

Abschlussbericht des Projektes

„Flüssig-Flüssig-Extraktion im Downstream Processing – Verfahrensentwicklung in Kombination aus Modellierung und Miniplant-Technik“

Gefördert durch die Max-Buchner-Forschungstiftung

Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik
Technische Universität Clausthal

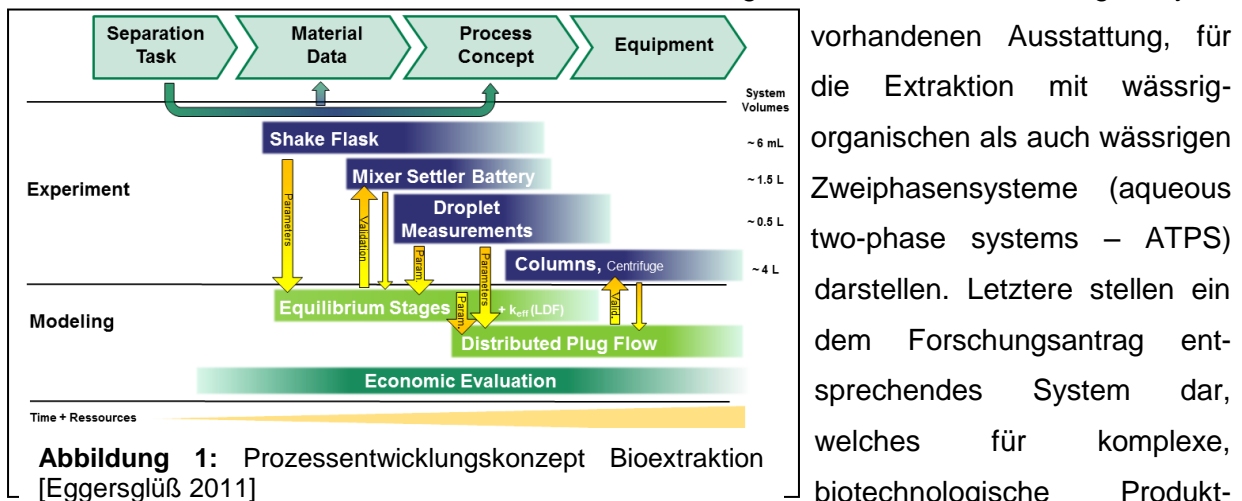
09.12.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Versuchsergebnisse	1
2.1	Schüttelversuche	1
2.2	Mixer-Settler-Batterie.....	2
2.3	Einzeltröpfenmessungen	3
2.4	Miniplant	4
2.5	Modellierung.....	5
3	Kostenstudie.....	7
4	Fazit	7
5	Literaturverzeichnis	8

1 Einleitung

Wie im Antrag dargestellt, sieht das Forschungsvorhaben eine Kombination von experimentellen Versuchen inklusive Modellparameterbestimmung und Modellierung vor (Konzept siehe Abbildung 1). Seit der Einreichung des Stipendienantrages wurden am Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik eine Einzeltropfenmesszelle, eine Miniplant-Anlage unter anderem mit 10-stufiger Mixer-Settler-Batterie, einer gerührten Kühni-Extraktionskolonne als auch eine pulsierte Packungsextraktionskolonne in Betrieb genommen und für erste Forschung verwendet. Parallel wurde die Modellierung der Flüssig-Flüssig Extraktion über Gleichgewichtsstufenmodelle und Distributed-Plug-Flow Modelle aufgebaut und optimiert. Folgend dargestellte Ergebnisse sollen exemplarisch Laborversuche, die Inbetriebnahmen, Charakterisierung als auch die Verwendung der jetzt



vorhandenen Ausstattung, für die Extraktion mit wässrig-organischen als auch wässrigen Zweiphasensystemen (aqueous two-phase systems – ATPS) darstellen. Letztere stellen ein dem Forschungsantrag entsprechendes System dar, welches für komplexe, biotechnologische Produkt-

ströme verwendet werden kann. Es ermöglicht den Einsatz der Extraktion in Bereichen, die klassischen organischen Lösungsmitteln verschlossen ist, da diese die Zielmoleküle irreversibel denaturieren können [Azevedo 2004].

Auf der Basis der durchgeführten Messungen und Berechnungen sind Veröffentlichungen eingereicht worden, auf die für detailliertere Betrachtungen der einzelnen Themen verwiesen wird [Eggersgluß 2012, Eggersgluß 2013, Eggersgluß 2014].

2 Versuchsergebnisse

2.1 Schüttelversuche

Schüttelversuche sind die Grundlage aller Extraktionsuntersuchungen. Es wird ein definiertes Volumen der Trägerphase mit einem definierten Volumen der Gegenphase gemischt. Nach Einstellung des Gleichgewichts durch Schütteln bzw. Rühren und

Phasentrennung wird die Zusammensetzung der beiden Phasen analysiert. Aus den erhaltenen Daten lassen sich Verteilungsgleichgewichte aller analysierten Komponenten, sowie zugehörige Selektivitäten, Massenbilanzen, Ausbeuten und Reinheiten errechnen. Schon vor Umsetzung eines realen Mehrstufenprozesses in einer Mixer-Settler-Batterie oder Kolonne, sollte eine Größenordnung für die maximal mögliche Aufreinigung ermittelt werden. Um die Abtrennbarkeit aller Nebenkomponten zu überprüfen, ist eine Kreuzstromextraktionsuntersuchung hilfreich. Der Zielphase wird immer neues Lösungsmittel zugeführt, gemischt und wieder abgetrennt. Dieser Lösungsmittelaustausch kann so oft wiederholt werden wie gewünscht. Auf Kosten der Ausbeute kann hier untersucht werden, ob mit immer frischem Lösungsmittel alle, auch in der Analytik verdeckte Komponenten, abtrennbar sind. Diese Entwicklung lässt sich auch in den Analytikergebnissen in Tabelle 3.5 wiederfinden. Nach vier Waschstufen verändert sich die Reinheit der Zielphase nur noch geringfügig.

Tabelle 1: Übersicht über die Analytikergebnisse der Kreuzstromextraktionsversuche mit System 1 [Eggersglüss 2014]

Stufe	Größenausschlusschromatographie				Protein A Analytik		
	Verteilungs- koeffizient MAB []	Reinheit Zielphase [%]	Gesamtausbeute MAB in ATPS [%]	Ausbeute MAB in Zielphase [%]	Reinheit Zielphase [%]	Gesamtausbeute MAB in ATPS [%]	Ausbeute MAB in Zielphase [%]
1	219	31	104	104	18	93	93
2	46	46	94	88	29	91	90
3	43	57	99	92	42	99	97
4	29	25	106	96	53	102	100
5	39	64	109	101	59	102	99
6	45	66	94	88	62	99	97
7	41	67	94	87	63	98	95
8	52	68	101	95	64	96	94
alle Stufen:	64		100	60		81	69

Festzustellen ist, dass nach einer Stufe eine Ausbeute von nahezu 100% in der Zielphase vorliegt und nach acht Kreuzstromstufen eine Reinheit von 64 bis 68 % erreichbar ist. Jede weitere realisierte Stufe wird die Reinheit nur noch geringfügig erhöhen. Daraus ergibt sich, dass die Reinheit der Trennung höchstwahrscheinlich asymptotisch an eine Grenze einer maximal möglichen Reinheit ausläuft.

2.2 Mixer-Settler-Batterie

Entsprechend des in der Einleitung vorgestellten Konzeptes der Prozessentwicklung, ist die Durchführung einer Trennung in einer Mixer-Settler-Batterie (MSB) der erste Schritt einer apparativen Umsetzung des mehrstufigen Trennprozesses. Folgend sollen die Ergebnisse eines MSB-Trenntests als Vorstufe einer apparativen Mehrstufenextraktion in einer

Extraktionskolonne vorgestellt werden. Für den MSB-Versuch wird eine Miniplant MSB des ITVP verwendet, welche 10 Stufen mit getrennter Mischkammer und DN 30 Abscheider sowie eine Zwangsförderung durch Mehrkanalpumpen besitzt. Das Anlagen-Hold-Up liegt bei 3,7 L und damit in der Dimension der später verwendeten Extraktionskolonne.

In der MSB wird ein zehnstufiger Waschversuch durchgeführt, welcher in der Praxis auf den Extraktionsschritt folgen würde. Da, wie vorgestellt, die Schüttelversuche in einer einstufigen Extraktion immer an die 100% Antikörperausbeute in der leichten Phase ergeben, sollte dabei nur ein einstufiger Extraktionsprozess notwendig sein. Die Ergebnisse der 10 stufigen Wäsche sind in Abbildung 2 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Chromatogrammfläche des MABs nahezu konstant bleibt, während von Stufe 10 zu Stufe 1 die Nebenkomponenten abnehmen. Damit sind in dieser Versuchsanordnungen Reinheiten von ~46% erreichbar. Die Ergebnisse des MSB-Versuches zeigen deutlich, dass eine Mehrstufenextraktion möglich ist und eine höhere Aufreinigung ermöglicht als die einstufige Extraktion. Eine Reinigung von ca. 10 % im Harvest auf 16 % in der leichten Phase einer einstufigen Extraktion steht der Aufreinigung um 36% (von 10 % auf 46 %) in der MSB gegenüber.

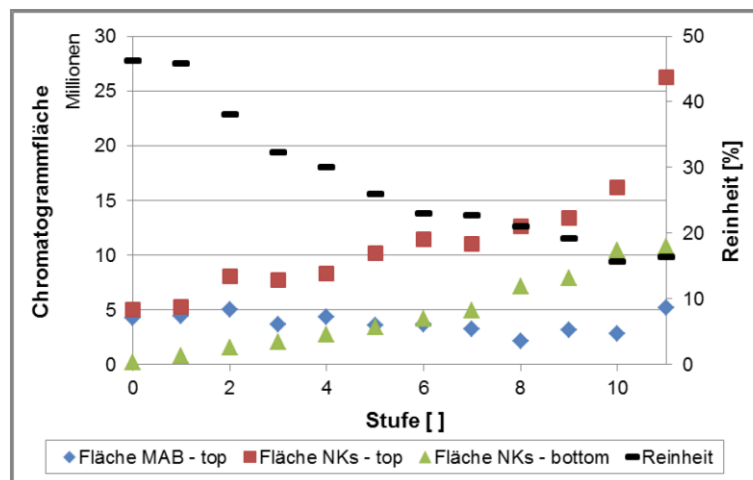


Abbildung 2: Ergebnisse der Mixer-Settler-Versuche [Eggersglüss 2014]

2.3 Einzeltropfenmessungen

Das Ziel der Einzeltropfenmessungen in einer Tropfenmesszelle ist die Analyse und das Verständnis von Phänomenen der Hydrodynamik und des Stoffübergangs am Einzeltropfen sowie die daraus ableitbare Extrapolation auf die Tropfenpopulation in einer Extraktionskolonne. Nach bestem Wissen des Autors, sollen hier das zweite Mal Ergebnisse für Tropfensedimentationsgeschwindigkeiten [Bhawsar et al. 1994] und das erste Mal für den Einzeltropfenstoffübergang in PEG-Phosphat ATPS vorgestellt werden. Exemplarische Ergebnisse der Tropfensedimentationsmessungen an Literatursystemen sind in Abbildung 3

dargestellt. Für genauere Beschreibungen des Vorgehens und der Ergebnisse sei auf die dazu entstandene Veröffentlichung verwiesen [Eggersglüß 2013]. Für die Entwicklung innerhalb der ATP-Systeme ist bis auf das Azev-System ein direkter Bezug zwischen den Koaleszenzerggebnissen und der Stabilität zu beobachten. So zeigt das Rosa-System mit steigendem pH-Wert ein Anstieg der Tropfengeschwindigkeit und Stabilität bei gleichzeitiger abnehmender Koaleszenzzeit. Ähnlich sehen die Ergebnisse für die Auswirkungen der NaCl-Konzentration aus. Sinkt die Koaleszenzzeit mit steigender NaCl-Konzentration (z. B. System 2), steigt die Stabilität oder umgekehrt steigt die Koaleszenzzeit sinkt die Tropfenstabilität (z. B. Andrews und Rosa-System). Die Verlängerung der Konoden (Azev-System) führt zur Reduktion der Koaleszenzzeit wie auch der Erhöhung der Tropfenstabilität.

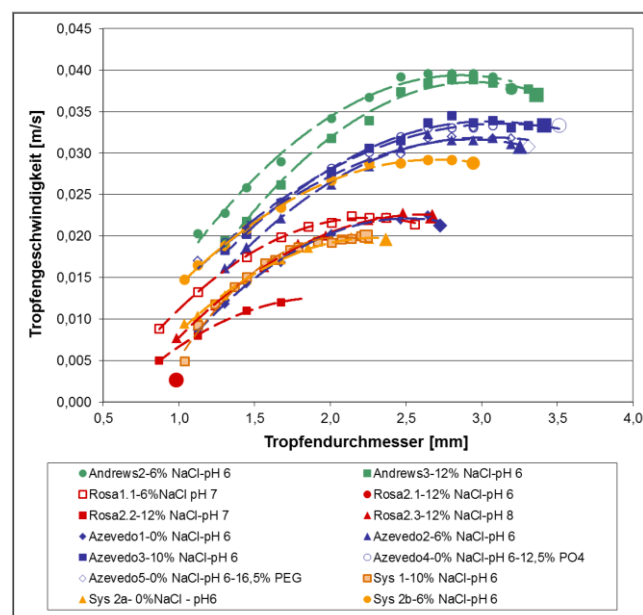


Abbildung 3: Ergebnisse der Einzeltropfenmessungen an unterschiedlichen Literatursystemen [Eggersglüß 2014]

2.4 Miniplant

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Miniplant-Technik, eine weiter miniaturisierte Pilotanlagentechnik, als prozessnahe Hilfsmittel der Verfahrensentwicklung immer weiter verbreitet. Unter anderem vor dem Hintergrund des steigenden Zeit- und Kostendrucks bei der Prozessentwicklung und den geringen anfangs vorhandenen Stoffmengen, bietet sich die Miniplant-Technik in Kombination mit Prozessmodellierung, als das verfahrenstechnische Werkzeug für die zukünftige Prozessentwicklung an. Miniplant-Extraktionskolonnen werden primär eingesetzt, um die Fluidynamik von vielstufigen Prozessen zu untersuchen. Hier sind sowohl Betrachtungen der Stoffaustauschrichtung, Dispersionsrichtung, Tropfenverteilung sowie das reale Betriebsverhalten zu überprüfen.

Der Versuch mit kombinierter, mehrstufiger Wäsche und Extraktion zeigt mehrere wichtige Ergebnisse. Die Analyse des Konzentrationsprofils über die Kolonnenhöhe in Abbildung 4 links zeigt, dass der gesamte Antikörper direkt bei Phasenkontakt, am Zulauf der beladenen schweren Phase, in die leichte Phase übergeht. Alle weiteren Extraktionsstufen, der Großteil der Kolonnenhöhe, ermöglicht es nur den Nebenkomponenten auch in die Zielphase überzugehen. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass für eine gute Aufreinigung nur eine sehr kurze Extraktionskolonne, wenn nicht evtl. nur eine Stufe, notwendig ist. Dies verhindert den Übergang von zusätzlichen Nebenkomponenten.

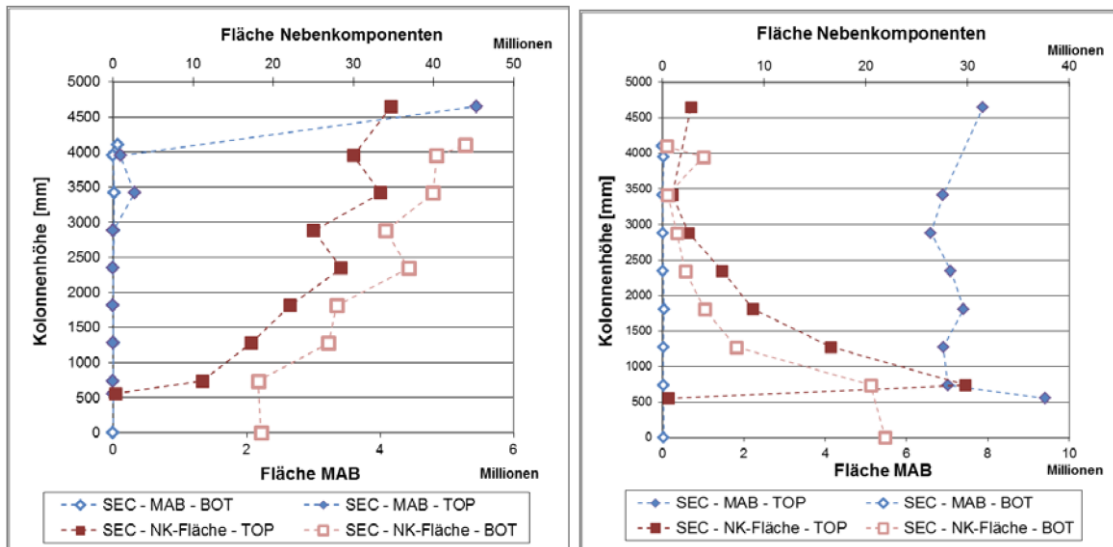


Abbildung 4: Konzentrationsprofile Antikörper und Nebenkomponenten über die Kolonnenhöhe. Links: Extraktion PhV 1:3 20 % Harvest, rechts: Wäsche 1:5 30 % Harvest [Eggersglüss 2014]

Die Auswertung der der Wäsche (Abbildung 4, rechts) zeigt, dass die Konzentration der Nebenkomponenten stark reduziert werden kann. Ohne signifikanten Antikörperverlust werden die Nebenkomponenten größtenteils abgereinigt. Es bleiben Nebenkomponenten mit Retentionszeit $t_R = 12,5$ und $t_R = 14,5$ min zurück.

2.5 Modellierung

Der Fokus der Modellierung und Diskussion liegt auf der Beschreibung verschiedener ATP-Prozesse über ein Gleichgewichtsstufenmodell. Dieses Modell erfordert wenige Modellparameter. Zudem ist ein signifikanter Vorteil, dass die Modellierung auch einfache, aus SEC-Chromatogramm-Flächen gewonnene Daten nutzen kann. Dies macht, ohne analytisch sehr aufwändige Definition und Kalibration der verschiedenen Nebenkomponenten, die Modellierung einer Extraktion möglich.

Tabelle 2: Übersicht über Versuchs- und Modellergebnisse unter Verwendung eines gewichteten, über Kolonnenhöhe gemittelten Verteilungskoeffizienten bei der Waschextraktion mit PhV 1:5 [Eggersglüß 2014]

	Kolonnen-Wäsche PhV 1:5	Modell	Abweichung zu Messwerten [%]
Ausbeute [%]	95	99	4
Reinheit [%]	72	75	3
Fläche MAB top-letzte Stufe	9.192.727	9.194.504	0
Fläche Aggregate + NK1 top-letzte Stufe	3.667.830	2.990.758	-23
Fläche NKs 2-4 top-letzte Stufe	433.377	4.021	-10678

Es lässt sich in Tabelle 2 erkennen, dass das Verhalten des Antikörpers sowie der Aggregate und NK1 gut vom Modell beschrieben werden kann. Die Abtrennung der Nebenkonzentrationen 2 bis 4 wird allerdings zu positiv berechnet.

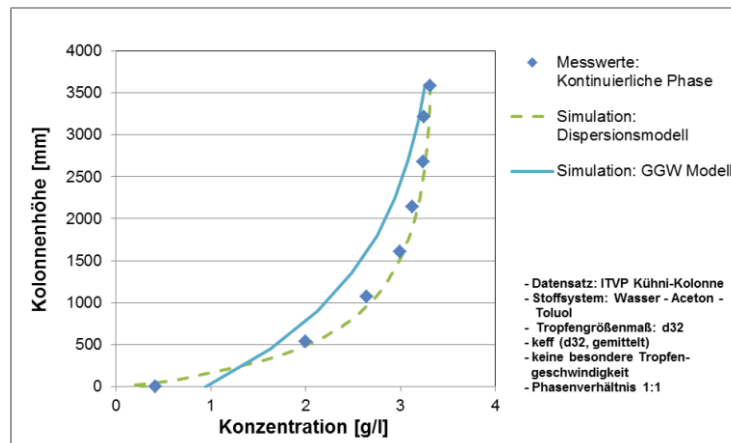


Abbildung 5: Darstellung des gemessenen Kolonnenkonzentrationsprofils im Vergleich zu Profilen ermittelt über Gleichgewichtsstufen- und axiales Dispersionsmodell. [Eggersglüß 2014]

Der Vergleich des Ergebnisses eines Gleichgewichtsstufenmodells und eines axialen Dispersionsmodells im Vergleich zu realen Messdaten zeigt, dass das axiale Dispersionsmodell aufgrund der Erhöhung der Beschreibung realer Phänomene besser in der Lage ist das Trennergebnis und Konzentrationsprofil vorherzusagen. Exemplarisch ist in Abbildung 5 der Vergleich der Konzentrationsprofile der kontinuierlichen Phase für das Testsystem Toluol-Aceton-Wasser zu sehen. Das Gleichgewichtsstufenmodell weist am Auslauf der kontinuierlichen Phase eine größere Differenz auf, während das DPM nur eine Abweichung von 23 % am Endpunkt und 4 % im Mittelwert erreicht. Das Kolonnenprofil kann deutlich besser beschrieben werden. Für das Testsystem Butylacetat-Aceton-Wasser liegt die Endpunktabweichung in beiden Fällen bei 13 %.

3 Kostenstudie

Um den Vergleich mit der Protein A Chromatographie zu realisieren, ist ein Protein A-Prozess entsprechend vorhandener folgend aufgelisteter Literaturdaten aufgesetzt worden. Grundsätzlich gelten hier die gleichen Annahmen wie für den Extraktionsprozess.

Tabelle 3 ist zu entnehmen, dass der ATP-Extraktionsprozess im Batchmodus für die alten 1 g/L Titerprozesse nicht wirtschaftlich ist. Da diese Prozesse Großteils der Prozessentwicklung der Vergangenheit angehören, sollte dies kein Problem darstellen. Wird von einem Standardprozess mit einem Titer von 5 bis 10 g/L und einer laut Literatur üblichen Adsorbenskapazität und -lebensdauer ausgegangen, hat die ATP-Extraktion, auch im Batchmodus, einen Kostenvorteil von fast 50 %. Im Fall einer maximierten Adsorbenskapazität von 50 g/L und 300 Zyklen Lebensdauer erreicht der Protein A-Prozess ungefähr die gleichen Prozesskosten. Die ATP-Extraktion ist damit, für den vorgestellten Prozess, wirtschaftlich.

Zu beachten bleibt, dass nur eine Reinheit von 75 %, nicht > 90 % erreicht wird. Ebenso kann keine Volumenreduktion um den Faktor 10 erfolgen [Shukla 2007].

Tabelle 3: Vergleich der spezifischen Trennkosten eines Extraktionsprozesses mit verschiedenen Parametersätzen eines Protein A Prozesses [Eggersglüß 2014]

spezifische Trennkosten	Extraktion	Protein A		
	Trennkosten pro kg MAB [€/kg]	150 Zyklen, Kapazität 30 g/L [€/kg]	200 Zyklen, Kapazität 30 g/L [€/kg]	300 Zyklen, Kapazität 50 g/L [€/kg]
Szenario 1	16.058	11.403	10.689	8536
Szenario 2	11.773	6.088	5.374	3221
Szenario 3	9.478	11.403	10.689	8536
Szenario 4	6.129	6.088	5.374	3221
Szenario 5	3.787	6.301	6.505	4352
Szenario 6	2.861	5.238	4.677	2524
Szenario 7	2.090	6.301	6.505	4352
Szenario 8	1.382	5.238	4.677	2524
Szenario 9	3.087	5.663	6.327	4173
Szenario 10	2.519	5.132	4.647	2494
Szenario 11	1.413	5.663	6.327	4173
Szenario 12	1.002	5.132	4.647	2494

4 Fazit

Die vorliegende Arbeit weist nach, dass die Bioextraktion, speziell die wässrige Zweiphasenextraktion, eine wirtschaftliche und technisch realisierbare Grundoperation als Antwort auf die aktuellen Trennaufgaben der biotechnischen Industrie mit steigenden Produkttitern ist. Damit ist das Ziel dieser Forschungsarbeit entsprechend des Antrages erreicht. Aus dieser Arbeit entstanden Veröffentlichungen, diverse Vorträge auf Fachtagungen sowie eine Dissertation.

Da diese Arbeit einen Grundstein für eine Prozessentwicklung einer mehrstufigen ATP-Extraktionstechnologie legen soll, kann zudem mit der Erschließung weiterer, noch nicht

ausgeschöpfter Optimierungspotenziale gerechnet werden. Infolge einer unbegrenzten Apparateskalierbarkeit innerhalb eines mehrstufigen Extraktionsprozesses und der Anpassbarkeit der selektiven Trennung auf unterschiedliche Moleküle, hat die wässrige Zweiphasenextraktion Potenzial für die Zukunft und kann helfen den Downstream Bottleneck zu entzerren. Da zukünftige biotechnologische Trennaufgaben anstehen, die aufgrund fehlender Affinitätsinteraktionen nicht unbegrenzt Protein A Chromatographie anwenden können, bietet die ATP-Extraktion eine Alternative als vielseitiger Capture Prozess.

5 Literaturverzeichnis

- [Azevedo 2007] A. Azevedo, et. al., J. Biotechnol. 132 (**2007**): 209-217
- [Eggersglüß 2011] J. Eggersglüß et. al., "Vortrag European Conference of Chemical Engineering, Berlin 26.09.**2011**
- [Eggersglüß 2012] J.K. Eggersgluess, S. Both, J. Strube, (**2012**): *Chim. Oggi*, 30 (4), 14–18.
- [Eggersglüß 2013] J.K. Eggersgluess, M. Richter, M. Dieterle, J. Strube, Chem. Eng. Technol., In Review
- [Eggersglüß 2014] J.K. Eggersgluess, Dissertation, TU Clausthal, In Press
- [Shukla 2007] A. Shukla; B. Hubbard; T. Tressel; S. Guhan; D. Low (**2007**): *Journal of Chromatography B* 848, (1), S. 28–39.