_T}{\dot{V}} \quad \text{Gleichung 5-13}$$

### 5.6.4.3 Ermittlung des Abscheidegrads

Zur Bestimmung der Filtereffizienz wurde zum Vergleich zu gravimetrischen Bestimmungen auch die Trübungsmessungen herangezogen. Diese so ermittelten Abscheidegrade (Filtereffizienzen) sind aus oben genannten Gründen geringer, da kleinere Partikeln stärker in die Gewichtung eingehen. Die aus den Trübungsmessungen ermittelten Abscheidegrade lassen sich aber als Maß für den Verlust an Partikeloberfläche auffassen, was bei Sorptions- oder heterogenen Reaktionsprozessen das gegenüber dem Verlust an Partikelmasse wichtigere Maß darstellt. Für den Filter-Abscheidegrad  $\varphi$  gilt:

$$\varphi = 1 - \left( \frac{c}{c_0} \right) \quad \text{Gleichung 5-14}$$

Für einige Anwendungen ist weniger der Abscheidegrad zu einem bestimmten Zeitpunkt des Filtrationsprozesses, als vielmehr der mittlere Abscheidegrad  $\bar{\varphi}$  bis zum Erreichen einer bestimmten Filtratkonzentration  $c$  interessant, die nicht überschritten werden soll. Es gilt:

$$\bar{\varphi} = \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} \varphi(t) dt \quad \text{Gleichung 5-15}$$

Der mittlere Abscheidegrad lässt sich anhand der ermittelten Ablaufkonzentration  $c(t)$  aus Gleichung 5-14 und Gleichung 5-15 ermitteln. In der Arbeit wurde  $\Delta t$  so bemessen, dass nach dieser Filtrationszeit ein 5%- oder 10%-iger Durchbruch auftrat, d.h.  $c/c_0 = 0.05$  bzw. 0.1.



#### 5.6.4.4 Ermittlung der Filterbeladung

Unter der Filterbeladung  $\sigma$  versteht man die im Filter abgeschiedene Partikelmasse bezogen auf das Filtrervolumen. Aus der DBK lässt sich die Beladung des Filters in Abhängigkeit der Filtrationszeit berechnen. Aus der Massenbilanz für den Gesamtfiler

$$c_0 \dot{V} dt = c \dot{V} dt + V_F d\sigma(t) \quad \text{Gleichung 5-16}$$

erhält man durch Integration:

$$\sigma(t) = \frac{1}{V_F} \int_0^{\Delta t} \dot{V} (c_0 - c) dt \quad \text{Gleichung 5-17}$$

Da für jeden Versuch sowohl der Volumenstrom als auch die Filtratkonzentration  $c$  über die Zeit erfasst wurden, lässt sich leicht die Beladung zu jedem Zeitpunkt berechnen. Die Beladung steigt zu Beginn des Filtrationszyklus linear mit der Filtrationszeit an. Mit dem Filterdurchbruch erreicht die Beladung im Allgemeinen einen Plateauwert. Diesen Wert bezeichnet man als Sättigungbeladung  $\sigma_s$  des Filters.

#### 5.6.4.5 Filterkoeffizient

Zur Charakterisierung der Filtration kann auch die dimensionslose Kennzahl  $\lambda_0 L$  herangezogen werden. Sie ist das Produkt des Filterkoeffizienten  $\lambda_0$  des Tiefenfiltermodells und der Filterlänge  $L$ . Die Kennzahl kann als Fit-Parameter der nichtlinearen Regression von Gl. 4-11 (Durchbruchskurve) an die Messwerte bestimmt werden. Für eine effiziente Filtration sollte  $\lambda_0 L$  *mindestens* einen Wert von etwa 5 betragen, da sonst die Durchbruchskurve zunehmend flacher verläuft und sich die möglichen Filtrationszeiten zunehmend verkürzen.

#### 5.6.5 OGMS-Anlage

Zum Betrieb der beiden verwendeten OGMS-Typen wurden ein zur Labor-HGMS-Anlage (siehe Abschnitt 5.6.2) analoger Aufbau verwendet, wobei die Suspension über eine Schlauchpumpe dem OGMS zugeführt wurde. Zusätzlich wurde die Saugseite einer zweiten Schlauchpumpe mit dem Konzentratabfluss des OGMS verbunden, so dass sowohl der Gesamtvolumenstrom als auch der Konzentratvolumenstrom über die beiden Pumpen gesteuert werden konnten. Das Filtrat des OGMS konnte frei abfließen. Als Magnetfeldquelle wurde für beide OGMS-Typen das supraleitende Magnetsystem verwendet (vgl. Abschnitt 3.1.1).

#### 5.6.6 RMMS-Anlage

Die Verschaltung der RMMS-Anlage entsprach der der OGMS (vgl. Abschnitt 5.6.5). Die beiden Konzentratabflüsse wurden direkt nach dem RMMS über ein Y-Stück vereinigt und über eine zweite Schlauchpumpe mit definiertem Volumenstrom abgezogen. Als Magnetfeldquelle wurde der in Abschnitt 3.1.2 beschriebene Permanentmagnet verwendet.

## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Hochgradientenmagnetseparation (HGMS)

Die Untersuchungen zur Separation von magnetischen Mikropartikeln wurden zunächst mit dem HGMS-Laborseparator (siehe Kapitel 3.2) durchgeführt, um die Separationseffizienzen und Filterkapazitäten unter unterschiedlichen Bedingungen für verschiedene Partikelarten zu betrachten. Durch den variablen Aufbau und die Verwendung eines supraleitenden Magnetsystems als Magnetfeldquelle erlaubt der Laborseparator eine Variation der Filterlänge und insbesondere eine Variation der magnetischen Flussdichte auch über sonst für die HGMS übliche Flussdichten hinaus. Auf den hieraus gewonnenen Ergebnissen aufbauend wurde das industriell einsetzbare System HGF-10 entwickelt, das auf kostengünstigen Seltenerd-Permanentmagneten als Feldquelle basiert, mehr als die 3-fache Filterfläche besitzt und vollautomatisch computergesteuert werden kann.

#### 6.1.1 Labor-HGMS

Unter der Verwendung des Labor-HGMS mit zylindrischer Filterkammer wurden die physikalischen Haupteinflussgrößen auf das Filtrationsverhalten magnetischer Mikropartikeln variiert. Hierzu zählen insbesondere

- die verwendete Filtermatrix (Porosität  $\varepsilon_F$ , Drahtradius  $a$ , Maschenweite)
- die Filterlänge  $L$
- die Partikelzulaufkonzentration  $c_0$
- die (Leerrohr-) Filtergeschwindigkeit  $v_0$
- die äußere magnetische Flussdichte  $B_0$  bzw. Feldstärke  $H_0$
- Filterkonfiguration (longitudinal/transversal/axial)
- die Partikelsorte und ihre Eigenschaften wie Partikelradius  $b$ , Partikelgrößenverteilung, Sättigungsmagnetisierung  $M_{s,p}$  und Remanenz  $M_{r,p}$
- die Anwesenheit von unmagnetischen Partikeln und
- die Viskosität des Mediums  $\eta$

##### 6.1.1.1 Filtermatrix und Reproduzierbarkeit

Das ausschließlich verwendete Matrixmaterial war ein rostfreier magnetischer Chromstahl vom Typ DIN 1.4013. In Vorversuchen wurden zunächst mehrere Versuche unter gleichen Versuchsbedingungen mit vergleichsweise feiner Maschenweite von 1 mm und einer Drahtstärke 0.224 mm durchgeführt („feine Matrix“). Die Versuchsbedingungen sind in Abb. 6-1 genannt. Die Durchbruchkonzentrationen wurden über eine Online-Trübungsmessung erfasst. Wie in Abb. 6-1 zu erkennen, sind die DBK für die feinere Matrix mit geringen Schwankungen reproduzierbar. Probleme mit der Reproduzierbarkeit wurden dann beobachtet, wenn die Filterkammer vor einer Beaufschlagung mit Suspension nicht vollständig entlüftet wurde. Bypass-Strömungen sind die Folge und führen zu verfrühten

Filterdurchbrüchen. Standardmäßig wurden die Separatoren vor Versuchsbeginn deshalb längere Zeit unter hoher Strömungsgeschwindigkeit mit Wasser beaufschlagt, um eingeschlossene Luft weitgehend zu entfernen. Bei Bedarf wurde die Filterkammer zusätzlich mit Hilfe eines Gummihammers erschüttert, bis in Folge der Erschütterung kein Anstieg der Trübung im Ablauf mehr verzeichnet wurde.

Bei Verwendung eines gröberen Matrixgewebes (2 mm Maschenweite, 0,5 mm Drahtdurchmesser) werden gleich hohe Separationseffizienzen erreicht. Allerdings ist die Filterkapazität um etwa 35% reduziert.

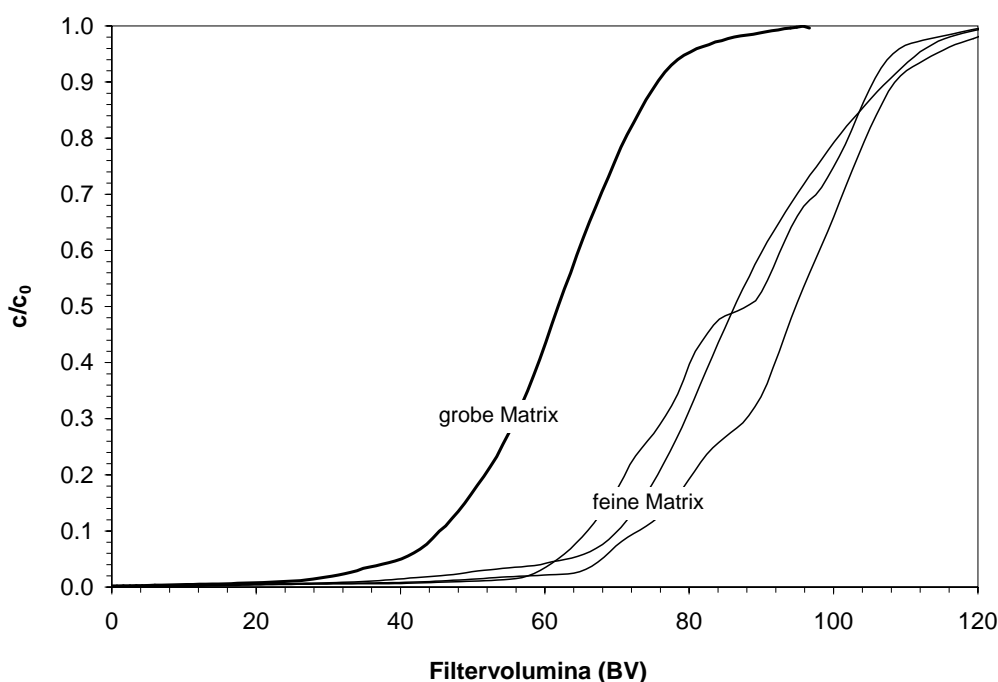


Abb. 6-1: Einfluss des Matrixmaterials auf das Filterdurchbruchverhalten; Magnetit Mm in Leitungswasser;  $c_0 = 2 \text{ g/L}$ ;  $B_0 = 0.4 \text{ T}$ ;  $v_0 = 24 \text{ m/h}$ ;  $L = 40 \text{ mm}$ ; Labor-HGMS-Separator; mit der feinen Matrix wurden 3 Versuche mit gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt

Die Reduktion der Filterkapazität mit der Erhöhung des Drahtradiuses erklärt sich qualitativ aus der Verringerung des kritischen Einfangradiuses  $R_{c_a}$ . Da das Verhältnis der Drahtoberflächen zu Matrixvolumeneinheit für die beiden verwendeten Matrices konstant ist, bewirkt die Verringerung des kritischen Einfangradiuses eine geringere Ausdehnung der Anlagerungszone für jeden Draht. Der Einfluss des Drahtradiuses auf den kritischen Einfangradius  $R_{c_a}$  und auf die Kennzahlen  $v_m/v_0$  und  $\lambda_0 L$  ist in Abb. 6-2 für die dort angegebenen Bedingungen exemplarisch gezeigt.

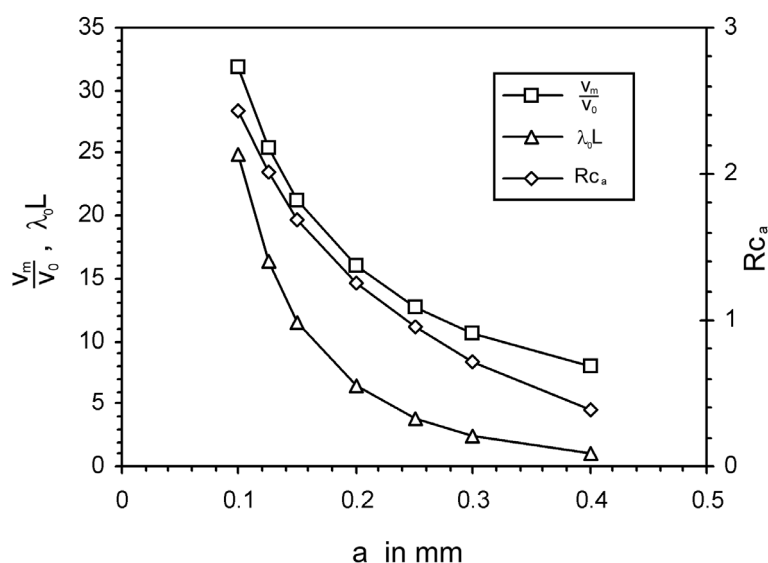


Abb. 6-2: Berechnete Kennzahlen der HGMS als Funktion des Drahtradius.

Modellparameter:  $v_0 = 24$  m/h;  $B_0 = 0.4$  T;  $b = 1$   $\mu$ m;  $M_p = 34$  Am<sup>2</sup>/kg;  $J_d = 2 B_0$ ;  $\epsilon_F = 0.96$ ;  $L = 40$  mm;  $\eta = 1$  mPas; longitudinale Filteranordnung;

Zum genannten Einfluss kommt der weitere Effekt, dass durch feinere Drahnte höhere lokale Magnetkräfte an der Drahtoberfläche hervorgerufen werden. Für die Radialkomponente der Magnetkraft gilt an der Drahtoberfläche (vgl. Gleichung 8–3 im Anhang für  $r = a$ ):

$$F_{m,r}(r = a) \propto \frac{1}{a} \quad \text{Gleichung 6-1}$$

Durch die höhere Magnetkraft wird eine stärkere Kompaktierung der bereits auf der Drahtoberfläche abgeschiedenen Partikeln verursacht. Dieser Sachverhalt wurde experimentell überprüft, indem Suspensionen magnetischer Partikeln im Supraleitermagneten ohne Magnetfeldgradienten sedimentierten. Nach der Sedimentation und der Bestimmung der Schuttichte des Sediments wurde der Magnetfeldstarkegradient erhöhet und nach Erreichen eines Gleichgewichts erneut die Schuttichte bestimmt. Dieses Vorgehen wurde sukzessive bis zum maximalen Gradienten der Spule von 46 T/m wiederholt. Die Sedimentporositat in Abhängigkeit des angelegten Feldgradienten ist in Abb. 6-3 gezeigt. Sowohl die Magnetitpartikeln  $Mm$  als auch die magnetischen Silica-Partikeln zeigen eine deutliche Kompaktierung mit zunehmendem Feldgradienten. Die Partikeln sind außer bei ausgeschaltetem Feld stets in der magnetischen Satigung. Zum Vergleich sind praktisch unmagnetische Goethit-Partikeln ( $\alpha$ -FeO(OH)) mit aufgeführt, bei denen keine Kompaktierung nach Anlegen eines Feldgradienten auftritt.

Obwohl der maximale Gradient der Spule deutlich unterhalb der Feldgradienten liegt, die in der HGMS erzielt werden, scheint die maximal mögliche Kompaktierung der verwendeten magnetischen Partikeln bereits bei etwa 50 T/m weitgehend abgeschlossen zu sein. Legt man als maximal erreichbare Sedimentdichte den Plateauwert der Fitkurve in Abb. 6-3 zugrunde, so lässt sich damit unter der Voraussetzung eines hinreichend großen Einfangradius  $Rc_a$  die Kapazität eines HGMS abschätzen. Da in 50% des nicht von Drahnten ausgefüllten Separatorvolumens eine anziehende Magnetkraft auf ferromagnetische Partikeln wirkt, ergibt sich folgende Abschätzung:

$$\sigma_{\text{HGMS}} \approx \frac{1}{2} \cdot \varepsilon_{\text{F}} \cdot \sigma_{\text{Sed,max}} = 131 \text{ kg/m}^3 \quad \text{Gleichung 6-2}$$

Dieser Wert entspricht sehr gut der erreichten Kapazität unter Verwendung des feinen Matrixmaterials bis zum Erreichen eines 5%-igen Filterdurchbruchs (vgl. Abb. 6-1):

$$\sigma_{5\%} \approx c_0 \cdot BV_{5\%} \approx 130 \text{ kg/m}^3 \quad \text{Gleichung 6-3}$$

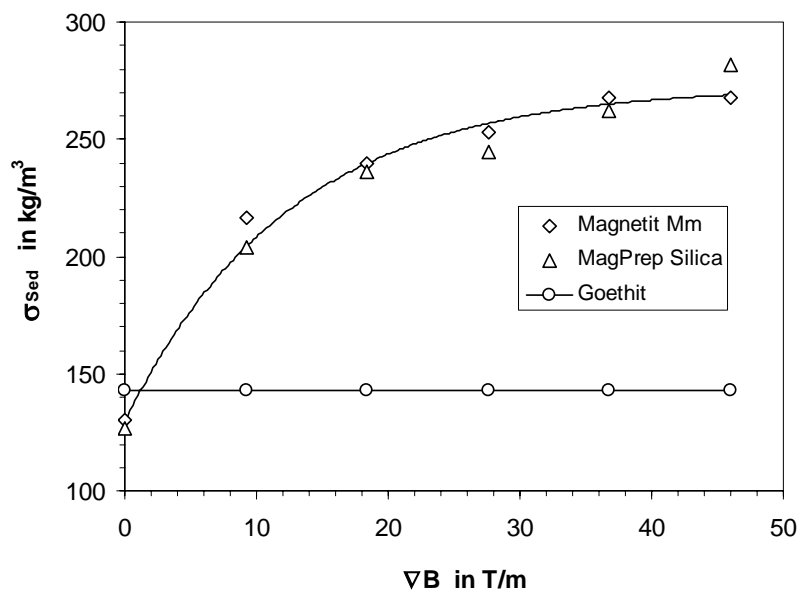


Abb. 6-3: Sedimentdichte in Abhängigkeit des magnetischen Feldgradienten;

Die entsprechenden Sedimentporositäten liegen bei:  
0.92 - 0.96 (Mm),  
0.93 - 0.97 (Silica),  
0.96 (Goethit).

Empirische Fitkurve vom Typ  
 $y(x) = y_0 + a \cdot (1 - \exp(-b \cdot x))$ ;  
 $y_0 = 130$ ,  $a = 143$ ,  $b = 0.0800$ ,  
 $R^2 = 0.981$ .

### 6.1.1.2 Einfluss der Filterlänge

Zur Untersuchung des Einflusses der Länge des HGMS wurden zylindrische Filterkammern unterschiedlicher Länge mit Filterronden vollständig gefüllt. Mit jeder Filterkammer wurde ein Separationsversuch durchgeführt und die Ablaufkonzentrationen durch eine Online-Trübungsmessung zeitlich verfolgt. Die Abfolge der Filterdurchbrüche erfolgt in der erwartungsgemäßen *zeitlichen* Abfolge. Die Durchbruchkurven sind in Abb. 6-4 zusammen mit den gewählten Versuchsbedingungen als Funktion der durchgesetzten Filtervolumina dargestellt. Außer für den sehr kurzen Filter von 1 cm weisen die Durchbruchkurven sigmoidale Verläufe auf, wie sie nach dem Tiefenfiltermodell (vgl. Gleichung 4-11) vorausgesagt werden. Wie an der Abbildung zu erkennen ist, lässt sich die Durchbruchkurve für sehr kurze Filter dagegen nicht durch das Tiefenfiltermodell wiedergeben. In diesem Fall ist der Anteil der Filterkammer, der nicht mit der Matrix ausgefüllt ist, nicht mehr zu vernachlässigen. Ein Anteil des Gesamtvolumens wird zur Verteilung der Zulaufsuspension auf die Filterfläche bzw. zum Sammeln des Filtrats nach Durchströmen der Matrix benötigt. Da auch in diesen Zonen ein (inhomogenes) Magnetfeld wirkt, können Partikeln über „offene“ Magnetfeldgradienten abgeschieden werden. Die Filterlänge erhöht sich hierdurch scheinbar. Dieser Effekt kommt in Abb. 6-5 (rechts) in einem Anstieg der Sättigungs- und nutzbaren Kapazität unterhalb 2 cm Filterlänge zum Ausdruck und sollte beim Auslegen von HGMS berücksichtigt werden, insbesondere wenn

Flüssigkeitsdistributionssysteme zum Einsatz kommen, deren Volumen im Vergleich zum Matrixvolumen nicht zu vernachlässigen ist. Ab einer Filterlänge von 2 cm bleibt die *Sättigungskapazität* mit  $120 \text{ kg/m}^3$  konstant. Die *nutzbare Kapazität* (bis zum Erreichen eines 10%-igen Filterdurchbruchs) steigt ab einer Filterlänge von 2 cm wieder deutlich an, d.h. die Filterausnutzung erhöht sich. Dieser Sachverhalt begründet sich über die mit zunehmender Filterlänge bei einer Auftragung über die durchgesetzten Filtervolumina immer steiler verlaufenden Durchbruchkurven, was sich in der Zunahme der Kennzahl  $\lambda_0 L$  widerspiegelt (vgl. Abb. 6-5 links). Der experimentell ermittelte Filterkoeffizient  $\lambda_0$  ist dabei mit einem Mittelwert von  $278 \text{ m}^{-1}$  weitgehend konstant, was im Einklang mit dem Tiefenfiltermodell steht, nach dem der Filterkoeffizient  $\lambda_0$  lediglich vom Einzeldraht-Einfangradius  $R_c$ , vom Drahradius  $a$  und von der Filterporosität  $\varepsilon$  abhängt (vgl. Gleichung 4–13 in Kapitel 4).

Der experimentell für eine Filterlänge von 4 cm ermittelte Wert für  $\lambda_0 L$  von 8.6 stimmt exakt mit dem theoretisch anhand des Einzeldrahtmodells (vgl. Kapitel 4) berechneten Wert überein, wenn man einen Partikeldurchmesser  $2b$  von  $1.06 \mu\text{m}$  annimmt. Dieser Wert liegt wiederum genau im Bereich des Größenverteilungsmaximums ( $0.72 \mu\text{m}$  Sedimentationsmessung bzw.  $1.5 \mu\text{m}$  LALLS-Messung, vgl. Kapitel 5.3). Betrachtet man alle vier Durchbruchkurven in Abb. 6-4 kommt man auf diese Weise auf Partikeldurchmesser zwischen  $1.1$  und  $1.4 \mu\text{m}$ . Die in Kapitel 4 dargestellte theoretische Beschreibung des Abscheidemechanismus im HGMS lässt sich also sehr gut auf die experimentellen Befunde abbilden. Dies ist insofern erstaunlich, als magnetisch induzierte Agglomerationsvorgänge der Partikeln nach Eintritt in den HGMS im Modell nicht berücksichtigt wurden. Bei den verwendeten Partikelkonzentrationen und Verweilzeiten der Partikeln im Magnetfeld scheinen diese daher nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

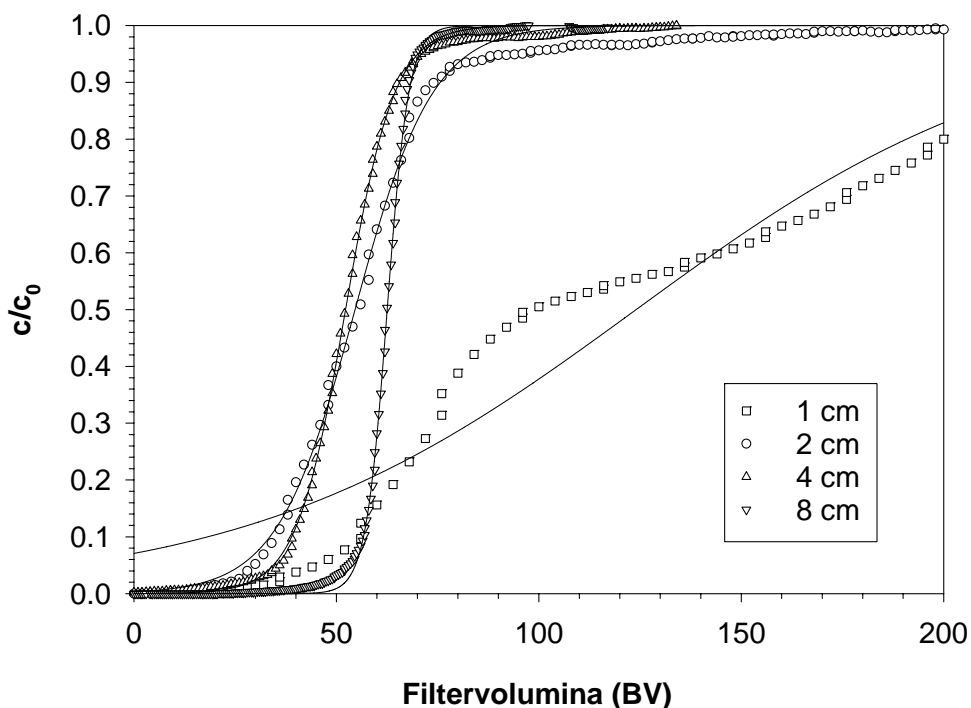


Abb. 6-4: Einfluss der Filterlänge auf das Durchbruchverhalten eines HGMS; Magnetit Mm in Leitungswasser;  $c_0 = 2 \text{ g/L}$ ;  $B_0 = 0.4 \text{ T}$ ;  $v_0 = 24 \text{ m/h}$ ;  $a = 0.12 \text{ mm}$ ;  $\varepsilon = 0.96$ ; Labor-HGMS; Nach dem Tiefenfiltermodell berechnete Kurven sind durchgezogen dargestellt ( $\sigma_s$  und  $\lambda_0 L$  sind Anpassungsparameter der Fitkurven an die Messpunkte).

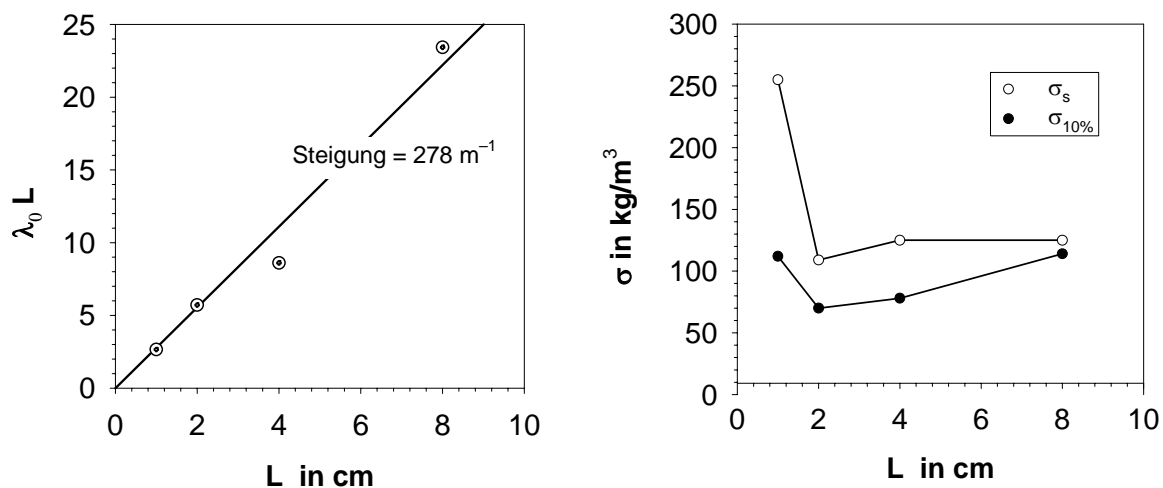


Abb. 6-5: Kennwert  $\lambda_0 L$  des Tiefenfiltermodells (links); Sättigungskapazitäten  $\sigma_s$  und nutzbare Kapazität bis zu einem 10%-igen Filterdurchbruch  $\sigma_{10\%}$  in Abhängigkeit der Filterlänge (rechts).

### 6.1.1.3 Einfluss der Partikelkonzentration

Durch Experimente unter Verwendung des Laborseparators mit einem Filtervolumen von 18 mL ( $L = 4 \text{ cm}$ ) wurde der Einfluss der Zulaufkonzentration der Magnetpartikeln charakterisiert. Verwendet wurden Magnetitpartikeln Mm in Leitungswasser. Weitere

Versuchsbedingungen sind in Abb. 6-6 genannt. Die Ablaufkonzentration wurde zeitlich über eine Online-Trübungsmessung verfolgt.

Der Durchbruchzeitpunkt und die Partikelkonzentration verhalten sich erwartungsgemäß annähernd umgekehrt proportional (siehe Abb. 6-7). Im untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 0.5 und 3 g/L Magnetit lässt sich kein signifikanter Einfluss der Konzentration auf die Filterkapazität feststellen. Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden lässt sich die nutzbare Kapazität (bis zu einem 10%-igen Durchbruch) abschätzen. Der Wert von 88 kg/m<sup>3</sup> ist gegenüber dem ‚4 cm-Versuch‘ in Abb. 6-5 (rechts) etwas erhöht, was vermutlich durch die Verwendung einer neuen Magnetpartikel-Charge mit etwas höherer Magnetisierung zu erklären ist.

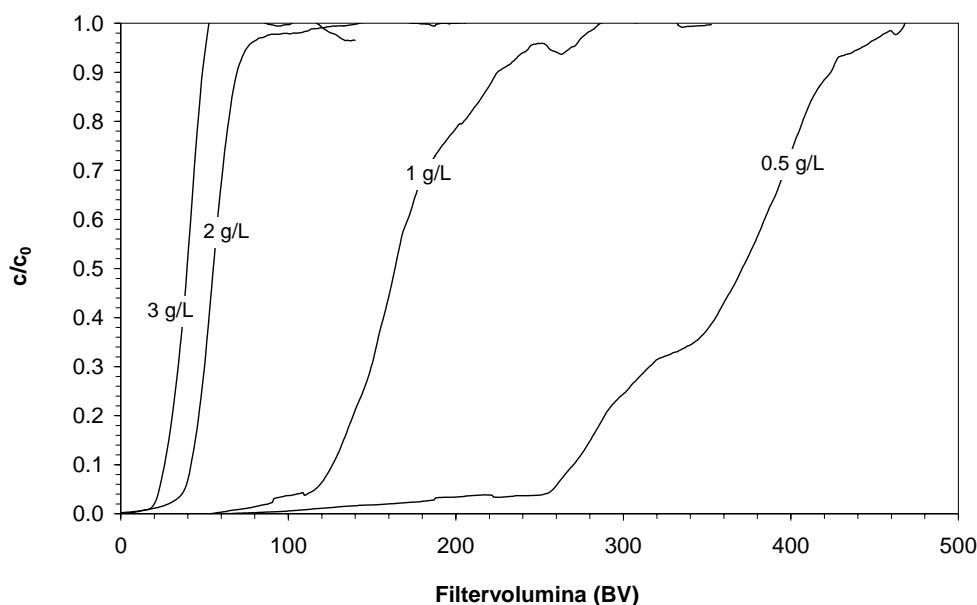


Abb. 6-6: Filterdurchbruchkurven für verschiedene Partikelzulaufkonzentrationen; Labor-HGMS, Magnetit,  $\text{Mm}^3$  in Leitungswasser,  $B_0 = 0.4 \text{ T}$ ,  $v_0 = 24 \text{ m/h}$ ,  $L = 40 \text{ mm}$ .

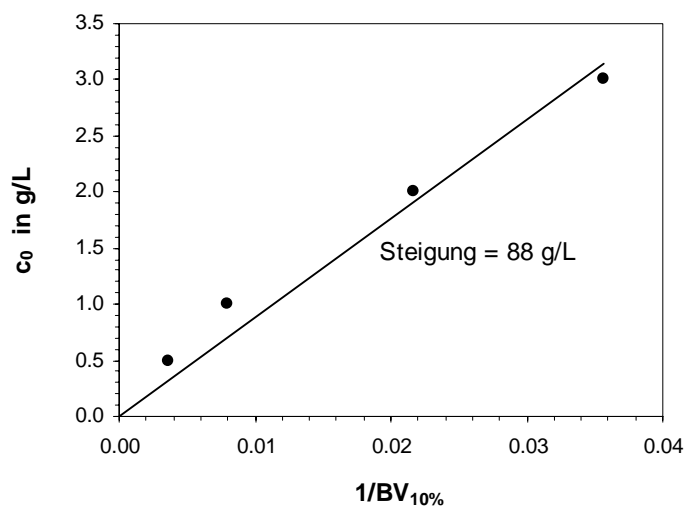


Abb. 6-7: Zusammenhang zwischen Partikelzulaufkonzentration und Filterdurchbruch ( $c/c_0=10\%$ )



#### 6.1.1.4 Einfluss der Filtergeschwindigkeit

Durch Experimente unter Verwendung des Laborseparators mit einem Filtervolumen von 9 mL ( $L = 2$  cm) wurde der Einfluss der Filtergeschwindigkeit im Bereich zwischen 13 und 133 m/h ermittelt. Verwendet wurden Magnetitpartikeln Mm in Leitungswasser. Weitere Versuchsbedingungen sind in Abb. 6-8 genannt. Die Ablaufkonzentration wurde zeitlich über eine Online-Trübungsmessung verfolgt. Bei der verwendeten kurzen Filterlänge kommt es bei Filtergeschwindigkeiten über etwa 40 m/h zu einem spontanen Anfangsdurchbruch. In Abb. 6-9 sind die Sättigungskapazität  $\sigma_s$  und die nutzbare Kapazität  $\sigma_{5\%}$  als Funktion der Filtergeschwindigkeit dargestellt. Mit zunehmender Filtergeschwindigkeit nehmen die Widerstandskräfte auf noch nicht abgeschiedenen Partikeln, insbesondere aber auch Scherkräfte auf die bereits ausgebildeten Partikelanlagerungszonen zu, was sich in der annähernd linearen Abnahme der Kapazität widerspiegelt.

Die vergleichsweise kurze Filterlänge von nur 2 cm führt zu einer schlechten Kapazitätsausnutzung, d.h. zu einer hohen Diskrepanz zwischen nutzbarer Kapazität und Sättigungskapazität (siehe Abb. 6-9).

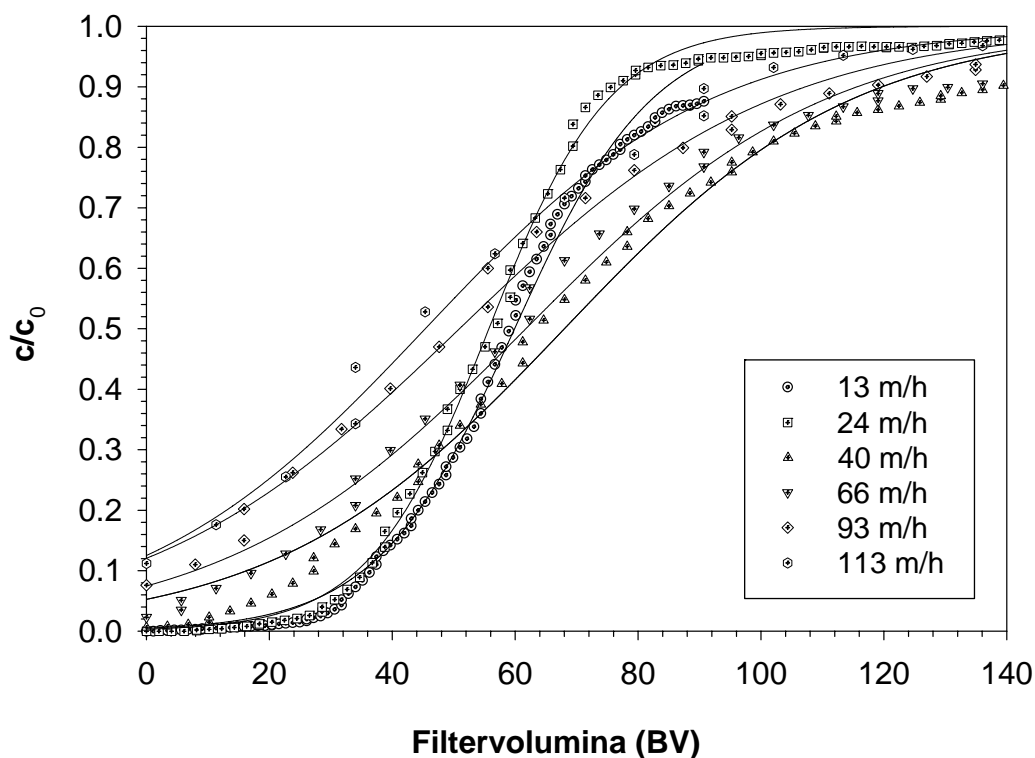


Abb. 6-8: Einfluss der Filtergeschwindigkeit auf das Durchbruchverhalten; Magnetit ‚Mm‘ in Leitungswasser;  $c_0 = 2$  g/L,  $B_0 = 0.4$  T,  $L = 2$  cm; Labor-HGMS-Separator; Nach dem Tiefenfiltermodell berechnete Kurven sind durchgezogen dargestellt ( $\sigma_s$  und  $\lambda_0 L$  sind Anpassungsparameter der Fitkurven an die Messpunkte).

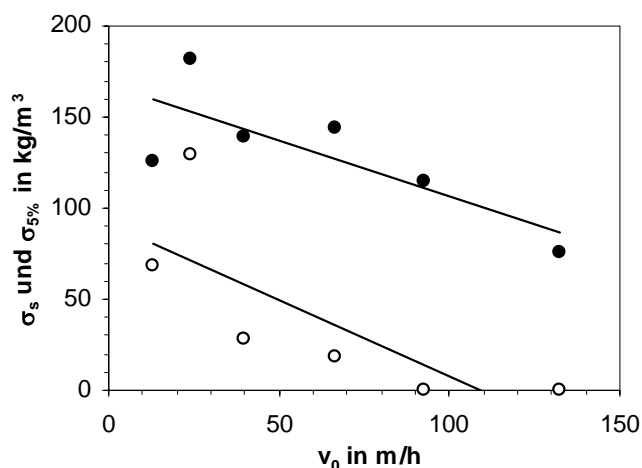


Abb. 6-9: SättigungsfILTERkapazität  $\sigma_s$  (•) und nutzbare Kapazität  $\sigma_{5\%}$  (o) in Abhängigkeit der Filtergeschwindigkeit; Magnetit ‚Mm‘ in Leitungswasser;  $c_0 = 2$  g/L;  $B_0 = 0.4$  T;  $L = 2$  cm; Labor-HGMS

In Abb. 6-10 sind die Parameter der nach dem Tiefenfiltermodell gefitteten Durchbruchkurven der Abb. 6-8 dargestellt. Mit Ausnahme des Ausreißers bei 24 m/h nimmt der Parameter  $\sigma_0$ , der die Sättigungskapazität wiedergibt, linear mit der Strömungsgeschwindigkeit ab. Der Parameter  $\lambda_0 L$ , der die Steilheit der Durchbruchkurven und damit die nutzbare Kapazität beeinflusst, nimmt insbesondere im Bereich zwischen 13 und 60 m/h stark ab. Für noch höhere Geschwindigkeiten bleibt der Parameter auf geringem Niveau um 2. Für alle untersuchten Geschwindigkeiten erscheint der Parameter  $\lambda_0 L$  mit maximal 5.3 zu gering. Für eine effiziente Kapazitätsausnutzung des Filters sollten mindestens Werte um 10 angestrebt werden, um vergleichsweise steile Durchbruchkurven zu erzielen. Dies kann wie Abschnitt 6.1.1.2 zeigt, für eine Filtergeschwindigkeit von 24 m/h mit einer Filterlänge von mindestens 4 cm erreicht werden. Für höhere Strömungsgeschwindigkeiten müssen entsprechend längere Filter verwendet werden.

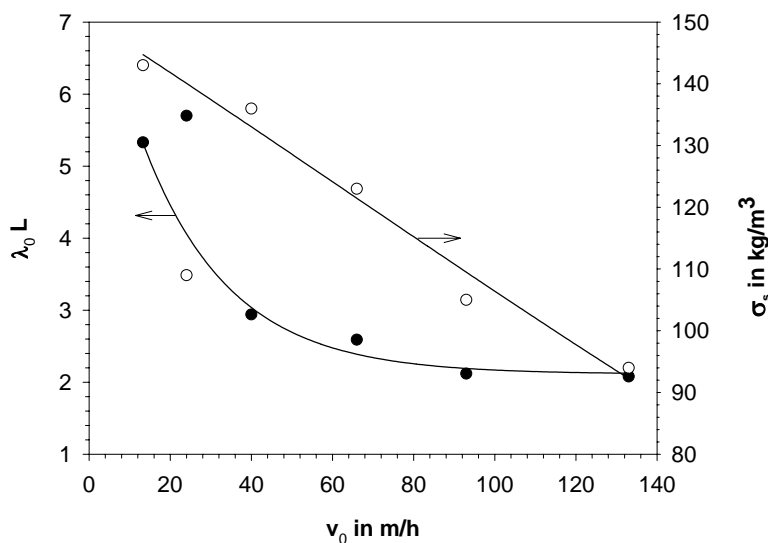


Abb. 6-10: Parameter des Tiefenfiltermodells.

Der Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf  $\lambda_0 L$  lässt sich im untersuchten Bereich näherungsweise durch einen exponentiellen Abfall beschreiben:

$$\lambda_0 L \approx 2.1 + 6.0 \cdot \exp\left(-\frac{v_0}{21 \text{ mh}^{-1}}\right)$$

### 6.1.1.5 Einfluss der magnetischen Flussdichte

Durch die Verwendung einer supraleitenden Spule konnte der Einfluss der magnetischen Flussdichte über einen weiten Bereich zwischen 0 und 5 Tesla untersucht werden. In Abb. 6-11 sind DBK als Funktion der durchgesetzten Filtervolumina für verschiedene Flussdichten dargestellt. Qualitativ ergibt sich eine Erhöhung der Filterkapazität mit zunehmender Flussdichte. Allerdings ist der Einfluss zwischen 0.2 und 1.0 Tesla relativ gering (vgl. Abb. 6-12). Interessant ist die weitere Zunahme der Kapazität für Flussdichten oberhalb 2 Tesla. Diese Kapazitätserhöhung lässt sich nicht anhand der HGMS-Theorie erklären, da sich ab 1.7 Tesla sowohl Abscheidematrix als auch Magnetpartikeln in der magnetischen Sättigung befinden. Eine Erhöhung der Flussdichte oberhalb 1.7 Tesla dürfte demnach keinen Einfluss auf das Filtrationsverhalten haben. Allerdings steigen durch die Erhöhung der Flussdichte die durch die Magnetspule hervorgerufenen „offenen“ Gradienten linear mit der Flussdichte an. Auch hier ist vermutlich der Sekundäreffekt einer Abscheidung aufgrund offenen Feldgradienten die Ursache für eine verbesserte Abscheidung im Hochfeldbereich.

Da für die Versuche zur Variation der Flussdichte eine größere Filterlänge von 4 cm gewählt wurde, liegt der Anteil der nutzbaren Kapazität an der Gesamtkapazität deutlich höher als bei den Versuchen zur Variation der Filtergeschwindigkeit.

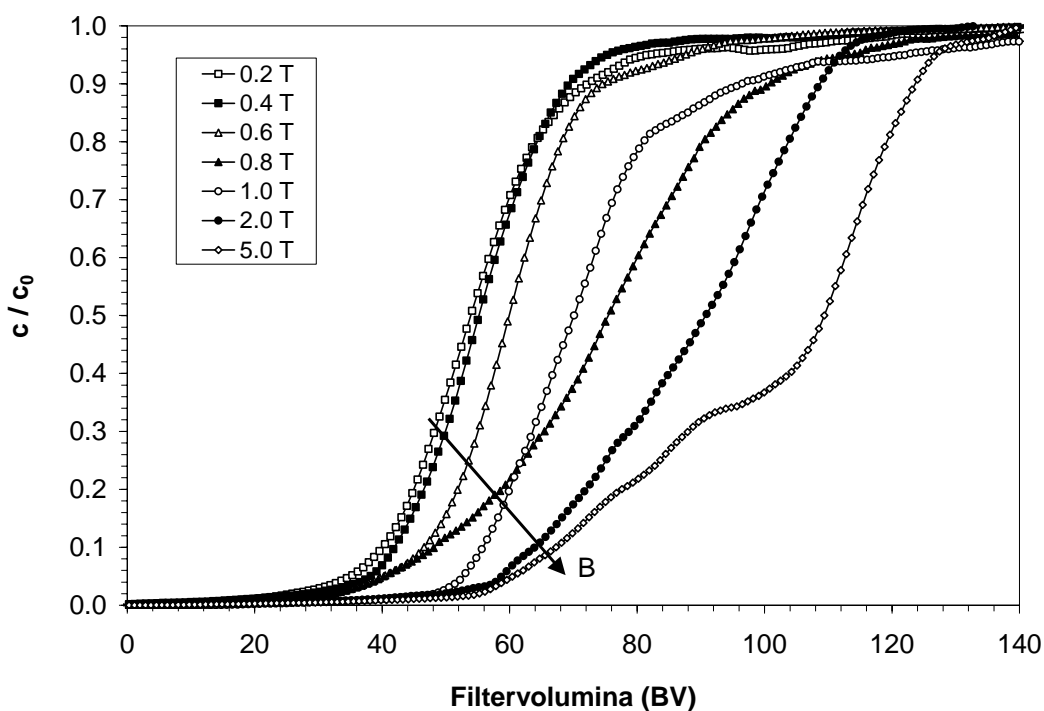


Abb. 6-11: Einfluss der Flussdichte auf das Durchbruchverhalten; Magnetit ‚Mm‘ in Leitungswasser;  $c_0 = 2 \text{ g/L}$ ;  $v_0 = 24 \text{ m/h}$ ;  $L = 4 \text{ cm}$ ; Labor-HGMS

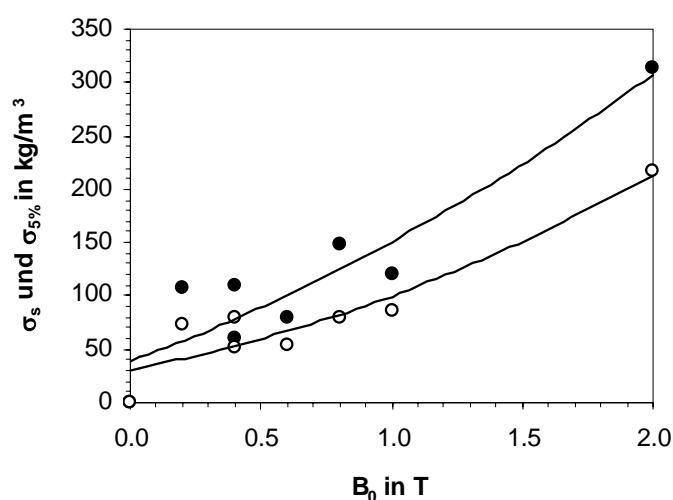


Abb. 6-12: Sättigungsfilterkapazität (●) und nutzbare Kapazität (○) in Abhängigkeit der Flussdichte; Magnetit ‚Mm‘ in Leitungswasser;  $c_0 = 2 \text{ g/L}$ ;  $v_0 = 24 \text{ m/h}$ ;  $L = 4 \text{ cm}$ ; Labor-HGMS

### 6.1.1.6 Filter-Konfigurationen

Zur technischen Umsetzung eines magnetischen Separationssystems erscheint die Verwendung von elektrischen Spulen als Feldquellen nur bedingt sinnvoll. Insbesondere die Verwendung von supraleitenden Spulen ist mit hohen Investitionskosten verbunden. Deshalb wurde versucht, die gleiche zylindrische Filterkammer in einem einfachen Permanentmagneten zu verwenden. Dabei ändert sich die Filterkonfiguration, da das Magnetfeld dann nicht mehr parallel zur Strömung angeordnet ist. Vielmehr befinden sich etwa 50% der Abscheideträfte in einer transversalen Anordnung während die andere Hälfte in Richtung der Feldlinien angeordnet ist und keinen Beitrag zur Abscheidung leistet („tote“ Anordnung). Sowohl im Falle, in dem eine Spule als Feldquelle eingesetzt wurde (longitudinale Anordnung), als auch im Falle eines Permanentmagneten als Feldquelle (transversale und ‚tote‘ Anordnung) wurden hohe Abscheidegrade erreicht (vgl. Tabelle 6-1). Allerdings ist die erreichbare Filterkapazität bei der Verwendung im Permanentmagneten deutlich reduziert. Dies liegt an der Tatsache, dass 50% der Dräfte nicht für eine Abscheidung genutzt werden und zusätzlich zu einem magnetischen „Kurzschluss“ führen, d.h. sie bündeln die Feldlinien in ihrem Innern und setzen dadurch die Flussdichte in ihrer unmittelbaren Umgebung herab. Diese beiden Effekte führen fast zu einer Halbierung der nutzbaren Kapazität im Vergleich zur longitudinalen Filteranordnung (siehe Abb. 6-13).

Tabelle 6-1: Vergleich zweier Filterkonfigurationen für die gleiche Filterkammer

Partikeln	Versuchsbedingungen					Ergebnisse		Referenz
	$v_0$ in m/h	$B_0$ in T	Anord- nung	L in mm	$\varepsilon$	$\varphi_{10\%}$ in %	$\sigma_{10\%}$ in $\text{kg/m}^3$	
Mm	24	0.4	L <sup>1)</sup>	50	0.96	99.8	120	diese Arbeit
Mm	24	0.4	T/t <sup>2)</sup>	50	0.96	99.1	66	diese Arbeit

1) geordnete longitudinale Anordnung

2) 50% der Dräfte in transversaler, 50% in „toter“ Anordnung (Dräfte stehen in Richtung des Magnetfelds)

Um diese nachteiligen Effekte zu verhindern, muss bei der Verwendung eines Permanentmagneten als Feldquelle idealerweise eine Konfiguration angestrebt werden, bei der sich die Drähte in einer transversalen und/oder in einer axialen Anordnung befinden. Eine gemischte transversal-/axiale Anordnung erreicht man durch Schichten von Drahtgewebe, dessen Ebenen senkrecht zu den Feldlinien des Permanentmagneten stehen. Diese Anordnung wurde für das integrierte HGMS-System vom Typ HGF-10 verwendet (siehe Abschnitt 6.1.2).

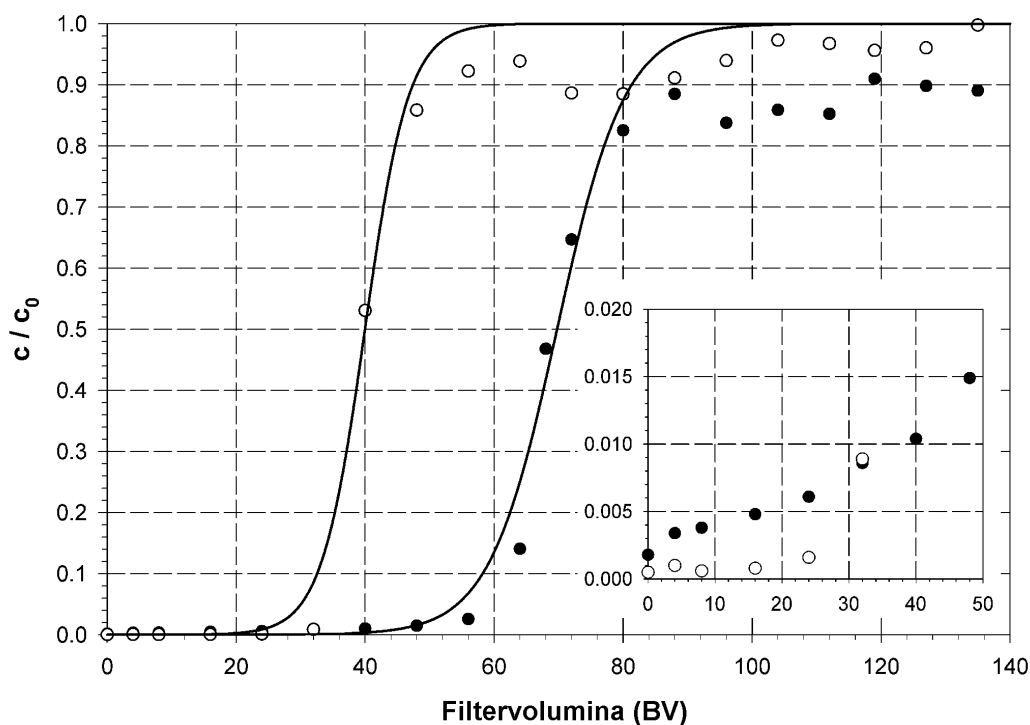


Abb. 6-13: Durchbruchkurven für die Feldrichtung parallel (●) und senkrecht zur Strömung (o). Die beiden Experimente wurden bei gleicher Feldstärke in einer Spule bzw. in einem Permanentmagneten durchgeführt. Das eingesetzte Diagramm stellt den anfänglichen Durchbruch vergrößert dar. Magnetit-Partikeln ‚Mm‘,  $c_0 = 2.0 \text{ g/L}$ ,  $v_0 = 24 \text{ m/h}$ ,  $B_0 = 0.4 \text{ T}$ ,  $L = 50 \text{ mm}$ ,  $\varepsilon = 0.96$ , Konzentrationsbestimmung mittels ICP-OES.

### 6.1.1.7 Verschiedene Partikeltypen

In den bisher beschriebenen HGMS-Versuchen wurden nur Modellpartikeln vom Typ ‚Mm‘ verwendet. Diese Partikeln haben den Vorzug, dass sie einfach, schnell und kostengünstig in größeren Chargen hergestellt werden können. Allerdings sind die Partikeln nur bedingt als Modellsystem für echte so genannte „Magnetic beads“ geeignet, wie sie als Affinitätssorbentien oder Enzymträgerpartikeln in der Biotechnologie Verwendung finden. Nachteilig ist insbesondere die deutlich breitere Partikelgrößenverteilung der Partikeln vom Typ ‚Mm‘. Die spezifische Magnetisierung ist dagegen durchaus vergleichbar, wobei die Mm-Partikeln allerdings eine geringe magnetische Remanenz besitzen, während viele „magnetic beads“ superparamagnetisch sind. Die Oberflächen der unfunktionalisierten ‚Mm‘-Partikeln unterscheiden sich außerdem deutlich von denen der funktionalisierten magnetischen Affinitätssorbentien.

Um die Auswirkungen dieser Eigenschaftsunterschiede auf die HGMS der Partikeln zu untersuchen, wurden Versuche mit verschiedenen Partikeltypen unter sonst gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Verwendet wurden neben „Mm“-Partikeln solche vom Typ „MJH“ und „Silica“. Die DBK für die drei Partikeltypen sind in Abb. 6-14 dargestellt.

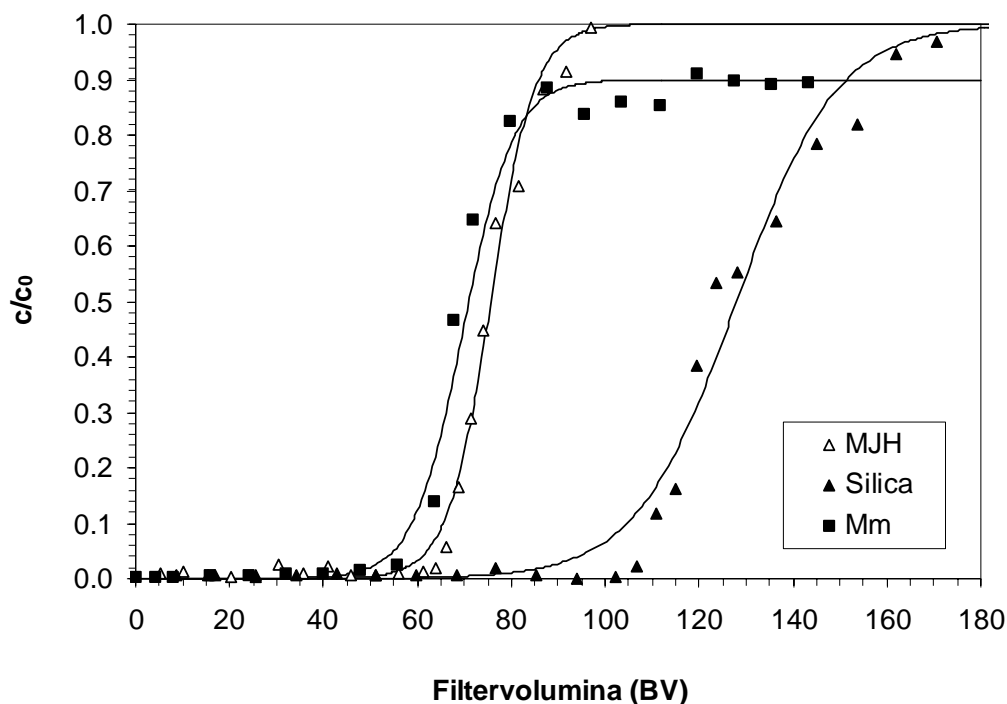


Abb. 6-14: Durchbruchskurven für unterschiedliche Magnetpartikeln; Filtergeschwindigkeit 24 m/h, Flusssichte 0,4 T, Partikelkonzentration 2 g/L, L = 50mm. Konzentrationsbestimmung mittels ICP-OES.

Zu erkennen ist, dass alle Partikeln mit hohen Abscheidegraden separiert werden können. Die mittleren Abscheidegrade  $\varphi_{10\%}$  bis zum Erreichen eines 10%-igen Durchbruchs sind in Tabelle 6-2 aufgeführt und liegen für alle Partikeln über 98,5%.

Die Modellpartikeln „Mm“ erlauben im Unterschied zu den „Magnetic beads“ von Typ MJH allerdings nur eine um etwa 11% geringere nutzbare Kapazität. Außerdem ist erkennbar, dass die Ablaufkonzentration für die Mm-Partikeln nicht zur Gänze die Zulaufkonzentration erreicht. Selbst nach erfolgtem Filterdurchbruch werden etwa 10% der Partikeln im Zulauf im Separator zurückgehalten. Dies spricht für eine breite Verteilungsfunktion der magnetischen Eigenschaften und/oder der Partikelgrößen. Vermutlich entstehen bei der Herstellung der Partikeln vom Typ Mm mehrere mineralogische Phasen wie Magnetit, Maghämüt und andere Eisenoxide mit unterschiedlicher Sättigungsmagnetisierung, so dass ein Anteil mit hoher Magnetisierung selbst nach Durchbruch der Hauptfraktion noch separiert werden kann. Das vollständige Durchbrechen der Partikeln MJH und Silica auf die Zulaufkonzentration spricht für eine enge Partikelgrößenverteilung und eine homogene Zusammensetzung der Partikeln.

Heebøll-Nielsen *et al.* (2002) erreichten unter Verwendung des gleichen Matrixstahls in weitgehend ungeordneter Filteranordnung bei gleichen Partikeln MJH und sonst gleichen Versuchsbedingungen (gleiche Filtergeschwindigkeit, Flusssdichte, Wasser als Medium) aber sogar höherem Matrixanteil von 10% im Vergleich zu 4% und größerer Filterlänge (70 mm) nur etwa 50% der Kapazität, die in dieser Arbeit für eine geordnete Matrix in longitudinaler Konfiguration erreicht wurde (vgl. Tabelle 6-2). Ähnlich geringe Werte wurden von Hubbuch (2001) für die gleiche ungeordnete Anordnung berichtet. Dieser Sachverhalt deckt sich mit der in Abschnitt 6.1.1.6 gewonnenen Erkenntnis, dass sich Drahtanteile, die in Feldrichtung angeordnet sind, bei guten Abscheidegraden stark negativ auf die Filterkapazität auswirken.

Tabelle 6-2: Vergleich des mittleren Abscheidegrads und der nutzbaren Kapazität, jeweils für  $B_0 = 0.4$  T und  $v_0 = 24$  m/h.

Versuchsbedingungen				Ergebnisse			Referenz
Partikeln	Anordnung	L in mm	$\epsilon$	$\phi_{10\%}$ in %	$\sigma_{10\%}$ in $\text{kg/m}^3$	$\sigma_{10\%}/\rho_p$ in %v/v	
Mm	L <sup>1)</sup>	50	0.96	99.1	120	3.75	diese Arbeit
MJH	L <sup>1)</sup>	50	0.96	98.5	135	4.82	diese Arbeit
Silica	L <sup>1)</sup>	50	0.96	99.2	220	~ 4.3	diese Arbeit
MJH	A/T/t <sup>2)</sup>	65	0.90	n.b.	70 <sup>3)</sup>	2.50	Hubbuch (2001)
MJH	A/T/t <sup>2)</sup>	70	0.90	n.b.	67	2.39	Heebøll-Nielsen (2002)
Mm	A/T <sup>4)</sup>	120	0.96	99.9	96	3.00	diese Arbeit

1) geordnete longitudinale Anordnung

2) ungeordnete Anordnung mit axialen, transversalen und unwirksamen Drahtanteilen, Maschen-Gewebe,  $b \sim 55 \mu\text{m}$ , gerollt

3) vorbeladener Filter, für neuen oder gereinigten Filter lagen die Kapazitäten um ~30% höher.

4) geordnete axial-/transversale Anordnung (unter Verwendung des HGF-10-Separators; vgl. Abschnitt 6.1.2.1)

Die sehr hohe (Massen-)Kapazität für die Silica-Magnetit-Partikeln kann vermutlich im Wesentlichen durch die hohe Feststoffdichte der kompakten Magnetit-Einkristalle erklärt werden. Nimmt man für deren Dichte den Literaturwert für reinen Magnetit an, so ist die Kapazität vergleichbar mit den MJH-Magnetbeads (vgl. Tabelle 6-2).

### 6.1.1.8 Partikelwiedergewinnung

Die Verwendung magnetischer Affinitätsträger in der Biotechnologie macht eine Partikelwiederverwendung aufgrund der vergleichsweise hohen Herstellungskosten der Partikeln zwingend notwendig. Aber auch um eine effiziente Elution gebundener Zielmoleküle zu gewährleisten oder um Waschschriffe durchzuführen, ist eine intermediäre Partikelwiedergewinnung zwischen verschiedenen Prozessschritten von Nöten. Im Folgenden sind daher die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt, die zum Ziel hatten Partikeln von vorbeladenen HGMS-Matrices möglichst vollständig wiederzugewinnen. Die Wiedergewinnung der Partikeln erfolgt sinnvollerweise stets unter Abschaltung des

Magnetfeldes. Neben den Magnetkräften werden die auf der Matrix abgeschiedenen Partikeln allerdings durch weitere physikalische Kräfte an der Matrix gehalten, wie Van-der-Waals- und elektrostatischen Kräfte. Im Allgemeinen werden hohe Strömungsgeschwindigkeiten zur Erzeugung hoher Scherspannungen angewandt. Zur Verlängerung der Einwirkzeit der Scherkräfte konnte die Spülflüssigkeit mehrfach im Kreislauf durch den HGMS gespült werden. Im Rahmen der Arbeit wurde zusätzlich der Einfluss von Ultraschall (US) auf die Effizienz der Partikelwiedergewinnung untersucht.

In den folgenden Abbildungen sind die Partikelwiedergewinnungsanteile nach 1 bis 4 Spülzyklen für verschiedene Spülstrategien dargestellt. Hierzu zählen (i) die Anwendung einer Spülung im Kreislauf mit hoher Strömungsgeschwindigkeit, (ii) der Eintrag von Ultraschall und (iii) die Kombination der beiden. Nach jedem Spülzyklus erfolgte das Ausspülen von 200 mL Suspension und eine Probenahme bevor sich ein weiterer Spülzyklus anschloss. In Abb. 6-15 sind die Wiedergewinnungsanteile mehrerer Versuche dargestellt, bei denen die Filtermatrix nach Vorbeladung unter 0.4 T und 24 m/h Filtergeschwindigkeit über Kreislaufspülen wahlweise mit und ohne zusätzlichen Ultraschalleintrag gespült wurde. Durch alleiniges Kreislaufspülen werden nur durchschnittlich 65% der abgeschiedenen Partikeln nach 4 Spülzyklen wiedergewonnen. Durch die zusätzliche Anwendung von Ultraschall kann der Wiedergewinnungsanteil auf über 99% gesteigert werden. Wie Abb. 6-16 zeigt, liefert auch der alleinige Eintrag von Ultraschall ohne Kreislaufspülen nur geringfügig höhere Anteile an wiedergewonnenen Partikeln als das alleinige Kreislaufspülen. Erst durch die Kombination der beiden Maßnahmen wurde eine nahezu vollständige Reinigung der vorbeladenen Matrix erzielt.

Der Einfluss des verwendeten Filtermatrixmaterials ist in Abb. 6-17 aufgezeigt. Eine Matrix mit 1 und 2 mm Maschenweite wurde durch Kreislaufspülen unter Ultraschalleintrag regeneriert. Unter Verwendung der gröberen Matrix wurden um 10% geringere Gesamtwiedergewinnungen erzielt als für die Matrix mit 1 mm Maschenweite. Dies ist vermutlich auf die geringeren Scherkräfte am Ort der Anlagerungen der Partikeln auf der Drahtoberfläche zurückzuführen.



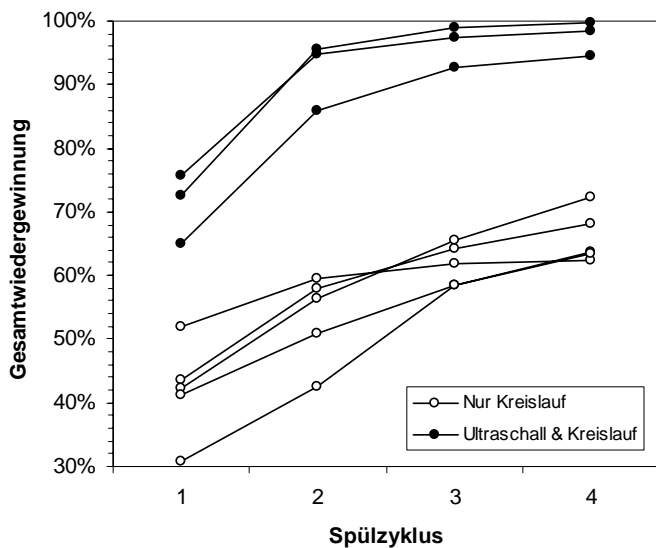


Abb. 6-15: Gesamtwiedergewinnung von Mm-Partikeln mit Kreislaufspülung (212 m/h, 1min je Zyklus) mit und ohne Ultraschalleintrag; je Methode wurden mehrere Versuche unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

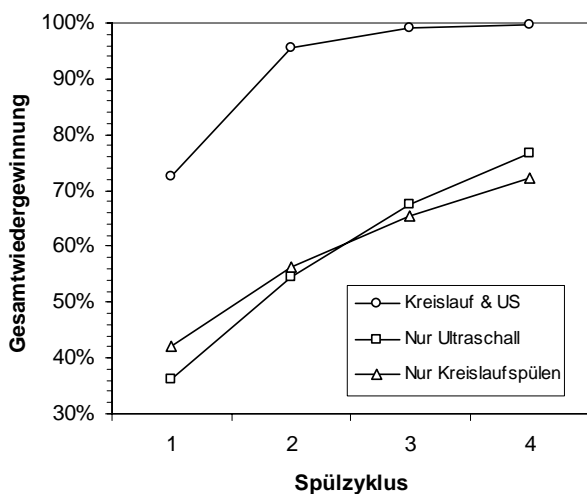


Abb. 6-16: Gesamtwiedergewinnung von Mm-Partikeln mit/ohne Kreislaufspülung (212 m/h, 1 min je Zyklus) und mit/ohne Ultraschalleintrag.

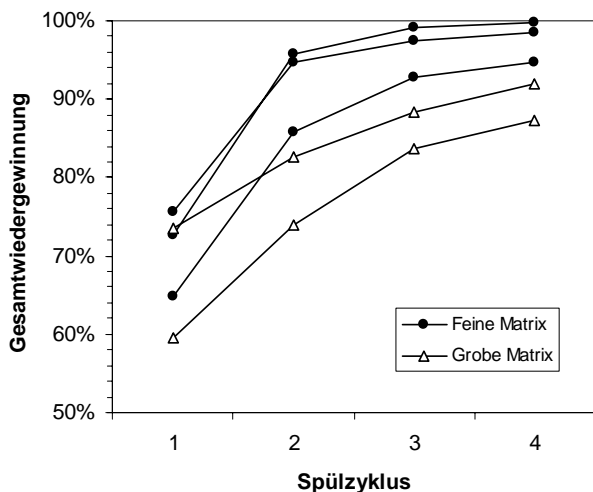


Abb. 6-17: Gesamtwiedergewinnung von Mm-Partikeln mit Kreislaufspülung (212 m/h, 1 min je Zyklus) mit Ultraschalleintrag für feines (1.0x0.224) und grobes (2.0x0.5) Matrixmaterial; je Matrixtyp wurden mehrere Versuche durchgeführt.

### 6.1.1.9 HGMS von Hefe/Magnetit-Suspensionen

Zur Charakterisierung der Separation von Magnetpartikeln aus Biosuspensionen wurden als Modellsystem Suspensionsmischungen von Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) und Magnetit „Mm“ in Phosphatpuffer (pH 7.0) verwendet. Zur Bestimmung der Einzelkonzentrationen der Filterablaufproben, wurde die Gesamtkonzentration gravimetrisch nach Filtration durch 0.45  $\mu\text{m}$  Cellulosenitratfilter und Trocknung bestimmt. Die Bestimmung der Magnetpartikeln erfolgte durch Eisenanalytik (ICP-OES) nach Auflösen der Proben in  $\text{HNO}_3$ .

#### Separation und Rückgewinnung

In Abb. 6-18 sind die relativen Ablaufkonzentrationen für Magnetit und für die Hefezellen im Verlauf eines Separationsexperiments dargestellt. Die Kapazität und Effizienz der Separation unterscheidet sich nicht signifikant von der Separation zellfreier Magnetit-Suspensionen. Die mittlere Separationseffizienz bis zum Durchbruch von 1 % liegt bei 99.2 % wobei eine Kapazität von  $87 \text{ kg/m}^3$  erreicht wird. Lässt man einen Durchbruch von 5 % zu, so wird eine mittlere Effizienz von 98.4 % bei einer Kapazität von  $108 \text{ kg/m}^3$  erreicht. Die Sättigungskapazität nach vollständigem Durchbruch beträgt  $158 \text{ kg/m}^3$ . Obwohl Schwankungen der Hefe-Ablaufkonzentration auftreten, lässt sich anhand Abb. 6-18 keine signifikante Akkumulation an Hefezellen innerhalb des Separators feststellen. Die mittlere Hefeablaufkonzentration entspricht nahezu dem Zulauf.

Die Wiedergewinnung der abgeschiedenen Partikeln erfolgte durch Kreislaufspülen unter Ultraschalleintrag. Bereits nach 2 Spülzyklen konnten 98.05% der Partikeln aus der Matrix wiedergewonnen werden. Nach 4 Zyklen wurden mit 99.52% nahezu sämtliche Partikeln wiedergewonnen.

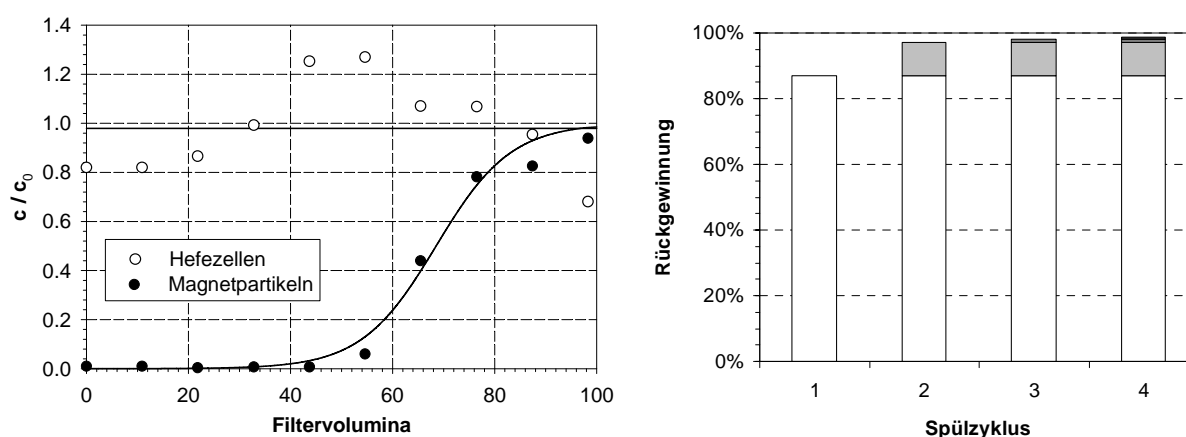


Abb. 6-18: DBK für Magnetit und Hefe;  $c_{\text{Mm}} = 2 \text{ g/L}$ ,  $c_{\text{Hefe}} = 2 \text{ g/L}$ , Phosphatpuffer (0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0),  $L = 45 \text{ mm}$ ,  $B_0 = 0.4 \text{ T}$ ,  $v_0 = 24 \text{ m/h}$ , Filterporosität 0.96; Partikelwiedergewinnung durch zyklisches Kreislaufspülen bei 210 m/h unter US-Eintrag.

### *Einfluss der Gesamtpartikelkonzentration*

Die Gesamtpartikelkonzentration wurde im Vergleich zum vorangegangenen Experiment verringert, die Hefe- und Magnetitkonzentration betragen je 0.9 g/L. Im Vergleich zu oben werden geringere Schwankungen der Hefeablaufkonzentration beobachtet, der Durchbruch der Hefezellen ist von Beginn an nahezu vollständig. Die Kapazität für den magnetischen Partikelanteil ist im Vergleich zur höheren Gesamtkonzentrationen um etwa 40% erhöht. Legt man die modellierte Durchbruchskurve zugrunde beträgt die Erhöhung der Kapazität allerdings nur etwa 10%. Die Effizienz bis zum Durchbruch von 1% ist mit 99.42% vergleichbar mit dem Versuch bei höherer Gesamtkonzentration.

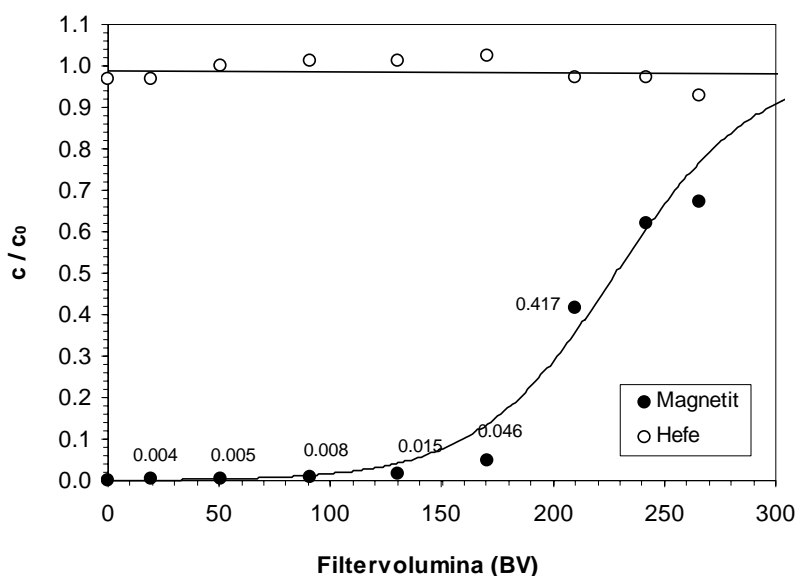


Abb. 6-19: DBK für Magnetit und Hefe;  $c_{Mm} = 0.9$  g/L,  $c_{Hefe} = 0.9$  g/L, Phosphatpuffer 0.1 mol/L (pH 7.0),  $L = 50$  mm,  $B_0 = 0.4$  T,  $v_0 = 24$  m/h, Filterporosität 0.96

### *Einfluss der Zellkonzentration*

Die HGMS der magnetischen Modellträgerpartikeln Mm aus einer Hefezellsuspension führte zu nahezu ebenso hohen Abscheidegraden wie bei der Separation der zellfreien Suspension (vgl. Abb. 6-20). Nur bei der Verwendung sehr hoher Zelldichten von 500 g/L BFM trat ein sofortiger Durchbruch von 1.4% der Zulaufkonzentration auf, gefolgt von einem flachen Durchbruchverhalten.

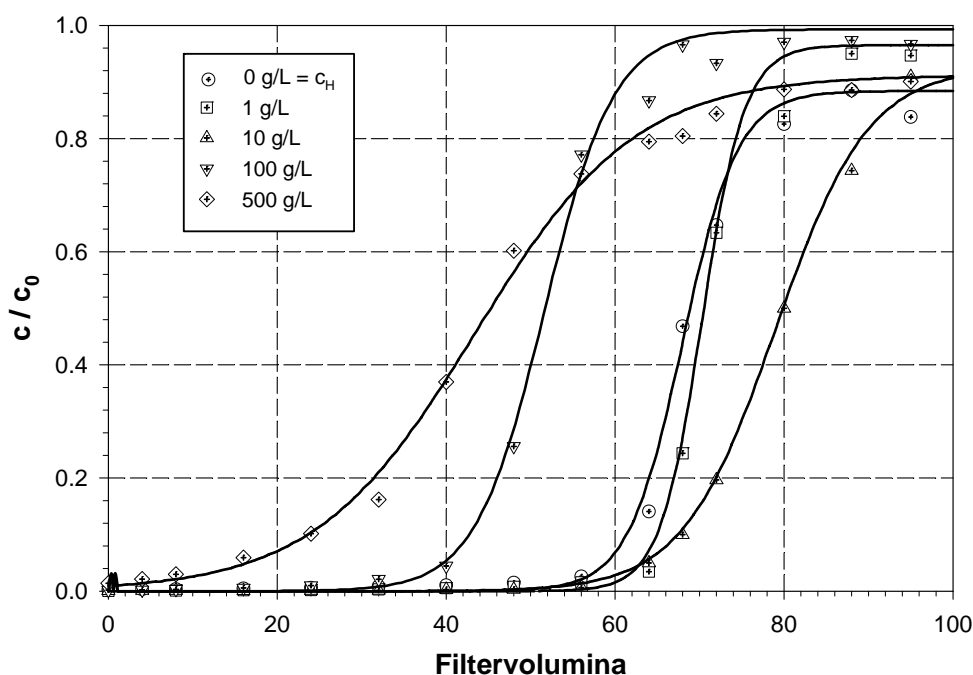


Abb. 6-20: Durchbruchkurven für die Separation von  $1\mu\text{m}$  großen Magnetit Partikeln 'Mm' von Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) mit einer in der Legende angegebenen Biofeuchtmasskonzentration; das Fluid war 20 mmol/L Natriumphosphatpuffer bei pH 7.0; Magnetpartikelkonzentration 2.0 g/L, Strömungsgeschwindigkeit 24 m/h, Flussdichte 0.4 T, Filterlänge 50 mm, longitudinale Filteranordnung (Solenoid).

Hubbuch (2001) berichtet für ungepufferte Hefezellsuspensionen in Wasser unter Verwendung von Polyglutaraldehyd-beschichteten MJH-Trägern von einer Adsorption der positiv geladenen Magnetpartikeln an die negativ geladenen Zellwände. Dadurch wurde eine Koagulation der Gesamtsuspension (Heterokoagulation) verursacht, die in einem HGMS-Experiment zu einem sofortigen Filterdurchbruch ohne Abscheidung der Magnetpartikeln führte. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit unter Verwendung gepufferter Suspensionen aus Hefezellen und Magnetpartikeln nicht gemacht werden. Auch für gepufferte Suspensionen aus *E. coli*-Zelldebris mit Magnetpartikeln wurde eine gute Separierbarkeit mittels HGMS erzielt (vgl. Kapitel 6.4).

Dieser Vergleich zeigt, dass das Puffermedium sowohl für die Partikel-Zell-Interaktion als auch für die Wechselwirkung zwischen den gleichartigen Partikelarten entscheidend ist. Einheitliche Partikeln besitzen die selbe Oberflächenladung, die über eine Zetapotentialmessung charakterisiert werden kann. Die Oberflächenladung ist bei höheren pH-Werten negativ, bei geringen pH-Werten positiv. Der Vorzeichenwechsel findet beim so genannten isoelektrischen Punkt statt. Der korrespondierende pH-Wert wird häufig mit pI (isoelektrischer Punkt) bezeichnet. Die Stabilität der Suspension gleichartiger Partikeln wird durch die DLVO-Theorie (Derjaguin 1941, Verwey 1948) beschrieben, die eine zunehmende Destabilisierung der Suspension mit zunehmender Ionenstärke und abnehmender Oberflächenladung voraussagt. Zur Verhinderung einer Koagulation gleichartiger Partikeln (Homokoagulation) sollte demnach der pH-Wert nicht nahe am pI-Wert liegen und sollte die Salzkonzentration nicht zu hoch gewählt werden.

In Suspensionen mit zwei unterschiedlichen Partikelarten spielen die pI-Werte beider Partikelarten eine Rolle. Hefezellen besitzen einen pI-Wert von etwa 3 (Dauer 1991), während der pI-Wert für PGA-beschichtete Magnetpartikeln bei etwa 7.2 liegt (Hubbuch 2001). Dies führt dazu, dass bei einem meist verwendeten pH-Wert um 6.8 die Hefezellen eine negative, die Magnetpartikeln aber eine positive Oberflächenladung tragen und deshalb in ungepufferten Medien koagulieren können. Wird allerdings die Ionenstärke der Lösung erhöht, so können die Oberflächenladungen durch eine Ionenhülle um die Partikeln maskiert werden, so dass keine Koagulation der unterschiedlich geladenen Partikeln mehr eintritt. Um gleichzeitig eine Homokoagulation gleichartiger Partikel zu verhindern, darf die Salzkonzentration aber auch nicht zu hoch gewählt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Phosphatpuffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0, eingestellt durch NaOH) in den Konzentrationen zwischen 20 und 100 mmol/L  $\text{PO}_4^{3-}$  ließen keine Heterokoagulation bzw. Beeinträchtigung der Magnetseparation beobachten.

Die folgende Abb. 6-21 zeigt den Einfluss der Zellkonzentration bzw. der damit verbundenen Viskosität der Suspension auf die Sättigungskapazität der HGMS-Matrix. Die Viskositätsmessungen der Zellsuspensionen in Natriumphosphatpuffer wurden ohne Magnetitanteil mittels eines Hoesppler-Kugelfallviskosimeter bei 25°C durchgeführt.

Bis zu einer Zellkonzentration von etwa 10 g/L BFM lässt sich kein signifikanter Rückgang der Kapazität feststellen (vgl. Abb. 6-20 und Abb. 6-21 links), für noch höhere Konzentrationen von 100 g/L wird vermutlich ein Teil der Zellen in die HGMS-Anlagerungsbereiche im Filter mit eingeschlossen. Diese ‚mechanische‘ Einlagerung ist aber nicht mit einer Koagulation, zu vergleichen, bei der ein sofortiger Durchbruch auftreten würde (vgl. Hubbuch 2001). Die teilweise Einlagerung von Zellen in die Anlagerungsbereiche macht aber deutlich, dass sich für die Aufreinigung von Biomolekülen nach der Magnetseparation ein Waschschriff der Partikeln anschließen muss, um noch den Partikeln anhaftende Zellen vollständig zu entfernen.

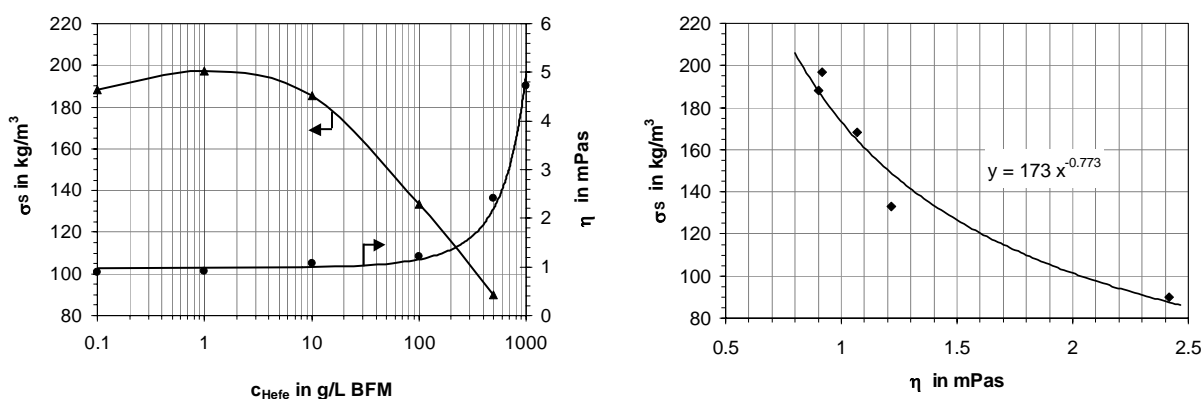


Abb. 6-21: Einfluss der Zellkonzentration auf die Sättigungskapazität des HGMS

Der Einfluss der Zellkonzentration bzw. der Suspensionsviskosität auf die relative Anfangsdurchbruchkonzentration zeigt Abb. 6-22. Unterhalb einer Zellkonzentration von 100 g/L BFM liegt diese stets unterhalb 0.2%, steigt bei höherer Zellkonzentration jedoch deutlich an. Bei der sehr hohen Zellkonzentration von 500 g/L tritt entsprechend ein sofortiger Durchbruch von 1.4% der Zulaufkonzentration auf. Die Tatsache, dass selbst bei derart hohen Zellkonzentrationen noch eine effektive Magnetseparation möglich ist, bestätigt nochmals die Vermutung, dass unter den gewählten Pufferbedingungen keine Heterokoagulation eintritt, sondern die verminderte Kapazität und Abscheideeffizienz alleine auf die erhöhte Viskosität der Zellsuspension zurückzuführen ist, durch die sich die Magnetpartikeln in Richtung Abscheideträfte bewegen müssen.

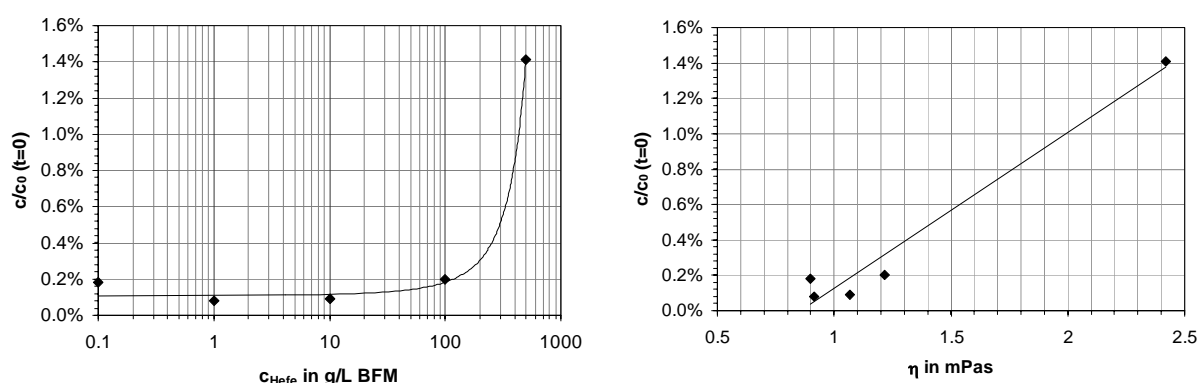


Abb. 6-22: Einfluss der Zellkonzentration auf die (Anfangs-)Abscheideeffizienz des HGMS

## 6.1.2 Integriertes HGMS-System HGF-10

Ziel der Konstruktion und der Fertigung eines integrierten HGMS Systems war es, die zuvor unter der Verwendung des Labor-HGMS gewonnenen Kenntnisse in ein upscale-fähiges industrielles System zu übertragen und die speziellen Erfordernisse wie Kosteneffizienz (durch Verwendung eines neuartigen schaltbaren Permanentmagnetsystems) und Automatisierung der Prozessschritte (durch Computersteuerung von Ventilen, Pumpen, Ultraschallwandler und Magnetmotor) zu erfüllen.

Wie bereits in Abschnitt 6.1.1.6 erörtert, lassen sich durch Verwendung einer kombinierten Filteranordnung, bei der sich je 50% der Drähte in einer transversalen bzw. in einer axialen Anordnung befinden, hohe Filterkapazitäten zusammen mit einer maximaler Feldausnutzung erzielen. Nähere Angaben zu dem verwendeten Matrixpaket und zum Aufbau des Magnetseparators finden sich im konstruktiven Teil der Arbeit.

### 6.1.2.1 Vergleich zwischen HGF-10 und Labor-HGMS

Zunächst wurde ein Vergleich der Separation zwischen dem Labor-HGMS und dem neuen System HGF-10 gezogen. In Abb. 6-23 sind DBK des Labor-HGMS sowie des HGF-10 gegenübergestellt. Die Kapazität des HGF-10 ist um etwa 30% geringer als die des Labor-

HGMS, wobei dies vermutlich in der weniger homogenen Durchströmung der quaderförmigen HGF-10 Matrix begründet liegt. Eine gleichmäßige Flüssigkeitsaufgabe ist im Vergleich zur zylindrischen Filterkammer des Labor-HGMS schwieriger, so dass bestimmte Bereiche des Matrixpakets vermutlich nur unzureichend mit Suspension durchströmt werden. Außerdem erreicht die Flussdichte im Luftspalt des HGF-10 mit 0.32 T nicht ganz die Flussdichte, die standardmäßig für den Labor-HGMS verwendet wurde. Die unter Verwendung des Labor-HGMS gewonnenen prinzipiellen Abhängigkeiten erscheinen für den industriellen Prototyp trotz veränderter Matrixkonfiguration jedoch ihre Gültigkeit zu behalten.

Die Filtereffizienz für den HGF-10 Typ erreicht in der Anfangsphase der Separation höhere Werte, was in der größeren Filterlänge des HGF-10 von 12 cm im Vergleich zu 5 cm begründet liegt (vgl. Abb. 6-23 rechts). Sie beträgt im Mittel bis zum Erreichen eines 1%-igen Durchbruchs 99.88% für den HGF-10 und 99.5% für den Labor-HGMS.

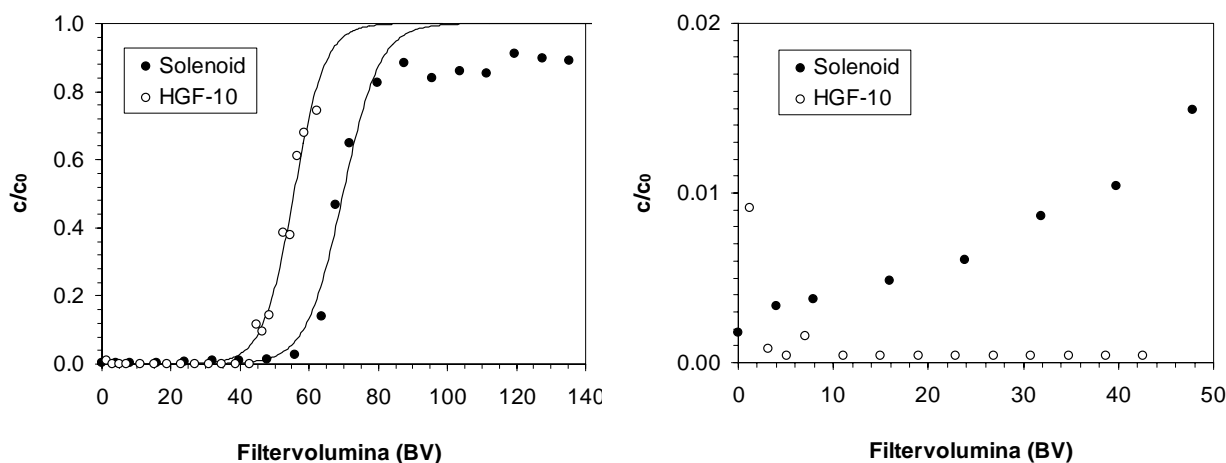


Abb. 6-23: Vergleich der beiden HGMS-Systeme;  $v_0 = 24$  m/h,  $c_0 = 2$  g/L, Mm-Partikeln, feiner Matrixtyp (1x0.224 mm)

### 6.1.2.2 Partikelwiedergewinnung (HGF-10)

Die Partikelwiedergewinnung nach erfolgter Separation erfolgte durch einminütiges Kreislaufspülen bei Maximalgeschwindigkeit der Pumpe entsprechend einer Filtergeschwindigkeit von 70 m/h und gleichzeitigem Eintrag von Ultraschall in das Filtergehäuse. Danach wurde mit 1 L deionisiertem Wasser ausgespült und der nächste Spülzyklus gestartet. Nach 4 Regenerationszyklen wurde die Matrix ausgebaut und im Ultraschallbad vollständig gereinigt. Die im Ultraschallbad zurückbleibende Partikelmenge dieser Reinigung wurde ebenfalls bestimmt. In Abb. 6-24 ist die Gesamtrückgewinnung in Abhängigkeit der angewandten Spülzyklen aufgetragen. Nach 4 Spülzyklen verblieben immer noch über 30% auf der Separationsmatrix. Die ungenügende Wiedergewinnung der Partikeln liegt zum Einen sicherlich an der bautechnisch bedingten vergleichsweise niedrigen Rückspül-Filtergeschwindigkeit von maximal 70 m/h, zum Anderen aber auch an einer geringen Ultraschall-Amplitude von nur 1-2  $\mu$ m (gemessen an der Filterkammerober-

fläche). Hinzu kommt, dass die Leistungsaufnahme des verwendeten Ultraschallprozessors von 130 W nicht die Nennleistung von 250 W erreichte. Außerdem ist vermutlich die Schallabsorption innerhalb der Matrix nicht homogen und damit die Wirkung des Ultraschalls im Matrix-Inneren nicht ausreichend, um eine vollständige Partikelablösung zu bewirken. Dies ist beim Labor-HGMS weniger relevant, da die erforderliche Eindringtiefe hier maximal 15 mm beträgt, während beim HGF-10 bis zu 80 mm notwendig sind und die Leistung über eine Länge von 120 mm eingebracht wird.

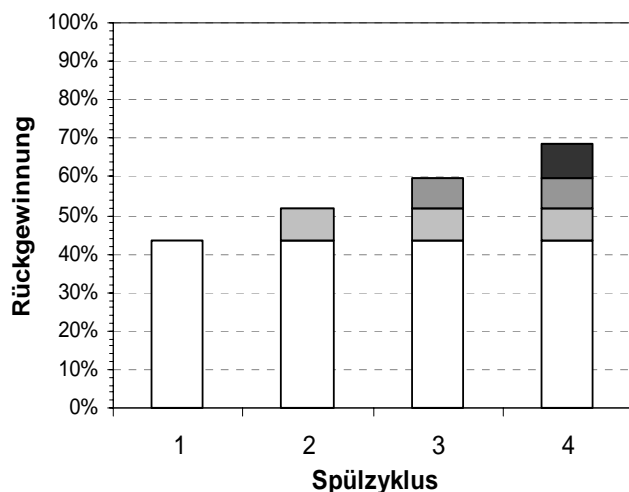


Abb. 6-24: Partikelwiedergewinnung im HGF-10; zur Rückspülung wurde im Kreislauf gespült (je Zyklus 1 min bei 70 m/h) und gleichzeitig Ultraschall (130 W) eingetragen.

Für eine gute Partikelwiedergewinnung sollte in technischen Magnetseparationsanlagen daher auf eine ausreichende Rückspülgeschwindigkeit oberhalb etwa 200 m/h und auf effiziente zusätzliche Maßnahmen für einen Energieeintrag geachtet werden. Neben Ultraschall bieten sich hierfür mechanische Vibrationen bzw. eine Flüssigkeitspulsation an.



## 6.2 Offene-Gradienten Magnetseparation (OGMS)

Neben der diskontinuierlich betriebenen HGMS wurde als weiteres Separationsverfahren die kontinuierlich arbeitende Offene-Gradienten Magnetseparation (OGMS) auf eine Eignung zur Separation magnetischer Mikropartikeln hin untersucht. Zur Charakterisierung des Einflusses der relevanten physikalischen Größen auf die Separationseffizienz wurde zunächst der OGMS-Laborseparator (siehe Abschnitt 3.4.1) unter Verwendung von Magnetitpartikeln ‚Mm‘ untersucht. Zur Realisierung eines Upscalings und zur Verbesserung des Konzentratabzugs wurde weiterhin ein OGMS-Separator mit Schlammräumer-Konstruktion verwendet (siehe Abschnitt 3.4.2). Schließlich wurde die kontinuierliche Separation magnetischer Mikropartikeln aus einer Hefezell-Suspension untersucht.

### 6.2.1 Absatzweise betriebene OGMS (ohne Konzentratabzug)

Anhand des Labor-OGMS wurden zunächst Parameterstudien durchgeführt, um den Einfluss der geometrischen Anordnung, der Strömungsgeschwindigkeit, der Flussdichte und der Verwendung unterschiedlicher Partikeln auf den Abscheidegrad zu bestimmen. Ein Konzentratstrom wurde dabei nicht abgezogen, so dass sich die Partikeln am Boden des Separators zunehmend ansammelten. Die Kapazität des Moduls war jedoch stets ausreichend, so dass es im Versuchszeitraum zu keiner Rückwirkung der Ansammlung auf die Filtratkonzentration kommen konnte.

#### 6.2.1.1 Variation der Einbauhöhe

Zur Auffindung der optimalen Einbauposition wurde die axiale Einbauhöhe variiert und jeweils die Ablaufkonzentration im Filtrat bestimmt. Parallel wurde die Trübung des Filtrats mitaufgezeichnet. In Abb. 6-25 kann man erkennen, dass die minimale Filtratkonzentration bei einer Einbauhöhe 2 cm unterhalb der Standardhöhe erreicht wurde. Dies entspricht etwa einer Aufgabe der Suspension auf die Ebene der Spulenmitte und damit der Gleichgewichtsposition der Partikeln, da auf der Spulenmitte kein Feldgradient auftritt.

Bei der verwendeten Filtergeschwindigkeit von 4.3 m/h und einer Flussdichte von 1.0 T wurde eine minimale Filtratablaufkonzentration von 0.24 % der Zulaufkonzentration erreicht.

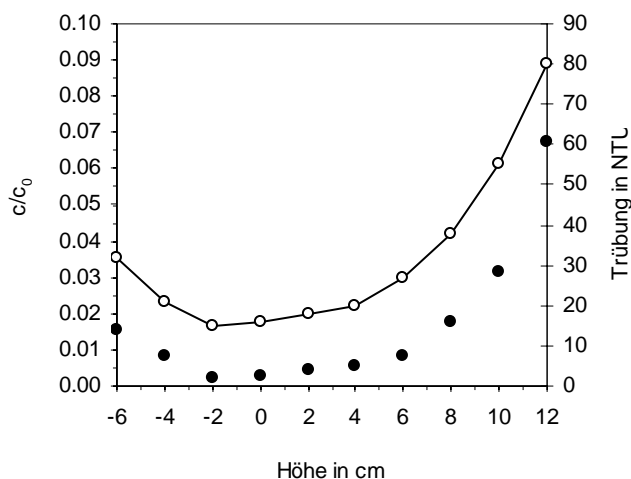


Abb. 6-25:  $c/c_0$  (●) bzw. die Trübung (○) des Filtrats in Abhängigkeit der axialen Einbauposition des OGMS-Separators.

Mm-Partikeln,  $B_0 = 1.0$  T,  $v = 4.25$  m/h  
Die Höhe 0 cm entspricht der auf der Einbauzeichnung (Kap. 3) dargestellten Position.

### 6.2.1.2 Einfluss der Filtrationsgeschwindigkeit und der Flussdichte

Die wichtigsten Einflussfaktoren auf das Separationsverhalten sind neben konstruktiven Faktoren und Stoffgrößen (der Partikeln und des Mediums) die Filtrationsgeschwindigkeit und die Flussdichte des Feldes. Der Einfluss der Flussdichte auf die relative Filtratkonzentration ist in Abb. 6-26 für verschiedene Filtergeschwindigkeiten bei der Verwendung von Magnetit Mm dargestellt. Bei sehr geringen Strömungsgeschwindigkeiten von 0.85 m/h werden selbst bei minimalen Flussdichten von nur 0.1 T Filtratkonzentrationen von maximal 3% der Zulaufkonzentration erreicht. Bei Flussdichten oberhalb 3 Tesla konnten gravimetrisch keine Partikeln mehr im Filtrat nachgewiesen werden. Um gute Filtrationseffizienzen bei Filtergeschwindigkeiten von einigen m/h realisieren zu können, muss die Flussdichte auf mehrere Tesla erhöht werden. Für eine Filtergeschwindigkeit von 2.6 m/h gelangen bei 1.0 T Flussdichte etwa 3.2 % der Partikeln im Zulauf ins Filtrat. Dieser Wert lässt sich jedoch bei Anwendung von 5 Tesla halbieren. Bei einer Filtergeschwindigkeit von 4.2 m/h lassen sich auch bei 5 T nur noch etwa 2.8% des Zulaufs erreichen.

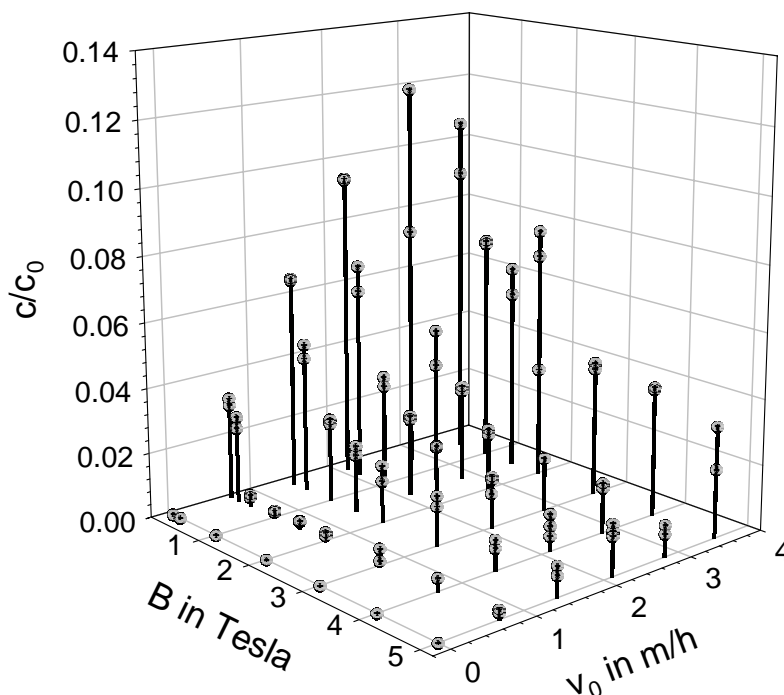


Abb. 6-26: Variation von Flussdichte und Filtrationsgeschwindigkeit für die absatzweise betriebene OGMS von Magnetit Mm. (Für geringe Flussdichten von 0.1–0.25 T treten höhere Filtratkonzentrationen auf, die in der Abbildung nicht dargestellt sind, siehe Abb. 6-27)

Um eine allgemeine Beschreibung der Abscheideeffizienz im Falle der absatzweise betriebenen OGMS zu erzielen, wurde im Theorieteil (Abschnitt 4.2) eine dimensionslose Kennzahl  $\mathbf{M}$  eingeführt, die aus dem Verhältnis aus maximaler Magnetkraft und hydrodynamischer Widerstandskraft gebildet wird:

$$\mathbf{M} = \frac{2b^2 M_{s,p} (\nabla B)_{\max}}{9\eta v_0} \quad \text{Gleichung 6-4}$$

Trägt man die relative Ablaufkonzentration  $\mathbf{C} = c/c_0$  über der  $\mathbf{M}$ -Zahl doppel-logarithmisch auf, so erhält man die in Abb. 6-27 gezeigte Darstellung. Man erhält einen einheitlichen Zusammenhang der Abscheideeffizienzen durch:

$$\mathbf{C}(\mathbf{M}) = \frac{\mathbf{C}_1}{\mathbf{M}^{1.1}} \quad \text{Gleichung 6-5}$$

Hierbei wurde die relative Ablaufkonzentration  $\mathbf{C}_1$  bei der  $\mathbf{M}$ -Zahl von 1 zu 0.017 ermittelt. Dass für diesen Fall gleicher Magnetkraft und Widerstandskraft noch Abscheideeffizienzen von über 98 % erzielt werden, lässt sich dadurch erklären, dass  $\mathbf{M}$ -Zahlen stets mit den Radien  $b$  unmagnetisierter Partikeln gebildet wurden. Beim Einbringen ins Magnetfeld tritt allerdings eine magnetische Agglomeration der unterschiedlichen Partikeln ein. Die  $\mathbf{M}$ -Zahl steigt damit quadratisch mit dem Agglomeratdurchmesser an, wodurch die Abscheideeffizienz gemäß Gleichung 6-5 entsprechend erhöht wird.

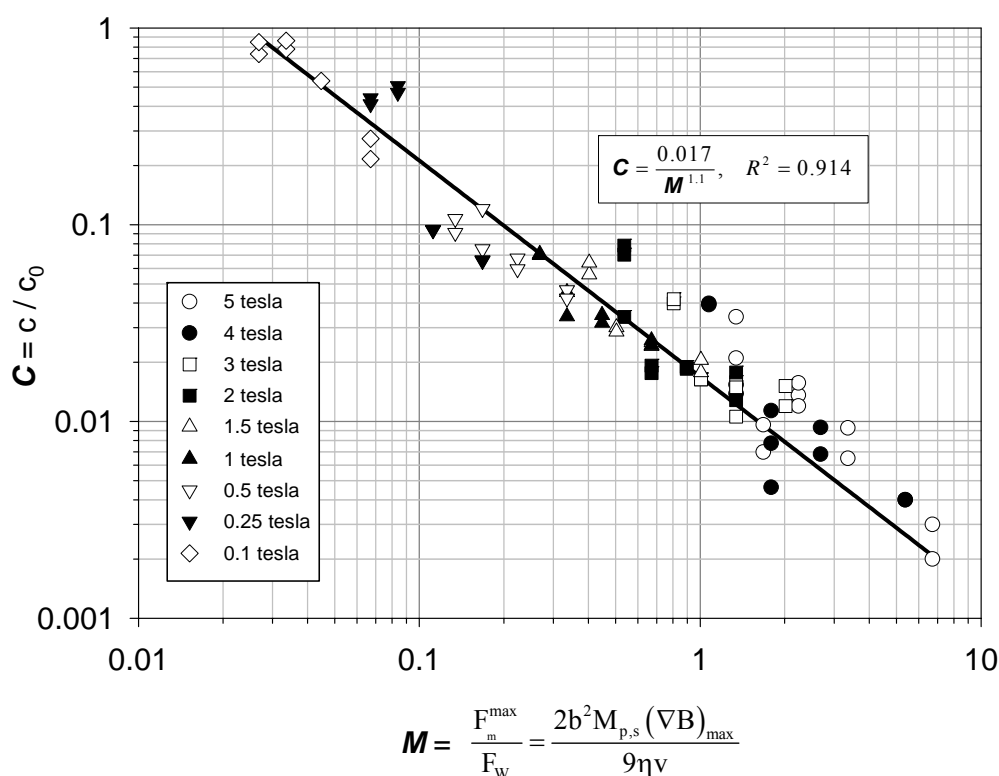


Abb. 6-27: Variation von Flussdichte und Filtrationsgeschwindigkeit für die absatzweise betriebene OGMS von Magnetit ,Mm'

### 6.2.1.3 Verschiedene Partikelsorten

Zur Untersuchung des Einflusses der Partikelart auf die Abscheideeffizienz wurden drei verschiedene Partikelsorten (Mm, Silica und MJH) untersucht. Bei einer konstanten Strömungsgeschwindigkeit von 2.6 m/h wurde daneben die magnetische Flussdichte zwischen 0.05 und 5 Tesla variiert. Die Zulaufkonzentration betrug stets 2 g/L. In Abb. 6-28 ist die relative Ablaufkonzentration im doppelt-logarithmischen Diagramm über der verwendeten magnetischen Flussdichte dargestellt. Es ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Partikelsorten. Bei den Silica-Magnetit-Partikeln lag die Ablaufkonzentration bei 0.25 T bereits bei 0.1% der Zulaufkonzentration. Ab 0.5 T konnten keine Partikel mehr im Filtrat nachgewiesen werden. Bei MJH-Magnetit wurde diese Effizienz erst bei 5 T erreicht. Bei 1 T betrug die Ablaufkonzentration 1% des Zulaufs, bei 0.1 T 25%. Die schlechteste Abscheidung wurde bei Verwendung von Mm-Magnetit erzielt. Selbst bei einer Flussdichte von 5 T wurde noch 1% des Zulaufs im Filtrat gefunden. Bei 1 Tesla stieg die relative Ablaufkonzentration auf 3.2% an.

Um auch bei Verwendung unterschiedlicher Partikelsorten zu einer einheitlichen Darstellung zu gelangen, wurde die relative Ablaufkonzentration wiederum über der dimensionslosen M-Zahl aufgetragen (Abb. 6-29). Allerdings wurde die M-Zahl hier nicht mit dem Radius unmagnetisierter Einzelpartikeln gebildet, sondern die realistischere Annahme einer Partikelagglomeration im Magnetfeld getroffen. Der Partikelagglomeratdurchmesser

wurde für jede Partikelart jeweils so abgeschätzt, dass gerade gilt  $C(1) = 0.5$ . Für den Fall, dass die Magnetkraft gerade der hydrodynamischen Widerstandskraft entspricht, gelangen also gleiche Anteile an Partikelmasse ins Filtrat und ins Konzentrat. Diese Annahme erscheint insofern sinnvoll, da für Partikeln, die sich im Kräftegleichgewicht befinden, die Wahrscheinlichkeit ins Filtrat bzw. Konzentrat zu gelangen, gleich groß ist.

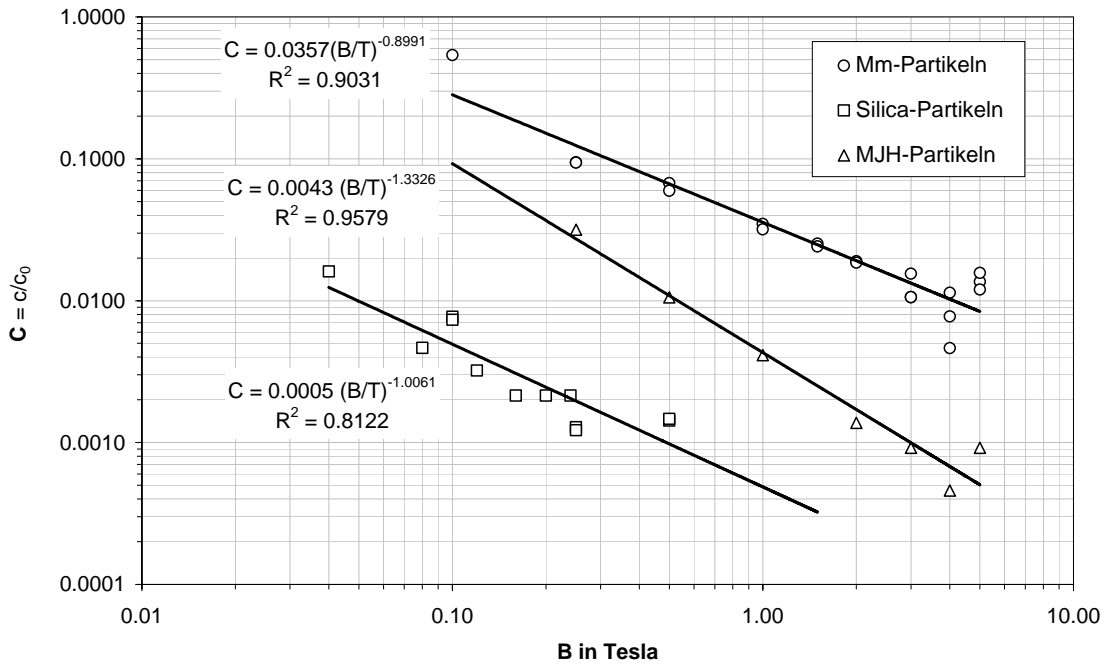


Abb. 6-28: Vergleich verschiedener Partikelsorten bei  $v = 2.6$  m/h

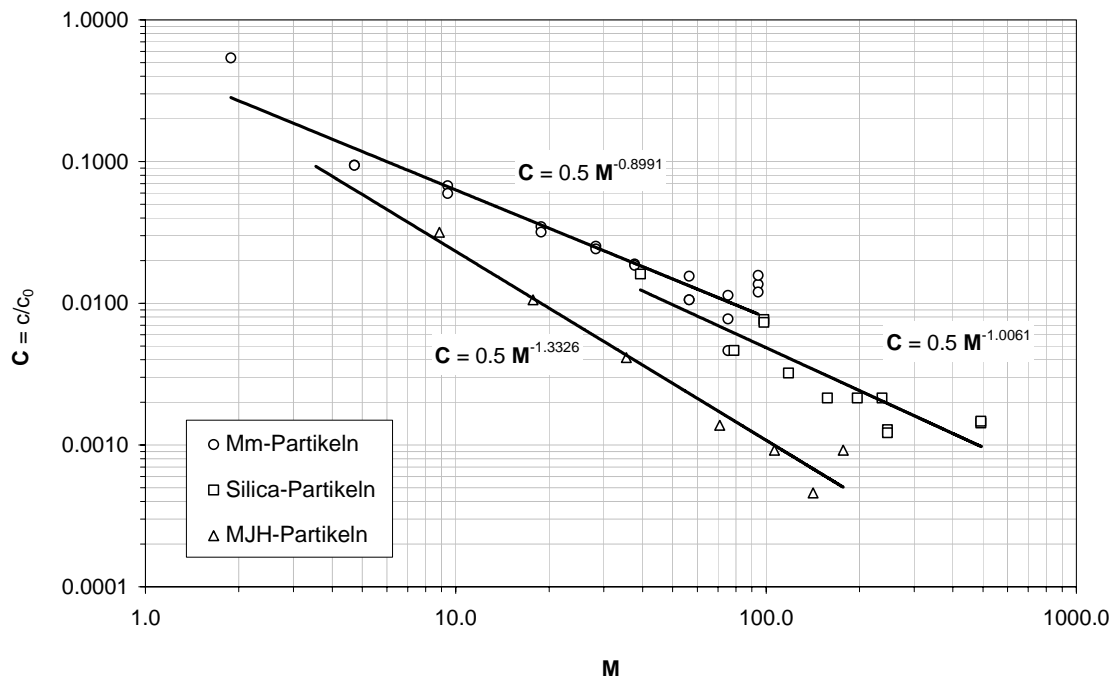


Abb. 6-29: Vergleich verschiedener Partikelsorten bei  $v = 2.6$  m/h

Im doppelt-logarithmischen Diagramm der Abb. 6-29 erhält man also Geraden, die durch den Punkt ( $C = 0.5$ ;  $M = 1$ ) laufen. Die Steigungen der Geraden unterscheiden sich allerdings für die drei Partikelarten. Da für einen "idealen" Separator und monodispersen Partikeln eine Sprungfunktion gemäß

$$\mathbf{C} = \begin{cases} 0 & \text{für } \mathbf{M} \leq 1 \\ 1 & \text{für } \mathbf{M} > 1 \end{cases} \quad \text{Gleichung 6-6}$$

zu erwarten wäre, liegt die Vermutung nahe, dass die Abweichungen vom idealen Verhalten durch die Polydispersität des Partikelkollektivs (mit-)verursacht wird. In Abb. 6-30 ist der Exponent  $\alpha$  der Funktion

$$\mathbf{C}(\mathbf{M}) = \frac{C_1}{\mathbf{M}^\alpha} \quad \text{Gleichung 6-7}$$

in Abhängigkeit der Varianzen der Flächendichteverteilungen  $q_2(x)$  für die verschiedenen Partikelarten dargestellt. Insbesondere für die nicht-magnetisierten Partikeln ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Größen. Ein Anteil der Nichtidealität des Separators kann also auf die Polydispersität des Partikelkollektivs zurückgeführt werden. Für den Grenzfall  $\sigma^2 \rightarrow 0$  ergibt sich formal ein absolutes Maximum der Steigung  $\alpha$  in Gleichung 6-7 von 1.44.

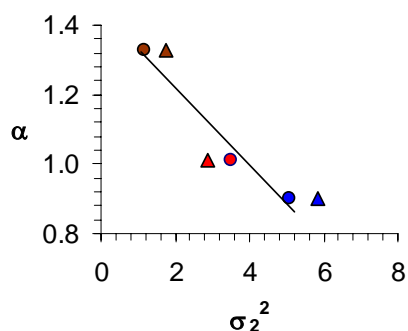


Abb. 6-30: Abhängigkeit des Exponenten  $\alpha$  von der Varianz der Verteilungsfunktion  $q_2(x)$ . Unmagnetisierte Partikeln (●), bzw. magnetisiert bei 1T (▲).

$$\alpha = 1.44 - \frac{\sigma^2}{8.97 \mu\text{m}^2}, \text{ gilt für } 1.1 \mu\text{m}^2 < \sigma^2 < 5.1 \mu\text{m}^2.$$

Trägt man  $\mathbf{C}$  über  $\mathbf{M}^\alpha$  auf, so erhält man für alle untersuchten Partikelarten die einheitliche Darstellung in Abb. 6-31. In guter Näherung gilt:

$$\mathbf{C} \cdot \mathbf{M}^\alpha = \text{konst} \quad \text{Gleichung 6-8}$$

Die Konstante in Gleichung 6-8 wurde hier durch die Annahme  $C(1) = 0.5$  festgelegt. Zur Auslegung eines OGMS-Apparates mit einer unbekanntem Partikelart sollte diese Konstante durch ein 1-Punktexperiment ermittelt werden. Wird beispielsweise für  $\mathbf{M}^\alpha = 10$  die relative Ablaufkonzentration  $C_{10}$  experimentell ermittelt, so kann über den Zusammenhang

$$\mathbf{C}(\mathbf{M}^\alpha) = \frac{C_{10}}{10 \cdot \mathbf{M}^\alpha} \quad \text{Gleichung 6-9}$$

das Verhalten des Separators bei jeder Feldstärke und Filtergeschwindigkeit ermittelt werden.

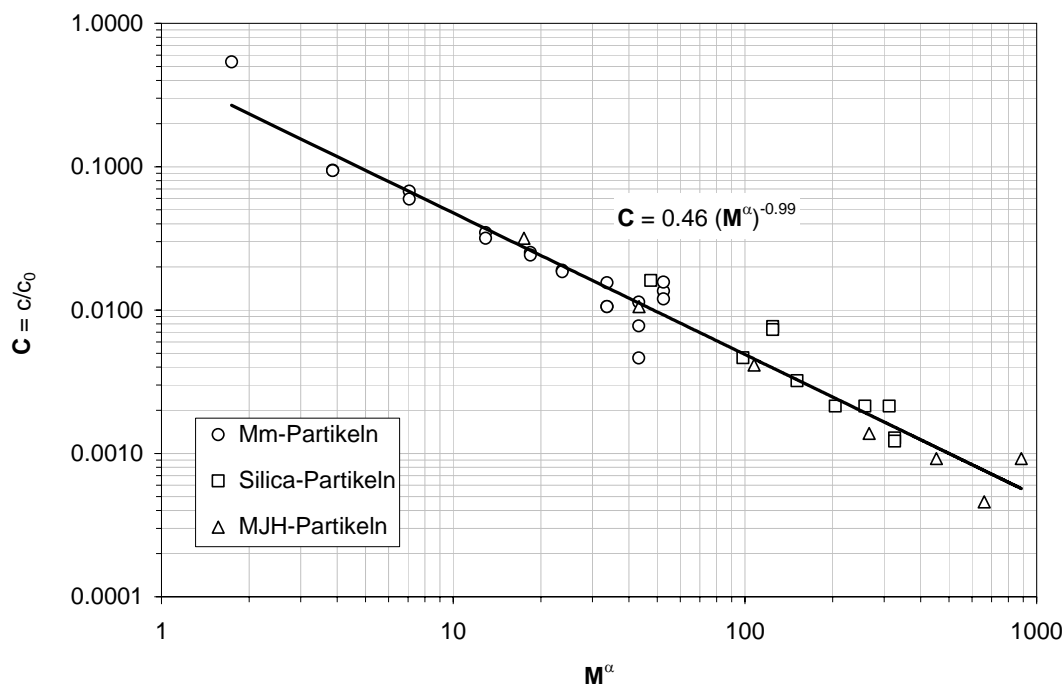


Abb. 6-31: Vergleich verschiedener Partikelsorten bei  $v = 2.6$  m/h

Aus der Bedingung, dass für unterschiedliche Partikelarten bei gleicher  $M^\alpha$ -Zahl gleiche Abscheideeffizienzen erreicht werden, lassen sich die mittleren Agglomeratdurchmesser aufgrund der magnetischen Aggregation der Primärpartikeln innerhalb des Separators ermitteln. In Tabelle 6-3 sind die Partikeldurchmesser  $x_{\max}$  bei der die Dichteverteilung  $q_2(x)$  der unmagnetisierten Partikeln maximal wird und die Durchmesser der magnetischen Agglomerate gegenüber gestellt. In Abb. 6-32 ist die relative Partikelgrößenänderung durch Magneto-Agglomeration und die relative irreversible Partikelgrößenänderung durch dauerhafte Aufmagnetisierung oder von Van-der-Waals-Kräften verursachte Agglomeration dargestellt. Hohe Magneto-Agglomeration ist für jede magnetische Separationsmethode aufgrund der quadratischen Abhängigkeit der M-Zahl vom Partikeldurchmesser von Vorteil. Die Vermeidung einer hohen irreversiblen Agglomeration ist dagegen in vielen Fällen, insbesondere für biotechnologische Verfahren, bei denen hohe spezifische Oberflächen bereitgestellt werden müssen, von essentieller Bedeutung. Ein hoher Anteil irreversibler Agglomeration erschwert die Wiederverwendung der Magnetbeads oder macht sie gar unmöglich. Neben der Verringerung der spezifischen Oberfläche, können auch Fouling-Probleme entstehen, da die Partikeln unter Umständen nicht mehr effektiv gereinigt bzw. sterilisiert werden können. Selbst wenn die innere Phasengrenzfläche bei makroporösen Agglomeraten noch zugänglich ist, entstehen zusätzliche Stofftransportwiderstände, die die Vorteile der Verwendung von Mikropartikeln zum Teil wieder aufheben können.

Tabelle 6-3: Partikelgrößen unmagnetisiert und auf  $M_{s,p}$  magnetisiert

Partikelsorte	$x_{\max}$ (unmagnetisiert)	$x$ (in der Sättigung)	$x$ (nach Magnetisieren)
MJH	0.60	20.2	0.66
Mm	0.72	14.8	0.75
Silica	2.21	53.6	3.01

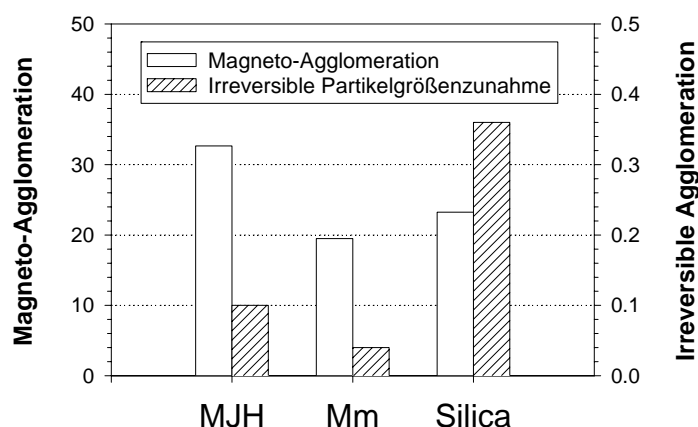


Abb. 6-32: Relative Zunahmen der Partikelgrößen durch Einbringen ins Magnetfeld (Magneto-Agglomeration, linke Achse) und irreversible Vergrößerung des Partikeldurchmessers nach Aufmagnetisieren (rechte Achse)

## 6.2.2 Kontinuierliche Separation

Bei der voll-kontinuierlichen Betriebsweise mit Konzentratabzug wurden mitunter deutlich höhere Filtratkonzentrationen gefunden. In Abb. 6-33 sind die relativen Filtrat- und Konzentratkonzentrationen, bezogen auf die Zulaufkonzentration von 2 g/L, aufgetragen. Die Filtergeschwindigkeit betrug 4.2 m/h, die Flussdichte 1.0 Tesla. 5% des Gesamtvolumenstroms von 50 mL/min wurden als Konzentratstrom abgezogen. Die relative Filtratkonzentration liegt mit 5-19 % über den Werten, die ohne Konzentratabzug gefunden wurden. Im stationären Zustand einer kontinuierlich betriebenen OGMS erhält man für die relative Konzentratkonzentration (siehe Abschnitt 4.3.1):

$$\frac{c_K}{c_0} = \frac{1}{v_K} \left[ 1 - (1 - v_K) \frac{c_F}{c_0} \right] \quad \text{Gleichung 6-10}$$

Für den vorliegenden Fall liefert Gleichung 6-10 bei einer mittleren relativen Filtratkonzentration von 0.12 eine theoretische relative Konzentratkonzentration von 17.7.

Der stationäre Zustand kann sich zu Beginn der Separation nicht sofort einstellen, da eine Rückvermischung im Separatorraum auftritt. Nach einer Zeit von  $10 \tau = 20$  min sollte das instationäre Verhalten aufgrund der Rückvermischung jedoch verschwinden.

Während sich für die Filtratkonzentration näherungsweise ein stationärer Zustand einstellt, verhält sich die Konzentratkonzentration instationär. Die experimentell ermittelten Konzentrationen liegen zum Teil oberhalb, aber auch deutlich unterhalb der theoretischen stationären Konzentratkonzentration. Gravimetrisch wurde nach Versuchsende ein Verbleib von 14.8 g Partikeln im Separator ermittelt. Obwohl hohe Aufkonzentrierungen bis



über 20 erreicht werden, scheint der hohe Verbleib an Partikeln im Separator von hier 56% der zugeführten Menge, gegenüber der HGMS-Separation nachteilig zu sein.

Durch Erhöhung des Konzentratanteils  $v_K$  ließ sich die relative Filtratkonzentration deutlich senken, allerdings traten auch hier starke Schwankungen der Konzentratkonzentration auf, die nicht nur zu einer allmählichen Zunahme der Filtratkonzentration führten, sondern nach 360 min Betriebszeit schließlich in einer Verstopfung des Konzentratabflusses endeten (vgl. Abb. 6-34).

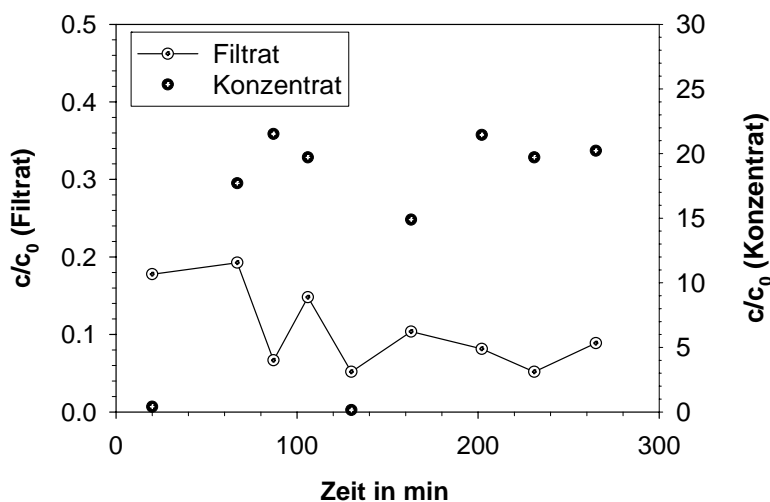


Abb. 6-33: OGMS von Magnetit Mm,  $c_0 = 2$  g/L,  $v = 4.2$  m/h,  $B_0 = 1.0$  T,  $v_K = 5\%$

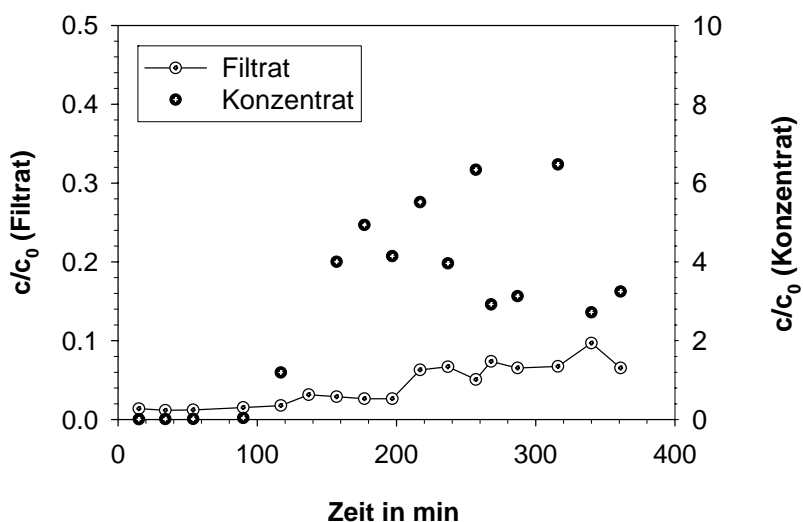


Abb. 6-34: OGMS von Magnetit Mm,  $c_0 = 2$  g/L,  $v = 4.2$  m/h,  $B_0 = 1.0$  T,  $v_K = 15\%$

### 6.2.2.1 OGMS-Separator mit Schlammräumer-Konstruktion

Um das Feldvolumen des Supraleiters besser auszunutzen, wurde der im konstruktiven Teil beschriebene OGMS mit einem Innendurchmesser von 74 mm verwendet. Er besitzt gegenüber dem Labor-OGMS eine 5-fach größere Filterfläche und zusätzlich einen

mechanischen Schlammräumer, so dass geringere Schwankungen der Konzentrationen im Vergleich zum Labortyp zu erwarten waren.

Wie aus Abb. 6-35 hervorgeht, wurden für eine Flussdichte von 1 T geringe Filtratkonzentrationen von 1.6% der Zulaufkonzentration erreicht, was vergleichbar mit dem Laborseparator ist, für den für 15% Konzentratanteil im gleichen Zeitraum eine mittlere relative Filtratkonzentration von 1.4% erreicht wurde. Ein Upscaling des ursprünglichen Laborseparator bei konstanter Filterflächenbelastung (Zulaufvolumenstrom / Filterfläche) erscheint demnach gerechtfertigt. Die Schwankungsbreite der Konzentrationen war allerdings nahezu unverändert gegenüber dem Laborseparator ohne Schlammräumer.

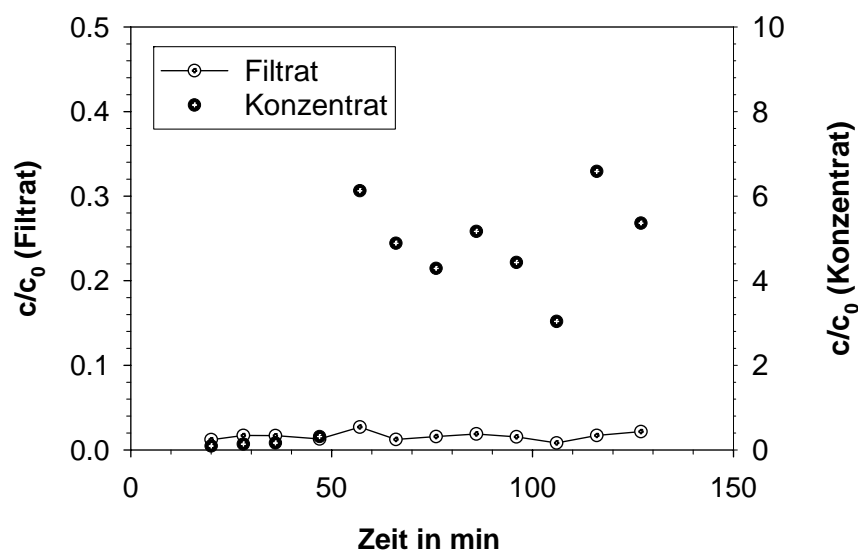


Abb. 6-35: OGMS unter Verwendung des Schlammräumer-OGMS, Magnetit Mm,  $c_0 = 2 \text{ g/L}$ ,  $v = 4.2 \text{ m/h}$ ,  $B_0 = 1.0 \text{ T}$ ,  $v_K = 20\%$

### 6.2.3 Separation von Magnetit aus Hefezellsuspensionen

Um eine Aussage treffen zu können, in wieweit magnetische Mikropartikel von biologischen Zellen mittels OGMS voneinander zu separieren sind, wurden Versuche mit Mischungen aus Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) und Magnetitpartikeln Mm durchgeführt. Standardmäßig betragen die Konzentrationen von Magnetit und Hefe je  $2.0 \text{ g/L}$ . Die Partikeln wurden in wässrigem Natriumphosphatpuffer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $0.1 \text{ mol/L}$ , der mit Natronlauge auf pH 7.0 eingestellt wurde, suspendiert. In Abb. 6-36 sind die Konzentrationsverläufe der Hefe ("Tails") und des Magnetits ("Mags") in Filtrat und Konzentrat dargestellt. Die Gesamtkonzentrationen wurden jeweils gravimetrisch bestimmt. Das Mengenverhältnis von Magnetit und Hefe wurde zusätzlich magnetometrisch bestimmt. Die Versuchsbedingungen waren eine Flussdichte von 1.0 T, eine Strömungsgeschwindigkeit von 4.2 m/h und ein Volumenstromverhältnis  $v_K$  von 5 %.

Die relative Filtratkonzentration entspricht mit durchschnittlich 10% ungefähr dem Wert ohne Hefe. Die Wiederfindung der Hefe im Filtrat liegt durchschnittlich bei 98%. Im

Vergleich zur Separation von Magnetit ohne Hefe scheint die Zeit bis zum Erreichen einer stationären Magnetitkonzentration im Konzentrat erhöht (140 Min gegenüber 80 Min.). Dies ist unter Umständen auf einen veränderten Dispersionsgrad des Magnetits durch das verwendete Puffermedium zurückzuführen. Durch eine Erhöhung der magnetischen Flussdichte auf bis zu 5 Tesla konnte die relative Filtratkonzentration der Magnetpartikeln auf 1% gesenkt werden (vgl. Abb. 6-37).

Die Abtrennung des Magnetits von Bäckerhefe mittels OGMS ist somit möglich. Koagulations- und Anlagerungseffekte zwischen den beiden Partikelsystemen scheinen unter den gewählten Versuchsbedingungen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. In wie weit eine Abtrennung auch mit funktionalisierten Magnetbeads gelingt, muss noch untersucht werden.

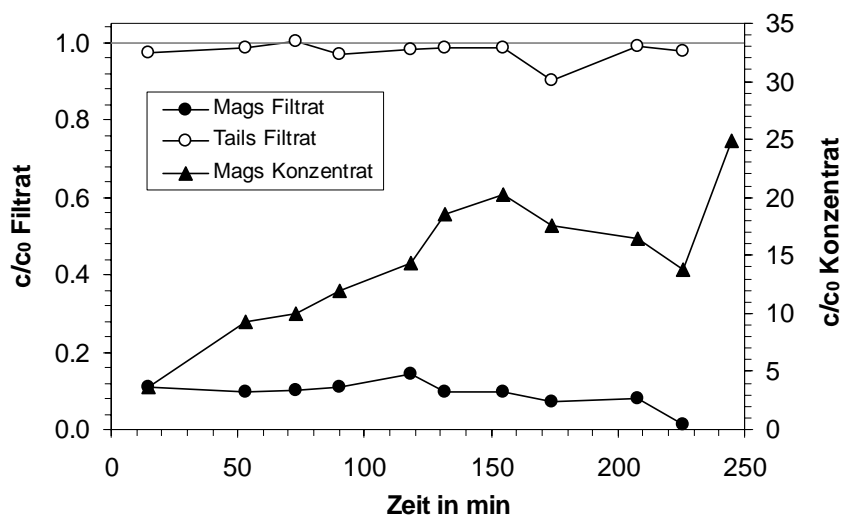


Abb. 6-36: OGMS einer Hefe-Magnetit (Mm)-Mischung in 0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7.0,  $c_{\text{H0}} = c_{\text{M0}} = 2 \text{ g/L}$ ,  $v = 4.2 \text{ m/h}$ ,  $B_0 = 1.0 \text{ T}$ ,  $v_K = 5\%$

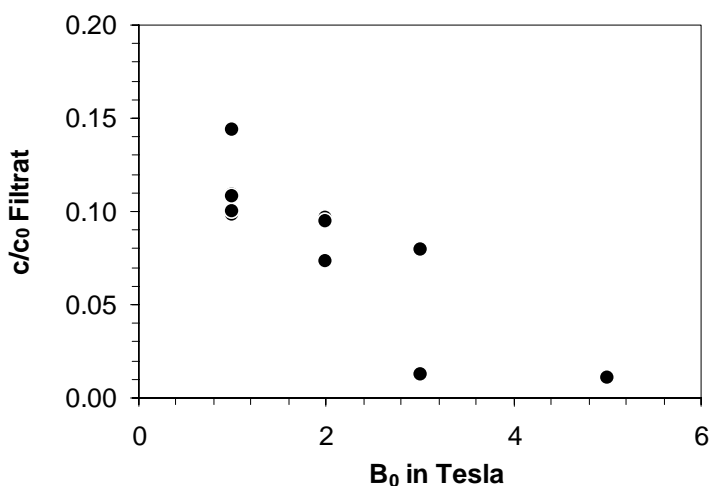


Abb. 6-37: Variation der Flussdichte bei der OGMS einer Hefe-Magnetit-Mischung in Phosphat-Puffer, pH 7.0,  $c_{\text{H0}} = c_{\text{M0}} = 2 \text{ g/L}$ ,  $v = 4.2 \text{ m/h}$ ,  $v_K = 5\%$ ,

### 6.3 Repulsive Mode Magnetseparation (RMMS)

Neben der OGMS wurde ein weiteres vollkontinuierliches Magnetseparationsverfahren, die Repulsive Mode Magnetseparation (RMMS), entwickelt und untersucht, das im Gegen-

satz zur OGMS ohne den Einsatz von vergleichsweise aufwendigen und teuren Supraleitermagneten auskommt. In diesem Kapitel werden die Einflussgrößen anhand experimenteller Untersuchungen und anhand den in Kapitel 4 dargestellten theoretischen Überlegungen diskutiert.

### 6.3.1 Qualitative Überprüfung des Modells

Zur qualitativen Überprüfung des in Kapitel 4 postulierten Abscheidemechanismus wurde der RMMS einige Zeit mit Magnetit vom Typ ‚Mm‘ in einer Konzentration von 0.2 g/L beaufschlagt. Abb. 6-38 zeigt eine Fotografie des Inneren des Strömungsrohres nach Versuchsende. Deutlich zu erkennen sind die Partikelablagerungen am linken und rechten Rand des Rohres. Die nicht abgebildeten Metallstäbe befinden sich ober- und unterhalb des Strömungsrohres. Die magnetischen Feldlinien verlaufen in horizontaler Richtung. Dieser qualitative Versuch zeigt, dass die Magnetpartikeln von den magnetisierten Stäben abgestoßen werden und durch den Einfluss der anziehenden Bereiche der Stäbe zur Seite abgelenkt werden. Der prinzipielle Verlauf der berechneten Partikelbahnen entspricht also dem experimentellen Ergebnis (vgl. Abb. 4-21). Eine Quantifizierung der Filtrat- und Konzentratkonzentrationen bzw. des Abscheidegrads bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen erfolgt in den nächsten Abschnitten.

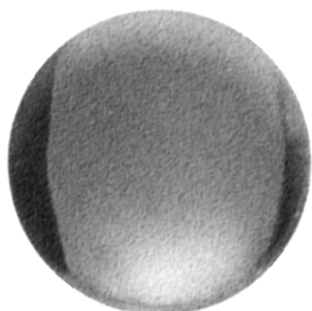


Abb. 6-38: Fotografie des Inneren des Strömungsrohres (Innendurchmesser 5 mm) nach dem Ende eines Separationsversuchs mit einer Magnetit-Suspension. Deutlich zu erkennen sind die Partikelablagerungen am linken und rechten Rand des Rohres. Die nicht abgebildeten Metallstäbe befinden sich ober- und unterhalb des Strömungsrohres. Die magnetischen Feldlinien verlaufen in horizontaler Richtung.

### 6.3.2 Einfluss der Partikelkonzentration

Zur Charakterisierung des Einflusses der Partikelkonzentration auf das Separationsverhalten des RMMS wurden Versuche mit variabler Partikelkonzentration bis zum Erreichen einer konstanten Filtrat- und Konzentratkonzentration durchgeführt. Die Flussdichte betrug jeweils 0.5 Tesla, die Filtergeschwindigkeit 305 m/h und der Konzentratvolumenstromanteil 20 %. Die relativen Konzentrat- und Filtratkonzentrationen sind in Abb. 6-39 dargestellt. Für sehr geringe Zulaufkonzentrationen von 0.2 g/L ist die Filtratkonzentration etwa 30% geringer als bei Konzentrationen über 1.2 g/L. Bei einer weiteren Verdoppelung der Zulaufkonzentration bleibt das Separationsverhalten jedoch weitgehend unverändert. Die Zeit bis zum Erreichen konstanter Ablaufkonzentrationen im Konzentrat und im Filtrat ist in guter Näherung umgekehrt proportional zur Zulaufkonzentration. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich zunächst Anlagerungszonen innerhalb des Strömungsrohres in 0°-Position ausbilden. Erst wenn diese Anlagerungen eine bestimmte Dicke erreicht haben, findet aufgrund der Scherkräfte der Strömung keine weitere Anlagerung statt, und es bildet

sich ein stationärer Zustand aus. Die Zeit bis zum Erreichen dieses Zustands hängt demnach von der Menge der bereits zugelaufenen Partikeln, aber auch von der Strömungsgeschwindigkeit ab.

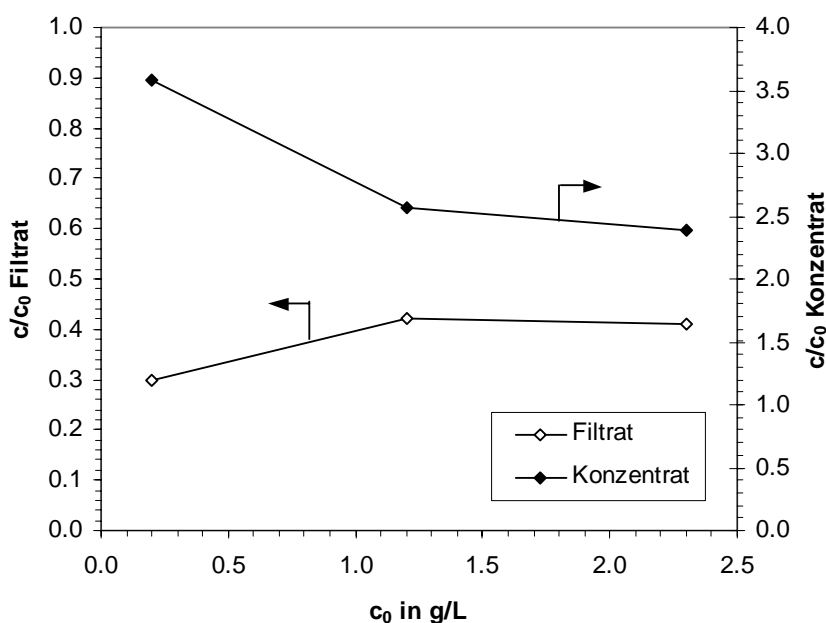


Abb. 6-39: Einfluss der Partikelkonzentration auf die RMMS;  $v = 305$  m/h,  $B_0 = 0,5$  T,  $v_K = 0,2$

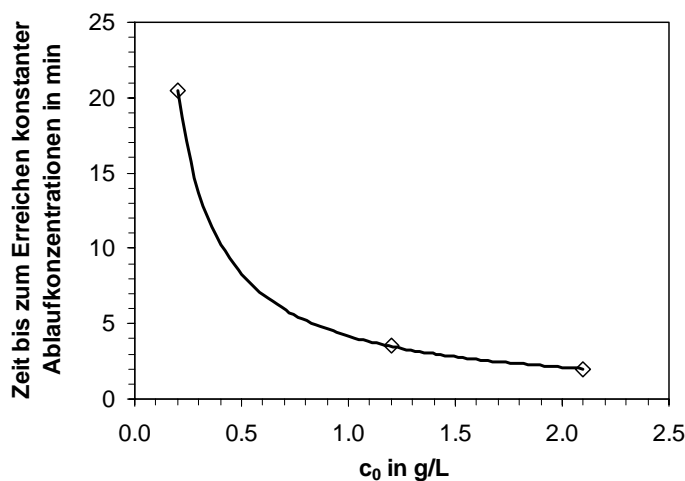


Abb. 6-40: Zeit bis zum Erreichen konstanter Ablaufkonzentrationen (abzüglich Totzeit);  $v = 305$  m/h,  $B_0 = 0,5$  T,  $v_K = 0,2$

### 6.3.3 Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit

Die Strömungsgeschwindigkeit wurde für sonst konstante Bedingungen zwischen 150 und 800 m/h variiert. Die Zulaufkonzentration betrug 2 g/L, die Flusssdichte 0,5 Tesla und der Konzentratvolumenanteil 20%. Für eine Strömungsgeschwindigkeit von 305 m/h ist in Abb. 6-41 exemplarisch der zeitliche Verlauf der relativen Ablaufkonzentrationen gezeigt. Die als konstant ermittelten Ablaufkonzentrationen sind in Abb. 6-42 in Abhängigkeit der Strömungsgeschwindigkeit dargestellt. Erwartungsgemäß nimmt die Filtratkonzentration

mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit zu. Die Konzentration nimmt allerdings erst ab etwa 450 m/h entsprechend ab, so dass die Massenbilanz gemäß Gl. 4-23 geschlossen ist. Für kleinere Strömungsgeschwindigkeiten schließt sich im betrachteten Zeitraum die Massenbilanz auch für weitgehend konstante Ablaufkonzentrationen nicht. Vielmehr existiert ein Verbleib von Partikeln innerhalb des Separators, d.h. ein echt stationärer Zustand wurde noch nicht erreicht. Für die in Abb. 6-41 dargestellten Versuchsbedingungen (305 m/h) ergibt sich eine Senke von 19% des Zulaufs im quasi-stationären Fall. Dieser Anteil steigt für geringere Strömungsgeschwindigkeiten weiter an und erreicht bei 150 m/h 35% des Zulaufs. Der Anteil des Zulaufs, der im quasi-stationären Zustand im Separator verbleibt (Senkterm) ist in Abb. 6-42 mit dargestellt. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist das selektive Abscheiden magnetisch stark susceptibler Partikeln aus dem Feedstrom. Ein analoges Verhalten wird auch bei der HGMS beobachtet. Hier tritt nach Durchbruch des HGMS ein quasi-stationärer Zustand auf, ohne dass die Ablaufkonzentration die Zulaufkonzentration erreicht ( $c/c_0 < 1$ ).

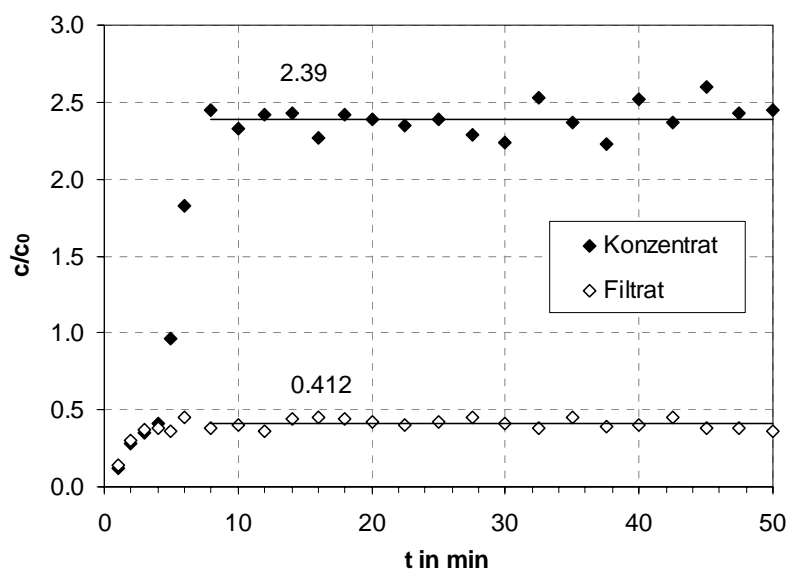


Abb. 6-41: Zeitliches Verhalten der Konzentrat- und Filtratkonzentration;  $v = 305$  m/h;  $v_K = 0.2$ ,  $c_0 = 2.0$  g/L,  $B_0 = 0.5$  T

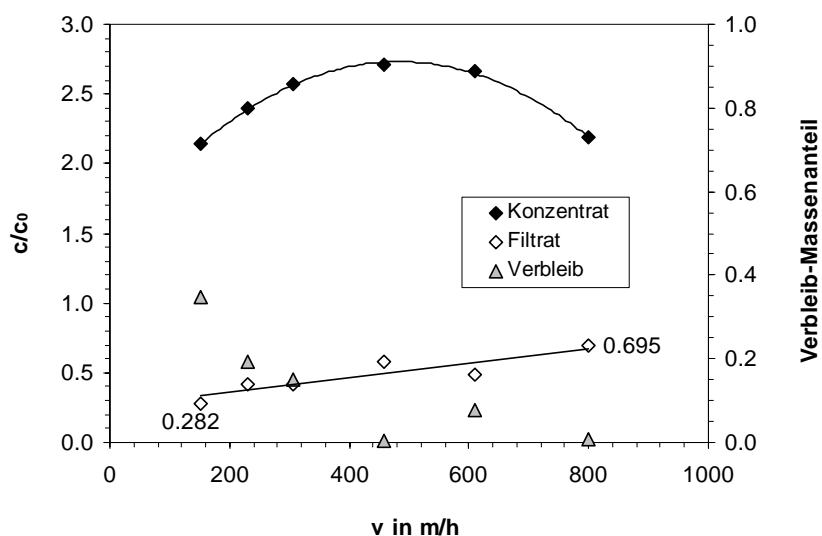


Abb. 6-42: Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf das Separationsverhalten des RMMS,  $v_K = 0.2$ ,  $c_0 = 2.0$  g/L,  $B_0 = 0.5$  T

In Abb. 6-43 ist der experimentell ermittelte Abscheidegrad ( $\varphi = 1 - C_F$ ) in Abhängigkeit der Strömungsgeschwindigkeit dargestellt (Punkte im Diagramm). Außer dem Versuch bei 137 m/h, bei dem ein Abscheidegrad von 91.0% erreicht wurde, betrug die Zulaufkonzentration stets 2.0 g/L. Der Abscheidegrad bei 137 m/h erscheint für eine Konzentration von 2.0 g/L nach den Ausführungen zu Abb. 6-39 demnach etwas zu hoch bewertet. In Abb. 6-43 ist der aus der Modellierung des Separators berechnete Abscheidegrad als Funktion der Strömungsgeschwindigkeit (durchgezogene Linie) mit aufgetragen (vgl. Kapitel 4.4.4 im Theorieteil).

Für die theoretische Berechnung des Abscheidegrads wurden für 13 Strömungsgeschwindigkeiten zwischen 0 und 800 m/h Abscheidegrade gemäß Gl. 4-49 berechnet. Für jeden dieser 13 Abscheidegrade wurden 69 räumliche Partikelbahnen für eine Flussdichte von 0.5 Tesla numerisch berechnet. Für jede dieser 69 Einzelpartikelbahnen wurden wiederum 100 räumliche Koordinaten zeitabhängig berechnet, so dass für die Darstellung des theoretischen Abscheidegrads in Abb. 6-43 knapp 90000 Partikelkoordinaten berechnet werden mussten. Für die Modellierung wurde ein Partikelradius von 12.5  $\mu\text{m}$  angenommen. Da die Partikeln nach Eintritt in den Separator sofort aufmagnetisiert werden, tritt eine magnetische Agglomeration der Einzelpartikel auf. Ein effektiver Durchmesser dieser Agglomerate konnte nicht bestimmt werden, da die Partikeln nach Verlassen des Separators ihre Magnetisierung nahezu vollständig verlieren und auch nicht mehr den Scherkräften der Strömung ausgesetzt sind. Der ins Modell eingehende Partikelradius  $b$  ist deshalb als Anpassungsparameter zu verstehen, der jedoch für alle Strömungsgeschwindigkeiten gleich ist. Insgesamt stehen Modell und Experiment hinsichtlich eines Einflusses der Strömungsgeschwindigkeit in sehr gutem Einklang.

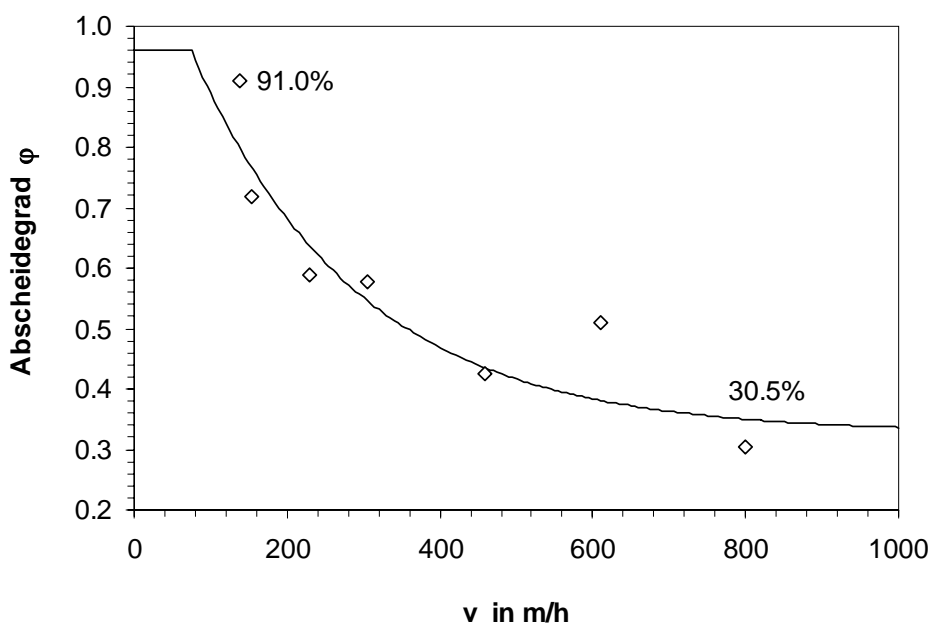


Abb. 6-43: Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf das Separationsverhalten des RMMS,  $v_K = 0.2$ ,  $c_0 = 2.0$  g/L (außer 91.0%-Wert:  $c_0 = 0.2$  g/L),  $B_0 = 0.5$  T

### 6.3.4 Einfluss des Konzentratanteils

Nimmt man ein laminares Strömungsprofil innerhalb des Strömungsrohrs an, so ergibt sich für den Volumenstrom der beiden Konzentratabzüge ein Wert von  $v_K = 20\%$  des Zulaufvolumenstroms. Prinzipiell sind kleinere Konzentratanteile erstrebenswert, da sich damit der Konzentrierungsfaktor erhöht. Allerdings sind mit der Verringerung des Trennwandabstands von der Separatorwand ein erhöhter konstruktiver Aufwand und ein höheres Risiko der Verstopfung der kleiner werdenden Konzentratkanäle verbunden.

Da sich während der instationären Anfangsphase der Separation Anlagerungszonen im Bereich des Konzentratabzugs ausbilden, verringert sich der Konzentratabzugsquerschnitt allerdings durch diese Partikelanlagerungen, so dass ein Abzug von 20% des Zulaufs als Konzentrat nicht optimal erscheint. Um ein optimales Verhalten des RMMS hinsichtlich des Konzentratanteils zu finden, wurde deshalb beim verwendeten RMMS-Prototypen (bei konstantem Trennwandabstand) der Konzentratanteil zwischen 5 und 20% variiert.

In diesen Versuchen wurden die Konzentrat- und Filtratverläufe je 30 Minuten lang verfolgt, wobei nach etwa 10 Minuten konstante Werte erreicht wurden. Ein typischer Verlauf ist in Abb. 6-44 für  $v_K = 0.1$  dargestellt. Der berechnete Verbleibs-Massenanteil ist zu jedem Zeitpunkt mit dargestellt. Dieser geht innerhalb etwa 10 Minuten auf null zurück und wird einige Zeit sogar negativ, es kommt zu einer Art Überschwingen, d.h. ein Teil der Anlagerungen wird vermutlich wieder abgelöst, bzw. langsam aufgrund der angreifenden Scherkräfte entlang des Strömungsrohrs in Richtung Konzentratabzug transportiert. Dies



kann z.B. durch sukzessives Ablösen von Partikeln und erneutem Anlagern verursacht werden.

Die konstanten Ablaufkonzentrationen (jeweils die Mittelwerte zwischen 10-30 min) sind in Abb. 6-45 als Funktion des Konzentratanteils abgebildet. Durch Halbierung des Konzentratanteils auf 10 % konnte die Konzentratkonzentration annähernd verdoppelt werden. Durch erneute Verringerung auf einen Wert von 5 % der Zulaufkonzentration wurde sogar ein Konzentrierungsfaktor von 8.2 erreicht. Die relative Filtratkonzentration durchläuft mit Verringerung des Konzentratanteils ein Minimum. Der ursprüngliche Wert von 0.58 verringert sich mit Halbierung des Konzentratanteils zunächst um 30 %, steigt mit weiterer Reduzierung aber wieder leicht an. Es deutet sich hier vermutlich eine beginnende Verstopfung des Konzentratabzugs an, die bei weiterer Verringerung des Konzentratanteils zu erwarten ist und zu einer Erhöhung der Filtratkonzentration führen würde.

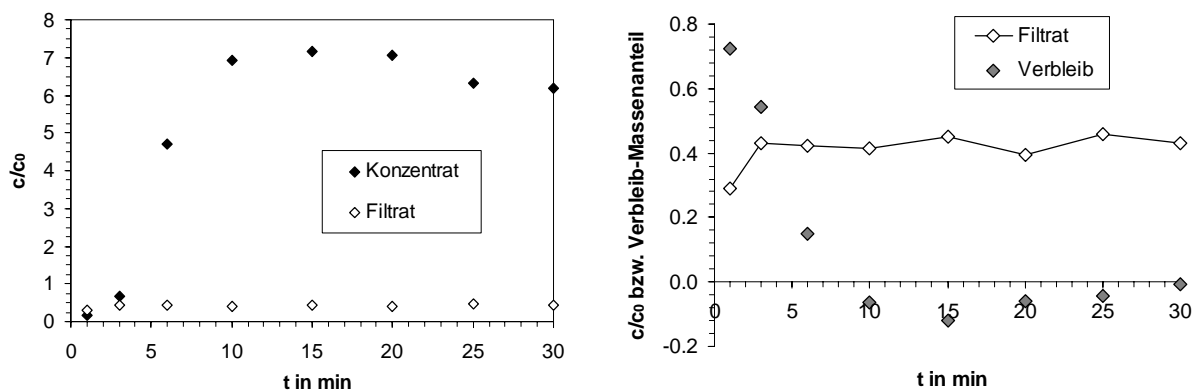


Abb. 6-44: Versuchsergebnis für ein Konzentratvolumenstromanteil von  $v_K = 10 \%$ ,  $v = 458 \text{ m/h}$ ,  $c_0 = 2.0 \text{ g/L}$ ,  $B_0 = 0.5 \text{ T}$ .

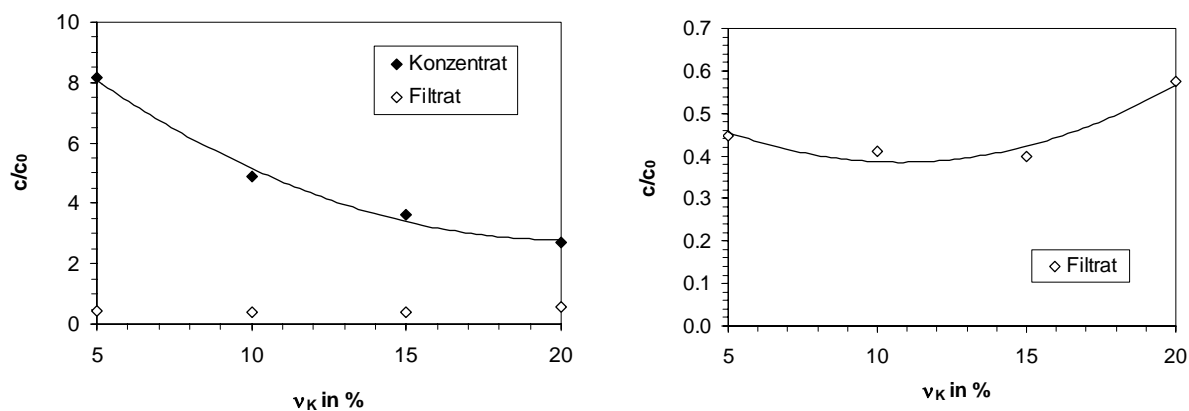


Abb. 6-45: Einfluss des Konzentratvolumenstromanteils auf das Separationsverhalten des RMMS,  $v = 458 \text{ m/h}$ ,  $c_0 = 2.0 \text{ g/L}$ ,  $B_0 = 0.5 \text{ T}$

### 6.3.5 Kaskadierung von zwei Separationsstufen

Die im Vergleich zur HGMS nur mäßigen Abscheidegrade der RMMS lassen sich durch ein Verschalten von mehreren RMMS-Stufen in Kaskade erhöhen. Es wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem sowohl das Filtrat als auch das Konzentrat einer ersten Separation erneut einer RMMS zugeführt wurden. Da nur ein Separator zu Verfügung stand, erfolgten die drei Separationen zeitlich nacheinander. Dabei wurden die Feedvolumenströme der zweiten Stufe so gewählt, dass sie dem Filtrat- bzw. Konzentratvolumenstrom der ersten Stufe entsprachen. Um noch einen hinreichenden Konzentratvolumenstrom nach der zweiten Stufe realisieren zu können, wurde die Strömungsgeschwindigkeit für die ersten Stufe mit 600 m/h recht hoch gewählt. Das Separationsergebnis der ersten Stufe ist in Abb. 6-46 gezeigt. Um ein hinreichendes Konzentratvolumen für die zweite Stufe (Konzentratnachbehandlung) zu gewinnen, wurde der erste Versuch mit 130 min vergleichsweise lange durchgeführt. Die Separationsergebnisse der Konzentrat- und Filtratnachbehandlung (2. Stufe) sind in den Abb. 6-47 und Abb. 6-48 dargestellt. Insgesamt ließ sich unter den gewählten Bedingungen eine Konzentrierung um den Faktor 7 realisieren, die relative Filtratkonzentration nach der 2. Stufe war mit 0.4 aber vergleichsweise hoch, was zum Einen an der hohen Strömungsgeschwindigkeit und zum Andern auch am hohen Konzentratanteil von 20% lag. Sicherlich lässt sich durch Optimierung sowohl die Aufkonzentrierung als auch die Abreicherung des Filtrats für eine zweistufige Anordnung verbessern. Die Konzentrationen und Strömungsgeschwindigkeiten der unterschiedlichen Ströme der zweistufigen RMMS sind in Tabelle 6-4 zusammengefasst.

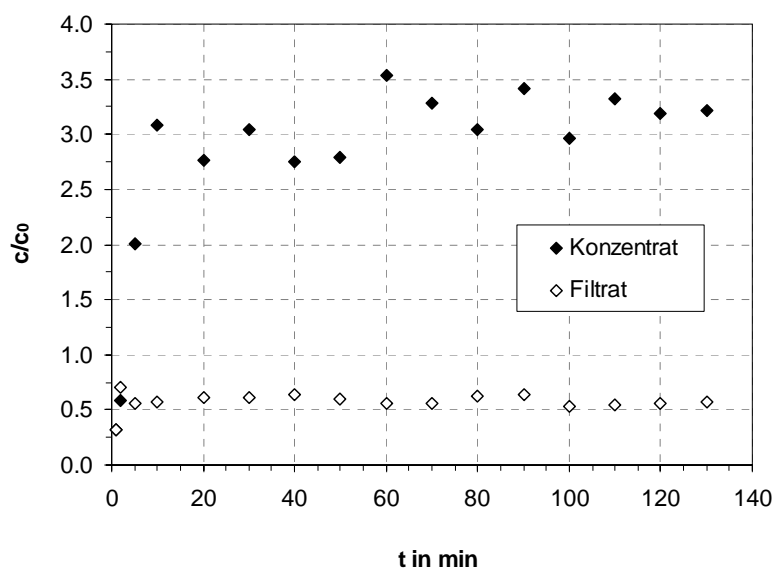


Abb. 6-46: Separationsergebnis nach der ersten RMMS-Stufe,  $c_0 = 2.50$  g/L,  $v_K = 0.2$ ,  $v = 600$  m/h,  $B_0 = 0.5$  T

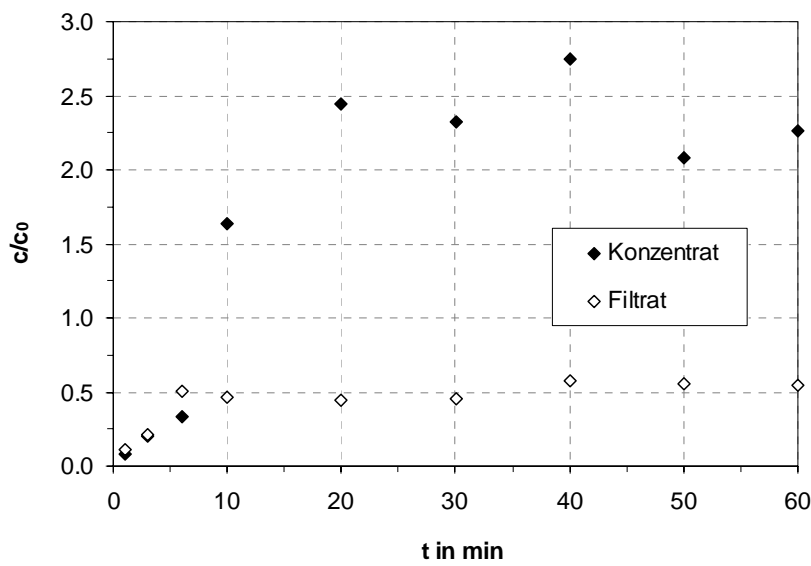


Abb. 6-47:  
Separationsergebnis nach der  
zweiten RMMS-Stufe  
(Konzentratnachbehandlung),  
 $c_0 = 7.50 \text{ g/L}$ ,  $v_K = 0.2$ ,  
 $v = 120 \text{ m/h}$ ,  $B_0 = 0.5 \text{ T}$

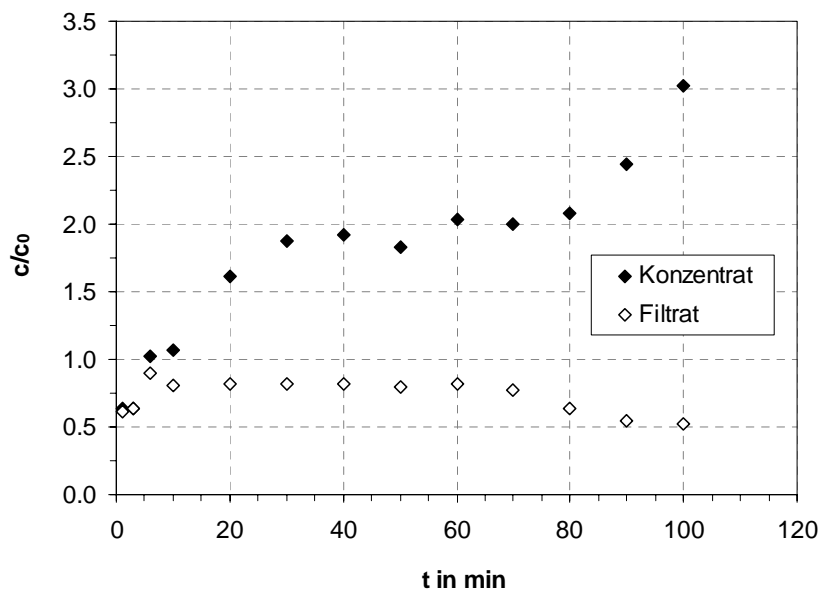


Abb. 6-48: Separations-  
ergebnis nach der zweiten  
RMMS-Stufe (Filtratnachbe-  
handlung),  
 $c_0 = 1.45 \text{ g/L}$ ,  $v_K = 0.2$ ,  
 $v = 480 \text{ m/h}$ ,  $B_0 = 0.5 \text{ T}$

Tabelle 6-4: Konzentrationen und Strömungsgeschwindigkeiten der 2-stufigen RMMS

Strom	c in g/L	$c/c_{\text{ein}}$ (Stufe)	$c/c_0$ (gesamt)	v in m/h
Feed	2.5	–	–	600
F	1.4	0.58	0.58	480
K	7.8	3.1	3.1	120
FF	1.0	0.73	0.40	384
FK	3.1	2.15	1.24	96
KF	3.8	0.51	1.52	96
KK	17.9	2.73	7.16	24

## 6.4 Sorption an magnetische IMA-Mikrosorbentien

Anhand der Sorption von Modellproteinen an verschiedene im Rahmen der Arbeit synthetisierte magnetische Immobilisierte-Metallchelate-Affinitäts- (IMA) Mikrosorbentien wurden die Träger miteinander verglichen und auf eine Eignung zur Aufreinigung eines Zielproteins hin untersucht.

### 6.4.1 Sorption von Kupferionen an IMA-Träger

Zur Bestimmung der Ligandendichte an IDA auf der Oberfläche der IMA-Sorbentien wurde die Beladungskapazität der Partikeln für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen bestimmt. Wie in den folgenden Kapiteln dargestellt wird, sind hohe Dichten des Affinitätsliganden auf der Partikeloberfläche wichtig, um ausreichende Proteinbindekapazitäten, insbesondere aber auch um ein geringes nicht-selektives Bindevormögen zu erzielen. Die ermittelten Kupferkapazitäten sind ein Maß für die IDA-Ligandendichte der synthetisierten magnetischen Trägerpartikeln. Die Kupferionen reagieren stöchiometrisch und äquimolar mit IDA-Gruppen. Die Sorption wurde durch Zugabe von  $\text{CuCl}_2$ -Lösungen variabler Konzentration zu einer konstanten Partikelmasse durchgeführt. Im Gegensatz zur Beladung mit Kupfer zum Zwecke der Proteinsorption wurden keine weiteren Elektrolyte wie  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  oder  $\text{NaCl}$  zugesetzt, da sonst  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$ -Ionen in Konkurrenz um die Sorptionsplätze stehen würden. Abb. 6-49 zeigt Sorptionsisothermen mit logarithmischer Auftragung der Kupferkapazität über der Gleichgewichtskonzentration im Überstand. Die Sättigungskapazitäten der Langmuir-Ausgleichskurven sind der Tabelle 6-5 auf Seite VI-149 zu entnehmen.

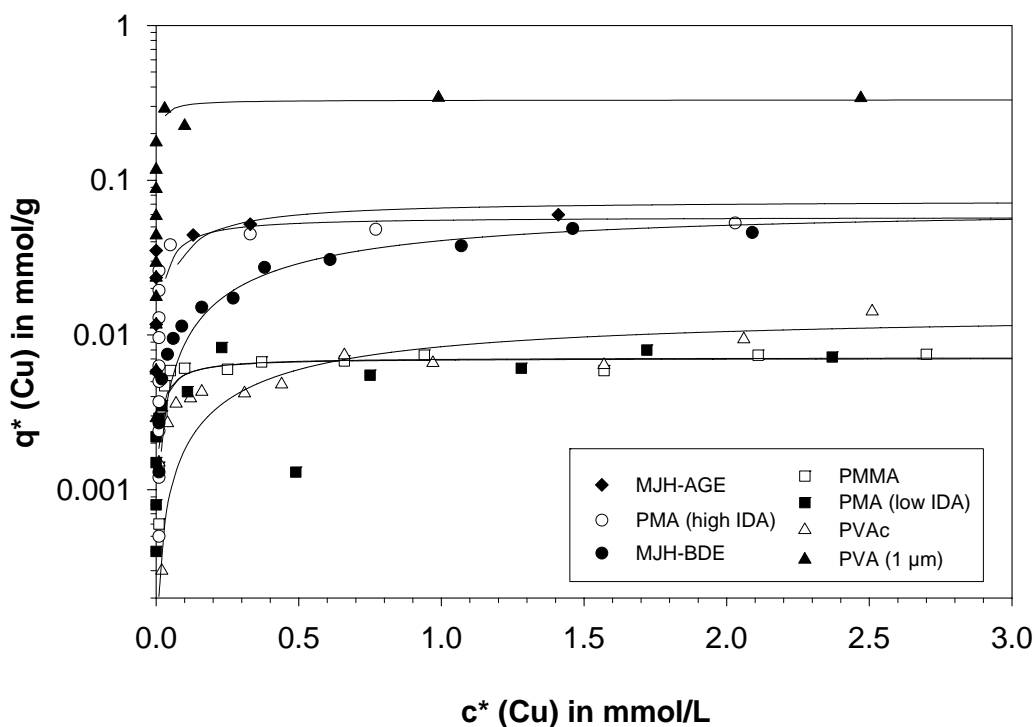


Abb. 6-49: Sorptionsisothermen für Kupfer(II)-Ionen an magnetische IMA-Mikrosorbentien.

Die gegenüber den MJH-AGE-Partikeln um den Faktor 4.5 mal so hohe Kupfer-Kapazität der PVA-Trägerpartikeln (vgl. auch Tabelle 6-5) erscheint zunächst erstaunlich, da die PVA-Partikeln bei ähnlichem Durchmesser eine glatte und damit geringere Partikeloberfläche besitzen (vgl. REM-Aufnahme in Kapitel 5). Die hohe Kupferkapazität lässt sich allerdings durch eine komplexierende Wirkung des PVA-Polymers selbst erklären (Godard 1989, vgl. Abb. 6-50). Der Komplex zwischen PVA und Kupfer ist allerdings sehr schwach, so dass die über PVA gebundenen Kupferionen bereits durch einen Pufferaustausch wieder mobilisiert werden können (Pitfield 1992).

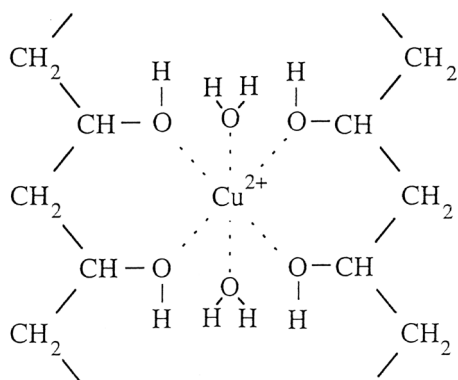


Abb. 6-50: Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch PVA; nach Pitfield (1992)

## 6.4.2 Sorption von Hämoglobin (Hb)

### 6.4.2.1 Sorptionskinetik

Zur Untersuchung der Kinetik der Sorption von Proteinmolekülen an magnetische IMA-Mikrosorbentien wurde Rinder-Hämoglobin als Sorptiv und kupferbeladene Metallchelartpartikeln vom Typ MJH-BDE als Sorbens verwendet. 25 mg der Partikeln wurden unter Rühren in 20, 50 bzw. 100 mL einer bei 25°C thermostatisierten Hb-Lösung von 25 mg/L in Phosphatpuffer pH 6.8 zugegeben und in Abständen Proben der Suspension von 1 mL entnommen. Die in den Proben vorhandenen Sorbenspartikeln wurden sofort durch kurze Zentrifugation bei 16000g (Eppendorf Centrifuge 5415D) entfernt und Hb im Überstand photometrisch bestimmt. Die auf die Ausgangskonzentration bezogenen Hämoglobinkonzentrationen in Abhängigkeit der Kontaktzeit sind für die drei Protein-zu-Partikel-Verhältnisse in Abb. 6-51 gezeigt. Regressionskurven vom Typ  $c/c_0 = c_E + \exp(-t/\tau)$  wurden miteingezeichnet. Die Zeitkonstanten betragen  $\tau_{10\%} = 1.05$  min,  $\tau_{5\%} = 0.33$  min,  $\tau_{2\%} = 0.19$  min.

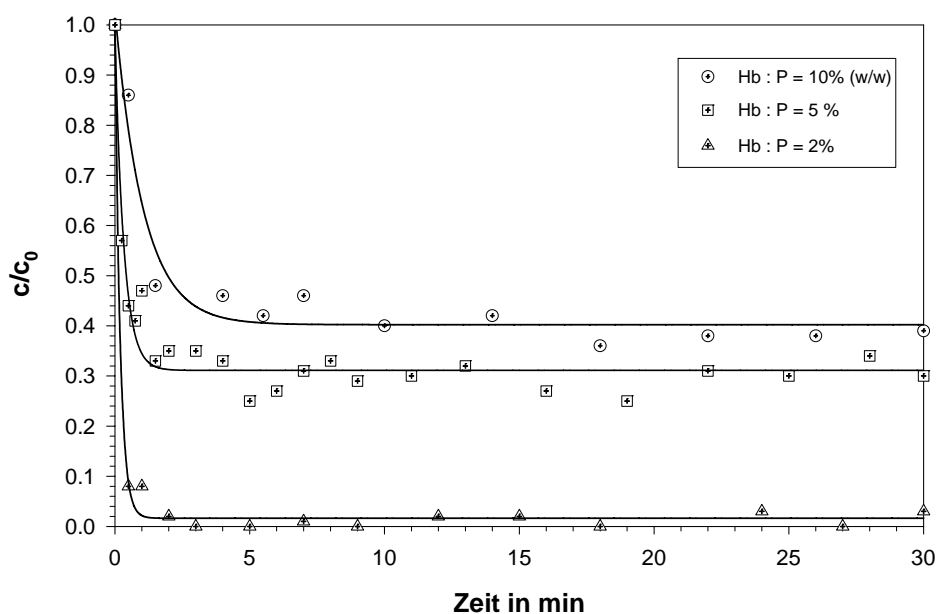


Abb. 6-51: Sorptionskinetik für Hb an kupferbeladene Metallchelatepartikeln MJH-BDE bei 25°C

Die Sorption eines Proteins an die magnetischen Mikrosorbentien findet im Vergleich zu porösen Trägern wesentlich schneller statt. Während die Sorption für die Mikropartikel nach wenigen Minuten abgeschlossen ist, kann die Einstellung des Sorptionsgleichgewichts für Proteine an poröse Träger mehrere Stunden betragen (vgl. Kapitel 2).

Aus den Kurven der Abb. 6-51 lässt sich der Stoffübergangskoeffizient  $\beta_L$  des Proteintransports an die Sorbensoberfläche abschätzen. Aus der Massenbilanz für einen Rührbehälter mit linearem kinetischen Ansatz folgt für unbeladene Trägerpartikeln ( $t \rightarrow 0$ ):

$$\left. \frac{dc}{dt} \right|_{t \rightarrow 0} = -\beta_L a_s c_p c \quad \text{Gleichung 6-11}$$

bzw. nach Integration:

$$\ln \frac{c}{c_0} \Big|_{t \rightarrow 0} = -\beta_L a_s c_p t \quad \text{Gleichung 6-12}$$

Die Anfangssteigung des Logarithmus der  $c/c_0$ -Werte entspricht demnach gerade  $\beta_L a_s c_p$ . Diese Anfangssteigungen lassen sich im linken Diagramm von Abb. 6-52 ablesen. Trägt man diese Anfangssteigungen wiederum über der Partikelkonzentration  $c_p$  auf, so ergibt die Steigung den Kinetikparameter  $\beta_L a_s$ . Für die Sorption von Hämoglobin an den kupferbeladenen MJH-BDE-Träger erhält man einen Wert von  $0.0657 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ . Nimmt man für die spezifische (Film-)oberfläche mit  $d_p \approx 2 \text{ } \mu\text{m}$  einen Wert von:

$$a_s = \frac{6}{d_p \rho_p} \approx 1.07 \frac{\text{m}^2}{\text{g}} \quad \text{Gleichung 6-13}$$

an, so ergibt sich ein Stoffübergangskoeffizient von  $\beta_L = 6.1 \times 10^{-5} \text{ ms}^{-1}$ .

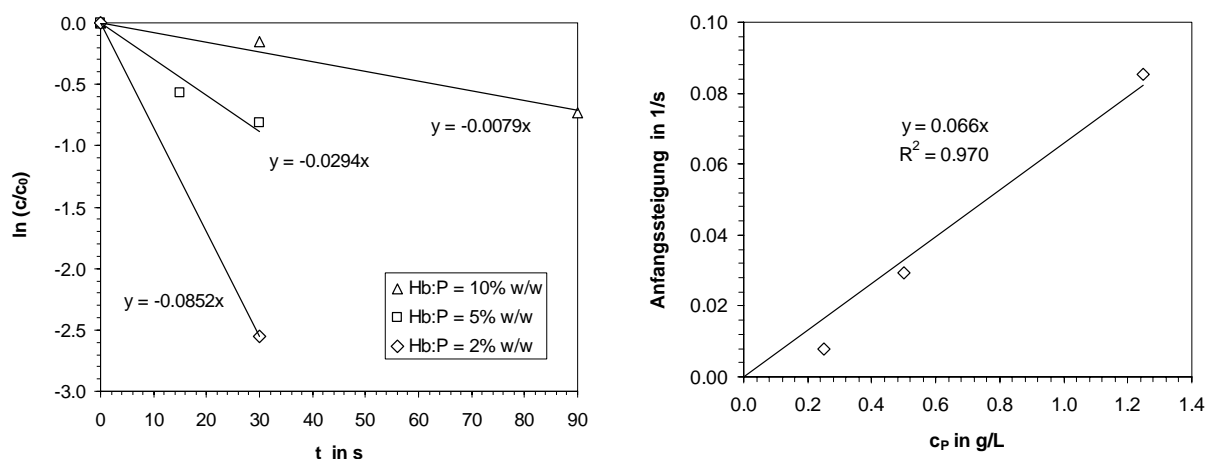


Abb. 6-52: Ermittlung des Kinetikparameters der Sorption von Hämoglobin an MJH-BDE

Eine Abschätzung des Diffusionskoeffizienten des Hämoglobins mit der Stokes-Einstein-Beziehung (Atkins 1990) ergibt:

$$D_{\text{Hb}} = \frac{kT}{3\pi\eta d_{\text{Hb}}} \approx 6.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \quad \text{Gleichung 6-14}$$

Der Stoffübergangskoeffizient  $\beta_L$  folgt allgemein aus der Sherwoodzahl  $Sh$ , dem Diffusionskoeffizienten  $D$  und dem Partikeldurchmesser  $d_p$  gemäß:

$$\beta_L = Sh \frac{D}{d_p} \quad \text{Gleichung 6-15}$$

Für gerührte Suspensionen gilt für Partikel-Reynoldszahlen  $Re_p < 1$  (Friedlander 1961, Herndl 1981) der Zusammenhang:

$$Sh = 2 + 0.991 \cdot Re_p^{1/3} \cdot Sc^{1/3} \quad \text{Gleichung 6-16}$$

Da die Reynoldszahl sowohl aufgrund des geringen Durchmessers der Mikropartikeln als auch aufgrund der verschwindenden Relativgeschwindigkeit zwischen Fluid und Partikel gegen null geht, nimmt die Sherwood-Zahl in diesem Fall den minimalen Wert 2 an. Daraus ergibt sich für den Stoffübergangskoeffizienten gemäß Gleichung 6-14 einen Wert von  $\beta_L = 6.7 \times 10^{-5} \text{ ms}^{-1}$ . Der theoretische Wert steht somit in sehr gutem Einklang mit dem gemessenen Wert.

Die tatsächliche Sorptionsoberfläche steht nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der ‚glatten‘ Filmoberfläche. Dies zeigt bereits die BET-Oberflächenbestimmung, die etwa um den Faktor 100 über der spezifischen Diffusionsgrenzfläche liegt. Die für die Protein-sorption nutzbare Sorptionsoberfläche lässt sich wie folgt abschätzen:

Nimmt man eine hexagonal-dichteste Packung der Proteinmoleküle auf der Oberfläche an (vgl. Abb. 6-53), so ergibt sich ein Belegungsgrad von

$$3 \frac{A_{\text{Sektor}}}{A_{\text{Dreieck}}} = \left( \frac{\sqrt{3}}{4} g^2 \right) \div \left( \frac{\pi}{24} g^2 \right) = 90.7\%$$

Gleichung 6-17

Der Flächenbedarf für ein Hämoglobinmolekül mit Durchmesser 6.4 nm beträgt somit 35.5 nm<sup>2</sup> bzw. 2.1×10<sup>-7</sup> m<sup>2</sup>/mol. Bei einer Sorptionskapazität von 50 mg/g bzw. 0.775 μmol/g ergibt sich eine nutzbare Sorptionsoberfläche von 16.6 m<sup>2</sup>/g. Diese fast 16-fach höhere Sorptionsoberfläche erklärt sich aus der brombeerartig-rauen, aus Einzelkristallen aufgebauten Oberfläche der verwendeten Partikeln (vgl. REM-Aufnahmen in Kapitel 5).

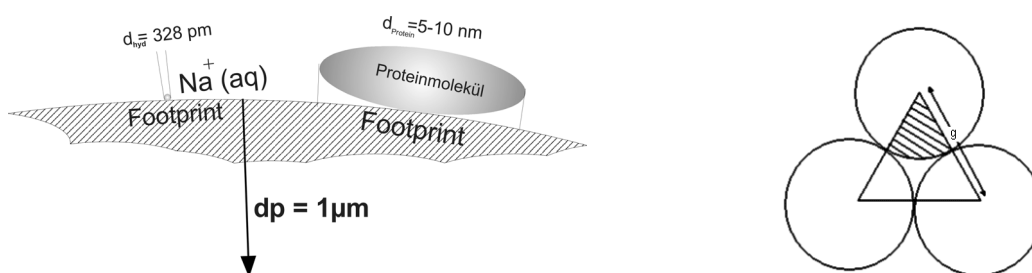


Abb. 6-53: Größenvergleich zwischen Partikel, einem hydratisierten Natriumion und einem typischen Proteinmolekül (links) und hexagonale Anordnung der sphärisch angenommenen Moleküle auf der Oberfläche (rechts)

#### 6.4.2.2 Gleichgewicht der Sorption von Hämoglobin

Zur Charakterisierung der Affinität und Kapazität der hergestellten magnetischen Affinitätsorbentien für die Bindung von Hämoglobin wurden Sorptionsisothermen bei 25°C aufgenommen. Die Gleichgewichtsbeladung  $q^*$  ist in Abb. 6-54 über der Gleichgewichtskonzentration  $c^*$  im Überstand dargestellt. Die Dissoziationskonstanten  $K_d$  liegen für alle Partikelarten unterhalb 1 μmol/L, d.h. alle Trägerpartikeln weisen eine hohe Affinität für die Sorption von Hb auf. Für höhere Gleichgewichtskonzentrationen lassen einige Isothermen bereits eine Mehrschichtadsorption („multi-layer binding“) mit sigmoidaler Sorptionsisotherme erkennen. Die Messdaten wurden deshalb in Abb. 6-54 mit BET-Isothermen beschrieben. Abb. 6-55 zeigt die Beladungen für geringe Gleichgewichtskonzentrationen genauer (Hochaffinitätsbereich). Die Isothermen in diesem Bereich wurden mit Langmuir-Isothermen beschrieben. Die Parameter der Langmuir-Regressionen sind in Tabelle 6-5 zusammengefasst. Die Sättigungskapazität für die MJH-BDE-Partikeln deckt sich fast exakt mit dem von O'Brien et al. (1996) bestimmten Wert von 108 mg/g, was für eine sehr gute Vergleichbarkeit der selbst nach weitgehend gleicher Methode hergestellten Partikeln dieses Typs spricht.

Die Partikeln vom Typ MJH-AGE sind vom Standpunkt der Sorptionskapazität und Affinität am Besten für die Hb-Sorption geeignet. Die gleichen Partikeln, die mit BDE funktionalisiert wurden, erreichen nur etwa 60% der Kapazität der mit AGE funktionalisierten Partikeln. Es wird vermutet, dass die höhere IDA-Ligandendichte der AGE-Partikeln für die höheren Proteinkapazitäten verantwortlich sind (vgl. Abb. 6-49). Ein



ähnlicher Trend lässt sich für PMA-Partikeln beobachten. Die PMA-Partikeln mit der höheren Kupferkapazität erreichen auch eine um ein Drittel höhere Proteinkapazität. Die Kupferkapazitäten korrelieren in grober Näherung linear mit den Proteinkapazitäten (vgl. Abb. 6-56), wobei sich die PVA-Partikeln aufgrund ihrer Eigenkomplexierung von Kupferionen nicht in diesen Trend einordnen lassen (vgl. Abschnitt 6.4.1).

Die gegenüber den emulsionspolymerisierten Partikeln (PMA, PMMA, PVAc, PVA) deutlich höheren Kapazitäten der gecoateten Magnetitpartikeln MJH liegt vermutlich in der rauen Oberflächenbeschaffenheit der MJH-Beads begründet. Eine raue, brombeerartige Partikeloberfläche erweist sich also gegenüber einer sphärischen Partikelform als vorteilhaft.

Die kommerziell erhältlichen PVA-Partikeln mit 2  $\mu\text{m}$  Durchmesser erreichen die geringste Hb-Kapazität. Dies ist vermutlich auf die geringe spezifische Oberfläche aufgrund der glatten und ideal-sphärischen Partikeloberfläche zurückzuführen.

Anhand der PVA-Partikeln ist aber deutlich der Einfluss der Partikelgröße abzulesen. Die Partikeln mit 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser erreichen eine 77% höhere Kapazität gegenüber den Partikeln mit doppeltem Durchmesser.

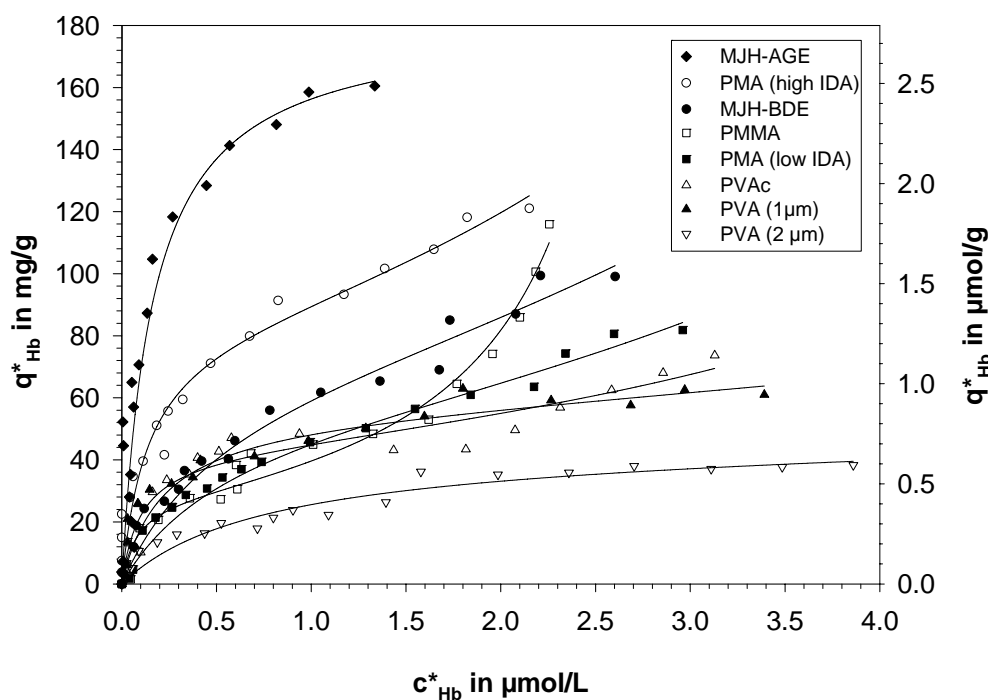


Abb. 6-54: Sorption von bovinem Hämoglobin an verschiedene  $\text{Cu}^{2+}$ -beladene IDA-funktionalisierte ‚Magnetic Beads‘ und BET-Fitkurven

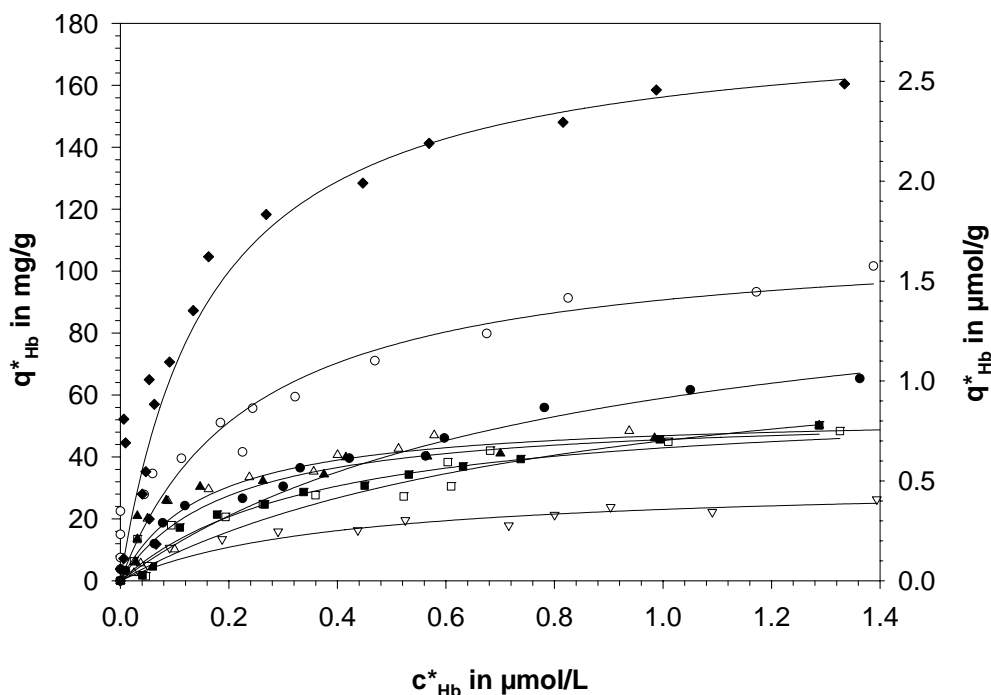


Abb. 6-55: Sorption von bovinem Hämoglobin an verschiedene Cu<sup>2+</sup>-beladene IDA-funktionalisierte ‚Magnetic Beads‘ und Langmuir-Fitkurven (Symbole entsprechend Abb. 6-54)

Tabelle 6-5: Langmuir-Parameter der Sorption von Hb an magnetische IMA-Mikrosorbentien und Cu-Sättigungskapazität

Partikelsorte	q <sub>max</sub> in mg/g	K <sub>d</sub> in µmol/L	q <sub>Cu</sub> in µmol/g
MJH-AGE	182	0.16	74
PMA (high IDA)	112	0.24	58
MJH-BDE	108	0.83	69
PMA (low IDA)	83.9	0.85	7.2
PMMA	58.7	0.37	7.1
PVA (1µm)	54.6	0.20	331
PVAc	52.2	0.16	14
PVA (2µm)	31.1	0.39	n.b.

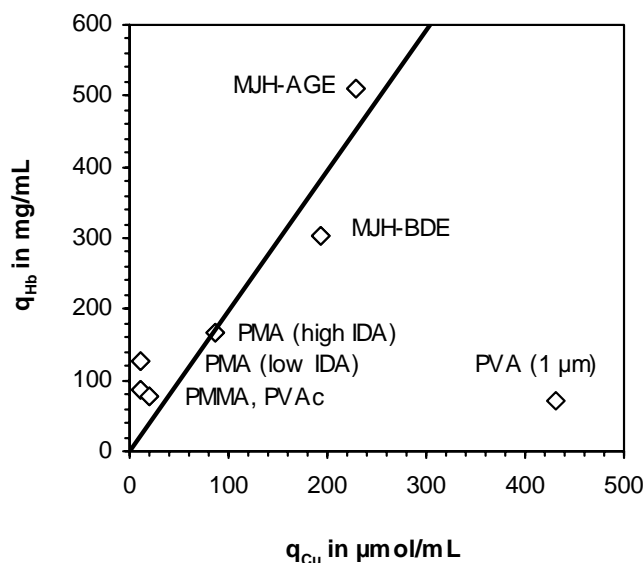


Abb. 6-56: Sorptionssättigungskapazität für Hb als Funktion der Kapazität für Kupferionen für verschiedene Partikelsorten.

#### 6.4.2.3 Nicht-selektive Bindung von Hämoglobin

Um eine effiziente Affinitätsaufreinigung mit gleichzeitig hoher Ausbeute und Reinheit bzgl. des Zielproteins zu erreichen, ist es erforderlich, dass die Bindung an den Affinitästräger ausschließlich über die selektive Wechselwirkung zwischen Protein und Affinitätsligand erfolgt. Tragen daneben weitere Sorptionsmechanismen (wie ionische und hydrophobe Wechselwirkungen) zu einer Bindung bei, so spricht man von nicht-selektiver Bindung. Ein nicht-selektiver Bindungsanteil führt dazu, dass

- ungewünschte Proteinanteile an nicht-selektiven Sorptionsplätzen gebunden werden, d.h. die Produktreinheit nach Elution sinkt,
- und das Zielprotein zum Teil an nicht-selektiven Sorptionsplätzen gebunden wird und damit nicht oder erschwert eluiert werden kann, d.h. die Produktausbeute sinkt.

Die Sorptionskapazität bezüglich des Zielproteins reicht zur Beurteilung der Qualität des Affinitästrägers somit nicht aus. Zur Beurteilung inwieweit die Bindefähigkeit der magnetischen Sorbentien auf die selektive Wechselwirkung zwischen Affinitätsligand und Histidinrest des Proteins zurückzuführen ist, wurden zusätzlich Sorptionsversuche mit Trägerpartikeln durchgeführt, die nicht mit Kupfer-, sondern mit Natriumionen beladen wurden. Abb. 6-57 zeigt die Beladung an Hb in Abhängigkeit der Gleichgewichtskonzentration für die verschiedenen Partikelarten. Die Darstellung zeigt, dass die hydrophoben Polymerpartikeln PVAc und PMA einen nicht vernachlässigbaren Anteil an Hb unspezifisch binden. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den hydrophoben Charakter der Polymermatrix zurückzuführen. Offensichtlich ist die Ligandendichte an IDA nicht ausreichend hoch, so dass Hb über hydrophobe Wechselwirkungen direkt an der Polymermatrix gebunden werden kann.

Die Partikelsorten MJH, PMMA und die hydrophilen Polymerpartikeln PVA zeigen dagegen keinerlei nicht-selektive Bindefähigkeit für Hb.

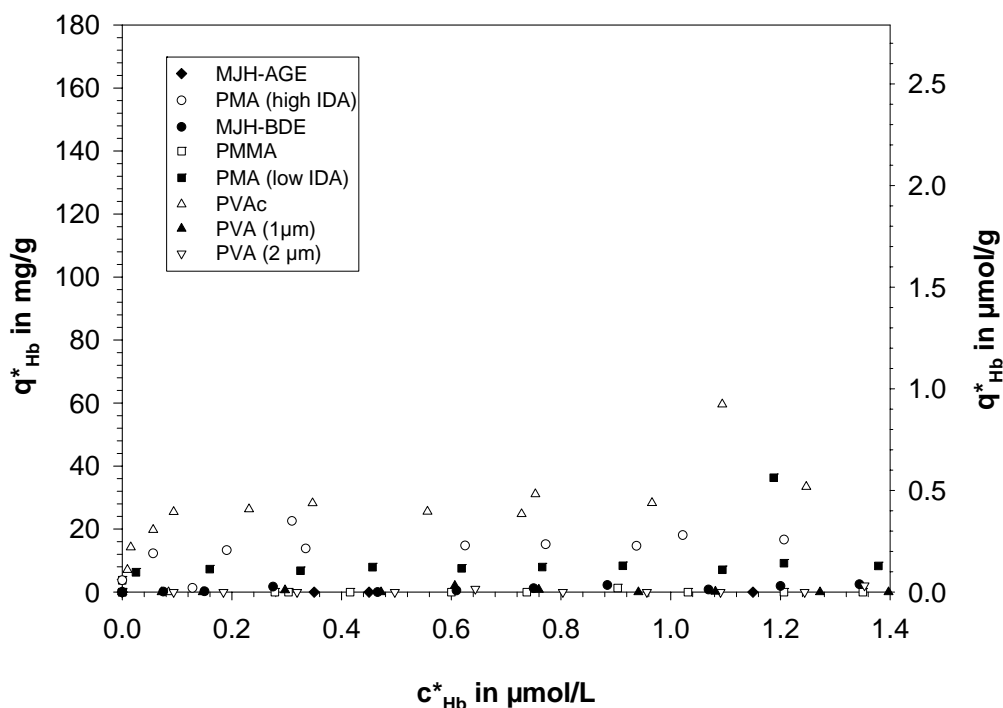


Abb. 6-57: Sorption von Hb an  $\text{Na}^+$ -beladene Träger zur Charakterisierung der nicht-selektiven Bindung von Protein an magnetische IMA-Sorbentien

#### 6.4.2.4 Elution von Hämoglobin

Aufgrund der hohen Affinität des Liganden zum Zielmolekül wurde zur Wiedergewinnung des Hb eine Affinitätselution mit Imidazol (Imidazol 0.1mol/L, pH 7.0, NaCl 1mol/L) durchgeführt. Eine Erhöhung der Imidazol-Konzentration führte im Fall der MJH-BDE-Partikeln zu keiner Verbesserung der Wiedergewinnung (Ergebnisse nicht dargestellt). Der eluierte Anteil zwischen 30 s und 30 min nach Zugabe des Elutionspuffers blieb konstant (MJH-BDE-Partikeln, Ergebnisse nicht dargestellt). Die Kinetik der Elution ist demnach ausgesprochen schnell.

Abb. 6-58 zeigt die wiedergewonnenen Anteile an Hb für die verschiedenen Partikelsorten nach 1 bzw. 2 Elutionsschritten. Die Partikeln wurden relativ gering mit 10-12  $\text{mg/g}$  beladen, so dass eine nahezu vollständige Entfernung des Hb aus der Ausgangslösung beobachtet wurde. Anschließend wurden die Partikeln je zweimal mit Bindepuffer gewaschen und schließlich mit Elutionspuffer (Imidazol 0.1mol/L, pH 7.0, NaCl 1mol/L) eluiert. Die Anteile an eluiertem Protein sind jeweils bezogen auf die errechnete Beladung der Partikeln nach zweimaligen Waschen. Der Verlust durch Waschen lag für die verschiedenen Partikelsorten gemittelt bei 14%.

Insgesamt zeigen die polymeren Magnetpartikeln nur geringe Wiedergewinnungen. Die hydrophilen Polyvinylalkoholpartikeln zeigen darunter vergleichsweise hohe Anteile.

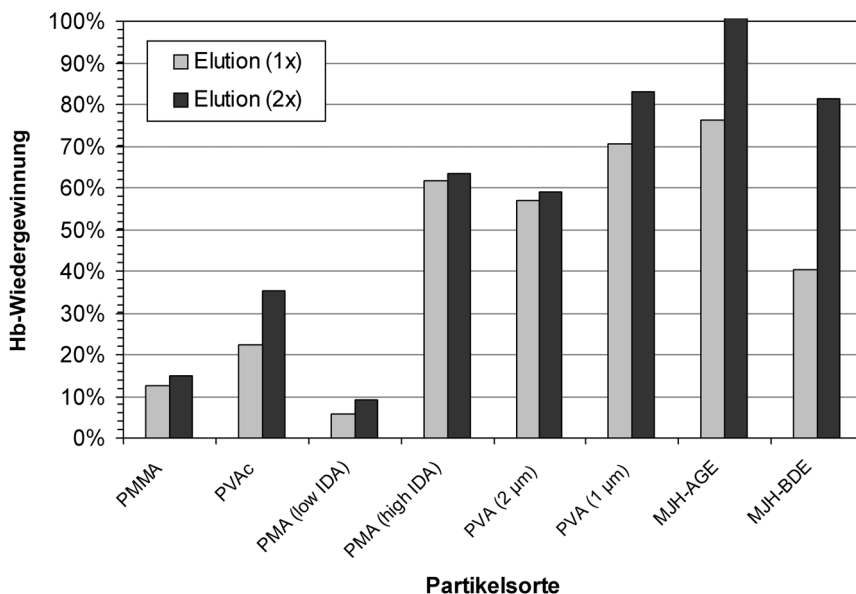


Abb. 6-58: Wiedergewinnung des Zielmoleküls Hb durch Affinitätselution mit Imidazol nach 1 und 2 Elutionsschritten. Angegeben ist der Anteil des eluierten Proteins bezogen auf die Beladung nach dem Waschen des Trägers. (Vorbeladung Hb etwa 10-12 mg/g)

Im Vergleich zu den hydrophoben Polymerpartikeln lässt sich gebundenes Hb von den gecoateten Magnetitpartikeln MJH sehr gut wiedergewinnen. Die mit AGE funktionalisierten MJH-Partikeln erlauben sogar eine vollständige Elution des zuvor sorbierten Hb.

Die enormen Unterschiede in der Elutionsfähigkeit gebundenen Proteins legen die Vermutung nahe, dass die hochaffine Bindung nicht der einzige Sorptionsmechanismus darstellt. Insbesondere die hydrophoben Polymeroberflächen können Protein bei geringer IDA-Ligandendichte über hydrophobe Wechselwirkungen binden. Über hydrophobe Wechselwirkungen gebundenes Protein ist aber nicht über eine Affinitätselution mittels Imidazol desorbierbar, da das hydrophile Imidazol lediglich eine Bindung mit den oberflächengebundenen Cu-Ionen eingeht und nur daran gebundenes Protein verdrängt. Dem Vorteil einer negativen Oberflächenladung von PMA und PMMA und die damit verbundene geringe *ionische* Wechselwirkung mit (negativ geladenen) Proteinen steht also der Nachteil ihres hydrophoben Charakters gegenüber (Pieters 1992). Eine Möglichkeit ihren hydrophoben Charakter zu reduzieren, ist die Co-Polymerisation zusammen mit hydrophilen Polymeren wie Hydroxyethyl-Methacrylat (HEMA; Pieters 1992), die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

In der folgenden Abb. 6-59 ist der Zusammenhang zwischen der Kupferkapazität und dem in zwei Elutionsschritten eluierbaren Proteinanteil dargestellt. Die Kupferkapazität wurde hierbei auf das Partikelvolumen bezogen, da die spezifische Oberfläche nicht für alle Partikelsorten bekannt ist. Der eluierte Anteil bezieht sich auf die Beladung mit Hb nach Waschen der Partikeln.

Der Elutionsanteil steigt näherungsweise logarithmisch mit der Kupferkapazität. Da die Kupferkapazität ein Maß für die IDA-Ligandendichte darstellt, wird deutlich, dass nur

vergleichsweise hohe Immobilisierungsdichten des Affinitätsliganden eine vollständige Eluierbarkeit des Zielproteins erlauben.

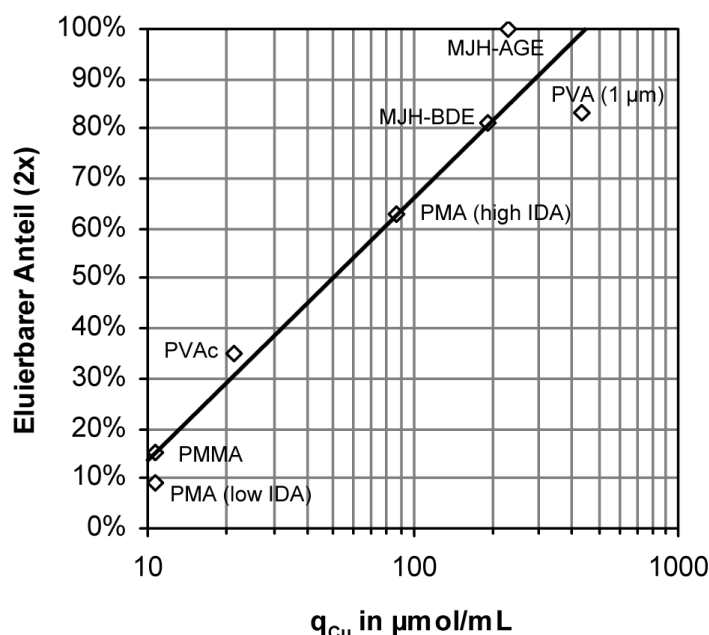


Abb. 6-59: Wiedergewinnung des Zielmoleküls Hb nach zwei Elutionsschritten in Abhängigkeit der partikelvolumenbezogenen Kupfersorptionskapazität (vgl. Abschnitt 6.4.1) für die magnetischen IMA-Mikrosorbentien

#### 6.4.2.5 Zusammenfassung der Hämoglobin-Experimente

Die in diesem Kapitel 6.4.2 dargestellten Ergebnisse der Sorption und der Wiedergewinnung des Modellproteins Hämoglobin an kompakte magnetische Mikrosorbentien lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- *Hohe Bindekapazitäten* für die Sorption von Protein an magnetischen Trägerpartikeln lassen sich durch hohe spezifische Oberflächen erzielen. Diese lassen sich durch kleine Partikeldurchmesser und/oder eine raue Partikeloberfläche erreichen.
- Da für hohe Produktausbeuten eine hohe Beladung im Sorptionsschritt angestrebt werden muss, sind *geringe Dissoziationskonstanten*  $K_d$  erforderlich, um das Zielmolekül in einem Sorptionsschritt möglichst vollständig zu binden und eine hohe Ausbeute zu erzielen. Für sämtliche untersuchten Partikeln wurden für die Sorption von Hb  $K_d$ -Werte unter  $10^{-6}$  mol/L erzielt. In dieser Hinsicht liegt  $K_d$  im für Affinitäts-sorptionen notwendigen Bereich zwischen  $10^{-8}$  und  $10^{-4}$  mol/L (vgl. Kapitel 2).
- *Geringe nicht-selektive Wechselwirkungen* wurden durch hohe Immobilisierungsdichten des Affinitätsliganden bei möglichst *hydrophiler* Partikelmatrix erreicht. Dieser Aspekt erscheint zur Erzielung *hoher Produktreinheiten* nach dem Elutionsschritt aber auch für eine möglichst *vollständige Elution* des Zielmoleküls essenziell.
- Hämoglobin erweist sich als gutes Modellprotein für die Metallaffinitäts-sorption. Zur Untersuchung der Elution ist Hb aufgrund des relativ komplizierten Entfaltungsmechanismuses des tetrameren Hb nicht repräsentativ für „harte“ und monomere Proteine.

In Abb. 6-60 wurden die untersuchten magnetischen IMALT-Sorbentien grob in zwei Gruppen eingeteilt. Dargestellt ist das Verhältnis der Sättigungsbeladungen für Hb und Kupfer in Abhängigkeit der Kupferbeladung in einem doppelt-logarithmischen Diagramm. Partikeln mit hohem Hb-zu-Cu-Verhältnis bei gleichzeitig geringer Kupfer-Beladung legen die Vermutung nahe, dass das Zielprotein nicht-selektiv gebunden wurde, während ein geringes Kapazitätsverhältnis bei hoher Cu-Beladung für eine weitgehend selektive Bindung des Proteins spricht. Dieser Sachverhalt geht einher mit dem in Abb. 6-59 dargestellten eluierbaren Anteil des Hämoglobins.

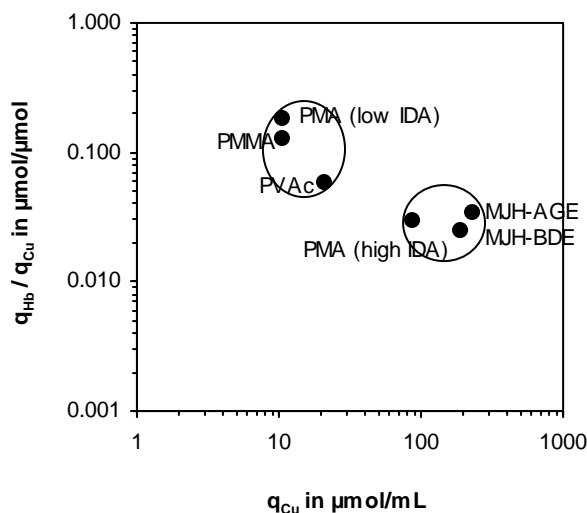


Abb. 6-60: Verhältnis der Hb- und Cu-Beladung für unterschiedliche magnetische Träger.

### 6.4.3 Sorption von $\alpha$ -Chymotrypsinogen (Chy)

Rinder- $\alpha$ -Chymotrypsinogen (Chy) besitzt keinen oberflächennahen Histidinrest (Sulkowski 1987) und zeigt in Folge dessen auch keine Sorptionswechselwirkung mit Metallchelatbildnern. Chymotrypsinogen wurde deshalb als Modellsubstanz verwendet, um nicht-selektive Wechselwirkungen zwischen magnetischen Mikrosorbentien und Protein festzustellen. Abb. 6-61 zeigt Sorptionsisothermen für Chy an vier verschiedene Partikelsorten. Für alle vier getestete Sorten lässt sich keine signifikante Sorption an die Partikeln feststellen. Die Proteinkonzentration im Überstand blieb nach Zugabe der Partikeln unverändert.

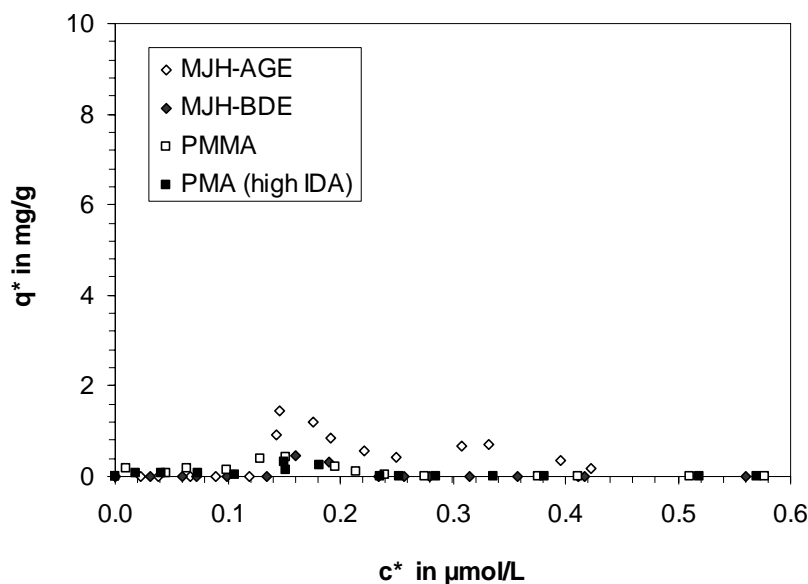


Abb. 6-61: Sorption von Chymotrypsinogen an verschiedene magnetische Sorbentien; Variation der Gleichgewichtskonzentration;

#### 6.4.4 Sorption von Hb-Chy-Mischungen

Um die Sorption eines einzelnen Proteins aus Proteinmischungen in einem zunächst überschaubaren System aus wenigen Proteinen zu untersuchen, wurde eine 1:1 (w/w)-Mischung von Hb und Chy verwendet. Zu der Mischung wurden Partikeln vom Typ MJH-BDE zugegeben. Abb. 6-62 zeigt die Konzentrationen von Hb und Chy im Überstand in Abhängigkeit der verwendeten Partikelkonzentration. Vollständige Sorption des Hb ist auch aus der Mischung möglich. Das Chymotrypsinogen verbleibt erwartungsgemäß vollständig im Überstand.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, inwieweit sich eine Erhöhung der Chy-Konzentration bei gleichbleibender Hb- und Partikelkonzentration auswirkt. Wie aus Abb. 6-63 ersichtlich, wird Chy selbst bei sehr hohen Konzentrationen über 150 µmol/L (~4 g/L) nicht an den Träger gebunden, während die Kapazität für Hb unverändert bleibt.



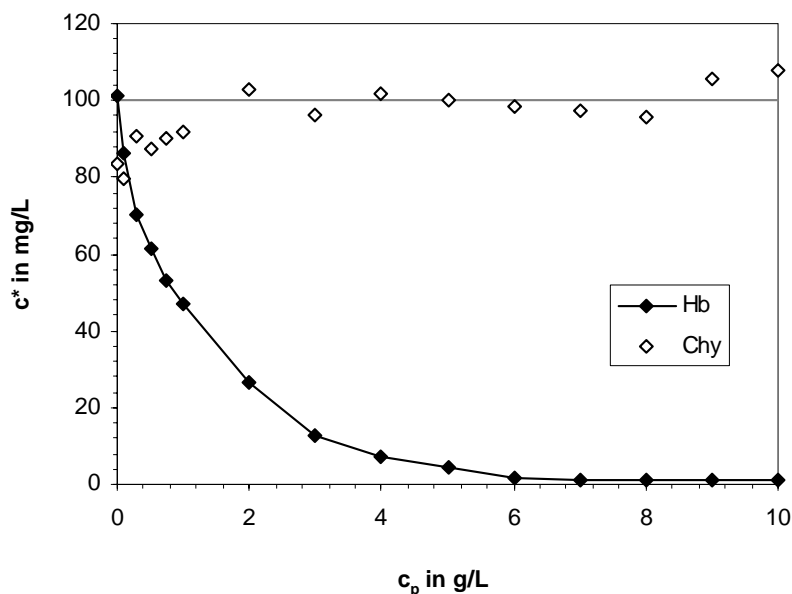


Abb. 6-62: Sorption einer Hb-Chy-Mischung an MJH-BDE; Variation der Partikelkonzentration;

$c_0(\text{Hb}) = 100 \text{ mg/L}$ ,  
 $c_0(\text{Chy}) = 100 \text{ mg/L}$ .

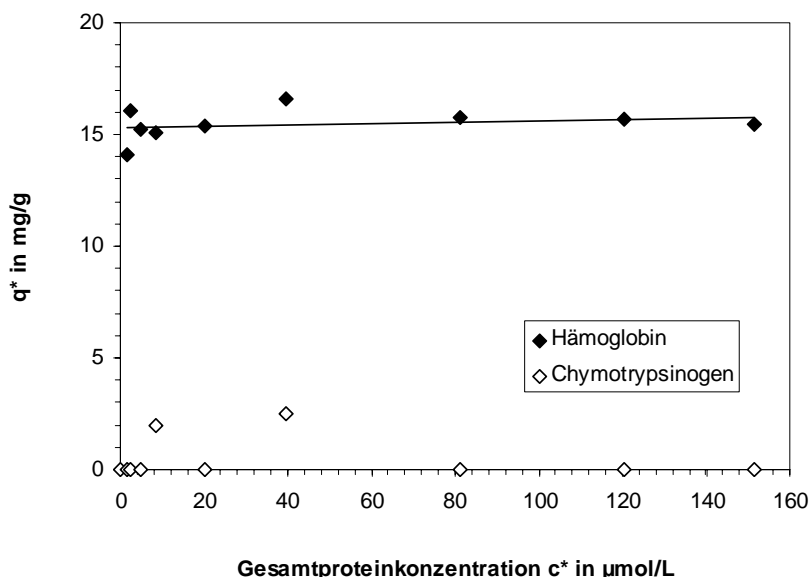


Abb. 6-63: Sorption einer Hb-Chy-Mischung an MJH-IDA; Variation der Gesamtproteinkonzentration;

$c_0(\text{Hb}) = 100 \text{ mg/L}$ ,  
 $c_p = 6 \text{ g/L}$

#### 6.4.5 Aufreinigung von rekombinantem his-getagtem GFP aus E.coli-Homogenisat

Im folgenden Abschnitt ist die Aufreinigung eines Proteins aus der komplex zusammengesetzten Proteinmischung einer rekombinanten *E.coli*-Kultur dargestellt. Das Zielprotein ist ein 5x-his-getagtes grün fluoreszierendes Protein (GFP, siehe Kapitel 5). Nach der Fermentation wurden die geernteten *E.coli*-Zellen durch Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen und anschließend zum Teil durch Zentrifugation geklärt, zum Teil aber direkt das ungeklärte Homogenisat verwendet

##### 6.4.5.1 Sorption und Elution aus zellfreiem E.coli-Homogenisat

Zur Untersuchung der Sorption des GFP an magnetische Mikrosorbentien wurde zunächst das geklärte Homogenisat (ohne Zellen und Zellbruchstücke) verwendet. Das geklärte

Homogenisat wurde mit Phosphatpuffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mmol/L, pH 6.8, NaCl 1 mol/L) 1:1000 verdünnt.

Abb. 6-64 zeigt die Gleichgewichtskonzentration an GFP im Überstand nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an magnetischen IMA-Mikrosorbentien. Jede verwendete Partikelsorte erlaubt eine vollständige Entfernung des Zielproteins aus der Lösung. Die AGE-funktionalisierten MJH-Partikeln weisen sich dabei durch eine besonders hohe Sorptionskapazität aus.

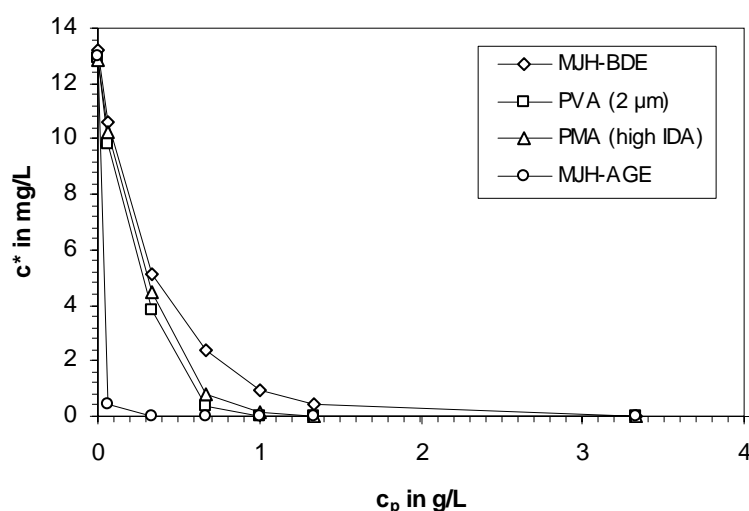


Abb. 6-64: Sorption von GFP aus zellfreiem *E.coli* Homogenisat an unterschiedliche magnetische Trägerpartikeln;  $c_0$  (GFP) = 13 mg/L. Der Zellaufschluss wurde durch Zentrifugation geklärt und 1:1000 verdünnt.

Abb. 6-65 zeigt die Sorptionsisothermen bei Raumtemperatur, wobei der geteilte Maßstab der Ordinatenachse zu beachten ist. Die Trägerpartikeln vom Typ BDE, PVA und PMA zeigen bereits bei geringen Gleichgewichtskonzentrationen eine beginnende Mehrschichtadsorption, während die AGE-Partikeln eine Sättigungskapazität auf deutlich höherem Niveau um 380 mg/g aufweisen.

Tabelle 6-6 stellt die Langmuir-Parameter der Sorption von Hb und GFP gegenüber. Für die Sorption von GFP werden für alle Träger deutlich geringere Dissoziationskonstanten (im Mittel um den Faktor 60) im Vergleich zu Hb gefunden. Dies erklärt sich im Vorhandensein des 5xHis-Tags des rekombinanten GFPs.

Die geringere Kapazität der Träger BDE, PVA und PMA für GFP im Vergleich zu Hb erklärt sich sehr wahrscheinlich durch eine erfolgte Alterung der Trägerpartikeln. Zum Zeitpunkt der GFP-Sorption waren diese Träger bereits etwa 6 Monate alt und seit der Herstellung bei Raumtemperatur gelagert. Es wird ein teilweiser mikrobieller und/oder chemischer Abbau der Affinitätsliganden vermutet. Die Partikeln vom Typ AGE waren dagegen frisch synthetisiert bzw. bei 8°C gelagert.

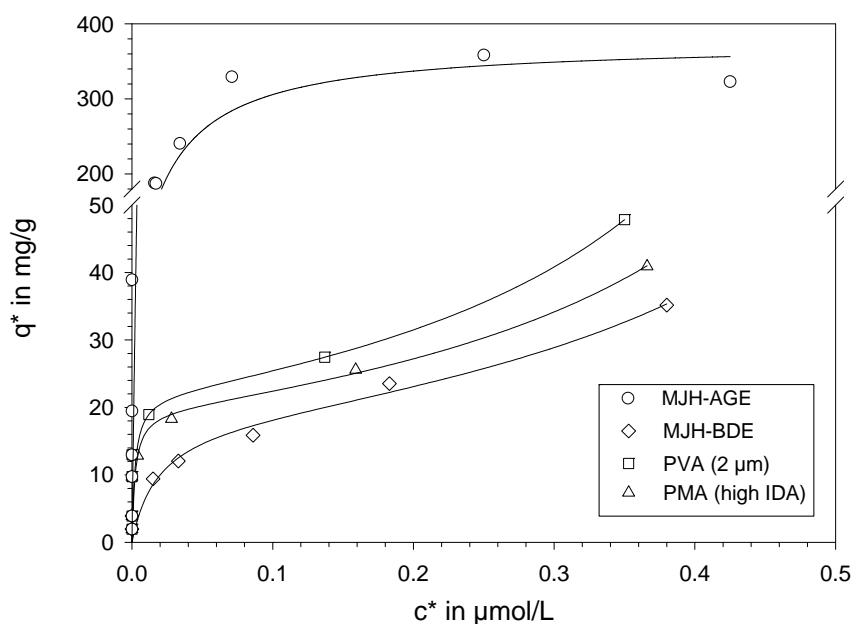


Abb. 6-65: Sorption von GFP aus zellfreier Biosuspension an unterschiedliche magnetische IMA-Trägerpartikeln und Fitkurven,  $T=25^{\circ}\text{C}$

Tabelle 6-6: Langmuir-Parameter der Sorption von GFP und Hb an magnetische IMA-Träger

Partikelsorte	$K_d$ (GFP) in $\mu\text{mol/L}$	$q_{\text{max}}$ (GFP) in $\text{mg/g}$	$K_d$ (Hb) in $\mu\text{mol/L}$	$q_{\text{max}}$ (Hb) in $\text{mg/g}$
MJH-AGE	0.0228	376	0.16	182
MJH-BDE	0.0155	18.5	0.83	108
PVA (2 $\mu\text{m}$ )	0.0062	28.7	0.39	31.1
PMA (high IDA)	0.0021	19.7	0.24	112

Nach erfolgter Sorption wurden die Partikeln magnetisch separiert und mit Bindepuffer gewaschen. Der Anteil an GFP im Waschpuffer bezogen auf die sorbierte GFP-Menge ist in Abb. 6-66 dargestellt. Der Waschverlust steigt tendenziell mit der Vorbeladung an. Auffällig ist, dass die Partikelsorte AGE einen merklich geringeren Waschverlust aufweist, was vermutlich daran liegt, dass GFP vollständig über die hochaffine Metallchelate-Bindung gebunden vorliegt, während die anderen Partikelsorten einen Teil der Proteins nicht-selektiv gebunden haben.

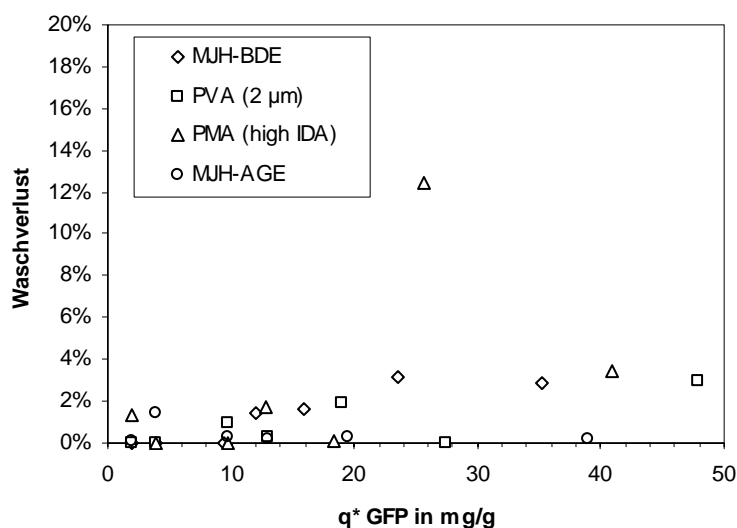


Abb. 6-66: Verlust an GFP durch einen Waschschrift mit Bindepuffer

Nach dem Waschen der Sorbentien wurden diese in Elutionspuffer resuspendiert, nach 10 min magnetisch separiert und in einem 2. Elutionsschritt erneut mit Elutionspuffer versetzt und magnetisch separiert. Der eluierte Anteil an GFP der zwei Desorptionsschritte bezogen auf das nach dem Waschschrift gebundene GFP ist in Abb. 6-67 in Abhängigkeit der Beladung gezeigt. Für sämtliche untersuchten Partikeln wird ein relatives Maximum durchlaufen. Der Verlauf entspricht somit qualitativ dem der Elution von Hb. Der wiedergewonnene Anteil ist allerdings für GFP deutlich höher als für Hb, was mit der Entfaltung des Hb auf der Oberfläche erklärt werden kann. Das monomere GFP ist in diesem Sinne ein „hartes“ Protein, das seine Tertiärstruktur während des Sorptionsvorgangs nicht verändert. Der starke Rückgang der Eluierbarkeit mit zunehmender Partikelbeladung erklärt sich durch die zunehmende Besetzung nicht-selektiver Sorptionsplätze über hydrophobe Wechselwirkungen. Nicht-selektive gebundenes GFP ist nicht über eine Affinitätselution desorbierbar. Außerdem steigt mit zunehmender Beladung auch die Gleichgewichtskonzentration während der Desorption, so dass auch bei ‚ungünstiger‘ Desorptionsisotherme das Sorptions-Desorptions-Gleichgewicht vermehrt auf der Seite der Sorption liegt. Dieser Einfluss wurde durch eine zweistufige Elution allerdings weitgehend eliminiert.

Der Rückgang des eluierten Anteils für sehr geringe Kapazitäten spricht dafür, dass ein bestimmter Anteil irreversibel gebunden bleibt. Eine weitere Vermutung ist aber, dass der Komplexbildner Imidazol im Elutionspuffer einen Teil des zweiwertigen Eisens aus dem Magnetitanteil der Partikeln mobilisiert. O’Brien (1995) berichtet über eine Eisensfreisetzung von bis zu 0.9 %w/w des in den Partikeln enthaltenden Eisens im Sorptionschritt und Elutionsschritt. Eisen hat das Vermögen die Fluoreszenz von GFP durch Überführung in eine reduzierte Form zu löschen (Inouye 1994). Da für geringe Beladungen das Verhältnis zwischen Magnetit und GFP besonders hoch ist, macht sich dieser Effekt in diesem Bereich besonders bemerkbar. Diese Vermutung würde bedeuten, dass die eluierten Anteile für geringe Beladungen analytisch unterschätzt werden. In praktischer Hinsicht ist der Bereich geringer GFP-Beladungen aber weitgehend uninteressant, da Kapazitätsausnutzung und Produktreinheit hier gering sind.

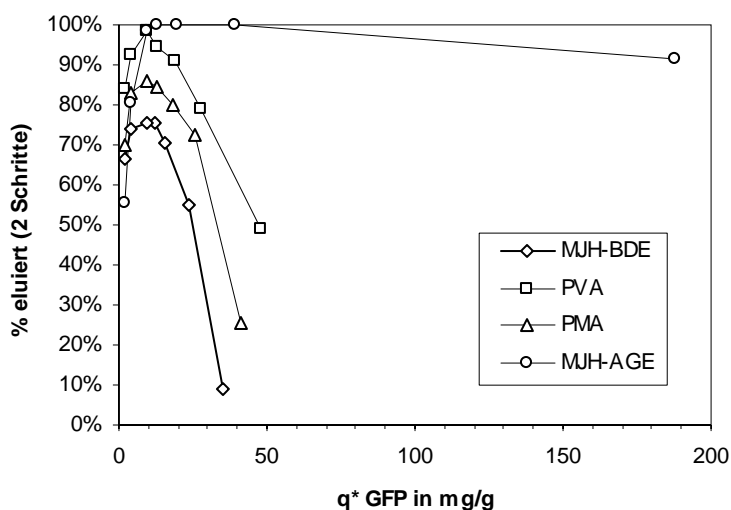


Abb. 6-67: Anteil an eluiertem GFP in zwei Elutionsschritten mit Imidazolpuffer (0.1 mol/L Imidazol, pH 7.0, 1.0 mol/L NaCl)

Die Reinheit des Eluats im ersten Elutionsschritt E1 ist in Abb. 6-68 in Abhängigkeit der GFP-Beladung dargestellt. Alle Partikelarten erlauben die Erzielung einer Reinheit von etwa 99%. Dabei ist die Reinheit als Anhaltswert zu betrachten, da sowohl die Konzentrationsbestimmung des GFP, als auch die Gesamtproteinbestimmung mit einem Fehler behaftet sind. Da in den Eluatproben zusätzlich die Eigenabsorption des Elutionsmittels Imidazol bei der photometrischen Messung kompensiert werden musste, erhöht sich der Messfehler zusätzlich.

Zur Erzielung einer hohen Reinheit müssen die Partikel BDE, PVA und PMA zumindest auf die Sättigungsbeladung vorbeladen sein, da sonst offensichtlich andere Proteine die unbesetzten Sorptionsplätze einnehmen und im Elutionsschritt desorbiert werden. Die Partikel AGE sorbieren dagegen bereits bei einer Beladung von nur 10% der Sättigungsbeladung kein Fremdprotein mehr, bei einer Beladung von 188 mg/g betrug die Ausbeute nach 2 Elutionsschritten immer noch 81 %.

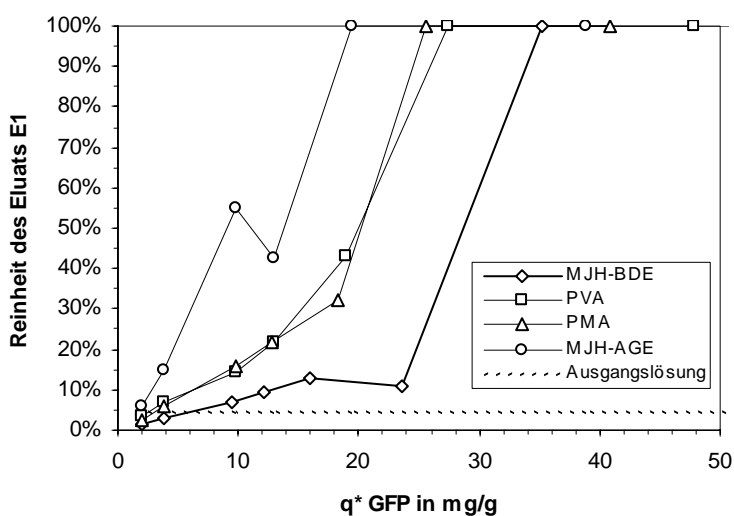


Abb. 6-68: Reinheit des Eluats E1 ( $= c_{\text{GFP}} / c_{\text{Protein}}$ )

In den folgenden Abbildungen Abb. 6-69 und Abb. 6-70 ist der Konzentrationsfaktor bzw. die Ausbeute an GFP in Abhängigkeit der Vorbeladung des Trägers dargestellt. Beide Kennzahlen sind im Wesentlichen durch das Elutionsvermögen (vgl. Abb. 6-67) bestimmt. Der Verlust durch Waschen des Trägers macht sich nur untergeordnet bemerkbar. Der maximal erreichbare Konzentrationsfaktor ist über das Volumenverhältnis zwischen Sorption und Elution mit einem Wert von 5 vorgegeben.

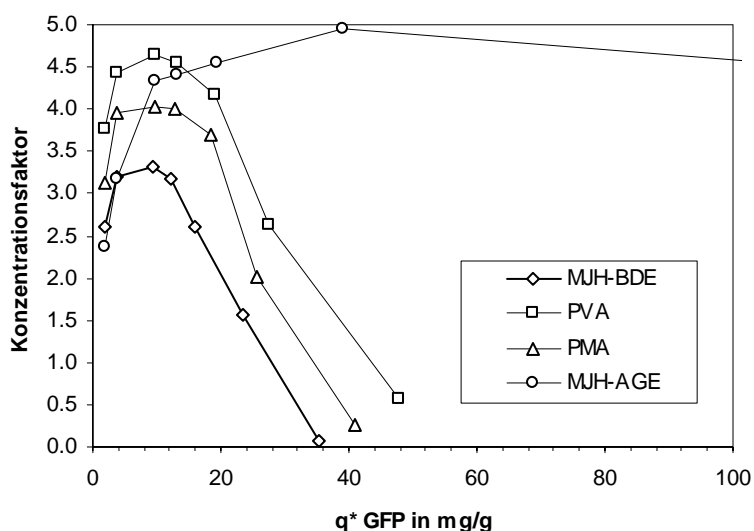


Abb. 6-69: Aufkonzentrierung in Abhängigkeit der Beladung  $q^*$

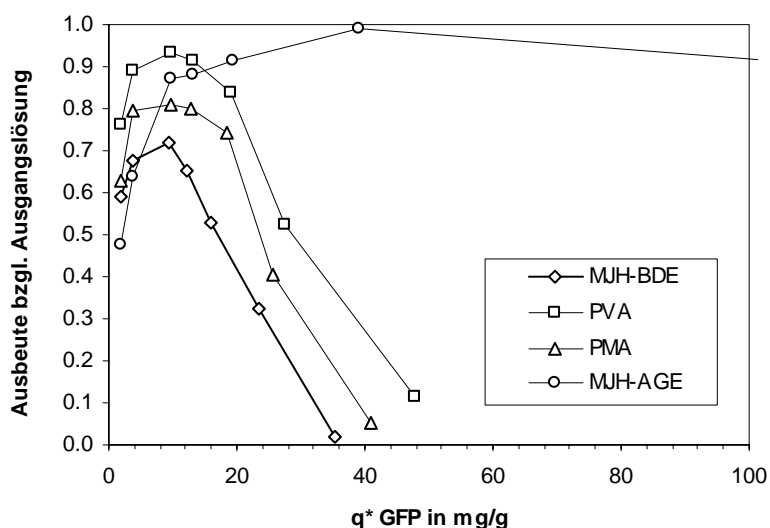


Abb. 6-70: Gesamtausbeute an GFP in Abhängigkeit von  $q^*$

Für die Partikelsorten BDE, PVA und PMA ergibt sich jeweils eine „Trade-off“-Situation zwischen erreichter Ausbeute und Reinheit des Produkts. Mit höherer Beladung des Trägers steigt zwar die erreichte Reinheit über etwa 99 % an, die dabei erzielten Ausbeuten sind dabei allerdings stark reduziert (vgl. Abb. 6-68 und Abb. 6-70). Für diese Partikelsorten muss deshalb durch Einstellung des Sorptiv-zu-Sorbens-Verhältnisses eine Abwägung getroffen werden. Ein anderes Verhalten zeigen die Partikel AGE, die mit zunehmender Reinheit eine Erhöhung der Ausbeute zur Folge haben. Im Experiment ließ

sich für eine Beladung von 39 mg/g eine Ausbeute von 99.0% bei einer Reinheit von etwa 99% erzielen (siehe Abb. 6-71).

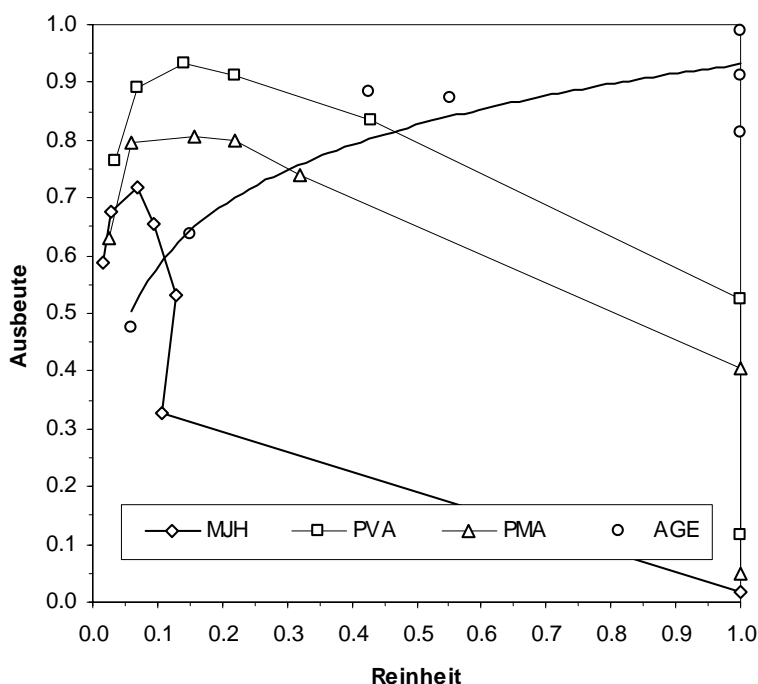


Abb. 6-71: Zusammenhang zwischen Ausbeute und Reinheit an GFP.

#### 6.4.5.2 Aufreinigung aus ungeklärtem *E.coli*-Homogenisat

Auf Basis der vorangehenden Ergebnisse wurde GFP aus ungeklärtem *E.coli*-Zellaufschluss durchgeführt. Verwendet wurden die Partikel PVA, da diese eine vollständige Elution erlaubten. Die Partikel MJH-AGE standen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung. Das Zellhomogenisat nach Zellaufschluss wurde mit Phosphatpuffer 1:20 verdünnt, nachdem es bei der Zellernte um den Faktor 35.6 konzentriert worden war. Die Proteinausgangskonzentrationen lagen somit um den Faktor 1.8 über der Konzentration der Fermentationsbrühe. In der Ausgangssuspension für die Aufreinigung betrug die Gesamtproteinkonzentration somit 11 g/L mit einer GFP-Konzentration von 592 mg/L.

Da auch für die PVA-Partikel eine klare ‚Trade-off‘-Situation zwischen Reinheit und Produktausbeute besteht (vgl. Abb. 6-68 und Abb. 6-70), musste eine Abwägung stattfinden. Die angestrebte Beladung wurde so gewählt, dass die Produktausbeute nicht unter 85% absinkt, was bei einer Beladung von 18 mg/g noch gewährleistet ist. Gleichzeitig ließ sich bei dieser Beladung noch eine deutliche Aufreinigung um den Faktor 8 erreichen. Unter dieser Maßgabe wurde eine vergleichsweise hohe Partikelkonzentration von 33 g/L eingestellt:

$$q \approx \frac{c_{0,\text{GFP}}}{c_p} = \frac{592 \text{ mg/L}}{33 \text{ g/L}} = 18 \frac{\text{mg}}{\text{g}}$$

Tabelle 6-7 zeigt die Aufreinigung unter diesen Bedingungen. In Abb. 6-72 ist das Elektrophorese-Gel der Aufreinigungsfraktionen abgebildet. Das vollständige Verschwinden der

GFP-Bande im Überstand ist dabei deutlich zu erkennen. Die Gesamtausbeute nach 2 Elutionsschritten lag mit 87 % im Erwartungsbereich. Durch einen dritten Elutionsschritt konnte die Gesamtausbeute sogar auf 96 % gesteigert werden. Der Aufreinigungsfaktor im ersten Elutionsschritt lag bei etwa 7. Die Ergebnisse zeigen somit, dass sich das Aufreinigungsverhalten der geklärten und stark verdünnten Biosuspension ausgezeichnet auf eine 50-fach höher konzentrierte und Zelldebris enthaltende Biosuspension übertragen lässt. Die Verwendung der AGE-Partikeln verspricht somit die Erzielung einer hohen Reinheit bei gleichzeitig hoher Produktausbeute auch aus ungeklärter Suspension (vgl. Abb. 6-71)

Tabelle 6-7: Aufreinigungstabelle für die IMA-Extraktion von GFP aus rohem *E.coli* Homogenisat mittels magnetischer PVA-Mikrosorbentien.

Aufreinigungsstufe	Volumen (mL)	Gesamtprotein (mg)	Gesamtprot.konz. (g/L)	GFP (µg)	GFP-Konz. (mg/L)	GFP Ausbeute (%)	Purifikationsfaktor P	Reinheit (% w/w)	Konzentrationsfaktor
Ungeklärtes Homogenisat	1.5	16.8	11.2	888	592	(100)	(1)	5.28	(1)
Sorptionsüberstand	1.5	10.7	7.13	10.7	7.2	1.2	0.02	0.10	0.01
Waschüberstand 1	1.5	3.22	2.14	8.4	5.6	1.0	0.05	0.26	0.01
Waschüberstand 2	1.5	0.35	0.24	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00
Elution 1	0.3	1.55	5.17	568	1894	64.0	6.9	36.6	3.20
Elution 2	0.3	1.14	3.82	205	682	23.0	3.4	17.9	1.15
Elution 3	0.3	0.94	3.12	59.9	200	6.7	1.2	6.40	0.34
Gesamtausbeute(%)		106%				95.9%			
Ausbeute im Eluat 1-3 (%)		22%				93.8%			

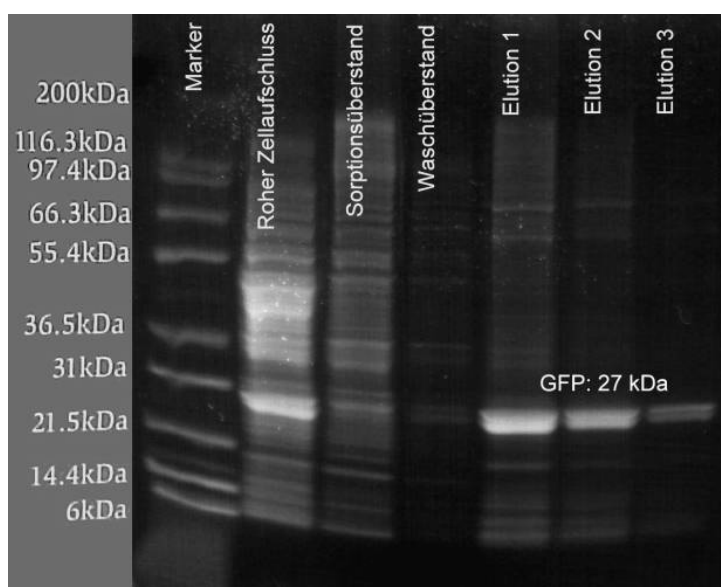


Abb. 6-72: Elektrophorese-Gel der Aufreinigungsfraktionen



### 6.4.5.3 Automatisierte Aufreinigung von GFP aus ungeklärtem *E.coli*-Homogenisat mittels des HGF-10-Systems

Abschließend wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem GFP unter Verwendung des HGF-10-Systems weitgehend automatisiert aus einem rohen *E.coli*-Homogenisat aufgereinigt wurde.

Zur Sorption wurden MJH-AGE-Mikrosorbentien verwendet. Diese wurden nach Beladung mit Kupferionen in einer Endkonzentration von 3.3 g/L der *E.coli*-Suspension von 250 mL zugegeben. Das *E.coli*-Homogenisat entsprach in seiner Zusammensetzung dem des Abschnitts 6.4.5.2. Nach Zugabe der Partikeln verblieben noch etwa 3% des ursprünglich vorhandenen GFPs im Überstand. Um eine möglichst hohe Reinheit des Produkts zu erzielen, wurde dieser geringe Verlust in Kauf genommen. Die Partikelbeladung betrug 176 mg/g.

Zur Realisierung höherer Filtergeschwindigkeiten für eine verbesserte Filtrerrückspülung wurde der Filterquerschnitt durch einen Messing-Einsatz bei gleichbleibender Filterlänge auf einen Kreisquerschnitt mit 10 mm Durchmesser reduziert und das Filtervolumen von nun 9.4 mL mit Stahlwolle ( $\epsilon = 0.96$ ) in axialer Orientierung befüllt.

Der HGF-10 wurde zunächst mit Wasser, dann etwa 5 min lang mit Bindepuffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mmol/L, pH 6.8, NaCl 1 mol/L) gespült. Bei eingeschaltetem Magnetfeld wurde die dunkelbraune Suspension aus Zellhomogenisat und den Magnetic Beads mit einer Filtergeschwindigkeit von 24 m/h aufgegeben, wonach das weißliche Zellhomogenisat am Ablauf aufgefangen werden konnte. Die Magnetpartikeln wurden optisch vollständig im HGMS zurückgehalten. Nach vollständiger Aufgabe der Ausgangssuspension wurde erneut Bindepuffer aufgegeben bis keine Zelldebris mehr im Ablauf beobachtet wurde. Der Ablauf wurde aufgefangen („HGMS-Durchfluss“). Der Zulauf wurde unterbrochen und auf Kreislaufbetrieb umgeschaltet. Hierzu wurden gleichzeitig (i) das Ventilsystem so geschaltet, dass die im Separator verbliebenen Magnetpartikeln im Kreislauf gespült werden konnten, (ii) das Magnetfeld abgeschaltet, (iii) Ultraschall zugeschaltet und (iv) die Pumpengeschwindigkeit bei umgekehrter Pumprichtung auf die 58-fache Filtergeschwindigkeit (1380 m/h) erhöht. Nach einer Minute Kreislaufspülen wurden die Partikeln bei eingeschaltetem Magnetfeld und einer Filtergeschwindigkeit von 24 m/h wieder separiert und das System schließlich mit Bindepuffer durchspült. Der Ablauf wurde aufgefangen („HGMS-Waschschritt“). Das System wurde nun mit Elutionspuffer (Imidazol 100 mmol/L, NaCl 1 mol/L, pH 7.0) gefüllt, eine erneute Kreislaufspülung durchgeführt, die Partikeln erneut separiert und das Eluat ausgespült und aufgefangen („HGMS-Elution“).

In Abb. 6-73 ist das Elektrophorese-Gel der Aufreinigungsfraktionen abgebildet. Deutlich zu erkennen ist die weitgehende Entfernung der GFP-Bande nach erfolgtem Sorptions-schritt (Fraktion „Sorptionsüberstand“). Entsprechend ist auch im Ablauf des HGF-10 nach dem ersten Separationsschritt nur wenig GFP enthalten (Fraktion „HGMS-Durchfluss“). Im Waschschritt werden Proteine, die nicht oder nur schwach an den Träger gebunden waren, ebenso entfernt wie ein geringer Anteil verschleppter Zelldebris. Ein geringer Anteil an GFP gelangt ebenso in die Waschfraktion (vgl. Fraktionen „HGMS-Waschschritt“). Im

Eluat ist im Elektrophorese-Gel ausschließlich das Zielprotein GFP nachweisbar (Fraktionen ‚GFP-Elution‘).

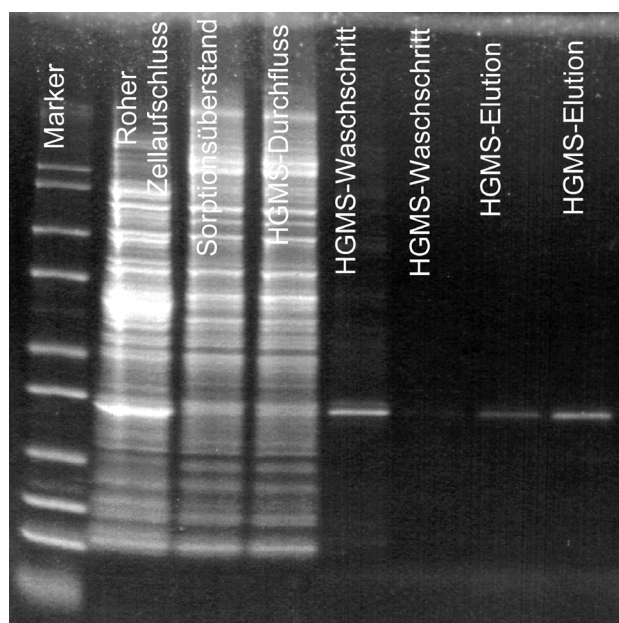


Abb. 6-73: Elektrophorese-Gel der Aufreinigungsfractionen;

Von links nach rechts: Marker, Rohes Zellaufschluss, Sorptionsüberstand, HGMS-Durchfluss, HGMS Waschschrift (zwei zeitlich nacheinander genommene Proben), HGMS-Elutionsschritt (zwei zeitlich nacheinander genommene Proben).

Eine Bestimmung der Ausbeute und der Konzentration des GFP in den Einzelfractionen war im Anschluss an den Versuch jedoch überraschenderweise nicht möglich. Die Ursache hierfür ist vermutlich in dem Umstand zu suchen, dass die verwendete Imidazol-Elutionslösung auch die verwendete Stahlwollmatrix und den zur Volumenverringern verwendeten Messinginsatz korrodierte. Als Folge kam es zu einer hohen Metallionenkonzentration in den Elutionslösungen, die die Fluoreszenzwirkung des GFP irreversibel inhibierte (vgl. hierzu die Anmerkungen in Abschnitt 6.4.5.1). Durch eine Verbesserung der Korrosionsbeständigkeit der innerhalb des Separators HGF-10 verwendeten Materialien lässt sich dieses Problem aber zukünftig sicherlich vermeiden.

Trotz der fehlenden quantitativen Auswertung konnte jedoch gezeigt werden, dass das System HGF-10 dafür geeignet ist, nach erfolgter Zugabe magnetischer Mikrosorbentien zu einer Biosuspension, sämtliche für eine Aufreinigung des Zielproteins notwendigen Schritte weitgehend automatisiert durchzuführen und das Produkt in hoher Reinheit zu erhalten. Eine vollautomatische Durchführung ist zukünftig durch eine einfache Zeitsteuerung der Einzelschritte problemlos durchführbar. Eine automatisierte Zugabe der magnetischen Mikrosorbentien über eine Mischdüse erscheint ebenso realisierbar.

## 7 Fazit und Ausblick

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an,  
interessant zu werden, wo sie aufhört.“  
*Justus Freiherr von Liebig (1803-1873),  
deutscher Chemiker*

### Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurden die Voraussetzungen für ein neuartiges Verfahren geschaffen, das durch die Kombination von Magnetseparationsschritten und hochselektiver Affinitäts-Sorptionstechnik eine Integration mehrerer konventioneller Prozessstufen der primären Bioproduktaufarbeitung wie Fest-Flüssig-Trennung, Aufkonzentrierung und Aufreinigung ermöglicht.

Hierfür wurden geeignete Magnetseparatoren ausgelegt und konstruiert, die in der Lage sind, Partikeln im Mikrometermaßstab selektiv von Zellen und Zelldebris im gleichen Größenbereich zu trennen. Desweiteren wurden mathematische Beschreibungen des Separationsvorgangs entwickelt, Möglichkeiten zur Herstellung geeigneter magnetischer Mikrosorbentien aufgezeigt und das Separationsverhalten der Magnetseparatoren, die Sorptionseigenschaften der Partikeln und schließlich, an einem Beispiel, die Leistungsfähigkeit des Gesamtverfahrens charakterisiert.

Obwohl mehrere Magnetseparationsverfahren untersucht und miteinander verglichen wurden, bestand der Wunsch ein Verfahren gezielt für den Verwendungszweck des Downstream Processings voranzutreiben. Da sich anhand der Untersuchungen die HGMS als das Verfahren mit dem in näherer Zukunft größten Potential herausgestellt hatte, wurde dieses Verfahren favorisiert und anhand von Untersuchungen im Labor-Maßstab optimiert. Im Vergleich zu jüngsten Veröffentlichungen wurden hierbei wesentliche Verbesserungen hinsichtlich erreichbarer Aufnahmekapazität für Magnetbeads und hinsichtlich der Partikelwiedergewinnung nach erfolgter Separation erzielt.

Aufbauend hierauf wurde das Verfahren zusammen mit dem Industriepartner der Arbeitsgruppe ‚Magnettechnologie‘ in einen industriellen Separatortyp (HGF-10) umgesetzt, der auf einem neuartigen Prinzip eines schaltbaren Permanentmagneten beruht und somit nur geringe Betriebskosten verursacht. Der dabei verwendete Ansatz für die Filterrückspülung die Magnete anstelle der Filtermatrix zu bewegen, bieten den Vorteil, dass keinerlei bewegliche Teile mit der Prozessflüssigkeit in Kontakt geraten. Dies vereinfacht die Konstruktion erheblich, macht kostspielige Dichtungen überflüssig und erhöht die Bereitschaft, das System in der Bioprozesstechnik einzusetzen. Wie in Berechnungen und in der Praxis demonstriert wurde, kann ein Upscaling des Systems auf höhere Volumenströme mit geringem Aufwand durchgeführt werden.

Wie sich im Laufe der Arbeit zeigte, ist die größte Bedeutung für den Erfolg des Gesamtverfahrens den magnetischen Mikrosorbentien zuzuordnen. Da die Partikeln ein Zielmole-

kül mit hoher Bindekapazität und Selektivität (hinsichtlich anderer Biomoleküle) binden müssen, die Partikeln selbst zugleich mit hoher Separatorkapazität und Selektivität (hinsichtlich anderer Feststoffe) magnetisch separiert werden sollen, lässt sich das erforderliche Anforderungsprofil grob in zwei Gruppen aufteilen: (i) in die physikochemischen Sorptionseigenschaften der Partikeloberfläche und (ii) in die physikalischen Partikeleigenschaften, welche die Magnetseparation beeinflussen. Hinsichtlich (i) muss neben einer hohen spezifischen Oberfläche auch eine hohe Ligandendichte des Affinitätsliganden erzielt werden, um hohe Bindekapazitäten für das Zielprotein aber idealerweise keine Bindekapazitäten für alle weiteren Inhaltsstoffe zu erreichen.

Zahlreiche Chargen magnetischer Mikropartikeln wurden im Rahmen der Arbeit synthetisiert, darunter Polymerpartikeln mit eingeschlossenem nanoskaligen Magnetit, synthetischer Magnetit und mit Polymeren beschichtete Magnetitpartikeln. Für sämtliche Partikelarten ließ sich eine gute magnetische Separierbarkeit erreichen, wobei die Partikeln eine Größe um etwa 1  $\mu\text{m}$  aufwiesen. Für die meisten Partikelarten wurde eine sehr enge Partikelgrößenverteilung zusammen mit superparamagnetischem Verhalten erzielt, d.h. die Partikeln weisen eine hohe Magnetisierung im Magnetfeld aber keinerlei Remanenz nach Abschalten des Feldes auf. Hierdurch werden eine irreversible magnetische Agglomeration der Partikeln und ein magnetisches Anhaften an eine HGMS-Drahtmatrix verhindert.

Während für kommerziell erhältliche Träger häufig viel Aufwand betrieben wird, um ideale Kugeln als nicht-poröse Mikrosorbentien herzustellen, zeigte sich in der Arbeit, dass deutlich höhere Sorptionskapazitäten bei gleichem Stoffübergangskoeffizienten durch Herstellung einer rauen, brombeerartigen Partikeloberfläche erzielt werden können.

Aufgrund ihres ausgezeichneten Eigenschaftsprofils werden polyglutaraldehyd-beschichtete, mit Allyl-Glycidylether aktivierte und mit IDA funktionalisierte magnetischen Mikrosorbentien (Typ MJH-AGE) für den Verwendungszweck der magnetischen Metallaffinitätsaufreinigung Histidin-getaggtter Proteine favorisiert. Insbesondere die hohe spezifische Bindungskapazität von über 350 mg je Gramm Träger für ein rekombinantes, monomeres und zur Aufreinigung modifiziertes Modellprotein (5x-His-GFP) zusammen mit dem weitgehenden Fehlen einer nicht-selektiven Bindekapazität lassen diesen Partikeltyp nach dem aktuellen Stand der Forschung als ideal erscheinen.

### **Ausblick**

Eine dritte Kategorie an Partikeleigenschaften, die zuvor nicht genannt wurde, lässt sich mit ‚Stabilität‘ (iii) umschreiben. Dies bedeutet neben der mechanischen und chemischen Stabilität der Partikeln selbst auch ein ‚biokompatibles‘ Verhalten der Partikeln gegenüber den oft labilen Bio-Makromolekülen. Mobilisierbare Inhaltsstoffe aus den Partikeln (wie Schwermetallionen oder organische Monomere) können Biomoleküle verunreinigen, inaktivieren oder sogar irreversibel schädigen. Umgekehrt können die Partikeln durch längeren oder mehrmaligen Kontakt mit rohen Biosuspensionen über Foulingmechanismen un-

brauchbar werden. Insbesondere sollte der für die Partikeln oft kostenbestimmende Affinitätsligand selbst nicht mobilisiert werden können (Leakage), weshalb er in der Arbeit ausschließlich kovalent immobilisiert wurde. Diese Frage der Trägerstabilität erfordert weitere Studien, insbesondere für den Bereich der pharmazeutischen Bioproduktaufreinigung, für den strikte gesetzgeberische Vorgaben bestehen.

Das Wechselwirkungsverhalten zwischen den Trägerpartikeln und Biosuspensionen unterschiedlicher Herkunft ebenso wie die Separierbarkeit der ‚Magnetic Beads‘ aus verschiedenen Suspensionen (mit unterschiedlichen Zelldichten, Viskositäten, Fett- und Proteinanteilen) wurde zudem bisher nur exemplarisch an wenigen Systemen untersucht. Umfangreichere Studien sind hierzu notwendig, um das Verfahren einem breiten Anwendungsfeld zuzuführen.

Im Falle der Matrixrückspülung unter Ultraschallanwendung wurden unter Verwendung des Labor-HGMS sehr gute Ergebnisse erzielt, die Frage des Scale-up ist allerdings noch nicht zufriedenstellend gelöst und unter Umständen müssen neue Ansätze (wie induzierte Flüssigkeitspulsationen) untersucht werden, um ein ‚scale-up‘-fähiges Verfahren zu finden, das eine vollständige Regeneration der HGMS-Matrix ermöglicht. Letzteres stellt nach dem aktuellen Stand der Forschung vermutlich die größte Herausforderung dar, da eine vollständige und automatisierbare Matrixreinigung für einen Einsatz in der Biotechnologie und für die Forderung einer Clean-in-place-Reinigung (CIP) essenziell erscheint.

Berücksichtigt man die in der Arbeit demonstrierten Möglichkeiten des Verfahrens, in einem Prozessschritt mehrere konventionelle Prozessstufen des Downstream Processings in sich zu vereinigen und die Bereitstellung eines neuartigen, kostengünstigen und ‚biokompatiblen‘ Magnetseparationssystems, so gibt es gute Gründe anzunehmen, dass die Anzahl und Bandbreite für Anwendungen der Hochgradientenmagnetseparation im Bereich der Biotechnologie in Zukunft zunehmen werden.

## 8 Anhang

### 8.1 Berechnungen

#### 8.1.1 Herleitung der magnetischen Geschwindigkeit (zu Kapitel 4.1)

In zahlreichen theoretischen und experimentellen Untersuchungen erwies sich das (dimensionslose) Verhältnis aus der so genannten „magnetischen Geschwindigkeit“  $v_m$  und der Filtergeschwindigkeit  $v_0$  als wichtiger Anhaltswert für die voraussichtliche Effizienz einer Hochgradientenmagnetseparation. Ausgangspunkt zur Bestimmung der magnetischen Geschwindigkeit ist das Newton'sche Grundgesetz der Mechanik, nach dem die Summe aller an einer Partikel angreifenden Kräfte gleich dem Produkt aus seiner Masse und seiner Beschleunigung ist:

$$\sum_i \vec{F}_i = m \cdot \vec{a} \quad \text{Gleichung 8-1}$$

Da es sich bei den in dieser Arbeit interessierenden Anwendungen um die Abscheidung feiner Partikeln aus einem wässrigen Medium handelt, ist der Einfluss der Gravitationskraft sehr gering und kann vernachlässigt werden. Auch Van-der-Waals- und elektrostatische Kräfte haben aufgrund ihrer kurzen Reichweite nur einen untergeordneten Einfluss auf die Partikelbahnen. Das Newton'sche Gesetz nimmt demnach die Form an:

$$m \cdot \vec{a} = \vec{F}_w + \vec{F}_m \quad \text{Gleichung 8-2}$$

Für die Radialkomponente  $F_{m,r}$  der magnetischen Kraft in der Umgebung eines magnetisierten Einzeldrahts  $F_m$  gilt (Svoboda 1987):

$$F_{m,r} = \frac{1}{2} \cdot \mu_0 \cdot \Delta\kappa \cdot V_p \cdot \frac{\partial H^2}{\partial r} = -\frac{\mu_0 \cdot \Delta\kappa \cdot V_p \cdot M_d \cdot a^2}{r^3} \left( \frac{M_d \cdot a^2}{2r^2} + H_0 \cos 2\theta \right) \quad \text{Gleichung 8-3}$$

Hierin ist  $\Delta\kappa$  der Suszeptibilitätsunterschied zwischen Partikeln und Fluid,  $V_p$  das Partikelvolumen,  $H$  die Feldstärke,  $M_d$  die Drahtmagnetisierung und  $(r, \theta)$  die Position des Partikels in einem Koordinatensystem gemäß Abb. 8-1.

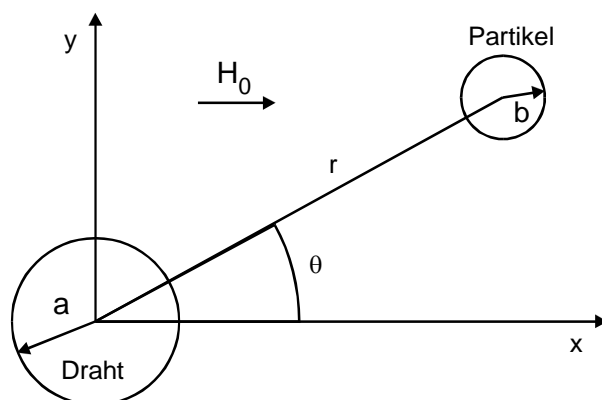


Abb. 8-1: Definition des Koordinatensystems

Die hydrodynamische Widerstandskraft  $F_W$  auf ein sich mit der Geschwindigkeit  $v_{r,p}$  relativ zum Fluid bewegendes Partikel erhält man allgemein aus der Beziehung:

$$F_W = \frac{1}{2} c_w \cdot \rho_f \cdot \pi b^2 \cdot (v_{r,p})^2 \quad \text{Gleichung 8-4}$$

Für Partikel-Reynoldszahlen unter 0.25, wie sie für Mikropartikeln vorliegen, wurde das Problem von Stokes (1851) für die Kugelumströmung analytisch gelöst. Es gilt die bekannte Beziehung:

$$F_{W,r} = -6\pi\eta b \cdot \left( \frac{dr}{dt} - v_r \right) \quad \text{Gleichung 8-5}$$

Da die Trägheit von Mikropartikeln in einem wässrigen Medium vernachlässigt werden kann, gilt:

$$\vec{F}_W = -\vec{F}_m \quad \text{Gleichung 8-6}$$

Man erhält aus dem Newton'schen Gesetz einen Ausdruck für die maximal durch die Magnetkraft verursachte Partikelgeschwindigkeit in unmittelbarer Drahtnähe ( $r = a$ ,  $\theta = 0$ ), die auch „magnetische Geschwindigkeit“ genannt wird (Watson 1973), zu:

$$v_m = \frac{2}{9} \cdot \mu_0 \cdot \Delta\kappa \cdot M_{s,d} \cdot H_0 \cdot \frac{b^2}{a \cdot \eta} \quad \text{Gleichung 8-7}$$

### 8.1.2 Trajektorie für einen Einzeldraht in axialer Anordnung (zu Kapitel 4.3)

Die Berechnung der Partikelbahnen ist für den Fall einer axialen Anordnung zwischen Draht und Strömungsrichtung relativ einfach, da in diesem Fall keine Magnetkräfte in Strömungsrichtung wirken (Birss 1976; Uchiyama 1976, 1977).

Unter Verwendung eines zylindrischen Koordinatensystems (vgl. Abschnitt 4.3.3) lässt sich die Partikelbahn in eine Bewegung in z-Richtung und eine in die xy-Ebene projizierte Bahn unterteilen. Die differentielle Beschreibung der Partikelbahnen lautet unter Annahme viskositätsfreier Strömungsbedingungen (Svoboda 1987):

$$\frac{dr_a}{dt} = - \frac{v_m}{a} \left( \frac{K}{r_a^5} + \frac{\cos 2\theta}{r_a^3} \right) \quad \text{Gleichung 8-8}$$

$$r_a \frac{d\theta}{dt} = - \frac{v_m \sin 2\theta}{a r_a^3} \quad \text{Gleichung 8-9}$$

$$\frac{dz_a}{dt} = \frac{v_0}{a} \quad \text{Gleichung 8-10}$$

Die Annahme viskositätsfreier Strömungsbedingungen ist im Falle einer axialen Anordnung gleichbedeutend mit der Annahme, dass die Strömungsgeschwindigkeit des Fluids in z-Richtung über den gesamten Filterquerschnitt konstant ist. Diese Annahme trifft in der Nähe der Drähte jedoch mit Sicherheit nicht zu, da direkt an der Drahtoberfläche die Haftbedingung  $v = 0$  erfüllt sein muss. Ein besseres Modell der Strömungsbe-

dingungen liefert die Annahme einer laminaren Umströmung der Drähte. Birss *et al.* lösten die Bewegungsgleichungen der Partikel auch für diesen Fall (Birss 1978a, 1978b), wobei sich aber zeigte, dass die Unterschiede in den Partikelbahnen nur minimal sind und den erheblichen zusätzlichen Rechenaufwand nicht rechtfertigen.

Nach Elimination der Zeit aus Gleichung 8-8 bis Gleichung 8-10 lassen sich die resultierenden Differentialgleichungen im Gegensatz zu den entsprechenden Gleichungen der transversalen oder longitudinalen Anordnung analytisch lösen. Als Lösung ergibt sich:

$$r_a(\theta) = \sqrt{-K \cdot \cos(2\theta) + C \cdot |\sin(2\theta)|} \quad \text{Gleichung 8-11}$$

mit  $K = \frac{M_{s,d}}{2H_0}$  und der Integrationskonstanten  $C$

$$C = \frac{r_{ai}^2 + K \cdot \cos(2\theta_i)}{|\sin(2\theta_i)|} \quad \text{Gleichung 8-12}$$

Unter der Annahme viskositätsfreier Strömung ist die Strömungsgeschwindigkeit über den Querschnitt konstant, d.h. es gilt:

$$\frac{dz_a}{dt} = \frac{v_0}{a} \quad \text{Gleichung 8-13}$$

und es lässt sich folgende Lösung für die z-Koordinate angeben:

$$z_a(r_a, \theta) = \frac{v_0}{v_m} \left[ \frac{K^2}{2} \ln \left( \frac{\tan \theta_i}{\tan \theta} \right) - K (r_{ai}^2 - r_a^2) - \frac{K^2 + C^2}{2} (\cos 2\theta_i - \cos 2\theta) \right] \quad \text{Gleichung 8-14}$$

In Abb. 8-2 sind die über Gleichung 8-11 und Gleichung 8-12 berechneten ebenen Partikelbahnen im abstoßenden Bereich eines magnetisierten Einzeldrahtes für  $r_{ai} = 1$  und unterschiedliche Startwinkel  $\theta_i$  dargestellt. Dargestellt ist nur ein Viertel des Drahts, dessen Mittelpunkt mit dem Ursprung des Koordinatensystems zusammenfällt. Nachdem sich die Partikeln von der Drahtoberfläche wegbewegt haben, gelangen sie schließlich wieder in den Einfluss des anziehenden Bereichs des Drahtes. Wird die Strömung der Suspension durch ein Rohr oberhalb des abstoßenden Bereichs des Drahtes geleitet, so können die Partikeln nur maximal die Rohrwand erreichen (in der Abbildung als Halbkreis dargestellt). Die in Abb. 8-2 dargestellten Partikelbahnen zeigen jedoch, dass die Partikeln durch den Einfluss der Magnetkraft in dieser Anordnung eher gleichmäßig über die Rohrwand verteilt werden und nicht in einem definierten Bereich gesammelt werden können. Soll eine Aufspaltung in einen Konzentratanteil und in einen partikelarmen Filtratanteil erfolgen, so erscheint die hier betrachtete Anordnung nach Takayasu *et al.* (1984) mit nur *einem* magnetisierten Draht daher weniger geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine neuartige Anordnung untersucht, bei der die Strömung einer Suspension zwischen *zwei* magnetisierten Drähten erfolgt (vgl. Kapitel 4.3).



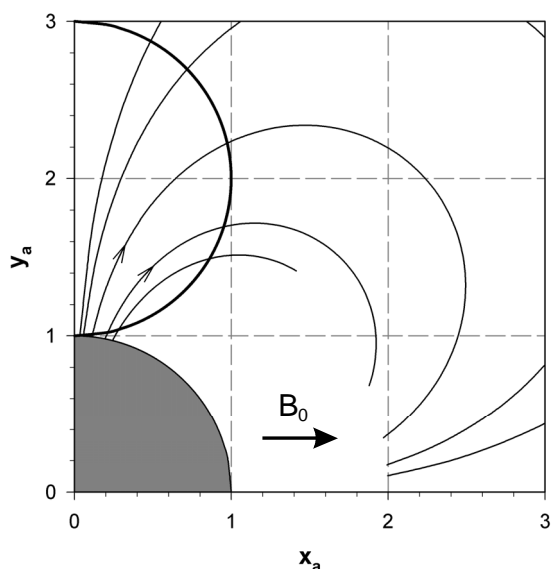


Abb. 8-2: Berechnete Trajektorien für Partikeln unter Einfluss des abstoßenden Bereichs eines Einzeldrahts.

### 8.1.3 Feldberechnungen über Finite Element Methode (FEM)

Zur Berechnung des Magnetfeldes über Finite Elemente Methode (FEM) wurde die kommerzielle Software Quickfield™ (Tera Analysis, Granada Hills, CA, USA) verwendet. Die Software berechnet 2D-Grenzwertprobleme für elliptische partielle Differentialgleichungen sowohl für skalare Potentiale als auch Einkomponenten-Vektorpotentiale. Als Magnetfeldquellen kommen elektrische Ströme, Permanentmagneten und externe Magnetfeldquellen in Frage. Das mathematische Problem wird als Poisson-Gleichung für das magnetische Vektorpotential  $\mathbf{A}$  formuliert. Die magnetische Flussdichte  $\mathbf{B}$  liegt in der Modellebene ( $xy$ ), während der Vektor der elektrischen Stromdichte und das magnetische Vektorpotential  $\mathbf{A}$  senkrecht dazu stehen. Nur die Komponenten  $j_z$  und  $A_z$  sind von null verschieden und werden deshalb vereinfachend mit  $j$  und  $A$  bezeichnet. Im nichtlinearen, isotropen Fall gilt  $\mu_x = \mu_y$  aber  $\mu = \mu(H)$ . Die Formulierung des so genannten lokalen Dirichlet-Problems für den planaren Fall lautet:

$$\frac{\partial}{\partial x} \left[ \frac{1}{\mu_y} \frac{\partial A}{\partial x} \right] + \frac{\partial}{\partial y} \left[ \frac{1}{\mu_x} \frac{\partial A}{\partial y} \right] = -j + \left( \frac{\partial H_{cy}}{\partial x} - \frac{\partial H_{cx}}{\partial y} \right) \quad \text{Gleichung 8-15}$$

Zur Lösung des Problems wurde die Dirichlet-Randwertbedingung gewählt, die dem magnetischen Vektorpotential am Rand einen festen Wert  $A_0$  zuweist. Dies entspricht einem konstanten und homogenen Hintergrundmagnetfeld  $B_0$ .

Aus dem Vektorfeld  $\mathbf{A}$  lässt sich allgemein die magnetische Flussdichte über eine der Maxwell'schen Gleichungen berechnen gemäß:

$$\mathbf{B} = \text{rot } \mathbf{A} = \nabla \times \mathbf{A} = \begin{vmatrix} \mathbf{i} & \mathbf{j} & \mathbf{k} \\ \frac{\partial}{\partial x} & \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial z} \\ A_x & A_y & A_z \end{vmatrix} = \left( \frac{\partial A_z}{\partial y} - \frac{\partial A_y}{\partial z} \right) \mathbf{i} + \left( \frac{\partial A_x}{\partial z} - \frac{\partial A_z}{\partial x} \right) \mathbf{j} + \left( \frac{\partial A_y}{\partial x} - \frac{\partial A_x}{\partial y} \right) \mathbf{k} \quad \text{Gleichung 8-16}$$

Für den ebenen Fall ergeben sich die einfachen Beziehungen

$$B_x = \frac{\partial A}{\partial y}, \quad B_y = -\frac{\partial A}{\partial x} \quad \text{Gleichung 8-17}$$

## 8.2 Verwendete Modellproteine (zu Kapitel 5.4)

Als Modellproteine für die Charakterisierung der Sorption und Elution an den hergestellten magnetischen Affinitätsorbentien wurden Rinder-Hämoglobin (Hb),  $\alpha$ -Chymotrypsinogen aus Rinderpankreas (Chy) und ein selbst fermentiertes und in *E.coli* exprimiertes rekombinantes Grün-Fluoreszierendes Protein (GFP) verwendet.

### 8.2.1 Hämoglobin

Hämoglobin (Hb) ist ein tetrameres Molekül (2  $\alpha$ - und 2  $\beta$ -Ketten) mit einer Molekülmasse von 64.5 kDa. Jede Peptidkette enthält eine Häm-Gruppe mit einem zentralen Eisenion, das über Imidazolreste von Histidinbausteinen gebunden ist (Deckwer 1999). In der Aminosäuresequenz einer  $\alpha$ -Kette befinden sich 10, in der  $\beta$ -Kette 9 Histidine. Im Gesamtmolekül liegen von den 38 Histidinen 20 an der Moleküloberfläche und sind deshalb als Kontaktstelle für eine Sorption über Metallchelate-Bindung zugänglich (Todd 1994). Abb. 8-3 zeigt die Struktur des Rinderhämoglobinmoleküls. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 6.8 (Conway-Jacobs 1971). Der mittlere Moleküldurchmesser beträgt etwa 6.4 nm.

Als natürliches Modellprotein wurde Rinderhämoglobin verwendet (Merck KGaA, aus Rindererythrocyten, lyophilisiertes Pulver). Aufgrund der Anwesenheit von Luft liegt es vornehmlich oxidiert als Methämoglobin mit dreiwertigem Eisen vor.

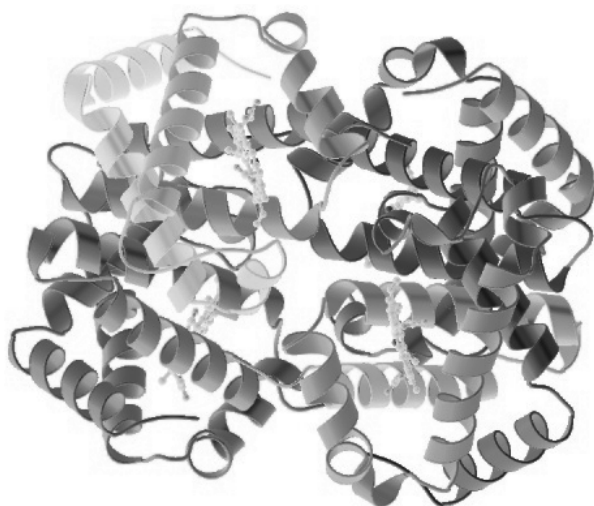


Abb. 8-3: Quartärstruktur von Rinderhämoglobin

## 8.2.2 $\alpha$ -Chymotrypsinogen

$\alpha$ -Chymotrypsinogen A (Chy, E.C. 3.4.21.1, Type II, C4879) aus Rinderpankreas wurde von Sigma Chemical Co. Ltd. bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

## 8.2.3 Green Fluorescent Protein (GFP)

### 8.2.3.1 Allgemeines

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde ursprünglich geklont von der Qualle *Aequorea victoria* (Plautz 1999), bei der es eine grüne Biolumineszenz hervorruft. Die Fähigkeit zur Fluoreszenz ist genetisch eingepreßt, das Fluorophor ist Derivat natürlicher Konstituenten der Primärstruktur des GFP, so dass keine Kofaktoren oder Substrate zur Fluoreszenz nötig sind (Breik 1996). Das Chromophor besteht aus einer posttranslatorisch zyklisierten und oxidierten Modifikation der Ser-Tyr-Gly-Sequenz an Position 65-67 (Plautz 1999). Das Wild-Typ GFP enthält 238 Aminosäuren mit einer vergleichsweise kleinen Molekülmasse von 26900 kDa und ist ein ausgesprochen stabiles, monomeres Protein (Plautz 1999). Beispielsweise ist GFP selbst in 6-molarem Guanidin-HCl, 8-molarem Harnstoff oder 1%igem SDS stabil. GFP hat zwei Anregungspeaks bei 395 nm (blau) und 470 nm und emittiert im grünen Wellenlängenbereich mit  $\lambda_{\max} = 509$  nm (Prasher 1995) mit einer Quantenausbeute von etwa 0.8 (Breik 1996). Mittlerweile existieren zahlreiche Mutanten, die in anderen Wellenlängenbereichen emittieren, stärker fluoreszieren oder schneller posttranslatorisch modifiziert werden (Plautz 1999).

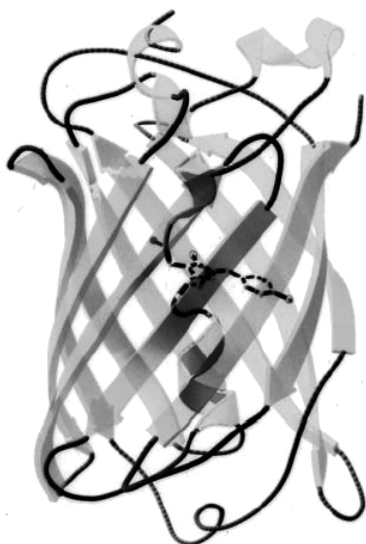


Abb. 8-4: Tertiärstruktur des Wild-Typ GFP. Das Chromophor ist als Kugel-Stab-Modell dargestellt; nach (Brejc 1997)

### 8.2.3.2 GFP-Fermentation in *E.coli*

#### **E.coli Klon**

Ein *Escherichia coli* Stamm (JM109), der das Plasmid pJOE4056 als Expressionsvektor für das Protein GFP enthält, wurde von Dr. Josef Altenbuchner vom Institut für industrielle Genetik (IIG) der Universität Stuttgart erhalten. Das Plasmid wurde frisch in *E.coli* kloniert und auf Agar-Platte angezüchtet. Beim verwendeten Expressionssystem wird die Expression von GFP durch Zugabe von L-Rhamnose induziert (Stumpp 2000). Das rekombinante GFP-Gen enthält zusätzlich 5 Histidincodons, so dass ein 5x-His-Tag an das Protein N-terminal angehängt wird. Außerdem ist zur Selektionierung der Plasmid-tragenden Zellen ein Ampecillin-Resistenzgen vorhanden.

#### **Vorkultur (20 mL)**

Zur Herstellung einer Vorkultur wurde 1 Öse der rekombinanten Kultur in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen in 20 mL sterilem LB (Luria Bertoni)-Medium (pH 7.0) resuspendiert. Hierzu wurden 20 µL Ampecillin (100 g/L, steril filtriert) zugegeben. Die Zellsuspension wurde für 24 Stunden bei 37°C geschüttelt.

#### **Hauptkultur (2 L)**

In vier 500 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden je 500 mL autoklaviertes LB-Medium (pH 7.0, enthielt 10 g/L Tryptone, 5 g/L Hefeextrakt und 10 g/L NaCl), 500 µL Ampecillin (100 g/L, steril filtriert) und 5 mL der Vorkultur gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 37°C für etwa 3 Stunden geschüttelt, bis eine Absorption bei 600 nm von 0.4 erreicht wurde.

Die Expression des GFP wurde durch Zugabe von je 5 mL 20% (w/v) Rhamnose induziert. Im Anschluss wurde die Kultur für 18 Stunden bei 30°C geschüttelt. Durch die Expression des GFP zeigte die Kultur danach eine intensiv grüne Farbe. Die Biofeuchtmasskonzentration betrug 9 g/L.

#### **Zellernte und Zellaufschluss**

Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (30 min bei 9000g und 7°C), das Pellet wurde mit 400 mL 0.1 mol/L Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 gewaschen und erneut 30 min zentrifugiert. Die vier Pellets wurden vereinigt und gewogen.

Der Zellaufschluss erfolgte mit einem French<sup>®</sup> Press-Hochdruckhomogenisator. Das Zellkonzentrat wurde mit einer Biofeuchtmasse-Konzentration von 320 g/L (entspricht 96 g/L BTM) zwei mal bei 600 psig aufgeschlossen.

Ein Teil des Zellaufschlusses wurde durch Zentrifugation geklärt während der Hauptteil ungeklärt blieb. Beide Teile wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C eingefroren. Die rückgerechnete Gesamtproteinkonzentration der geklärten Fermentationsbrühe betrug 20 g/L, die GFP-Konzentration 1.1 g/L.

## 8.2.4 Proteinanalytik

### 8.2.4.1 Gesamtproteinbestimmung

#### *Direkte photometrische Messung*

Für Proteinkonzentrationen über etwa 50 mg/L wurde die Absorption im UV bei 280 nm gemessen. Kalibriert wurde gegen bovines Serumalbumin (BSA). Der lineare Messbereich liegt etwa zwischen 50 und 1000 mg/L. Die Absorption ist bedingt durch die Anwesenheit der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und mit geringerem Einfluss Tyrosin. Die spektralen Absorptionskoeffizienten schwanken für verschiedene Proteine aufgrund des unterschiedlichen Gehalts an diesen aromatischen Aminosäuren (Janson 1997). Für BSA wurde 0.59, für Hämoglobin dagegen 1.4 mL·mg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> gemessen. Literaturangaben reichen von 0 (Parvalbumin) bis 2.7 mL·mg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Lysozyme) (Janson 1997).

#### *Bradford-Assay*

Für geringe Proteinkonzentrationen wurde eine Modifikation der photospektrometrischen Methode nach Bradford (Bradford 1976) unter Verwendung des Farbstoffs Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue verwendet. Das Reagenz wurde als Fertiglösung von Sigma bezogen. 1 mL der zu bestimmenden Lösung wurde mit 1 mL Reagenz versetzt. Nach 5-10 min wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Analog wurde mit einer Blindprobe mit der Probenmatrix (Pufferlösung) verfahren. Die Absorptionsdifferenz aus Probe und Blindprobe ist ein Maß für die Gesamtproteinkonzentration. Kalibriert wurde gegen BSA. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Der lineare Messbereich liegt etwa zwischen 0.5 und 10 mg/L.

### 8.2.4.2 Gel-Elektrophorese

Diskontinuierliche denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde durchgeführt wie durch Laemmli beschrieben (Laemmli 1970).

Verwendet wurden vorgefertigte Gekassetten mit 4-12% Tris-Glycin Gelen in Zusammenhang mit dem Elektrophorese-System Invitrogen XCell Surelock<sup>™</sup> Minicell (beides Fa. Invitrogen, Deutschland).

Das diskontinuierliche Gel besteht aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Das Sammelgel konzentriert die Probe in einem Band und erhöht so die Auflösung im nachfolgenden Trenngel. Polyacrylamidgele werden durch Polymerisation von Acrylamid in der Gegenwart des Crosslinkers N,N'-Methylen-bis-Acrylamid hergestellt. Die Proteine werden durch das anionische Tensid SDS denaturiert und mit negativer Oberflächenladung versehen.

#### *Durchführung der Elektrophorese*

Die Proben wurden mit dem Probenpuffer 1:1 gemischt und für 2 min bei 85°C geschüttelt. Der Laufpuffer wurde 1:10 verdünnt. Die Gekassette wurde ausgepackt, mit Wasser

gespült, Schutzstreifen und Kamm entfernt, die Wells mit Laufpuffer gespült und in das Elektrophorese-System eingesetzt. Das System wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Proben (je 25  $\mu\text{L}$ ) und Referenzstandard (10  $\mu\text{L}$ ) in die Wells gefüllt. Unbenutzte Wells wurden mit Probenpuffer gefüllt. Nach Anschluss der Stromversorgung wurde das Programm gestartet und die Spannung für 90 min bei 125 V gehalten. Die Stromstärke beträgt zu Beginn ungefähr 40 mA und sinkt im Laufe der Elektrophorese auf etwa 10 mA.

#### *Färben und Trocknen des Gels*

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde die Gelkassette geöffnet und das Gel vorsichtig in eine Mischung aus 55 mL Wasser, 20 mL Methanol, 5 mL Stainer A und 20 mL Stainer B gegeben und für 3 Stunden langsam geschüttelt. Das Stainer-Kit enthält Coomassie Blau G-250. Danach wurde die Flüssigkeit abgelassen, 250 mL Wasser zugegeben und 7-72 Stunden entfärbt. Die Nachweisgrenze des Colloidal Blau Färbesystems liegt unter 10 ng BSA.

Nach dem Entfärben wurde das Gel gewaschen und in 35 mL Novex Gel-Dry Solution für 5 min geschüttelt. Zwei Cellophanfolien wurde 20 sec in die gleiche Lösung eingetaucht. Das Gel wurde zwischen den zwei Folien luftfrei in einen Trockenrahmen eingespannt und an Luft getrocknet. Abschließend wurde das trockene Gel zur Archivierung über einen Flachbettscanner eingescannt. Das trockene Gel lässt sich problemlos über längere Zeit aufbewahren.

Tabelle 8-1: SDS-PAGE Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
Elektrophorese-System	XCell Surelock™ Minicell	Invitrogen
4-20% Tris-Glycin Precast-Gel	EC6035 (1mm Dicke, 10 wells)	
Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer	LC2675	
Tris-Glycin-SDS-Probenpuffer	LC2676	
Colloidal Blue Staining Kit	LC6025; enthält Stainer A und B	
Novex Gel-Dry Solution	LC4025	
Novex SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard	LC5625	

#### **8.2.4.3 Hämoglobin-Bestimmung**

Hämoglobin wurde direkt photometrisch durch Messung der Absorption bei 410 nm bestimmt. Kalibriert wurde jeweils gegen einen Hämoglobinstandard im gleichen Puffer wie der Messlösung. Der lineare Messbereich liegt etwa zwischen 1 und 100 mg/L. Abb. 8-5 zeigt das Absorptionsspektrum von Rinderhämoglobin in Phosphatpuffer. Der spektrale Absorptionskoeffizient bei 410 nm liegt je nach Pufferbedingungen bei etwa  $4.7 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

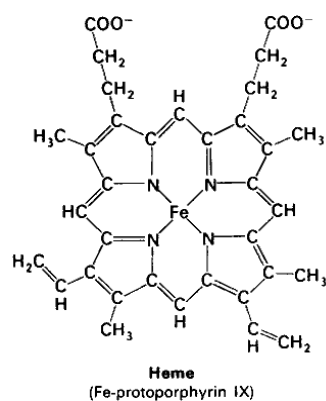
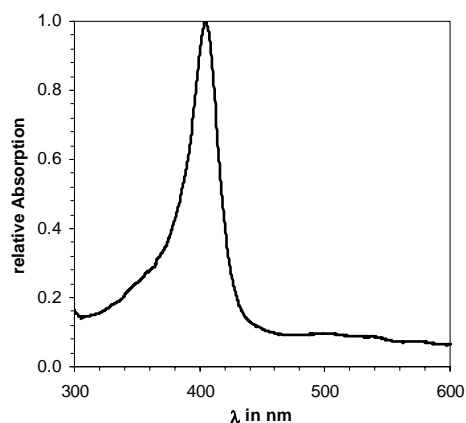


Abb. 8-5: links: Relative Absorption von bovinem Methämoglobin. Das gemessene Absorptionsmaximum liegt bei 405 nm. rechts: Für die Absorption verantwortliche Häm-Gruppe.

#### 8.2.4.4 GFP-Bestimmung

Die Konzentration von GFP wurde fluorometrisch mit einem Fluorometer (spectraFluor SLT, Tecan Deutschland GmbH) in 96-well-Mikrotiterplatten bestimmt. Dabei wurde die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Fluoreszenz-Emission bei 535 nm detektiert. Kalibriert wurde gegen einen GFP-Standard (rEGFP, CLONTECH, 8365-1).

### 8.3 Formelzeichen und Symbole

#### Lateinische Symbole

a	Drahradius,	m
a	Mittlerer Spulenradius,	m
a	Beschleunigung,	ms <sup>-2</sup>
a <sub>s</sub>	Spezifische Oberfläche,	m <sup>2</sup> /g
b	Partikelradius,	m
b	Halbe Spulenlänge,	m
c	Konzentration,	g/L bzw. mol/L
c <sub>w</sub>	Widerstandsbeiwert,	–
d <sub>p</sub>	Partikeldurchmesser,	m
g	Erdbeschleunigung,	g = 9.81 ms <sup>-2</sup>
h	Abstand Trennwand–Rohrmittelpunkt beim RMMS,	m
k	Boltzmann-Konstante,	k = 1.3807·10 <sup>-23</sup> JK <sup>-1</sup>
m	Masse,	kg
n	Windungszahl,	–
p	Druck,	Pa
q	Sorptionskapazität,	kg/kg bzw. mol/kg
r	Radialkoordinate,	m
t	Zeit,	s
t <sub>T</sub>	Totzeit,	s
v	Filter-Leerohrgeschwindigkeit,	m/s
v <sub>m</sub>	Magnetische Geschwindigkeit,	m/s
$\bar{v}$	Mittlere Strömungsgeschwindigkeit,	m/s
x	Partikeldurchmesser,	m
z	Axialkoordinate einer Solenoid-Spule,	m
A	Fläche,	m <sup>2</sup>
A	Magnetisches Vektorpotential,	T·m
C <sub>F</sub>	relative Filtratkonzentration,	–
C <sub>K</sub>	relative Konzentratkonzentration,	–
B	Magnetische Flussdichte,	T
D <sub>m</sub>	Demagnetisierungsfaktor,	–
E	Filtereffizienz,	–
F	Kraft,	N
F <sub>m</sub>	Magnetkraft,	N
F <sub>w</sub>	Hydrodynamische Widerstandskraft,	N
H	Magnetische Feldstärke,	A/m
H <sub>c</sub>	Koerzitivfeldstärke,	A/m
I	Stromstärke,	A
J	Magnetische Polarisierung,	T
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante,	mol/L
L	(Filter-)länge,	m
M	Magnetisierung,	Am <sup>2</sup> /kg bzw. A/m
P	Aufreinigungsfaktor,	–
R <sub>c</sub>	Einfangradius,	m
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient,	–



S	Spezifische Oberfläche,	m <sup>2</sup> /kg
T	Temperatur,	K bzw. °C
V	Volumen,	m <sup>3</sup>
V <sub>F</sub>	Filtervolumen,	m <sup>3</sup>
V <sub>T</sub>	Totvolumen,	m <sup>3</sup>
$\dot{V}$	Volumenstrom,	m <sup>3</sup> /s

### Griechische Symbole

β	Stoffübergangskoeffizient,	m/s
ε	Porosität,	–
ε <sub>F</sub>	Filterhohlraumvolumenanteil,	–
λ	Filterkoeffizient,	m <sup>-1</sup>
φ	Abscheidegrad,	–
η	Dynamische Viskosität,	Pa·s
κ	Volumenssuszeptibilität,	–
ν	Kinematische Viskosität,	m <sup>2</sup> /s
v	Anteil am Gesamtvolumenstrom,	–
v <sub>K</sub>	Konzentrat-Volumenstromanteil,	–
μ <sub>0</sub>	Permeabilitätskonstante des Vakuums,	μ <sub>0</sub> = 4π · 10 <sup>-7</sup> VsA <sup>-1</sup> m <sup>-1</sup>
μ <sub>r</sub>	Relative Permeabilität,	–
ρ	Dichte,	kg/m <sup>3</sup>
θ	Winkelkoordinate,	°
σ	Filterkapazität,	kg/m <sup>3</sup>
∇	Nabla-Operator bzw. Gradient	

### Dimensionslose Kennzahlen

Re <sub>d</sub>	Draht-Reynoldszahl $Re_d = \frac{2 a v}{v}$
Re <sub>p</sub>	Partikel-Reynoldszahl $Re_p = \frac{2 b v}{v}$
R	Hydrodynamischer Faktor, $R = 2 - \ln Re_d$
Sc	Schmidt-Zahl $Sc = \frac{v}{D}$
Sh	Sherwoodzahl $Sh = \frac{\beta_L d_p}{D}$

### Indizes und Superskripte

0	Zulauf
0	Hintergrundfeld
*	Im thermodynamischen Gleichgewicht
a	auf Drahtradius normierte Größe
a	außen
d	Draht
i	intrinsisch, innen
f	Flüssigkeit

max	maximal
p	Partikel
r	Remanenz
s	Sättigung
s	Singulärer Punkt
F	Filter
F	Filtrat
H	Hefe
K	Konzentrat
L	Flüssigkeit

## 8.4 Verwendete Abkürzungen

AGE	Allyl-Glycidylether
AGM	Alternating Gradient Magnetometer
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATPS	Aqueous Two Phase Systems, wässrige Zweiphasensysteme
BDE	1,4-Butandiol-Diglycidylether
BTM	Biotrockenmasse
BFM	Biofeuchtfasse
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Bettvolumina, Filtervolumina
Chy	$\alpha$ -Chymotrypsinogen
DBK	Durchbruchskurve
DMF	Dimethylformamid
DSP	Downstream Processing, Bioproduktaufarbeitung
EBA	Expanded Bed Adsorption
E.C.	Enzymklassifizierungsnummer
FEM	Finite-Element-Methode
GFP	Green Fluorescent Protein
Hb	Hämoglobin
HEMA	Hydroxyethyl-Methacrylat-Copolymer
HGF	Hochgradientenfilter
HGMS	Hochgradientenmagnetseparation, -separator
His	Histidin
IALT	Immobilisierte Affinitätsliganden Technologie
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma
IDA	Iminodiessigsäure, Iminodiacetat
IMAC	Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IMALT	Immobilisierte Metall-Affinitätsliganden-Technologie
LALLS	Partikelgrößenbestimmung mittels 'Low-Angle Laser Light Scattering'
MJH	Magnetpartikeln vom Typ MJH
Mm	Magnetpartikeln vom Typ Mm
M-PVA	Magnetische PVA-Partikeln der Fa. Chemagen, Deutschland
n.b.	Wert wurde nicht bestimmt
NBS	N-Bromo-Succinimid
PVA	Polyvinylalkohol
PGA	Polyglutaraldehyd

PMA	Polymethylacrylat
PMMA	Polymethylmethacrylat
PVAc	Polyvinylacetat
OES	Optische Emissionsspektroskopie
OD	Trübung, optical density
OGMS	Offene-Gradienten Magnetseparation, -separator
RMMS	'Repulsive mode' Magnetseparation, -separator
SDS	Natriumdodecylsulfat
Trp	Tryptophan
US	Ultraschall
w/v	Massenkonzentration (weight per volume)
w/w	Massenanteil (weight per weight)

## 8.5 Literaturverzeichnis

- Abudiab T. & Beitle R.R.Jr. (1998) Preparation of magnetic immobilized metal affinity separation media and its use in the isolation of proteins. *J. Chromatogr.A* 795 (2): 211-217
- Amersham Pharmacia Biotech (1997) Expanded bed adsorption - Principles and methods (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden, Hrsg.).
- Amersham Pharmacia Biotech (1999a) Affinity chromatography - Principles and methods (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden, Hrsg.).
- Amersham Pharmacia Biotech (1999b) Protein Purification Handbook (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden, Hrsg.).
- Ameskamp N., Priesner C., Lehmann J. & Lütkemeyer D. (1999) Pilot scale recovery of monoclonal antibodies by expanded bed ion exchange adsorption. *Bioseparation* 8: 169-188
- Anspach F.B., Curbelo D., Hartmann R., Garke G. & Deckwer W.D. (1999) Expanded-Bed chromatography in primary protein purification. *J. Chromatogr. A* 865: 129-144
- Arnold F.H. (1991) Metal-affinity separations: A new dimension in protein processing. *Bio/Technology* 9: 151-156
- Atkins P.W. (1990) Physikalische Chemie, 1. Aufl., VCH, Weinheim.
- Barthels C.R., Kleinman G., Korzon N.J. & Irish D.B. (1958) A novel ion-exchange method for the isolation of streptomycin. *Chem. Eng. Prog.* 54: 49-52
- Belter P.A., Cusser E.L. & Hu W.-S. (1988) Bioseparations - Downstream Processing for Biotechnology, Wiley & Sons, New York.
- Bernhardt C. (1990) Granulometrie - Klassier- und Sedimentationsmethoden, 1. Aufl., Dt. Verl. für Grundstoffind., Leipzig.
- Birss R.R., Gerber R. & Parker M.R. (1976) Theory and design of axially ordered filters for high intensity magnetic separation. *IEEE Transactions on magnetics* MAG-12: 892-894
- Birss R.R., Gerber R., Parker M.R. & Sheerer T.J. (1978a) Laminar flow model of particle capture of axial magnetic filters. *IEEE Transactions on magnetics* MAG-14 (6): 1165-1169

- Birss R.R., Gerber R., Parker M.R. & Sheerer T.J. (1978b) Theory and performance of axial magnetic filters in laminar flow conditions. *IEEE Trans. Magn.* MAG-14 (5): 389-391
- Blayer S., Woodley J.M., Lilly M.D. & Dawson M.J. (1996) Characterization of the chemoenzymatic synthesis of N-Acetyl-D-neuraminic acid (Neu5Ac). *Biotechnol. Prog.* 12: 758-763
- Böhm D. & Voß H. (1999) Einsatz von magnetischen Mikropartikeln in der chemischen Technik. *Chem. Ing. Tech.* 71 (1+2): 43-51
- Bolto B.A. (1990) Magnetic particle technology for wastewater treatment. *Waste Management* 10: 11-21
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Brejic K., Sixma T.K., Kitts P.A., Kain S.R., Tsien R.Y., Ormö M. & Remington S.J. (1997) Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2306-2311
- Buchholz K. & Kasche V. (1997) Biokatalysatoren und Enzymtechnologie, Wiley-VCH, Weinheim.
- Buchholz K. (1979) Characterization of immobilized biocatalysts, in: DEHEMA Monographs (D. Behrens, K. Fischbeck, Hrsg.), Bd. 84, Verlag Chemie, Weinheim.
- Conway-Jacobs A. & Lewin L.M. (1971) Isoelectric focusing in acrylamide gels. *Analytical Biochem.* 43: 394-400
- Cudjoe K.S., Thorsen L.I., Sorensen T., Reseland J., Olsvik O. & Granum P.E. (1991) Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in faecal and food samples using immunomagnetic separation (IMS)-ELISA. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 313-322
- Dauer R.R. & Dunlop E.H. (1991) High gradient magnetic separation of yeast. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 1021-1028
- Deckwer W.-D., Pühler A. & Schmid R.D. (Eds.) (1999) Römpp-Lexikon: Biotechnologie und Gentechnik, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Dekker R.F.H. (1989) Immobilization of a lactase onto a magnetic support by covalent attachment to polyethyleneimine-glutaraldehyde-activated magnetite. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 22: 289-310
- Derjaguin B.V. & Landau L.D. (1941) Theory of the stability of strongly charged lyophilic sols and the adhesion of strongly charged solutions of electrolytes. *Acta Physicochimica U.R.S.S.* 14 (6): 633-645
- Deutsches Institut für Normung e.V. (1975) DIN 66 132: Bestimmung der spezifischen Oberfläche von Feststoffen durch Stickstoffadsorption - Einpunktverfahren nach Haul und Dümbgen.
- Dixon D.R. (1980) Magnetic adsorbents: Properties and applications. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 30: 572-578
- Dunnill P. & Lilly M.D. (1974) Purification of enzymes using magnetic bio-affinity materials. *Biotechnol. Bioeng.* 16: 987-990
- Dynal A.S. (1996) Cell separation and protein purification technical handbook (Dynal A.S., Oslo, Norway, Hrsg.).
- Dynal A.S. (1998) Biomagnetic techniques in molecular biology - Technical handbook (Dynal A.S., Oslo, Norway, Hrsg.), .
- Dynal A.S. (1999) Dynal Bioscience Product Catalogue (Dynal A.S., Oslo, Norway, Hrsg.).

- Falbe J. & Regnitz M. (Eds.) (1995) Römpp Chemie Lexikon - CD Version 1.0, Thieme Verl., Stuttgart.
- Fish N.M. & Lilly M.D. (1984) The interactions between fermentation and protein recovery. *Bio/Technology* 4: 623-627
- Frantz S.G. (1937) Magnetic separator, Patent: US 2074085
- Franz M. (1997) Entwicklung und experimentelle Überprüfung eines Modells der Magnetfiltration magnetithaltiger Schwermetallhydroxide, in: Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), Karlsruhe.
- Franz M., Kampeis P., Franzreb M. & Eberle S.H. (1998) Production of magnetite-bearing copper hydroxide flocs for eliminating copper from waste water. *Chem. Eng. Tech.* 21 (7): 588-592
- Franzreb M. & Höll W.H. (2000) Phosphate removal by high-gradient magnetic separation using permanent magnets. *IEEE Trans. Appl. Supercond.* 10 (1): 923-926
- Franzreb M. & Warlitz G. (2001b) Hochgradienten-Magnetfilter und Verfahren zum Abtrennen von schwach magnetisierbaren Partikeln aus flüssigen Medien (patent pending), Patent: DE 10117659
- Franzreb M. (2001a) New design of high-gradient magnetic separators using permanent magnets. *Proc. 6th World Congr. Chem. Eng., 23-27 September 2001, Melbourne, Australia*
- Franzreb M., Höll W.H. & Hoffmann C. (1999) Hochgradienten-Magnetabscheider, Patent: DE 19934427
- Franzreb M., Juengst K.-P. & Höll W.H. (1998b) Open gradient magnetic separator for removal of heavy metals from waste water based on a cryogen free superconducting 5 T magnet. *Proc. 15th Int. Conf. Magnet Technol., Beijing, China, October 20-24, 1997*
- Franzreb M., Kampeis P., Franz M. & Eberle S.H. (1998a) Use of magnet technology for phosphate elimination from municipal sewage. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 26 (4): 213-217
- Friedlander S.K. (1961) Transport to spheres in Stokes flow. *AIChE Journal* 7 (2): 347-349
- Gerber R. & Birss R.R. (1983) High gradient magnetic separation, John Wiley & Sons, New York.
- Gerber R., Kelland D.R. & Takayasu M. (1989) Collision effects in axial HGMS. *IEEE Trans. Magn.* 25 (5): 3800-3802
- Gerthsen C. & Vogel H. (1993) Physik, 17. Aufl., Springer-Verlag, Berlin.
- Godard P., Wertz J.L., Biebuyck J.J. & Mercier J.P. (1989) Poly(vinyl alcohol)-copper(II) complex: Characterization and practical applications. *Polym. Eng. Sci.* 29 (2): 127-133
- Goding J.W. (1986) Monoclonal antibodies - Principles and practice, 2. Aufl., Acad. Press, London.
- Gundersen S.G., Haagensen I., Jonassen T.O., Figenschau K.J., De Jonge N. & Deelder A.M. (1992) Magnetic bead based antigen capture enzyme-linked immunoassays in microtitre trays for rapid detection of schistosomal circulating anodic antigen. *J. Immunol. Methods* 148: 1-8
- Häfel U., Schütt W., Teller J. & Zborowski M. (Eds.) (1997) Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, Plenum Press, New York.
- Halling P. & Dunnill P. (1979) Improved magnetic supports for immobilized enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 21: 393-416
- Halling P.J. & Dunnill P. (1980) Magnetic supports for immobilized enzyme and bioaffinity adsorbents. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 2-11
- Hauptmann S. (1988) Organische Chemie, 2. Aufl., VEB Deutscher Verl. für Grundstoffindustrie, Leipzig.

- Hausmann R., Hoffmann C., Franzreb M. & Höll W.H. (2000) Mass transfer rates in a liquid magnetically stabilized fluidized bed of magnetic ion-exchange particles. *Chem. Eng. Sci.* 55: 1477-1482
- Heeboll-Nielsen A., Choe W.-S., Middelberg A.P.J. & Thomas O.R.T. (2002) Efficient inclusion body processing using chemical extraction and high gradient magnetic fishing. *submitted, April 2002*
- Hermanson G., Mallia A.K. & Smith P.K. (1992) Immobilized affinity ligand techniques, Academic Pr., San Diego.
- Herndl G. & Mersmann A.B. (1981) Fluid dynamics and mass-transfer in stirred suspensions. *Chem. Eng. Commun.* 13: 23-37
- Hirschbein B.L. & Whitesides G.M. (1982) Affinity separation of enzymes from mixtures containing suspended solids – Comparisons of magnetic and nonmagnetic techniques. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 7: 157-176
- Hoffmann C., Franzreb M. & Höll W.H. (2002) A novel high gradient magnetic separator (HGMS) design for biotech applications. *IEEE Trans. Appl. Supercond.* 12(1): 963-966
- Hubbuch J.J., Matthiesen D.B., Hobley T.J. & Thomas O.R.T. (2001a) High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: a first principal comparison. *Bioseparation* 10: 99-112
- Hubbuch J.J. (2001b) Development of adsorptive separation systems for recovery of proteins from crude bioprocess liquors, in: Ph.D. Thesis, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark.
- Hubbuch J.J., Heeboll-Nielsen A., Hobley T.J. & Thomas O.R.T. (2002) A new fluid distribution system for scale-flexible expanded bed adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 78 (1): 35-43
- Iannicelli J. (1976) New developments in magnetic separation. *IEEE Trans. Mag.* MAG-12 (6): 436-443
- ICH-Guideline (2000) Int. Conf. on Harmonisation (ICH) of technical requirements of pharmaceuticals for human use: Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients (ICH tripartite guideline). <http://ifpma.org/ich1.html>
- Inouye S. & Tsuji F. I. (1994) Evidence for redox forms of the Aequorea gree fluorescent protein. *FEBS Letters* 351: 211-214
- Iwasaki T. (1937) Some notes on sand filtration. *J. Am. Water Works Assoc.* 29 (10): 1591-1602
- Jakubith M. (1998) Grundoperationen und chemische Reaktionstechnik, Wiley-VCH, Weinheim.
- Janson J.-C. & Rydén L. (Eds.) (1998) Protein purification - Principles, high-resolution methods and applications, 2. Aufl., Wiley & Sons Inc., New York.
- Kazumasa Y., Munehiro N., Takao O. & Akinori S. (1996) Process for purifying recombinant human serum albumin, Patent: EU 0699687
- Kolm H.H. (1971) Magnetic device, Patent: US 3567026
- Kroner K.H., Schütte H., Stach W. & Kula M.R. (1982) Scale-up of formate dehydrogenase by partitioning. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32: 130-137
- Kula M.-R. & Selber K. (1999) Protein purification by aqueous liquid extraction, in: Encyclopaedia of Bioprocess Technology (M.C. Flickinger, S.W. Drew, Hrsg.), Wiley & Sons, New York, S. 2179-2191.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

- Liese A., Seelbach K. & Wandrey C. (2000) *Industrial biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Ljunglöf A. & Thömmes J. (1998) Visualising intraparticle protein transport in porous adsorbents by confocal microscopy. *J. Chromatogr.* 813: 387-395
- Martin S.E.V., Thomas O.R.T., Owens R., Hill C.R. & Dunnill P. (1994) Engineering and expression of a single-chain antibody for purification by immobilized metal affinity chromatography. *The 1994 IChemE Research Event, London, UK* 1: 85-87
- Michalowsky L. (1995) *Magnettechnik*, Fachbuchverlag, Leipzig.
- Miltenyi Biotec (2000) *Magnetic Cell Sorting and Separation of Biomolecules* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany, Hrsg.).
- Morgan P.E. (1996) Non-porous pseudoaffinity supports for the recovery of antibodies, in: Ph.D. Thesis, University of London, London.
- Munro P.A., Dunnill P. & Lilly M.D. (1977) Nonporous magnetic materials as enzyme supports: Studies with immobilized chymotrypsin. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 101-124
- O'Brien S.M. (1995) The separation of recombinant proteins by metall-chelating magnetic affinity supports, in: Ph.D. Thesis, University College, London.
- O'Brien S.M., Sloane R.P., Thomas O.R.T. & Dunnill P. (1997) Characterization of non-porous magnetic chelator supports and their use to recover polyhistidine-tailed T4 lysozyme from a crude E. coli extract. *J. Biotechnol.* 54: 53-67
- O'Brien S.M., Thomas O.R.T. & Dunnill P. (1994) Preparation and evaluation of magnetic metal chelating affinity supports. *The 1994 IChemE Research Event, London, UK* 1: 159-161
- O'Brien S.M., Thomas O.R.T. & Dunnill P. (1996) Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilized metal affinity adsorption. *J. Biotechnol.* 50: 13-25
- Olsvik O., Popovic E.S., Cudjoe K.S., Hornes E., Ugelstad J. & Uhlen M. (1994) Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiol. Reviews* 7: 43-54
- O'Shannessy K., Scoble J. & Scopes R.K. (1996) A simple and economical procedure for purification of muscle lactate dehydrogenase by batch dye-ligand adsorption. *Bioseparation* 6: 77-80
- Pfister H. (1979) Magnetische Separation mit hohen Flussdichtegradienten - High Gradient Magnetic Separation. *J. Magn. Magn. Mat.* 13: 1-10
- Pieters B.R. & Bardeletti G. (1992) Enzyme immobilization on a low-cost magnetic support: Kinetic studies on immobilized and coimmobilized glucose oxidase and glucoamylase. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 361-370
- Pieters B.R., Williams R.A. & Webb C.A (1992) *Colloid and surface engineering: Applications in the process industries* (R.A. Williams, Hrsg.), Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Pitfield I. (1992) Perfluorocarbon chromatographic supports, in: Ph.D. Thesis, University of Cambridge, Cambridge.
- Plautz J.D. & Kay S.A. (1999) Green fluorescent proteins, in: *Methods in cell biology* (K.F. Sullivan, Hrsg.), Acad. Press, San Diego.
- Prasher D.C. (1995) Using GFP to see the light. *Trends in Genetics* 11 (8): 320-323

- Prenosil J.E., Kut Ö.M., Dunn I.J. & Heinzle E. (1989) Immobilized Biocatalysts, in: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry (W. Gerhartz, Hrsg.), 5. Aufl., Bd. A 14, VCH Verl.-Ges., Weinheim, Germany, S. 1-48.
- Ribeiro S.C., Monteiro G.A., Cabrol J.M.S. & Prazeres D.M.F. (2002) Isolation of plasmid DNA from cell lysates by Aqueous Two-Phase Systems. *Biotechnol. Bioeng.* 78 (4): 376-384
- Robinson P.J., Dunnill P. & Lilly M.D. (1973) The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 603-605
- Schuster M., Wasserbauer E., Ortner C., Graumann K., Jungbauer A., Hammerschmid F. & Werner G. (2000) Short cut of protein purification by integration of cell-disrupture and affinity extraction. *Bioseparation* 9: 59-67
- Schwertmann U. & Cornell R.M. (1991) Iron Oxides in the Laboratory, VCH, Weinheim.
- Selber K., Nellen F., Steffen B., Thömmes J. & Kula M.-R. (2000) Investigation of mathematical methods for efficient optimisation of aqueous two-phase extraction. *J. Chromatogr. B* 743: 21-30
- Setchell C.H. (1985) Magnetic separations in biotechnology - a review. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 35B (3): 175-182
- Spalding B.J. (1991) Downstream Processing: Key to slashing production costs 100 fold. *Bio/Technology* 9: 229-232
- Stokes G.G. (1851) On the Effect of the Internal Friction of Fluids on the Motion of Pendulums. *Cambridge Philos. Trans.* 9: 8-106
- Straton J.A. (1941) Electromagnetic Theory, McGraw-Hill, New York.
- Stumpp T., Wilms B. & Altenbuchner J. (2000) Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. *Biospektrum* 1: 33-36
- Subramanian G. (1998) Bioreseparation and Bioprocessing - A handbook, Bd. 1, Wiley-VCH, Weinheim.
- Sulkowski E. (1987) Immobilized metal ion affinity chromatography of proteins, in: Protein purification: Micro to Macro (R. Burgess, Hrsg.), Alan R. Liss, New York, S. 149-162.
- Svec F. & Fréchet M.J. (1996) New design of macroporous polymers and supports: From separation to biocatalysis. *Science* 273 (7): 205-211
- Svoboda J. (1987) Magnetic methods for the treatment of minerals, in: Developments in mineral processing (D.W. Fuerstenau, Hrsg.), Bd. 8, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Takayasu M., Kelland D.R. & Minervini J.V. (2000) Continuous magnetic separation of blood components from whole blood. *IEEE Trans. Appl. Superconductivity* 10 (1): 927-930
- Takayasu M., Maxwell E. & Kelland D. R. (1984) Continuous selective HGMS in the repulsive force mode. *IEEE Trans. Magn.* MAG-20 (5): 1186-1188
- Theodossiou I., Thomas O.R.T. & Dunnill P. (1997) Preparation and characterization of magnetic dye affinity supports. *The 1997 IChemE Jubilee Research Event, Nottingham, UK* 2: 973-976
- Thomas O.R.T. (2002) Private communication. *Center for Process Biotechnology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark*
- Thömmes J. (1997) Fluidized bed adsorption as a primary recovery step in protein purification. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 58: 185-230



- Todd R.J., Johnson R.D. & Arnold F.H. (1994) Multiple-site binding interactions in metal-affinity chromatography - I. Equilibrium binding of engineered histidine-containing cytochromes c. *J. Chromatogr. A* 662: 13-26
- Uchiyama S., Kondo S. & Takayasu M. (1976) Performance of parallel stream type magnetic filter for HGMS. *IEEE Trans. Magn.* MAG-12 (6): 895-897
- Uchiyama S., Kurinobu S., Kumazawa M. & Takayasu M. (1977) Magnetic particle buildup process in parallel stream type HGMS filter. *IEEE Trans. Magn.* MAG-13 (5): 1490-1492
- Ugelstad J. et al. (1988) Monosized magnetic particles and their use in selective cell separation. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* (17): 177-211
- US Code of Federal Regulations: 21.CFR (Food and Drugs) Part 210-211 (2001) Current good manufacturing practice in manufacturing, processing, packing, or holding of drugs. <http://www.access.gpo.gov>
- vanKleef R.P., Myron H.W. & Wyder P., Parker, M.R. (1984) Application of magnetic flocculation in a continuous flow magnetic separator. *IEEE Trans. Magn.* MAG-20 (5): 1168-1170
- Verwey E.J.W. & Overbeek J.T.G. (1948) Theory of the stability of lyophobic colloids, Elsevier, Amsterdam.
- Vettese-Dadey M. (1999) Gone Fishin': Labsystems' KingFisher (TM) automates purification of single-stranded DNA. *The Scientist* 13: 21ff
- Watson J.H.P. & Beharrell P.A. (1997) Magnetic separation using a switchable system of permanent magnets. *J. Appl. Phys.* 81 (8): 4260-4262
- Watson J.H.P. (1973) Magnetic filtration. *J. Appl. Phys.* 44 (9): 4208-4213
- Weide H., Páca J. & Knorre W.A. (1991) Biotechnologie, 2. Aufl., Gustav Fischer Verl., Jena.
- Welo L.A. & Baudisch O. (1925) The two stage transformation of magnetite into hematite. *Phil. Mag.* 50: 399-408
- Whitehead R.A., Chagon M.S., Groman E.V. & Josephson L. (1987) Magnetic particles for use in separations, Patent: US 4695393
- Whitesides G.M, Kazlauskas R.J. & Josephson L. (1983) Magnetic separations in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1 (5): 144-148
- Zierpep J. (1993) Grundzüge der Strömungslehre, 5. Aufl., Springer-Verlag, Berlin.