



gefördert durch



Deutsche Bundesstiftung Umwelt

www.dbu.de

Abschlussbericht zum DBU-Projekt

„Entwicklung innovativer selektiver Adsorbentmaterialien zur ökoeffizienten Aufarbeitung von β -Lactamantibiotika“

Az. 13240 - 32

Projektbeginn: 01.11.2009

Laufzeit: 28 Monate

Kaiserslautern, 15.04.2012

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	I
2	Abbildungsverzeichnis	IV
3	Tabellenverzeichnis	VII
4	Projektinformationen	1
4.1	Titel des Projekts	1
4.2	Aktenzeichen	1
4.3	Projektpartner	1
4.4	Projektbearbeiter	1
5	Zusammenfassung	2
6	Bericht.....	4
6.1	Anlass und Zielsetzung.....	4
6.2	Verwendete Methoden.....	5
6.2.1	Wasseraufnahmekapazität (WAK).....	5
6.2.2	Inverse Größenausschlußchromatographie (GPC).....	6
6.2.3	Eingesetzte kommerzielle Adsorber	6
6.2.4	Adsorptionsuntersuchungen an kommerziellen Adsorbentien und der instrAction-Phasen.....	7
6.2.4.1	Vorbehandlung der Adsorbentien.....	7
6.2.4.2	Adsorption und Elution von Cephalosporin C über die Zeit.....	7
6.2.4.3	Adsorptionsisothermen	8
6.2.4.4	Elution.....	9
6.2.4.5	Spektroskopische Untersuchungen	9
6.2.5	Optimierung der Hochgradienten Magnetseparation	10
6.2.5.1	Eingesetzte Filterkammern	10

6.2.5.2 Aufnahme von Durchbruchskurven und Berechnung der Filterkonstanten	13
6.2.5.3 Simulation der Gittermatrix innerhalb der HGMS-Filterkammer	15
6.3 Ergebnisse	17
6.3.1 Darstellung selektiver Adsorberphasen	17
6.3.2 Bindungsuntersuchungen an den Adsorbern	25
6.3.2.1 Erfassung von Adsorption und Elution anhand des Modellsystems XAD-16/CPC mittels UV/Vis- und FTIR- Spektroskopie	25
6.3.2.1.1 UV/Vis-Spektroskopie	25
6.3.2.1.2 FTIR-ATR Spektroskopie	26
6.3.2.1.3 Zeitaufgelöste FTIR-Messungen zur Bindungskinetik	28
6.3.2.2 Bindungsuntersuchungen an instrAction Adsorberphasen	31
6.3.2.3 Stabilität der Antibiotika	34
6.3.2.4 Kommerzielle Adsorbersysteme	35
6.3.2.5 Vergleich kommerzielle Systeme und instrAction – Phasen	40
6.3.2.6 Wiederverwertbarkeit der instrAction-Adsorber	49
6.3.3 Abtrennbarkeit von Magnetpartikeln aus der Antibiotika-fermentation	51
6.3.3.1 Messmethode zur direkten optischen Beobachtung der Anlagerungszonen der magnetischen Mikrosorbentien im HGMS-Filter unter Wirkung des äußeren Magnetfelds	51
6.3.3.2 Kontinuierliche Aufnahme und vollautomatische Auswertung mittels Bildanalyse zur Realisierung einer In-line-Analytik	52
6.3.3.3 Strategie zur Prozess-Steuerung	56
Vollautomatischer Programmablauf	56
6.3.3.4 Neukonstruktion und Fertigung der Filterkammer zur Verbesserung der Trennleistung des Hochgradienten-Magnetfilters	58
6.3.3.4.1 Bestandsaufnahme der Strömung in der Filterkammer	59
6.3.3.4.2 Version 1: Austausch der vorhandenen Absperrventile	61
6.3.3.4.3 Version 2: Strömungsoptimierung durch Stromstörer	62

6.3.3.4.4	Version 3: Optimierung des Ein- und Auslaufbereiches	63
6.3.3.4.5	Version 4: Optimierung der Version 3	65
6.3.3.5	Prozessschritt zur Wiedergewinnung und Resuspendierung der magnetischen Mikrosorbentien	66
6.3.3.6	Trennung Biomasse und Partikel im Satzbetrieb	68
6.3.3.7	Abtrennung der magnetisierbaren Partikel aus der Antibiotika - Fermentationsbrühe im HGMS	69
6.3.3.8	Neukonstruktion der HGMS-Filtermatrix	71
6.3.3.9	Integration des HGMS in den β -Lactam Fermentations- und Aufarbeitungsprozess	76
7	Erwartete und erzielte Ergebnisse	80
8	Betrachtung der Ökoeffizienz	81
9	Diskussion	86
10	Kooperation innerhalb des Projekts	88
11	Veröffentlichungen, Literatur, Präsentationen, Patente	88
11.1	Veröffentlichungen und Präsentationen	88
12	Literaturquellen	90
13	Projektkennblätter (TU KL, instrAction GmbH)	91

2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Separationskammer vor der Optimierung der Gittermatrix.....	11
Abb. 2:	Verwendete Matrixorientierungen für die Filterkammeroptimierung.	11
Abb. 3:	Orientierung der magnetischen Stäbe in kubischer und rhomboedrischer Anordnung.	12
Abb. 4:	Separationskammer mit verschiedenen Kammereinsätzen für Gitterabstände zwischen 0,2 mm und 1,4 mm.....	13
Abb. 5:	Durchbruchskurve magnetischer Partikel im HGMS: Magnetpartikel-konzentration der eigens hergestellten Silica-Partikel am Ausgang des HGMS-Filters.	14
Abb. 6:	Durchbruchskurve und Fit der Messwerte anhand basierend auf der Theorie der Tiefenfiltration.....	15
Abb. 7:	Elution von Imipenem von Phase ND 10322 unter simulierten Fermentationsbedingungen	18
Abb. 8:	Chromatogramm der Fraktionierung von Imipenem auf ND 10322.....	19
Abb. 9:	Chromatogramm von Fraktion "L2" auf der analytischen C-18 Phase	19
Abb. 10:	Allgemeiner Aufbau der instrAction Technologie	20
Abb. 11:	magnetische Partikel BV 11220 als Lichtmikroskop-Aufnahme	21
Abb. 12:	Porengrößenverteilung von ND 11832	22
Abb. 13:	Schematischer Aufbau des modifizierten Polymernetzwerkes auf InstrAction® Phase ND 11832.....	23
Abb. 14:	Statische UV/Vis-Spektren eines Adsorptionsexperimentes mit XAD16 und Cephalosporin C.	26
Abb. 15:	a) Differenzspektren zu Cephalosporin C auf XAD16, b) Differenzspektren von CPC in Lösung.....	27
Abb. 16:	Experimenteller Aufbau des „online Verfahrens“ zur Analyse der Bindungskinetik.	29
Abb. 17:	Zeitaufgelöste Spektren zum Bindungsprozess.....	30
Abb. 18:	Abbauuntersuchungen von Imipenem und Cephalosporin C.....	34
Abb. 19:	Adsorptionsisothermen von CPC auf kommerzieller Partikelsystemen.....	36

Abb. 20:	Vergleich der Adsorptionsisothermen von CPC auf verschiedenen Adsorbentien	38
Abb. 21:	Adsorption von Imipenem auf dem kommerziellen Adsorber IRA 400 Adsorptionstemperatur T=10°C.....	39
Abb. 22:	Zeitabhängiger Verlauf der Adsorberbeladung und Desorption	40
Abb. 23:	Cephalosporin C auf instrAction-Phasen.....	41
Abb. 24:	Adsorption von Cephalosporin C auf InstrAction-Partikel, Vergleich der Adsorption im Puffer und realen Fermentationsmedium	42
Abb. 25:	Adsorptionsisothermen Imipenem auf magnetischen und unmagnetischen Adsorberphasen.....	43
Abb. 26:	Chromatogramm des Überstandes nach der Inkubation des instrAction- Adsorbers in Imipenemlösung	43
Abb. 27:	Abnahme des Imipenems im Überstand während der Adsorption und Entstehung von Nebenprodukten.....	44
Abb. 28:	Entstehung der Abbauprodukte während der Inkubation des instrAction- Adsorbers in einer Imipenem-Lösung.....	45
Abb. 29:	Chromatogramm von Imipenem und den entstandenen Abbauprodukten nach Adsorption mit einer Reaktionszeit von 2 h und nach Inkubation für 4h in einer TSS-Lösung (pH 7)	47
Abb. 30:	Adsorption von Imipenem auf ND 11490 und CV 11005 mit einer Reaktionszeit von 10 Minuten.....	48
Abb. 31:	Vergleich der Adsorption von Imipenem auf CV 11005 im Puffer und im Medium mit einer Reaktionszeit von 10 Minuten.....	48
Abb. 32:	Adsorption und Elution von Cephalosporin C auf ND11490 in mehreren Zyklen, CPC in Pufferlösung.....	49
Abb. 33:	Adsorption und Elution von Imipenem auf CV11005 in mehreren Zyklen, Imipenem in Pufferlösung.....	50
Abb. 34:	Zeitliche Veränderungen der Anlagerungszonen von Magnetpartikeln in der HGMS-Filterkammer	52
Abb. 35:	Abfolge der Schritte zur automatischen Bildauswertung.....	53
Abb. 36:	Automatische Vermessung der Anlagerungszonen mittels der Software „Matrox Inspector®“	54
Abb. 37:	Diagramm der normierten Abstände A_N zwischen den Anlagerungsbereichen ...	56
Abb. 38:	Aufbau des Programmablaufs zur Steuerung der HGMS-Filtration.....	57

Abb. 39:	Detail-Vergrößerung der Magnetpartikel-Anlagerungsbereiche während der Magnetfiltration.....	58
Abb. 40:	CAD-Geometrie des ursprünglichen Filtermoduls und Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene.....	59
Abb. 41:	Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene (3D, skalar).....	61
Abb. 42:	Neue, außenliegende Nadelventile.....	61
Abb. 43:	Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene von Version 2	62
Abb. 44:	Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene von Version 3	64
Abb. 45:	Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene von Version 3	64
Abb. 46:	Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene der Version 4.....	66
Abb. 47:	Rühren agglomerierter Magnetpartikel mit einem Propellerrührer und Beschallen der Magnetpartikel in einer Ultraschalldurchflusszelle	67
Abb. 48:	Trennung der Partikel aus der Fermentationsbrühe im Satzbetrieb.....	68
Abb. 49:	Farbintensität ermittelt mit Hilfe von NI Vision Assistant.....	69
Abb. 50:	Anlagerung der magnetisierbaren Partikel an die Pellet bildenden Streptomyceten und Partikelseparation in Anwesenheit der Streptomyceten	70
Abb. 51:	Experimentelle Beladung des HGMS verschiedener Raumausrichtungen und Anordnungen der Drahtgitter.....	72
Abb. 52:	Simulation des magnetischen Feldes und der fluiddynamischen Verteilung in der HGMS-Kammer.....	75
Abb. 53:	Reaktorkaskade zur Produktion und integrierter Aufarbeitung von Lactam-Antibiotika	76
Abb. 54:	Verlauf der Partikelkonzentration über mehrere Zyklen der HGMS-Filtration mit Modellmagnetpartikeln.	77
Abb. 55:	Verfahrensfließbild der Stoffstromsimulation der β -Lactam-Antibiotikum Fermentation und der anschließenden Produkt-aufreinigung durch Hochgradient-Magnetseparation.	84

3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammensetzung des Fermentationsmediums (Hauptkultur) für <i>Streptomyces sp.</i> zur Adsorption des Imipenems:.....	8
Tab. 2:	Zusammensetzung des Fermentationsmediums für <i>Streptomyces sp.</i> zur Adsorption des Imipenems:	9
Tab. 3:	Ergebnisse des Screenings beispielhaft an zwei Phasenmotiven BD 06134 und ND 06256 gezeigt.	17
Tab. 4:	Auswahl der Ergebnisse (k' -Werte) der optimierten Phasenbibliothek	18
Tab. 5:	Elementaranalysen der Zwischen- und Endprodukte auf den Magnetpartikeln	24
Tab. 6:	Eigenschaften aktueller Adsorberphasen von InstrAction. Die Angabe zur maximalen Beladung bezieht sich auf das Ausmaß der Adsorption nach Inkubation in einer Imipenemlösung. Die Effizienz beschreibt das Transfervermögen von Antibiotikamolekülen zwischen zwei Lösungen.	32
Tab. 7:	Übersicht über die zur Methodenentwicklung hergestellten Rezeptorphasen der Firma InstrAction. Unter Grundsubstanz ist die jeweilige Zusammensetzung des Partikels beschrieben. Unter Bemerkungen werden die Wechselwirkungen gegenüber Imipenem kurz erläutert.	33
Tab. 8:	Messdaten der spezifischen Oberflächen verschiedenen Adsorber, sowie daraus berechnete Maximalbeladung q_m in Bezug auf die Adsorberoberfläche:.....	37
Tab. 9:	Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption und Desorption eingesetzter Adsorbersysteme und Cephalosporin C:	41
Tab. 10:	Auswertung der optischen Darstellung der Anlagerungsbereiche	55
Tab. 11:	Vergleich verschiedener Gitterorientierungen; die Filterkonstanten wurden anhand der Durchbruchkurven errechnet.....	72
Tab. 12:	Vergleich der unterschiedlichen Gitterstababstände bei verschiedenen Flüssigkeitsströmen.	74
Tab. 13:	Ein- und ausgehende Stoffströme der chemischen Synthese von Thienamycin nach Kalkulationen der Software SuperPro Designer.....	82
Tab. 14:	Ein- und ausgehende Stoffströme der fermentativen Synthese von Thienamycin nach Kalkulationen der Software SuperPro Designer.....	82
Tab. 15:	Ein- und ausgehende Stoffströme der fermentativen Synthese unter HGMS-Aufarbeitung von Cephalosporin C nach Kalkulationen der Software SuperPro Designer.	85

4 Projektinformationen

4.1 Titel des Projekts

Entwicklung innovativer selektiver Adsorbentmaterialien zur ökoeffizienten Aufarbeitung von beta-Lactamantibiotika

4.2 Aktenzeichen

Az. 13240 - 32

4.3 Projektpartner

Partner	Adresse
Technische Universität Kaiserslautern, Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik	Gottlieb-Daimler-Str. 44, 67663 Kaiserslautern
instrAction GmbH	Donnersbergweg 1, 67059 Ludwigshafen am Rhein

4.4 Projektbearbeiter

Bearbeiter(in)	Institution
Prof. Dr. Roland Ulber	Technische Universität Kaiserslautern
Dr. Nils Tippkötter	Technische Universität Kaiserslautern
Dipl.-Biophys. Aline Pasteur	Technische Universität Kaiserslautern
Dipl.-Biotech. Benjamin Ludwig	Technische Universität Kaiserslautern
Dipl.-Ing. (FH) Doris Leipold	Technische Universität Kaiserslautern
Gesine Wünsch	Technische Universität Kaiserslautern
Dipl.-Ing. Slobodanka Maurer	Technische Universität Kaiserslautern
Dipl.-Ing. Ming Zhang	Technische Universität Kaiserslautern
Dr. Christian Meyer	instrAction GmbH
Prof. Dr. Percy Kampeis	Umwelt-Campus Birkenfeld, FH Trier
B.Eng. Daniel Feind	Umwelt-Campus Birkenfeld, FH Trier
Dipl.-Ing. (FH) Sabrina König	Umwelt-Campus Birkenfeld, FH Trier
B.Eng. Martin Lichtmes	Umwelt-Campus Birkenfeld, FH Trier
Prof. Dr. Rolf Diller	Technische Universität Kaiserslautern
Dipl.-Biophys. Patrick Singer	Technische Universität Kaiserslautern
Dipl.-Biophys. Johannes Ernst	Technische Universität Kaiserslautern
Cand.-Biophys. Philipp Alt	Technische Universität Kaiserslautern

5 Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektes wurde eine stationäre Phase mit einem definierten Bindungsmotiv, basierend auf der instrAction® Technologie identifiziert, die den zwitterionischen Wirkstoff Imipemen unter den Fermentationsbedingungen dessen Herstellung (pH-Wert von 7,4) nahe dem pI-Wert des Zielmoleküls bindet. Unter diesen Bedingungen kann mit einem konventionellen Ionenaustauscher keine Bindung erreicht werden. Des Weiteren wurde erstmals die instrAction Beschichtungstechnologie auf ein magnetisches Trägermaterial übertragen. Dazu wurden neue Beschichtungsverfahren untersucht.

Zur gezielten Untersuchung sowohl der Adsorption als auch der Elution zwischen Adsorbersubstrat und Antibiotikamolekül wurden FTIR-ATR sowie UV/Vis spektroskopische Methoden verwendet und weiterentwickelt. Es konnten die Adsorbermaterialien und die Antibiotikamoleküle im gelösten und adsorbierten Zustand charakterisiert, sowie die Bindungskinetik analysiert werden. Die Zuordnung relevanter IR-Markerbanden erfolgte mit Hilfe quantenchemischer DFT Rechnungen. So wurde eine Reihe von Adsorberphasen auf ihr Adsorptionsvermögen hin untersucht, sowie an dem Modellsystem XAD 16 – Cephalosporin-C (CPC) der gesamte Zyklus (Suspension – Adsorption – Elution) spektroskopisch erfasst. Weiter wurden durch UV/VIS – Spektroskopie Kontrollexperimente zur Adsorptionsausbeute und zur Antibiotika-Degradation durchgeführt.

Die von der instrAction entwickelten Adsorber wurden anhand von Adsorptionsisothermen untersucht. Die Adsorptionsparameter wurden im Rahmen des Projektes optimiert um eine Degradation des Antibiotikums während der Aufarbeitung zu minimieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Adsorber stabil in mehreren Zyklen einsetzbar sind, jedoch aufgrund unzureichender Elution nach dem ersten Adsorptionszyklus an Kapazität einbüßen.

Am Umwelt-Campus Birkenfeld der FH Trier wurde eine Messmethode zur direkten optischen Beobachtung der Anlagerungszonen magnetischer Mikrosorbentien im HGMS-Filter unter Wirkung des äußeren Magnetfelds konzipiert, aufgebaut und angewendet. Dazu war es nötig, die Filterkammer sowie die Filtermatrix neu zu konstruieren. Neben der kontinuierlichen Aufnahme und der vollautomatischen

Auswertung mittels Bildanalyse wurde diese als Inline-Analytik realisiert sowie eine Strategie zur Prozess-Steuerung erarbeitet. Außerdem wurde ein Prozessschritt zur Wiedergewinnung und Resuspendierung der magnetischen Mikrosorbentien aufgebaut und untersucht.

Die Abtrennung von Biomasse und filamentös wachsendem Mikroorganismus von den Mikropartikeln ist nicht geglückt, sodass für den Aufbau eines kompletten Prozesses eine Vorfiltration des Mediums vorgesehen wurde. Zur Realisierung der Fermentation eines Antibiotikums mit integrierter Aufarbeitung mittels Hochgradient-Magnetseparation (HGMS) wurde an der TU Kaiserslautern eine Reaktorkaskade bestehend aus zwei Reaktoren und dem HGMS aufgebaut und charakterisiert. Das Problem der Biomasserückhaltung konnte bisher noch nicht abschließend gelöst werden, die Kaskade stellt jedoch einen vielversprechenden Ansatz zur Antibiotikaherstellung mit kontinuierlicher Produktabtrennung dar.

6 Bericht

6.1 Anlass und Zielsetzung

Ziel des geförderten Projektes ist die selektive Isolierung von fermentativ hergestellten β -Lactamantibiotika aus komplexen, hochviskosen Stoffgemischen unter anschließender magnetischer Separation. Das Verfahren soll im frühen Stadium der Aufarbeitung eingesetzt werden, um die hydrolyseempfindlichen Carbapenem-Antibiotika zu stabilisieren und damit die Ausbeute an Produkt zu erhöhen.

Die Gewinnung von Antibiotika aus Fermentationsbrühen ist ein bereits vieldiskutiertes Problem in der Aufarbeitung dieser Verbindungen. β -Lactam-Antibiotika werden in wässrigen Lösungen produziert. Sie sind nur unter hohem Aufwand aus diesen Medien zu isolieren, da sie gut wasserlöslich sind und einen zwitterionischen Charakter besitzen. Ein weiteres Problem stellt das Medium selbst dar, aus dem die Lactame isoliert werden sollen. Diese beinhalten für die Produktion essenzielle Zusätze, welche ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen wie das Zielprodukt. Eine Aufarbeitungsmethode schlägt die direkte Bindung auf basischen Ionentauscherharzen vor. Die in der Fermentationsbrühe enthaltenen anorganischen Ionen führen jedoch zu unspezifischen Adsorptionen auf dem Adsorberharz, so dass ein gravierender Einbruch in der Adsorptionskapazität zu verzeichnen ist. Aus diesem Grund erhöhen sich die Aufarbeitungsschritte und damit auch die Stoffströme. Ein weiterer Ansatz für die Aufarbeitung ist die Verwendung von aromatischen Adsorbentien wie XAD 2, 4 und 16. Diese Adsorbentien zeigen keine unspezifischen Wechselwirkungen gegenüber anorganischen Ionen und aufgrund ihrer hohen Porosität auch größere Maximalbeladungen pro Gramm Adsorbentium als basische Ionentauscher. Allerdings erhöht sich durch die Porosität auch die Adsorptionszeit aufgrund von Diffusionseffekten, was sich bei den hydrolyseempfindlichen β -Lactam-Antibiotika in einem erheblichen Produktverlust niederschlägt.

Beide Aufarbeitungsmethoden sind für β -Lactam-Antibiotika in wässrigen Lösungen einsetzbar, zeigen jedoch in Fermentationsmedien einige Schwächen. Eine Kombination beider Methoden auf einem Adsorbentium könnte hier zu einer deutlichen

Steigerung der Effizienz führen und somit Aufarbeitungsschritte und Lösungsmittel einsparen. Durch die magnetische Separation im **HochGradienten MagnetSeparator** (HGMS) ist eine Fest/Fest/Flüssig-Trennung und somit zusätzlich ein erheblicher Zeitgewinn im Downstream-Prozess möglich. Es kommt zu weiteren Einsparungen an Lösungsmittel und Energie innerhalb des Prozesses, was in ökologischer Hinsicht einen interessanten Aspekt darstellt.

Im Projekt soll zunächst die Beschichtung verschiedener magnetisierbarer Partikel sowie die Synthese selektiver Rezeptorphasen für Carbapeneme realisiert werden. Zur Identifikation des Adsorbers mit optimaler Bindungskinetik, bester Bindungskapazität, günstigsten Bedingungen für Elution und damit vollständiger Entfernung der Antibiotika, werden Trennversuche zur Bestimmung von Reinheit und Ausbeute des Zielprodukts in Modellmedien durchgeführt und Bindungseigenschaften sowie Hydrolyseprozesse mit Hilfe von HPLC-Methoden und photometrisch mittels UV/Vis-Spektroskopie charakterisiert. Die Bestimmung der Bindungskinetik und Oberflächenbeladung erfolgt mittels FTIR-ATR-Spektroskopie. Zur Beurteilung und Steuerung der Magnetfiltration wird eine neue optische In-line-Analytik in das HGMS-System integriert werden. Nach Abschluss der Charakterisierung und Optimierung der Modellsysteme soll eine Integration in den β -Lactam-Fermentationsprozess vorgenommen werden. Ziel ist die kontinuierliche Abtrennung des Antibiotikums aus der Fermentationsbrühe.

6.2 Verwendete Methoden

6.2.1 Wasseraufnahmekapazität (WAK)

Die Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität ist ein wichtiger Parameter für die Beschichtung von porösen Materialien mit der instrAction[®] Technologie. Das getrocknete Trägermaterial wird in Filterzentrifugenvials eingewogen und mit Wasser versetzt. Anschließend wird das Wasser aus dem Zwischenkornvolumen in einer Minispin bei 13.400 Upm herausgeschleudert. Die immer noch mit Wasser gefüllten Partikel werden gewogen und aus der Differenz kann über die Dichte das Porenvolumen berechnet werden.

6.2.2 Inverse Größenausschlußchromatographie (GPC)

Bei der inversen GPC wird die Porengrößenverteilung für ein Trägermaterial ermittelt. Dabei werden Polymerstandards (PMMA) mit einem definierten hydrodynamischen Radius, die keine Retention auf dem Trägermaterial haben dürfen, auf eine Säule aus dem Trägermaterial injiziert. Aus der Verschiebung der Retentionszeiten für die unterschiedlich großen Polymerstandards wird das zugängliche Porenvolumen für den jeweiligen Standard ermittelt. Aus den Messwerten, die das für den jeweiligen Polymerstandard zugängliche Porenvolumen darstellen, lässt sich dann eine Porengrößenverteilung berechnen.

6.2.3 Eingesetzte kommerzielle Adsorber

XAD 4: Polystyrol basierte nicht ionische Beads mit Partikeldurchmesser zwischen 0,49 bis 0,69 mm, einer spezifischen Oberfläche von 850 m²/g und einer Porosität von 0,5 ml/ml

IRA 67: Schwach basischer unporöser Ionentauscher auf Acrylbasis mit einer spezifischen Oberfläche von 0,7 m²/g und tertiärem Amin als funktionelle Gruppe. Der Beaddurchmesser beträgt 0,3 bis 1,2 mm

Orica: Stark basischer unporöser magnetisierbarer Ionentauscher mit einer spezifischen Oberfläche von 5,1 m²/g und tertiärem Amin als funktioneller Gruppe. Der mittlere Partikeldurchmesser beträgt 0,18 mm.

IRA 400: Stark basischer poröser Ionentauscher auf Polystyrolbasis und quartären Amininen als funktionelle Gruppe. Das Adsorberharz liegt in der Cl⁻ Form vor. Der Beaddurchmesser beträgt 0,6 bis 0,75 mm

InstrAction-Phasen: ND 11490: Silicagel mit optimierter Derivatisierung (Palmoylsäure + Sulfobenzoessäure); CV11005: magnetisches Silicapartikel mit gleicher Derivatisierung wie ND 11490 ; ND11835: Gleiches Partikel wie CV11005 mit gleicher Derivatisierung und anschließender Acetylierung der restlichen Aminogruppen; ND12195:

gleiches Partikel wie CV11005 mit veränderter Derivatisierung (ohne Sulfonsäure-Gruppen)

6.2.4 Adsorptionsuntersuchungen an kommerziellen Adsorbentien und der instrAction-Phasen

6.2.4.1 Vorbehandlung der Adsorbentien

XAD 4: Waschen der Partikel mit Methanol um die Salze für die Lagerung herauszuwaschen. Danach werden die Adsorbentien in dest. Wasser zur weiteren Verwendung gelagert und eingesetzt [1].

IRA 67: Zunächst Waschen der Adsorbentien mit dest. Wasser um auch hier Salze der Lagerung zu beseitigen. Danach werden die Adsorbentien mit 1 M NaOH vorbehandelt um dann mit 1 M Essigsäure in die Acetat-Form überführt zu werden [2].

IRA 400: siehe IRA 67

Orica: Diese magnetisierbaren Beads liegen in Lösung vor und werden zunächst mit Wasser gewaschen und im Trockenschrank getrocknet. Danach werden die Adsorbentien genau wie IRA-67 mit 1 M NaOH vorbehandelt um dann mit 1 M Essigsäure in die Acetat-Form überführt zu werden [2].

instrAction: Eine Vorbehandlung der Partikel ist nicht notwendig. Die Partikel können direkt eingesetzt werden.

6.2.4.2 Adsorption und Elution von Cephalosporin C über die Zeit

Die Anfangskonzentration von CPC beträgt 1 g/L in 50 ml Puffer. Mit 0,1 M Essigsäure/NaOH-Puffer wird der pH-Wert auf 3 eingestellt. Von allen Adsorbentien wurde jeweils 1 g/L eingesetzt. Die Probenahme erfolgt jeweils alle zwei Minuten. Die CPC Konzentrationen des Überstandes wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie am Absorptionsmaximum des Antibiotikums von 260 nm ermittelt. Bei der Untersuchung der Elution werden 50 ml des entsprechenden Eluenten (Zusammensetzung siehe

Punkt Elution) und 1 g/L der beladenen Adsorber eingesetzt. Auch hier erfolgt die Probenahme alle zwei Minuten.

6.2.4.3 Adsorptionsisothermen

Zur Erstellung einer Adsorptionsisotherme wurden die CPC Ausgangskonzentrationen 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 7 g/L, 9 g/L, 11 g/L, 13 g/L, 15 g/L eingesetzt. Der pH-Wert wurde mit 0,1 M Essigsäure/NaOH auf 3 und 4 eingestellt. In 1 ml der Lösungen verschiedener CPC-Konzentrationen wurden jeweils 20 mg des entsprechenden Adsorbermaterials zugegeben. Die Adsorptionszeit betrug 1 Stunde bei 25 °C. Die Gleichgewichtskonzentrationen der Überstände nach der Adsorption wurden mit Hilfe der HPLC-Analytik ermittelt. Die spätere Adsorption wurde im realen Fermentationsmedium folgender Zusammensetzung durchgeführt:

Tab. 1: Zusammensetzung des Fermentationsmediums (Hauptkultur) für *Streptomyces sp.* zur Adsorption des Imipenems:

Bestandteil	Konzentration [g/l]
Glucose	35
MgSO ₄	6,67
H ₂ KPO ₄	3,1
FeSO ₄	0,09
MnSO ₄	0,03
ZnSO ₄	0,02
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,2
CuSO ₄	0,02
Na ₂ SO ₄	5
Urea	2,1
Serin	1
DL-Methionin	14,67
Sojaöl	40

Im Fall von Imipenem wurden zur Erstellung der Adsorptionsisothermen die Ausgangskonzentrationen 0,05 g/L; 0,1 g/L; 0,2 g/L; 0,4 g/L; 0,6 g/L; 0,8 g/L; 1 g/L; 2 g/L; 4 g/L; 6 g/L; 8 g/L; 10 g/L eingesetzt. Als Lösemittel für das Imipenem diente

zunächst eine 15 mM NaCl, 35 mM Natriumacetat Lösung (pH 7,5). Aliquots von 1 ml der verschiedenen Imipenem-Konzentrationen wurden jeweils zu 20 mg des entsprechenden Adsorbermaterials zugegeben. Die Adsorptionszeit betrug anfänglich 1 Stunde bei 25 °C und wurde später auf 10 Minuten reduziert. Die Gleichgewichtskonzentrationen der Überstände nach der Adsorption wurden mit Hilfe der HPLC-Analytik ermittelt. Die späteren Adsorptionsuntersuchungen erfolgten im realen Fermentationsmedium folgender Zusammensetzung:

Tab. 2: Zusammensetzung des Fermentationsmediums für *Streptomyces sp.* zur Adsorption des Imipenems:

Bestandteil	Konzentration [g/L]
Glycerin	80,00
K ₂ HPO ₄	2,00
MgSO ₄	2,00
Sojamine	25,79
Hefeextrakt	7,64

6.2.4.4 Elution

Die beladenen Adsorber werden zunächst mit 1 mL des Adsorptionspuffers gewaschen, um unspezifisch gebundenes Antibiotikum zu entfernen. Als Elutionsmittel für XAD 4 und Cephalosporin C werden 2 ml einer 50 % (v/v) Methanol-Lösung eingesetzt. Für IRA 67 und Orica Partikel werden 2 ml einer 0,1 M Kaliumacetat-Lösung bei pH 6,5 eingesetzt [2]. Die Elutionszeit beträgt 1 Stunde bei 25 °C. Auch hier wurden die Konzentrationen mittels HPLC bestimmt.

Im Falle von Imipenem wurde ein Eluent mit 1 M Natriumacetat/Ethanol/H₂O (1:1:1) eingesetzt. Die Elutionszeit betrug zu Beginn 60 Minuten und wurde im Laufe des Projektes auf 10 Minuten reduziert.

6.2.4.5 Spektroskopische Untersuchungen

Für die Aufnahme der Schwingungsspektren wurden zwei FTIR-ATR Spektrometer (Perkin-Elmer, Spektrum100; Thermo-Fischer, Nicolet380) verwendet. Komplementär wurde auch die FT-Raman Spektroskopie erprobt (Bruker RFS100S).

Photometrische Untersuchungen wurden am UV/VIS-Spektrometer V670 (Jasco) durchgeführt. Eine Analyse und Zuordnung der in den IR-Spektren auftretenden Schwingungsbanden erfolgte über quantenchemische Simulationen der Antibiotika mittels GAUSSIAN (Basissatz B3-LYP; 6-31-Gd). Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

6.2.5 Optimierung der Hochgradienten Magnetseparation

6.2.5.1 Eingesetzte Filterkammern

Die verschiedenen Separationsexperimente wurden mit dem HGF-10 Permanentmagnet-System der Firma Steinert GmbH durchgeführt. Die magnetisierbare Matrix dieses Systems wird von einer Reihe gestapelter Drahtgitter aufgebaut. Sie beinhaltet zwei verschiedene Gitter, wovon eine Sorte magnetisierbar ist (ferromagnetisches Material DIN 1.4106) und die andere als Spacer zwischen den magnetisierbaren Gittern aus einem nicht ferromagnetischen Material (DIN 1.4571) besteht (siehe Abb. 1). Diese nicht magnetisierbaren Gitter nehmen einen großen Raum in der Filterkammer ein, der für die Partikelseparation verloren geht und tragen somit nicht zur magnetischen Separation der Partikel bei. Durch diesen Raumverlust wechselt die Separation von einer reinen magnetischen Filtration zu einer Tiefenfiltration. Dies führt dazu, dass eine Separation der Magnetpartikel von nicht magnetisierbaren Stoffen nur für eine kurze Zeit garantiert werden kann. Im Rahmen dieses Projektes soll die originale Filtermatrix so reduziert werden, dass die Filtermatrix aus einem Minimum an Gitterstäben besteht die als Stromstörer dienen und dennoch keine Verluste oder sogar eine Steigerung der Separationseffizienz aufweisen.

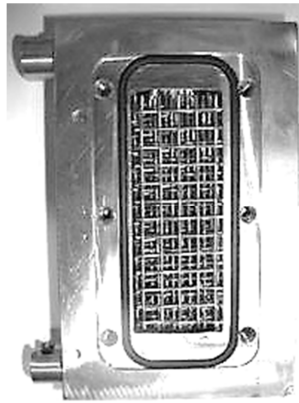


Abb. 1: Separationskammer vor der Optimierung der Gittermatrix

Um herauszufinden, welche Gitterorientierung den größten Beitrag zur Partikelabscheidung liefert, wurde eine neue Trennkammer konstruiert, mit der die Gitterorientierung in alle drei Raumrichtungen variiert werden kann (siehe Abb. 2). Als magnetisierbares Gitter dienten Stäbe der Materialbezeichnung DIN 1.4310.

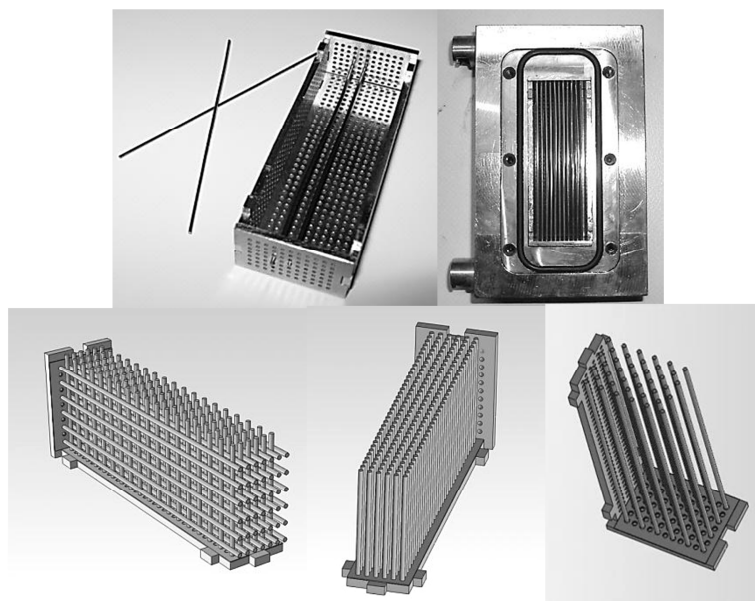


Abb. 2: Verwendete Matrixorientierungen für die Filterkammeroptimierung: a) Einsatz für die HGMS-Filtrationskammer für unterschiedliche Gitterorientierungen, b) Filterkammer mit axialer Anordnung, c) simulierte Gitterstruktur der Filterkammer, d) transversale Gitterstaborientierung und e) axial Gitterorientierung.

Anhand verschiedener Separationsexperimente wurde die Gittermatrix des Steinert HGF-10 (siehe Abb. 2c) mit einer transversalen (Abb. 2d) oder axialen Anordnung Abb. 2e) von Gitterstäben als Filtermatrix verglichen. Als Negativexperiment wurde eine sogenannte parallele Anordnung verwendet bei der die Gitterstäbe parallel zum magnetischen Feld und senkrecht zum Flüssigkeitsstrom platziert werden. Diese Orientierung bildet keinen magnetischen Feldgradienten aus, sodass auch keine Partikel magnetisch abgetrennt werden können.

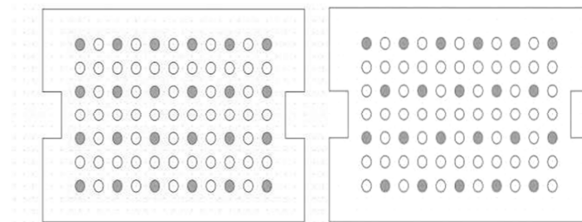


Abb. 3: Orientierung der magnetischen Stäbe in a) kubischer und b) rhomboedrischer Anordnung.

Als weitere Orientierungsmöglichkeit wurde eine kubische oder eine rhomboedrische Anordnung in Betracht gezogen (siehe Abb. 3). Die Effizienz der Separation wurde zunächst gravimetrisch bestimmt, indem nach einem bestimmten Zeitintervall die Menge an separierten Partikeln auf der Filtermatrix quantifiziert wurde. Ausgehend von diesem Wert wurde die Filterbeladung für jede Gitterorientierung berechnet. In weiteren Folgeexperimenten wurde die Separationseffizienz ausgehend vom Filterkoeffizient berechnet, welcher mit Hilfe von Durchbruchkurven bestimmt werden kann (siehe Kap. 6.2.3.2).

Für eine transversal rhomboedrische Anordnung der Stäbe wurden verschiedene Kammereinsätze mit Gitterabständen zwischen 0,2 mm und 1,4 mm angefertigt (siehe Abb. 4). Diese dienten der Identifizierung der optimalen Gitterabstände.

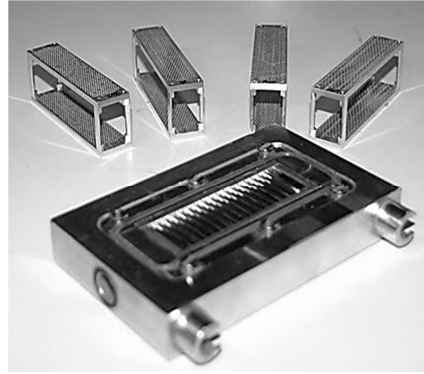


Abb. 4: Separationskammer mit verschiedenen Kammereinsätzen für Gitterabstände zwischen 0,2 mm und 1,4 mm.

6.2.5.2 Aufnahme von Durchbruchkurven und Berechnung der Filterkonstanten

Der Verlauf einer vollständigen Beladung mit, an der Technischen Universität Kaiserslautern hergestellten, Silica-Partikeln bei einem Volumenstrom von $100 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ und deren Elution ($500 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) aus dem HGMS ist in Abb. 5 dargestellt. Der Durchbruch der Partikelsuspension beginnt nach einer Beladungsdauer von 4,5 min. Nach 9,5 min ist eine vollständige Erschöpfung der Filterkapazität zu erkennen. Die Maximalbeladung dieses Filters mit magnetischen Partikeln beträgt 4,17 g. Anhand der nachfolgenden Reinigungsspülung der Kammer mit eingeschaltetem Magneten ab der 19,5 min ist zu erkennen, dass die Partikel vollständig im Magnetfeld zurückgehalten werden. Erst nach der Entfernung des äußeren Magnetfelds in der 27. Minute ist die Elution der Partikel zu erkennen.

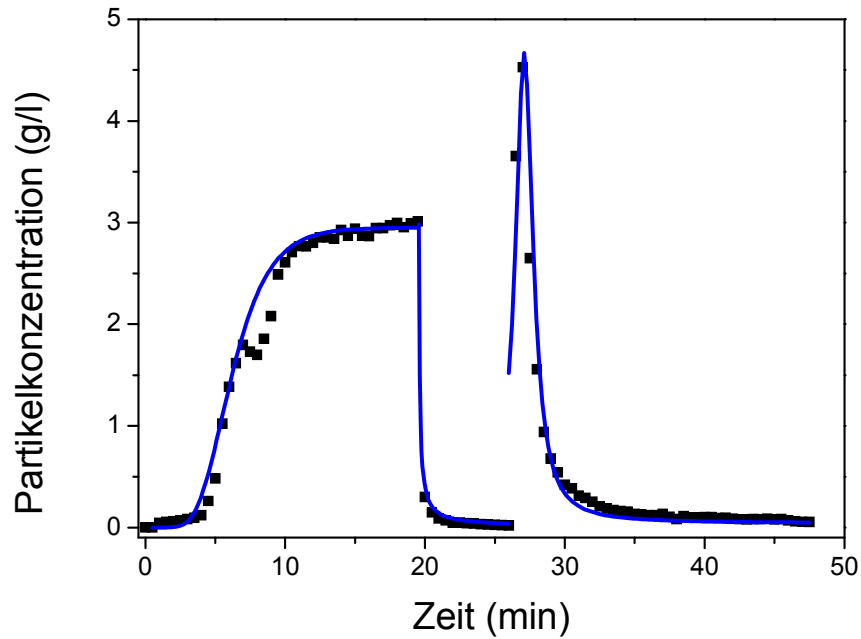


Abb. 5: Durchbruchkurve magnetischer Partikel im HGMS: Magnetpartikelkonzentration der eigens hergestellten Silica-Partikel am Ausgang des HGMS-Filters. Bis zur 20. Minute ist die Beladung des Filters dargestellt. Im Anschluss die Spülung (ab 22 min) und das Auswaschen (ab 27 min) der Filterkammer.

Anhand solcher Durchbruchkurven können diverse Filterkonstanten berechnet werden, die Aufschluss über die Separationseffizienz geben. Bei der Aufnahme der Durchbruchkurven wird die Partikelkonzentration am Ausgang der Separationskammer mittels Messungen der optischen Dichte zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Mathematisch kann der Verlauf der Partikelkonzentration mit folgender Gleichung beschrieben werden [3]:

$$\frac{c}{c_0} = \frac{\exp(\sigma_s^{-1} \cdot c_0 \cdot v_0 \cdot \lambda_0 \cdot \tau)}{\exp(\sigma_s^{-1} \cdot c_0 \cdot v_0 \cdot \lambda_0 \cdot \tau) + \exp(\lambda_0 \cdot L_F) - 1} \quad (1)$$

$$\tau = t - \frac{L_F}{v_F} \quad (2)$$

$$v_F = \frac{v_0}{\varepsilon} \quad (3)$$

c_0 ist hierbei die Partikelkonzentration am Kammereingang, c die Partikelkonzentration am Kammerausgang, σ_s die Sättigungskapazität der Filtermatrix, v_0 die Fluidgeschwindigkeit am Einlass, λ_0 der initiale Filterkoeffizient, τ die Verweilzeit, definiert durch die Filtrationszeit t minus dem Quotienten aus Filterlänge L_F und Fluidgeschwindigkeit v_F innerhalb des Filters, wobei v_F eine Funktion der Filterporosität ε ist.

Diese Gleichung basiert auf der Theorie der Tiefenfiltration. Mit diesem Modell kann die Kapazität der Filtermatrix bestimmt werden und für Vergleiche der verschiedenen Gitterausrichtungen herangezogen werden. Dieses Modell lässt sich gut auf die HGMS anwenden, was ebenfalls im Rahmen der Experimente bestätigt werden konnte (siehe Abb. 6).

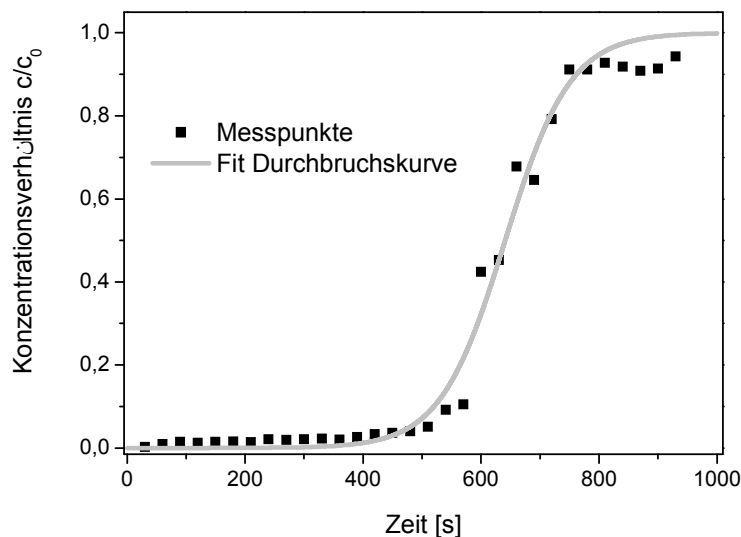


Abb. 6: Durchbruchskurve und Fit der Messwerte anhand Gleichung 1 basierend auf der Theorie der Tiefenfiltration.

6.2.5.3 Simulation der Gittermatrix innerhalb der HGMS-Filterkammer

Die Software COMSOL Multiphysics ist ein Programm, welches verschiedene physikalische Modelle verbindet und auf ein einziges simulatives Problem anwendet. Die hier genutzte Simulation basiert auf Grundlagen der Magnetostatik und des inkompressiblen Navier-Stokes Modells.

Mit Hilfe des Moduls zur Magnetostatik kann auf Grundlage der Maxwell'schen Gleichungen das magnetische Feld simuliert werden. Anhand von Oberflächenplots ist in jedem Punkt der Simulation die magnetische Feldstärke \vec{H} bestimmt. Ausgehend von diesen Simulationen kann die magnetische Kraft \vec{F}_M berechnet werden, die auf die magnetischen Partikel wirkt:

$$\vec{F}_M = \mu_0 \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r_p \cdot \chi \cdot \vec{H} \cdot \text{grad } \vec{H} \quad (4)$$

wobei μ_0 die Permeabilitätskonstante des Vakuums, r_p den Partikelradius der magnetischen Komponente des Magnetpartikels und χ die Suszeptibilität der magnetischen Partikel darstellt. Die Suszeptibilität der hier verwendeten Partikel wird definiert als $\chi = 0,61$, was einer Suszeptibilität von Magnetit bei 1 T [4] entspricht. Die Suszeptibilität ist von der Form und Größe der Partikel abhängig, diese Abhängigkeit spielt jedoch für das betrachtete Modell keine Rolle, da dieser Wert in allen Simulationen konstant gehalten und die Ergebnisse für den Vergleich der Matrixorientierungen untereinander herangezogen werden. Eine quantitative Beschreibung der Partikeltrajektorien soll hierbei nicht erreicht werden.

Die fluiddynamischen Abläufe für inkompressible viskose Flüssigkeiten wird mit Hilfe der Navier-Stokes Gleichung beschrieben. Die Kraft \vec{F}_D , die auf die Partikel durch den Flüssigkeitsstrom wirkt, kann mit Hilfe folgender Gleichung berechnet werden:

$$\vec{F}_D = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_p \cdot \vec{v} \quad (5)$$

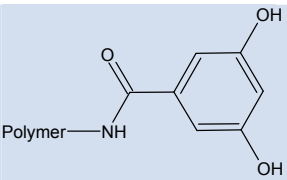
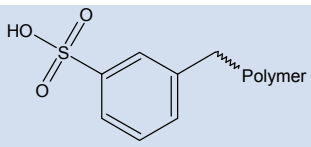
wobei η die dynamische Viskosität, r_p den Partikelradius und \vec{v} die Fluidgeschwindigkeit beschreiben. Die Simulationen wurden zunächst in 2D durchgeführt und alle Kräfte in x und y Richtung berechnet.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Darstellung selektiver Adsorberphasen

Das Projekt wurde mit der Identifizierung eines Bindungsmotivs begonnen. Für die Suche einer selektiven Adsorberphase, auf Basis der Netzwerktechnologie für das sehr polare und zwitterionische Imipenem, wurde ein Screening von über 200 Säulen aus der patentgeschützten Phasenbibliothek der instrAction GmbH durchgeführt. Bei der Wahl der Screeningbedingungen wurden die Ionenstärke und der pH-Wert des Fermentationsmediums imitiert. Für die Adsorption an eine instrAction Phase (ISP) wird eine ionische Wechselwirkung bzw. ein rein lipophiler Bindungsmechanismus nur zu sehr geringer Retention führen. Die Phase muss daher aus einer Kombination mit stark polaren, gegebenenfalls ionischen Gruppen, und stark lipophilen Gruppen bestehen. Liganden des polymeren Netzwerkes, die aromatische Struktureinheiten besitzen, könnten von Vorteil sein. Gemäß der Theorie publiziert von Withesides et al. [5] multiplizieren sich die individuellen Bindungsstärken. Diese Modellvorstellung konnte durch die im Screening gefundene Phase bestätigt werden.

Tab. 3: Ergebnisse des Screenings beispielhaft an zwei Phasenmotiven BD 06134 und ND 06256 gezeigt.

	Beladung Imipemen [mg/mL]	ND 06134	ND 06256
k'-Wert isokratisch: 15 mM Na ₂ HPO ₄ + 35 mM NaCl; pH 7,0	0,3	2,8	8,0
	1	2,6	6,1
Struktur der Liganden der stationären instrAction Phasen			

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde auf kieselgelbasierten Trägermaterialien der instrAction GmbH eine spezielle Phasenbibliothek mit 24 Einträgen synthetisiert, die sowohl die aromatischen Wechselwirkungen anspricht, als auch stark ionische Gruppen enthält. Diese neuen multimodalen Motive zeigten alle mindestens einen vergleichbaren k'-Wert, wie die Ausgangshitphasen aus dem ersten Screening. Der

k' -Wert ist ein Maß für die Größe der Bindungskonstante unter den gegebenen Chromatographiebedingungen. Bei einer ganzen Reihe dieser Phasen wurden sogar deutlich höhere k' -Werte Tab. 4; z. B. ND 10322 k' -Wert >36) gefunden.

Tab. 4: Auswahl der Ergebnisse (k' -Werte) der optimierten Phasenbibliothek

Phase	ND 10315	ND 10316	ND 10327	ND 10328	ND 10317	ND 10322	ND 10321
k' -Werte ^(a)	9,89	5,43	6,11	13,00	26,10	>36	19,23

(a) Säule 40 x 4 mm Gradient: 15mM NaOAc + 35 mM NaCl (pH 7) auf 15mM NaOAc + 1 M NaCl (pH 7)

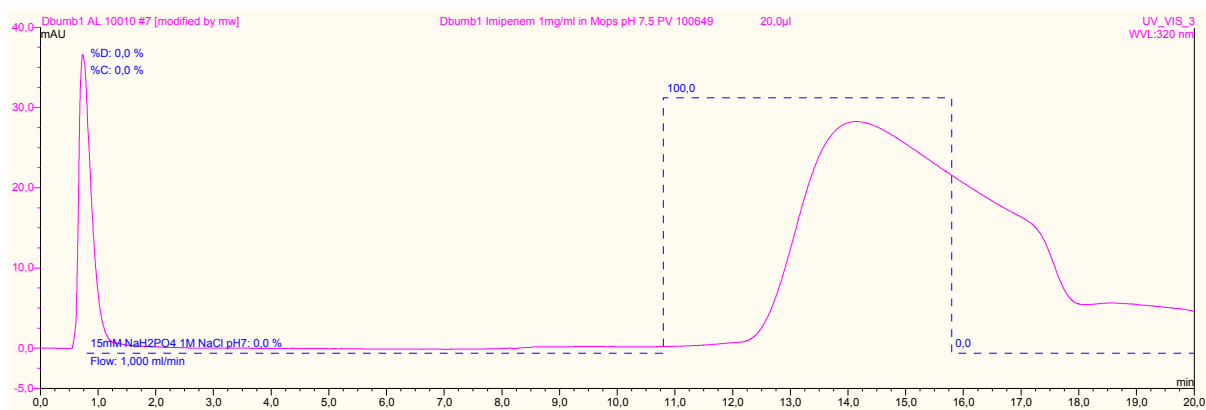


Abb. 7: Elution von Imipenem von Phase ND 10322 unter simulierten Fermentationsbedingungen

Die Elution des Imipenem (Abb. 7) findet erst beim Spülen der Säule mit 1 M NaCl-Puffer statt. Ohne Änderung der Salzstärke ist für dieses Bindungsmotiv auf dem instrAction Polymernetzwerk in endlicher Zeit nicht mit einer Elution des Imipenem von der Phase zu rechnen. Diese deutliche Verbesserung der Retention kann durch das Zusammenwirken der beiden aufgebracht Gruppen erklärt werden. Die Phase ND 10317 enthält nur den Liganden 1 und hat einen deutlich niedrigeren k' -Wert von 26 im Vergleich zu der Phase ND 10322, die noch einen weiteren Liganden mit einer starken ionischen Wechselwirkung enthält.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Entwicklung der Adsorberphase war die Stabilisierung des Imipenems bzw. die Verhinderung der Bildung eines Imipenem-Dimers durch Öffnung des β -Lactam-Ringes unter den wässrigen Bedingungen der Fermentation. Um die Stabilität des Imipenems unter den Bindungsbedingungen auf der Phasenoberfläche zu zeigen, wurden Fraktionierungen des Elutionspeak auf der

Phase ND 10322 durchgeführt. Dabei wurde durch Verringerung der Flussrate durch die Säule die Verweilzeit des Imipenem von 8 min auf 32 min erhöht. Die Experimente wurden einmal mit und einmal ohne einen Anteil von 25% Methanol im Elutionsschritt durchgeführt. Das Eluat aus der Säule wurde in zwei getrennten Fraktionen aufgefangen (siehe Abb. 8).

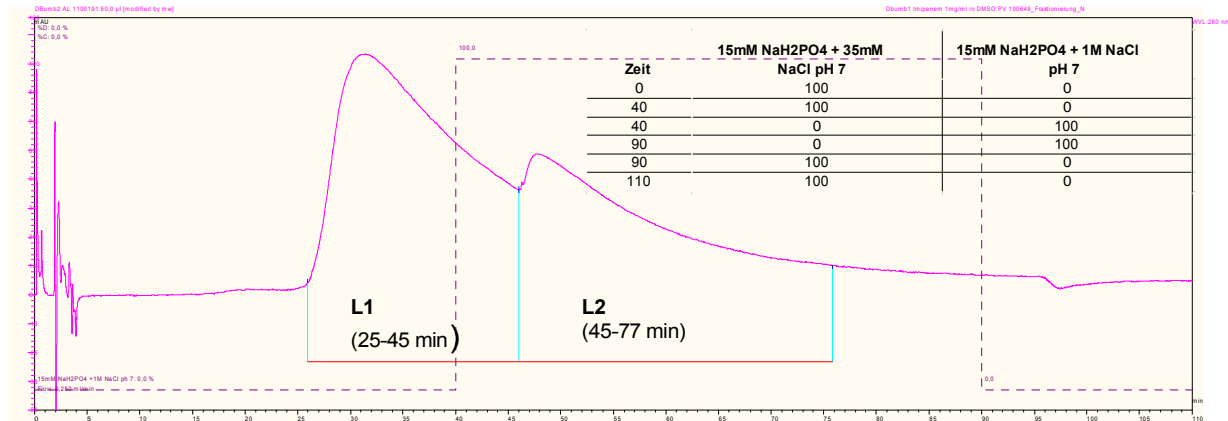


Abb. 8: Chromatogramm der Fraktionierung von Imipenem auf ND 10322

Dann wurde die Reinheit des Imipenem mit einer analytischen Methode auf einer C-18 Säule untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass bei der Verwendung von 1 M Natriumchlorid in Wasser für die Elution keine weiteren Signale im analytischen Chromatogramm detektiert wurden. Bei der Verwendung von zusätzlich 25% Methanol im Elutionspuffer wurden nur in der späteren Elutionsfraktion „L2“, zwei neue Signale gefunden.

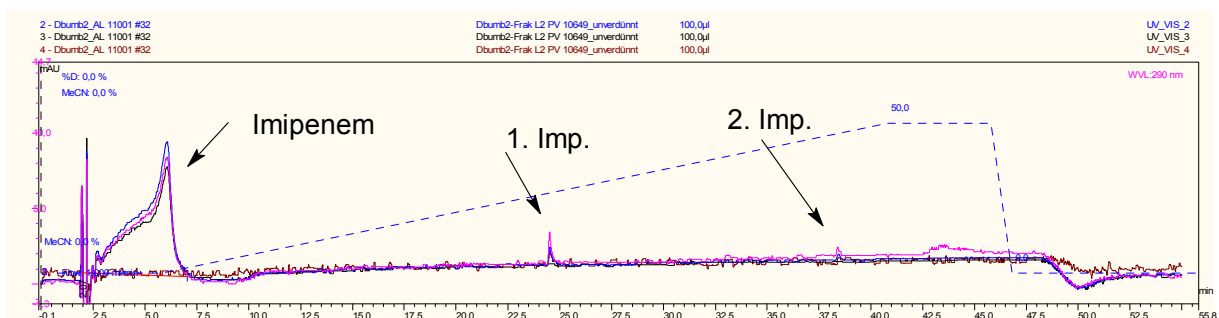


Abb. 9: Chromatogramm von Fraktion „L2“ auf der analytischen C-18 Phase

Nur in dieser Fraktion ist das Imipenem mit Methanol als Lösungsmittel in Kontakt gekommen. Eines dieser Signale liegt knapp über der Quantifizierungsgrenze. Für

beide wurde ein Absorptionsmaximum bei 290 nm gefunden. Dieses spricht gegen die Bildung des Dimers auf der Phase, welches sein Absorptionsmaximum bei 375 nm hat.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der Ligandenverteilung auf der stationären Phase ND 10322 ein instrAction Bindungsmotiv gefunden wurde, das das Zielmolekül bindet und es unter geeigneten Bedingungen wieder von der Phase eluiert wird. Ein sehr wichtiger Aspekt scheint hier die Wahl des geeigneten Eluenten für die Phase zu sein.

Nachdem ein Adsorber für das Imipenem gefunden war, stand als zweites großes Ziel für den Erfolg des Projektes der Transfer des Polymernetzwerkes auf einen geeigneten magnetischen Träger an, um den Adsorber auch in der magnetischen Separation einsetzen zu können. In der folgenden Abbildung ist der generelle Aufbau der instrAction Technologie dargestellt.

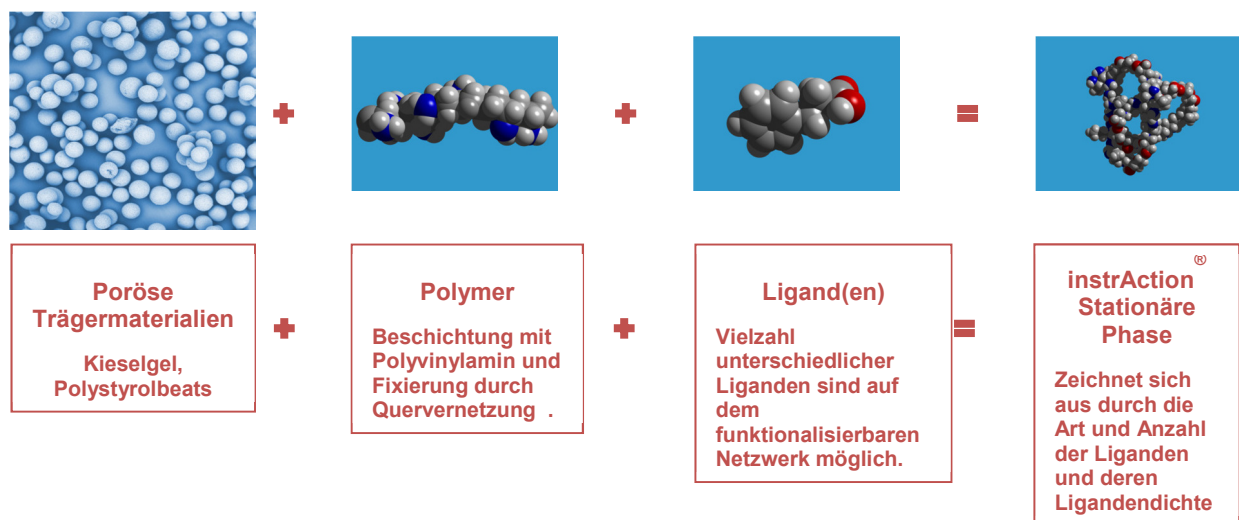


Abb. 10: Allgemeiner Aufbau der instrAction Technologie

Im Rahmen des Projektes soll die gefundene Beschichtung auf einen magnetischen Träger übertragen werden. In der Regel sind die kommerziell erhältlichen Partikel nicht porös und weisen eine geringe Partikelgröße (< 5 µm) auf, um eine große Oberfläche für die Adsorption zu bieten. Eine Reihe verschiedener verfügbarer magnetischer Partikel wurde untersucht. Die nicht porösen Partikel ließen sich nicht mit dem üblichen Beschichtungsverfahren der instrAction GmbH beschichten. Die Beschichtungen auf diesen Trägermaterialien führten nicht zu hinreichend stabilen Schichten für die notwendige weitere Derivatisierung des polymeren Netzwerkes.

Erst durch die Verfügbarkeit von porösen magnetischen Silica-Partikeln der Firma Chemicell GmbH konnte die Grundbeschichtung für das modifizierte instrAction Polymernetzwerk stabil aufgebracht werden.

Die Partikel SiMAG/MP-Silanol der Firma Chemicell wurden getrocknet und die Porosität mittels der Wasseraufnahmekapazität bestimmt. Die Partikel nehmen ca. 0,39 mL/g Wasser auf. Das Material hat nur ca. 40 % des Porenvolumen, das bei einem HPLC-Kieselgel gemessen wird. Die inverse GPC Messung zeigt eine sehr breite Porengrößenverteilung zwischen 10 und 200 nm. Dieses Material bietet weiteres Optimierungspotenzial für die Beschichtung mit der instrAction® Technologie, repräsentiert jedoch den geeignetsten zurzeit verfügbaren magnetische Träger.

Der Beschichtungsprozess besteht aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wird die aufzubringende Menge Polymer (Polyvinylamin mit definierten Eigenschaften) in die Poren des Trägers gefüllt. Im zweiten Schritt werden die einzelnen Polymerfäden, die sich unter bestimmten Bedingungen wieder vollständig von dem Träger herunter waschen lassen würden, mit einem Vernetzter (Moleküle mit zwei reaktiven Endgruppen) versetzt und es wird ein stabiles Polymernetzwerk auf dem Träger gebildet, das nicht mehr heruntergewaschen werden kann. In der folgenden Abbildung ist ein beschichtetes Material BV 11220 als Lichtmikroskop-Aufnahme zu sehen.

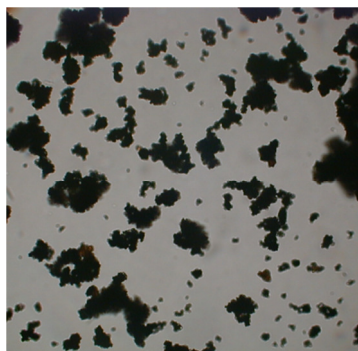


Abb. 11: Magnetische Partikel BV 11220 als Lichtmikroskop-Aufnahme

Bei diesem Beschichtungsversuch wurde das instrAction Grundpolymer aufgebracht, erfolgreich vernetzt und damit fest auf dem Träger immobilisiert. Diese Grundphase zeigt eine statische Anionenkapazität von 550 $\mu\text{mol/g}$. Diese Ionenkapazität entspricht dem erwarteten Wert für die aufgebrachte Menge an Polymer. Damit ist eine erfolgreiche stabile Beschichtung auf einem magnetischen Träger möglich, die

analog den Leitmotiven auf den üblichen Kieselgelträgern derivatisiert werden kann. Die Derivatisierung der multimodalen Phase erfolgt anschließend ebenfalls in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird als Ligand ein Molekül eingebracht, das hauptsächlich lipophile Wechselwirkungen mit dem Zielmoleküle einbringt. In der zweiten Stufe wird ein Ligand eingebaut, der für eine starke ionische Wechselwirkung auf der Oberfläche der instrAction Phase sorgt. In der folgenden Abbildung ist die Porengrößenverteilung einer derivatisierten Phase auf dem magnetischen Träger gezeigt. Hier zeigt sich, dass die Poren auf dem Träger nach der Beschichtung und Derivatisierung immer noch zugänglich sind. Die Poren haben einen mittleren Durchmesser von deutlich über 100 nm. Das bedeutet aber auch, dass die Oberfläche der Partikel deutlich geringer ist, als bei den instrAction Phasen auf denen die hohen Bindungskapazitäten für das Imipenem gemessen wurden. Die noch nicht zufriedenstellenden Ergebnisse für die Beladung von Imipenem auf den magnetischen Phasen, liegen mit hoher Wahrscheinlichkeit an der geringeren Oberfläche der magnetischen Beads.

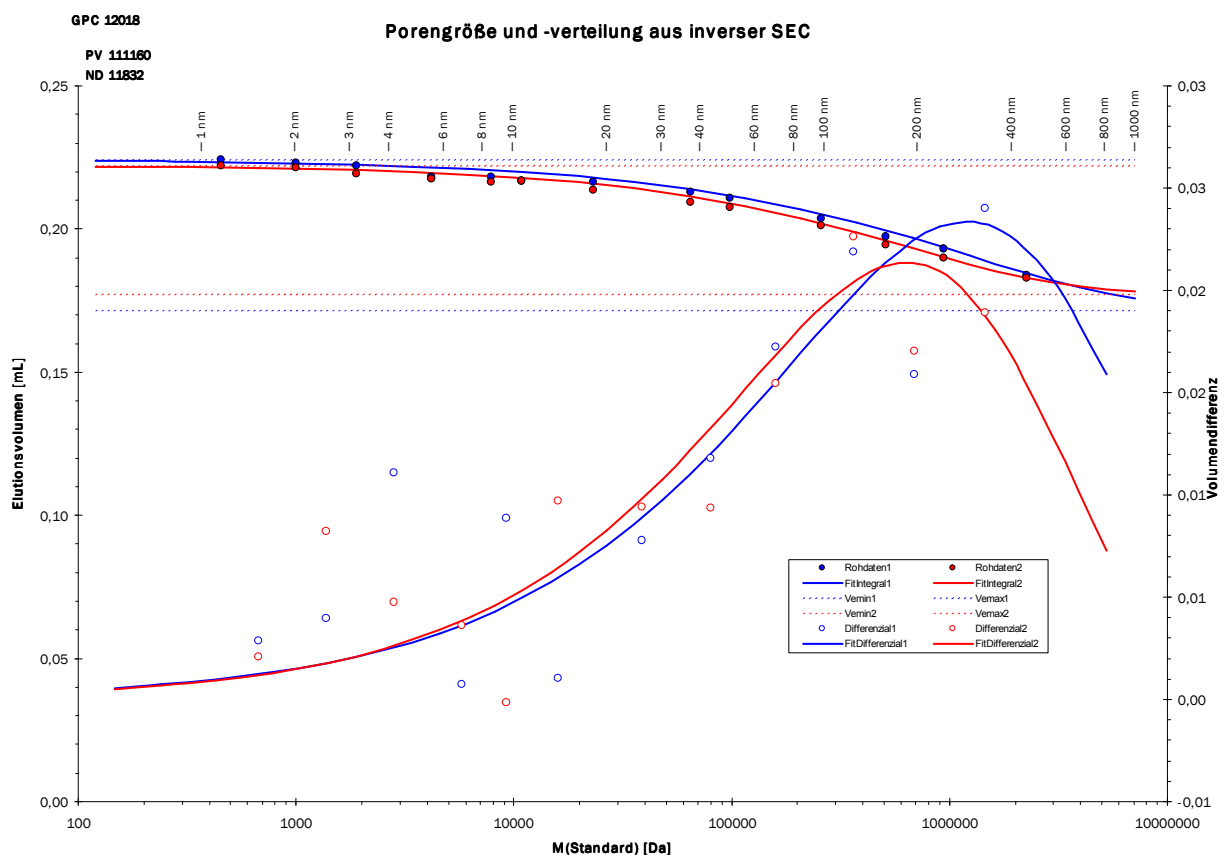


Abb. 12: Porengrößenverteilung von ND 11832

Die Herstellung der Phase wurde in einen größeren Maßstab transferiert. Es wurden 30 g SiMAG/MP-Silanol in einem Ansatz erfolgreich beschichtet und anschließend durch Vernetzung der Polyvinylaminketten auf dem Träger immobilisiert. Das Netzwerk wurde mit dem Liganden Palmoyle Säure und 2-Sulfobenzoesäure derivatisiert. Die Liganden werden über amidische Bindungen an den Aminogruppen des Polymers fixiert. In folgender Abbildung ist die Anbindung der Liganden schematisch dargestellt.

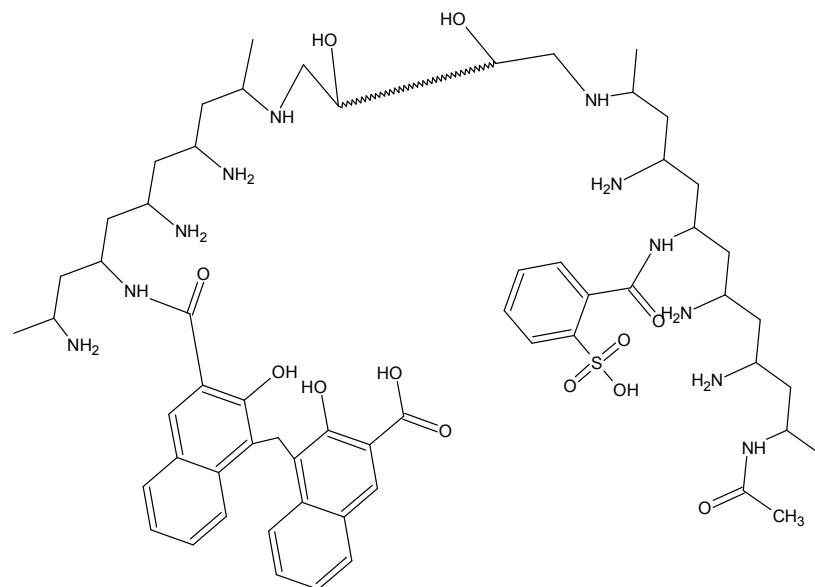


Abb. 13: Schematischer Aufbau des modifizierten Polymernetzwerkes auf InstrAction® Phase ND 11832

Die Derivatisierung durch den stufenweisen Einbau der Liganden lässt sich sehr gut durch die Elementaranalyse der Zwischen- und Endprodukte verfolgen, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind. Die Abweichung der gemessenen Elementgehalte der analogen Herstellung von ND 11824 und ND 11825 sind nicht signifikant, somit ist eine Reproduzierbarkeit der Synthese gewährleistet.

Tab. 5: Elementaranalysen der Zwischen- und Endprodukte auf den Magnetpartikeln

Phase	Phasenaufbau	C-Gehalt		H-Gehalt		N-Gehalt		S-Gehalt	
		[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
ND 11824/1	MBK2000/10-6-PVA-5-EGDGE-PamSr-100	5,58	5,56	1,10	0,98	1,38	1,39	n.d.	n.d.
ND 11825/1	MBK2000/10-6-PVA-5-EGDGE-PamSr-100	5,52	5,56	0,91	0,93	1,41	1,41	n.d.	n.d.
ND 11831/1	MBK2000/10-6-PVA-5-EGDGE-PamSr-100-PhCar2SSr	8,85	8,98	1,22	1,30	1,50	1,49	1,18	1,17
ND 11832/1	MBK2000/10-6-PVA-5-EGDGE-PamSr-100-PhCar2SSr	8,86	8,81	1,27	1,15	1,45	1,46	1,20	1,20
ND 11835/1	MBK2000/10-6-PVA-5-EGDGE-PamSr-100-PhCar2SSr-Ac	9,36	9,30	1,35	1,36	1,58	1,57	1,15	1,14

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass eine Beschichtung von magnetischen Trägern mit der instrAction Technologie möglich ist und die Synthesen dieser Phasen auch skalierbar sind. Die bisherige Chargengröße von 30 g Trägermaterial sollte bei Verfügbarkeit von weiterem Trägermaterial ohne Problem weiter gesteigert werden können.

6.3.2 Bindungsuntersuchungen an den Adsorbentien

6.3.2.1 Erfassung von Adsorption und Elution anhand des Modellsystems XAD-16/CPC mittels UV/Vis- und FTIR-Spektroskopie

Hier werden die im Rahmen der Projektlaufzeit erarbeiteten Methoden zur spektroskopischen Charakterisierung des Bindungsprozesses mittels FTIR-ATR und UV/Vis Spektroskopie anhand des XAD-16/CPC Modellsystems (CPC bindet auf XAD-16 Adsorbentien) vorgestellt. Ziel war es, den vollständigen Reaktionszyklus von der Adsorption bis zur anschließenden Elution exemplarisch sowohl statisch als auch kinetisch zu verfolgen.

6.3.2.1.1 UV/Vis-Spektroskopie

Mit Hilfe der statischen UV/Vis Spektroskopie wurde eine CPC-Lösung (10 g/l CPC in 20 mM Essigsäure mit NaOH auf pH 3,75) einerseits vor und nach Inkubation mit Adsorbentienpartikeln (XAD-16, 200 g/l), des Weiteren nach anschließender Elution mit 50% MeOH von den Adsorbentienpartikeln untersucht, um dadurch auf die generellen Bindungs- und Elutionseigenschaften zu schließen. Durch diese Messungen wird die Umsatzeffizienz (wie viel g Antibiotikum kann pro g Adsorbentienpartikel aus der Startlösung in den Elutionspuffer transferiert werden) der Adsorbentienpartikel beurteilt. Abb. 14 zeigt entsprechende UV/Vis Spektren einer CPC Lösung mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Der schwarze Graph beschreibt die Ausgangslösung (Referenz). Nach Adsorbentieninkubation verringert sich die Extinktion um ca. 90 % von ca. 1.5 OD auf ca. 0.15 OD (roter Graph). Nach anschließender Elution steigt die Extinktion auf ca. 50 % der Startlösung (grüner Graph). Durch diese Messungen wird gezeigt, dass das Ausmaß sowohl der Adsorptionsernte, als auch der anschließenden Elution spektroskopisch quantifiziert werden kann.

Aus der quantitativen Analyse dieser Untersuchungen geht hervor, dass ausgehend von einer Startlösung der relativen Konzentration $0,05 \frac{\text{g CPC}}{\text{g XAD16}}$ die maximale Beladungskapazität der Partikel ca. $0,046 \frac{\text{g CPC}}{\text{g XAD16}}$ beträgt. Wird die anschließende Elution der Antibiotikamoleküle berücksichtigt, dann beläuft sich die Umsatzeffizienz

der Partikel auf $0,0245 \frac{g \text{ CPC}}{g \text{ XAD16}}$. Der verbleibende Anteil CPC wird vermutlich irreversibel an die Rezeptorphase gebunden oder degradiert.

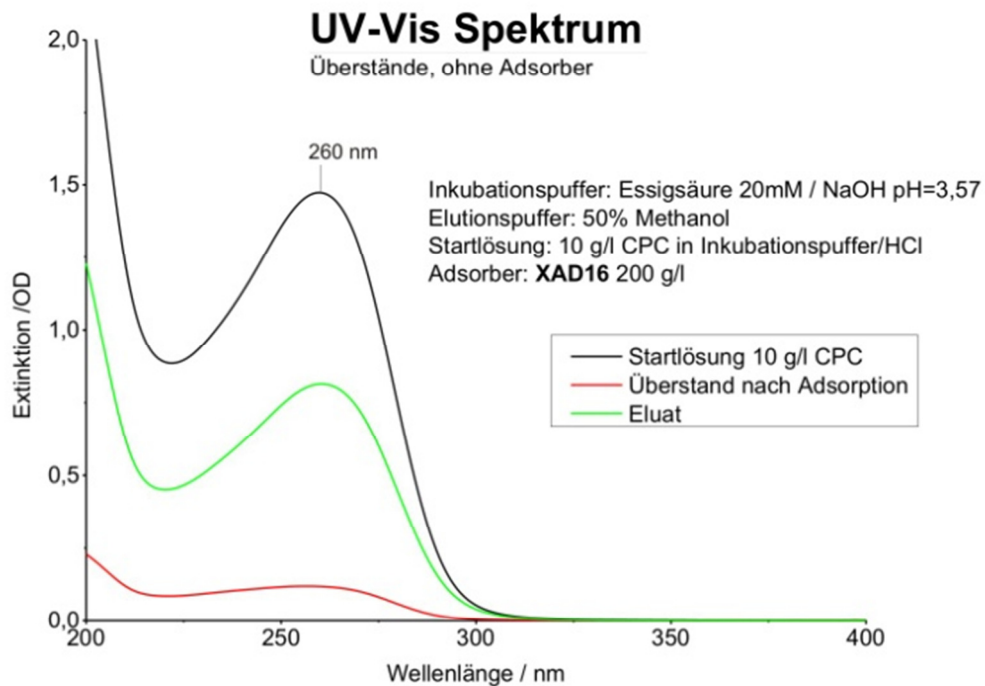


Abb. 14: Statische UV/Vis-Spektren eines Adsorptionsexperimentes mit XAD16 und Cephalosporin C. Der schwarze Graph beschreibt das Spektrum der Startlösung. Nach erfolgter Inkubation sinkt die Absorption bei 260 nm (Absorptionspeak) um 1,35 OD auf OD 0.15 stark ab (roter Graph). Nach anschließender Elution des Antibiotikums von den Partikeln wird eine OD von 0,7 erreicht (grüner Graph).

6.3.2.1.2 FTIR-ATR Spektroskopie

Ausgehend von den Ergebnissen der photometrischen Untersuchungen wurde eine FTIR-ATR spektroskopische Charakterisierung der Adsorberpartikel und der Antibiotikalösung durchgeführt. Durch den Einsatz der Differenzspektroskopie können einzelne Bandenspektren der beteiligten Reaktanden (Lösungsmittel, Adsorberphase, Antibiotikum) gezielt aus dem Summenspektrum eliminiert werden, wodurch das Bandenspektrum einer Spezies spektral isoliert auftritt.

Abb. 15a zeigt ein Differenzspektrum von zuvor in Antibiotikalösung inkubierten Adsorbermolekülen, bei dem die Banden der Adsorbermoleküle subtrahiert wurden,

um auf diese Weise nur noch das Bandenspektrum des auf den Partikeln adsorbierten Antibiotikums (roter Graph) zu sehen. Der schwarze Graph zeigt ein CPC-Referenz-Differenzspektrum (in Lösung). Im direkten Vergleich zum Adsorberpartikel-Differenzspektrum können Banden um 1250 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} und um 1750 cm^{-1} identifiziert werden. Nach anschließender Elution (grüner Graph) mit 50 % MeOH verschwinden die Banden wieder, was eine nahezu vollständige Elution anzeigt. Abb. 15a) demonstriert also die Be- und Entladung der Adsorberpartikel mit CPC.

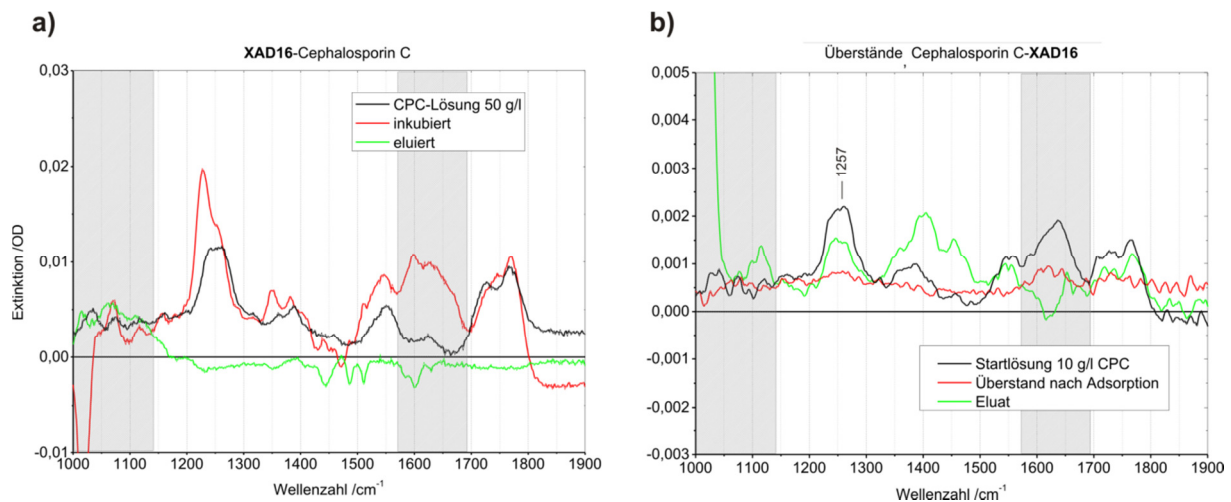


Abb. 15: a) Differenzspektren zu Cephalosporin C auf XAD16 (XAD-16 Spektrum wurde subtrahiert). Zu erkennen ist das CPC-Spektrum auf dem Adsorberpartikel (rot) im Vergleich zum CPC-Spektrum in Lösung (schwarz). Nach der Elution (grün) sind keine Banden des CPC auf den Adsorberpartikeln zu erkennen. b) Differenzspektren von CPC in Lösung (Lösungsmittelbanden subtrahiert). Nach der Adsorption verschwinden die CPC-Banden (rot) im Vergleich zur Startlösung (schwarz). Das Spektrum nach Elution (grün) zeigt charakteristische CPC-Schwindungsbanden.

Abb. 15b) zeigt entsprechende (Differenz-) Spektren der CPC-Pufferlösung (Überstand, die Adsorberpartikel wurden abzentrifugiert), bei der die Beiträge des Lösungspuffers subtrahiert wurden. Nach der Inkubation mit Adsorberpartikeln verschwinden die Antibiotikabanden der Startlösung nahezu vollständig (vgl. roter und schwarzer Graph). Nach anschließender Elution zeigen sich erwartungsgemäß wieder charakteristische CPC-Banden (z.B. bei 1257 cm^{-1}) im Elutionspuffer (grüner Graph). Die daneben beobachteten Unterschiede zwischen anfänglich gelöstem und eluiertem CPC werden einerseits auf erhöhtes Messrauschen (schraffierter Bereich,

Wasserbanden) zurückgeführt, andererseits können zusätzlich eluierte, unbekannte Moleküle nicht ausgeschlossen werden. Eine Degradation des Antibiotikums wird durch die kurze Dauer der Messung und die unveränderte Form der UV/Vis Spektren (siehe Abb. 14) ausgeschlossen. Abb. 15b) demonstriert also komplementär zu Abb. 15a) und analog zu Abb. 14 die quantitative Abnahme (Adsorption) und Zunahme (Elution) von CPC in Lösung.

6.3.2.1.3 Zeitaufgelöste FTIR-Messungen zur Bindungskinetik

Auf Basis der FTIR-ATR Spektroskopie wurden im Rahmen der Projektlaufzeit zwei experimentelle Methoden zur kinetischen Verfolgung des Adsorptionsvorganges entwickelt. Zunächst wird, wieder am Beispiel des Modellsystems XAD-16/CPC, das „online“-Verfahren vorgestellt.

Das FTIR-ATR - „online-Verfahren“ basiert auf der Echtzeit-Verfolgung der Antibiotikakonzentration in Lösung, bei der die direkte Abnahme der Antibiotikamoleküle aus der Pufferlösung in Gegenwart der Adsorberpartikel registriert wird. Dabei wird die Antibiotikalösung direkt auf den ATR-Diamant gebracht, die Reaktion startet bei anschließender Zugabe der Adsorberpartikel. Weiter wird ein speziell hierfür entwickelter Rühraufsatz auf den ATR-Messkopf installiert, um eine kontinuierliche Durchmischung der Probensuspension sicherzustellen (Abb. 16). Der Rührer verfügt über eine Schrittmotorsteuerung, welche das Rührblatt mit einer maximalen Geschwindigkeit von 20 Upm um jeweils 180° dreht. Der Abstand zwischen Rührblatt und ATR-Diamant beträgt ca. 1 mm. Es wurde jeweils über acht Aufnahmen bei einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} pro Messintervall gemittelt, die Zeitauflösung im Experiment lag bei 60 s, die maximale Zeitauflösung bei diesem Verfahren liegt bei ca. 10 s. Für die Auswertung und Analyse der Bindungs- und Elutionskinetik wurde eine Marker-Bande des CPC bei 1257 cm^{-1} herangezogen, aus den DFT Rechnungen geht hervor, dass es sich hierbei um CH_2 Biegeschwingung handelt.

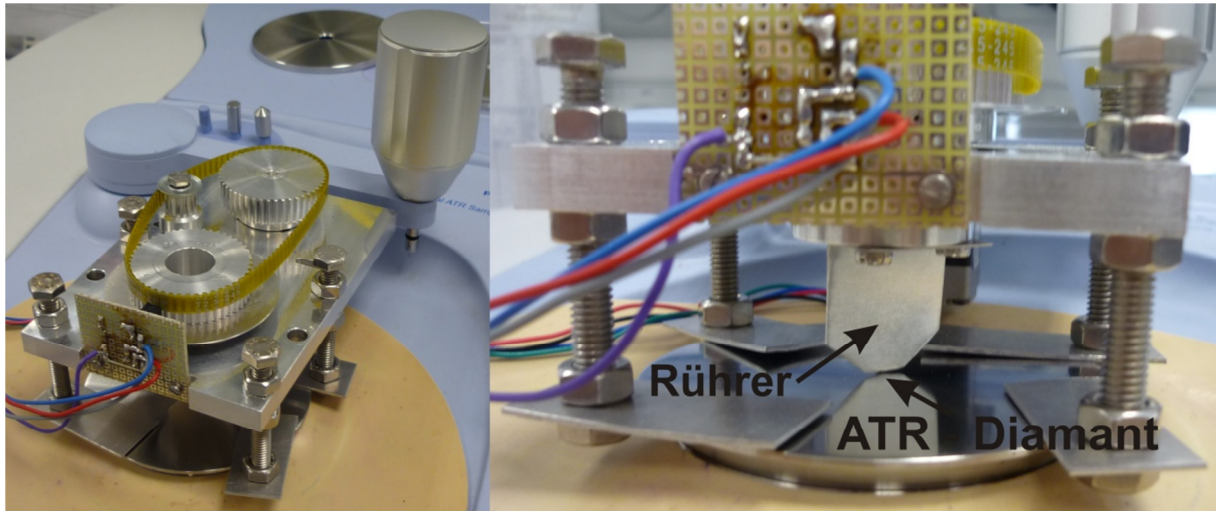
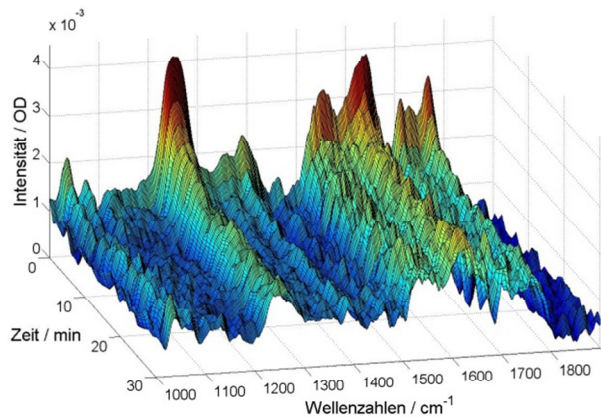


Abb. 16. Experimenteller Aufbau des „online Verfahrens“ zur Analyse der Bindungskinetik. Über dem ATR-Diamanten ist ein elektronisch gesteuerter Rührer angebracht, welcher für eine stetige Probendurchmischung sorgt.

Für die Messungen mit dem „online-Verfahren“ wurde das Antibiotikum CPC zu 20 g/l in einer Pufferlösung mit den Adsorberpartikeln suspendiert.

Von den Spektren wurde das Lösungsmittelspektrum subtrahiert, wodurch nur noch Banden des Antibiotikums erscheinen sollten (bei diesem Verfahren können spektrale Beiträge der be- bzw. unbeladenen Adsorber aufgrund der geringen Konzentration im Bereich des evaneszenten Feldes vernachlässigt werden). Der zeitliche Verlauf der daraus ermittelten Differenzspektren ist in Abb. 17a) für einen Zeitraum von 30 min dargestellt.

a)



b)

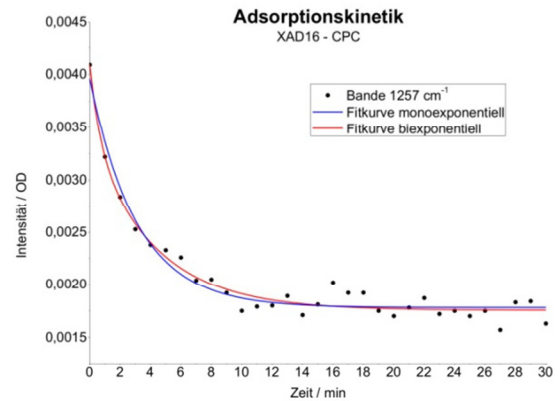


Abb. 17: Zeitaufgelöste Spektren zum Bindungsprozess. a) zeigt die transiente Abnahme der Antibiotikakonzentration in Lösung als Differenzspektrum (Lösungsmittelbanden subtrahiert). In b) ist eine Transiente bei 1257 cm^{-1} gezeigt. Die Messpunkte wurden sowohl mono- als auch biexponentiell gefittet.

Zu erkennen ist eine deutliche Abnahme der jeweiligen Bandenintensitäten vor allem in den ersten zwei Minuten. Auf der Zeitskala von 20 min stellt sich ein stationärer Zustand ein. Dies lässt vermuten, dass nach erfolgreicher Adsorption ein Restbestand an Antibiotikamolekülen in Lösung besteht, und somit die maximale Beladungskapazität der Adsorbermoleküle erreicht ist.

In Abb. 17b) ist eine Transiente der CH_2 Schwingungsmode bei 1257 cm^{-1} dargestellt. Für eine kinetische Analyse wurden die Messpunkte biexponentiell gefittet. Ein monoexponentieller Fit zeigte systematische Abweichungen von den Messpunkten. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in der Literatur beschrieben [6]. Gedeutet wird dies mit einem zweistufigen Reaktionsprozess, und zwar einer schnellen Adsorption auf den Rezeptoroberflächen und einer anschließenden, langsameren Porendiffusion mit Adsorption. Aufgrund der Porosität der Adsorbersubstrate wird die Hypothese für den Adsorptionsprozess auch hier als relevant erachtet. Das biphasische Verhalten bei der Adsorption poröser Adsorberpartikel wurde des Weiteren durch komplementäre UV/Vis-Messungen des Überstandes in Gegenwart der Adsorberpartikel ND 10085 und ND 10322 bestätigt (siehe Zwischenbericht 2011). Hierdurch wird somit demonstriert, wie die Adsorptionskinetik durch die Abnahme des Antibiotikums aus der Lösung spektroskopisch quantitativ analysiert werden kann.

Wie oben erwähnt, wurde eine weitere Methode für zeitaufgelöste Untersuchungen entwickelt („statisches Verfahren“), welche die direkte Anlagerung des Antibiotikums auf den Adsorberpartikeln erfasst. Durch gezieltes Anhalten der Adsorptionsreaktion nach vordefinierten Zeitpunkten werden Messungen zu verschiedenen Inkubationsdauern mit im Vergleich zur "online-Messung" hohen zeitlichen Auflösung und auch größerer Sensitivität möglich, da über eine beliebige Anzahl an Aufnahmen gemittelt werden kann. Die zeitliche Auflösung liegt hier im Sekundenbereich. Eine detaillierte Beschreibung dieses Verfahrens findet sich im Zwischenbericht 2011.

6.3.2.2 Bindungsuntersuchungen an InstrAction Adsorberphasen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analysen zu den Bindungseigenschaften verschiedener InstrAction-Adsorberphasen gegenüber Imipenem tabellarisch vorgestellt. Zunächst wird auf die Ergebnisse zu den Adsorberphasen ND 10322, ND 11491, ND 11835 und CV 11005 eingegangen. Diese Phasen waren gezielt für die Anforderungen in diesem Projekt (selektive Adsorption von Imipenem und anschließende Elution) hergestellt worden.

Bei diesen Proben handelt es sich um Adsorberphasen, die jeweils die gleiche Sorte an Rezeptorgruppen (Palmoylsäure + 2-Sulfobenzoessäure) aufweisen. Alle Adsorberpartikel (außer ND 10322) verfügen über einen Magnetkern, wobei der Magnetkern von ND 11491 sich in seiner Zusammensetzung von denen der Proben ND 11835 und CV 11005 unterscheidet. Bei Probe ND 11835 sind offene Aminogruppen mit Acetylgruppen blockiert (degradationsfördernde Wirkung von Aminogruppen wird vermutet). Angegeben werden die maximale Beladung der Adsorberpartikel mit Imipenemmolekülen und die Umsatzeffizienz, welche die Elution von Imipenem in den Elutionspuffer (50 % MeOH) berücksichtigt (siehe Tab. 6). Dazu wurde Imipenem zu 10 g/l in einem Phosphatpuffer gelöst, die Ausgangskonzentration lag bei $1,5 \frac{\text{g Imipenem}}{\text{g Adsorber}}$.

Tab. 6: Eigenschaften aktueller Adsorberphasen von InstrAction. Die Angabe zur maximalen Beladung bezieht sich auf das Ausmaß der Adsorption nach Inkubation in einer Imipenemlösung. Die Effizienz beschreibt das Transfervermögen von Antibiotikamolekülen zwischen zwei Lösungen.

Probe	Max. Beladung [$\frac{g \text{ Imipenem}}{g \text{ Adsorber}}$]	Umsatzeffizienz [$\frac{g \text{ Imipenem}}{g \text{ Adsorber}}$]	Stabilität Imipenem (Nach Adsorption)
ND 11491	0,15	0,0414	Keine Degradation
ND 11835	0,6	k.A.	Leichte Degradation
ND 10322	0,45	0,13	Keine Degradation
CV 11005	0,28	0,016	Leichte Degradation

Die stärkste Wechselwirkung gegenüber Imipenem mit einer maximalen Beladung von $0,6 \frac{g \text{ Imipenem}}{g \text{ Adsorber}}$ wird bei Phase ND 11835 beobachtet, Elutionsexperimente konnten jedoch bislang nicht durchgeführt werden. Bei dieser Phase besteht der Verdacht, dass die Blockierung der freien Aminogruppen mit Acetylgruppen zur Adsorption beiträgt. Die größte gemessene Umsatzeffizienz von $0,13 \frac{g \text{ Imipenem}}{g \text{ Adsorber}}$ zeigt sich bei Phase ND 10322. Dies ist damit zu begründen, dass hier der Magnetkern fehlt und somit vergleichsweise mehr Rezeptormoleküle pro Adsorbereinwaage bereitstehen. Die Proben ND 11835 und CV 11005 weisen leichte Anzeichen einer degradationsfördernden Wirkung gegenüber gelöstem Imipenem auf (< 5% der Startlösung). In den FTIR-ATR Differenzspektren (Spektrum Adsorber subtrahiert, nicht gezeigt) aller in **Tab. 6** aufgeführter Adsorber konnten nach Inkubation in Imipenemlösung Banden, welche auf das Vorhandensein von Imipenem schließen lassen, mit Signalintensitäten von wenigen milli OD identifiziert werden.

Mit Hilfe der entwickelten spektroskopischen Verfahren ist somit eine genaue Analyse Umsatzeffizienz der InstrAction Adsorberpartikel möglich, zusätzlich können Spuren von Degradation des gelösten Antibiotikums nachgewiesen werden. Es bleibt festzuhalten, dass von den bisher untersuchten Materialien ND 11491 als Phase mit Magnetkern die maximale Umsatzeffizienz bei verschwindender Antibiotikadegradation aufweist, und damit den Projektanforderungen am Nächsten kommt.

Abschließend sind in Tab. 7 die Adsorberphasen aufgeführt (gruppiert nach den Trägermaterialien Silicagel und Polystyrol), die im Rahmen des Projektes der Methodenentwicklung dienten. Die jeweiligen Bemerkungen beschreiben die beobachteten Wechselwirkungen gegenüber Imipenem in Lösung.

Tab. 7: Übersicht über die zur Methodenentwicklung hergestellten Rezeptorphasen der Firma instrAction. Unter Grundsubstanz ist die jeweilige Zusammensetzung des Partikels beschrieben. Unter Bemerkungen werden die Wechselwirkungen gegenüber Imipenem kurz erläutert.

Probenbezeichnung	Grundsubstanz	Bemerkungen
0803	Silicagel (Sg)	Keine Wechselwirkungen
BV 09001	Sg + Polyvinylamin (PvAm)	Wenig Adsorption, Antibiotikum degradiert
ND 09168	Sg + PvAm + Acetylgruppen	Keine Adsorption, Antibiotikum intakt
ND07028	Sg + PvAm + Benzotrinitrilgruppen	Keine Adsorption, Antibiotikum degradiert
ND06134	Sg + PvAm + Dihydroxybenzol	Keine Adsorption, Antibiotikum degradiert
LA 08011	Polystyrol (Ps)	Keine Wechselwirkung
ND 10085	Ps + sulfonierte Aromaten Geringer Derivatisierungsgrad	Irreversible Bindung, Antibiotikum degradiert
ND 09256	Ps + sulfonierte Aromaten Hoher Derivatisierungsgrad	Irreversible Bindung, Antibiotikum degradiert

6.3.2.3 Stabilität der Antibiotika

Zur Optimierung der Adsorptionsparameter ist es notwendig, die Stabilität der Antibiotika bei den verschiedenen Bedingungen, insbesondere pH-Wert und Temperatur, zu kennen. Hierzu wurden Abbaustudien mit den β -Lactam-Antibiotika Imipenem und Cephalosporin C durchgeführt.

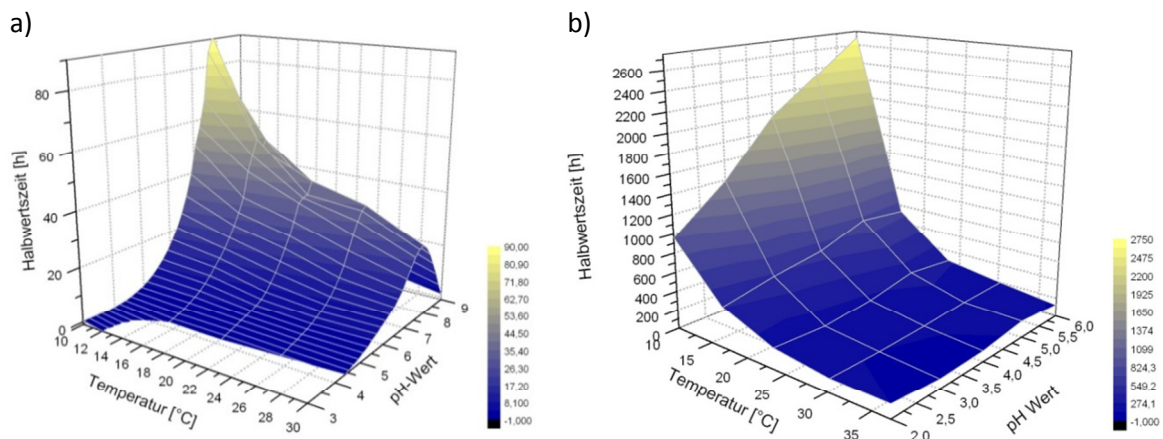


Abb. 18: Abbauntersuchungen von a) Imipenem und b) Cephalosporin C. Aufgetragen sind Temperatur gegen pH-Wert und Halbwertszeit in Stunden.

Aus Abb. 18a) geht hervor, dass der Abbau von Imipenem stark vom pH-Wert abhängig ist und ein pH-Optimum von 7,9 aufweist. Dies entspricht dem isoelektrischen Punkt des Antibiotikums. Für Cephalosporin C ist in dem untersuchten pH-Bereich kein direktes pH-Optimum erkennbar. Die ermittelten Halbwertszeiten nehmen nur zum neutralen Bereich hin leicht zu. Für Cephalosporin C ist in erster Linie die Temperatur entscheidend für den Abbau des Antibiotikums. Eine Adsorption des Imipenems ist im sauren pH-Bereich somit nicht realisierbar, da hier der Abbau zu schnell verläuft. Eine Aufarbeitung sollte demnach eher im alkalischen Milieu stattfinden, womit die Verwendung von schwach basischen Ionenaustauschern entfällt, da diese nur im pH-Bereich von 1-7 einsetzbar sind. Vergleicht man die beiden Antibiotika miteinander, sieht man, dass das Cephalosporin C deutlich stabiler ist und keine der bestimmten Halbwertszeiten unter 100 h liegt. Bei Imipenem stellt sich dies anders dar, hier tritt keine Halbwertszeit oberhalb von 100 h auf. Dieser deutlich schnellere Abbau des Imipenem erschwert

die Suche nach einem Partikelsystem zur Aufreinigung, weshalb zur Untersuchung der kommerziellen Referenzsysteme zunächst CPC verwendet wurde.

6.3.2.4 Kommerzielle Adsorbersysteme

Wie in Kap. 3.1.2. erwähnt, wurden als kommerziell verfügbare Adsorbersysteme für das Modellantibiotikum Cephalosporin C ein aromatischer Adsorber (XAD 4), ein schwacher Ionentauscher (IRA 67), ein starker Ionentauscher (IRA 400) und magnetisierbarer starker Ionentauscher (Orica MIEX) untersucht. Diese Partikel wurden ausgewählt, da sie teilweise bereits in der Literatur für vergleichbare Aufarbeitungswege beschrieben sind [1,2] und auf der instrAction-Phase sowohl aromatische als auch ionische Gruppen zugrunde liegen.

Zunächst wurden zeitliche Untersuchungen der Adsorption durchgeführt (siehe Abb. 22a). Zu sehen ist, dass für die porösen XAD 4 Partikel eine längere Adsorptionszeit benötigt wird als für die Ionentauscher. Dies lässt sich durch die Porendiffusion erklären. Für die beiden Ionentauscher ist kaum ein Unterschied in der Adsorptionszeit zu erkennen. Um für alle Adsorber gleiche Bedingungen zu schaffen, wurde anhand dieser Adsorptionsuntersuchungen über die Zeit eine Verweilzeit der Adsorber in Antibiotikallösung von 60 Minuten festgelegt. Die Elution erfolgt deutlich schneller als die Adsorption (siehe Abb. 22b). Die Ionentauscher sind hier nicht mehr mit XAD 4 vergleichbar, da ein anderes Elutionsmittel eingesetzt wurde. Es ist allerdings festzustellen, dass bei gleichen Eluenten der schwache Ionentauscher längere Elutionszeiten aufweist. Für die nachfolgenden Adsorptionsversuche wurde eine Elutionszeit von 60 Minuten festgelegt. Diese könnte jedoch für eine nahezu vollständige Elution auf 30 Minuten reduziert werden. Für eine Aufarbeitungszeit von 2 h sind Verluste von Cephalosporin C durch Hydrolyse im wässrigen Überstand zu vernachlässigen, für diesen Zeitraum wurde ein Abbau von $< 0,5\%$ bestimmt.

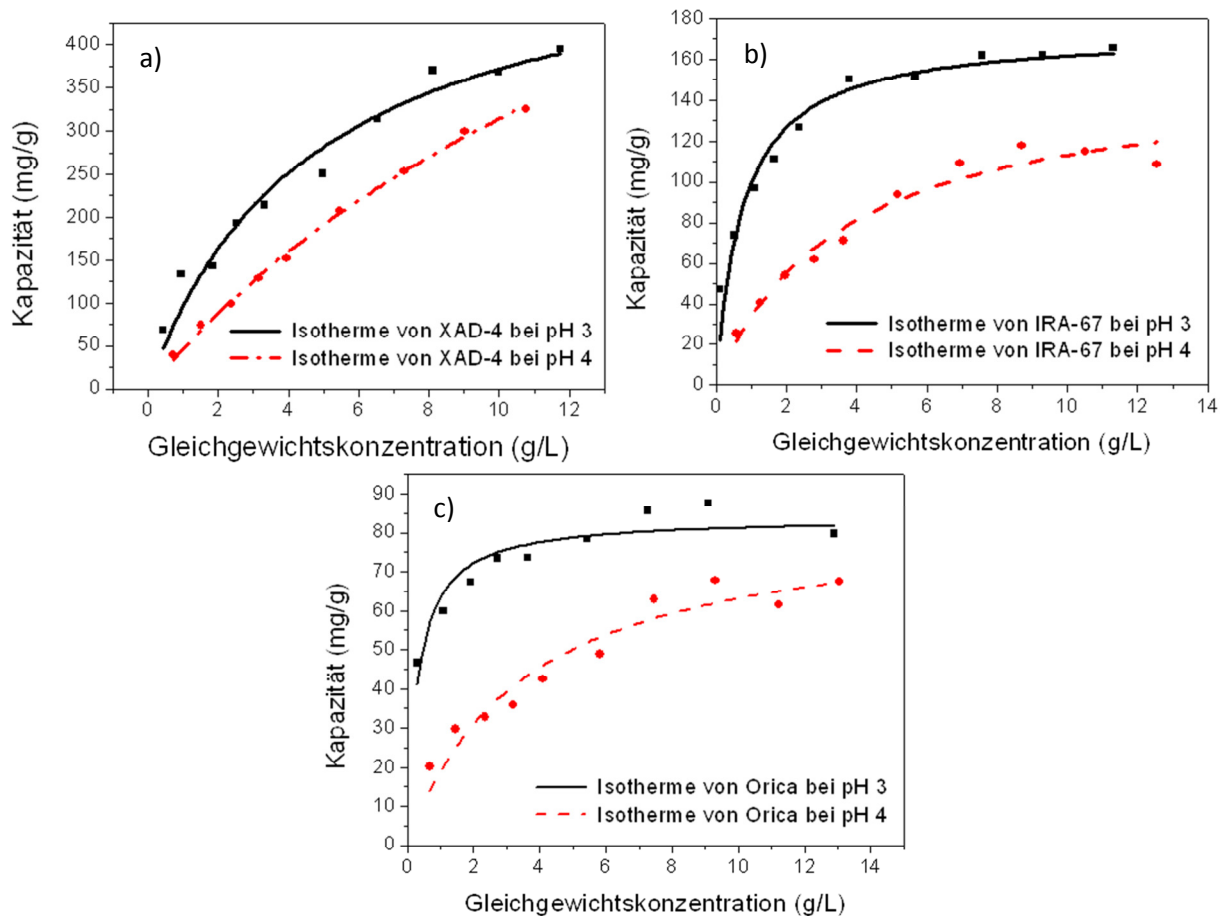


Abb. 19: Adsorptionsisothermen von CPC auf kommerzieller Partikelsystemen im 0,1 M Natriumacetat/NaOH Puffer bei 25°C, pH 3 und pH 4; a) XAD-4; b) IRA-67; c) MIEX Orica.

Unter Anwendung der genannten Adsorptions- und Elutionszeiten wurden Adsorptionsisothermen bei 25°C und verschiedenen pH-Werten aufgenommen. In Abb. 19 sind die Adsorptionsisothermen für XAD 4 bei pH 3 und pH 4 dargestellt. Der Verlauf der Messpunkte kann mit einer Langmuir-Isothermen beschrieben werden. Da es sich bei XAD 4 um einen unpolaren Adsorber handelt, sind die größten Maximalbeladungen in der Nähe des isoelektrischen Punkts (IEP) der zu adsorbierenden Moleküle zu erwarten. Dies erklärt die geringeren Beladungen an Cephalosporin C bei pH 4 im Vergleich zu pH 3 (siehe Abb. 19a) da dieses Antibiotikum einen IEP von 2,7 besitzt. Für die Ionentauscher konnte nur ein geringer Unterschied in den Beladungen bei verschiedenen pH-Werten festgestellt werden. XAD 4 zeigt die größte Beladung, was auf die große Oberfläche dieses Adsorbers und die Porosität zurückzuführen ist. Unter Betrachtung der Beladungen q_m in Bezug

auf die Oberfläche ist der schwache Ionentauscher deutlich effizienter als der unpolare Adsorber. Für die Separation der zukünftigen magnetisierbaren selektiven Adsorber im HGMS werden Partikeldurchmesser von etwa 1 μm benötigt. Durch die Derivatisierung der Partikeloberfläche kann es dazu kommen, dass die Partikelporen kleiner werden bis hin zu einer nanoporösen Oberfläche. Aus diesem Grund ist eine Betrachtung der Adsorption bezogen auf die Fläche des Adsorbers hier sinnvoll. Diese wurden im Rahmen von BET-Messungen für alle eingesetzten Adsorber bestimmt. Die Werte für q_m sind Tab. 8 zu entnehmen.

Tab. 8: Messdaten der spezifischen Oberflächen verschiedenen Adsorber, sowie daraus berechnete Maximalbeladung q_m in Bezug auf die Adsorberoberfläche:

Proben	spez. Oberfläche [m^2/g]	q_m		
		[mg/g]	[mg/m^2]	
XAD-4	851,32	<i>pH 3</i>	545	0,64
		<i>pH 4</i>	325	0,38
IRA-67	0,72	<i>pH 3</i>	174	241,77
		<i>pH 4</i>	153	213,12
MIEX	4,88	<i>pH 3</i>	84	17,18
		<i>pH 4</i>	85	17,41
instrAction ND10322	99,28	<i>pH 3</i>	51	0,51
		<i>pH 4</i>	29	0,29

Die Elution des β -Lactam-Antibiotikums konnte von den XAD Adsorbern mit > 90 % Wiederfindung durchgeführt werden. Die Ionentauscher zeigen hingegen Elutionen zwischen 60 % und 80 %. Eine Reduktion des Methanols bei der Elution von XAD 4 wäre z.B. denkbar und im Hinblick auf eine Einsparung an Lösungsmittel wünschenswert.

Die Experimente der Adsorptionsisothermen von CPC auf verschiedenen Adsorbern im Puffer wurden für eine Adsorption aus dem Fermentationsmedium bei pH 3 übertragen. Die Adsorptionsisothermen im Fermentationsmedium sind in Abb. 20 dargestellt und wurden mit den Ergebnissen im Puffersystem verglichen. Die Adsorptionsaffinität von CPC nimmt für alle Adsorber im Fermentationsmedium für kleine Konzentrationen ab.

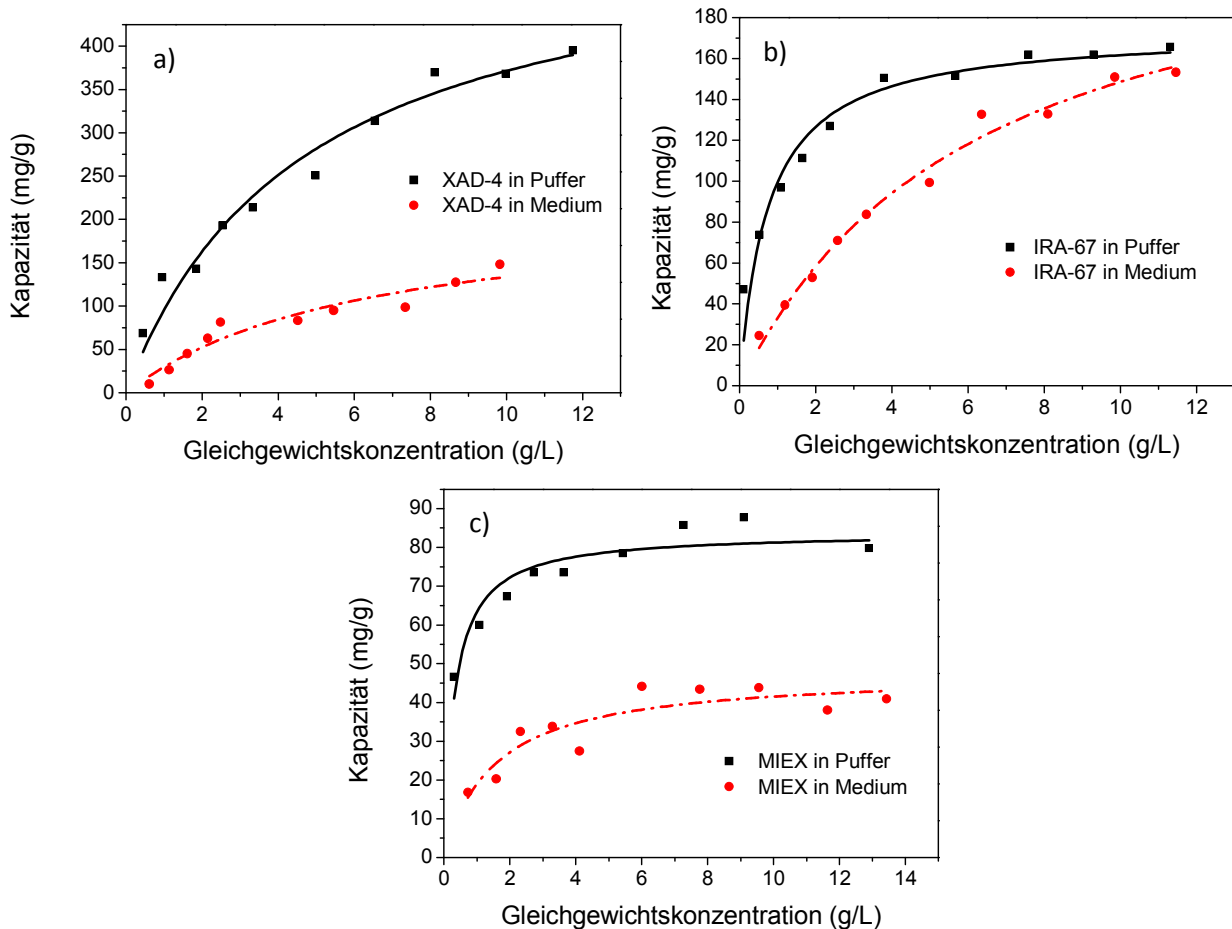


Abb. 20: Vergleich der Adsorptionsisothermen von CPC auf verschiedenen Adsorbentien in 0,1 M Natriumacetate / NaOH Puffer und Fermentationsmedium bei 25°C und pH 3, a) Adsorptionsisotherme von XAD-4; b) Adsorptionsisotherme von IRA-67; c) Adsorptionsisotherme von MIEX;

Die massenspezifische Maximalbeladung q_m im Medium von XAD-4 und den starken Ionentauschern (Orica) reduziert sich um 50 %, die Maximalbeladung des schwachen Ionentauchers allerdings erreicht bei hohen CPC-Konzentrationen gleiche Werte wie im Puffersystem.

Für Imipenem wurden ebenfalls verschiedene Referenzsysteme getestet. Eine Adsorption auf schwachen Ionentauschern (IRA 67) ist nicht möglich, da das Imipenem bei pH-Werten unter sieben zu instabil ist (siehe Kap. 6.3.2.3). Eine Adsorption auf IRA 400 wurde für verschiedene pH-Werte (7, 8, 9) untersucht. Eine Adsorption bei Raumtemperatur war dabei kaum möglich. Bei einer Adsorptionstemperatur von 10 °C konnten folgende Adsorptionsisothermen aufgenommen werden.

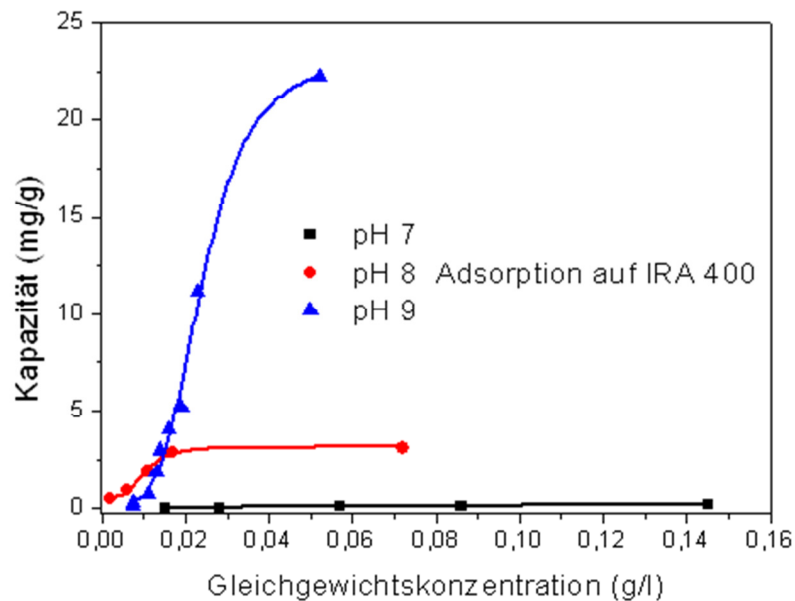


Abb. 21: Adsorption von Imipenem auf dem kommerziellen Adsorber IRA 400 Adsorptionstemperatur $T=10^{\circ}\text{C}$.

Bei pH 7 wurde eine maximale Kapazität von 0,45 mg/g bei pH 8 3,3 mg/g und bei pH 9 von 24,7 mg/g erreicht. Eine weitere Erhöhung des pH-Werte ist nicht empfehlenswert, da hier das Imipenem wiederum zu instabil wird. Als weiterer Adsorber wurde XAD 4 bei Raumtemperatur (25°C) untersucht, der Maximalbeladungen von 4 mg/g erreichte. Eine Aufarbeitung des Imipenem mit kommerziellen Adsorbentien im Vergleich zu CPC ist aufgrund der hohen Instabilität des Imipenems nur mit hohem energetischen Aufwand (Kühlung auf unter 10°C) und Korrekturmittelaufwand (Einstellen des pH-Wertes) möglich.

6.3.2.5 Vergleich kommerzielle Systeme und instrAction – Phasen

Die von der instrAction GmbH zur Verfügung gestellten Adsorberphasen sind zwar nicht auf das beta-Lactam Cephalosporin C hin optimiert, sollten aber aufgrund ihrer aromatischen und ionischen Oberfläche ebenfalls eine Adsorption dieses, Imipenem strukturell sehr ähnlichen, Antibiotikums zeigen. Wie auch bei den kommerziellen Adsorbentien wurde hier eine Studie der Adsorption über die Zeit durchgeführt. In Abb. 22 sind alle Ergebnisse zusammengefasst.

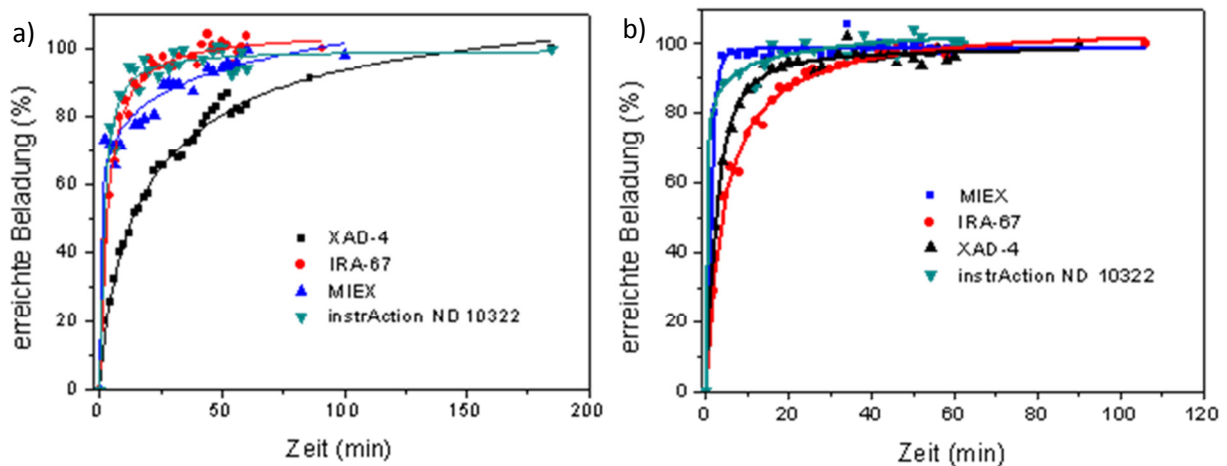


Abb. 22: Zeitabhängiger Verlauf der a) Adsorberbeladung und b) Desorption

Die zeitabhängige Adsorption kann mit der Lagergren-Gleichung (pseudo erster Ordnung) modelliert werden:

$$\log(q_m - q) = \log(q_m) - \left(\frac{k_{Ads}}{2,303}\right) \cdot t \quad (6)$$

Tab. 9 zeigt die resultierenden Geschwindigkeitskonstanten für Adsorption k_{Ads} und Desorption k_{Des} . Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die instrAction-Adsorberphasen die schnellste Adsorption und eine schnelle Desorption aufweisen. Die Inkubationszeit von 60 Minuten für Adsorption und Elution kann somit im Rahmen einer Optimierung des Prozesses deutlich verringert werden.

Tab. 9: Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption und Desorption eingesetzter Adsorbersysteme und Cephalosporin C:

Adsorber	k_{Ads} (min^{-1})	k_{Des} (min^{-1})
XAD-4	0,035	0,153
IRA-67	0,126	0,084
MIEX	0,065	0,561
instrAction ND10322	0,126	0,239

In Abb. 23 sind die Adsorptionsisothermen für die instrAction Adsorberphasen bei pH 3 und pH 4 zu sehen. Es werden im Vergleich zu den kommerziellen Adsorbentien geringere Beladungen erreicht, die Affinität des Antibiotikums zum Adsorbent ist jedoch erhöht, da die maximale Beladung bereits bei geringen Konzentrationen erreicht werden kann.

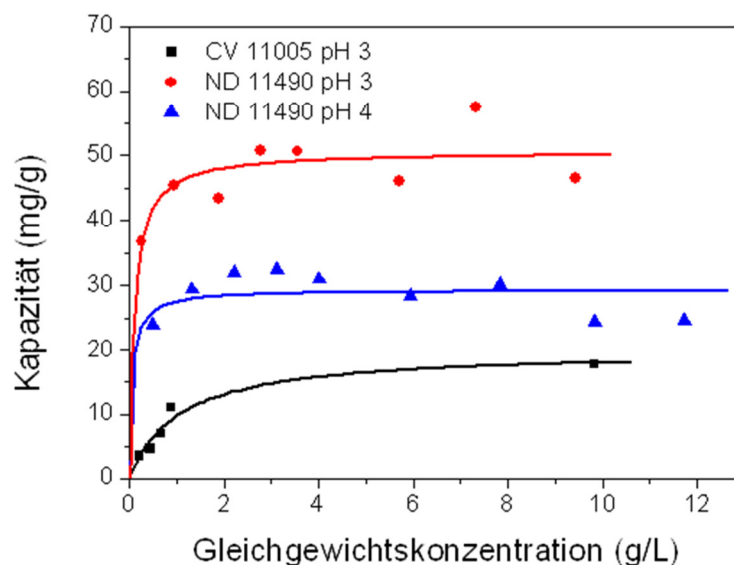


Abb. 23: Cephalosporin C auf instrAction-Phasen.

Ein weiterer Vorteil der instrAction-Phase gegenüber vielen kommerziellen Systemen ist das Verhalten im Fermentationsmedium. Wie bereits bei den schwachen Ionenaustauschern ist auch hier zunächst die Affinität im geringen Konzentrationsbereich reduziert, die maximale Beladung erreicht jedoch vergleichbare Werte wie im Puffersystem (siehe Abb. 24).

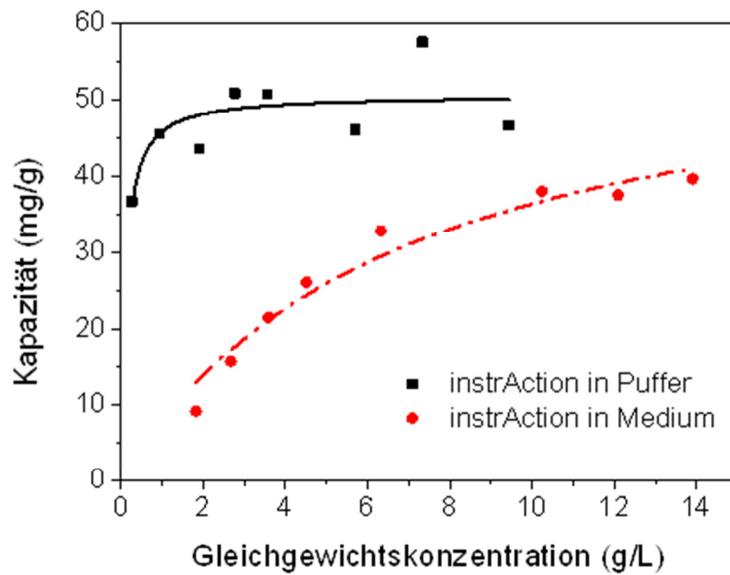


Abb. 24: Adsorption von Cephalosporin C auf InstrAction-Partikel, Vergleich der Adsorption im Puffer und realen Fermentationsmedium .

Das Fermentationsmedium für Lactam-Antibiotika besitzt einen pH-Wert von etwa 7,5 bei dem jedoch keine Wechselwirkung der Phase mit dem Modellantibiotikum CPC nachgewiesen werden konnte. Für eine Aufarbeitung von CPC mit diesem Adsorber, der nicht speziell für dieses Molekül ausgelegt ist, wäre demnach ein Einstellen des pHs vor der Adsorption notwendig. Für Imipenem ist dies nicht der Fall. Das Antibiotikum ist im Fermentationsbereich am stabilsten und die Aufarbeitung sollte auch in diesem Bereich stattfinden.

Abb. 25 zeigt die Adsorptionsisotherme von Imipenem auf der Adsorberphase ND11490, CV11005 und ND11835 (die Erklärung zu den Adsorbernummierungen ist Kap. 6.2.3 zu entnehmen). Die Adsorption ist bei Raumtemperatur ($T=25\text{ °C}$) und einem pH von 7,5 durchgeführt worden. Keiner der untersuchten kommerziellen Adsorber war in der Lage bei diesen Bedingungen eine signifikante Adsorption zu zeigen. Durch das Aufbringen des Adsorberpolymers auf magnetische Silica-Partikel sinkt die maximale Beladung der Adsorber pro Gramm Partikel.

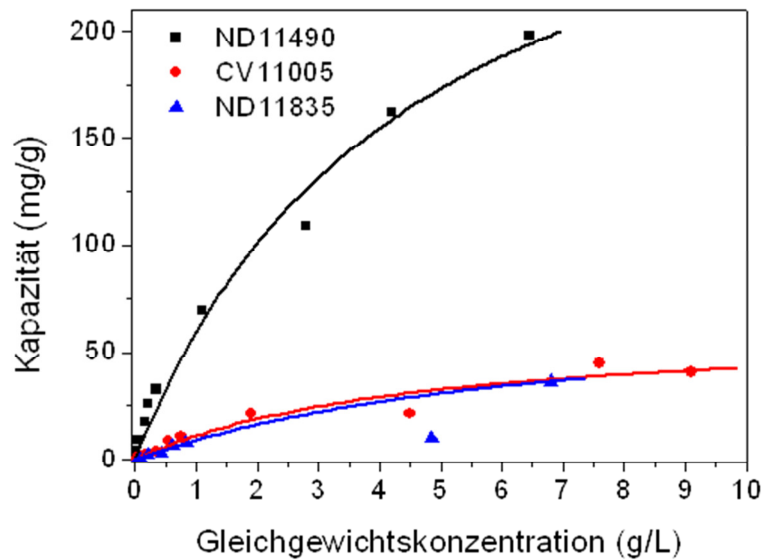


Abb. 25: Adsorptionsisothermen Imipenem auf magnetischen und unmagnetischen Adsorberphasen

Ein weiteres Problem, das sich im Laufe des Projektes ergab, war eine durch die Adsorber beschleunigte Degradation des Antibiotikums. Dies konnte unter Einsatz von HPLC-Analytik beobachtet werden, da in den Chromatogrammen nach der Adsorption zusätzliche Banden (5,7; 8,3 und 10,5 min), die auf die Entstehung von Abbauprodukten hindeuten, erschienen. Ein solches Beispielchromatogramm ist in Abb. 26 dargestellt.

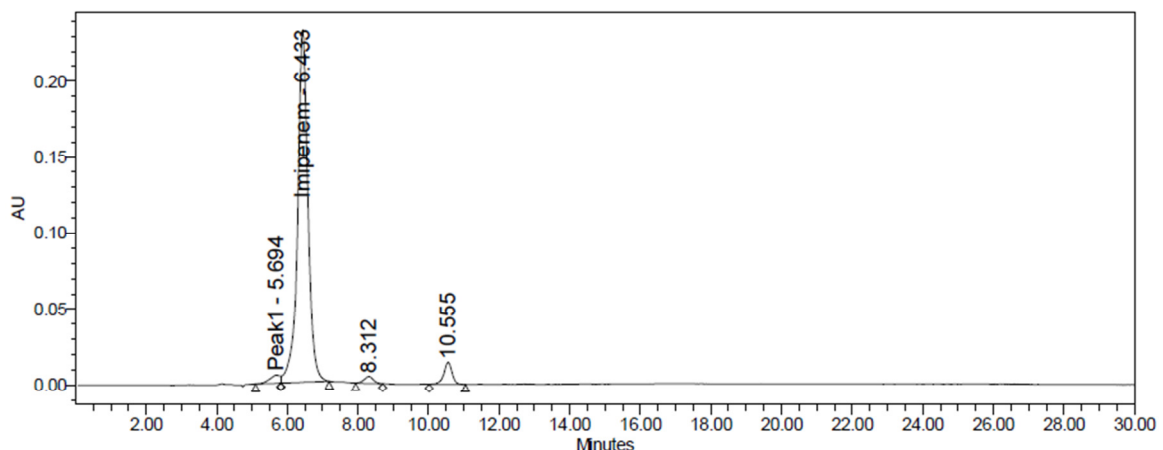


Abb. 26: Chromatogramm des Überstandes nach der Inkubation des instrAction-Adsorbers in Imipenemlösung

Da die Entstehung der Abbauprodukte kontinuierlich erfolgt kann das Erreichen des Gleichgewichtes der Adsorption nicht eindeutig ermittelt werden und eine Darstellung

der Adsorption des Imipenem auf den instrAction-Phasen über die Zeit, wie in Abb. 22, ist somit nicht möglich. In folgenden Versuchen wurde die Abnahme der Imipenemkonzentration bei Inkubation mit dem Adsorber über einen Zeitraum von 4 h mittels HPLC untersucht und parallel die Entstehung der Abbauprodukte verfolgt (siehe Abb. 27).

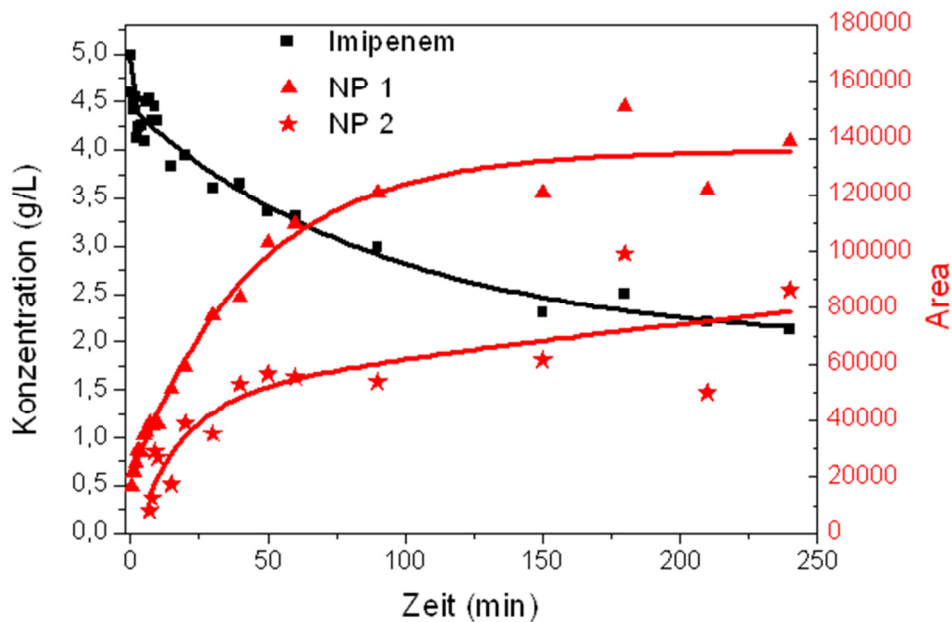


Abb. 27: Abnahme des Imipenems im Überstand während der Adsorption und Entstehung von Nebenprodukten. NP = Abbauprodukte.

Die Konzentration des Imipenems nimmt bereits rapide in den ersten 2 Minuten linear ab und geht dann in eine exponentielle Abnahme über, die mit dem Verlauf der Entstehung der Abbauprodukte (NP1 und NP2) angenähert werden kann. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Adsorption in dieser Phase bereits fast vollständig abgeschlossen ist. Dies deutet auf eine gesteigerte Affinität der Adsorber zum Antibiotikum hin und bestätigt somit die Beobachtung aus Abb. 22 und übertrifft sogar die Absorptionsgeschwindigkeit des CPC auf ND11490.

Die genaue Menge an entstandenem Nebenprodukt kann anhand obiger Messungen nicht ermittelt werden, da keine Standards der Abbauprodukte zur Verfügung stehen und die Nebenprodukte ihr Absorptionsmaximum nicht wie Imipenem bei 300 nm sondern bei 311 nm und 289 nm haben. Allerdings kann die zeitliche Entwicklung des Produktabbaus beobachtet werden. Das Abbauprodukt bei 8,3 min Retentionszeit (NP2) ist ein Abbauprodukt, das auch bei einfacher Inkubation des

Antibiotikums in Adsorptionspuffer, jedoch mit geringerer Entstehungsrate, auftritt; das Abbauprodukt bei 10,3 min (NP1) hingegen entsteht nur bei der Inkubation mit dem Adsorber. Es muss sich hierbei demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Degradation handeln die durch den Adsorber katalysiert wird. Durch eine Maskierung der Aminogruppen auf der Adsorberoberfläche soll die Degradation des Zielmoleküls minimiert werden.

In einer weiteren Partikelcharge (ND11835) wurden die restlichen Aminogruppen auf der Adsorberoberfläche durch Acetylierung blockiert. Die Acetylierung der Aminogruppen beeinträchtigt die Absorption des Antibiotikums nicht, wie anhand der Adsorptionsisothermen in Abb. 25 zu sehen ist. Die Aminogruppen scheinen im Fall von Imipenem an der Wechselwirkung zwischen Adsorber und Zielmolekül nicht beteiligt zu sein. Anschließend wurde die Entstehung der Abbauprodukte in Gegenwart der Partikel ND11835 (acetyliert) und CV11005 (nicht acetyliert) miteinander verglichen. Beide Verläufe der Abbauprodukte NP1 und NP2 sind für die Partikelsysteme ND11835 und CV11005 annähernd deckungsgleich.

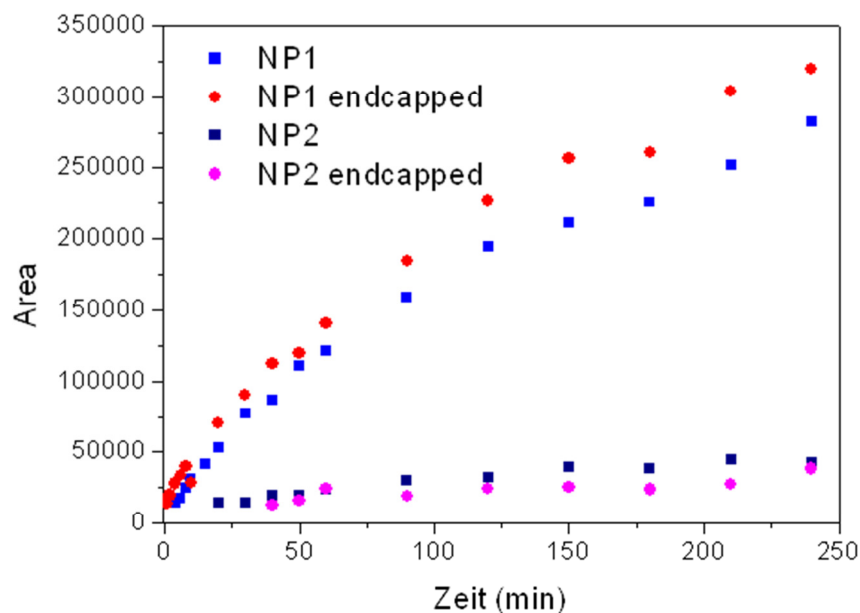


Abb. 28: Entstehung der Abbauprodukte während der Inkubation des instrAction-Adsorbers in einer Imipenem-Lösung. Als Vergleich zwischen den Adsorbentien mit und ohne Acetylierung der Aminogruppen.

Die Acetylierung der Aminogruppen kann den Abbau des Antibiotikums nicht verringern und kann somit als zusätzlichen Syntheseschritt entfallen. Da die

Aminogruppen nicht für den beschleunigten Abbau des Antibiotikums verantwortlich sind, kann nur eine der funktionellen Gruppen auf der Adsorberoberfläche zu dem gesteigerten Abbau führen. Um den Abbau des Antibiotikums einer funktionellen Gruppe zuordnen zu können, sollten im Projektverlauf die Abbauprodukte identifiziert werden.

Neben der Adsorption wurde auch das Eluat mittels HPLC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Imipenem von den Adsorbentien eluiert werden kann, allerdings sind auch im Eluat die durch den Adsorber entstandenen Abbauprodukte zu sehen. Neben den beiden Abbauprodukten NP1 (RT 9,7) und NP2 (RT 8,5), die während der Adsorption beobachtet wurden, erscheinen im Überstand nach der Elution mit 1 M NaOAc / Ethanol / H₂O auch höhermolekulare Di- und Trimere des Imipenems. Mit Hilfe von HPLC-MS konnten einige Abbauprodukte identifiziert werden. Bei NP1 und den Abbauprodukten ab einer Retentionszeit von 13 min handelt es sich wahrscheinlich um Dimere oder sogar Trimere des Imipenems. Deren Entstehung ist säurekatalysiert und durchläuft verschiedene Stufen, wie den Untersuchungen von Smith et al. [7] zu entnehmen ist. Des Weiteren konnte noch das Abbauprodukt bei einer Retentionszeit von 6,4 min identifiziert werden (siehe Abb. 29), welches ebenfalls bereits durch Smith et al. [7] beschrieben ist. Die Abbauprodukte deuten demnach auf eine säurekatalysierte Degradation des Imipenems hin. Aus den Studien des Abbauverhaltens von Imipenem bei verschiedenen pH-Werten (siehe Kap. 6.3.2.2) ist bereits die schnelle Degradation des Antibiotikums im sauren pH-Bereich bekannt und in Verbindung mit den Ergebnissen aus den HPLC-MS Messungen wurden die auf der Oberfläche befindlichen Sulfonsäuregruppen für die beschleunigte Degradation in Betracht gezogen. Die Inkubation des Imipenem in einer Sulfonsäurelösung bestätigt diese Vermutung. Die Abbauprodukte beider Chromatogramme stimmen überein, wie Abb. 29 zu entnehmen ist.

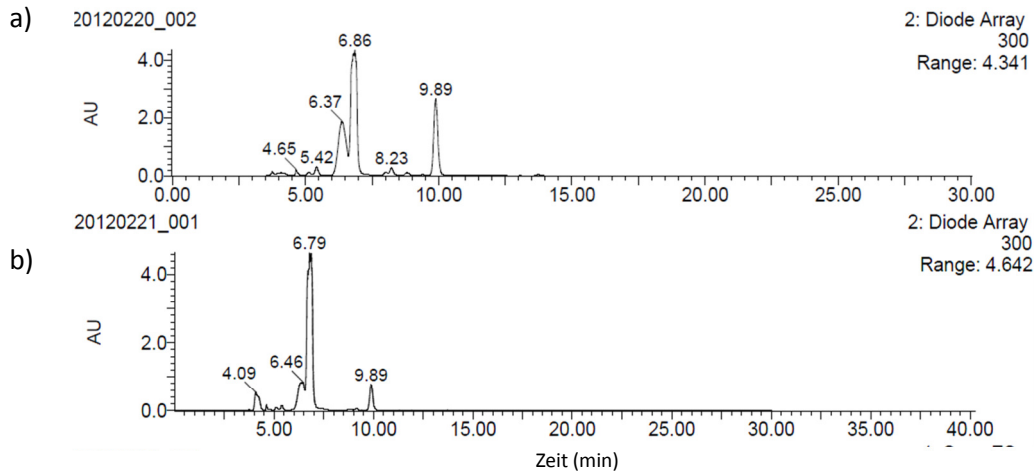


Abb. 29: Chromatogramm von Imipenem und den entstandenen Abbauprodukten a) nach Adsorption mit einer Reaktionszeit von 2 h und b) nach Inkubation für 4h in einer TSS-Lösung (pH 7).

Eine neue Partikelcharge (ND12195) ohne Sulfonsäuregruppen wurde hergestellt und mit der Adsorptionsisotherme von CV11005 verglichen. Die neue Partikelcharge zeigte deutlich geringere Kapazität als die Phase CV11005. Außerdem wird die Löslichkeit der magnetischen Partikel in Wasser herabgesetzt, was den späteren Einsatz in der Reaktorkaskade (siehe Kap.6.3.3.9) unmöglich macht, da die Partikel an der Reaktorwand adsorbiert wären und nicht mittels HGMS separiert werden könnten. Eine Eliminierung dieser funktionellen Gruppe um die Degradation des Antibiotikums zu verringern, muss aus diesen Gründen ausgeschlossen werden. Um die Partikelcharge CV11005 dennoch verwenden zu können wurde in den folgenden Versuchen die Adsorptions- und Elutionszeit auf 10 min reduziert.

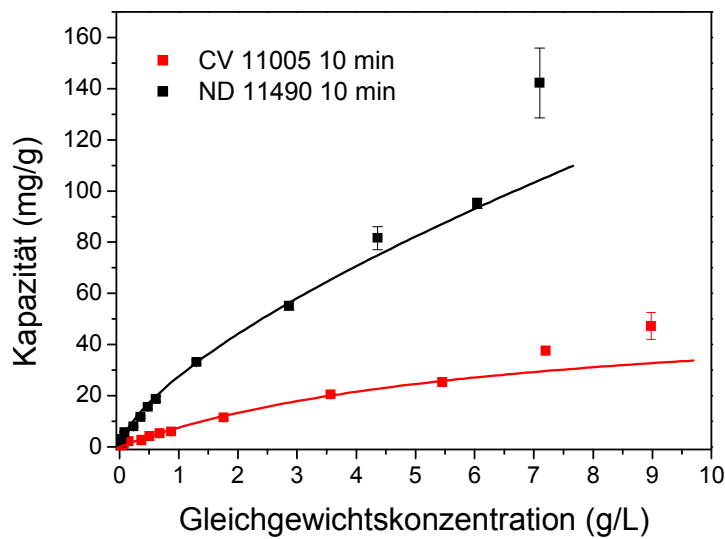


Abb. 30: Adsorption von Imipenem auf ND 11490 und CV 11005 mit einer Reaktionszeit von 10 Minuten

Die Kapazitäten variieren nur leicht verglichen mit den Isothermen bei einer Reaktionszeit von 60 Minuten (vergleiche Abb. 25 mit Abb. 30). Die Spektren des Mediumüberstands nach der Adsorption zeigen jedoch deutlich weniger, bis keine Abbauprodukte, so dass die Adsorption aus dem realen Fermentationsmedium nun mit diesen Versuchsparametern durchgeführt werden kann.

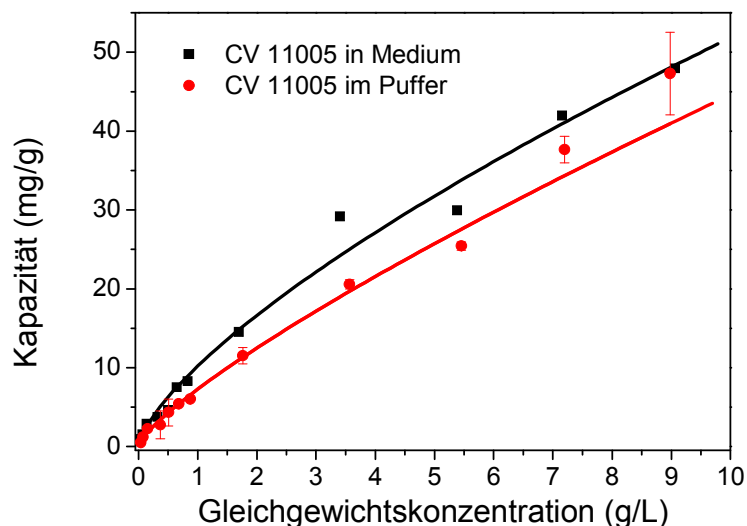


Abb. 31: Vergleich der Adsorption von Imipenem auf CV 11005 im Puffer und im Medium mit einer Reaktionszeit von 10 Minuten.

Bei der Aufnahme der Isothermen im Fermentationsmedium konnte kaum ein Einfluss des Mediums auf die Adsorptionskapazität beobachtet werden. Dies lässt erneut auf eine sehr hohe Affinität des Moleküls zur Adsorberoberfläche schließen und ist mit keinem der unspezifischen kommerziellen Systeme zu vergleichen.

6.3.2.6 Wiederverwertbarkeit der instrAction-Adsorber

Nachdem sowohl für Cephalosporin C als auch für Imipenem die Adsorptionsbedingungen optimiert wurden, konnte eine Studie der Wiederverwertbarkeit der Adsorber durchgeführt werden. Für Cephalosporin C nimmt die Adsorptionskapazität der Adsorber ab dem zweiten Einsatz auf 80 % ab und wird bei einer Kapazität zwischen 75 und 80 % über einen Zeitraum von 13 Zyklen konstant (siehe Abb. 32). Die Elution erfolgt nach der ersten Nutzung zu 70 % im Folgenden nimmt sie jedoch Werte von etwa 90 % des adsorbierten Antibiotikums an.

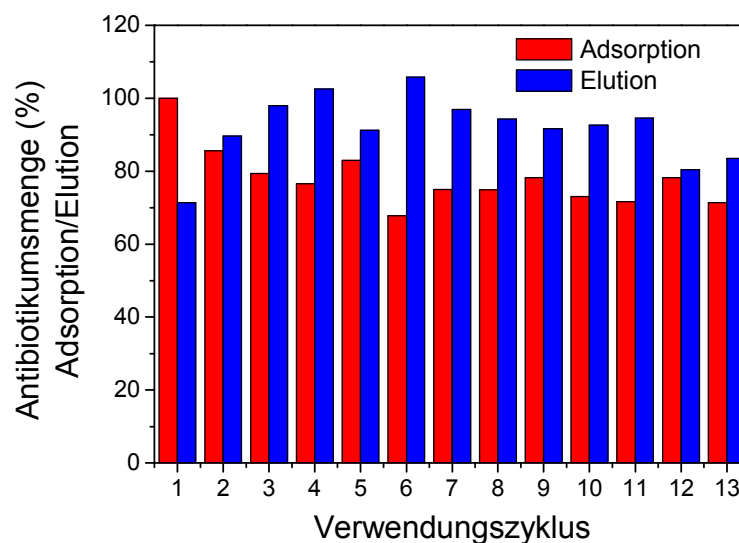


Abb. 32: Adsorption und Elution von Cephalosporin C auf ND11490 in mehreren Zyklen, CPC in Pufferlösung

Im Fall von Imipenem nimmt die Kapazität des Adsorbers beim zweiten Einsatz auf 45 % der Ausgangskapazität ab, bleibt anschließend bei einem Wert zwischen 45 und 50 % konstant. Die zerstörungsfreie Elution des Imipenem von der Adsorberoberfläche stellt weiterhin ein Problem dar. Nach dem ersten

Adsorptionsschritt ist lediglich eine Elution von 23 % des adsorbierten Imipenems möglich (siehe Abb. 33), ab der zweiten Elution, bricht die Ausbeute deutlich ein und die Wiederfindung des Imipenems beträgt nur noch 10 %. Die Wiederverwertbarkeit des Adsorbers ist mit einer Kapazität von etwa 50 % des Ausgangswertes gegeben, die Elution des Antibiotikum bedarf allerdings weiterer Optimierung.

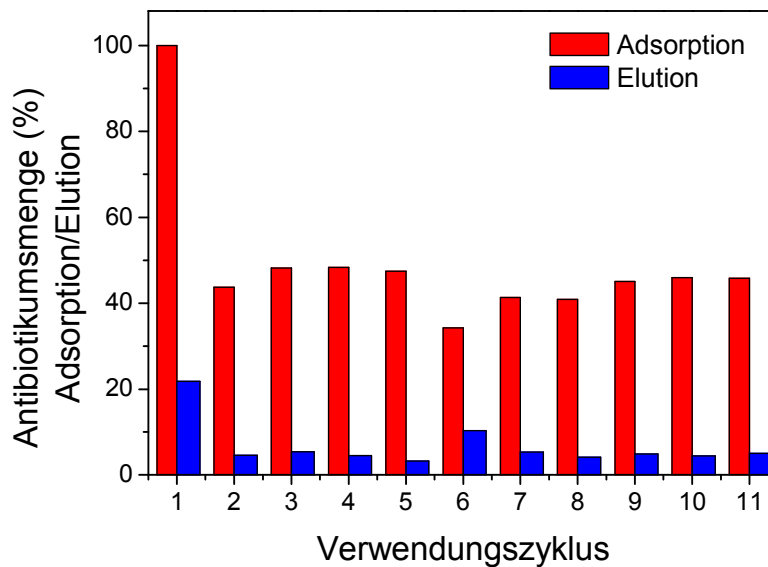


Abb. 33: Adsorption und Elution von Imipenem auf CV11005 in mehreren Zyklen, Imipenem in Pufferlösung.

6.3.3 Abtrennbarkeit von Magnetpartikeln aus der Antibiotika-fermentation

6.3.3.1 Messmethode zur direkten optischen Beobachtung der Anlagerungszonen der magnetischen Mikrosorbentien im HGMS-Filter unter Wirkung des äußeren Magnetfelds

In der ersten Phase der durchgeführten Arbeiten wurde am Umwelt-Campus Birkenfeld der FH Trier eine Versuchsanlage geplant und aufgebaut, mit der eine direkte optische Bestimmung der Anlagerungszonen der Magnetpartikel in der Filterkammer unter Verwendung eines Boroskops und einer daran angeschlossenen CCD-Kamera erfolgen kann. Es gelang damit die weltweit erstmalige Visualisierung der Anlagerungszonen in einem HGMS-System während des Filtrationsvorgangs.

Mit Hilfe des Boroskops können während der Magnetfiltration einzelne Fotoaufnahmen des Filterkammerinneren aufgenommen, sowie Videosequenzen der Filtration aufgezeichnet werden. In den Bildsequenzen kommt deutlich die zeitliche Änderung der Filterbeladung zum Vorschein (s. Abb. 34). Es ist möglich, durch einen Einstellring die Blickrichtung des Boroskops so zu verändern, dass die Filterkammer aus verschiedenen Blickwinkeln betrachtet werden kann. In den folgenden Beispielen wurde die Blickrichtung so eingestellt, dass das Boroskop immer gegen die Strömung, d.h. parallel zu der Filtermatrix in Richtung Filterkammer-Eingang blickt. Bei der Betrachtung mehrerer zeitlich aufeinander folgender Fotoaufnahmen (s. Abb. 34) ist zu erkennen, wie die Anlagerungsbereiche auf der zuvor magnetpartikelfreien Filtermatrix (oben links) zunehmen und die freie Strömung in der Mitte der Fotoaufnahmen zusehends weiter eingeschränkt wird (unten rechts).

Anhand solcher Fotoaufnahmen und der quantifizierbaren Veränderung der Abstände der Anlagerungszonen zueinander kann ein bevorstehender Magnetpartikel-Durchbruch erkannt werden.

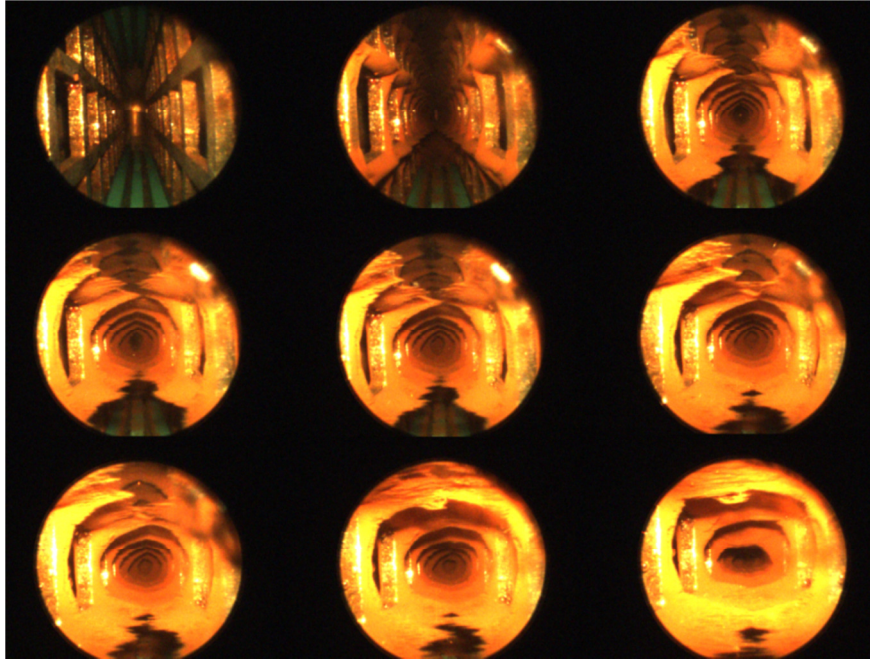


Abb. 34: Zeitliche Veränderungen der Anlagerungszonen von Magnetpartikeln in der HGMS-Filterkammer

Die optische Auswertung des Filterkammerinneren mittels Boroskop hat noch weitere Vorteile für die Filtration: Beim Befüllen der Anlage kann beobachtet werden, ob sich Luftblasen im Filterkammerinneren befinden, die die spätere Filtration stören würden. Des Weiteren stellt diese Methode eine gute Kontrolle für das Aus- und Rückspülen des HGMS-Filters nach der Filtration dar, wobei durch den optischen Eindruck des Ausspülvorganges bereits mögliche Unregelmäßigkeiten erkannt und behoben werden können.

6.3.3.2 Kontinuierliche Aufnahme und vollautomatische Auswertung mittels Bildanalyse zur Realisierung einer In-line-Analytik

Um die Auswertung der Bildsequenzen automatisieren zu können, wurde am Umwelt-Campus Birkenfeld die Software „Matrox Inspector[®]“ eingesetzt. Diese Software erlaubt eine vollautomatische Bildauswertung. Es stehen vorgegebene Programmschritte zur Verfügung, die fallspezifisch angewandt werden können. Das Besondere an diesem Programm ist, dass nach der Einbindung der einzelnen

Schritte in ein sogenanntes ActiveMIL-Projekt eine Visual Basic-Anwendung programmiert wird, die einen automatischen Ablauf der gesamten Auswertung ermöglicht. Die Programmschritte wurden so angepasst, dass sie für die Auswertung der Anlagerungszonen im HGMS-Filter verwendbar sind. Die Bildauswertung verläuft in 5 Schritten wie in Abb. 35 dargestellt.

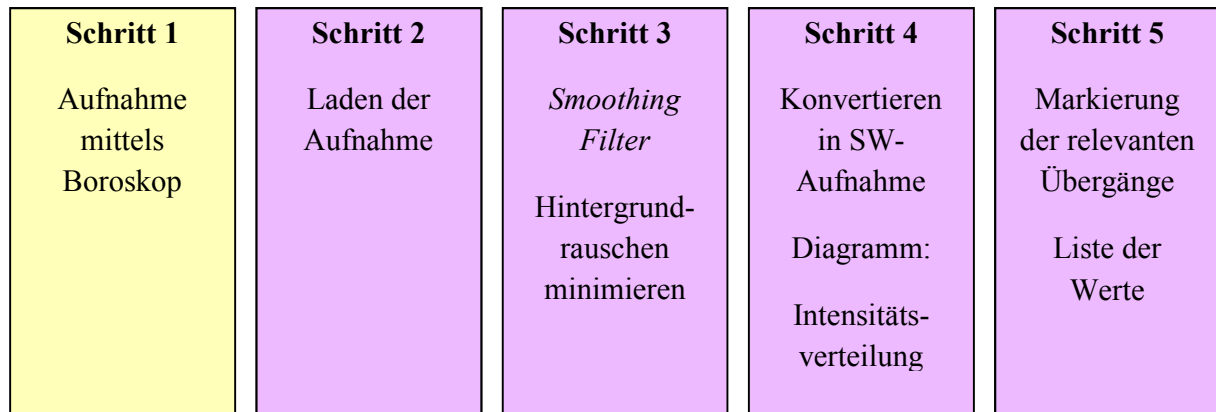


Abb. 35: Abfolge der Schritte zur automatischen Bildauswertung

In Schritt 1 werden mit Hilfe des Boroskops in der Filterkammer einzelne Bilder aufgenommen. Diese werden in Schritt 2 automatisch in das Programm geladen. In Schritt 3 wird zunächst das Hintergrundrauschen der Pixelintensität durch einen Filter (Smoothing Filter) minimiert. Anschließend wird in Schritt 4 eine Funktion gestartet, die das farbige Bild in eine Schwarz-Weiß-Aufnahme konvertiert und ein Diagramm der Intensitätsverteilung innerhalb dieser Aufnahme erstellt (s. Abb. 36, Diagramm rechts).



Abb. 36: Automatische Vermessung der Anlagerungszonen mittels der Software „Matrox Inspector®“

Die Intensitätsverteilung spiegelt in diesem Fall die Übergänge verschiedener Graustufen wider. Dabei wird ein Übergang von schwarz zu weiß als 100 %-Wert angenommen und alle dazwischen liegenden Graustufen werden in die jeweiligen %-Werte umgerechnet. Im Diagramm sind diese %-Angaben über die untersuchten Pixel aufgetragen und es kann anhand der Maximal- und Minimalwerte eine signifikante Intensitätsveränderung definiert werden.

In Schritt 5 sucht das Programm automatisch über den Befehl FIND im Diagramm die relevanten Übergänge von Magnetpartikel-Anlagerungszonen zur freien Strömung und markiert die Positionen im Bild (s. Abb. 36). In den Voreinstellungen der Software kann festgelegt werden, wie groß der Bereich sein soll, in dem vom Programm eine Intensitätsveränderung als Übergang angezeigt wird. Die zugehörigen Werte werden automatisch in einer separaten Liste dargestellt, in der die x- und y-Koordinaten der Markierungen, sowie der Abstand zwischen den Markierungen angegeben werden (s. Tab. 10).

Tab. 10: Auswertung der optischen Darstellung der Anlagerungsbereiche

X1	X2	X2-X1 (Y1=Y2=Konstant)	Zeit [min:sec]
350,98	356,96	5,98	00:12
354,61	391,00	36,39	00:24
341,00	390,88	49,88	00:36
346,99	386,99	40,00	00:48
354,98	381,07	26,09	01:00
361,11	379,06	17,95	01:12
369,04	376,96	7,92	01:24
337,47	348,51	11,04	01:36
337,40	340,97	3,57	01:48

Aus der Tabelle wird ein Diagramm erstellt, in dem die auf die Anfangsbedingung normierten Abstände A_N dargestellt werden (s. Gleichung 7). In

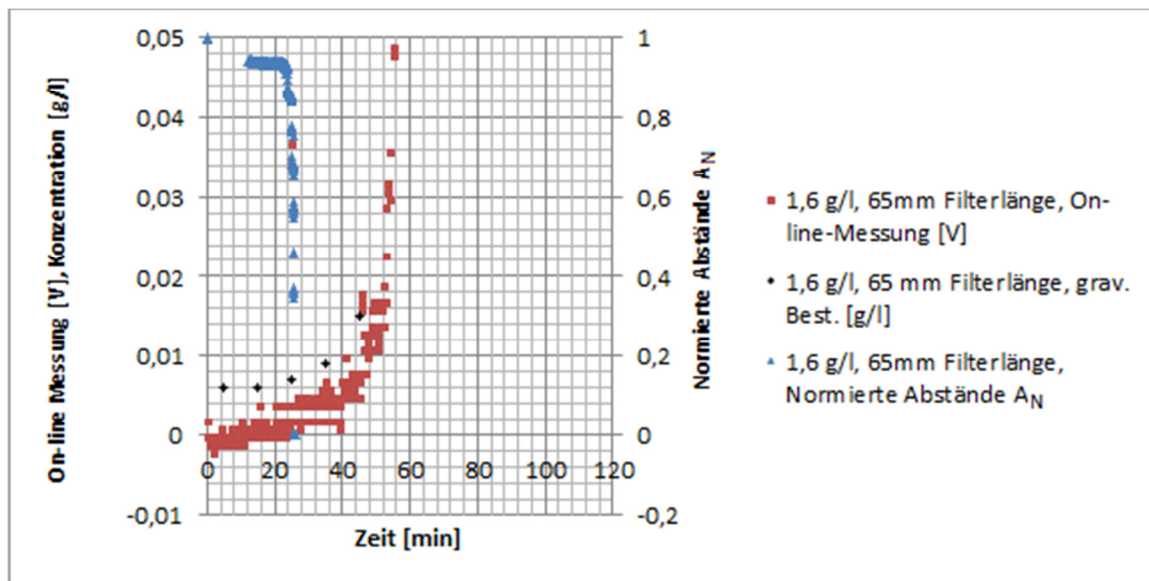


Abb. 37 ist beispielhaft eine solche Kurve der Abstände zwischen den Anlagerungsbereichen im Vergleich zu den Magnetpartikelmessungen im Filtrat dargestellt.

$$A_N = \frac{x_2 - x_1}{(x_2 - x_1)_{t=0}} \quad (7)$$

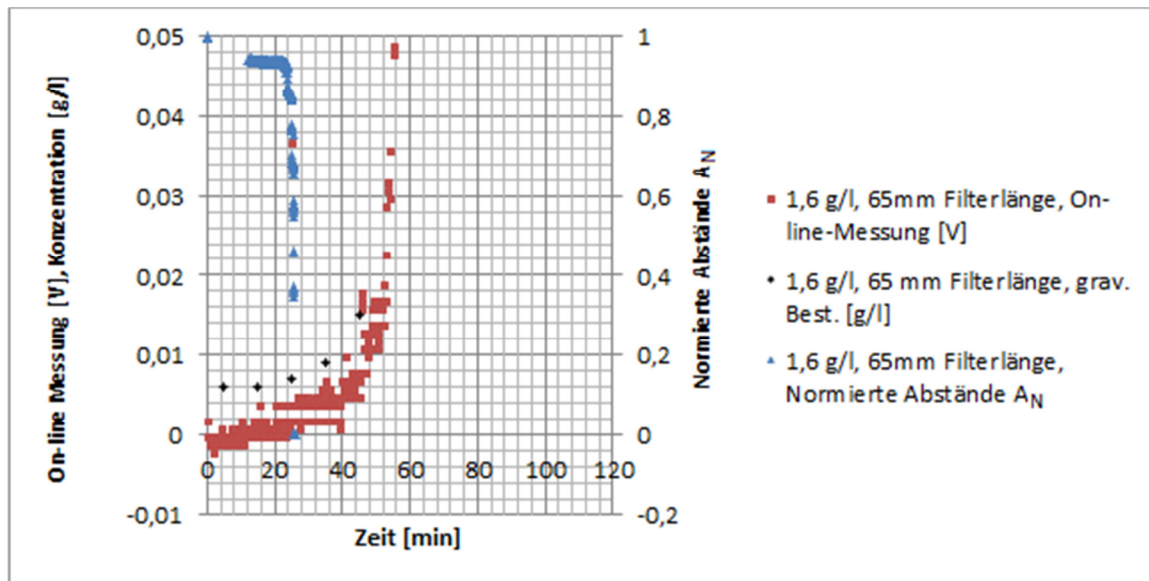


Abb. 37: Diagramm der normierten Abstände A_N zwischen den Anlagerungsbereichen

Die Schritte 2 bis 5 werden zu einer Programmsequenz vereinigt und können ab diesem Zeitpunkt automatisch ablaufen.

6.3.3.3 Strategie zur Prozess-Steuerung

Vollautomatischer Programmablauf

Der vollautomatische Programmablauf besteht im Wesentlichen aus vier Sequenzen (siehe Abb. 38).

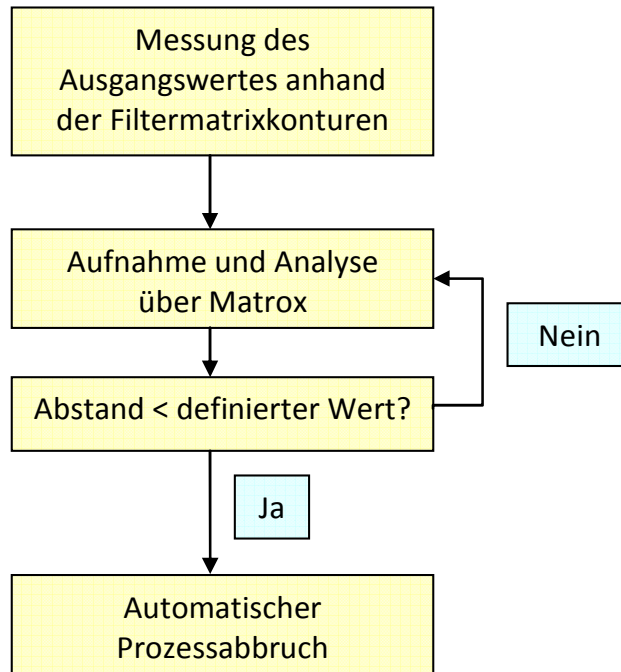


Abb. 38: Aufbau des Programmablaufs zur Steuerung der HGMS-Filtration

In der ersten Sequenz wird der (Konturen-)Abstand der Gitternetze der Filtermatrix vor Beginn der Filtration gemessen und als Konstante gespeichert. Während der Filtration wird in der zweiten Sequenz von der Software Matrox Inspector™ automatisch die Lage der „Kanten“ und daraus der noch verbleibende Abstand der Anlagerungszonen ermittelt (vgl. 6.3.3.2). In der dritten Sequenz wird überprüft, ob der Abstand kleiner als ein vorher festgelegter (Minimal-)Wert ist. Ist diese Überprüfung falsch, dann wird über eine *While*-Schleife in definierten Zeitabständen wieder die zweite Sequenz ausgeführt. Sobald die Überprüfung in der dritten Sequenz *wahr* ist, wird der Prozess der Bildauswertung gestoppt. Abb. 39 zeigt mehrere Bilder die während einer Filtration aufgenommen und von der Software vollautomatisch ausgewertet wurden. Das Anwachsen der Magnetpartikel-Anlagerungszonen ist deutlich zu erkennen.

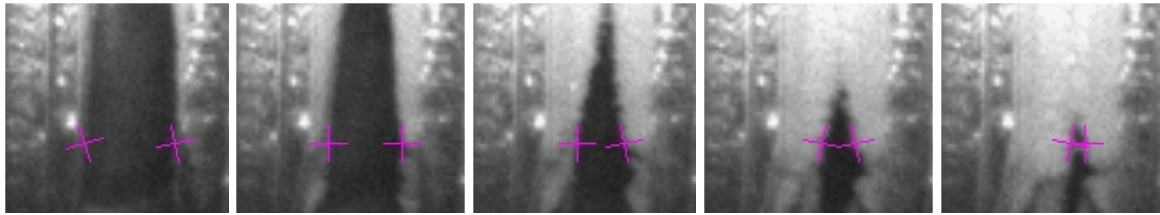


Abb. 39: Detail-Vergrößerung der Magnetpartikel-Anlagerungsbereiche während der Magnetfiltration

Nach Erreichen des Abbruchkriteriums, wird diese Information an die Software LabView™ weiter gegeben, die die HGMS-Anlage steuert. Dort wird dann die Filtration gestoppt und der Spülzyklus eingeleitet.

6.3.3.4 Neukonstruktion und Fertigung der Filterkammer zur Verbesserung der Trennleistung des Hochgradienten-Magnetfilters

Die ursprünglich benutzte HGMS-Anlage ist mit fluiddynamischen Schwächen behaftet, weshalb eine Strömungsoptimierung durch eine Neukonstruktion der Filterkammer sowie der Filtermatrix (siehe Kap. 6.3.3.8) angestrebt wurde. Da die entstehenden Anlagerungsbereiche bei diesem Filterverfahren fast ausschließlich durch das künstlich erzeugte Magnetfeld auf der Filteroberfläche gehalten wird und die Strömung über weite Strecken tangential zur Filteroberfläche verläuft, müssen ungünstige Strömungsverhältnisse vermieden werden, welche einen verfrühten Filterdurchbruch herbeiführen oder eine ungleichmäßige Ablagerung der Anlagerungsbereiche bewirken könnten. Bei kompakten Filtermodulen besteht außerdem die Gefahr von teilweisen oder sogar vollständigen Verstopfungen sowie anderen unerwünschten Ablagerungen, welche den Filtrationsprozess auf unterschiedliche Arten negativ beeinflussen können. Des Weiteren erschweren Ritzen und Spalten die Reinigung und Sterilisation der Anlage in montiertem Zustand, da hier aufgrund kleiner Toträume keine ausreichende Spülung stattfindet. Um das Potential der HGMS-Filtrationstechnik weitest möglich auszunutzen, ist es notwendig, die Strömungsverhältnisse im Inneren eines Filtermoduls zu verstehen und zu steuern. Unter Zuhilfenahme moderner rechnergestützter Simulationen kann

dieser Forderung über weite Strecken entsprochen werden. So konnten zunächst die Schwächen verschiedener Filterkonzepte aufgedeckt und durch gezielte Optimierung ein neues, vielversprechendes Filtermodul entwickelt werden.

6.3.3.4.1 Bestandsaufnahme der Strömung in der bisher verwendeten Filterkammer

In der üblicherweise verwendeten Filterkammer ist in der Berechnung der Strömung deutlich erkennbar, dass der Ein- und Auslass der Filterkammer strömungsdynamisch sehr ungünstig ist, da er stark gegen den eigentlichen Filterraum versetzt ist (siehe Abb. 40). Des Weiteren sind harte Kanten an den Filterblechaufnahmen sowie den Übergängen zwischen Ein- und Auslass- und Filterraum erkennbar. Die Strömung ist asymmetrisch und es bilden sich Totzonen. Die Filterblechhalterungen sind instabil und es entsteht eine einseitige Bypass-Strömung.

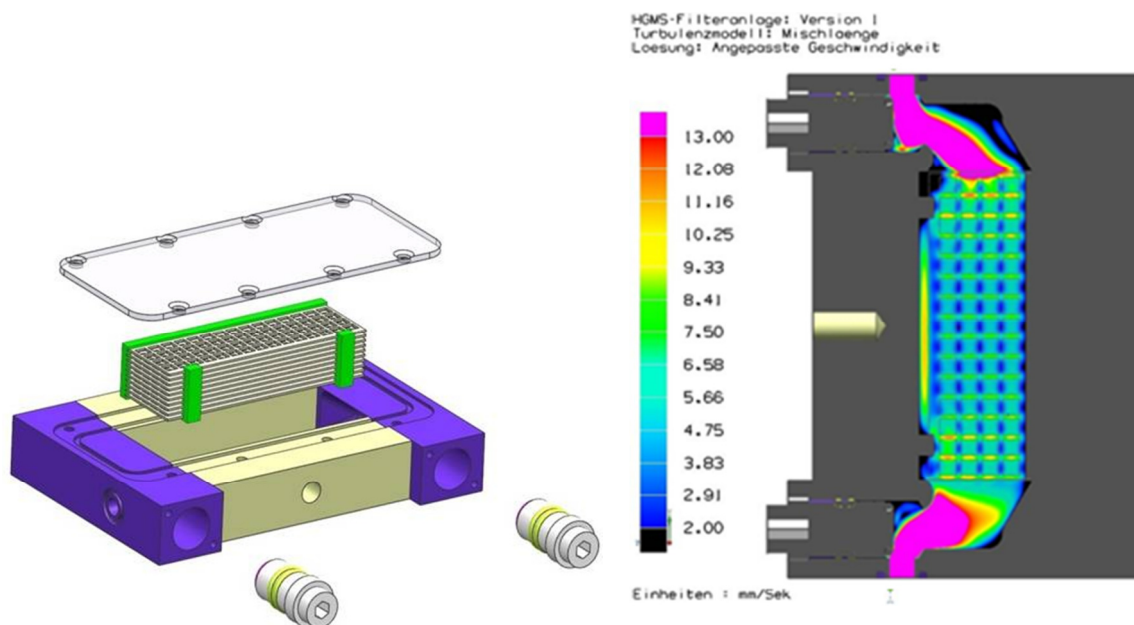


Abb. 40: CAD-Geometrie des ursprünglichen Filtermoduls und Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene

Im Ein- und Auslassbereich des Filtermoduls sind Unruhen zu erkennen. Des Weiteren zeichnen sich signifikante Geschwindigkeitsvarianzen im gesamten Filterbereich ab.

Neben den starken Verwirbelungen ist auch eine große Filterumgehung zu erkennen. In den großen Totzonen sowie in den engen Spalten zwischen Absperrventilen und Gehäuse könnten sich Beads ablagern. Auch das Gebiet in unmittelbarer Nähe zum längs verlaufenden Filterblechhalter weist sehr niedrige Geschwindigkeiten auf, weshalb hier ebenfalls die Gefahr von Ablagerungen oder partiellen Verstopfungen besteht. Die Strömung wird außerdem aufgrund des verwinkelten Ein- und Auslasses auf ungünstige Bahnen gelenkt.

Der auf der Symmetrieebene erstellte Plot zeigt deutlich, wie die Strömungsgeschwindigkeit durch die Form der Filterbleche und Filterblechaufnahmen sowie die Geometrie des Ein- und Auslassbereichs beeinflusst wird (vgl. Abb. 41).

So ist zu erkennen, dass die Geschwindigkeit im mittleren Bereich zwar über die gesamte Breite der Bleche relativ gleichmäßig pulsiert, durch die nachteilige Ausführung der Filterblechaufnahmen und die verwinkelten Ein- und Auslassbereiche, treten an den Grenzen zu Ein- und Auslassbereich und der einseitigen Filterumgehung jedoch unerwünscht hohe Geschwindigkeiten auf. Auf den Filterblechen erschweren die Geschwindigkeitsextrema die Ansiedelung der Beads, während im Bereich der Filterumgehung große Mengen der ungefilterten Suspension vorbeiströmen können.

Es ist des Weiteren bei gegebener Ausführung des Filtermoduls zu erwarten, dass an den Querstreben der Bleche, besonders an Anfang und Ende des Filterbereichs, ein verfrühter Filterdurchbruch eingeleitet wird bzw. weniger Partikel angelagert werden.

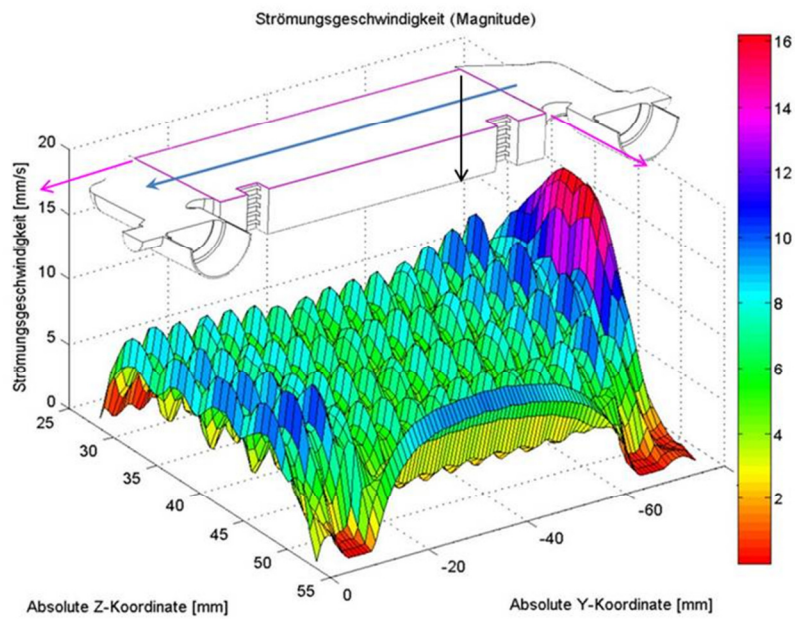


Abb. 41: Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene (3D, skalar)

Um diese Nachteile zu beseitigen wurden verschiedene Veränderungen an der Filterkammer und der Filtermatrix konzeptioniert:

6.3.3.4.2 Version 1: Austausch der vorhandenen Absperrventile

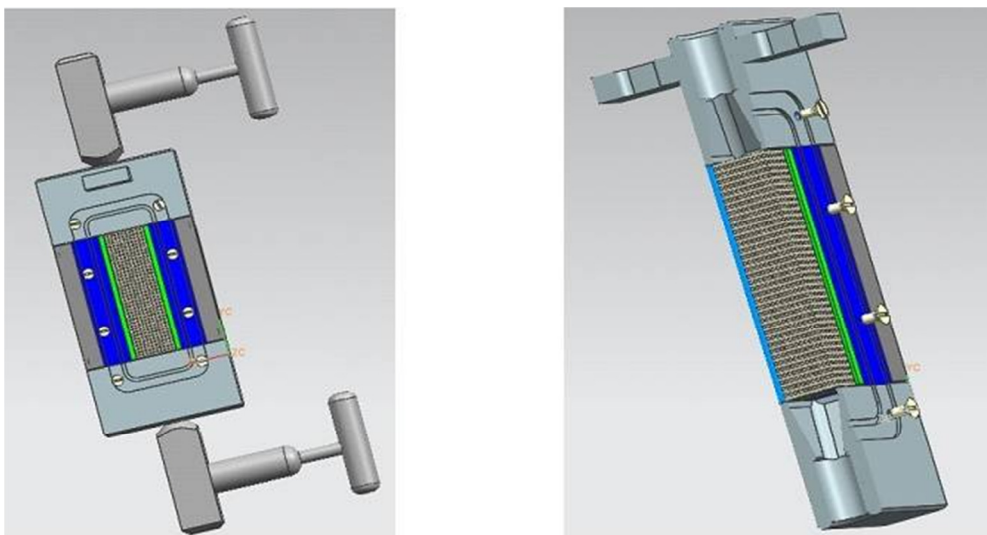


Abb. 42: Neue, außenliegende Nadelventile

Um eine verbesserte Anströmung in die Filterkammer zu erhalten, wurde zunächst ein flacher Einlauftrichter konstruiert. Zugleich wurde darauf geachtet, dass auch zukünftig die Möglichkeit besteht, die Filterkammer in gefülltem Zustand aus der

Anlage auszubauen. Um zu gewährleisten, dass die Filterkammer CIP- und SIP-fähig ist, wurde besonderen Wert auf temperaturbeständige Werkstoffe gelegt, die gegen übliche Sterilisationsmittel resistent sind.

Die bisher verwendeten innenliegenden Absperrschraben werden durch außenliegende Nadelventile der Firma Swagelok ersetzt. Durch diese Maßnahme sollen Strömungsumlenkungen und ausgeprägte Toträume in unmittelbarer Nähe zum Ein- und Auslaufbereich vermieden werden. Der Flussraum kann dadurch weitestgehend begradigt werden.

6.3.3.4.3 Version 2: Strömungsoptimierung durch Stromstörer

Das neue Gehäuse erhält einen eingeschweißten Boden, wodurch zwar nur noch eine Seite zur Entnahme der Filterbleche geöffnet werden kann, die Abdichtung des Gehäuses aber erheblich erleichtert wird.

Eine der wichtigsten Änderungen stellt der Einbau eines Störkörpers im Einströmbereich dar, um die Strömungsgeschwindigkeiten über der gesamten Einströmebene gleichmäßig zu verteilen und eventuelle Unruhen zu beseitigen.

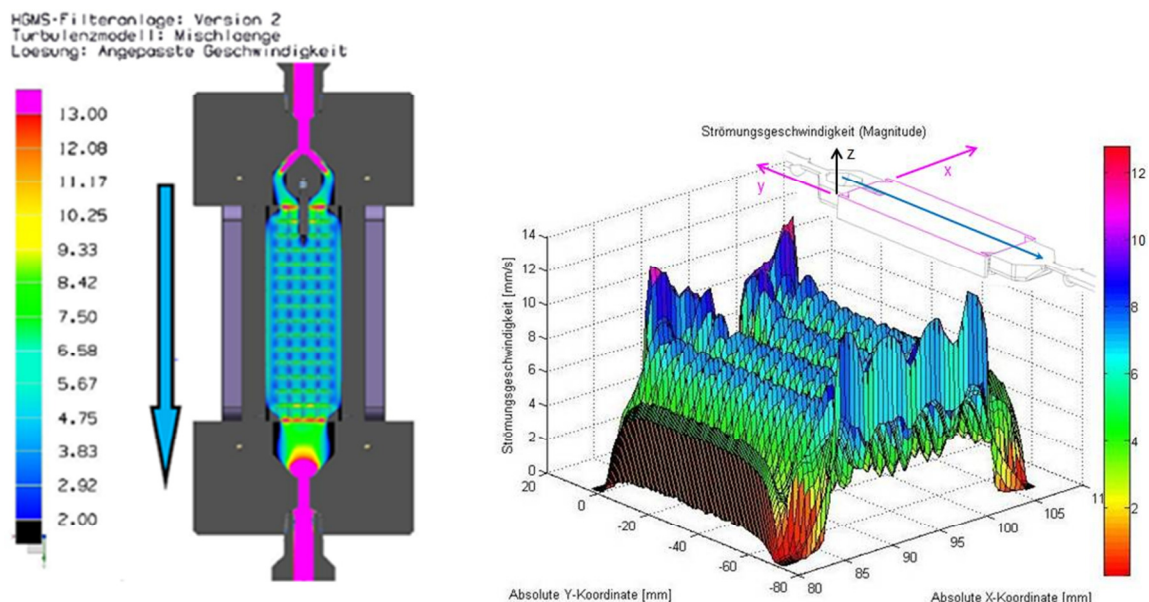


Abb. 43: Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene von Version 2

Insgesamt weist Abb. 43 ein sehr viel gemäßigeres Strömungsverhalten auf. Jedoch können die Filterbleche noch immer weitläufig umgangen werden und das

ungünstige Konzept des Filterpakets mit recht großen, im unmittelbaren Filterbereich liegenden Abstandshaltern verursacht einen extremen Geschwindigkeitsanstieg in Ein- und Ausströmbereich des Filterraums. Auch der Störkörper im Einströmbereich ist in gegebener Ausführung von eher zweifelhaftem Nutzen. Die Strömung im Einströmbereich wird dadurch auf die äußeren Gebiete der Filterbleche konzentriert, was zu erhöhten Geschwindigkeiten in diesen Bereichen führt. Im Übrigen erweist es sich als sehr problematisch, eine Möglichkeit zu finden, den Störkörper platzsparend und funktionsgerecht zu montieren.

6.3.3.4.4 Version 3: Optimierung des Ein- und Auslaufbereiches

Version 3 übernimmt zunächst den Vorschlag des begradigten Strömungsraumes, die Absperrventile sowie die Filterbleche. Außerdem soll die trichterförmige Gestalt des Ein- und Ausströmbereiches weiterentwickelt werden. Im Gegensatz zu Version 2 wird versucht, auf einen Störkörper zu verzichten. Als wesentliche Änderung verfügt Version 3 aufgrund einer neuen Geometrie im eigentlichen Filtermodul nur noch über drei stetige Querschnittsänderungen.

Der Einlass wurde in seiner grundlegenden Form so gestaltet, dass der kreisrunde Querschnitt des inneren Ventilgehäusedurchmessers stetig in den rechteckigen Querschnitt des die Filterbleche umschließenden Filterraumes überführt wird. Der Bildung von Totzonen soll so entgegengewirkt werden. Hinter der Querschnittsänderung wurde eine Ausgleichstrecke angebracht. Dem noch parabolischen Geschwindigkeitsprofil soll so die Möglichkeit eingeräumt werden, sich der Gestalt eines logarithmischen Profils anzugleichen, wie es für turbulente Innenströmungen charakteristisch ist. Dies ist zweckdienlich, da bei einem typisch turbulenten Geschwindigkeitsprofil alle Filterlagen annähernd gleich schnell angeströmt werden, während bei einem parabolischen Profil in den mittleren Lagen eine höhere Geschwindigkeit auftritt, als in den Randgebieten.

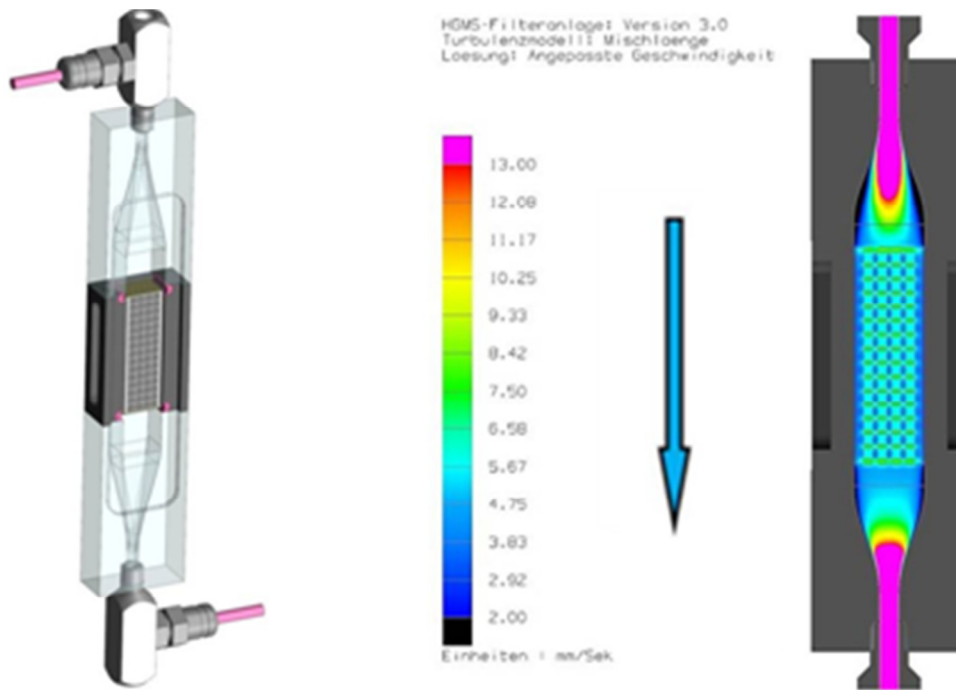


Abb. 44: Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene von Version 3

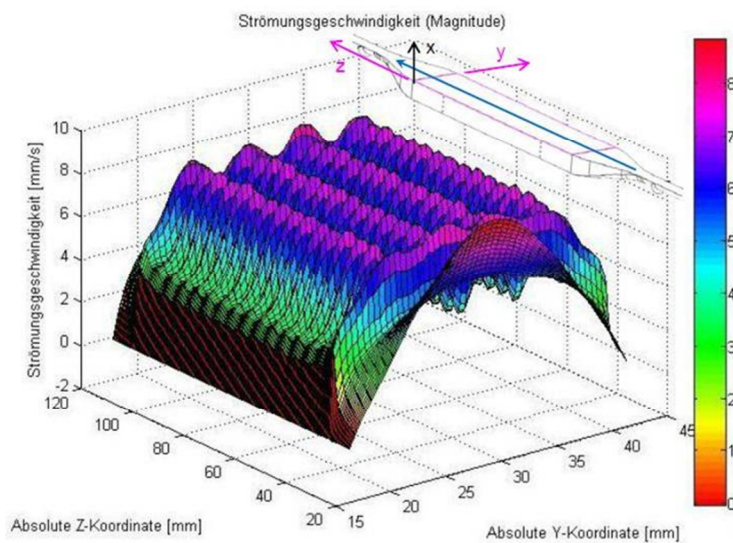


Abb. 45: Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene von Version 3

Es ist zu erkennen, dass sich das gesamte Strömungsbild im Filterbereich stark beruhigt hat, allerdings scheint das Geschwindigkeitsprofil in unmittelbarer Nähe zu den Filterblechen noch immer eher parabolischen Charakters zu sein. Die Geschwindigkeit pulsiert gleichmäßig über dem gesamten Filterbereich der Symmetrieebene. Allerdings treten auch in Version 3 noch immer störende Totzonen im Bereich der Querschnittsänderung des Einlasses auf.

6.3.3.4.5 Version 4: Optimierung der Version 3

Nachdem Version 3 in ersten Berechnungen bereits gute Ergebnisse liefern konnte, erfolgte eine Feinabstimmung der Geometrie. Dazu wurden schrittweise einzelne Komponenten des Filtermoduls verändert und in Simulationen getestet.

Es wurden folgende Anpassungen getroffen:

1) Vermeidung von Totzonen:

Der Querschnittsübergang im Einlass wurde angepasst, sodass keine Verwirbelungen mehr entstehen. Die Länge des Übergangs wurde dazu erhöht und die Verrundung der Übergänge vergrößert. Diese Anpassungen wurden in verschiedenen Variationen so lange wiederholt, bis keine Totzonen mehr zu verzeichnen waren. Dabei wurde versucht, eine kompakte Gestalt zu bewahren.

2) Anpassung des Geschwindigkeitsprofils:

Das Geschwindigkeitsprofil wurde über eine Verlängerung der Ausgleichstrecke so weit beeinflusst, dass alle Filterlagen aufgrund der Ausbildung eines turbulenten Geschwindigkeitsprofils in etwa gleich schnell angeströmt werden.

Aus diesen Anpassungen und den darauffolgenden Simulationen ging die Version 4 hervor, welche bei den Berechnungen die bisher besten Ergebnisse erzielte. Die Version 4 erzeugt bereits keine Wirbel mehr im Einlassbereich und die Strömungsgeschwindigkeit ist in allen Filterlagen nahezu gleich.

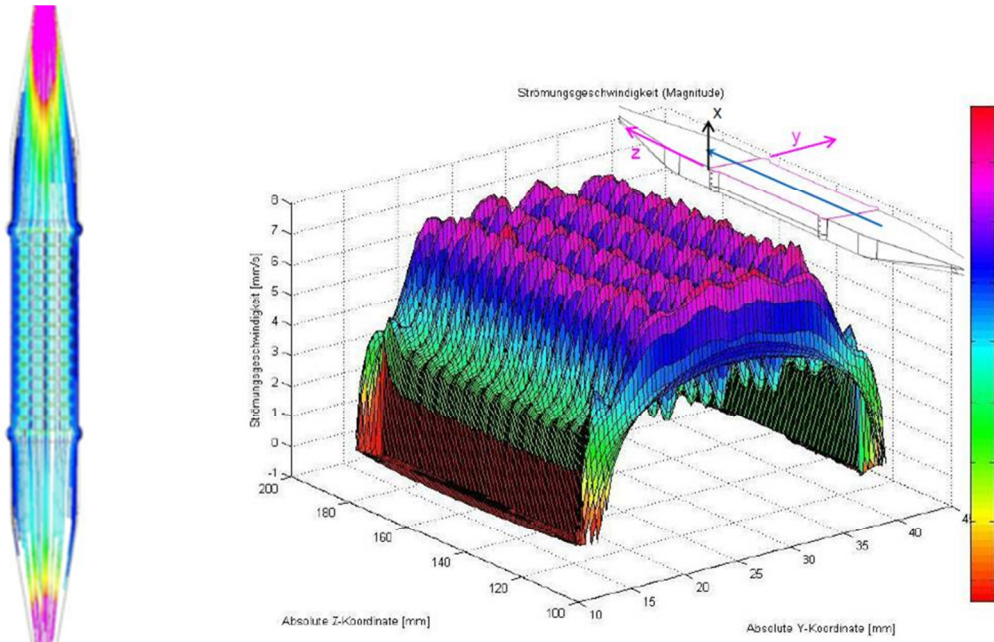


Abb. 46: Geschwindigkeitsverlauf über der Symmetrieebene der Version 4

Scharfe Kanten und Totzonen wurden bis auf kleine Gebiete in den Absperrventilen beseitigt, was die Reinigung und Sterilisation des Filtermoduls erleichtert. Des Weiteren konnten genauere Erkenntnisse über strömungsmechanische Charakteristika der verwendeten Filterbleche und der neuen Absperrventile gewonnen werden.

6.3.3.5 Prozessschritt zur Wiedergewinnung und Resuspendierung der magnetischen Mikrosorbentien

Um die magnetischen Mikrosorbentien wieder zu verwenden, müssen sie nach den HGMS-Durchgängen resuspendiert werden. Da die Partikel während der Filtration agglomerieren wurden am Umwelt-Campus Birkenfeld Versuche zur Trennung der Partikel durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden Partikel der Firma PerkinElmer chemagen Technologie GmbH verwendet (M-PVA C22) mit einer Standardpartikelgröße von 1-3 μm . Um die Partikel für die Versuche zu agglomerieren wurden sie über mehrere Wochen eingetrocknet.

Die Partikelgröße wurde in den Versuchen mit einem Partikelgrößenmessgerät (Analysette 22) der Firma Fritsch GmbH bestimmt. Die agglomerierten Partikel wurden resuspendiert und mit einem Propellerrührer gerührt. Spätestens alle 30 min. wurde die Partikelgröße neu bestimmt. Anhand der Bestimmungen wird deutlich, dass sich die Agglomerate durch das alleinige Rühren der Partikel nicht zerteilen lassen (siehe Abb. 47).

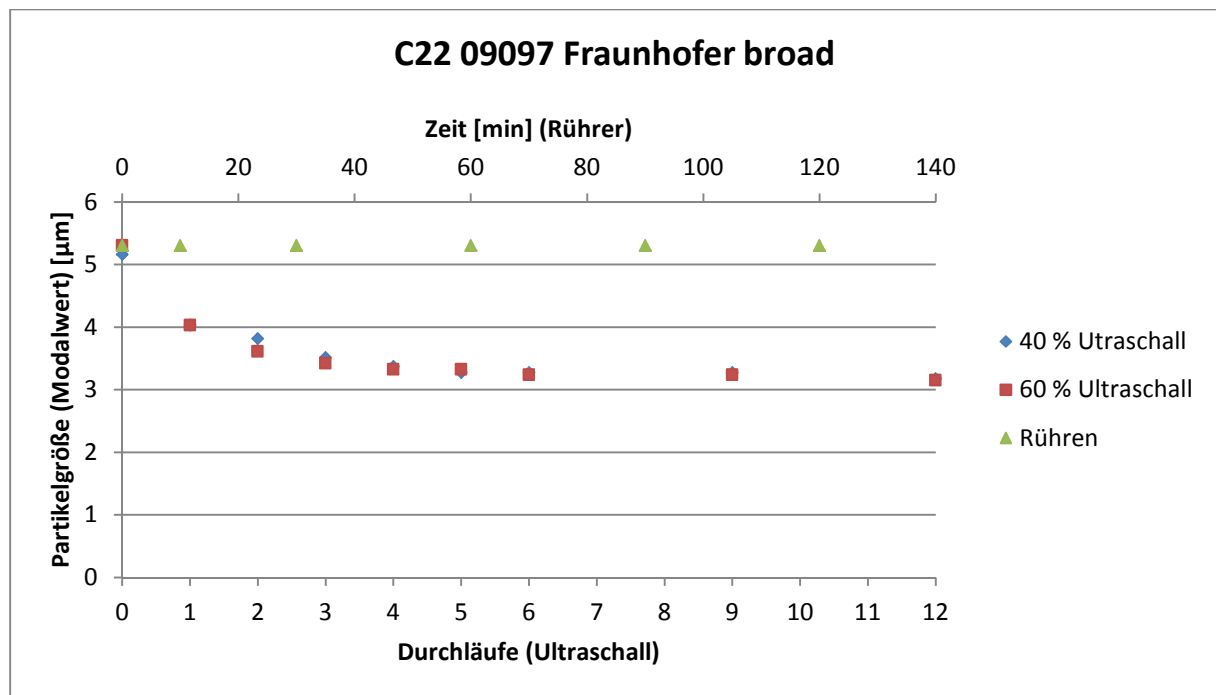


Abb. 47: Rühren agglomerierter Magnetpartikel mit einem Propellerrührer und Beschallen der Magnetpartikel in einer Ultraschalldurchflusszelle

Daher wurde für weitere Untersuchungen eine Ultraschalldurchflusszelle angeschafft. Hier wurden die Magnetpartikel mit 100 mL/min bei verschiedenen Beschallungsintensitäten (40 % und 60 %) durch die Zelle gepumpt und nach jedem Durchlauf die Partikelgröße bestimmt. Das entstehende Diagramm (siehe Abb. 47) zeigt eine deutliche Auflösung der Agglomerate bis hin zu einem Wert von 3,15 µm, womit eine ausreichend gute Resuspendierung der Magnetpartikel für eine erneute Verwendung erreicht ist.

6.3.3.6 Trennung Biomasse und Partikel im Satzbetrieb

Abb. 48 zeigt eine Abtrennung der magnetischen Partikel im Satzbetrieb. Bei dem braunen Überstand in Abb. 48b) handelt es sich um das Medium ohne Biomasse. Die Biomasse wurde zusammen mit den magnetischen Beads abgetrennt. Dies deutet auf eine Einlagerung der Partikel in die Pellets der Streptomyces hin, was sich bei der Beobachtung unter dem Mikroskop bestätigt (siehe Abb. 50a). Eine Separation der magnetischen Beads von der Biomasse kann somit im Satzbetrieb ohne Zugabe von Detergenzien nicht erreicht werden.

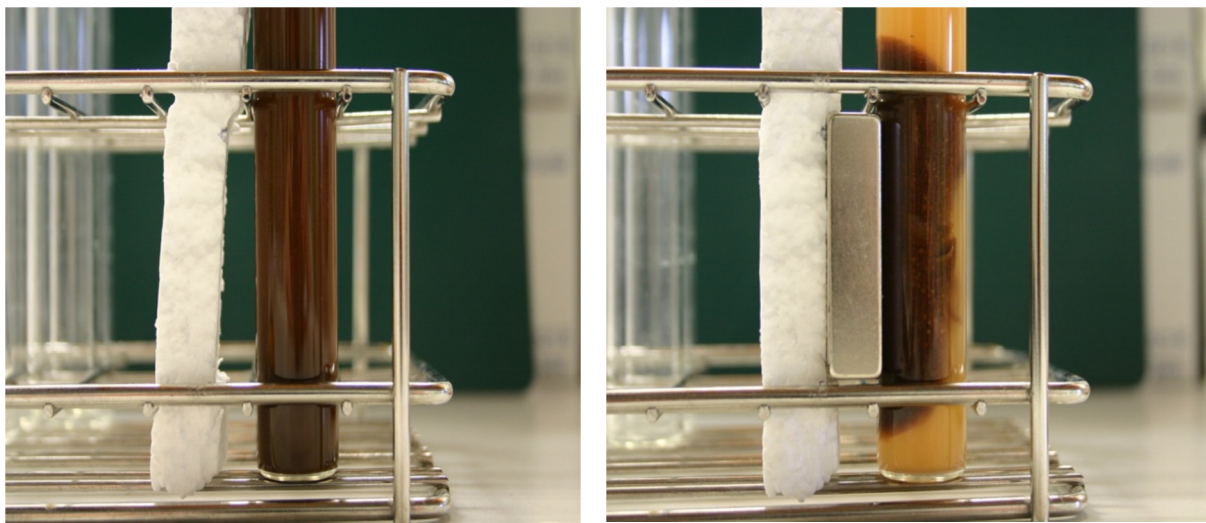


Abb. 48: Trennung der Partikel aus der Fermentationsbrühe im Satzbetrieb: a) Fermentationsbrühe mit magnetischen Partikeln, b) Abtrennung der in den Streptomyces Pellets eingelagerten magnetischen Partikel mittels Permanentmagneten

Um die Separation der magnetischen Partikel mittels Permanentmagneten zu dokumentieren, wurden alle 10 Sekunden Bilder des Aufbaus (siehe z.B. Abb. 48) gemacht. Mit Hilfe einer Bildauswertesoftware (NI Vision Assistant) kann die farbliche Veränderung der Probe und damit die Wanderung der Partikelfront während der magnetischen Abtrennung beobachtet werden. Es wurde eine Linie etwa in halber Höhe des Magneten durch das Reagenzglas in der Abbildung gelegt und entlang dieser Linie die Farbintensität in Graustufen aufgezeichnet.

Abb. 49 zeigt den Intensitätsverlauf zu verschiedenen Zeitpunkten. Ein geringer Wert in der Farbintensität deutete auf einen dunklen Bereich hin, ein hoher Wert steht für

helle Bereiche. Bei $d = 1$ cm stellt sich ein Gleichgewicht mit hohen Farbintensitäten ein, sprich der Überstand auf der dem Magneten gegenüberliegenden Seite wird klar. Zwischen 0 und 0,2 cm stellen sich dunkle Bereiche ein. Bereits nach einer Minute hat sich eine Partikel/Biomasse-Font von etwa 0,2 cm Dicke gebildet, erkennbar an dem Sprung der Farbintensität in

Abb. 49.

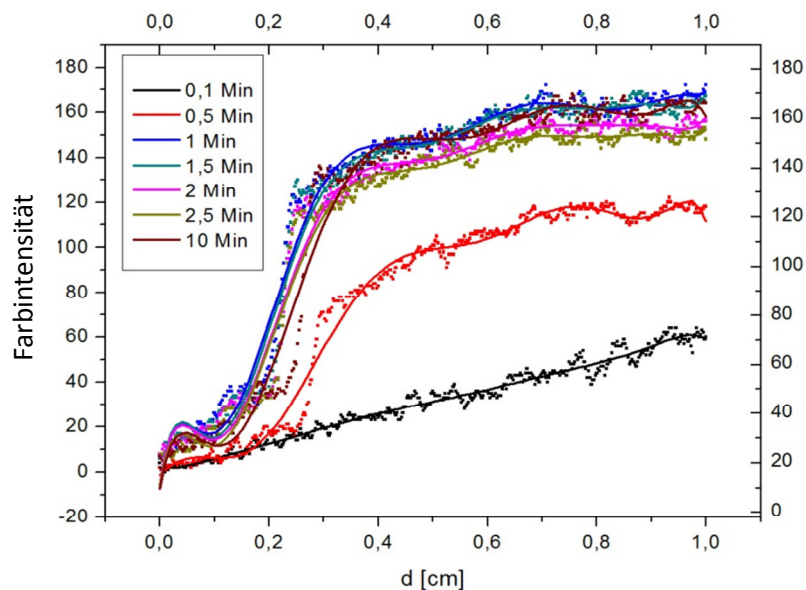


Abb. 49: Farbintensität ermittelt mit Hilfe von NI Vision Assistant. Nach etwa einer Minute bildet sich eine Partikel/Biomasse-Font von etwa 0,2 cm Dicke aus.

6.3.3.7 Abtrennung der magnetisierbaren Partikel aus der Antibiotika - Fermentationsbrühe im HGMS

Eine große Herausforderung für die Separation stellt das filamentöse Wachstum der Biomasse dar. Hier kommt es zu Einlagerungen der magnetischen Beads in die *Streptomyces* Pellets wie im Kapitel zuvor gezeigt. Eine Separation der Partikel von der Biomasse wird somit erschwert. Abb. 50a) zeigt eine solche Anlagerung der Partikel an die Biomasse. Durch die Zugabe von Natriumpyrophosphat kann ein Großteil der Partikel von den Streptomyces abgelöst werden (siehe Abb. 50b)). Es bleibt jedoch ein Teil der magnetischen Beads an der Biomasse haften, sodass es gemeinsam mit der Biomasse zum teilweisen Austrag der Partikel aus dem HGMS

kommt. Dies ist in Abb. 50c) dargestellt. Hier ist bis zur achten Minute der Magnet eingeschaltet, dennoch kommt es zum Austrag einiger Partikel. Hierbei handelt es sich um Partikel, die sich in Pellets der *Streptomyces* eingelagert haben. Ab Minute 8,5 wurde der Magnet ausgeschaltet und die magnetisierbaren Partikel ausgewaschen. Da die Partikel nur durch einfaches Spülen im geschlossenen Kreislauf (kein pneumatisches Klopfen, keine Rückspülung) ausgewaschen werden, sinkt die Partikelkonzentration am Ende der Messung nicht vollständig auf null. Im Inneren der Kammer haften weiterhin Partikel an der Filtermatrix. Mit Hilfe des Boroskops, welches am Umwelt-Campus Birkenfeld eingesetzt wird, könnte die Separation der Partikel von der Biomasse nicht filamentöser Mikroorganismen und das spätere Auswaschen sowohl der Biomasse als auch der magnetischen Beads aus der Filterkammer optisch dargestellt und optimiert werden.

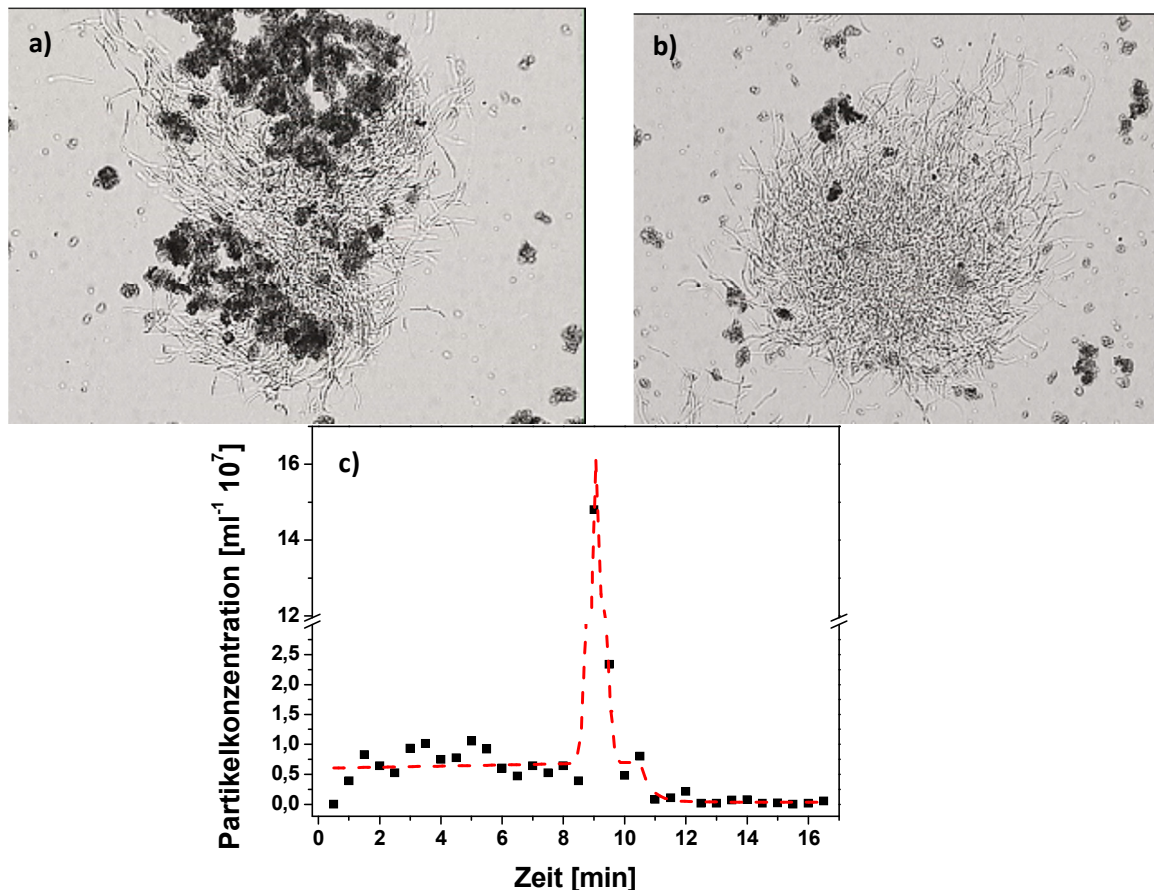


Abb. 50: Anlagerung der magnetisierbaren Partikel an die Pellet bildenden *Streptomyces* a) ohne und b) mit Natriumpyrophosphat (NaPP); die Zugabe des NaPP verbessert die Abtrennung der Partikel von der Biomasse, eine vollständige Ablösung wurde nicht erreicht;

c) Partikelseparation in Anwesenheit der *Streptomyces*, ab Minute 8 wurde der Magnet ausgeschaltet

Im Fall der filamentösen Streptomyces sollte für den Aufbau eines kompletten Prozesses aus Fermentation und anschließender Aufarbeitung mit magnetischen Partikeln, eine Vorfiltration nach der Fermentation vorgesehen werden, um filamentöse Biomasse und Medium zu trennen.

6.3.3.8 Neukonstruktion der HGMS-Filtermatrix

Zur Verbesserung der Biomassedurchlässigkeit und Separationscharakteristik des HGMS wurden verschiedene Anordnungsrichtungen der Drahtstäbe simuliert und in Separationsversuchen getestet. Die Simulationen wurden durch den Einsatz der Finite Elemente Methode (FEM) durchgeführt. Hierbei sind dreidimensionale Simulationen der Trennkammer unter Beachtung der Differenzialgleichungen der Strömungs- und Magnetfelder entwickelt worden (siehe Kapitel 6.2.3.5). Eine Anordnung in Z-Richtung entspricht einer Ausrichtung der Gitterstäbe parallel zum Mediumsstrom und senkrecht zum Magnetfeld, in Y-Richtung senkrecht zum Magnetfeld und senkrecht zum Fluss, in X-Richtung senkrecht zum Fluss und parallel zum Magnetfeld.

Abb. 52c) zeigt exemplarisch eine Anordnung der Stahlgitter in Y-Richtung. Zusätzlich wurde die kubische und rhomboedrische Anordnung der Gitterstäbe untersucht. Die Ergebnisse der Separationsversuche und die daraus berechneten Filterbelastungen sind in Abb. 51 zusammengefasst.

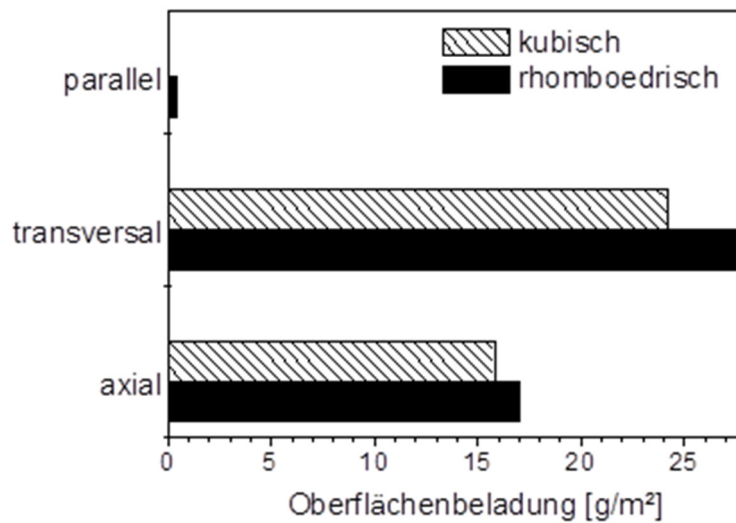


Abb. 51: Experimentelle Beladung des HGMS verschiedener Raumausrichtungen und Anordnungen der Drahtgitter. Die Beladung der Drähte mit Magnetpartikeln ist relativ zu deren Oberfläche dargestellt.

Die experimentellen Untersuchungen der Gitterorientierung zeigen klare Unterschiede zwischen den verschiedenen Anordnungen. Im Hinblick auf die Filteroberflachenbeladung (siehe Abb. 51) sowie die maximale Kapazität der Filter welche aus den Durchbruchskurven berechnet wird (siehe Tab. 11) zeigt die transversale, rhoemboedrische Anordnung die höchste Beladung und Kapazität. Eine Anordnung der Stahlstäbe in x-Richtung (parallel zum Magnetfeld) liefert kaum, bzw. keine Rückhaltung der magnetisierbaren Partikel. Diese wurde auch in den Simulationen bestätigt, da sich hier kein magnetischer Gradient innerhalb der Kammer aufbaut.

Tab. 11: Vergleich verschiedener Gitterorientierungen; die Filterkonstanten wurden anhand der Durchbruchskurven errechnet.

Orientation	maximum capacity [kg/m³]	Filter coefficient [1/m]	Separation efficiency []
transversal	287,7	91,97	6,7
axial	280,9	60,32	4,4
ax + trans (mesh)	276,6	74,96	5,5

Neben der maximalen Kapazität der Filtermatrix wird auch der initiale Filterkoeffizient anhand der Durchbruchkurven errechnet. Das Produkt (sog. Filtereffizienz) $\lambda_0 \cdot L_F$ muss Werte größer als 5 annehmen, damit das Filtrationsverhalten des HGMS einer klassischen Tiefenfiltration angenähert werden kann [4]. In diesem Fall bildet sich eine klare Beladungs- und Konzentrationsfront im Inneren der Kammer, die mit der Filtrationszeit über die Länge des Filters in Richtung Kammerauslass wandert. Die Bildung einer solchen Front führt zu einem plötzlichen Durchbruch des Filters. Dies führt zu geringeren Verlusten an Partikeln im Vergleich zu einem langsamen und konstanten Anstieg von c/c_0 wie es bei der axialen Anordnung der Fall ist. Die transversale Anordnung zeigt also auch die beste Separationseffizienz. Obwohl für die axiale Anordnung eine recht hohe maximale Kapazität erreicht wird, ist die Separationseffizienz ungenügend. Die Anordnung in einer Gitterstruktur (ax + trans) zeigt geringere maximale Beladungen, was in dem größeren Platzbedarf der Matrix innerhalb der Kammer begründet liegt. Anhand dieser Ergebnisse kann die Gitterstruktur zu Gunsten einer transversalen Anordnung von Gitterstäben ersetzt werden.

Um nun die Gitterabstände in der Kammer zu optimieren wurde auf der Basis der Ergebnisse aus Abb. 51 und Tab. 11 eine neue Kammer entworfen. Die maximale Filterkapazität und die Separationseffizienz bei verschiedenen Flüssigkeitsströmen sind in Tab. 12 zusammengefasst

Tab. 12: Vergleich der unterschiedlichen Gitterstababstände bei verschiedenen Flüssigkeitsströmen.

Abstand [mm]	maximale Kapazität 100 ml/min [kg/m ³]	maximale Kapazität 200 ml/min [kg/m ³]	Filterkoeffizient 100 ml/min [1/m]	Filterkoeffizient 200 ml/min [1/m]	Separations-effizienz 100 ml/min	Separations-effizienz 200 ml/min
1,4	113,7	103,7	92,2	38,9	9,9	2,8
1,0	168,0	83,9	200,4	27,2	14,6	1,9
0,8	167,1	87,5	125,2	32,0	9,1	2,3
0,6	88,3	115,4	248,6	64,7	18,2	4,7
0,4	120,3	20,9	186,4	34,3	13,6	2,5
0,2	29,4	23,7	57,5	21,1	4,2	1,5

Die FEM-Simulation dieser effizientesten Ausrichtung der Gitter in rhomboedrischer Anordnung mit einem Millimeter Gitterabstand ist in Abb. 52 exemplarisch dargestellt. Durch die rhomboedrische Anordnung ist es möglich, im Vergleich zur kubischen Anordnung weniger Gitterstäbe bei gleicher Abtrennung einzusetzen. Dies bedeutet, dass sich weniger Stromstörer innerhalb des Systems befinden und die Zellpellets beim Passieren der Kammer weniger behindert werden. Bei der Anordnung der Filtermatrix in y-Richtung verteilen sich die magnetischen Beads links und rechts der Gitterstäbe. Dies könnte sich als weiterer Vorteil für unser System darstellen, da in dieser Ausrichtung die Partikel am effizientesten vom Medium umspült und damit die Biomasse ausgetragen werden kann. Innerhalb der Separationsversuche konnte außerdem gezeigt werden, dass auf die Querstreben des Filtergitters verzichtet werden kann.

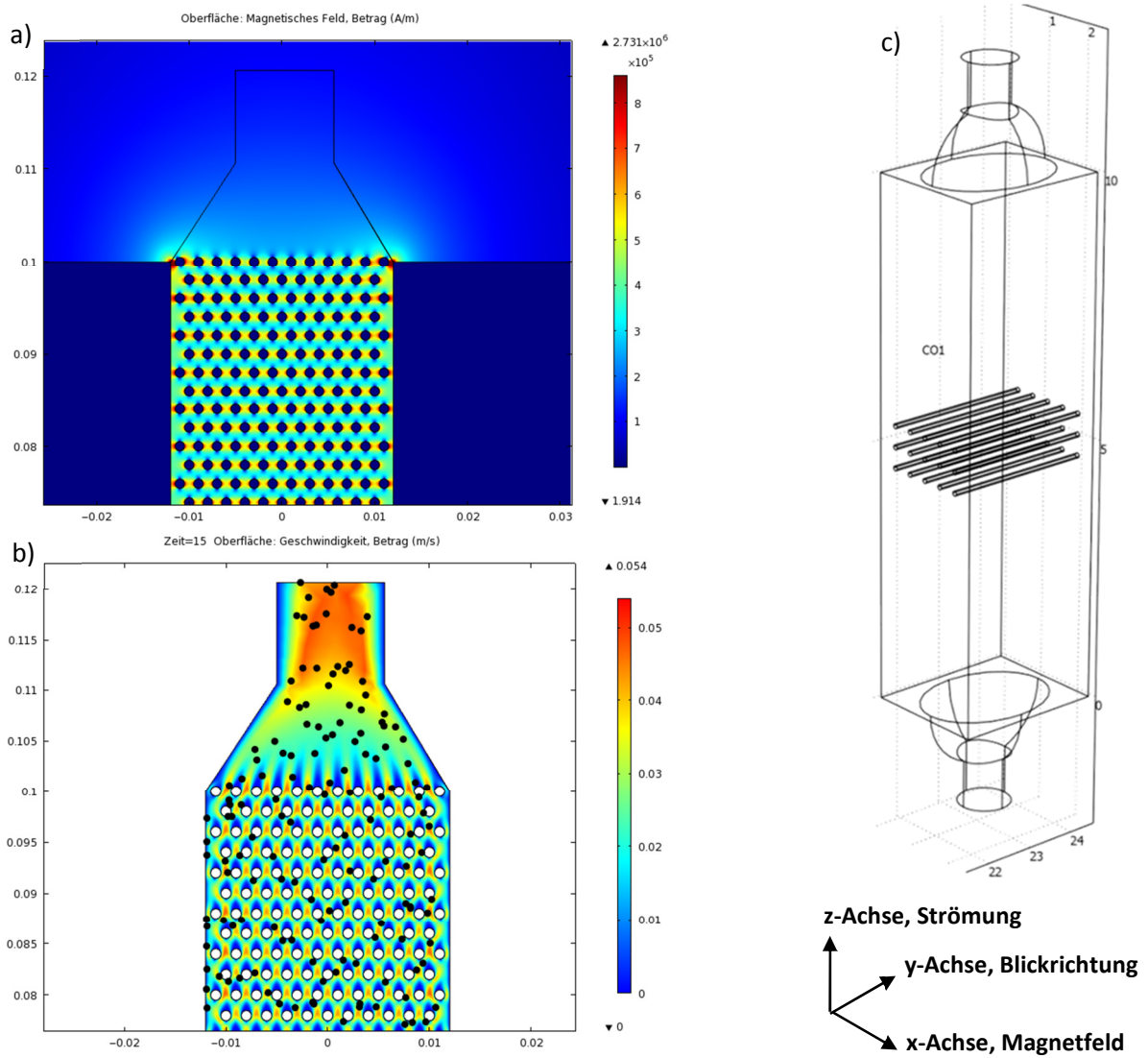


Abb. 52: Simulation des magnetischen Feldes und der fluiddynamischen Verteilung in der HGMS-Kammer, a) magnetisches Feld in transversaler rhomboedrischer Anordnung, b) Fluidgeschwindigkeit mit Partikeln in transversal rhomboedrische Anordnung c) kubische 3D Anordnung der magnetisierbaren Stahlstäbe in der Separationskammer

6.3.3.9 Integration des HGMS in den β -Lactam Fermentations- und Aufarbeitungsprozess

Für die Bilanzierung der Lactam-Aufarbeitung über mehrere Trennzyklen wurde der in Abb. 53 dargestellte Versuchsaufbau mit optimierter Gitteranordnung (siehe Kap. 6.3.3.8) verwendet. Der Trennzyklus aus Filtration, Waschen und Spülung wurde dabei zehnmal hintereinander mit einer Modell Magnetpartikel-Suspension (Konzentration 3 g/l, Volumen 1 l) durchgeführt. Dazu wurde die aus der Fermentation von *Acremonium chrysogenum* erhaltene Fermentationsbrühe mit Hilfe einer Filterzentrifuge (HERMLE SIEVA-2) von der Biomasse befreit.

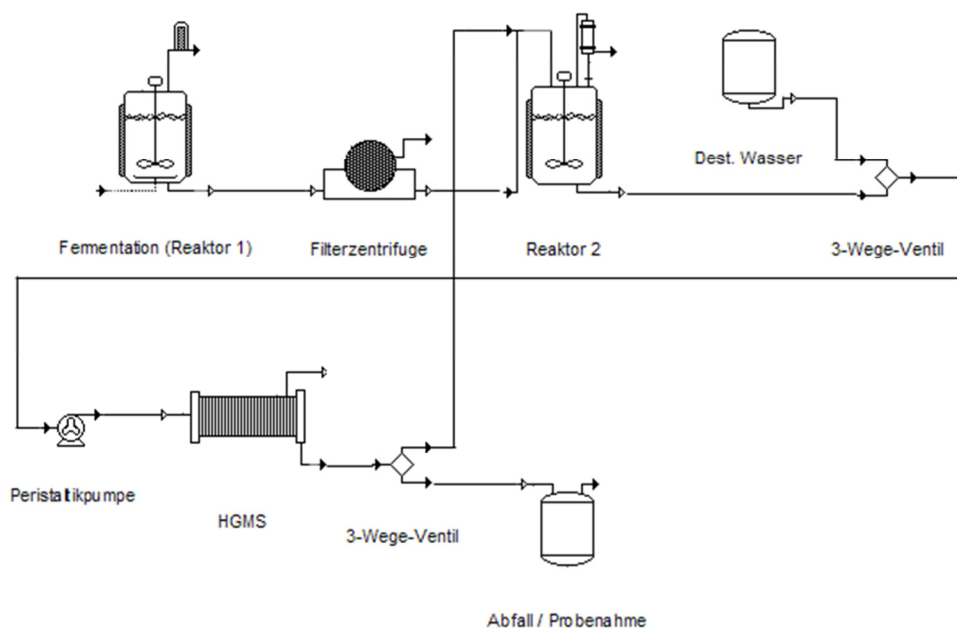


Abb. 53: Verfahrensschema der Reaktorkaskade zur Produktion und integrierter Aufarbeitung von Lactam-Antibiotika

Mit dem auf diese Weise erhaltenen Permeat wurde ein Minifors-Reaktor, in dem sich eine Magnetpartikel-Suspension (Konzentration 3 g/l, Volumen 500 ml) befand, auf 1 l aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde danach mittels des HGMS, in dem die Filtermatrix mit dem Abstand 1 mm eingebaut war, bei einem Volumenstrom von 100 ml/min aufgereinigt und gewaschen. Danach erfolgte eine Spülung der Separationskammer bei 500 ml/min, wobei der Abfluss in Reaktor 2 gesammelt wurde. Destilliertes Wasser wurde dabei zum Ausspülen verwendet als Supplement für ein später zu verwendendes Elutionsmittel. Diese Elutionssuspension wurde wiederum im HGMS separiert (100 ml/min), mit destilliertem Wasser gespült

(500 ml/min) und der Abfluss in Reaktor 2 gesammelt. Mit dem Permeat der Fermentationsbrühe aus Reaktor 1 wurde Reaktor 2 auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt, so dass der gesamte Vorgang aus Adsorption und Elution wiederholt werden konnte. Auf diese Weise wurden 10 Zyklen, d.h. die jeweils fünfmalige magnetische Separation des Permeats der Fermentationsbrühe (Adsorption) und des Eluenten, durchgeführt. Durch eine minütliche Probenahme des Abflusstroms und der Ausgangskonzentrationen der Gemische konnte so eine Stoffstrom-Bilanzierung erfolgen. Die Adsorption und Elution des Antibiotikums aus der Fermentationsbrühe aus Reaktor 1 erfolgt sukzessive. Dies soll eine halbkontinuierliche Aufarbeitung des Antibiotikums ermöglichen. Die Auswertung der Proben erfolgte anschließend über eine Messung der optischen Dichte.

Nach zehn Zyklen betrug die Endkonzentration der Partikel im Reaktor 1,88 g/l. Dies wurde anhand einer gravimetrischen Probemessung bestimmt. Damit betrug der Gesamtverlust nach 10 Zyklen 1,12 g, im Durchschnitt also circa 0,11 g pro Zyklus, dies entspricht etwa 3,5 % der eingesetzten magnetischen Partikel. Ein negativer Einfluss des Mediums auf die Abtrennbarkeit der magnetischen Partikel konnte nicht festgestellt werden.

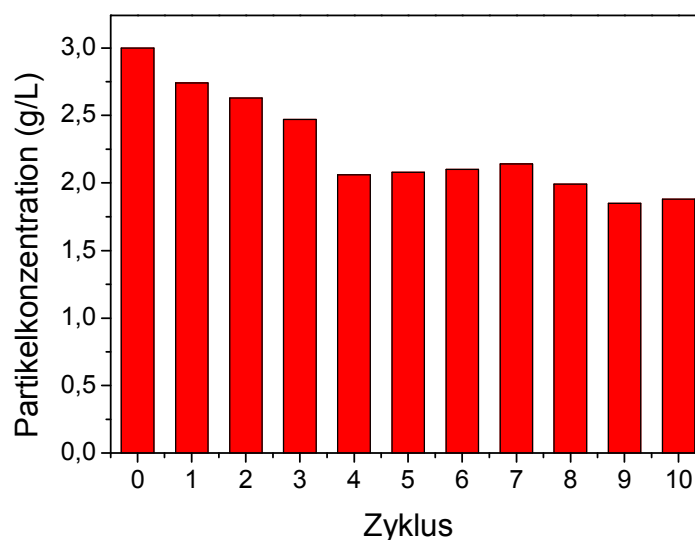


Abb. 54: Verlauf der Partikelkonzentration über mehrere Zyklen der HGMS-Filtration mit Modellmagnetpartikeln.

Ein Filterdurchbruch der Partikel wurde in keinem der Zyklen erreicht. Demnach resultiert der Partikelverlust nur im geringen Maße an nicht abgetrennten Partikeln.

Die Hauptverluste sind demnach eher beim Waschen oder bei Ablagerungen in der Versuchssperipherie zu suchen. Während der aufeinanderfolgenden Zyklen kommt es zu einer Akkumulation von 0,24 g Partikeln auf der Gittermatrix, die nicht resuspendiert werden konnten. Dies resultiert hauptsächlich aus der ersten Separation, danach stellt sich ein Gleichgewicht auf der Matrixoberfläche ein.

Die Bilanzierung der HGMS lieferte den Befund, dass auch nach mehreren Trennzyklen ein Verlust an Partikeln auftritt und sich für das komplette System nach 10 Zyklen noch kein Gleichgewicht eingestellt hat. Da die Herstellung magnetischer Adsorberpartikeln kostenintensiv ist, müssen, um eine wirtschaftlich interessante Alternative zu den herkömmlichen Methoden darzustellen, die Verlustquellen weiter minimiert werden. Dies könnte insbesondere durch eine Verbesserung der Trenneigenschaften der Matrix sowie durch Verbesserung des Schlauchsystems erfolgen.

Der Aufbau des Prozesses im Labormaßstab war erfolgreich. Der Prozess konnte über mehrere Trennzyklen betrieben und analysiert werden. Als letzter Schritt zur halbkontinuierlichen Aufarbeitung der Antibiotika muss die Filterzentrifuge in dem Prozess (siehe Abb. 53) durch ein System ersetzt werden, das es ermöglicht, die Fermentationsbrühe kontinuierlich von der Biomasse zu trennen. Realisiert werden sollte dies mittels einer in-situ Probenahmesonde, die mit einer Membran ausgestattet ist. Durch den Einsatz dieser direkten Filtration soll über die Membran die Biomasse zurückzuhalten und das Medium in Reaktor 2 mit den magnetischen Adsorbentien überführt werden. Um ein Zusetzen der Membran mit Biomasse zu minimieren, soll nach der Separation des Mediums frisches Medium über diese Probenahmesonde zugeführt werden. Das Institut für Technische Chemie der Universität Hannover stellte eine entsprechende Probenahmesonde für erste Versuche zur Machbarkeit zur Verfügung gestellt. Die bereitgestellte Membran erwies sich jedoch als zu engmaschig und es kam zu deren nahezu sofortigen Verblockung. Eine Membran mit größeren Porenradien konnte bisher noch nicht untersucht werden. Sollte dies nicht erfolgreich sein, wäre auch eine vorgeschaltete Rückhaltung der Biomasse mit magnetischen Partikeln denkbar. In Kap. 6.3.3.6 konnte bereits gezeigt werden, dass es möglich ist, die filamentöse Biomasse mittels magnetischer Partikel und einem Permanentmagneten zurück zuhalten. Ein Einfluss

der Beads auf das Biomassewachstum konnte mit Hilfe zweier Fermentationen ausgeschlossen werden.

7 Erwartete und erzielte Ergebnisse

Februar 2012 = Projektmonat 28

Arbeitspaket (Partner)	Geplantes Ende [Projektmonat]	Abgeschlossen [%]
AP 1: Grundbeschichtung der magnetischen Adsorber (instrAction)	4	90 %
AP 2: Derivatisierung der Adsorber (instrAction)	6	100 %
AP 3: Synthese der Rezeptorphasen für Carbapeneme und deren Charakterisierung in synthetischen Medien (instrAction/BioVT)	16	100 %
AP 4: Untersuchung der Recyclierbarkeit des eingesetzten Adsorbermaterials (instrAction/BioVT)	13	90 %
AP 5: Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeiten der adsorbierten Carbapeneme (BioVT)	17	100 %
AP 6: Vergleich mit kommerziellen Adsorbentien (BioVT)	17	100 %
AP 7: Test der Adsorbermaterialien in Realmedien (BioVT)	13	100 %
AP 8: Up-Scaling der Synthese der Adsorber (instrAction)	26	90 %
AP 9: Test der Adsorber im Fermentationsverfahren (BioVT)	28	70 %
AP 10: Integration des HGMS und Wiedergewinnung/Redispergierung der Magnetbeads (BioVT & Kampeis)	23	80 %
AP 11: In-line-Analytik zur Beurteilung des Trennverhaltens von Hochgradienten-Magnetfiltern (BioVT & Kampeis)	28	100 %
AP 12: Bestimmung der Bindungskinetiken (BioVT & Diller)	17	100 %
AP 13: Untersuchung von Umweltentlastungseffekten	28	90 %

8 Betrachtung der Ökoeffizienz

Eine Bewertung der ökonomischen und ökologischen Sparpotentiale der Produktion des Antibiotikums Imipenem für zwei Prozessschritte wurde durchgeführt. Die Synthese ist sowohl auf chemischen Weg als auch fermentativ möglich. Die chemische Synthese beruht auf Ergebnissen der Firma Merck [8]. Hierbei wird ausgehend von Dibenzylasparginsäure in einem zehnstufigen Reaktionsweg ein Keto-Zwischenprodukt hergestellt. Die Ketoverbindung wird üblicherweise für die europäische Produktion zugekauft und anschließend derivatisiert. Als alternatives Herstellungsverfahren dient die Fermentation von *Streptomyces sp.*. Im Zwischenbericht 2010 wurde eine Beschreibung des Fermentationsprozesses und der Aufarbeitung nach Treiber et al. [9] der Auslegungsbetrachtung zugrunde gelegt. Hierbei wird nach einer Rührkesselfermentation durch zwei Filtrations- und zwei Chromatographieschritte die Aufreinigung des Thienamycin durchgeführt.

Die Gegenüberstellung aller Prozesse durch Prozessmodellierung wurde mit der Software SuperPro Designer durchgeführt. Zum Vergleich der Prozesse wurde die Produktion von 1,2 kg Antibiotikum zugrunde gelegt. Eine Gegenüberstellung der eingehenden und ausgehenden Stoffströme der beiden Synthesewege ist in den Tab. 13 und Tab. 14 gegeben.

Tab. 13: Ein- und ausgehende Stoffströme der chemischen Synthese von Thienamycin nach Kalkulationen der Software SuperPro Designer.

Komponente	Eingehend [kg/Batch]	Ausgehend [kg/Batch]
Acetonitril	21.586	21.586
Platinoxid	1.030	1.030
Ethylacetat	595.554	595.554
Diisopropylethylamin	953	318
Diphenylchlorphosphat	968	290
N-p-Nitrobenzyloxycarbonylcysteamin	968	290
Diazoderivativ	6.286	528
Bicyclisches Keton	0	4.754
Keton-Derivativ	0	414
Enolphosphat	0	756
Enol-Derivativ	0	344
Geschütztes Thienamycin	0	275
Rhodiumdiacetat	187	187
Toluol	381.489	381.489
Tetrahydrofuran	538.663	538.663
Morpholinpropan	302.890	302.890
Thienamycin	0	1.207
Wasser	15.706	15.706
Gesamt	1.866.282	1.866.284

Tab. 14: Ein- und ausgehende Stoffströme der fermentativen Synthese von Thienamycin nach Kalkulationen der Software SuperPro Designer.

Komponente	Eingehend [kg/Batch]	Ausgehend [kg/Batch]
Ammoniumsulfat	606	606
Biomasse	41	5.622
CO ₂	0,00	20.376
Kohlensäurehaltiges Wasser	3.986	3.986
Maisquellwasser	1.241	1.242
Glucose	12.402	0,00
Stickstoff	81.015	81.066
Sauerstoff	24.595	9.847
Thienamycin	0,00	1.207
Wasser	109.340	109.803
Gesamt	233.226	233.753

Es ist zu erkennen, dass die aufgewendeten Lösungsmittel für eine chemische Synthese die der Fermentation um einen Faktor von 8 übertreffen. Hierbei sind vor allem hohe Mengen an Ethylacetat, Tetrahydrofuran und Toluol notwendig. Es ist

davon auszugehen, dass eine Aufreinigung der genannten organischen Lösungsmittel erfolgt. Die hierzu angewandten Methoden sind in der Fachliteratur nicht beschrieben, so dass zunächst lediglich ein Vergleich der Stoffströme durchgeführt werden kann. Die Bilanzierung der Thienamycin-Fermentation zeigt, dass neben 110 m^3 Wasser vorwiegend die Gase Stickstoff und Sauerstoff zur Fermentation eingesetzt werden.

Ergänzend zu den beiden oben beschriebenen Verfahrenswegen wurde ein Prozessmodell für die Fermentation und Magnetseparation unter Anwendung neuer Messergebnisse aus dem Projekt etabliert. Das Verfahrensfliessbild des Prozesses ist in Abb. 55 dargestellt. Die prinzipielle Prozessauslegung basiert auf dem Antibiotikum Cephalosporin, kann jedoch mit geringen Modifikationen auf die Produktion von Thienamycin oder Imipenem umgestellt werden. Für die Produktion wurden Vor- und Hauptfermentation mit Zeiträumen von je 140 h berücksichtigt. Aufgrund des filamentösen Wachstums wird die Biomasse mit einem Vorfilter im Bioreaktor zurückgehalten und der Überstand inklusive Antibiotikum in einen Adsorptionsreaktor überführt. Hier erfolgt, nach Absenkung des pH-Werts, die Zuführung von Magnetpartikeln. Deren Rückhaltung wird in einem nachfolgenden HGMS-Filtrationsprozess durchgeführt, der in der Simulation als Kombination eines Dead-End-Filters und eines Reaktors erfasst wird. Das Antibiotikum wird innerhalb des Filters mit wässrigem Methanol eluiert. Die Partikel werden recycelt, der Produktstrom zunächst in einer Kolonne destilliert. Die abgetrennte Methanolphase kann wiederverwendet werden, die wässrige Phase wird in einem weiteren Reaktor auf $5 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und der pH-Wert erhöht. Hierbei fällt das Antibiotikum kristallin aus und kann in einem Hydrozyklon abgetrennt werden. Die ein- und ausgehenden Stoffströme, die bei der Produktion von 1,2 kg des Produkts benötigt werden, sind in Tab. 15 wiedergegeben.

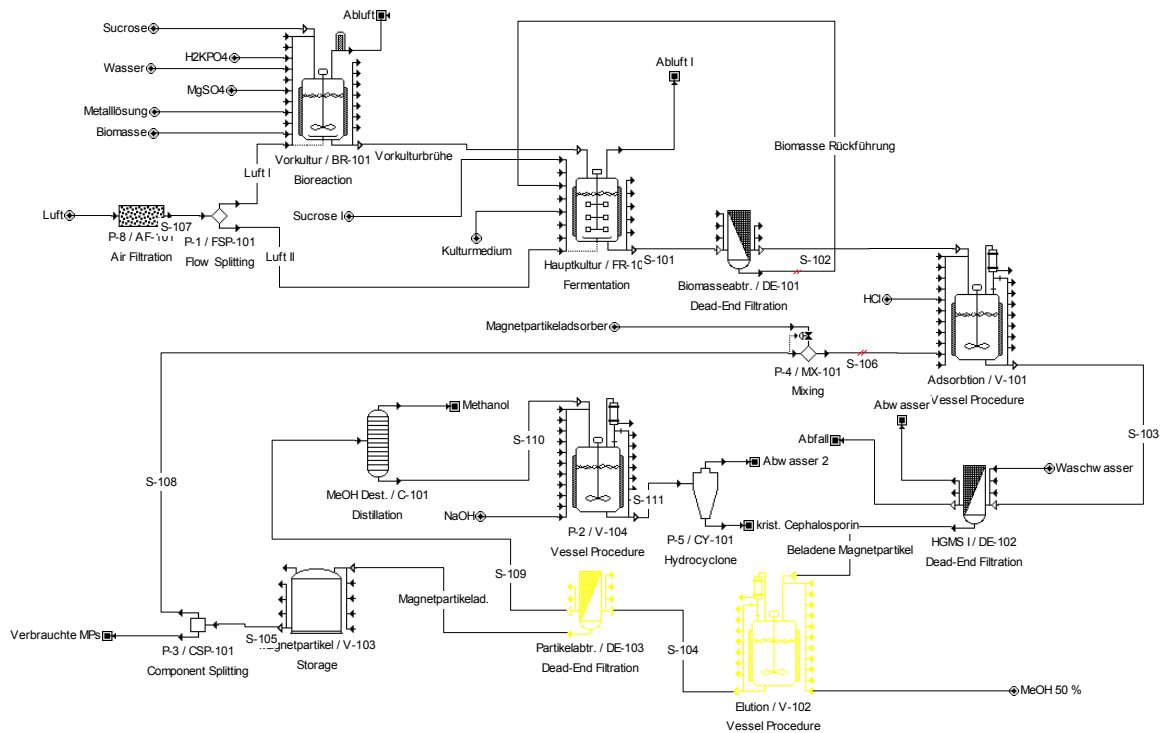


Abb. 55: Verfahrensfließbild der Stoffstromsimulation der β -Lactam-Antibiotikum Fermentation und der anschließenden Produktaufreinigung durch Hochgradient-Magnetseparation. Die gelb markierten Operationen repräsentieren die in-situ Elution in einer HGMS-Kammer.

Tab. 15: Ein- und ausgehende Stoffströme der fermentativen Synthese unter HGMS-Aufarbeitung von Cephalosporin C nach Kalkulationen der Software SuperPro Designer.

Komponente	Eingehend [kg/Batch]	Ausgehend [kg/Batch]
Ammoniumsulfat	98,9	98,9
Ammonium-Eisen	0,0	0,0
Erschöpfte Magnetpartikel	0,0	96,1
Biomasse	13,1	0,0
Kristallines Cephalosporin	0,0	1,2
D/L Methionin	39,6	39,6
Dihydrogenkaliumphosphat	221,5	221,5
Salzsäure	13,1	0,0
Hydrogendikaliumphosphat	205,9	205,9
Magnesiumsulfat	0,5	0,5
Magnetpartikel	90,8	0,0
Methanol	11.976	11.976
Natriumhydroxid	10,0	0,0
Natriumsulfat	22,4	22,4
Saccharose	784,8	274,7
Wasser	24.637	24.637
Ölsäure	19,8	19,8
Gesamt	13.521	12.921

Die Massenbilanz des geplanten Gesamtprozesses ist in Hinsicht auf den Verbrauch des Substrats Saccharose und der produzierten Biomasse noch ungenau. Des Weiteren wird von einer vollständigen Rückgewinnung der Biomasse ausgegangen, wie an dem ausgehenden Stoffstrom Biomasse von $0,0 \text{ kg} \cdot \text{batch}^{-1}$ zu erkennen ist. Der Verlust von $96,1 \text{ kg}$ Magnetpartikel pro Batch tritt aufgrund einer momentan unvollständigen Regeneration der Partikel nach Adsorption des Antibiotikums auf und zeigt Verbesserungsbedarf in Bezug auf das Magnetpartikelrecycling auf.

Im Vergleich zu den zuvor betrachteten Aufreinigungsprozess nach Treiber et al. [9] ist zu erkennen, dass durch die innovative Aufarbeitungsstrategie erheblich geringere Wassermengen benötigt werden. Diese betragen ca. ein Viertel der zuvor bestimmten. Die pro Kilogramm Produkt anfallende Abwassermasse mit Resten der Fermentationssalze wird anhand der Simulation auf $4,2 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$ geschätzt. Die Emissionen beschränken sich, wie üblich bei Fermentationen, auf Stickstoff, Sauerstoff und geringe Mengen Kohlenstoffdioxid. Im Bereich organischer Lösungsmittel ist mit der Verschleppung von $1,1 \text{ kg}$ Methanol in das Endprodukt zu rechnen. Dieses würde im Rahmen einer Produkttrocknung in die Atmosphäre

entweichen. Die notwendige Energie zur Erzeugung eines Kilogramms Produkt beträgt ca. 1.470 kWh. Des Weiteren wird ein Bedarf von ca. 400 m³ Kühlmittel und 2.400 kg Dampf approximiert. Ein großer Anteil der Energie wird zur Destillation des Methanols und der Kühlung zu dessen Kristallisation genutzt. Eine Verringerung des Anteils dieser Prozessschritte wird durch geschicktere Wahl an Elutionsmittel und Optimierung der Produktaufarbeitung bei der zukünftigen Prozessplanung berücksichtigt.

9 Diskussion

Die Suche nach einem Bindungsmotiv für das Imipemen dauerte länger als ursprünglich veranschlagt, da die Bedingungen der Fermentation (pH 7,4 min 50 mM NaCl) eine Bindung des zwitterionischen Zielmoleküls Imipenem mit einem pI-Wert von 7 an eine Adsorberoberfläche erschweren. Die Tatsache, dass es trotzdem gelungen ist, eine geeignete Ligandenkombination zu finden, zeigt das große Potential, das die Plattformtechnologie der InstrAction bietet.

Die zweite große Problemstellung in dem Projekt bestand darin, dass für die Beschichtung geeignete Trägermaterialien identifiziert werden mussten. Zu Beginn des Projektes wurden solide Partikel eingesetzt. Diese waren zum Teil kommerziell verfügbar zum Teil wurden sie von der TU Kaiserslautern hergestellt. Auf diese nicht porösen Partikel ließ sich das InstrAction Polymernetzwerk mit den bei der InstrAction etablierten Methoden nicht aufbringen bzw. die Schichten waren nicht stabil. Die Beschichtung wurde bei der weiteren Derivatisierung wieder vom Träger gewaschen. Die alternativen Beschichtungsmethoden führten auch nicht zu den gewünschten stabilen Beschichtungen auf den magnetischen Trägermaterialien. Erst ca. 6 Monate von Projektende wurden mit den porösen SiMag-Partikeln der Firma Chemicell GmbH ein Ausgangsmaterial verfügbar, auf dem dann eine stabile Beschichtung aufgebracht wurde, die anschließend erfolgreich mit den Liganden für das Bindungsmotiv derivatisiert werden konnten. Dieses Ausgangsmaterial ist noch nicht optimal, weil es zum einen zu große Poren besitzt und zum anderen ist das insgesamt verfügbare Porenvolumen deutlich kleiner als bei üblichen Kieselgelen, die in der Chromatographie eingesetzt werden. Die Beladung der beschichteten

magnetischen Partikel bezogen auf die Masse für das Imipenem ist daher deutlich geringer als auf den instrAction Kieselgel-Phasen, auf denen das Bindungsmotiv im Screening identifiziert wurde und in der Optimierung angepasst wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass die Adsorber stabil in mehreren Zyklen einsetzbar sind, jedoch aufgrund unzureichender Elution nach dem ersten Adsorptionszyklus an Kapazität einbüßen. Die Degradation des Antibiotikums während der Aufarbeitung mit den Adsorbentien konnte minimiert werden. Der Einsatz der Adsorbentien in Realmedien konnte untersucht und als erfolgreich bewertet werden. Langfristige Untersuchungen des Einflusses von Reaktionsmedien und metabolischer Nebenprodukte konnten aufgrund der späten Etablierung der Synthese und geringer Adsorbentienmengen nicht erschöpfend durchgeführt werden. Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine selektive Bindung auch in Gegenwart zahlreicher Fremdstoffen hin.

Zur Untersuchung sowohl der Adsorption als auch der Elution zwischen Adsorbentiensubstrat und Antibiotikamolekül wurden FTIR-ATR sowie UV/Vis spektroskopische Methoden erfolgreich etabliert. Es konnten die Adsorbentienmaterialien und die Antibiotikamoleküle im gelösten und adsorbierten Zustand charakterisiert, sowie die Bindungskinetik analysiert werden. Die neuen Methoden erlauben zukünftig eine schnelle und zerstörungsfreie Analyse des Aufreinigungsverlaufs und lassen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf vergleichbare Prozesse zur Antibiotikagewinnung transferieren.

Als weitere analytische Methode wurde die direkte Beobachtung der Anlagerungszonen magnetischer Mikrosorbentien im HGMS-Filter unter Wirkung eines äußeren Magnetfelds etabliert. Neben der kontinuierlichen Aufnahme und der vollautomatischen Auswertung mittels Bildanalyse wurde diese als Inline-Analytik realisiert sowie eine Strategie zur Prozess-Steuerung erarbeitet. Die entwickelten Technologien haben das Verständnis der magnetischen Trennprozesse erweitert und können in Zukunft für weitere wissenschaftliche Problemstellungen in diesem Bereich eingesetzt werden.

Die Abtrennung der stark filamentösen Biomasse von den magnetisierbaren Mikropartikeln ist nicht vollständig gelungen. Aus diesem Grund wurde eine einfache

Vorfiltrationsstufe zur Abtrennung der makroskopischen Filamente in den Prozess integriert. Diese Verfahrensentwicklung wurde in Form einer Reaktorkaskade aus zwei Reaktoren und dem HGMS erfolgreich etabliert. Im technischen Maßstab wäre eine solche Vorfiltration durch konventionelle Walzen- oder Zentrifugenfilter realisierbar.

10 Kooperation innerhalb des Projekts

Im Rahmen von sechs Treffen aller Projektpartner wurden Ergebnisse ausgetauscht und über Probleme diskutiert. Zusätzlich wurden verschiedene Online-Konferenzen zwischen den Kooperationspartnern durchgeführt. Da es sich bei dem Lehrstuhl des Unterauftragnehmers Prof. Diller und dem Lehrstuhl von Prof. Ulber um Arbeitsgruppen der gleichen Universität handelt, stehen diese beiden Arbeitsgruppen in ständigem Kontakt. Zwischen der Arbeitsgruppe des Nebenauftragnehmers Prof. Kampeis und dem Lehrstuhl von Prof. Ulber bestehen neben diesem Projekt noch weitere Kooperationen, sodass im Rahmen zahlreicher Treffen und Telefonkonferenzen hier die ständige Kommunikation gewährleistet ist.

Die Arbeitsgruppe des Umwelt-Campus Birkenfeld der FH Trier hat insbesondere mit der TU Kaiserslautern eng zusammen gearbeitet. So wurde z. B. die Geometrie der Filterkammer sowie der Filtermatrix gemeinsam weiter entwickelt.

11 Veröffentlichungen, Literatur, Präsentationen, Patente

11.1 Veröffentlichungen und Präsentationen

- [1] A. Pasteur, B. Ludwig, S. Maurer, N. Tippkötter, P. Singer, C. Meyer, K. Gottschall, P. Kampeis, R. Diller, R. Ulber: Entwicklung selektiver Adsorbermaterialien zur Aufarbeitung von β -Lactamantibiotika. Bioprozessorientiertes Anlagendesign, Nürnberg, 10.05.2010
- [2] A. Pasteur, B. Ludwig, E. Hackemann, N. Tippkötter, P. Singer, C. Meyer, K. Gottschall, P. Kampeis, R. Diller, B. König, R. Ulber: Aufarbeitung von β -Lactamantibiotika mittels selektiver, magnetischer Adsorbermaterialien. Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, 21.09.2010

- [3] N. Tippkötter, S. Maurer, A. Pasteur, P. Kampeis, R. Ulber: Hochgradienten-Magnetseparation von Fermentationsprodukten – Finite Elemente Simulation der Filtermatrix. ProcessNet Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, 22.09.2010
- [4] A. Pasteur, B. Ludwig, P. Singer, N. Tippkötter, C. Meyer, P. Kampeis, R. Diller, R. Ulber, Synthese magnetisierbarer Nanopartikel-Silicabeads zur Abtrennung von β -Lactam-Antibiotika aus Fermentationsmedien. NanoKat Frühjahrstagung, Kaiserslautern 14.04.2011
- [5] Feind, D.; Lieblang, M.; König, S.; König, B.; Meyer, C.; Ulber, R.; Kampeis, P.; Automatisierter Prozessabbruch bei der Hochgradienten-Magnetfiltration durch ein optisches Verfahren zur Bewertung der Magnetbead-Anlagerungszonen in der Filtermatrix; Poster, GVC / Dechema-Vortragstagung "Bioverfahrenstechnik an Grenzflächen", Potsdam, 30.05.2011
- [6] A. Pasteur, B. Ludwig, M. Zhang, N. Tippkötter, J. Ernst, P. Singer, R. Diller, P. Kampeis, B. König, C. Meyer, R. Ulber: Purification of β -lactam antibiotics with magnetisable particle systems. 1st European Congress of Applied Biotechnology, Berlin, 25.09.2011
- [7] N. Tippkötter, S. Wollny, A. Pasteur, R. Ulber: Biofunktionalisierte Nano- und Mikropartikel für ernährungsrelevante und medizinische Anwendungen, Technologietag Mainz, 29.11.2011

12 Literaturquellen

- [1] TSUKINAKA YAMANAX and AKIRA TSUJI: Comparative Stability of Cephalosporins in Aqueous Solution: Kinetics and Mechanisms of Degradation, Journal of Pharmaceutical Science, Vol. 65, No. 11, 1563-1574, 1976
- [2] J. Konecny et al.: Kinetics of the hydrolysis of cephalosporin C, The Journal of antibiotics, Vol. XXVI No. 3, 135-141, 1972
- [3] M. Franzreb, Magnettechnologie in der Verfahrenstechnik wässriger Medien, Dissertation, Karlsruhe, 2003.
- [4] M. Fran, Entwicklung und experimentelle Überprüfung eines Modells der magnetischen Filtration von magnetithaltigen Schwermetallhydroxiden, Universität Karlsruhe, Karlsruhe, Dissertation 1997
- [5] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, Polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: Auswirkungen auf ds Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren, Angewandte Chemie, 1998, 110, 2908-2953
- [6] S. Yang, D. Pyle: The adsorption kinetics of cephalosporin-c on non-ionic polymeric macropore Amberlite XAD-16 resin. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 74, 216 – 220, 1999.
- [7] G. Smith, G. Dezeny, A. Douglas: Stability and Kinetics of Degradation of Imipenem in Aqueous Solution, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 79, No. 8, 732-740, 1990
- [8] US-Patent 4,269,772
- [9] Treiber LR, Gullo VP, Putter I, Procedure for Isolation of Thienamycin from Fermentation Broths, Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIII, Pp. 1255-1265 (1981)

13 Projektkennblätter (TU KL, instrAction GmbH)

11/99		Projektkennblatt der Deutschen Bundesstiftung Umwelt			
Az	13240	Referat	32	Fördersumme	302.195,00 €
Antragstitel		Förderschwerpunkt Biotechnologie: ChemBioTec: Entwicklung innovativer selektiver Adsorbentmaterialien zur ökoeffizienten Aufarbeitung von beta-Lactamantibiotika			
Stichworte		Abfall, Abwasser, nachwachsende Rohstoffe, Schwerpunkt-Biotechnologie Verfahren, Mikrobiologie, Downstreamprocessing, Umweltchemikalien			
	Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)	
	28 Monate	01.11.2009	29.02.2012	2	
Zwischenberichte		nach 6 und 14 Monaten			
Bewilligungsempfänger		Technische Universität Kaiserslautern		Tel: 0631-205-4043	
		FB Maschinenbau und Verfahrenstechnik		Fax: 0631-205-4312	
		Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik		Projektleitung Prof. Ulber	
		Gottlieb-Daimler-Str. 67663 Kaiserslautern		Bearbeiter Benjamin Ludwig, Aline Pasteur	
Kooperationspartner		instrAction GmbH, Donnersbergweg 1 67059 Ludwigshafen			
Zielsetzung und Anlass des Vorhabens					
Ziel des Vorhabens ist die selektive Isolierung von fermentativ hergestellten beta-Lactamantibiotika aus komplexen Stoffgemischen via magnetischer Separation. Das Verfahren soll im frühen Stadium der Aufarbeitung eingesetzt werden, um die Antibiotika zu stabilisieren und damit die Ausbeute an Produkt zu erhöhen. Durch die magnetische Separation im HGMP-System ist eine Fest/Fest/Flüssig-Trennung möglich was im Downstream-Prozess einen erheblichen Zeitgewinn darstellt. Zusätzlich kommt es zu einer Einsparung an Lösungsmittel und Energie innerhalb des Prozesses, was in ökologischer Hinsicht einen interessanten Aspekt darstellt.					
Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden					

Zunächst soll die Beschichtung verschiedener kommerzieller und eigens hergestellter magnetischer Partikel sowie die Synthese selektiver Rezeptorphasen für Carbapeneme durch die Fa. instrAction realisiert werden. Die Bestimmung des Polymergehaltes erfolgt durch gravimetrische Messungen; die Nanoporesität wird mittels inverser GPC abgeschätzt. Zur Identifikation des Adsorbers mit optimaler Bindungskinetik, bester Bindungskapazität, günstigsten Bedingungen für Elution und damit vollständiger Entfernung der Antibiotika, werden Trennversuche zur Bestimmung von Reinheit und Ausbeute des Zielprodukts in Modellmedien durchgeführt und Bindungseigenschaften sowie Hydrolyseprozesse mit Hilfe von HPLC-Methoden und photometrisch mittels UV/Vis-Spektroskopie charakterisiert. Um mögliche Biofouling-Prozesse identifizieren zu können, werden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Bestimmung der Bindungskinetik und Oberflächenbeladung wird mittels FTIR-Spektroskopie durch den Unterauftragsnehmer Herrn Prof. Diller vorgenommen. Zur Beurteilung und Steuerung der Magnetfiltration soll eine neue optische In-line-Analytik in das HGMS-System integriert werden. Dies wird von Herr Prof. Kampeis realisiert. Nach Abschluss der Charakterisierung und Optimierung der Modellsysteme soll eine Integration in den beta-Lactamprozess vorgenommen werden. Hierzu werden Vorversuche im sequenziellen Betrieb durchgeführt, was bis hin zur kontinuierlichen Abtrennung des Antibiotikums optimiert wird. Abschließend wird eine Untersuchung von Umweltentlastungseffekten mit der Software SuperPro Designer durchgeführt.

Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel. 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • <http://www.dbu.de>

Ergebnisse und Diskussion

Für die Analytik der Adsorptionen und deren Kinetik wurden erfolgreich FTIR-ATR-Methoden entwickelt, die auf neue Adsorberphasen und weitere Antibiotika übertragbar sind. In bisherigen Studien konnte die Bindung und Elution von Imipenem auf verschiedenen Adsorbentien verfolgt werden. Die Untersuchung der Adsorption des Cephalosporin C auf kommerziell verfügbaren Adsorbentien, sowie der instrAction-Phase ND 10322, mittels FTIR-ATR-Methode und die Identifizierung der wechselwirkenden Adsorbentien- und Molekülgruppen wird somit möglich.

Die Adsorptionsuntersuchungen (Adsorptionsisothermen) an Adsorbentien haben gezeigt, dass Bindung von β -Lactam-Antibiotika bis zu 540 mg/g möglich sind. Hierbei konnten je nach Adsorbentien Modelle nach Langmuir oder Brunauer, Emmet und Teller zugrunde gelegt werden. Adsorptionsversuche im Fermentationsmedium mit hydrophoben Partikelsystemen zeigen, dass trotz zahlreicher Fremdkomponenten eine Antibiotikabindung von bis zu 60 % des Referenzwertes im wässrigen Medium erreicht werden können. Diesbezügliche Untersuchungen werden in den kommenden Monaten ergänzt und abgeschlossen. Die bisher erfolgreiche Adsorption an instrAction-Phasen sollte nach gezielter Veränderung der ionischen Gruppen auf der Adsorptionsphase in Wasser und im Medium für Cephalosporin C deutlich steigerungsfähig sein. Besonders im Hinblick auf die Elution muss das Verfahren weiter optimiert werden. Aus den Erfahrungen mit kommerziellen Systemen bieten sich als ionische Gruppen tertiäre Amine als Ergänzung zu den aromatischen Gruppen auf der instrAction-Phase an.

Die Auswahl und Synthese eines optimalen magnetischen Ausgangsmaterials zur Aufbringung der selektiven Phase ist noch nicht zufriedenstellend gelöst. Die Versuche die Beschichtungstechnologie auf nicht poröse Partikel zu übertragen führten bislang nicht zu ausreichenden Oberflächenkapazitäten für die Einführung von Rezeptorgruppen.

Durch die Neukonstruktion der magnetischen Filterkammer konnte die In-line-Analysentechnik erfolgreich etabliert werden. Die neue Geometrie der Filterkammer inkl. der Beleuchtung muss nun in eine Konstruktion überführt werden, die den steriltechnischen Anforderungen (CIP, SIP) des betrachteten Produktionsprozesses gerecht wird. Zudem ist mittels HGMF zu ermitteln, welches Abbruchkriterium zu setzen ist, um einerseits eine möglichst lange Filterlaufzeit zu gewährleisten und andererseits einen Filterdurchbruch sicher zu vermeiden. Zudem müssen in der Software Matrox weitere Optimierungen im Programmablauf vorgenommen werden.

Die Einbindung einer halbkontinuierlichen HGMF in den β -Lactam-Fermentationsprozess wird zurzeit im Rahmen einer Vertiefungsarbeit an der TU Kaiserslautern vorgenommen. Eine entsprechende Reaktionskaskade wurde gebaut und Vorversuche haben begonnen. Zusätzlich werden Simulationen

des Kammerinneren durchgeführt und die Filtermatrix weiter optimiert. Die Vorarbeiten hierzu sind dem Bericht von 2010 zu entnehmen.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

- A.Pasteur, B.Ludwig, S.Maurer, N.Tippkötter, P.Singer, C.Meyer, K.Gottschall, P.Kampeis, R.Diller, R.Ulber: Entwicklung selektiver Adsorbermaterialien zur Aufarbeitung von β -Lactamantibiotika. Bioprozessorientiertes Anlagendesign, Nürnberg, 10.05.2010
- A.Pasteur, B.Ludwig, E.Hackemann, N.Tippkötter, P.Singer, C.Meyer, K.Gottschall, P.Kampeis, R.Diller, B.König, R.Ulber: Aufarbeitung von β -Lactamantibiotika mittels selektiver, magnetischer Adsorbermaterialien. Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, 21.09.2010
- N.Tippkötter, S.Maurer, A.Pasteur, P.Kampeis, R.Ulber: Hochgradienten-Magnetseparation von Fermentationsprodukten – Finite Elemente Simulation der Filtermatrix. ProcessNet Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, 22.09.2010
- A.Pasteur, B.Ludwig, M.Zhang, N.Tippkötter, J.Ernst, P.Singer, R.Diller, P.Kampeis, B.König, C.Meyer, R.Ulber: Purification of β -lactam antibiotics with magnetisable particle systems, 1st European Congress of Applied Biotechnology, Berlin, 25.09.2011 (eingereicht)
- N. Tippkötter, A. Pasteur, P. Kampeis, R. Ulber, Fluid dynamic simulations for improved high gradient magnetic separation of beta-lactam producing bacteria 1st European Congress of Applied Biotechnology, Berlin, 25.09.2011 (eingereicht)

Fazit

Mit den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass ein Aufarbeitungsprozess für β -Lactamantibiotika entwickelt werden konnte, der nach weiterer Optimierung der Phasenoberfläche und der Partikelelution wirtschaftlich interessant wird. In ökologischer Hinsicht sind durch die Reduzierung der Arbeitsschritte erhebliche Einsparungen an Lösungsmitteln zu erwarten.