(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. August 2004 (05.08.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/065328 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C04B 38/00, C12N 11/14

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/000209

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Januar 2004 (14.01.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 1 669.4 17. Januar 2003 (17.01.2003) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **UNIVERSITÄT BREMEN** [DE/DE]; 28359 Bremen (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **KÜHN, Martina** [DE/DE]; Aschwardener Strasse 54a, 28790 Schwanewede (DE). **KOCH, Dietmar** [DE/DE]; Vorkampsweg 168a, 28359 Bremen (DE). **GRATHWOHL, Georg** [DE/DE]; Suhrfeldstrasse 65a, 28207 Bremen (DE). **SOLTMANN, Ulrich** [DE/DE]; Alaunstrasse 78, 01099 Dresden (DE). **BÖTTCHER, Horst** [DE/DE]; Ginsterstrasse 26, 01169 Dresden (DE).

(74) Anwalt: **HERTZ, Oliver**; v. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** BIOACTIVE CERAMIC COMPOSITE MATERIALS AND METHODS FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) **Bezeichnung:** BIOAKTIVE KERAMISCHE KOMPOSITMATERIALIEN UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to a ceramic composite material containing a ceramic substrate material with at least one biological material and at least one nanoparticular hardening material homogeneously incorporated therein. The invention also relates to methods for the production of said composite material.

(57) **Zusammenfassung:** Es werden ein keramisches Kompositmaterial, das ein keramisches Substratmaterial enthält, in das mindestens ein biologisches Material und mindestens ein nanopartikuläres Verfestigungsmaterial homogen eingebettet sind, und Verfahren zur Herstellung des Kompositmaterials beschrieben.

WO 2004/065328 A1

Bioaktive keramische Kompositmaterialien und Verfahren zu deren Herstellung

Die Erfindung betrifft keramische Kompositmaterialien, insbesondere bioaktive keramische Kompositmaterialien, Verfahren zu deren Herstellung und Anwendungen der Kompositmaterialien.

Es ist bekannt, dass derzeit große Anstrengungen unternommen werden, Biomoleküle und lebende Zellen in anorganischen Matrizen zu immobilisieren, da daraus im Vergleich zu den bislang verwendeten polymeren Matrizen insbesondere die folgenden Vorteile erwartet werden:

- hohe mechanische, thermische und photochemische Stabilität,
- hohe Transparenz,
- biologische Inertheit (d.h. keine Nahrungsquelle für Mikroorganismen), und
- steuerbare Porosität und variabler Immobilisierungsgrad.

Solche Biokompositmaterialien bieten zahlreiche neue potenzielle vorteilhafte Anwendungsmöglichkeiten, z. B. zur Herstellung biokompatibler Oberflächen in der Medizintechnik, zur Biokatalyse, Biogenese und für neuartige Wirkstoff-Freisetzungssysteme.

Neben der Möglichkeit, Biomoleküle oder Bakterienzellen an anorganischen Trägern wie Silicagel, Bentonit u.a. adsorptiv an der Oberfläche zu fixieren, wie es beispielsweise in IN 171047 beschrieben wird, besteht die Möglichkeit einer direkten Einbettung von Biomolekülen in eine anorganische Matrix durch Nutzung der Sol-Gel-Technik (vgl. C. J. Brinker und G.Scherer in "Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel-Processing", Academic Press Inc., Boston 1990).

Auf diese Weise ist zum Beispiel die Einbettung von Enzymen oder Proteinen in anorganische Matrizen möglich (siehe z. B. US 5 200 334 oder US 5 300 564). Nach der Immobilisierung von lebenden Hefezellen in SiO_2-Sol-Gel-Matrizen (G. Carturan et al., Mol. Catal. 57 (1989) L13) wurden in prinzipiell ähnlicher Weise Zellgewebe in Organosilikone (US 5 693 513), Pflanzenzellen in poröse SiO_2-Gele (WO 96/36703), tierische Zellen in ein Gel, hergestellt aus einem Organosilkon (US 5 739 020) bzw. eine aus der Gasphase erzeugte SiO_2-Schicht eingekapselt (WO 97/45537). Zur Einkapselung von Mikroorganismen wird ferner die Kombination von SiO_2-Gelen mit wasserlöslichen Polymeren wie Polyvinylalkohol, Gelatine (US 4 148 689) oder Alginaten (US 4 797 358, WO 96/35780) beschrieben.

Eine Alternative zu den Sol-Gel-Systemen sollte aus praktischer Sicht die homogene Einbettung von Biomolekülen in keramische Werkstoffe darstellen, da diese gegenüber Sol-Gel-Matrizen billiger, stabiler und formbar sind, und zudem eine etablierte Herstellungstechnologie zur Verfügung steht. Ein Hindernis besteht jedoch bisher in der Notwendigkeit, klassische keramische Formkörper durch einen Sinterprozess bei hohen Temperaturen, zum Beispiel oberhalb 600°C zu verfestigen. Da bei diesen Temperaturen jede organische Materie zerstört wird, war es bislang nicht möglich, Biomoleküle oder lebende Zellen in konventionelle keramische Massen einzubetten.

Aus DE 100 65 138 wird die Herstellung poröser Keramikformteile abweichend von den klassischen Verfahren bei niedrigen Temperaturen beschrieben. Bei diesem Verfahren wird eine spezielle Zusammensetzung einer keramischen Suspension verwendet, die einem in bestimmter Weise gesteuerten Gefrier-Trocknungsvorgang unterzogen wird. Bei dem aus DE 100 65 138 bekannten Verfahren konnte jedoch eine Einbettung von Biomaterialien nicht in Betracht gezogen werden, da nach dem Trocknungsvorgang zur Verfestigung der Keramikformteile eine für Biomaterialien schädli-

che Zusatzbehandlung mit Säuren oder Laugen erforderlich war. Die Zusatzbehandlung dient einer Auslaugung, die zur Kompositverfestigung führt.

Biomoleküle oder Mikroorganismen wurden darum bislang nur als Hilfsmittel (porenbildende Substanzen) keramischen Massen zugesetzt, die beim Sintervorgang eine gesteuerte Porosität der Keramik ergeben, z.B. für künstliche Knochen-Materialien (GB 2 365 423) oder andere funktionelle Keramiken (US 5 683 664, EP 631 998).

Die Immobilisierung von lebenden Mikroorganismen an Keramiken war bislang nur durch nachträgliche Tränkung poröser keramischer Oberflächen mit wässrigen Dispersionen von Mikroorganismen möglich (WO 98/13307). Dieses Verfahren hat jedoch eine Reihe von Nachteilen: der Immobilisierungsgrad ist gering, die Reproduzierbarkeit schlecht und die dazu geeigneten Keramiken erfordern mittlere Porengrößen, die über der z. T. beträchtlichen Größe der Mikroorganismen liegen.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte keramische Kompositmaterialien bereitzustellen, die mindestens ein Biomaterial enthalten, wobei die Kompositmaterialien die Nachteile herkömmlicher Kompositmaterialien vermeiden sollen. Die Aufgabe der Erfindung besteht insbesondere in der Bereitstellung von Kompositmaterialien mit einem verbesserten Immobilisierungsgrad für das mindestens eine Biomaterial und einer erhöhten Lebensfähigkeit und/oder Wirksamkeit des Biomaterials. Erfindungsgemäße Kompositmaterialien sollen ferner mit einem erweiterten Bereich mittlerer Porengrößen herstellbar und für neue Anwendungen nutzbar sein. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Verfahren zur Herstellung derartiger Kompositmaterialien bereitzustellen, die sich insbesondere durch eine für das Biomaterial schonende Verfahrensführung auszeichnen.

Diese Aufgaben werden durch Kompositmaterialien und Verfahren mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 oder 15 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Eine erste Grundidee der Erfindung ist es, ein keramisches Kompositmaterial, das auf der Basis eines keramischen Substratmaterials gebildet ist, dahingehend weiterzubilden, dass in das Substratmaterial mindestens ein biologisches Material und mindestens ein Verfestigungsmaterial homogen eingebettet sind, wobei das Verfestigungsmaterial miteinander verbundene, aus einem nanopartikulären Sol gebildete, anorganische Nanopartikel umfasst. Es wird ein nanopartikuläres, gelbildendes und vernetzendes Verfestigungsmaterial verwendet. Eine homogene Einbettung des Biomaterials in das Kompositmaterial bedeutet einen hohen Immobilisierungsgrad und damit eine hohe Stabilität und langdauernde Wirksamkeit des Kompositmaterials. Das im Kompositmaterial enthaltene Verfestigungsmaterial ermöglicht die Anwendung einer für das Biomaterial schonenden Prozedur zur Keramikverfestigung bei niedrigen Temperaturen.

Das erfindungsgemäße bioaktive keramische Kompositmaterial, bestehend aus einem keramischen Substrat und darin homogen verteilten, z.B. lebenden Zellen, kann bei so niedrigen Temperaturen hergestellt werden, dass keine Denaturierung des Zellmaterials während des Verfestigungsprozesses erfolgt. Die Erfindung gewährleistet eine so hohe Lebensfähigkeit der eingebetteten Zellen, dass eine Verwendung des Biokompositmaterials z. B. als Biokatalysator oder Biofilter zur Reinigung von schadstoffbelastetem Abwasser möglich ist.

Verfahrensbezogen basiert die Erfindung insbesondere auf einer Abwandlung des aus DE 100 65 138 bekannten Verfahrens dahingehend, dass durch die erfindungsgemäße Verwendung des nanopartikulären Verfestigungsmaterials auf den herkömmlichen Einsatz

von Säuren zur Auslaugung, die zur Kompositverfestigung führt, verzichtet werden kann. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass das erfindungsgemäße Verfahren eine Verfestigung des Komposits bei Raumtemperatur oder bei niedrigeren Temperaturen ermöglicht.

Die erfindungsgemäßen keramischen Komposite werden vorzugsweise durch Verfestigung an sich bekannter keramischer Schlicker, bestehend aus wäßrigen Dispersionen von Aluminiumoxid- oder Alumosilikat-Pulvern oder -Fasern, erzeugt. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung von Fasermaterial, da es die Herstellung mechanisch besonders stabiler Formkörper bei Raumtemperatur gestattet. Durch den Einsatz wäßriger Dispersionen ist auch die Zumischung wäßriger Zelldispersionen ohne Probleme möglich.

Ein wesentliches Merkmal der Erfindung besteht nun darin, durch die Zumischung gelierungsfähiger anorganischer Nanosole den Schlicker zu verfestigen. Dazu werden vorzugsweise Nanosole mit einem mittleren Teilchendurchmesser unter 200 nm verwendet. Die verfestigenden Nanosole bestehen gemäß bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung aus nanopartikulären Oxiden von Elementen der II. bis V. Haupt- oder Nebengruppe des Periodensystems oder deren Gemische in Wasser oder einem wässrig-organischen Lösungsmittel. Es können beispielsweise Nanosole aus SiO_2, Al_2O_3, ZrO_2, TiO_2, B_2O_3, ZnO, CaO, P_2O_5 oder deren Gemische verwendet werden, die man z.B. durch saure oder alkalische Hydrolyse der entsprechenden Metallalkoxide erhält.

Für die Modifizierung der Nanosol-Eigenschaften kann der Hydrolyseprozeß der Metallalkoxide in Gegenwart zugemischter Trialkoxysilane $R\text{-}Si(OR')_3$ und/oder Dialkoxysilane $R_2\text{-}Si(OR`)_2$ durchgeführt werden, wodurch modifizierte Metalloxidsole gebildet werden, die bezogen auf 1 Gewichtsanteil Metalloxid 0 bis 2 Gewichtsanteile $R\text{-}SiO_{3/2}$ und/oder $R_2{=}SiO$ enthalten. R ist dabei ein organischer Alkyl- oder Arylrest, der Amino-, Hydroxy-, E-

poxy- oder Alkoxygruppen enthalten kann oder durch Halogene substituiert ist. R' ist ein Alkylrest, vorzugsweise mit 1 bis 16 Kohlenstoffatomen. Durch diese Modifizierung können z.B. die mechanischen und Oberflächen-Eigenschaften der Komposite gezielt an die jeweils gewünschte Anwendung angepasst werden. Der Anteil des Verfestigungsmaterials im Komposit kann je nach gewünschtem Verfestigungsgrad bis zu 70 Gewichtsprozent betragen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von bioaktiven keramischen Kompositmaterialien gestattet die effektive Immobilisierung eines breiten Spektrums verschiedener Biomaterialien, speziell den Einsatz lebender Organismen wie z. B. Bakterien, Pilzen, Algen und Protozoen. Entsprechend können vielzellige tierische und pflanzliche Zellverbunde immobilisiert werden. Der Anteil der lebenden Zellen kann dabei vorteilhafterweise bis 30 Gew.-% bezogen auf das getrocknete Biokomposit betragen.

Das Verfahren eignet sich alternativ zur Immobilisierung von toten Zellen, Zellbestandteilen, Enzymen und anderen Proteinen, Biopolymeren und anderen bioaktiven molekularen Stoffen.
Für die Erhöhung der Gebrauchswerteigenschaften der bioaktiven keramischen Kompositmaterialien kann der Zusatz spezieller Additive vorteilhaft sein. Zur Erhöhung der biologischen Aktivität können Glycerol oder andere Polyole und/oder Nährstoffe zugesetzt werden.

Gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung kann durch den Zusatz wasserlöslicher Polymere wie Polyvinylalkohol oder Polyacrylsäure die Dispergierbarkeit der Schlickerbestandteile verbessert und durch polare Wechselwirkungen der anorganischen Oxidmatrix die mechanische Stabilität der bioaktiven keramischen Kompositmaterialien erhöht werden. Der Anteil der Zusätze kann vorteilhafterweise bis 30 Gew.-% bezogen auf das trockene Biokomposit betragen.

Das Verfahren zur Herstellung eines bioaktiven keramischen Kompositmaterials ist insbesondere durch die folgenden Schritte gekennzeichnet:

(1) Mischung eines Schlickers aus einer wäßriger Dispersionen von Aluminiumoxid- oder Alumosilikat-Pulvern oder -Fasern und dem dispergiertem Biomaterial, insbesondere bioaktiven Zellmaterial

(2) Zugabe des nanopartikulären Verfestigungsmaterials und ggf. anderer Additive zur Verbesserung der biologischen Aktivität und Erhöhung der mechanischen Stabilität, und

(3) Verfestigung des Materials; ggf. in Gussformen, durch

(a) einen Freezecasting-Prozeß (vgl. Beispiel 1)

Freezecasting (oder: Gefriergelieren) ist ein Formgebungsverfahren, bei dem die Mischung eines keramischen Pulvers und des verfestigenden Nanosols in einem Gefrierschrank oder einem Stickstoffbad eingefroren wird, wobei sich das Sol irreversibel in die Gelphase umwandelt und damit die keramischen Körner umschließt und miteinander vernetzt. Das auskristallisierte Wasser wird entweder durch Auftauen und Verdampfen oder (im Falle der üblichen Gefriertrocknung) durch Sublimation entfernt. Der Freezecasting-Prozeß zeichnet sich in vorteilhafter Weise durch ein homogenes Gefüge und eine gute Maßhaltigkeit der Formkörper sowie durch geringe Trocknungsschwindung nach dem Gefrieren aus, wodurch geringe Nachbearbeitungen erforderlich sind.

(b) Neutralisation bei Raumtemperatur (vgl. Beispiel 2)

Insbesonders im Fall von Schlickermaterialien auf Basis faserförmiger Oxide (z.B. Sintermullit) gelingt eine Verfestigung bei Raumtemperatur durch Neutralisation, da am Neutralpunkt die Nanosole spontan gelieren und ähnliche Vernetzungs- und Verfestigungs-Prozesse wie beim Freezecasting ablaufen.

Gemäß einem besonderen Vorteil der Erfindung kann die Formgebung gemäß (3a) bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts

von Wasser durchgeführt werden, bei denen die Lebensfähigkeit von Biomaterialien erhalten bleibt. Besonders vorteilhaft kann es sein, wenn das Freezecasting bei Temperaturen bis -80°C und die mögliche Gefriertrocknung bei Temperaturen bis zu -40°C durchgeführt wird.

Nach dem Gefrieren entsprechend (3a) wird der sog. Grünkörper im gefrorenen Zustand aus der Metallform entfernt und gefriergetrocknet. Entsprechend (3b) wird nach Neutralisation und Erstarrung der Grünkörper bei Raumtemperatur an der Luft oder im Vakuum getrocknet.

Aufgrund der Herstellung des bioaktiven keramischen Kompositmaterials bei niedrigen Temperaturen und geringer Restfeuchten ist eine hohe Lebensfähigkeit der immobilisierten Zellen und Bioaktivität gewährleistet. Darum können derartige Kompositmaterialien in Form eines Formkörpers oder einer Membran als Biokatalysator oder Biofilter zur Reinigung von schadstoffbelastetem Abwasser verwendet werden. Aufgrund ihrer guten mechanischen Stabilität bieten sich zerkleinerte Formteile vorteilhaft als Säulenfüllungsmaterial in Bioreaktoren an.

Erfolgreiche Versuche wurden durchgeführt zur Verwendung von erfindungsgemäßen Kompositen mit

(i) immobilisierten Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* als Fermentationskatalysator

(ii) immobilisierte Bakterien *Bacillus sphaericus* als Biofilter zur Entfernung von Schwermetallionen aus Uranabwässern

(iii) immobilisierte Bakterien *Rhodococcus spec.* als Biokatalysator zum Abbau von Phenol und Glykolen in salzhaltigen Industrieabwässern.

Darüber hinaus bieten die erfindungsgemäßen bioaktiven keramischen Kompositmaterialien neue Möglichkeiten zur Herstellung

poröser Keramiken mit definierter einheitlicher Porengröße, indem durch thermische Zersetzung der biologischen Bestandteile bei Temperaturen von mindestens 500°C keramische Werkstoffe mit einer Porenstruktur erzeugt werden, die der Form und der Menge der immobilisierten Biokomponente entspricht (vgl. Beispiel 3). Von besonderem Interesse sind aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit und ihrer fast monodispersen Größenverteilung sphärische Hefesporen, die beim Verflüchtigen während des Sinterns formgetreue Poren hinterlassen Es wurde beobachtet, dass verschiedene biologische Bestandteile wie ein organischer Binder fungieren und bei Temperaturen von mindestens 70°C feste schwindungsfreie Grünkörper bilden. Dadurch läßt sich der Anteil nanopartikulärer Verfestigungsmittel zur Herstellung bioaktiver keramischer kompositmaterialien drastisch senken.

Damit lassen sich die Vorteile der erfindungsgemäßen bioaktiven keramischen Komposit-materialien gegenüber dem Stand der Technik in folgenden Punkten zusammenfassen:

- es können erstmals lebende Zellen in homogener Verteilung und hoher biologischer Aktivität unter Erhaltung der Lebensfähigkeit in einem keramischen Formkörper immobilisiert werden,
- die bioaktiven keramischen Kompositmaterialien sind beliebig je nach den Anforderungen der konkreten Anwendung formbar und zeigen eine hohe mechanische Stabilität,
- durch die Art der Zusammensetzung und Herstellungstechnologie kann die Porosität der Komposite und damit deren biologische Aktivität und Reaktivität in weiten Grenzen gesteuert werden
- das Verfahren ist universell anwendbar,
- unterschiedliche Mikroorganismen und Zellsysteme können nach dem erfindungsgemäßen Verfahren in ein Komposit überführt werden,
- es sind zahlreiche Anwendungen als Biokatalysator oder Biofilter möglich, und

- die thermische Entfernung der Biokomponente bietet neue Möglichkeiten zur Herstellung poröser Keramiken.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Immobilisierung von *Bacillus spaericus* und *Saccharomyces cerevisiae* durch Freezecasting

(a) Herstellung des Kompositmaterials

Als Zellmaterial wurden *Bacillus sphaericus* Zellen, entsprechende Sporen (die aus den Zellen durch verringertes Nahrungsangebot und Zusatz von Mangan-Salzen erhalten wurden), sowie normale Bäckerhefe-Zellen (*Saccharomyces cerevisiae*) verwendet.

Der Schlicker hatte folgende Zusammensetzung:

+ 54 Gew.-% Mullit (Mullit73, Osthoff-Petrasch, Hamburg) und 16 Gew.-% Al_2O_3 (mittlerer Teilchendurchmesser 700 nm) als keramische Matrix

+ 27 Gew.-% Nyacol 1440 (Akzo Nobel Chemicals Wurzen) als nanopartikuläres Verfestigungsmaterial, Kieselsäuresol mit 40 % Feststoffgehalt und mittlerem Partikeldurchmesser von 14 nm 3 % Glycerol als Additiv.

+ 4 ml der Schlickerlösung wurden mit jeweils 1 ml Zellkultur mit definierten Zellzahlen gemischt und auf eine -40°C-Metallplatte getropft, wodurch Pellets (mit 3 bis 6 mm Durchmesser) bzw. Scheiben (3 cm Durchmesser, 1 cm Höhe) gebildet werden, die anschließend gefriergetrocknet werden.

(b) Test des Kompositmaterials

Tabelle 1: Anzahl lebender *Bacillus sphaericus* Zellen und Sporen (CFU) nach Lagerung bei 4°C (bestimmt durch Kultivierungstest)

Lagerzeit /Tage	Lebende Zellen CFU / g Komposit	Lebende Sporen CFU / g Komposit
6	1.2×10^6	6.4×10^6
124	9.0×10^5	5.7×10^6

Tabelle 2: Anzahl lebender Zellen (bestimmt durch Kultivierungstest)

		B. sphaericus	*Saccharomyces cerevisiae*
Nicht immobilisierte Zellen	control	1.1×10^9 / 15 µl	3.2×10^6 / 1.5 mg
	freeze & dried	2.1×10^5 / 15 µl	—
Freezecasting Komposit		7×10^4 / 15 µl resp. 100 mg Komposit	4×10^3 / 1.5 mg resp. 100 mg Komposit

Tabelle 3: Biologische Aktivität von 100 mg Biokomposit verglichen mit der entsprechenden Menge nicht-immobilisierter Zellen (anhand mikrobiologischer Standardtests)

Substrate	*Bacillus sphaericus*		*Saccharomyces cerevisiae*	
	nicht immobilisiert	Biokomposit	nicht-immobilisiert	Biokom-posit
FDA [1]	26 nMol/h	7 nMol/h	—	—
Resazurin [2]	89 nMol/h	40 nMol/h	—	—
Glucose [3]	—	—	16 µMol/h	2.2 µMol/h

[1] von den Zellen gebildete Enzyme (Esterasen) hydrolysieren Fluorescein-diacetat (FDA)

[2] von den Zellen gebildete Enzyme (Dehydrgenasen) reduzieren Resazurin (blau) zu Ressorufin (pink)

[3)] biokatalytische Umsetzung von Glucose

Beispiel 2: Immobilisierung von *Saccharomyces cerevisiae* bei Raumtemperatur und Lufttrocknung

(a) Herstellung des Kompositmaterials

Der Schlicker hatte folgende Zusammensetzung:

20,5 Gew.-% Al_2O_3-Fasern

20,5 Gew.-% Al_2O_3-Pulver (mittlerer Teilchendurchmesser 700 nm)

56,5 Gew.-% Nyacol 1440 (Akzo Nobel Chemicals Wurzen)

2,5 Gew.-% Trockenhefe

Das Nyacol wird mit HCl neutralisiert. In ca. 1/3 des Nyacols wird die Trockenhefe suspendiert. Die Al_2O_3 Fasern und Pulver werden mit dem verbleibenden Nyacol durchmischt und dann das Nyacol-Hefe-Gemisch zugegeben. Es entsteht eine pastöse Masse in der die Hefezellen homogen verteilt sind. Der Schlicker wird als Schicht mit ca. 0,5 cm Dicke ausgestrichen, bei einem Pressdruck von 1,5kN verdichtet und luftgetrocknet. Die Gießfähigkeit kann durch Zugabe von Wasser oder ggf. Erhöhung des Anteils an Nyacol verbessert werden. Die Platten wurden anschließend in Würfel zersägt und hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit getestet.

(b) Test des Kompositmaterials

Tabelle 4: Anzahl lebender *Saccharomyces cerevisiae* Zellen und deren biologische Aktivität in 100 mg Biokomposit verglichen mit der entsprechenden Menge nicht-immobilisierter Zellen (anhand mikrobiologischer Standardtests)

	Lebende Zellen	Biologische Aktivität
Biokomposit	7×10^5 CFU/100 mg Komposit	7,3 µMol/h×100 mg Komposit
Nicht-immobilisierte Zellen	$1,6 \times 10^7$ CFU/2,5 mg freie Zellen	60,3 µMol/h×2,5 mg freie-Zellen

Beispiel 3: Thermische Umwandlung eines bioaktiven keramischen Kompositmaterials in eine poröse Keramik

Ein wässriger Schlicker aus 40g Al_2O_3-Pulver, 45g Al_2O_3-Fasern und 5g Nyacol 1440 wird als Vormischung getrocknet und in eine Suspension mit 10g *Bacillus spaericus* gegeben. Die Suspension wird in eine Form gegossen und bei 70°C getrocknet. Nach der Trocknung liegt ein fester Grünkörper vor, der formtreu bleibt. Der Grünkörper kann z.B. bis 1400°C gesintert werden, so dass eine hochporöse schwindungsfreie Keramik entsteht.

PATENTANSPRÜCHE

1. Keramisches Kompositmaterial, das ein keramisches Substratmaterial enthält,
dadurch gekennzeichnet, dass
in das Substratmaterial mindestens ein biologisches Material und mindestens ein nanopartikuläres Verfestigungsmaterial homogen eingebettet sind.

2. Kompositmaterial nach Anspruch 1, bei dem das Verfestigungsmaterial nanopartikuläre Oxide von Elementen der II. bis V. Haupt- oder Nebengruppe des Periodensystems oder deren Gemische umfasst.

3. Kompositmaterial nach Anspruch 2, bei dem das Verfestigungsmaterial nanopartikuläre Hydrolyseprodukte von Trialkoxysilanen oder deren Gemische umfassen.

4. Kompositmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der Anteil des Verfestigungsmaterials bis zu 70 Gewichtsprozent beträgt.

5. Kompositmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Verfestigungsmaterial Nanopartikel mit einem mittleren Teilchendurchmesser kleiner als 200 nm umfasst.

6. Kompositmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das biologische Material biologische Zellen, Zellgruppen, Zellbestandteile oder biologisch wirksame Makromoleküle umfasst.

7. Kompositmaterial nach Anspruch 6, bei dem das biologische Material lebende oder lebensfähige Organismen umfasst.

8. Kompositmaterial nach Anspruch 7, bei dem das biologische Material Bakterien, Pilze, Sporen von Bakterien oder Pilzen, Protozoen, Algen, tierische Zellen, pflanzliche Zellen, tierische Zellgruppen oder pflanzliche Zellgruppen umfasst.

9. Kompositmaterial nach Anspruch 7 oder 8, bei dem der Anteil der lebenden Organismen 0.1 bis 30 Gew.-% bezogen auf das trockene Kompositmaterial beträgt.

10. Kompositmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das keramische Substratmaterial Aluminiumoxid oder Alumosilikat umfasst.

11. Kompositmaterial nach einem der vorhergehenden Ansprüche bei dem in das Substratmaterial mindestens ein Additiv zur Erhöhung der biologischen Aktivität und/oder mindestens ein wasserlösliches Polymer eingebettet ist.

12. Kompositmaterial nach Anspruch 11, bei dem das Additiv zur Erhöhung der biologischen Aktivität Polyole, Glycerol, und/oder Nährstoffe umfasst.

13. Kompositmaterial nach Anspruch 11, bei dem das mindestens eine wasserlösliche Polymer Polyvinylalkohol oder Polyacrylsäure umfasst.

14. Kompositmaterial nach einem der Ansprüche 11 bis 13, bei dem der Anteil der eingebetteten Zusätze bis zu 30 Gew.-% bezogen auf das trockene Kompositmaterial beträgt.

15. Verfahren zur Herstellung eines keramischen Kompositmaterials nach einem der vorhergehenden Ansprüche, mit den Schritten:

- Herstellung eines Schlickers aus einer wässrigen Dispersion des Substratmaterials und einer Dispersion des dispergierten biologischen Materials,
- Zugabe des nanopartikulären Verfestigungsmaterials,
- Verfestigung des Materials durch Neutralisation des Schlickers mit dem Verfestigungsmaterial bei Raumtemperatur oder durch einen Gefrierprozess, so dass das Kompositmaterial gebildet wird, und
- Abschlusstrocknung des Kompositmaterials.

16. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem dem Schlicker als Substratmaterial Aluminiumoxid oder Alumosilikat-Pulver oder -Fasern zugesetzt werden.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, bei dem dem Schlicker zusätzliche Additive zur Verbesserung der biologischen Aktivität und Erhöhung der mechanischen Stabilität zugesetzt werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, bei dem die Verfestigung in einer Gussform erfolgt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, bei dem der Gefrierprozess eine Gefrierbehandlung des Kompositmaterials bei einer Temperatur von bis -80°C umfasst.

20. Verfahren nach Anspruch 19, bei dem die Gefriertrocknung des Kompositmaterials bei einer Temperatur unterhalb des Gefrierpunkts von Wasser bis - 10° C erfolgt.

21. Verwendung eines Kompositmaterials nach einem der Ansprüche 1 bis 14 als Biokatalysator oder Biofilter zur Reinigung von Flüssigkeiten.

22. Verwendung eines Kompositmaterials nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung keramischer Werkstoffe.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/000209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C04B38/00 C12N11/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C04B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
PAJ, EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 180 378 B1 (SHEN SIYUAN ET AL) 30 January 2001 (2001-01-30) example 1	1-22
X	GB 1 267 685 A (BOLDINGH JAN ET AL) 22 March 1972 (1972-03-22) examples 1,1B	1-22
X	US 5 824 526 A (AVNIR DAVID ET AL) 20 October 1998 (1998-10-20) claim 1; examples 1-9	1-22
X	US 4 752 459 A (PERRER DUNCAN S) 21 June 1988 (1988-06-21) column 2, line 22 -column 2, line 27 column 5, line 37 -column 5, line 54; examples 1,2	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 May 2004	13/05/2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Sala, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/000209

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6180378 B1	30-01-2001	NONE	
GB 1267685 A	22-03-1972	AT 293983 B	10-11-1971
		BE 736979 A	02-02-1970
		DE 1939347 A1	26-03-1970
		DK 123828 B	07-08-1972
		ES 370162 A1	16-07-1971
		FR 2019322 A5	03-07-1970
		IT 1027004 B	20-11-1978
		LU 56634 A1	23-03-1970
		NL 6911735 A	04-02-1970
		ZA 6905488 A	31-03-1971
US 5824526 A	20-10-1998	IL 93134 A	20-11-1997
		US 5650311 A	22-07-1997
		AT 166459 T	15-06-1998
		DE 69129422 D1	25-06-1998
		DE 69129422 T2	07-01-1999
		EP 0439318 A2	31-07-1991
		JP 3226555 B2	05-11-2001
		JP 6122521 A	06-05-1994
		US 5300564 A	05-04-1994
		US 5292801 A	08-03-1994
		US 5371018 A	06-12-1994
		US 5308495 A	03-05-1994
US 4752459 A	21-06-1988	DE 3664571 D1	31-08-1989
		EP 0197776 A1	15-10-1986
		JP 61270202 A	29-11-1986

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/000209

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C04B38/00 C12N11/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N C04B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
PAJ, EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 180 378 B1 (SHEN SIYUAN ET AL) 30. Januar 2001 (2001-01-30) Beispiel 1	1-22
X	GB 1 267 685 A (BOLDINGH JAN ET AL) 22. März 1972 (1972-03-22) Beispiele 1,1B	1-22
X	US 5 824 526 A (AVNIR DAVID ET AL) 20. Oktober 1998 (1998-10-20) Anspruch 1; Beispiele 1-9	1-22
X	US 4 752 459 A (PERRER DUNCAN S) 21. Juni 1988 (1988-06-21) Spalte 2, Zeile 22 -Spalte 2, Zeile 27 Spalte 5, Zeile 37 -Spalte 5, Zeile 54; Beispiele 1,2	1-22

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
4. Mai 2004	13/05/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Sala, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/000209

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 6180378	B1	30-01-2001	KEINE		
GB 1267685	A	22-03-1972	AT	293983 B	10-11-1971
			BE	736979 A	02-02-1970
			DE	1939347 A1	26-03-1970
			DK	123828 B	07-08-1972
			ES	370162 A1	16-07-1971
			FR	2019322 A5	03-07-1970
			IT	1027004 B	20-11-1978
			LU	56634 A1	23-03-1970
			NL	6911735 A	04-02-1970
			ZA	6905488 A	31-03-1971
US 5824526	A	20-10-1998	IL	93134 A	20-11-1997
			US	5650311 A	22-07-1997
			AT	166459 T	15-06-1998
			DE	69129422 D1	25-06-1998
			DE	69129422 T2	07-01-1999
			EP	0439318 A2	31-07-1991
			JP	3226555 B2	05-11-2001
			JP	6122521 A	06-05-1994
			US	5300564 A	05-04-1994
			US	5292801 A	08-03-1994
			US	5371018 A	06-12-1994
			US	5308495 A	03-05-1994
US 4752459	A	21-06-1988	DE	3664571 D1	31-08-1989
			EP	0197776 A1	15-10-1986
			JP	61270202 A	29-11-1986