

ZENTRUM ANGEWANDTE CHEMIE

Institut für Technische Chemie

der Universität Hannover

**Großtechnische Gewinnung hochwertiger Minorkomponenten
aus Süßmolke unter Verwendung von Membrantechnologie**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation von

Dipl. Chem. Kerstin Plate
geboren am 01.07.1970 in Jülich

Hannover, Januar 2003

Hauptreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. h.c. Karl Schügerl

Tag der Promotion 31.01.2003

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuelle zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, Dezember 2002

Kerstin Plate

CURRICULUM VITAE

Name: **Kerstin Plate**
Geburtsdatum: 01. Juli 1970
Geburtsort: Jülich
Eltern: Dr. Hans Plate, Physiker
Karin Plate, geb. Brünings, Sekretärin
Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG

1976 - 1978 Grundschole Meyenfeld
1978 - 1980 Mittelpunktschule Horst
1980 - 1982 Orientierungsstufe Garbsen
1982 - 1989 Gymnasium Neustadt am Rübenerge
mit Abitur abgeschlossen, Note 2,5

HOCHSCHULBILDUNG

10/89 - 12/98 Studiengang Chemie (Diplom) am Fachbereich Chemie,
Universität Hannover
01/99 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie: Optimierung im
Downstreamprozess zur Gewinnung von Lactoferrin und
Lactoferricin aus Molke
Hauptreferent: Prof. Dr. T. Scheper, Institut für Technische
Chemie, Universität Hannover
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Bernd Hitzmann, Institut für
Technische Chemie, Universität Hannover
Note: 1,0; Gesamtnote: 1,7
seit 08/99 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technische
Chemie, Zentrum Angewandte Chemie, Universität Hannover,
Prof. Dr. T. Scheper
04/00 - 12/01 DFG-Stipendiatin im Graduierten-Kolleg „Chemische und
Technische Grundlagen der Naturstoff-Transformation“

DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von August 1999 bis Dezember 2002 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper, dem ich für die gute Betreuung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen ganz besonders herzlich danken möchte.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich ganz herzlich Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl.

Priv.-Doz. Dr. Roland Ulber möchte ich für die Unterstützung dieser Arbeit und seine zahlreichen Anregungen danken. Dr. Heinrich Buchholz und Dr. Wolfgang Demmer danke ich für die hilfsbereite Zusammenarbeit sowie für gaaaaanz viel Molke!

Besonderer Dank gilt Solvay Deutschland für die Einladung in ihre Werkshalle, als die Apparaturen zu groß für das Instituts-Technikum geworden waren, sowie für die Mitbenutzung ihrer Filtrationsanlagen. Ich danke Dr. Helmer Rasche und seinen Mädels Kerstin, Kirsten und Sabine für ihre große Hilfsbereitschaft, Beistand in kritischen Momenten und wärmenden Tee!

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Martina Weiß für ihre stete Hilfsbereitschaft hinsichtlich der Standard-Analytik HPLC sowie bei Dr. Ingrid Langwost für das gute Arbeitsklima und erste Hilfe bei Formatierungs-Schwierigkeiten.

Dr. Jörg Schaper, Timo Klewitz und Priv.-Doz. Dr. Roland Ulber danke ich für die gründliche Korrektur dieser Arbeit, Henning Stückmann für die professionelle Fotosession.

Allen Hannoverschen Biotechnologen möchte ich für das einmalig gute Arbeitsklima, täglichen Klatsch und Tratsch sowie viele feucht-fröhliche Stunden nach der Kernarbeitszeit danken!

Spezieller Dank an die Herren Tonnenträger Dr. Florian Irtel, Dr. Jörg Schaper und Timo Klewitz für kurzweilige Mittagspausen!

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Angelika, die mich in jeder Art und Weise während des Studiums unterstützt haben und ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre.

**DIE ERGEBNISSE DER VORLIEGENDEN DISSERTATION SIND BEREITS ZUM TEIL
VERÖFFENTLICHT WORDEN:**

ARTIKEL IN FACHZEITSCHRIFTEN / BÜCHERN:

K. Plate, T. Weiss, D. Steuber, H. Buchholz, W. Demmer, R. Ulber, T. Scheper; *Wertschöpfende Aufarbeitung von Molke - Isolierung von Lactoferrin und Lactoferricin über Membranadsorber*; Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe „Biotransformation nachwachsender Rohstoffe“; **15** (2000) 203

R. Ulber, K. Plate, T. Weiss, H. Buchholz, W. Demmer, T. Scheper; *Downstream Processing of Bovine Lactoferrin from Sweet Whey*; Acta Biotechnol.; **21** (2001) 27

K. Plate, H. Buchholz, W. Demmer, R. Ulber, T. Scheper; *Gewinnung von bovinem Lactoferrin aus Molke über Membranadsorber*; CIT; **73** (7) (2001) 898

K. Plate, H. Buchholz, W. Demmer, R. Ulber, T. Scheper; *Wertschöpfende Aufarbeitung von Molke - Isolierung von Lactoferrin über Membranadsorber*; Freiburger Forschungshefte „Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe“, **866** (2002) 145

R. Ulber, K. Plate, O.-W. Reif, D. Melzner; *Membranes for Protein Isolation and Purification*; in: B. Mattiason, R. Hatti-Kaul; Isolation and Purification of Proteines; Marcel Dekker Verlag; Kapitel 6, Seite 191, **im Druck**

VORTRÄGE:

K. Plate, *Profitable Processing of Cheese Whey - Isolation of Bovine Lactoferrin via Membrane Adsorber*; 11. internationaler Biotechnologiekongress "Biotechnology 2000"; (2000) Berlin, Deutschland

K. Plate, *Downstream Processing of bovine Lactoferrin from Cheese Whey*; 498. internationaler Kongress der American Chemical Society; (2001) San Diego, Kalifornien, USA

K. Plate, *Recovery of bovine Lactoferrin by ion exchange membrane adsorption*; 3. internationale Molke-Konferenz; (2001) München, Deutschland

K. Plate, *Wertschöpfende Aufarbeitung von Molke - Gewinnung von Lactoferrin über Membran-adsorber*; 9. internationale Tagung „Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe“; (2002) Freiberg, Deutschland

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bLF	bovine Lactoferrin
BSA	Bovines Serum Albumin
BSB ₅	Biologischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
BV	Bettvolumen
CAFCA	Computer Assisted Flow Control and Analysis
CFU	Colony Forming Units
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FIA	Flow Injection Analysis
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LF	Lactoferrin
LP	Lactoperoxidase
LPLC	Low Pressure Liquid Chromatography
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spektrometry
MF	Mikrofiltration
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NF	Nanofiltration
RO	Reversosmose
TFA	Trifluoressigsäure
TMP	Transmembrandruck
UF	Ultrafiltration
UO	Umkehrosmose
UTMP	Uniform Transmembrane Pressure

ABSTRACT (D)

Die Nahrungsmittelindustrien in Europa, den USA und Fernost müssen sich den wachsenden Ansprüchen der Konsumenten an ihre Produkte in Bezug auf Vielfalt, Gesundheit, Zweckmäßigkeit und Qualität stellen. Die Erschließung bislang ungenutzter Rohstoffquellen zur Isolierung hochwertiger Komponenten, die als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet werden können, gewinnt zunehmend an Bedeutung. Molke, ein Nebenprodukt der Käse- und Kaseinherstellung, beinhaltet eine Vielzahl an Substanzen mit physiologisch interessanten Eigenschaften. Eine dieser Substanzen in der Molke ist Lactoferrin, ein Protein mit großem Anwendungspotenzial auf dem Markt der Nahrungsmittel-Veredelung von Sportler- und Säuglingsnahrung. Es wird ein dreistufiger Prozess zur Gewinnung von Lactoferrin unter Einsatz von Membrantechnik vorgestellt.

Für die ersten Prozess-Stufe, eine Crossflow-Mikrofiltration, werden verschiedene Modulgeometrien und Porengrößen untersucht. Mit der Membran, die am besten zur Molkenfiltration geeignet ist, einem 0,2µm-Rohrmodul, wird ein Up-Scaling auf 4 m² durchgeführt. Nach der Optimierung der Anlage können über mehrere Stunden konstante Permeatflüsse von 400 L/m²h bei Lactoferrin-retentionen von unter 5% etabliert werden. Eine Reinigungsmethode für die erste Prozess-Stufe wird entwickelt, mit der die Wasserflüsse zu 100% wieder hergestellt werden können.

Die Isolierung des Lactoferrins aus der mikrofiltrierten Molke erfolgt über spezielle Kationenaustauschermembranen. Die Verwendung verschiedener Puffersysteme, Elutionssalze und pH-Werte in dieser zweiten Prozess-Stufe werden diskutiert, maximale und optimale Auftrags-Elutionszyklenzahlen unter Verwendung lactoferrinhaltiger Modelllösungen bestimmt und der mehrfache Einsatz von Elutionslösungen untersucht. Nach einem Up-Scaling auf 4 m² Membranfläche wird die optimale Anzahl der ohne Reinigung fahrbaren Zyklen mit Realmedium zu vier bei einer Ausbeute von 88 % an Zielprotein (bezogen auf die dynamische Bindekapazität der Adsorbermembran von 0,2 mg/cm²) bestimmt. Eine Reinigungsmethode wird entwickelt, mit der die Wasserflüsse zu 95 % wieder hergestellt werden können.

Für die dritte Prozess-Stufe, die Gewinnung des Lactoferrins aus den Eluat, wird eine Ultrafiltration (MWCO 10 kDa) zur Entsalzung mit anschließender Gefriertrocknung vorgestellt. Das gewonnene Protein ist von hoher Reinheit (über 95 %) und besitzt seine volle biologische Aktivität.

Für eine Anlage zur Isolierung von Lactoferrin im Industriemaßstab (80 m² Adsorberfläche) wird eine Kostenabschätzung durchgeführt. Mit dieser Anlage kann Lactoferrin unter Aufwandskosten von ca. 90 €/kg Protein aus Molke isoliert werden. Abschließend wird die zur Membranadsorbertechnik alternative Technologie Säulenchromatographie vergleichend diskutiert.

STICHWORTE

Molke, Lactoferrin, Crossflow-Mikrofiltration, Membranadsorber

ABSTRACT (E)

The food industries in Europe, the United States and the Far East have to follow the consumers' demands on food products concerning variety, health, convenience and quality. The screening for new sources of raw materials for the isolation of high-quality components that can serve as nutraceuticals gain further importance. Whey, a by-product of the cheese-making industry, comprises several substances that show interesting physiological properties. One of these substances is bovine lactoferrin, a protein with a large potential for the functional food market improving athlete and baby food. A three-step process for the production of lactoferrin using membrane technology is presented.

For the first process step, a crossflow microfiltration, various module geometries and pore sizes are investigated. A pretreatment of the whey is necessary to prevent blocking of the membranes used in the second process step. Afterwards an up-scaling is carried out with the membrane showing best results, a 0,2 μm tubular module. After optimization of this 4 m^2 plant a constant permeate flux of 400 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$ is obtained over several hours with a lactoferrin retention of less than 5%. A two-step cleaning method is presented, which reinitiates the water flux of the system up to 100%.

In the second process step, the isolation of bovine lactoferrin out of the microfiltrated whey is carried out using strongly acidic ion-exchange membrane modules. The use of various buffer systems, elution salts and pH values are discussed, maximum and optimal numbers of process cycles using ideal lactoferrin-containing solutions are determined and the repeated use of eluent solutions are investigated. After up-scaling to 4 m^2 membrane area six cycles were performed successively without a cleaning procedure for loading and elution of whey permeate. The lactoferrin yield was 88% referring to the dynamic binding capacity of 0,2 mg/cm^2 of the adsorber membrane. A cleaning method is presented, which reinitiates the water flux of the system up to 95%.

In the third process step, the recovery of bovine lactoferrin out from the eluents, a crossflow ultrafiltration (MWCO 10 kDa) for desalting and concentration is presented. Afterwards the desalted lactoferrin solution is lyophilized. The purity of the final product is $> 95\%$, and the protein possesses its biological activity.

The costs of an industrial scale plant for the isolation of bovine lactoferrin (80 m^2 membrane area) are estimated. With such a 80 m^2 plant lactoferrin can get isolated out of whey permeate with costs in a range of 90 $\text{€}/\text{kg}$ protein. Finally an alternate technology for the isolation of lactoferrin, column chromatography, is compared to membrane adsorber technology.

KEY WORDS

whey, lactoferrin, crossflow microfiltration, membrane adsorber

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>THEORIE</u>	<u>4</u>
2.1	MOLKE.....	4
2.1.1	ZUSAMMENSETZUNG.....	5
2.1.1.1	MOLKENPROTEINE	7
2.1.1.2	LACTOFERRIN	8
2.2	MEMBRANEN	10
2.2.1	MATERIALIEN	11
2.2.2	MODUL-GEOMETRIEN.....	14
2.2.3	MEMBRANEN MIT AKTIVIERTEN OBERFLÄCHEN	17
2.3	MEMBRAN-FILTRATION.....	18
2.3.1	ARTEN DER PROZESSFÜHRUNG	18
2.3.2	FLUSSLIMITIERENDE FAKTOREN	20
2.3.3	REINIGUNG.....	24
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>27</u>
3.1	1. PROZESS-STUFE: CROSSFLOW-MIKROFILTRATION.....	27
3.2	2. PROZESS-STUFE: ISOLIERUNG VON LACTOFERRIN	30
3.3	3. PROZESS-STUFE: LACTOFERRINGEWINNUNG AUS DEN ELUATEN	31
3.3.1	ULTRAFILTRATION.....	31
3.3.2	GEFRIERTROCKNUNG.....	32
3.4	QUALITÄTSKONTROLLE.....	32
3.4.1	MALDI-MS	32
3.4.2	WACHSTUMSHEMMTEST	33
3.5	ANALYTIK.....	35
3.5.1	HPLC	35
3.5.2	FIA	36
3.5.3	LPLC.....	36
3.5.4	STATISTIK	38

4	<u>ERGEBNISSE</u>	39
4.1	1. PROZESS-STUFE: CROSSFLOW-MIKROFILTRATION	40
4.1.1	MEMBRANSCREENING	40
4.1.1.1	FILTRATION MIT DÜNNMOLKE ALS FILTRATIONSMEDIUM	42
4.1.1.2	FILTRATION MIT MOLKENKONZENTRAT ALS FILTRATIONSMEDIUM	50
4.1.2	UP-SCALING AUF 1 M ² UND 4 M ²	53
4.1.3	OPTIMIERUNG	56
4.1.4	REINIGUNG	57
4.2	2. PROZESS-STUFE: ISOLIERUNG VON LACTOFERRIN	60
4.2.1	BESTIMMUNG DER OPTIMALEN ELUTIONSPARAMETER	62
4.2.1.1	WAHL DES PUFFERSYSTEMS	63
4.2.1.2	WAHL DES SALZES ZUR ELUTION	64
4.2.1.3	pH-ABHÄNGIGKEIT, TRENnung VON LACTOFERRIN UND LACTOPEROXIDASE	65
4.2.1.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR LANGZEITSTABILITÄT	68
4.2.1.5	MEHRFACH-ELUTION	70
4.2.2	UP-SCALING AUF 4 M ²	73
4.2.3	DIREKTE KOPPLUNG VON 1. UND 2. PROZESS-STUFE, REALE ZYKLENZAHLEN	75
4.2.4	REINIGUNG	78
4.3	3. PROZESS-STUFE: LACTOFERRIN-GEWINNUNG AUS DEN ELUATEN	81
4.3.1	ULTRAFILTRATION	81
4.3.2	GEFRIERTROCKNUNG	83
4.4	QUALITÄTSKONTROLLE	83
4.4.1	REINHEITSKONTROLLE	83
4.4.2	BIOLOGISCHE AKTIVITÄT DES PRODUKTES	84
4.5	PROZESS-RENTABILITÄT: KOSTENABSCHÄTZUNG UND PROZESSBEWERTUNG	87
4.5.1	KOSTENABSCHÄTZUNG	87
4.5.2	KOSTENVERGLEICHRECHNUNG UND PROZESSBEWERTUNG	94
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	98
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	102

1 Einleitung und Zielsetzung

Im Jahr 1999 war die deutsche Milchindustrie mit 135 Unternehmen, 38.000 Beschäftigten und einem Umsatz von 19,2 Mrd. € die umsatzstärkste Branche der Nahrungsmittelindustrie. 4,6 Mio. Milchkühe erzeugten 28,4 Mio. Tonnen Milch. In den milchverarbeitenden Betrieben fielen allein in Deutschland über 10 Mio. Tonnen Molke an [MIV, 2000].

Lange Zeit wurde Molke als problematischer Abfallstoff aus der Käse- und Caseinherstellung angesehen. Mit einem BSB₅-Wert von 30-60 g O₂/L stellt nämlich in Abwasser eingeleitete Molke eine hohe Belastung für die biologischen Stufen der Kläranlagen dar. Dabei ist Molke ein nicht nur preiswerter und in großen Mengen verfügbarer, sondern aufgrund ihrer Zusammensetzung auch sehr interessanter Rohstoff: die Molkenproteine als wesentliche Bestandteile zählen aufgrund ihrer Aminosäuren-Zusammensetzung zu den hochwertigsten Proteinen für die Ernährung. Neben einer Vielzahl von Vitaminen enthält Molke viele Mineralstoffe; weiterhin gilt sie als iodreich.

Der direkte Einsatz von Molke und Molkenpulver in der menschlichen Nahrung ist beschränkt durch die unausgewogene Zusammensetzung ihres Feststoffanteils, wie z.B. der hohe Gehalt an Lactose und anorganischen Salzen. Durch die zunehmende Entwicklung von Fraktionierungs- und Separationstechniken in der Lebensmitteltechnologie sind die Anwendungsbereiche für Molkeninhaltsstoffe heute jedoch zahlreich geworden: als funktionale Zutaten bei der Herstellung von Nahrungsmitteln und pharmazeutischen Präparaten sowie als Nährstoffe in Diätahrung und Nutraceuticals.

Als Nutraceuticals oder Functional Foods werden Nahrungsmittel oder Nahrungsmittelzusätze bezeichnet, die medizinische oder Gesundheitsvorteile bieten, darunter die Vorbeugung und Behandlung von Krankheiten. Beispiele für Nutraceuticals sind bioaktive Proteine, Pro- und Präbiotika. Sowohl die Nahrungsmittel- als auch die Pharma-Industrie interessieren sich für die Entwicklung neuer Produkte in dieser Kategorie unter Verwendung von Molke als Rohstoffquelle.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Gewinnung eines dieser bioaktiven Proteine aus Molke, dem verschiedene gesundheitsfördernde Wirkungen bei der Verdauung zugeschrieben werden: Lactoferrin.

Lactoferrin, ein Glycoprotein aus der Familie der Transferrine, ist ein geruchs- und geschmackloser hellbrauner kristalliner Feststoff. Der minore Molkenbestandteil ist nachweislich an der Regulierung des Eisenhaushaltes im menschlichen Körper beteiligt und hat antimikrobielle, antivirale und immunoregulatorische Eigenschaften. Zukünftige Anwendungen für Lactoferrin als

Nahrungsmittelzusatz liegen in der Veredelung von Sportler- und Säuglingsnahrung. Lactoferrin als gesundheitsförderndes Nahrungsergänzungsmittel in Tablettenform ist in Japan bereits auf dem Markt (Lac-Bion[®], Firma Morinaga-Milei). Ob das Protein als Medikament gegen Herpes und Hepatitis eingesetzt werden kann, hängt von den Ergebnissen derzeit laufender klinischer Studien ab [MARCHETTI ET AL., 1996; TANAKA ET AL., 1999].

Der isoelektrische Punkt von Lactoferrin liegt mit 8 - 9 weit im basischen Bereich. Das Enzym Lactoperoxidase ist der einzige weitere Molkenbestandteil, der einen ähnlich hohen isoelektrischen Punkt aufweist. Bei dem natürlichen pH-Wert 6,2 von Süßmolke liegen nur diese beiden Proteine kationisch vor, während alle anderen Substanzen ladungsfrei oder anionisch vorliegen. Aufgrund dieser physikalischen Eigenschaft ist die Isolierung der beiden Proteine aus Molke über Ionenaustauscher möglich. In Japan und den USA wird dieser Prozess im großtechnischen Maßstab unter Einsatz von Säulenchromatographie [ETZEL ET AL., 2002; YOSHIDA & YE-XIUYUN, 1991A] durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit ist anstelle einer Chromatographiesäule ein Membranadsorbersystem zur Isolierung der beiden kationischen Molkenkomponenten verwendet worden. Bei dieser noch jungen Technologie sind die Austauscherguppen auf den Innenoberflächen der Membranporen lokalisiert. Die makroporöse Membranstruktur erlaubt hohe Flussraten, und im Gegensatz zur Säulenchromatographie liegt keine porediffusionskontrollierte Austauschkinetik vor, wodurch kurze Beladungs-Elutions-Zyklen möglich sind. Weitere Vorteile des Membranadsorbersystems im Vergleich zur Säulenchromatographie sind niedrige Anlagenfixkosten, leichtes Handling und Up-Scaling sowie eine große Flexibilität im Anlagendesign. Die Ionenaustauschermodule sind in vielfachen Baugrößen mit Membranflächen von wenigen Quadratzentimetern bis 8 m² pro Modul im Handel erhältlich. Die an die jeweilige Anwendung angepasste Kombination von Serien- und Parallelverschaltung mehrerer Module führt zu steilen Durchbruchkurven bei hohen Auftragsflussraten. Membranadsorberanlagen lassen sich im Gegensatz zu einer Chromatographiesäule bei Bedarf leicht erweitern oder umbauen.

In einer bereits abgeschlossenen Dissertation ist die prinzipielle Eignung eines Membranadsorbersystems zur Isolierung von Lactoferrin sowie dem Enzym Lactoperoxidase als Nebenprodukt aus Molke bewiesen worden [WEISS, 1999]. Neben dem Aufbau einer prozessbegleitenden Analytik sind die Bedingungen zur selektiven Elution der beiden Proteine von der Austauschermembran untersucht und ein erstes Up-Scaling vom Labor- in kleinen Technikumsmaßstab durchgeführt worden. Mit der Übertragung in größeren Maßstab traten Probleme beim Beladen des Adsorbers mit Molke auf; es kam zu einer schnellen Verblockung der Membran. Um den Austauscher vor

Verblockung zu schützen, ist eine Crossflow-Mikrofiltration als erster Prozess-Schritt zur Vorklärung der Molke vorgeschlagen worden. Der gesamte Lactoferrin-Gewinnungsprozess läßt sich demnach in drei Prozess-Stufen gliedern:

1. Prozess-Stufe (Crossflow-Mikrofiltration): Vorbehandlung der Molke
2. Prozess-Stufe (Membranadsorber): Isolierung von Lactoferrin
3. Prozess-Stufe (Ultrafiltration / Trocknung): Gewinnung von Lactoferrin aus den Eluaten

Die vorliegende Dissertation baut auf diesen Ergebnissen auf. Es ist eine Optimierung der einzelnen Prozess-Stufen und anschließend ein Up-Scaling in großtechnischen Maßstab durchgeführt worden.

Auf der Basis der Versuchsergebnisse aus dieser entwickelten großtechnischen Anlage ist eine Kostenabschätzung für die zweite Prozess-Stufe, den Membranadsorber, im Industriemaßstab erstellt worden. Diese Berechnung bietet wertvolle Hilfestellung bei der Ermittlung kostenintensiver Faktoren und zeigt somit auf, wo weitere Kostenminimierungen möglich sind: die Marktchancen für functional food sind um so höher, je niedriger die Produktionskosten liegen.

Abschließend wird der Einsatz der beiden Technologien Membranadsorber und Säulen-chromatographie im Lactoferringewinnungsprozess unter ökonomischem Aspekt diskutiert.

2 Theorie

2.1 Molke

Molke ist ein Koppelprodukt bei der Herstellung von Käse, Quark und Casein. Sie entsteht durch Ausfällung von Casein in Milch oder entrahmter Milch und anschließender mechanischer Abtrennung des gefällten Caseins zusammen mit restlichen Fettanteilen. Je nach Art der Caseinfällung unterscheidet man zwischen verschiedenen Arten von Molke. Beim Käse wird durch den Zusatz von Lab-Enzymen gefällt; die daraus resultierende Molke wird als Süßmolke bezeichnet. Bei der Frischkäse- und Quarkproduktion erfolgt die Fällung durch Zusatz von milchsäurebildenden Bakterien, die entsprechende Molke heißt Sauermolke. Bei der Herstellung von Casein wird durch Zugabe von Mineralsäuren (Salz- oder Schwefelsäure) zur Milch gefällt. Dabei entsteht eine besondere Art von Sauermolke, die Caseinmolke [MIV, 2000]. Aus den verschiedenen Fällungsarten resultieren unterschiedliche Zusammensetzungen der Molken:

Tab. 2.01: mittlere Zusammensetzung von Kuhmilch sowie verschiedenen Molken [MIV, 2000; ROEDER, 1954]

	Kuhmilch	Süßmolke	Sauermolke	Caseinmolke
Wasser [%]	87,5	93 - 94	94 - 95	93,5 - 94,5
Trockenmasse [%]	12,5	6 - 7	5 - 6	5,5 - 6,5
Lactose [%]	4,7	4,8	4,6	4,7
Eiweiß [%]	3,6	0,8 - 1	0,3	0,5
Fett [%]	4	0,05	< 0,01	< 0,01
Asche [%]	0,7	0,6	0,8	0,9
pH-Wert [%]	6,6	6,2	4,6	4,4

Alle Molken stellen gelbgrünliche Flüssigkeiten dar. Im Rahmen dieser Arbeit ist ausschließlich Süßmolke verwendet worden. Sie ist mit einem Anteil von ca. 80% die am meisten produzierte Molke [ZADOW, 1992]. Ausserdem ist Süßmolke aufgrund ihres höheren pH-Wertes und Eiweiß-Anteils für den Lactoferrin-Gewinnungsprozess am besten geeignet (s.u.).

1999 wurden in der Europäischen Union über 194 Mio. Tonnen Milch erzeugt, 28 Mio. Tonnen allein in Deutschland. Die Menge anfallender Molke belief sich in Deutschland auf über 10 Mio. Tonnen, EU-weit waren es ca. 54 Mio. Tonnen [BML, 2000].

Über viele Jahre hinweg galt Molke als Abfallprodukt der Käse- und Caseinherstellung und wurde als Tierfutter oder gar nicht verwertet. Wegen ihres hohen Gehaltes an Stickstoff- und Sauerstoff-

Verbindungen stellt sie eine große Belastung für die biologischen Stufen von Kläranlagen dar. Der biologische Sauerstoffbedarf für Molke, BSB₅, beträgt 30 - 60 g Sauerstoff je Liter [SPREER, 1984]. Eine Verwertung der Molke ist also auch aus umweltpolitischer Sicht wünschenswert. Seit die Milchverarbeitende Industrie vor ca. 30 Jahren erkannt hat, dass Molke kein wertloser Reststoff, sondern vielmehr ein interessanter Rohstoff ist, wird auf dem Gebiet der Aufarbeitung und der Verwertung intensive Forschung betrieben. Das folgende Diagramm zeigt auf, wie vielfältig die Anwendungen von Molke bzw. ihrer Bestandteile in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie geworden sind:

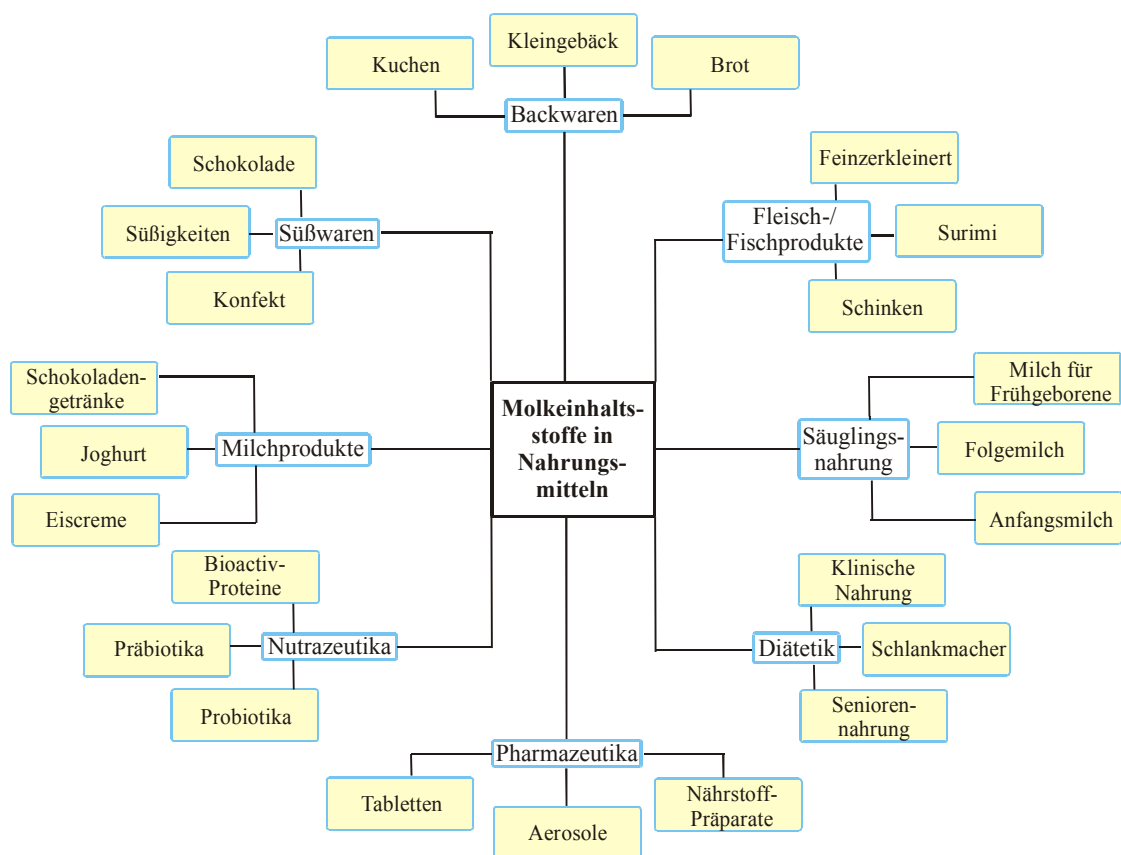


Abb. 2.01: Verwendung von Molkeinhaltsstoffen in Nahrungsmitteln [NACH DE WIT, 1995]

2.1.1 Zusammensetzung

Süßmolke ist ein hochkomplexes Medium, dessen Bestandteile sich gemäß ihrer Konzentrationen in Haupt- und Nebenbestandteile (g/L und mg/L) sowie in Spurstoffe ($\mu\text{g/L}$ und ng/L) gliedern lassen:

2.1.1.1 Molkenproteine

Die wasserlöslichen Proteine der Milch verbleiben bei der Caseinfällung und -abtrennung im flüssigen Rückstand, der Molke. Die Molkenproteine zählen aufgrund ihrer Aminosäuren-Zusammensetzung zu den hochwertigsten Proteinen für die Ernährung.

Tab. 2.02: Biologische Wertigkeit von Molkeneiweiß im Vergleich mit anderen Nahrungsmitteln [SPREER, 1984]:

	Molke	Vollei	Milch	Casein	Kartoffel
Biologische Wertigkeit	104	100	88	73	98

Wie aus Abbildung 2.02 und dem obigen Fließ-Schema ersichtlich ist, können auch die Proteine gemäß ihres Gehaltes in der Molke in majore (g/L) und minore (mg/L) Molkeneiweiße unterteilt werden. Den grössten Massenanteil unter den Proteinen haben β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Serum Albumin (BSA) und die Reihe der Immunoglobuline. Diese majoren Molkenproteine liegen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur molekular-dispers verteilt vor und können über Thiol-Disulfid-Wechselwirkungen oligomere Strukturen ausbilden [FOX & MULVIHILL, 1982]. Eine Übersicht der Haupt-Molkenproteine gibt Tabelle 2.03.

Tab. 2.03: Chemische und physikochemische Eigenschaften einiger majorer Molkenproteine

Eigenschaft	β -Lactoglobulin	α -Lactalbumin	BSA	Immunoglobuline
Konzentration [g/L]	2 - 4	0,6 - 1,7	0,4	0,4 - 1,0
Konzentration % w/w	56 - 60	18 - 24	6 - 12	6 - 12
Isoelektrischer Punkt	5,2	4,2 - 4,5	4,7 - 4,9	5,5 - 8,3
Molgewicht [Da]	18.400	14.000	66.000	> 146.000
Aminosäuren / mol	162	123	582	-
Disulfidbrücken / mol	2	4	17	-

Das β -Lactoglobulin hat den größten Anteil an den Molkenproteinen mit 56%. Dieser hohe Anteil ist im Hinblick auf die Verwendung der Molkenproteine in Nahrungsmitteln problematisch, da das Protein eine hohe Allergenität aufweist. In humaner Milch ist β -Lactoglobulin überhaupt nicht vorhanden.

Neben den majoren Molkenproteinen können eine Reihe weiterer Proteine in der Molke nachgewiesen werden. Sie werden unter dem Begriff minore Molkenproteine zusammengefasst, da sie in nur sehr geringen Konzentrationen vorliegen (so beträgt z.B. der durchschnittliche Anteil an dem minoren Protein Lactoferrin in der Trockenmasse der Süßmolke nur 0,02%). Neben den zwei eisenbindenden Proteinen Lactoferrin und Transferrin gehören auch das Enzym

Lactoperoxidase, eine Reihe von Glycoproteinen sowie die sogenannte Freie Sektorische Komponente (FSK) in diese Gruppe (siehe Tab. 2.04).

Tab. 2.04: Übersicht der minoren Molkenproteine [SCHLIMME & BUCHHEIM, 1995]

	Konzentration [mg/mL]	Molgewicht [Da]	isoelektrischer Punkt	Anzahl an Aminosäuren
Lactoferrin	100	82.800	8,8	708
Transferrin	100	76.000	6,7	704
Lactoperoxidase	25	80.642	8,6	712
β_2-Macroglobulin	4	11.636	5,6	98
Butyrophilin	k. A.	60.000	5,1	526
Ceruloplasmin	k. A.	121.404	5,4	1.062
Freie Sektorische Komponente FSC	4	k. A.	k. A.	k. A.

k. A.: keine Angaben

Einige der Proteine verfügen über interessante Eigenschaften im Hinblick auf sowohl pharmazeutische als auch technische Anwendungen, wie beispielsweise als Nahrungsmittelzusatz oder als Stabilisator von Lebensmitteln [REITER, 1985]. Der Gehalt der Proteine in der Molke ist nicht konstant, er hängt ab von der eingesetzten Milch (Artspezifität) sowie der Art der Vorbehandlung der Molke. Durch die Fällung der Caseine und Fette bei der Käseherstellung treten Verluste durch Anlagerung der Proteine an die Präzipitate auf. Auch sind die Proteine in wässriger Lösung nur begrenzt haltbar; nach einigen Tagen muss mit Denaturierung und Zersetzungserscheinungen gerechnet werden.

2.1.1.2 Lactoferrin

Bovines Lactoferrin ist ein natürliches Glycoprotein aus der Familie der Transferrine. Es besteht aus einem 708 Aminosäuren beinhaltenden Monozeptid-Strang, der zu zwei Schleifen, der N- und der C-Schleife, gefaltet ist. An jede dieser zwei Zonen kann jeweils ein Fe^{3+} -Ion koordinativ gebunden werden. Die Molmasse von bovinem Lactoferrin variiert - je nach Eisengehalt und Glycolisierungsgrad - zwischen 80.000 und 95.000 g/mol (Da). Die Strukturhomologie zum Transferrin beträgt 60%, die zu humanem Lactoferrin 95%.

Lactoferrin findet sich in sämtlichen exokrinen Sekreten der Säugetiere wie Speichel, Blutplasma, Augen- und Schleimhaut-Flüssigkeit, hauptsächlich jedoch in der Muttermilch. Der Gehalt an Lactoferrin ist von der Spezies abhängig. Am höchsten ist seine Konzentration in humaner Muttermilch während der ersten Tage nach der Geburt. Dort beträgt der Lactoferrin-Anteil mit bis zu 10 g/L 20% [ELLISON & GIEHL, 1991; TOMITA, 1997].

Lactoferrin ist wie auch das ihm strukturell sehr ähnliche Transferrin ein eisenbindendes Protein und einer der Regulatoren des Eisenhaushaltes im humanen Metabolismus. Seine Affinität zu Eisen ist sehr hoch (ca. 250mal größer als die von Transferrin), und erst bei sehr niedrigen pH-Werten von unter 2 ist die Bindung reversibel. Bakterien benötigen Eisen für ihr Wachstum. Durch den Entzug dieses für sie essentiellen Metalls wirkt das Lactoferrin direkt hemmend auf Krankheitserreger [ARNOLD ET AL., 1982; LEHRER & GANZ, 1988]. Interessant dabei ist, dass das Wachstum der für den Organismus wichtigen Bakterien in Mund und Darm nicht beeinflusst wird [NUIJENS ET AL., 1995]. Aufgrund dieser die Mund- und Darmflora regulierenden Eigenschaft hat sich Lactoferrin als Babynahrungszusatz durchgesetzt.

Lactoferrin beeinflusst Bakterienwachstum jedoch auch unabhängig vom Eisenhaushalt. So haben in vitro Versuche gezeigt, dass das Protein in der Lage ist, direkt an die Zellwände von Bakterien zu binden und sie permeabel zu machen, was zu ihrer Zerstörung führt [BROCK, 1995; ELLISON ET AL., 1988]. Eine in vivo Anwendung existiert in der Fischzucht-Industrie, wo Lactoferrin gegen mikrobiellen Befall der Tiere dem Fischfutter zugesetzt wird [KAKURA & KUROKURA, 1995]. Auch antivirale Eigenschaften konnten dem Protein nachgewiesen werden. So wirkt Lactoferrin gegen den Herpes Simplex Virus (HSV-1) [MARCHETTI ET AL., 1996]. Weiterhin wird vermutet, dass Lactoferrin Tumorerkrankungen beeinflusst. Die genaue Wirkungsweise des Proteins ist noch nicht bekannt; fest steht jedoch, dass Lactoferrin wachstums-stimulierend auf Lymphocyten und Fibroblasten wirkt und somit die körpereigenen Abwehrkräfte steigert [TOMITA, 1997; BROCK, 1995].

Lactoferrin kann längere Zeit in stark saurem Medium unzersetzt bestehen. Da in den Zellen der Magenwand spezielle Rezeptoren für Lactoferrin existieren, dient es auch hier als Eisenlieferant – eine Eigenschaft, auf die in den Prospekten der Firmen hingewiesen wird, die das Protein als Nahrungszusatz ("Functional Food") verkaufen. So wird Lactoferrin durch die Lebensmittelindustrie als körpereigenes und deshalb besonders schonendes Mittel zur Eisenapplikation und Lebensmittelveredelung vermarktet.

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Gewinnung von Lactoferrin sind vielfältig. Die meisten Veröffentlichungen basieren auf chromatographischen Methoden, vor allem mit Ionenaustauscherharzen für die Säulenchromatographie. Der Einsatz sowohl von Anionenaustauschern [GROVES, 1965] als auch von Kationenaustauschern vom Carboxymethyl-Typ [MONSAN ET AL., 1987], vom Sulfopropyl-Typ [FRANCIS ET AL., 1995] und vom Cellulosephosphat-Typ [FOLEY & BATES, 1987] ist möglich, da sich der isoelektrische Punkt des Proteins mit 8 - 9 deutlich von denen nahezu aller anderen Molkeninhaltsstoffe unterscheidet. In der vorliegenden Dissertation ist anstelle einer Chromatographiesäule ein Membranadsorber verwendet worden.

2.2 Membranen

Als Membran wird eine Trennwand bezeichnet, die aufgrund ihrer Morphologie geeignet ist, Stoffe aus einem Fluid, das die Trennwand passieren kann, selektiv abzutrennen. Die Stofftrennung erfolgt entsprechend der Teilchengröße und der physikalisch-chemischen Wechselwirkung mit der Membran.

Die Separation von Partikeln mittels Membranen wird Filtration genannt. Das zu filtrierende Medium wird als Feed bezeichnet, der nicht durch die Membran getretene Anteil des Mediums als Retentat oder Konzentrat. Der filtrierte Produktstrom ist das Permeat bzw. Filtrat.

Membranen lassen sich ausgehend von ihrer Porengröße in vier Gruppen unterteilen:

1. **M**ikro**f**iltrations-Membranen (MF-Membranen, Porengröße 10 µm - 0,1 µm)
2. **U**ltra**f**iltrations-Membranen (UF-Membranen, Porengröße 0,2 µm - 1 nm)
3. **N**ano**f**iltrations-Membranen (NF-Membranen, Porengröße 1 nm - 0,1 nm)
4. Membranen für **U**mkehr**o**smose (UO-Membranen, Porengröße < 0,1 nm)

Die folgende Graphik stellt dar, welche Partikel (Größe und Typ) im Allgemeinen und welche Milch- und Molkebestandteile im Einzelnen durch die verschiedenen Membrangruppen zurückgehalten werden können:

Partikelgröße [µm]	0,0001	0,001	0,01	0,1	1,0	10	100
Molekulargewicht [Da]	100	1.000	10.000	100.000	500.000		
Partikeltyp	Ionen	Moleküle	Makromoleküle	Zellen + Mikroartikel			
Bestandteile	Ionen Salze	Molkenproteine Lactose / -derivate Vitamine	Kaseinmizellen	Molkeneiweiß-Aggregate, Käse-Feinanteil	Fettkügelchen	Bakterien	Hefen, Schimmel
Trennungsv erfahren	UO	NF	UF		traditionelle Filtration MF		

Abb. 2.04: Trenngrenzen der verschiedenen Membrangruppen und mögliche Anwendungen in der Milch- und Molkeverarbeitenden Industrie [nach DE WIT, 1995]

Die Effizienz einer Membran in einem Filtrationsprozess wird durch die zwei Parameter Fluss und Selektivität bestimmt. Der Fluss durch eine Membran ist definiert als Durchtritts-Volumen bezogen auf die Membranfläche und die Filtrationszeit. Er wird in [L/m²h] angegeben und auch als Permeationsrate bezeichnet.

Die Selektivität einer Membran wird über die Retention R (Feststoff-Filtration) oder den Trennfaktor α (Gasfiltration oder Filtration von Gemischen organischer Flüssigkeiten) angegeben:

$$\text{Retention } R: \quad R = \frac{c_f - c_p}{c_f} = 1 - \frac{c_p}{c_f} \quad \text{Gl. (2.01)}$$

mit c_f = Stoffkonzentration im Feed

c_p = Stoffkonzentration im Permeat

R kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. $R = 0$ bedeutet totale Permeation des Stoffes durch die Membran, bei $R = 1$ wird der Stoff zu 100% durch die Membran zurückgehalten.

$$\text{Trennfaktor } \alpha: \quad \alpha_{A/B} = \frac{\frac{c_p^A}{c_f^A}}{\frac{c_p^B}{c_f^B}} \quad \text{Gl. (2.02)}$$

mit Index A = Komponente A

Index B = Komponente B

Der Index des Stoffes, dessen Permeationsrate größer ist, wird an die erste Stelle gesetzt. So gibt es je nach Prozessführung zwei Trennfaktoren $\alpha_{A/B}$ (Permeationsrate von Stoff A ist größer) oder $\alpha_{B/A}$ (Permeationsrate von Stoff B ist größer). Im Falle $\alpha_{A/B} = \alpha_{B/A} = 1$ wird keine Stofftrennung erreicht.

Zwei weitere Filtrations-Parameter sind die Ausbeute S sowie der Konzentrierungsfaktor f :

$$\text{Ausbeute } S: \quad S = \frac{q_p}{q_f} \quad \text{Gl. (2.03)}$$

mit q_p = Flussrate Permeat

q_f = Flussrate Feed

$$\text{Konzentrierungsfaktor } f_{\text{kontinuierlich}}: \quad f = \frac{q_f}{q_r} \quad \text{Gl. (2.04)}$$

mit q_r = Flussrate Retentat

$$\text{Konzentrierungsfaktor } f_{\text{batch}}: \quad f = \frac{V_{t=0}}{V_{\text{Ende}}} \quad \text{Gl. (2.05)}$$

2.2.1 Materialien

Eine weitere Möglichkeit zur Unterteilung von Membranen ist das Membranmaterial. Es gibt eine Vielzahl von Ausgangsstoffen, aus denen Membranen mit verschiedensten Eigenschaften generiert werden können. Dabei ist nicht jedes Material für die gesamte Bandbreite der prinzipiell

darstellbaren Porengrößen geeignet. In der nachstehenden Tabelle sind die verbreitetsten Materialien aufgeführt.

Tab. 2.05: Materialien zur Membran-Produktion und ihre Anwendungsgebiete [CHERYAN, 1998]

Material	MF	UF	NF	RO
Cellulosenitrat	⊕			
Polyamid (aliphatisch, z.B. Nylon)	⊕			
Polycarbonat	⊕			
Polyester	⊕			
Polypropylen (PP)	⊕			
Polytetrafluorethylen (PTFE)	⊕			
Polyvinylchlorid (PVC)	⊕			
Polyvinylidenfluorid (PVDF)	⊕			
Stahl	⊕			
Aluminium	⊕			
Aluminiumoxid	⊕	⊕		
Zirkoniumdioxid	⊕	⊕		
Titandioxid	⊕	⊕		
Cellulose (regeneriert)	⊕	⊕		
Polysulfon (PS)	⊕	⊕		
Polyethersulfon (PES)	⊕	⊕		
Celluloseacetat (CA)	⊕	⊕	⊕	⊕
Cellulosetriacetat (CTA)	⊕	⊕	⊕	⊕
Polyamid (aromatisch, PA)	⊕	⊕	⊕	⊕
Polyimid (PI)		⊕	⊕	⊕
Polybenzimidazol (PBI)			⊕	⊕
Polyetherimid (PEI)			⊕	⊕
Compositmembranen (z.B. Polyamid oder Polyacrylsäure auf Zirkon, Stahl oder Polysulfon)			⊕	⊕

Generell kann zwischen anorganischen (in Tab. 2.05 fett) und Polymermembranen unterschieden werden. Anorganische oder auch Keramik-Membranen sind erst im Verlauf der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts entwickelt worden. Sie bieten einige Vorteile gegenüber Polymermembranen:

INERT GEGEN CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL

Während Polymermembranen von vielen zur Reinigung eingesetzten Chemikalien, insbesondere Chlor, angegriffen werden, tolerieren keramische Membranen nahezu alle Substanzen. Einzige

Ausnahme ist hypofluorige Säure sowie Phosphorsäure, die Aluminiummembranen zersetzt. Gegen feste Zusätze zum Filtrationsmedium als Mittel gegen Verblockung sind anorganische Membranen hingegen empfindlich; hier treten Erosionserscheinungen auf.

TEMPERATURBESTÄNDIGKEIT

Keramikmodule sind bis 350°C temperaturbeständig, erlauben Autoklavieren und Heissdampf-Reinigung. Die meisten Polymermembranen können nur bis maximal 75°C betrieben werden. Ausnahmen davon sind einige PS- und PES-Membranen (bis 125°C) und PTFE-Membranen (bis 260°C).

PH-TOLERANZ

Membranen aus anorganischen Materialien sind im Gegensatz zu Polymermembranen über den gesamten pH-Bereich von 0-14 beständig.

DRUCKBESTÄNDIGKEIT

Drücke bis 10 bar werden von Keramikmodulen toleriert, und diese Limitierung hat ihren Ursprung in den Dichtungen und anderen polymeren Anlagenbauteilen, nicht in den Membranen selbst.

LANGLEBIGKEIT

Die Haltbarkeit von anorganischen Membranen beträgt 10 Jahre und darüber. Begründet ist diese Langzeit-Stabilität in ihrer hohen Toleranz gegen Reinigungsmittel. Die Haltbarkeit von Polymermembranen hingegen hängt von der Anzahl der Reinigungszyklen ab, denen sie ausgesetzt werden müssen. Bei dauerhafter Benutzung beträgt sie durchschnittlich 12 - 18 Monate.

RÜCKSPÜLFÄHIGKEIT

Keramikmodule sind im Gegensatz zu vielen Polymermodulen generell rückspülfähig. Diese Eigenschaft kann für die optimale Reinigungs-Strategie von großer Bedeutung sein.

Nachteile von keramischen Membranen im Vergleich zu Polymermembranen sind:

SPRÖDIGKEIT

Keramikmodule sind sehr empfindlich gegen Vibrationen und Stöße und daher nur sinnvoll in fest installierten Anlagen, die keinen Umbauten unterworfen werden müssen.

PORENGRÖßEN

Bis heute sind aus herstellungs-technischen Gründen nur Mikro- und Ultrafiltrationsmodule erhältlich. Für Filtrationen im Bereich Nanofiltration und Umkehrosmose sind polymere Materialien bis heute unverzichtbar.

ANSCHAFFUNGSKOSTEN

Keramische Module sind die teuersten auf dem Markt erhältlichen Module. Die Preise liegen im Vergleich zu Polymermodulen ca. 10mal höher [CHERYAN, 1998]. Allerdings sind die lange Haltbarkeit und die kontinuierliche Betreibbarkeit der Anlage (kein Auswechseln der Module ist nötig) Gründe, sich trotz der hohen Preise zum Kauf dieses Membrantyps zu entscheiden.

2.2.2 Modul-Geometrien

In der Industrie kommen keine losen Membranen zum Einsatz. Membranen werden in Einheiten mit definierter Geometrie, sogenannten Modulen, vom Hersteller gefertigt und vertrieben (Beispiele siehe Abbildung 2.05).



Abb. 2.05: links: Verschiedene Rohr- und Kapillarmodule [WERBEBROSCHÜRE DER FIRMA MICRODYN, 1998]
Mitte: Anströmfläche eines 4m²-Rohrmoduls [WERBEBROSCHÜRE DER FIRMA MICRODYN, 1998]
rechts: Plattenmodul [WERBEBROSCHÜRE FIRMA DANISH SEPARATION SYSTEMS]

Grundsätzlich können die Membraneinheiten gemäß ihrer Geometrie in Flach- und Rohrmodule unterteilt werden. Die folgende Abbildung zeigt den Aufbau der verschiedenen Modultypen:

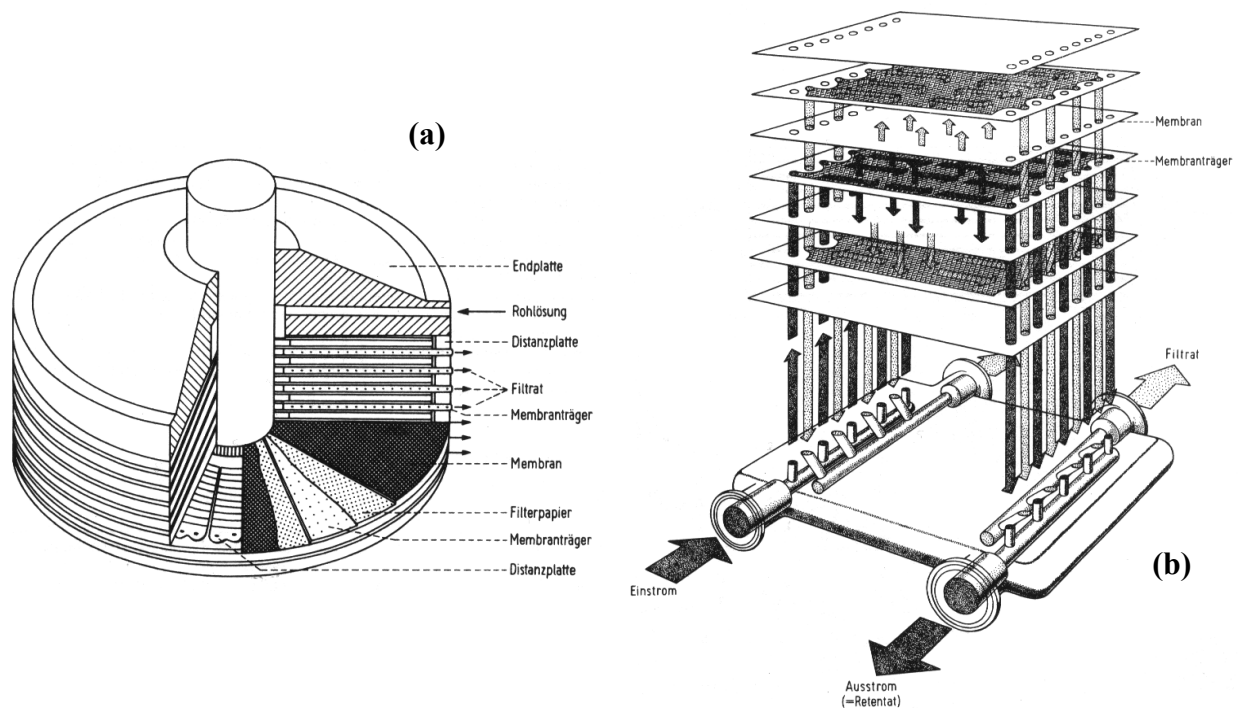


Abb. 2.06: Membranmodul-Konzepte: a) Plattenmodul b) Flachmembran-Kassettenmodul c) Wickelmodul
d) Rohrmembranmodul e) Kapillarmodul f) Hohlfasermodule [SCHLEE & KLEBER, 1991]

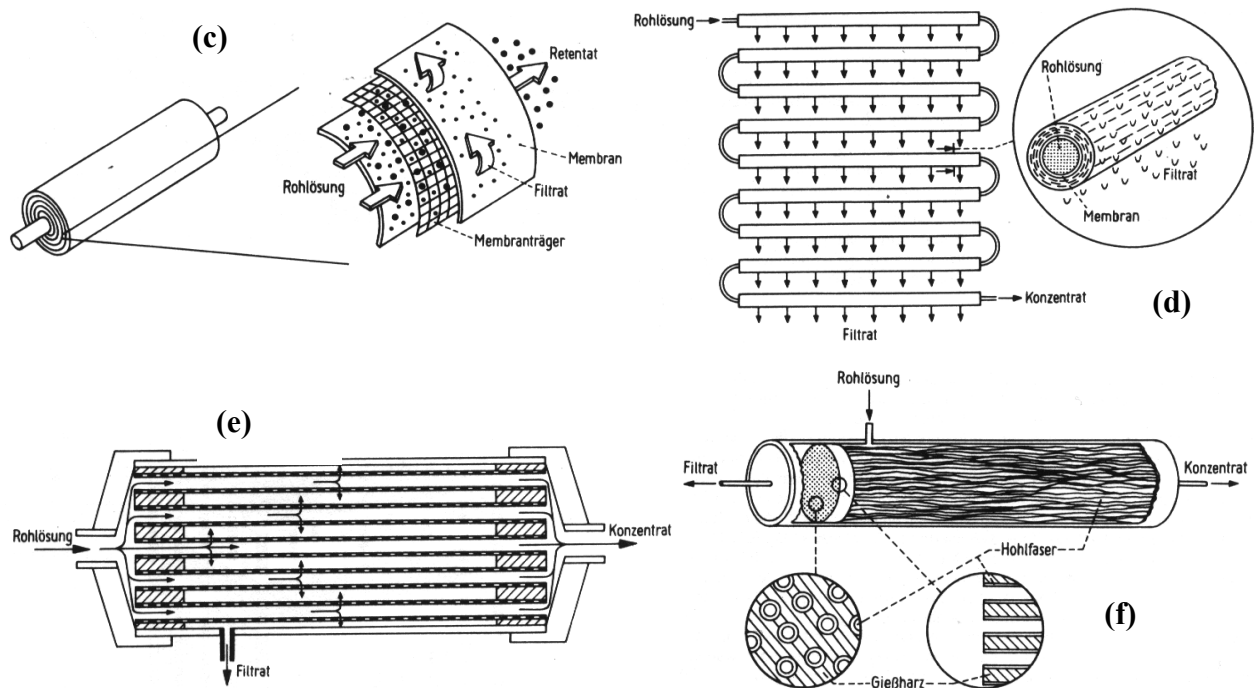


Abb. 2.06: Membranmodul-Konzepte: a) Plattenmodul b) Flachmembran-Kassettenmodul c) Wickelmodul d) Rohrmembranmodul e) Kapillarmodul f) Hohlfasermodul [SCHLEE & KLEBER, 1991]

FLACHMODULE:

Hierzu gehören das klassische Plattenmodul mit auswechselbaren Membranen in einer festen Einspannvorrichtung sowie die zwei fest verschweißten Kompaktmodule Wickel- und Flachmembran-Kassettenmodule. Der prinzipielle Aufbau eines Plattenmoduls besteht aus einer festen Trägerplatte, auf die eine Membran fixiert wird. Zwischen Trägerplatte und Membran wird ein zumeist netzartiger Abstandshalter, ein so genannter Spacer, gebracht, der als Flusskanal für das Permeat dient. Zwei gegeneinander installierte Einheiten dieser Art (als Abstandshalter dient wieder ein Spacer) bilden einen Flusskanal für das Feed. Je nach Einspannvorrichtung können unterschiedlich viele dieser Einheiten miteinander kombiniert werden; auch können verschiedene Membranen gleichzeitig betrieben werden (z.B. für Membran-Screenings). Es werden Packungsdichten von $100 - 400 \text{ m}^2/\text{m}^3$ erreicht.

Das Flachmembran-Kassettenmodul entspricht in Aufbau und Packungsdichte dem Flachmodul. Sämtliche Filtrationsschichten sind fest zu einer Kassette verschweisst. Dadurch ist der Einbau und Modulwechsel wesentlich einfacher und schneller durchzuführen, andererseits ist dieses System unflexibel in Bezug auf Membranfläche und -material.

Wickelmodule können als spiralförmig aufgerollte Flachmembran-Kassettenmodule aufgefasst werden. Das zu filtrierende Medium durchströmt die Feedkanäle axial (Eintritt des Feeds nicht durch den Modulkern, sondern durch die Stirnseite der Membranrolle), während das Permeat nach Eintritt in die Permeaträume koaxial bis in den Kern des Moduls fließt und dann von dort aus

dem Modul abgeführt wird. Durch diese Anordnung können wesentlich höhere Packungsdichten von 800 - 1200 m²/m³ erreicht werden.

ROHRMODULE:

Es wird, basierend auf den unterschiedlichen Innendurchmessern der rohrförmig geformten Membranen, unterschieden zwischen Rohr-, Kapillar- und Hohlfasermodulen (siehe Tabelle 2.06):

Tab. 2.06: Unterteilung der verschiedenen Rohrmodule nach Innendurchmessern und Packungsdichte [SCHLEE & KLEBER, 1991]

	Innendurchmesser [mm]	Packungsdichte [m ² /m ³]
Rohrmodul	> 5	20 - 200
Kapillarmodul	0,5 - 5	500 - 1000
Hohlfasermodul	< 0,5	bis 10000

Als Rohrmodule bezeichnet man demnach schlauchförmige Membranen mit Innendurchmessern von mindestens 5 mm. Die Membranen sind nicht freitragend und einzeln oder zu mehreren Rohren zusammengefasst in makroporöse Strukturen eingebettet. Das Feed wird durch die Rohre geführt, das Permeat tritt durch die Membranfläche nach aussen in die makroporöse Stützschiicht und fliesst von dort aus ab (inside-out-Modus). Die Packungsdichte ist gering, der Energiebedarf aufgrund des besonderen Verhältnisses von Anström- zu Membranfläche höher als bei anderen Modulgeometrien. Rohrmodule kommen bei der Filtration von hochviskosen Medien mit hohem Feststoffanteil zum Einsatz, wo hohe Strömungsgeschwindigkeiten zur Limitierung von Foulingerscheinungen gefordert sind.

Kapillar- und Hohlfasermodule stellen freitragende Membranröhren dar, die, gebündelt zu bis zu 200 (Kapillar) bzw. 3000 (Hohlfaser) Stück pro Modul, an den Stirnseiten in einem Modulmantel verklebt sind. Im Gegensatz zu Rohrmodulen sind zwei Betriebsweisen möglich: inside-out, wo die Membranröhren von innen vom Feed durchströmt werden und das Permeat nach aussen abfliesst (siehe Abb. 2.06e), und outside-in, wo das Feed die Röhren von aussen umströmt und das Permeat im Innenraum der Membranen gesammelt und abgeführt wird (siehe Abb. 2.06f). Die Drucktoleranz dieser Membranen sowie die Packungsdichten sind deutlich höher als bei Rohrmembranen. Der Druckabfall vor dem Modul ist höher, die Überströmungsgeschwindigkeit entlang der Membranen hingegen geringer. Kapillarmodule werden daher zur Filtration von niederviskosen Medien, Hohlfasermodule zur Nanofiltration und Umkehrosmose eingesetzt.

2.2.3 Membranen mit aktivierten Oberflächen

Membranen können zu Adsorbersystemen umgestaltet werden, indem funktionelle Gruppen an die Poreinnenwände einer synthetischen mikroporösen Membran fixiert werden (siehe Abbildung 2.07). In Abhängigkeit von der Art der funktionellen Gruppen können so Membranen zur Affinitäts- und Ionenaustausch-Chromatographie erhalten werden. Anwendungsgebiete für Membranadsorber sind die Isolierung und Aufkonzentrierung von Proteinen oder monoklonalen Antikörpern sowie die Entfernung von Kontaminanden wie DNA oder Endotoxinen aus Lösungen.

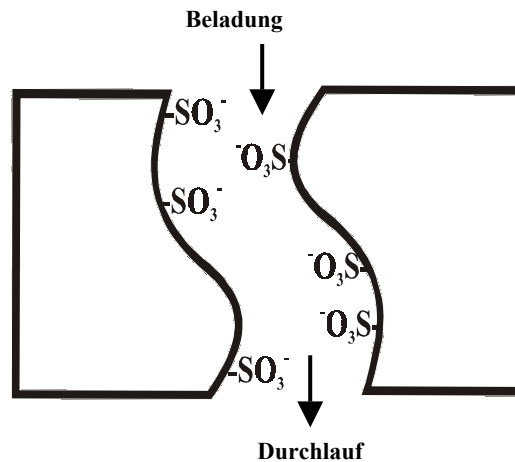


Abb. 2.07: Schematische Darstellung eines Porendurchschnitts einer Kationenaustauschermembran

Kommerziell erhältlich für den Labor- und Technikumsmaßstab sind Ionenaustauschermembranen mit stark sauren (Sulfonsäuregruppen), stark basischen (quartäre Ammoniumgruppen), schwach sauren (Carboxylgruppen) und schwach basischen (Diethylamingruppen) Eigenschaften.

Membranadsorbertechnik zum Ionenaustausch bietet einige Vorteile im Vergleich zu konventioneller Säulenchromatographie:

- keine Porendiffusionskontrollierte Austauschkinetik, dadurch höhere Flussraten
- niedrigere Anlagenfixkosten (siehe auch Kapitel 4.5)
- einfache Handhabung und Up-Scaling
- flexible Anlagen bestehend aus Modulen in Serie und/oder Parallelschaltung können jederzeit neuen Anwendungen angepasst werden

Im Rahmen dieser Arbeit ist mit stark sauren Membranadsorbentern der Firma Sartorius AG, Göttingen, Deutschland zur Isolierung von Lactoferrin aus Molke gearbeitet worden (siehe auch Kapitel 3.2).

2.3 Membran-Filtration

Als Filtration wird die Abscheidung eines Feststoffes aus einem Fluid mit einer für das Fluid durchlässigen Schicht bezeichnet, durch die der Feststoff zurückgehalten wird. Es handelt sich um eine physikalische Trennmethode, die auf unterschiedlicher Teilchengröße basiert (siehe auch Kapitel 2.2).

Die Membran-Filtration stellt ein Trennverfahren dar, bei dem das Substanzgemisch durch Konvektion an die Oberfläche einer Membran gebracht wird. Während ein Teil der Probenkomponenten die Membran durchdringt, zumeist unter der treibenden Kraft eines hydrostatischen Druckes, wird ein anderer Teil von der Membran zurückgehalten.

Die Filtration bietet als Prozess-Schritt zur Fraktionierung von Medien einige Vorteile gegenüber anderen Separationstechniken wie z.B. Destillation oder Zentrifugation:

- im crossflow-Betrieb ist eine kontinuierliche Betriebsweise möglich
- geringer Energieaufwand
- einfache Integration in bestehende Prozesse
- milde Reaktionsbedingungen (kein thermischer oder mechanischer Stress)
- leichtes Up-Scaling
- optimale Anpassung des vielfältigen Membranmaterials (s.o.) an die Anforderungen der jeweiligen Anwendung

Als Nachteile der Membranfiltration sind zu nennen:

- Fouling (siehe Kapitel 2.3.2)
- Materialverschleiss (begrenzte Lebensdauer der Membran)
- geringe Selektivität

2.3.1 Arten der Prozessführung

Es gibt zwei Betriebsarten auf dem Gebiet der Membranfiltration: statische und dynamische Prozessführung.

Bei der statischen (dead end) Filtration wird die Membran orthogonal von dem zu filtrierenden Medium durchströmt (siehe Abbildung 2.08). Alle zurückgehaltenen Partikel lagern sich auf der Membranoberfläche ab. Die so entstehende Deckschicht, der Filterkuchen, bildet einen zeitlich anwachsenden Strömungswiderstand, und es kommt zu einer Abnahme des Permeatflusses durch die Membran. Damit der Permeatfluss nicht völlig zum Erliegen kommt, muss das Modul

periodisch gereinigt oder ausgetauscht werden. Die statische Filtration wird angewandt, wenn die Konzentration der abzutrennenden Inhaltsstoffe niedrig ist, z.B. bei der Aufbereitung von Oberflächenwasser zu Trinkwasser oder zur Entkeimung.

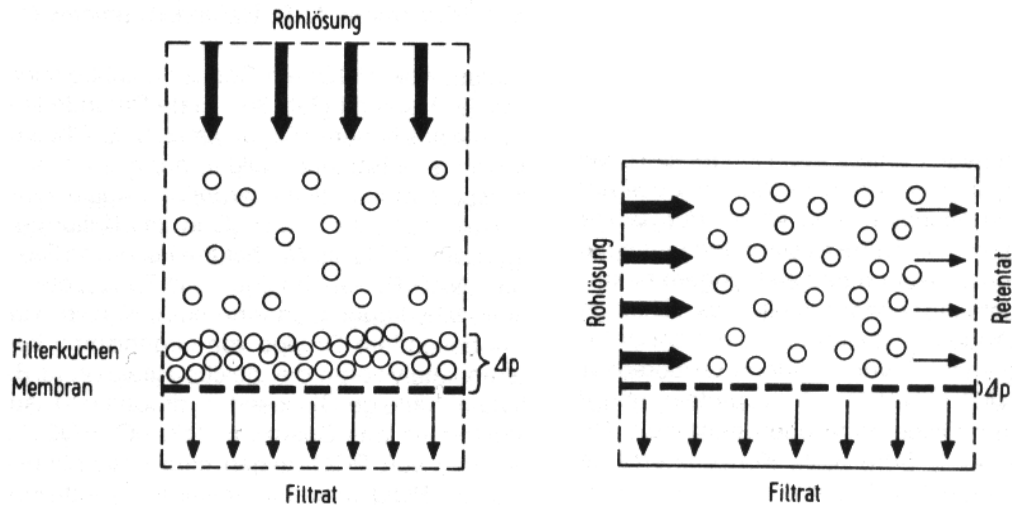


Abb. 2.08: Schematische Darstellung des Prinzips der Filtration im Dead-end und Crossflow Modus [SCHLEE & KLEBER, 1991]

Im Rahmen dieser Arbeit ist die dynamische Betriebsführung, auch Querstrom- oder Crossflow-Filtration genannt, angewandt worden. Das zu filtrierende Medium durchströmt das Modul parallel zur Membran. Mit der Überströmung werden Scher- und Auftriebskräfte an der Oberfläche der Membran erzeugt und abgelagerte Partikel können je nach Stoffsystem aus der Deckschicht in die Kernströmung zurückgeführt werden. Ist eine Minimierung der Deckschicht durch hohe Strömungsgeschwindigkeiten möglich, so spricht man von reversibler Deckschichtbildung. Ein solches System verhält sich nach einer Anfahrzeit stationär, d.h. Ablagern und Mitreissen der Partikel stehen im Gleichgewicht, und bei konstanter Deckschichtdicke stellt sich ein stationärer Permeatfluss ein. Bei vielen Anwendungen der Mikro- und Ultrafiltration findet eine derartige Deckschichtbildung statt. Struktur und Dicke der Deckschicht sind für die Lage der effektiven Trenngrenze der Membran von großer Bedeutung und teilweise sogar erwünscht, da hierdurch die Gefahr einer inneren Membranverblockung durch kleine Partikel verhindert werden kann. Die Deckschicht kann als eine in-situ erzeugte Membranschicht geringerer Porengröße nach dem Prinzip der zweischichtigen Compositmembranen aufgefasst werden. Die Anwendungsgebiete der Crossflow-Filtration sind vielfältig, neben pharmazeutischer und metallverarbeitender Industrie existieren viele Anwendungen in der Lebensmittelindustrie (Klarfiltration von Wein und Bier, Molkenverarbeitung u.a.).

2.3.2 Flusslimitierende Faktoren

Bei einer Filtration wird ein Teil der konvektiv zur Membran transportierten Komponenten aufgrund des Rückhaltevermögens der Membran am Durchtritt gehindert. Dadurch entsteht ein Anstieg der Konzentration dieser Stoffe an der Membran. Die Ausbildung einer solchen Schicht erhöhter Konzentration wird Konzentrationspolarisation genannt. Sie ist hauptsächlich für die starke Flussabnahme verantwortlich, die auftritt, wenn eine Filtrationsanlage von reinem Wasser auf Realmedium umgestellt wird.

Kommt es an der Membran zu Partikelablagerungen an oder in den Poren, so spricht man von Fouling. Fouling ist einer der limitierenden Faktoren in der Membran-Technik (siehe Kapitel 2.3.1) und zeigt sich in kontinuierlich abfallenden Permeatflüssen unter konstanten Betriebsbedingungen. Im Gegensatz zur Konzentrationspolarisation, deren Schichtdicke durch die eingestellten Betriebsparameter beeinflusst werden kann, stellt Fouling eine irreversible Form der Flusslimitierung dar. Ein höherer Fluss kann erst wieder nach einer Reinigung der Membran erreicht werden.

Es sind verschiedene Modelle entwickelt worden, um den Verlauf einer Filtration und den Abfall des Permeatflusses mathematisch zu beschreiben. Die Vorgänge an der Membranoberfläche sind jedoch so komplex, dass die Modelle den tatsächlichen Filtrationsverlauf nicht exakt erfassen und nur Näherungen darstellen.

Unter idealen Bedingungen (gleichmäßig verteilte und geformte Poren, kein Fouling und vernachlässigbare Konzentrationspolarisation) kann der Durchtritt eines Fluids mit dem Gesetz von Hagen-Poiseuille beschrieben werden:

$$J = \frac{\varepsilon \cdot d_p^2 \cdot (TMP - \Delta\pi)}{32 \cdot \Delta x \cdot \mu} \quad (\text{Gl. 2.06})$$

mit J = Fluss durch die Membran ε = Oberflächenporosität der Membran d_p = Porendurchmesser TMP = Transmembrandruck (s.u.); $\Delta\pi$ = osmotischer Druck; Δx = Länge der Pore; μ = Viskosität des Permeats

Bei den meisten Anwendungen in der Mikro- und Ultrafiltration kann der osmotische Druck der zurückgehaltenen Komponenten aufgrund ihrer hohen Molekulargewichte vernachlässigt werden, und Gleichung 2.06 vereinfacht sich zu:

$$J = \frac{\varepsilon \cdot d_p^2 \cdot TMP}{32 \cdot \Delta x \cdot \mu} \quad (\text{Gl. 2.07})$$

Die Berechnung des Transmembrandruckes erfolgt nach:

$$TMP = P_R - P_P \quad (\text{Gl. 2.08})$$

mit P_R = mittlerer Druck auf der Retentatseite P_P = Druck auf der Permeatseite

Die einzige variable Größe in der Gleichung von Hagen-Poiseuille ist der Transmembrandruck. Der Permeatfluss sollte sich also in Abhängigkeit des Transmembrandruckes einstellen. Bei der Filtration von reinem Wasser ist das tatsächlich der Fall. Die Filtrationen von Realmedien hingegen zeigen einen Permeatfluss-Verlauf, der mit dem Gesetz nicht korreliert, wie Abbildung 2.09 zeigt:

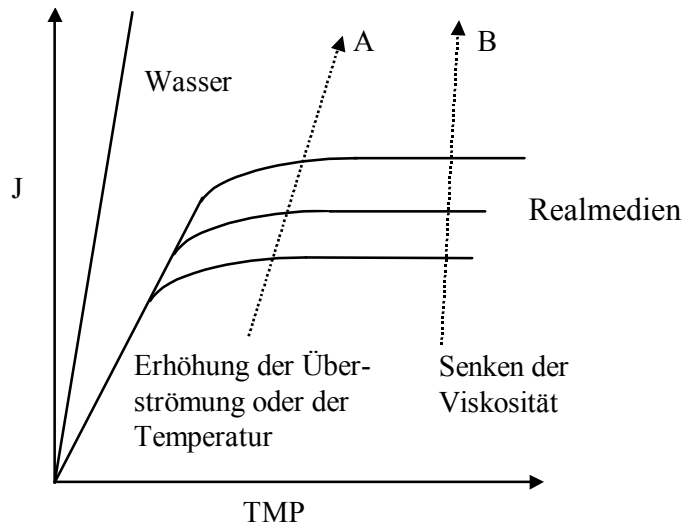


Abb. 2.09: Vergleich von Permeatfluss-Verläufen verschiedener Flüssigkeiten

Der Permeatfluss der Realmedien lässt sich in zwei Bereiche einteilen: einen druckabhängigen und einen druckunabhängigen Bereich. Ab einem für jedes Filtrationssystem spezifischen Transmembrandruck führt eine weitere Druckerhöhung zu keiner Steigerung der Permeatleistung mehr.

DAS MASSEN-TRANSFER-MODELL

Das Massen-Transfer-Modell oder auch Film-Theorie-Modell beschreibt den Filtrationsverlauf im druckunabhängigen Bereich. Es beruht auf der Annahme, dass sich durch Konzentrationspolarisation (s.o.) ein Konzentrationsgefälle und eine Gelschicht vor der Membranoberfläche aufbaut (siehe auch Abbildung 2.10). Sowohl der Transport der Partikel aus der Kernströmung durch dieses Konzentrationsgefälle und die Gelschicht an die Membran als auch ihr Rücktransport kann mit den Gesetzen der Diffusion beschrieben werden. Unter Gleichgewichtsbedingungen (steady state) sind die Massenströme zu und von der Membran gleich groß und es gilt:

$$J \cdot c_F = D \frac{dc}{dx} \quad (\text{Gl. 2.09})$$

mit J = Permeatfluss c_F = Stoffkonzentration im Feed D = Diffusionskoeffizient dc/dx = Konzentrationsgradient über ein differentielles Volumenelement

Die Gleichung 2.09 kann über die Schichtdicke des Konzentrationsgefälles integriert werden:

$$J = \frac{D}{\delta} \cdot \ln \frac{c_G}{c_F} = k \cdot \ln \frac{c_G}{c_F} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

mit c_G = Stoffkonzentration in der Gelschicht δ = Schichtdicke zwischen Feed und Gelschicht, in der ein Konzentrationsgradient auftritt k = Massentransfer-Koeffizient

Über Gleichung 2.10 kann der Permeatfluss nach dem Film-Theorie-Modell berechnet werden. Die Gleichung enthält keinen Druckterm, ist also nur im druckunabhängigen Bereich (s.o.) anwendbar. Änderungen von J werden durch die eingesetzte Stoffkonzentration im Feed oder durch Einflüsse, die die Größe von k bestimmen, erreicht. Hierzu gehören Temperaturänderungen (Änderung von D) oder Variation von Strömungsgeschwindigkeit bzw. Scherrate im Feed (Änderung von δ). Basierend auf dem Massen-Transfer-Modell sind verschiedene weiterführende Modelle zur Permeatflussberechnung entwickelt worden, die jedoch alle nur begrenzte Gültigkeit in verschiedenen Teilbereichen der Filtration haben. Unter Anwendung des Π -Theorems und der Dimensionsanalyse kommt man für die Filtration zu folgendem Zusammenhang zwischen den drei Kennzahlen Sherwoodzahl (Sh), Reynoldszahl (Re) und Schmidtzahl (Sc):

$$Sh = A \cdot (Re)^\alpha \cdot (Sc)^\beta \quad (\text{Gl. 2.11})$$

mit A ; α ; β = Konstanten, deren Größe von den Strömungsverhältnissen im System abhängt d_h = charakteristischer Durchmesser

$$Sh = \frac{k \cdot d_h}{D} \quad (\text{Gl. 2.12})$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho \cdot D} \quad (\text{Gl. 2.13})$$

$$Re = \frac{d_h \cdot v \cdot \rho}{\mu} \quad (\text{Gl. 2.14})$$

mit ρ = Dichte v = Strömungsgeschwindigkeit μ = Viskosität

Die Sherwoodzahl Sh ist eine dimensionslose Kennzahl, die das Verhältnis von Stofftransport durch Konvektion zum Stofftransport durch Diffusion angibt. Die Schmidtzahl Sc drückt das Verhältnis der molekularen Ausgleichskoeffizienten für Impuls- und Stofftransport aus. Die Reynoldszahl Re ist eine dimensionslose Kennzahl, die das Verhältnis von Trägheitskraft zu Viskositätskraft in einem System beschreibt. Große Reynoldszahlen bedeuten turbulente Strömungsverhältnisse, kleine sind für laminare Strömungen charakteristisch. Ein Richtwert für den Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung in Rohren bzw. Rohrmodulen ist die kritische Reynoldszahl $Re \geq 2.300$. Bei geringen Oberflächenrauigkeiten kann allerdings laminare Strömung bis zu $Re \sim 10.000$ realisiert werden [JAKUBITH, 1991].

DAS WIDERSTANDSMODELL

Ein alternativer Ansatz zur Charakterisierung des realen Permeatfluss-Verhaltens einer Membran ist das Widerstandsmodell. Ausgehend vom Gesetz von Hagen-Poiseuille für ideale Verhältnisse kann Gleichung 2.07 umformuliert werden gemäß:

$$J = A \frac{TMP}{\mu} \quad (\text{Gl. 2.15})$$

mit A = Membran-Permeabilitäts-Koeffizient

Der Membran-Permeabilitäts-Koeffizient A fasst alle membranspezifischen Daten aus Gleichung 2.07 zusammen. Für die Beschreibung einer speziellen Feed-Komponente bei Raumtemperatur werden A und μ zusammengefasst zu $1/R_M$ mit R_M als intrinsischem Membranwiderstand, der gegen reines Wasser als Feed gemessen wird:

$$J_{\text{Wasser}} = \frac{TMP}{R_M} \quad (\text{Gl. 2.16})$$

Messungen von R_M dienen nicht nur der Prozess-Modellierung, sondern auch der Beurteilung von Reinigungs-Prozeduren (siehe Kapitel 2.3.3). Der intrinsische Membranwiderstand R_M ist nicht der einzige Widerstand, der den Permeatfluss bei der Filtration von Realmedien limitiert. Weitere Widerstände entstehen durch Foulingprozesse, den Aufbau einer Gelschicht auf der Membran sowie durch Konzentrationspolarisation (siehe Abbildung 2.10).

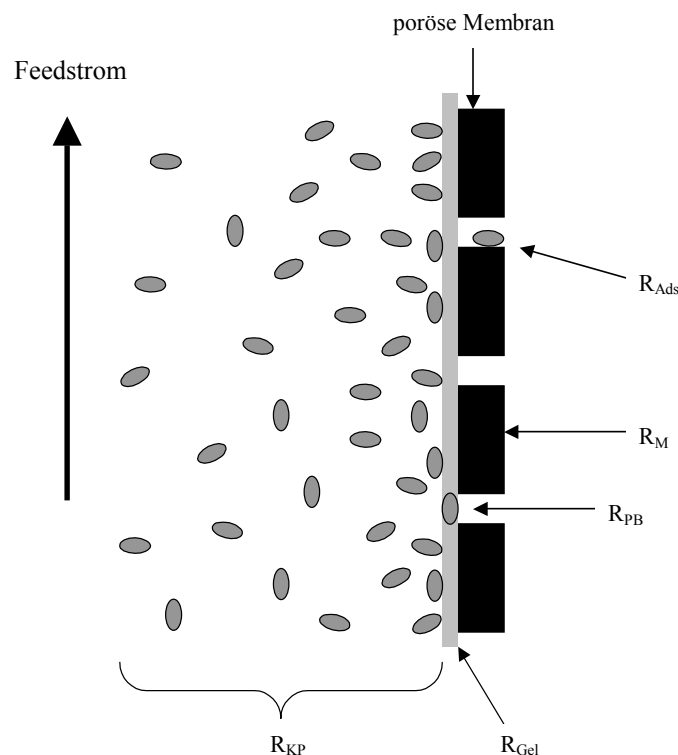


Abb. 2.10: Modell von verschiedenen Widerständen bei der Membranfiltration

Bezieht man diese Widerstände in Gleichung 2.16 ein, so erhält man folgenden Ausdruck:

$$J = \frac{TMP}{R_M + R_{PB} + R_{Ads} + R_{KP} + R_{Gel}} \quad (\text{Gl. 2.17})$$

mit R_{PB} = Widerstand durch Porenverblockung R_{Ads} = Widerstand durch Partikeladsorption an der Membranwand R_{KP} = Widerstand durch Konzentrationspolarisation R_{Gel} = Widerstand durch Ausbildung einer Gelschicht

R_{PB} und R_{Ads} können zu einem Widerstand R_F für Widerstand durch Fouling-Prozesse zusammengefasst werden und sind weitestgehend unabhängig von den Prozessparametern. Die Größen R_{KP} und R_{Gel} hingegen sind abhängig von den eingestellten Prozessparametern und somit eine Funktion des eingestellten Transmembrandruckes. Es gilt:

$$R_{KP} + R_{Gel} = R_G = \Phi TMP \quad (\text{Gl. 2.18})$$

Kombiniert man die Gleichungen 2.17 und 2.18, so erhält man:

$$J = \frac{TMP}{R_M + R_F + \Phi TMP} \quad (\text{Gl. 2.19})$$

Diese Gleichung beschreibt typische Fluss-Druck-Abhängigkeiten, die bei Filtrationen von Realmedien aufgenommen werden können. Bei geringen Betriebsdrücken ist R_G klein im Vergleich zu $(R_M + R_F)$, und der Fluss ist eine Funktion von TMP . Bei hohen Drücken wird der R_G -Term relativ groß. Dann ist der Fluss weniger druckabhängig und nähert sich dem Grenzwert $1/\Phi$. Φ ist eine Funktion, die von den Faktoren Viskosität, eingestellter Temperatur und dem Verhältnis Scherrate zu Flussgeschwindigkeit beeinflusst wird.

2.3.3 Reinigung

Jede Membran muss nach einer bestimmten Prozess-Zeit gereinigt werden. Der angewandte Reinigungs-Mechanismus muss individuell für jeden Filtrationsprozess entwickelt werden. Faktoren, die die Reinigungsprozedur beeinflussen, sind:

MEMBRAN-MATERIAL

Nicht jedes Membranmaterial ist gegen jedes Reinigungsmittel beständig. So dürfen z.B. Celluloseacetat-Membranen nicht mit starken Säuren oder Basen, Polyamidmembranen nicht mit Chlor gereinigt werden. Bei der Reinigung keramischer Membranen können nahezu alle Chemikalien eingesetzt werden. Hier ist darauf zu achten, dass keine anderen Anlagenbauteile durch extreme Reinigungsbedingungen geschädigt werden.

MECHANISCHE ENERGIE

Reinigungs-Substanzen sollten mit möglichst hoher Flussgeschwindigkeit durch das System gepumpt werden, um gebildete Deckschichten durch maximale Scherraten abtragen zu können.

Dabei sollte die Permeatseite zunächst geschlossen gehalten werden, um zu verhindern, dass durch den hohen Druck auf der Retentatseite Partikel in die Poren gedrückt werden und so zu erneuter Verblockung beitragen. Ist die zu reinigende Anlage rückspülfähig, kann die Gefahr der Porenverstopfung von der Retentatseite her umgangen werden, indem die Reinigungslösung von der Permeatseite durch das System gepumpt wird.

ZEIT

Je mehr Zeit ein Reinigungszyklus in Anspruch nimmt, desto weniger Zeit steht für die Produktgewinnung zur Verfügung, und die Rentabilität des Filtrationsprozesses nimmt ab. Andererseits benötigen einige Reinigungsmittel, insbesondere Enzymlösungen, lange Einwirkzeiten, um einen Reinigungseffekt zu erzielen.

TEMPERATUR

Die Kinetik chemischer Reaktionen ist stark temperaturabhängig, pro Erhöhung um 10°C verdoppelt sich die Reaktionsrate. Da Reinigungsprozeduren hauptsächlich chemische Reaktionen darstellen, ist eine Reinigung bei möglichst hoher Temperatur durchzuführen. Hier ist wieder das Membranmaterial der limitierende Faktor, so tolerieren z.B. Celluloseacetat-Membranen keine Temperaturen oberhalb 50°C. Bei enzymatischen Reinigungsmitteln ist darauf zu achten, dass die eingestellte Temperatur dem Optimum der enthaltenen Enzyme entspricht.

WASSERQUALITÄT

Die Qualität des zur Reinigung eingesetzten Wassers ist ein oftmals unterschätzter Faktor. Die Wasserhärte muss bekannt sein, und hartem Wasser sollten Komplexbildner wie z.B. Citrate oder Polyphosphate zugesetzt werden, um Calcium-Präzipitate auf der Membran zu vermeiden. Auch andere Metallionen wie Eisen oder Mangan sowie Silicate können langfristig zu einer Abnahme der Filtrationsleistung der Membran führen.

pH-WERT

Auch hier spielt das Material der zu reinigenden Membran eine entscheidende Rolle. Aber nicht jeder pH-Wert führt bei verschiedenen Verschmutzungen zu den gleichen Reinigungserfolgen. Basische Reinigungsmittel sind effektiv bei der Beseitigung von organischen Rückständen und Proteinen, saure Lösungen kommen bei der Entfernung anorganischer Rückstände zum Einsatz.

Bei der Herleitung der Gleichung 2.19 zur Permeatflussberechnung mit dem Widerstandsmodell ist Gleichung 2.16 aufgestellt worden. Durch Messung des Flusses durch eine Membran mit Wasser als Feed kann der intrinsische Membranwiderstand R_M bei definiertem TMP ermittelt werden. Messungen von R_M dienen der Beurteilung von Reinigungs-Prozeduren. Hierfür wird vor der Filtration des Realmediums der Wasserfluss durch die Membran, auch Wasserwert genannt,

bei einem definierten Transmembrandruck bestimmt. Die Messung des Wasserwertes nach der Filtration unter gleichen Bedingungen zeigt den Grad der Verschmutzung der Membran. Mit Wasserwert-Messungen nach einer Reinigung können Aussagen getroffen werden über die Effizienz der Reinigungsmethode (siehe Kapitel 4.1.4 und 4.2.4). Demnach gilt eine Membran als gereinigt, wenn der Wasserwert, der vor der Filtration gemessen worden ist, nach der Reinigung wieder erreicht wird. Wichtig für die Aufnahme des Wasserwertes ist eine exakte Temperaturangabe, da der Wasserfluss durch die Membran stark temperaturabhängig ist [CHERYAN, 1998]:

$$1,276 \cdot J_{Wasser}^{15^{\circ}C} = J_{Wasser}^{25^{\circ}C} = 0,615 \cdot J_{Wasser}^{50^{\circ}C} \quad (\text{Gl. 2.20})$$

Die folgenden Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen zeigen Oberflächen von Rohrmembranen, wie sie in Kapitel 4.1 zur Crossflow-Mikrofiltration von Molke verwendet worden sind, vor und nach einer erfolgreichen Reinigung:

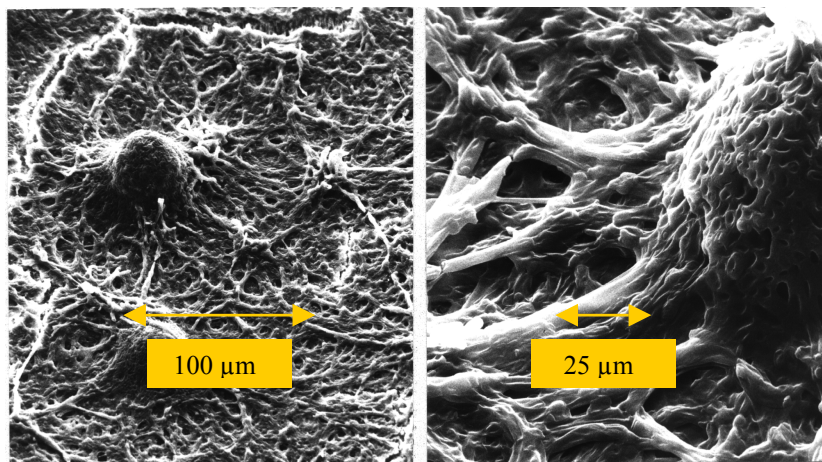


Abb. 2.11a: Membranoberfläche eines Polypropylen-Rohrmoduls nach Molkenfiltration; ungereinigt
links: 280fache Vergrößerung rechts: 1300fache Vergrößerung

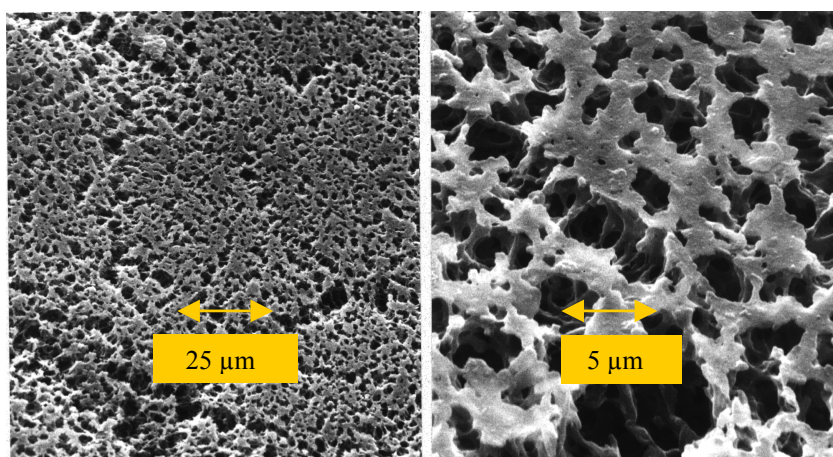


Abb. 2.11b: Membranoberfläche eines Polypropylen-Rohrmoduls nach Molkenfiltration; gereinigt
links: 1300fache Vergrößerung rechts: 7500fache Vergrößerung
(Quelle: Solvay Pharmaceuticals, Hannover, Deutschland)

3 Material und Methoden

CHEMIKALIEN

Die Standardreagenzien wurden von den Firmen Sigma oder Fluka in den handelsüblichen p.a. (pro analysis)-Qualitäten bezogen.

Tab. 3.01: Nicht-Standard-Reagenzien:

Substanz	Firma
α -Cyanozimtsäure	Sigma
Sinapinsäure	Sigma
Insulin (aus Schweinemagen)	Sigma
bov. Lactoferrin	Morinaga Milk Industries, Japan
Ultrasil P3-53	Henkel

3.1 1. Prozess-Stufe: Crossflow-Mikrofiltration

MEMBRAN-SCREENING

MEMBRANEN

Für das Membranscreening wurde eine Reihe von Mikrofiltrations-Membranen verwendet, die eine repräsentative Auswahl der in der Industrie gebräuchlichen Modulgeometrien darstellen und zur Verfügung standen. Es wurden die folgenden Module/Membranen eingesetzt:

- Spiralm modul; Typ S4-MFK-601-VSV; der Firma KOCH/Abcor, Düsseldorf, Deutschland
- Rohrmodul; Typ MD 020 TP 2N; der Firma Microdyn, Wuppertal, Deutschland
- Rohrmodul; Typ SE 020 TP 3N; der Firma Microdyn, Wuppertal, Deutschland
- Kapillarmodul; Typ MD 020 CP 4N; der Firma Microdyn, Wuppertal, Deutschland
- Plattenmembran; GRM 0,1 PP; der Firma Danish Separation Systems, Nakskov, Dänemark
- Plattenmembran; GRM 0,2 PP; der Firma Danish Separation Systems, Nakskov, Dänemark
- Plattenmembran; FSM 0,45 PP; der Firma Danish Separation Systems, Nakskov, Dänemark
- Keramik-Modul; Material Al_2O_3 ; der Firma Invensys APV, Unna, Deutschland

BENETZUNG VON MODULEN AUS HYDROPHOBEM MATERIAL

Die Membranen in den Modulen der Firma Microdyn bestehen aus dem hydrophoben Material Polypropylen. Daher müssen sie vor dem Filtrieren von hydrophilen Medien wie Molke hydrophilisiert werden. Diese Benetzung wird üblicherweise mit Medien, die eine Oberflächenspannung

kleiner 35 mN/m besitzen, durchgeführt (z.B. Ethanol oder Isopropanol, beide mindestens 60%ig). Die Module werden mit dem Benetzungsmittel gefüllt. Nach 30 Minuten werden die Module in die Apparatur eingebaut und das Benetzungsmittel mit dest. Wasser verdrängt.

VERSUCHSAUFBAU UND DURCHFÜHRUNG IM RECYCLED BATCH MODUS

Abbildung 3.01 zeigt den Versuchsaufbau für das Membran-Screening. Die Versuchsdurchführung zur Filtration mit Flachmembranen ist in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

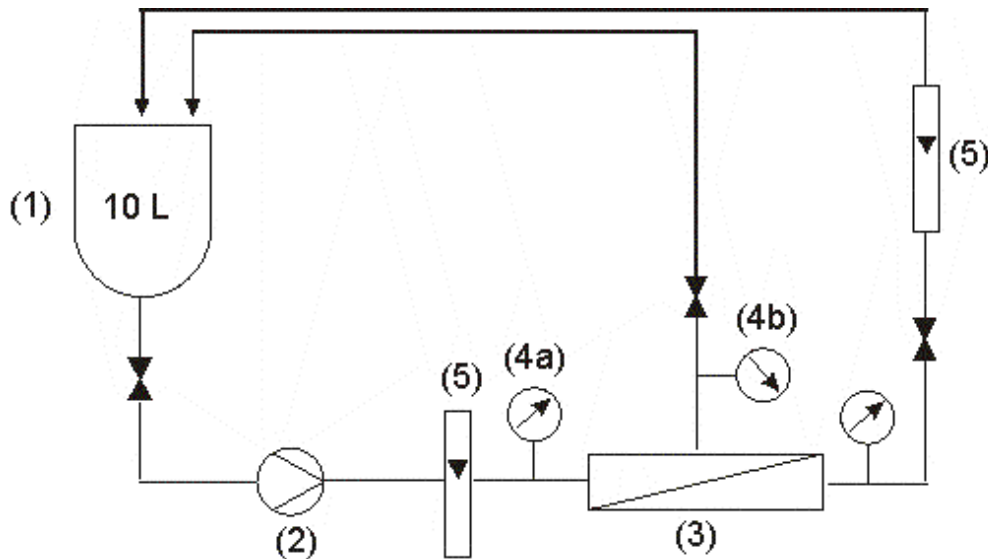


Abb. 3.01: Schema der recycled-batch-Versuchsanordnung für das Membranscreening; (1)=Vorlagebehälter, (2)=Pumpe, (3)=Membranmodul, (4a,b)=Manometer, (5)=Durchflussmessgerät

Die auf 50°C erwärmte Molke ist in einem 10 L-Reservoir (1) vorgelegt worden. Mit einer Pumpe (2) wurde die Molke durch den Retentatraum des zu testenden Moduls (3) gepumpt und das Retentat zurück in das Reservoir geleitet. Vor und hinter dem Modul waren Manometer installiert (4a, 4b). Das Permeat ist wie das Retentat in die 10 L-Vorlage zurückgeführt worden. Für Retentat und Permeat waren Durchfluss-Messgeräte in die Anlage integriert (5). Der Druck vor dem Modul (Manometer 4a) wurde einheitlich mit der Systempumpe auf 2 bar eingestellt. Der Druck am Retentat-Ausgang wurde nicht geregelt, d.h. der Retentatfluss nicht gedrosselt.

TRANSMISSIONSMESSUNG

Die Messungen sind an einem Zweistrahl-Photometer Uvikon 922 der Firma Kontron Instruments durchgeführt worden. Die Transmissionswerte für Molke und Molkenpermeate wurden bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen Wasser bestimmt. Die Transmissionswerte von Molke schwanken zwischen 5 % und 20 %, bei Molkenkonzentrat ist eine Transmission nicht mehr messbar. In früheren Arbeiten [WEISS 1999] ist der minimale Transmissionswert für prozessfähiges Molkenpermeat zu 30 % bestimmt worden.

BERECHNUNG VON ANSTRÖMFLÄCHE, STRÖMUNGSGESCHWINDIGKEIT UND REYNOLDSZAHL

1.: Plattenmodul: Es gelten die Gleichungen 3.01 bis 3.03:

$$\text{Anströmfläche:} \quad A = a \cdot b \cdot n \quad (\text{Gl. 3.01})$$

$$\text{Strömungsgeschwindigkeit:} \quad v = \frac{J}{A} \quad (\text{Gl. 3.02})$$

$$\text{Scherrate:} \quad \gamma = 6 \cdot \frac{V}{b} \quad (\text{Gl. 3.03})$$

2.: Rohr- und Kapillarmodul: Es gelten die Gleichungen 3.04, 3.02 und 3.05:

$$\text{Anströmfläche:} \quad A = 0,25 \cdot \pi \cdot d^2 \cdot m \quad (\text{Gl. 3.04})$$

$$\text{Scherrate:} \quad \gamma = 8 \cdot \frac{V}{d} \quad (\text{Gl. 3.05})$$

$$\text{Reynoldszahl:} \quad Re = \frac{d_h \cdot v \cdot \rho}{\mu} \quad (\text{Gl. 2.14})$$

J = Retentatfluss; a = Spacerbreite; b = Spacerhöhe; d = Innendurchmesser der Membranrohre; n = Anzahl der Retentaträume; m = Anzahl der Membranrohre; d_h = Innendurchmesser Retentatraum; ρ = Dichte von Molke = 1,024 g/cm³; μ = Viskosität von Molke = 1,09 g/m·s

UP-SCALING

VERSUCHSAUFBAU UND DURCHFÜHRUNG

Abbildung 3.02 zeigt den Versuchsaufbau für die Molkenfiltration mit der verwendeten 4 m²-Kompaktanlage:

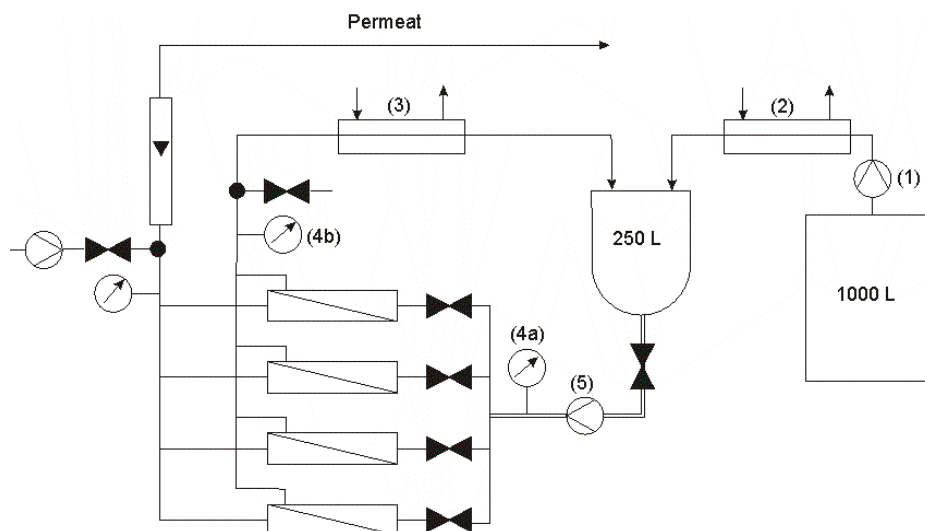


Abb. 3.02: Schema der Versuchsanordnung für die Molkenfiltration im 4 m²-Maßstab mit Aufkonzentrierung; (1)=Fasspumpe, (2,3)=Wärmetauscher, (4a,b)=Manometer, (5)=Systempumpe

Die auf 10°C gekühlte angelieferte Molke ist aus einem 1000 L-Tank mit einer Fasspumpe (1) über einen Wärmetauscher (2) in den 250 L-Vorlagebehälter der Kompaktanlage gepumpt

worden. Das Retentat wurde mit der Systempumpe (5) in der Anlage zirkuliert und dabei über einen zweiten Wärmetauscher (3) weiter erwärmt. Während der Filtration im recycled batch Modus wurde das gewonnene Permeat in den Vorlagebehälter zurückgeführt. Bei der Filtration im fed batch Modus wurde das Permeat in ein Zwischenreservoir geleitet und die dem System somit entnommene Flüssigkeit durch weitere Molke aus dem 1000 L-Tank ersetzt. Der Betriebsdruck vor den Modulen (4a) wurde über die Systempumpe auf 2 bar eingestellt.

BERECHNUNG DES KONZENTRIERUNGSFAKTORS

Der Konzentrierungsfaktor f ist ein Maß für den Grad der Aufkonzentrierung des Filtrationsmediums, das auf der Retentatseite zirkuliert wird, während das gewonnene Permeat dem Filtrationskreislauf entzogen wird. Es gilt die folgende Gleichung (siehe auch Gl. 2.05):

Konzentrierungsfaktor:
$$f = \frac{V_{t=0}}{V_{\text{Ende}}} \quad (\text{Gl. 2.05})$$

Für eine Molkenfiltration mit der 1 m²-Anlage, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, gilt folglich

$$f_{1\text{m}^2} = \frac{1000\text{L}}{250\text{L}} = 4 \quad ,$$

für die 4 m²-Anlage gilt
$$f_{4\text{m}^2} = \frac{1000\text{L}}{200\text{L}} = 5 \quad .$$

3.2 2. Prozess-Stufe: Isolierung von Lactoferrin

MEMBRANEN

Es ist mit Kationenaustauscher-Membranen vom Sulfonyl-Typ der Firma Sartorius AG gearbeitet worden. Die Module sind mit modifizierten makroporösen Celluloseacetat-Membranen bestückt, an deren Poreninnenoberflächen Austauschergruppen lokalisiert sind. Bei Apparaturen im Labormaßstab sind Plattenmodule Sartobind S15 mit 15 cm² Membranfläche verwendet worden (siehe Abbildung 3.03). In die großtechnische Anlage (Kapitel 4.2.2) sind zwei Wickelmodule S20k-15-50 mit je 2 m² Austauscherfläche der Sartobind S Factor Two Family integriert worden.

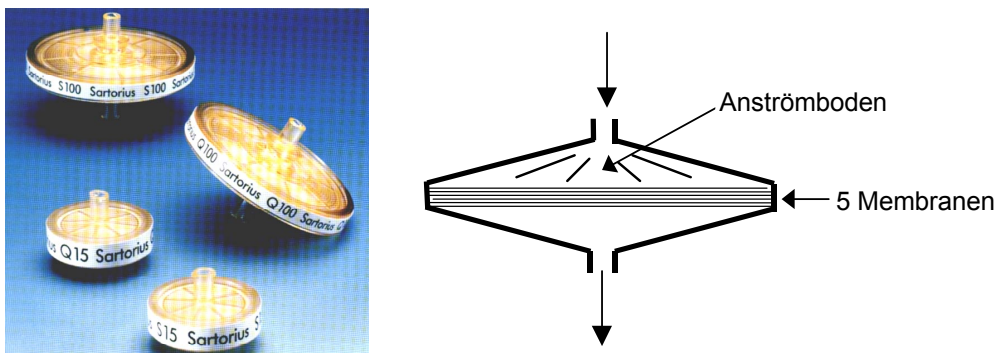


Abb. 3.03: links: Sartobind S15 und Sartobind S100 (Quelle: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) rechts: prinzipieller Aufbau der Sartobind S Module [KOSEMUND, 1998]

VERSUCHSAUFBAU UND DURCHFÜHRUNG

Die Apparaturen und Laufprogramme im kleinen Maßstab (Kapitel 4.2.1) werden im Kapitel 3.4 beschrieben. Der Aufbau der automatisierten 4 m²-Adsorberanlage ist in Abbildung 3.04 dargestellt.

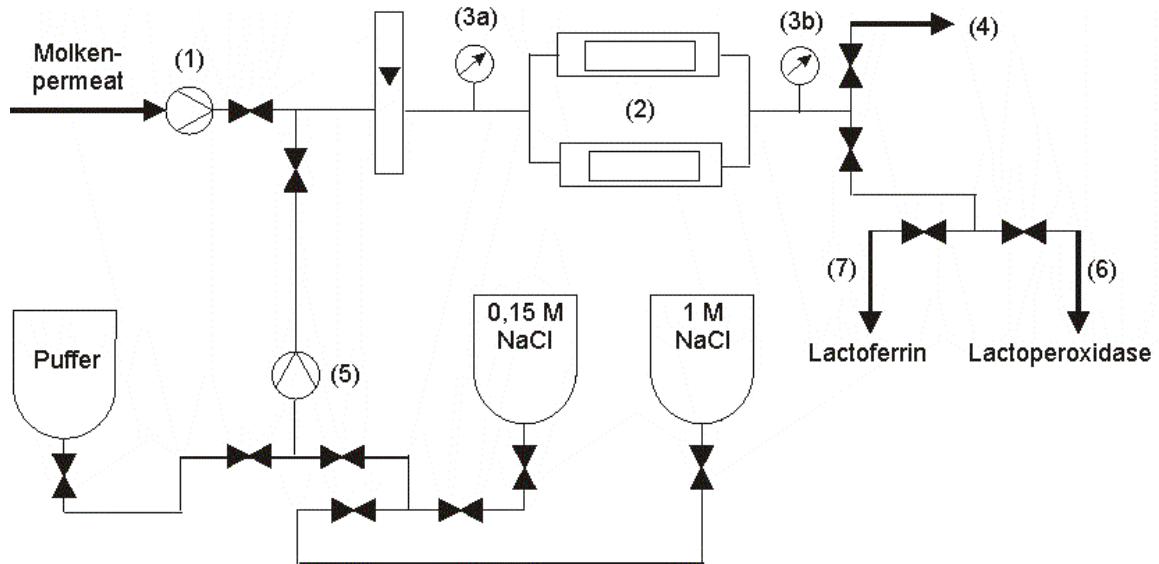


Abb. 3.04: Schema der 2. Prozess-Stufe; 4 m² Adsorberfläche; automatisiert; Firma Sartorius; (1)=Beladungspumpe, (2)=Adsorbermodule, (3a,3b)=Manometer, (4)=Durchlauf, (5)=Eluentenpumpe, (6)=Lactoperoxidasefraktion, (7)=Lactoferrinfraktion

Mit der Beladungspumpe (1) wird das Molkenpermeat aus der 1. Prozess-Stufe auf die zwei parallel geschalteten Adsorbermembranen (2) aufgetragen. Vor und hinter den Membranen sind Manometer zur Kontrolle des Systemdruckes installiert (3a; 3b). Der Durchlauf (4) wird verworfen. Nach der Beladung des Adsorbers wird mit der Puffer- und Eluentenpumpe (5) die Adsorberstufe zunächst gespült. Anschließend werden im 2-Stufen-Salzgradienten zunächst das Nebenprodukt Lactoperoxidase (6), danach Lactoferrin (7) eluiert. Die Prozess-Steuerung erfolgte über Volumen-, UV-, Zeit- und Leitfähigkeits-Messungen mit der Software Elution-Large-Scale der Firma Sartorius AG.

3.3 3. Prozess-Stufe: Lactoferringewinnung aus den Eluaten

3.3.1 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration ist an einer LabStak20-Kompaktanlage der Firma Danish Separation Systems, Dänemark, durchgeführt worden (siehe Kapitel 4.3.1, Abb. 4.38). In diese Apparatur werden keine Module integriert, sondern lose Membranen eingespannt. Es stehen insgesamt 20 Einspann-Vorrichtungen zur Verfügung, die separat mit beliebigen Membranen zu je 0,036 m² bestückt werden können. Für die Entsalzung und Aufkonzentrierung der 1 M NaCl-Eluate aus der zweiten Prozess-Stufe sind drei Celluloseacetat-Membranen, MWCO 10 kDa, verwendet worden. Der

Eingangsdruck wurde mit der Systempumpe auf 6 bar eingestellt, der Druck am Retentat-Ausgang auf 2 bar geregelt. Der Grad der Entsalzung wurde durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit verfolgt. Es ist zunächst diafiltriert worden, bis die elektrische Leitfähigkeit der Lactoferrin-Lösung auf der Retentatseite weniger als 1 mS betrug. Dann ist auf Ultrafiltration umgestellt und die Proteinlösung bis auf 5 Liter aufkonzentriert worden.

3.3.2 Gefriertrocknung

Die entsalzten und aufkonzentrierten Lactoferrinlösungen wurden lyophilisiert mit einem Gerät des Typs GeneVac SF50 der Firma Biometra, Göttingen, Deutschland. Die Kapazität der Apparatur für die Trocknung der Proteinlösungen betrug ca. 200 mL in 24 Stunden.

3.4 Qualitätskontrolle

3.4.1 MALDI-MS

GERÄT

Es stand ein Maldi3-Kompaktgerät der Firma Kratos Analytical, Manchester, Großbritannien, zur Verfügung.

PROBENPRÄPARATION

Zunächst musste eine Matrixlösung mit zuvor ermittelter optimaler Konzentration angesetzt werden. Es sind α -Cyanozimtsäure 15 g/L oder Sinapinsäure 10 g/L gelöst in Acetonitril mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) im Verhältnis 2:1 (v/v) verwendet worden. Die Probenpräparation erfolgte nach der „Dried-droplet-Methode“: Zunächst ist auf die Probenplätze der MALDI-Slides 1 μ L Matrixlösung aufgetragen worden. Nach dem Trocknen der Matrix wurde auf jeden Platz 1 μ L der zu untersuchenden Probensubstanz aufgebracht. Die Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben sollte im Bereich von 1 mg/mL liegen. Abschließend wurde noch einmal 1 μ L Matrixlösung aufgetragen. Nach dem Trocknen konnten die präparierten Slides zur Messung in das MALDI-MS eingeführt werden.

KALIBRATION DES GERÄTES:

Es ist eine externe Kalibration durchgeführt worden, d.h. eine Substanz mit bekanntem Spektrum wird vor den Proben vermessen und deren reale Peak-Maxima auf die idealen Werte gelegt, in diesem Fall mit Hilfe eines im MALDI-MS gespeicherten Referenz-Spektrums.

3.4.2 Wachstumshemmtest

VORKULTUR

Ein 500 mL Vierschikane-Erlenmeyerkolben wurde mit 20 mL zehnfach konzentriertem eisenfreien Mineralmedium Brunner und 160 mL Aqua bidest befüllt und bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Anschließend wurden unter einer Cleanbench 20 ml einer ebenfalls autoklavierten Glucoselösung (10 g/L) hinzugegeben. Von einer Stammpatte wurden nun einzelne Kolonien des benötigten Mikroorganismus in dieses Nährmedium überführt und die Vorkultur für zwei bis drei Tage unter aeroben Bedingungen in einem Rotationsschüttler bei 120 rpm und 28°C inkubiert.

WACHSTUMSTEST

Es wurden fünf 1L Schott Duran-Glasflaschen mit 20 mL zehnfach konzentriertem eisen-freien Mineralmedium Brunner und 160 mL Aqua bidest befüllt und autoklaviert (121°C, 20 min). Unter der Cleanbench wurden anschließend je 20 mL sterile Glucoselösung (10 g/L) sowie unterschiedliche Mengen der erstellten Vorkultur (zwischen 100 - 1000 µL) hinzugegeben und die Flaschen bei 28°C und 120 rpm inkubiert. Sobald eine deutliche Trübung des Mediums zu erkennen war, wurden optische Dichtemessungen durchgeführt, um den Eintritt der Kulturen in ihre exponentielle Wachstumsphase zu verfolgen (s.u.). Zeitgleich wurden fünf Paar (Doppelbestimmung) 100 mL Vierschikane-Erlenmeyerkolben für den eigentlichen Wachstumstest vorbereitet. In diesen Kolben wurden je 10 mL Lösung vorgelegt, bestehend aus Mineralmedium Brunner, 0,5 g/L Glucose (getrennt voneinander autoklaviert für 20 min bei 121°C) und unterschiedlichen Mengen an Lactoferrin. Die Lactoferrin-Konzentrationen lagen zwischen 5 µMol/L und 50 µMol/L.

Die Vorkultur, die ihre exponentielle Wachstumsphase zuerst erreichte, wurde zum Animpfen der zehn 100 mL Vierschikane-Erlenmeyerkolben benutzt; dazu wurden in jeden der Kolben mittels eines Dispensers jeweils 20 mL Vorkulturlösung aus der Schottflasche überführt. Die zehn Erlenmeyerkolben sind im Rotationsschüttler bei 28°C und 120 rpm inkubiert worden. Die erste Probeentnahme erfolgte nach 30 min; alle weiteren jeweils nach 60 min. Von jeder Probe wurde die optische Dichte bestimmt und somit das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen verfolgt. Von den ersten und letzten Proben wurden Verdünnungsreihen erstellt und diese ausplattiert, um die Lebendzellzahl zu bestimmen (s.u.).

AUSPLATTIEREN / BESTIMMUNG DER LEBENDZELLZAHL (=CFU)

Von den Flüssigkulturen wurden Verdünnungsreihen erstellt (10^{-1} in 10^{-6} mit 0,9% NaCl-Lösung oder Mineralmedium Brunner; beide steril); diese wurden ausplattiert (100 μ L pro Platte) und für etwa 48 Stunden bei 28°C im Brutschrank inkubiert. Die Platten, die zwischen 10 - 200 Kolonien enthielten, wurden ausgezählt und auf die Anfangskonzentrationen zurückgerechnet nach der Formel:

$$\text{CFU} = 10\{0,9 \cdot \text{CFU}_x \cdot V_x + 0,1 \cdot \text{CFU}_y \cdot V_y\} \quad (\text{Gl. 3.06})$$

10:	Korrekturfaktor, um von den eingesetzten 100 μ l auf 1 ml umzurechnen
0,9 / 0,1:	Gewichtungsfaktoren für die zwei geeigneten Verdünnungsstufen
$\text{CFU}_x / \text{CFU}_y$:	Anzahl der Kolonien auf den Agarplatten; x steht für die niedrigere Verdünnungsstufe mit höherer Lebendzell-Konzentration in Lösung, y für die um eine Zehnerpotenz höhere Verdünnung
V_x / V_y :	Verdünnungsfaktoren der ausplattierten Lösungen

OPTISCHE DICHTEMESSUNG

Mit dem Wachstum der Mikroorganismen in Flüssigkultur ist eine zunehmende Trübung des Mediums verbunden. Durch die Messung dieser wachsenden Lichtabsorption mittels eines Photometers lässt sich die Entwicklung der Mikroorganismen direkt verfolgen. Alle Messungen wurden bei einer festen Wellenlänge von 546 nm gegen eine Referenz bestehend aus einer Mineralmedium-Brunner-Lösung versetzt mit einer entsprechenden Menge an Lactoferrin durchgeführt. Für optische Dichtemessungen mit Werten oberhalb von 0,7 wurden die Proben aus messtechnischen Gründen verdünnt.

VERWENDETE SUBSTANZEN

Mineralmedium nach Brunner

	Einfach	10x konzentriert
Na_2HPO_4	2,44 g	24,4 g
KH_2PO_4	1,52 g	15,2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g	5,0 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g	2,0 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g	0,5 g
Spurenelementlösung 4 (SL 4)	10,0 mL	100 mL
Aqua bidest.	ad 1000 mL	ad 1000 mL

Eisenfreies Mineralmedium nach Brunner: Wie oben, aber ohne FeSO_4 und Na_2EDTA .

Spurenelementlösung 4

Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	0,642 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
Spurenelementlösung 6 (SL 6)	100 mL
Aqua bidest.	ad 1000 mL

Spurenelementlösung 6

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,3 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,03 g
Aqua bidest.	ad 1000 mL

3.5 Analytik**3.5.1 HPLC**

Zur Quantifizierung Lactoferrin-haltiger Proben ist eine HPLC-Anlage mit Autosampler benutzt worden. Die Detektion erfolgte im UV-Bereich bei 280 nm. Es ist mit einer Kationenaustauschersäule vom Typ Mono S H/R 5/5 der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden, gearbeitet worden. Das zeitgesteuerte Laufprogramm zeigt Tabelle 3.02:

Tab. 3.02: Laufprogramm der HPLC-Analytik

Puffer A: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7 + 2 M NaCl

Puffer	Laufzeit [min]	Flussrate [mL/min]	Programmschritt
-	-	-	Probeninjektion 240 µL
A	1	1	Durchlauf
Mix: 75 % A , 25 % B	7	1	1. Stufengradient
B	5	1	2. Stufengradient
A	15	1	Equilibrierung

3.5.2 FIA

Die Apparatur zur Fliessinjektionsanalyse (FIA) bestand aus einer EVA-Pumpe und einem EVA-Selektor der Firma Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland. Die Versuchssteuerung und Datenerfassung erfolgte über die Software CAFCA (Computer Assisted Flow Control and Analysis). Zur Auswertung wurden die Peakflächen der Lactoferrin-Elution benutzt, die mittels UV-Detektion erfasst wurden. Bei dem verwendeten UV-Detektor handelte es sich um ein Durchfluss-Messgerät UV-1 der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden. Das folgende Programm ist im Rahmen der Bestimmung der optimalen Elutionsparameter (Kapitel 4.2.1) gefahren worden:

Tab. 3.03: Laufprogramm zum Kapitel 4.2.1.1: Wahl des Puffersystems

Puffer A: 20 mM Puffer pH 7; Puffer B: 20 mM Puffer pH 7 + 1 M NaCl

Puffer	Laufzeit [min]	Flussrate [mL/min]	Programmschritt
A	1,5	2	spülen
-	2	2	auftragen
A	3	2	spülen
B	4	2	eluieren
A	1,5	2	spülen

Für die anderen Messungen des Kapitels 4.2.1 ist dasselbe Programm benutzt worden, nur die eingesetzten Lösungen wechselten je nach Aufgabenstellung:

Kapitel 4.2.1.3: Puffer A: 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH variabel; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH variabel + 1 M NaCl

Kapitel 4.2.1.4: Puffer A: 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7 + 1 M NaCl

Kapitel 4.2.1.5: Puffer A: 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7 + variable Konzentrationen NaCl

3.5.3 LPLC

Es ist eine Biologic LP Anlage der Firma BioRad, München, Deutschland verwendet worden. Das System besteht aus einer Peristaltikpumpe, einer Mischkammer und einer elektronischen Steuereinheit. Integriert sind ein Leitfähigkeitsmesser und ein UV-Messgerät. Die Anlage kann sowohl mit Säulen als auch Membranadsorbermodulen (S15 oder S100) betrieben werden. Die folgenden Programme sind im Rahmen der Bestimmung der optimalen Elutionsparameter (Kapitel 4.2.1) gefahren worden:

Tab. 3.04: Laufprogramm zum Kapitel 4.2.1.3: Trennung von Lactoferrin und Lactoperoxidase

Puffer A: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7 + 1 M NaCl pH 7

Puffer	Laufzeit [min]	Flussrate [mL/min]	Programmschritt
-	2	2	auftragen
A	6	2	spülen
Mix: 90 % A , 10 % B	7	2	eluieren
Mix: 87 % A , 13 % B	7	2	eluieren
Mix: 85 % A , 15 % B	7	2	eluieren
B	7	2	eluieren
A	5	2	spülen

Tab. 3.05: Laufprogramm zum Kapitel 4.2.1.2: Wahl des Salzes zur Elution

Puffer A: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7 + 1 M Salz

Puffer	Laufzeit [min]	Flussrate [mL/min]	Programmschritt
-	2	2	auftragen
A	7	2	spülen
Mix: 90 % A , 10 % B	6	2	eluieren
Mix: 80 % A , 20 % B	6	2	eluieren
Mix: 70 % A , 30 % B	6	2	eluieren
Mix: 60 % A , 40 % B	6	2	eluieren
Mix: 50 % A , 50 % B	6	2	eluieren
Mix: 40 % A , 60 % B	6	2	eluieren
Mix: 30 % A , 70 % B	6	2	eluieren
Mix: 20 % A , 80 % B	6	2	eluieren
Mix: 10 % A , 90 % B	6	2	eluieren
B	6	2	eluieren
Mix: 90 % A , 10 % B	7	2	spülen

Tab. 3.06: Laufprogramm zum Kapitel 4.2.1.4: Langzeitstabilität

Puffer A: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7; Puffer B: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7 + 1 M NaCl pH 7

Puffer	Laufzeit [min]	Flussrate [mL/min]	Programmschritt
A	2	2	spülen
-	2	2	auftragen
A	5	2	spülen
B	6	2	eluieren
A	3	2	spülen

3.5.4 Statistik

Zur Beurteilung der Messergebnisse ist eine Fehlerrechnung durchgeführt worden nach den folgenden Gleichungen:

Die Regressionsgerade besitzt die allgemeine Funktion $y = a \cdot x + b$.

Mittelwert MW:
$$MW = \frac{\sum_{i=1}^n}{n}$$
 mit $n = \text{Anzahl der Messwerte}$ (Gl. 3.07)

Standardabweichung σ :
$$\sigma = \sqrt{\text{Var}}$$
 mit $\text{Var} = \text{Varianz}$ (Gl. 3.08)

Varianz Var:
$$\text{Var} = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (W_i - MW)^2$$
 mit $W_i = \text{Messwert}$ (Gl. 3.09)

4 Ergebnisse

Grundlegende Arbeiten zur Lactoferrin-Gewinnung unter Verwendung eines Membranadsorber-Systems zur Isolierung des Proteins sind bereits im Rahmen einer Dissertation am Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, durchgeführt worden [WEISS, 1999]. Die direkte Isolierung von Lactoferrin aus Molke mittels Kationenaustauschermembran hat sich als problematisch erwiesen, sofern keine Vorbehandlung der Molke stattfindet. Die in der Molke enthaltenen Schwebstoffe führen zu einer sofortigen Verblockung der Austauschermodule. Daher ist eine Vorreinigung der Molke erforderlich. Um einen kontinuierlichen Betrieb zu ermöglichen, ist als erster Prozess-Schritt eine Crossflow-Mikrofiltration vor den Membranadsorber geschaltet worden. Abbildung 4.1 zeigt das Schema des entwickelten Lactoferrin-Gewinnungsprozesses integriert in den etablierten Molkenverarbeitungs-Prozess des Projektpartners.

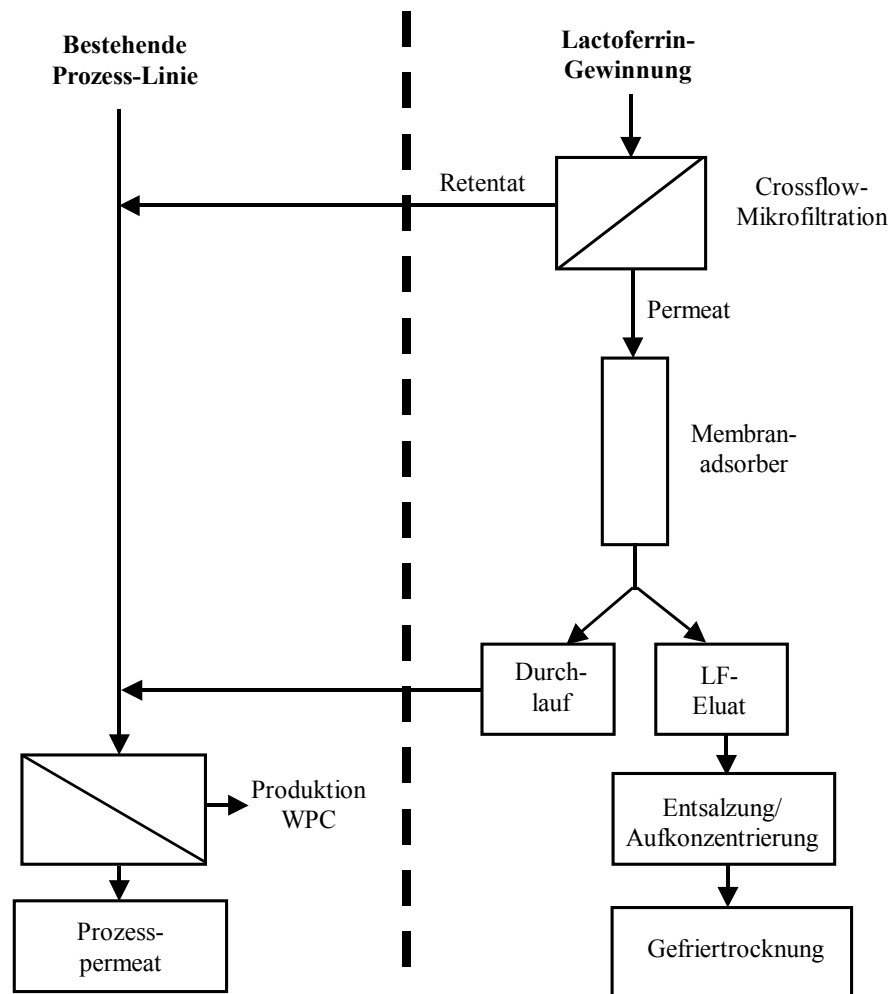


Abb. 4.01: Schema der Integration der Lactoferrin-Gewinnung in den etablierten Molkenverarbeitungs-Prozess des Projektpartners Biolac [PLATE ET AL., 2002]

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung und dem Up-Scaling der einzelnen Prozess-Stufen sowie einer Betrachtung der Prozess-Rentabilität auf der Basis der erhaltenen Ergebnisse.

4.1 1. Prozess-Stufe: Crossflow-Mikrofiltration

Zu der Vorbehandlung des Filtrationsmediums zum Schutz des Membranadsorbers vor Verblockung sind bereits grundlegende Untersuchungen durchgeführt worden [WEISS, 1999]. Die besten Ergebnisse konnten mit einer Zweistufen-Crossflow-Mikrofiltration in der UTMP-Anordnung (siehe Kapitel 2.3.1) erzielt werden. Durch das Hintereinanderschalten zweier Module verschiedener Porengrösse (1,2 μm und 0,8 μm , Flachmembran-Kassettenmodule, Membranfläche 0,7 m^2 , Material Hydrosart, Firma Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) war es möglich, 1000 L Molke in etwa 21 Stunden (Permeatfluss 68 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$) zu 570 L Molkenpermeat zu verarbeiten. Der Verlust an Zielprotein betrug 10-15 %, die Transmissionswerte des Permeates lagen bei 33. Die Reinigung der Module nach der Filtration konnte durch den Einsatz eines komplex aufgebauten Reinigungsmittels gewährleistet, die Initialflüsse zu 80 – 90 % wiederhergestellt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Crossflow-Mikrofiltration zu optimieren, um höhere Raum-Zeit-Ausbeuten an Lactoferrin-haltigem Molkenpermeat zu erzielen, sowie diese erste Prozess-Stufe langzeitstabiler und mit unkomplizierterer Reinigungsmethode fahren zu können.

4.1.1 Membranscreening

Die bisherigen Arbeiten konzentrierten sich auf den Einsatz von Plattenmodulen mit verschiedenen Porengrössen der Firma Sartorius AG, Göttingen, Deutschland. Um weitere Modulgeometrien auf ihre Eignung zur Molkenfiltration hin zu testen, ist ein Membranscreening durchgeführt worden mit Modulen unterschiedlicher Bauart, Porengrösse und Hersteller. Eine Übersicht gibt Tabelle 4.01:

Tab. 4.01: Im Membranscreening verwendete Module

Hersteller	Modulgeometrie	Porengrösse [μm]
Koch-Abcor	Spiralmodul	0,2
Microdyn	Rohrmodul	0,2
Microdyn	Kapillarmodul	0,4
Microdyn	Rohrmodul	1,0
Danish Separation Systems	Plattenmodul	0,1
Danish Separation Systems	Plattenmodul	0,2
Danish Separation Systems	Plattenmodul	0,45
Invensys APV	Keramikmodul	0,8

Das Screening wurde zunächst mit Dünnmolke als Filtrationsmedium durchgeführt. Anschließend ist bei Modulen mit guten Ergebnissen auf Molkenkonzentrat umgestellt worden. Die Versuche sind in der recycled-batch-Anordnung gefahren worden, um die Zusammensetzung des Filtrationsmediums über die gesamte Filtrationszeit hinweg konstant zu halten. Filtrationstemperatur und Betriebsdruck am Retentateingang der Module sind einheitlich zu 50°C und 2 bar gewählt worden. Eine Ausnahme stellen die drei Filtrationen mit den losen Flachmembranen dar, die an einer anderen Anlage, einer LabStak20-Kompaktanlage der Firma Danish Separation Systems, durchgeführt werden mussten (siehe Kapitel 4.3.1, Abb. 4.38). An dieser Anlage war das Vorheizen der zu filtrierenden Molke nicht möglich; daher betrug die Filtrationstemperatur nur 20°C. Das Filtrationsverhalten von Molke ist stark temperaturabhängig. Als besonders ungünstig gilt der Temperaturbereich zwischen 10°C und 40°C, da hier die Wechselwirkung der Teilchen untereinander am größten ist und der Aufbau einer Deckschicht beschleunigt wird [CHERYAN, 1998]. Die Ergebnisse dieser drei Filtrationsversuche sind daher nur bedingt mit denen der anderen Membranen vergleichbar.

Die erhaltenen Permeate aus den Versuchen sind anhand folgender Gesichtspunkte beurteilt worden:

ABREICHERUNG DER UNLÖSLICHEN SCHWEBSTOFFE WIE CASEINE, FETTE UND PROTEINPRÄZIPITATE
Der Grad der Aufreinigung der Molke ist anhand von Transmissions-Messungen von Rohmolke und Permeaten beurteilt worden (siehe Kapitel 3.1). Die Transmissionswerte von Rohmolke liegen zwischen 5 % und 20 %. Vorversuche haben gezeigt, dass die Permeate Transmissionswerte von mindestens 30 % aufweisen müssen, um eine Beladung des Kationenaustauschers zu ermöglichen, ohne dass dieser verblockt.

GEHALT DER ZIELKOMPONENTE LACTOFERRIN

Die Lactoferringehalte von Rohmolke und Molkenpermeat sind mittels HPLC-Messungen bestimmt worden. Sie sind in der Auswertung als Retention in [%] durch die Membran angegeben. Je höher die Retention ist, desto mehr Lactoferrin verbleibt auf der Retentatseite und geht für den weiteren Gewinnungsprozess verloren (siehe Kapitel 2.2).

FILTRATIONSLEISTUNG

Um die mit den verschiedenen Modulen erhaltenen Permeatmengen direkt untereinander vergleichen zu können, sind die Flüsse in der Auswertung auf erhaltene Liter Permeat pro Quadratmeter Membranfläche und Zeit [L/m²h] normiert.

4.1.1.1 Filtration mit Dünnmolke als Filtrationsmedium

Abbildung 4.02 zeigt den Verlauf der Filtration mit einem Spiralmodul der Firma Koch-Abcor. Spiralmodule sind die meistverwendeten Module in der Industrie. Sie sind am preiswertesten und in vielen Porengrößen erhältlich, daher ist ein Modul dieser Bauart zuerst getestet worden.

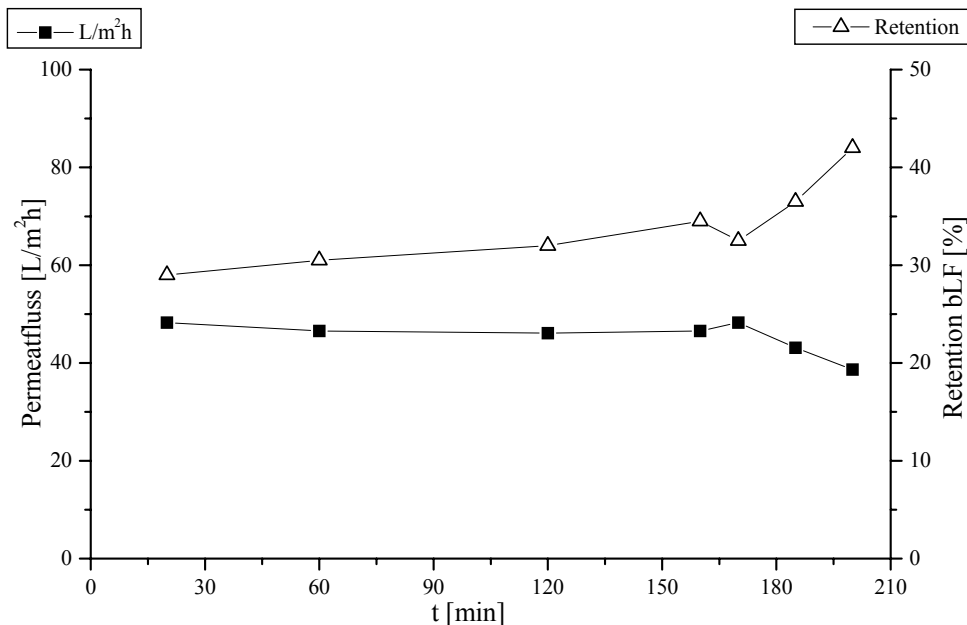


Abb. 4.02: Molkenfiltration mit Koch-Abcor-Wickelmodul; Material Polyethersulfon; Porengröße 0,2 μm ; $T_{\text{Filtration}}=50^{\circ}\text{C}$; Überströmung 1400 L/h; $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=54\%$; Membranfläche $A=5,8\text{ m}^2$

Der Grad der Aufreinigung der Molke für die zweite Prozessstufe ist ausreichend, die Transmissionswerte des Permeats liegen deutlich über dem kritischen Wert von 30 %. Der Permeatfluss liegt über fast drei Stunden konstant um 45 L/m²h bei einem Retentionswert von ca. 30 %. Danach fällt der Fluss über die nächsten 30 Minuten deutlich ab; gleichzeitig steigt die Retention von Lactoferrin auf über 40 %. Nach dreieinhalb Stunden wird der Versuch abgebrochen. Es hat sich eine Deckschicht auf der Membran gebildet, die den Durchtritt des Zielproteins zunehmend verhindert und die Filtrationsleistung absinken lässt. Das Spiralmodul ist also nur bedingt für den Einsatz im Prozess geeignet, da es einerseits den Membranadsorber vor schneller Verblockung schützen kann. Andererseits sind Permeatleistung, die Lactoferrin-Retention sowie die Standzeit der Membran nicht zufriedenstellend, da bereits nach drei Stunden die Filtrationsleistung abfällt und ein Reinigungszyklus gefahren werden muss.

Im Anschluss sind Versuche mit Membranen der Firma Microdyn durchgeführt worden; zwei Rohrmodule mit den Porengrößen 0,2 μm und 1 μm sowie ein Kapillarmodul mit der Porengröße 0,4 μm sind getestet worden. Die Abbildungen 4.03 – 4.05 dokumentieren die Filtrationsverläufe:

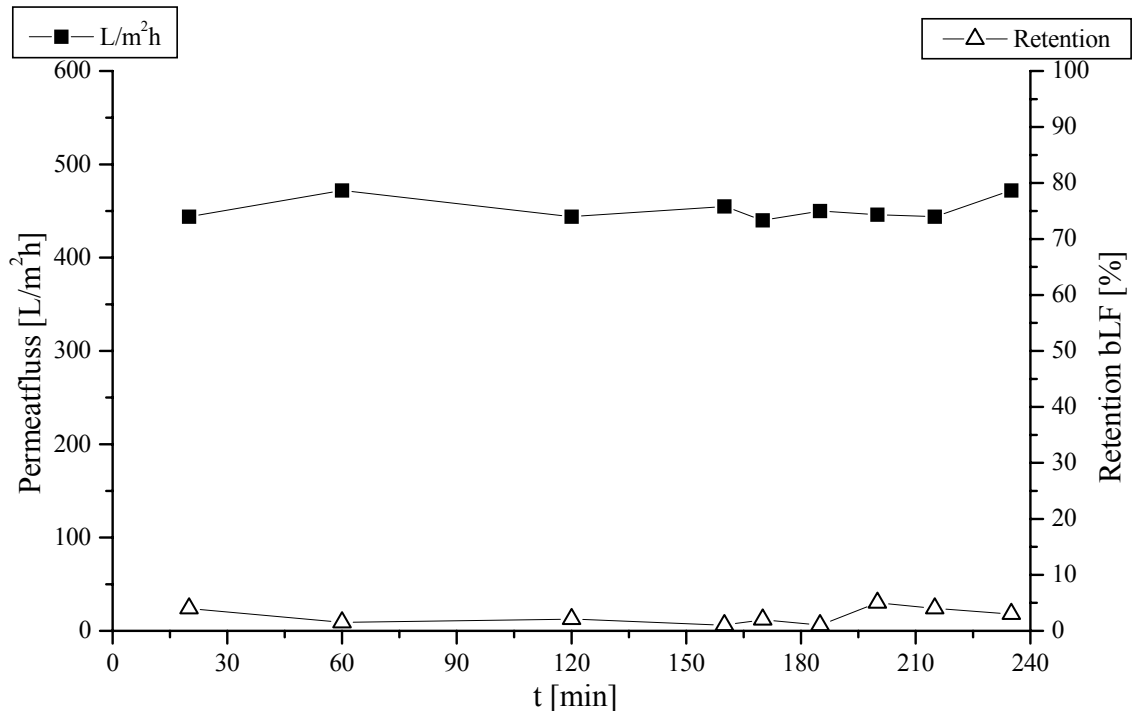


Abb. 4.03: Molkenfiltration mit Microdyn-Rohrmodul; Material Polypropylen; Porengröße 0,2 µm; $T_{\text{Filtration}}=50^{\circ}\text{C}$; Überströmung 1600 L/h; $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=80\%$; Membranfläche $A=0,036\text{ m}^2$; [PLATE ET AL., 2002]

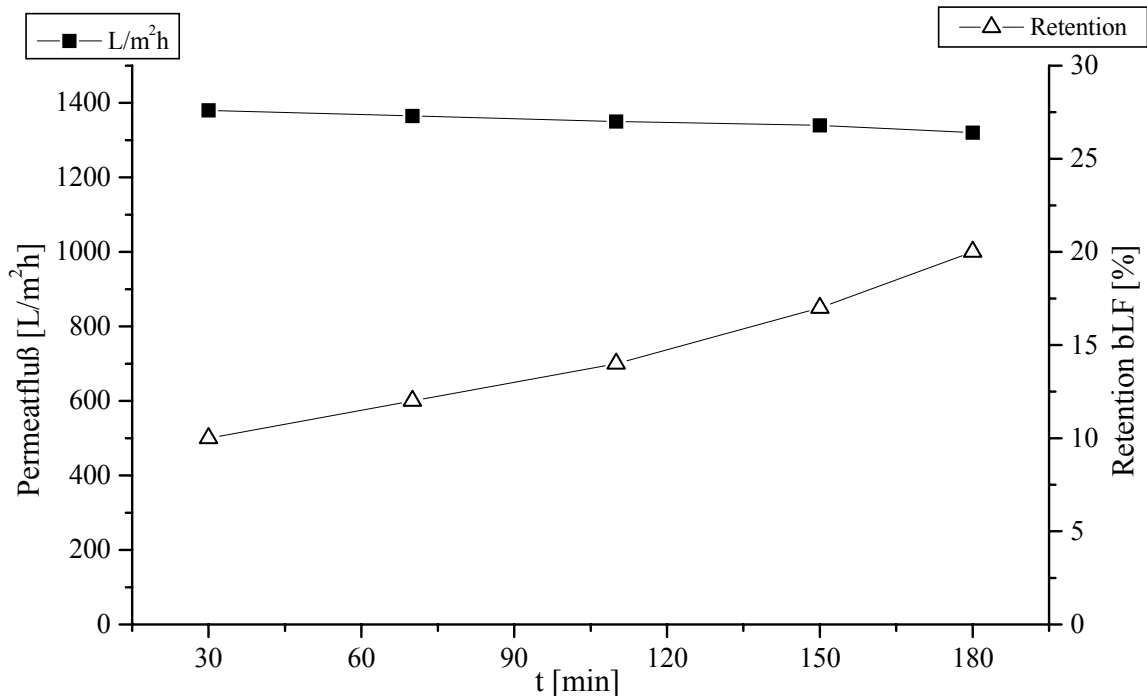


Abb. 4.04: Molkenfiltration mit Microdyn-Rohrmodul; Material Polypropylen; Porengröße 1 µm; $T_{\text{Filtration}}=50^{\circ}\text{C}$; Überströmung 1600 L/h; $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=23\%$; Membranfläche $A=0,02\text{ m}^2$

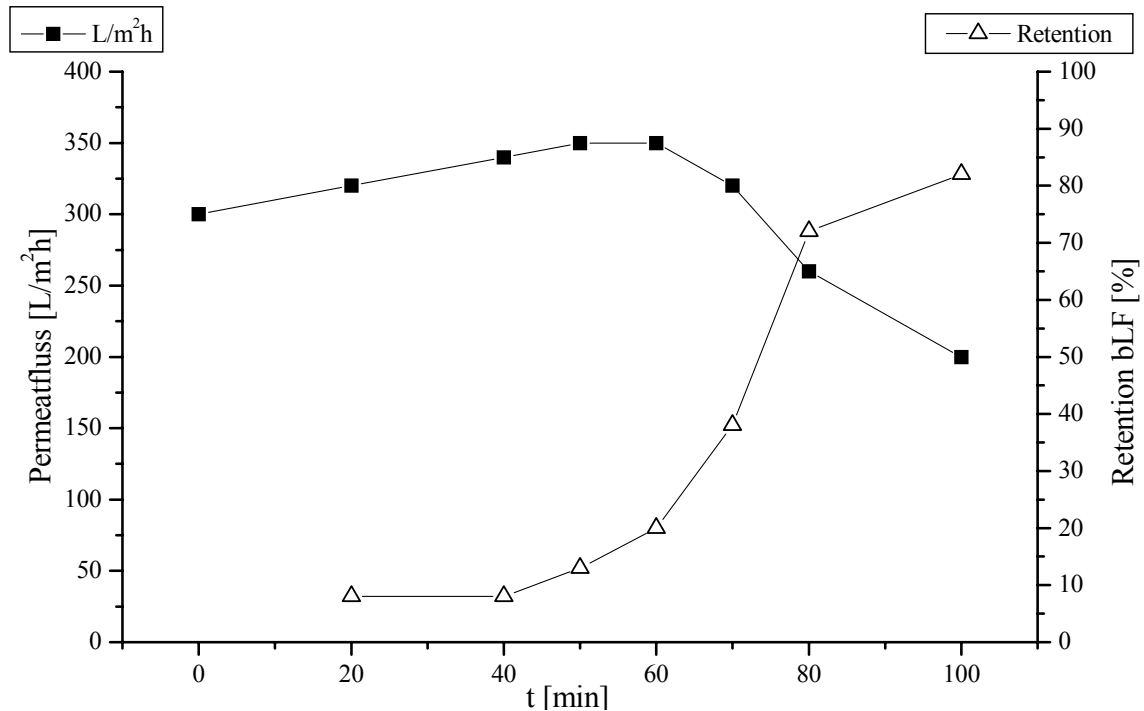


Abb. 4.05: Molkenfiltration mit Microdyn-Kapillarmodul; Material Polypropylen; Porengrösse 0,4 μm ; $T_{\text{Filtration}}=50^{\circ}\text{C}$; Überströmung 440 L/h; $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=80\%$; Membranfläche $A=0,1\text{ m}^2$

Das Rohrmodul mit der Porengrösse 0,2 μm zeigt über dreieinhalb Stunden einen hohen und sehr konstanten Permeatfluss von 450 L/m²h. Die Permeation von Lactoferrin durch die Membran liegt bei über 95 % über die gesamte Filtrationszeit hinweg, und der Grad der Aufreinigung liegt mit einem Wert von 80 % weit über den Anforderungen. Die Ausbildung einer den Filtrationsprozess limitierenden Deckschicht auf der Membran ist nicht zu erkennen. Das Modul ist für den Lactoferrin-Gewinnungsprozess sehr gut geeignet.

Der nächste Versuch ist mit einem Modul der gleichen Bauart mit einer Porengrösse von 1 μm durchgeführt worden. Grössere Poren führen zu höheren Permeatflüssen; es sollte untersucht werden, ob mit diesem Modul eine noch höhere Raum-Zeit-Ausbeute als 450 L/m²h bei vergleichbar günstigen Retentions- und Transmissionswerten erzielt werden kann. Tatsächlich liegt der Permeatfluss konstant über drei Stunden bei knapp 1400 L/m²h, das ist mehr als das Dreifache der Leistung des 0,2 μm -Moduls. Allerdings liegt der Transmissionswert bei nur 23 %. Der Grad der Aufreinigung der Molke durch die Filtration ist zu gering, um den Membranadsorber im nächsten Prozessschritt wirkungsvoll vor Verblockung zu schützen. Die Poren der Membran sind zu gross, um alle Partikel, die die Isolierung des Lactoferrins behindern, auf der Retentatseite zurückzuhalten. Auf weitere Versuche mit diesem Modul ist daher verzichtet worden.

Abbildung 4.05 zeigt den Verlauf einer Filtration mit einem Kapillarmodul, Porengrösse 0,4 μm . Der Transmissionswert des Permeats liegt bei 80 %, der Aufreinigungseffekt ist also gleich dem

des Rohrmoduls mit der Porengrösse 0,2 μm . Im Gegensatz zu den Rohrmodulen ist jedoch die Filtrationsleistung nicht konstant. Nach einer Stunde fällt der Permeatfluss stark ab, gleichzeitig steigen die Retentionswerte von 10 % auf über 80 %. Wie bei dem Spiralmodul hat sich eine die Filtration limitierende Deckschicht ausgebildet.

Das Kapillarmodul sowie das 0,2 μm -Rohrmodul unterscheiden sich in der Porengrösse und der Modulgeometrie. Die verschiedenen Grössen der Membranporen sind für die Molkenfiltration nicht von Bedeutung; die Transmissionswerte der Permeate beider Membranen liegen bei 80 %. Die unterschiedlichen Filtrationsleistungen müssen also in der Modulgeometrie begründet sein. Tabelle 4.02 zeigt die Unterschiede beider Module auf:

Tab. 4.02: Vergleichende Übersicht über die Geometrie-Daten von 0,2 μm Rohr- und 0,4 μm Kapillarmodul

	0,2 μm Rohrmodul	0,4 μm Kapillarmodul
Anzahl der Rohre/Kapillaren	3	20
Innendurchmesser der Rohre/Kapillaren [cm]	0,55	0,18
Anströmfläche [cm ²]	0,72	0,5
Anströmfläche : Membranfläche	$2 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$
Strömungsgeschwindigkeit v [cm/sec]	617	243
Reynoldszahl	31.880	4.109

Die Anströmfläche des Rohrmoduls ist um fast 50 % grösser als die des Kapillarmoduls, das Verhältnis von Anströmfläche zur Gesamt-Membranfläche ist sogar viermal grösser. Das Rohrmodul besitzt daher einen deutlich geringeren Strömungswiderstand als das Kapillarmodul und lässt während der Molkenfiltration bei einem gleich eingestellten Eingangsdruck von 2 bar einen wesentlich höheren Retentatfluss zu (Rohrmodul=1600 L/h, Kapillarmodul=440 L/h). Die daraus resultierende sehr hohe Strömungsgeschwindigkeit entlang der Membraninnenflächen des Rohrmoduls verhindert die Ausbildung einer Deckschicht, während die Strömungsgeschwindigkeit im Kapillarmodul zu gering ist, um die Bildung einer limitierenden Deckschicht zu verhindern. Die Reynoldszahlen als Maß der im System ausgebildeten Turbulenz machen den Unterschied der in den Modulen ausgebildeten Strömungen deutlich. Im Rohrmodul stellt sich eine eindeutig turbulente Strömung ein ($Re \gg Re_{\text{kritisch}} = 2.300$, siehe Kapitel 2.3.2). Die Reynoldszahl beim Kapillarmodul liegt mit 4109 ebenfalls über Re_{kritisch} ; aufgrund des Verlaufs des Filtrationsversuches kann jedoch auf überwiegend laminare Strömungsverhältnisse geschlossen werden.

Bei dem im Anschluss getesteten Modul handelt es sich um eine Keramikmembran aus Al_2O_3 der Firma APV. Die Vorteile dieser Membran liegen in ihrer Resistenz gegen fast alle Reinigungs- und Filtrationsmedien, Temperaturbeständigkeit bis 250°C sowie in ihrer hohen Drucktoleranz (siehe auch Kapitel 2.2.1). Die folgende Abbildung zeigt den Filtrationsverlauf:

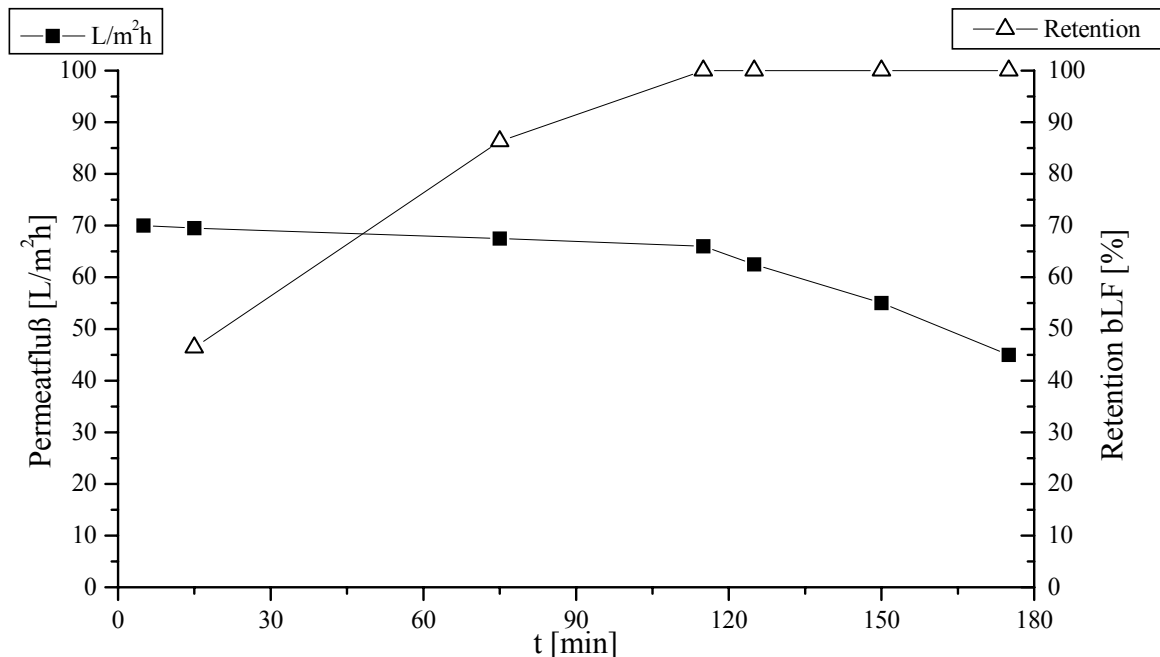


Abb. 4.06: Molkenfiltration mit Invensys-APV-Keramikmodul; Material Aluminiumoxid; Porengröße $0,8 \mu\text{m}$; $T_{\text{Filtration}}=50^\circ\text{C}$; Überströmung 1600 L/h ; $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=70 \%$; Membranfläche $A=0,2 \text{ m}^2$

Die bei dem Permeat gemessene Transmission von 70% zeigt eine für den Lactoferrin-Gewinnungsprozess ausreichende Aufreinigung der Molke. Der Permeatfluss liegt über zwei Stunden auf niedrigem aber konstantem Niveau von $70 \text{ L/m}^2\text{h}$, während die Retention von Beginn der Filtration an steigt und nach zwei Stunden 100% erreicht. Ab diesem Zeitpunkt sinkt der Permeatfluss kontinuierlich ab, eine limitierende Deckschicht auf der Membran hat sich gebildet.

Neben Spiral-, Rohr-, Kapillar- und Keramikmodulen sind auch Plattenmodule in das Membranscreening mit einbezogen worden. Da Sartorius-Flachmembran-Kassettenmodule bereits getestet wurden [WEISS, 1999], sind in dieser Arbeit Membranen der Firma Danish Separation Systems verwendet worden. Die folgenden Abbildungen dokumentieren die Versuchsverläufe:

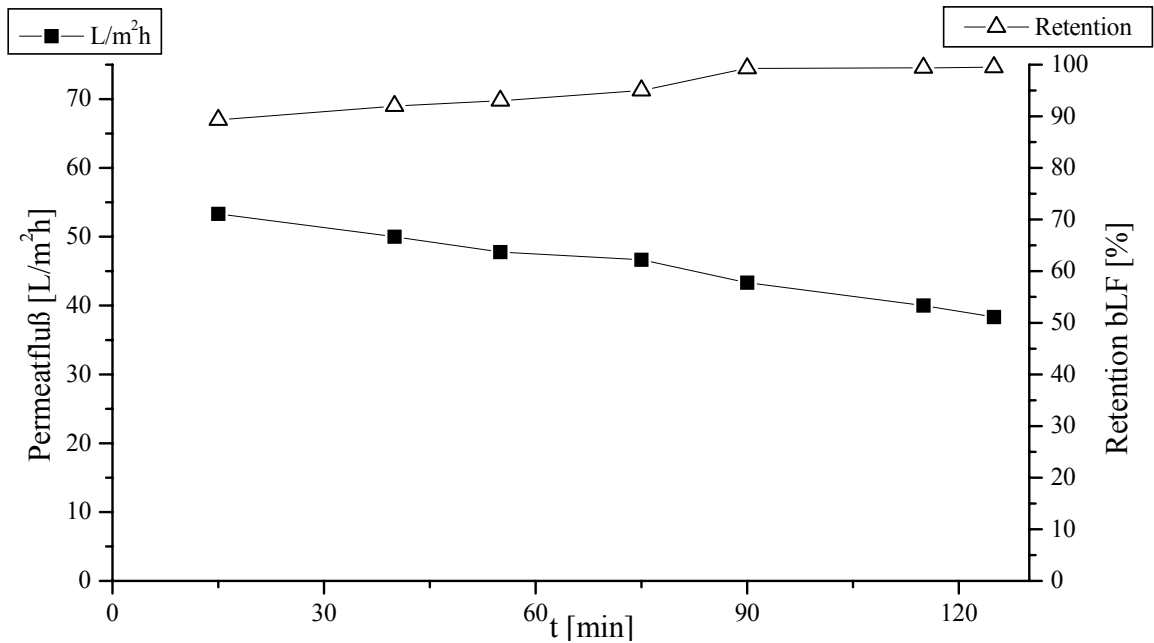


Abb. 4.07 Molkenfiltration mit DSS-Plattenmodul; Material Polysulfon; Porengröße 0,1 µm; $T_{\text{Filtration}}=20^{\circ}\text{C}$, Überströmung 570 L/h, $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=70\%$, Membranfläche $A=0,036\text{ m}^2$

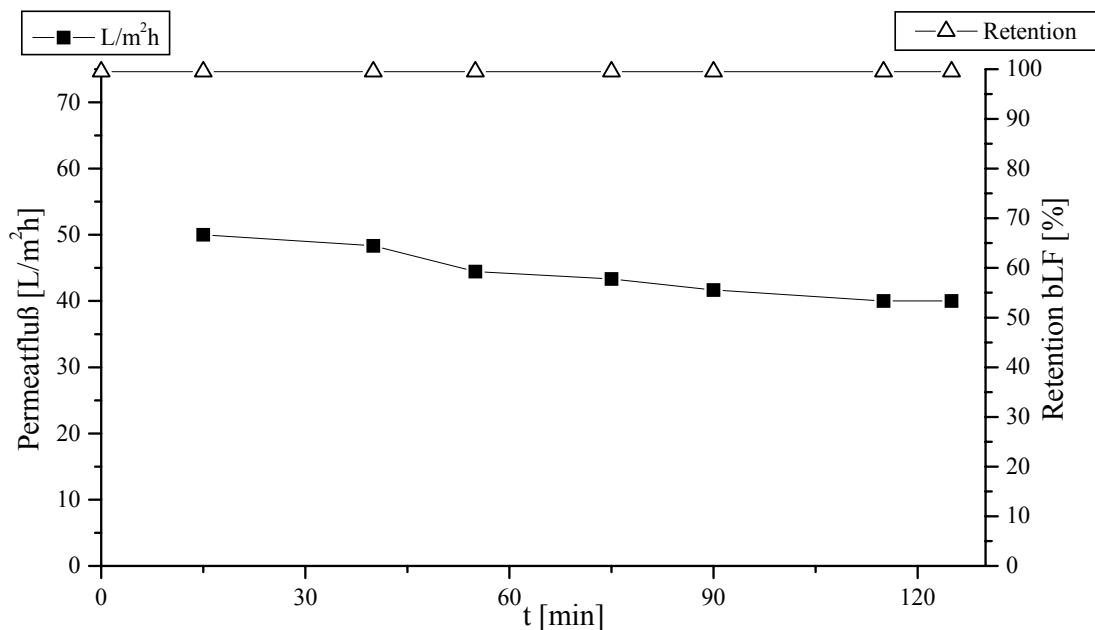


Abb. 4.08 Molkenfiltration mit DSS-Plattenmodul; Material Polysulfon; Porengröße 0,2 µm; $T_{\text{Filtration}}=20^{\circ}\text{C}$, Überströmung 570 L/h, $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=73\%$, Membranfläche $A=0,036\text{ m}^2$

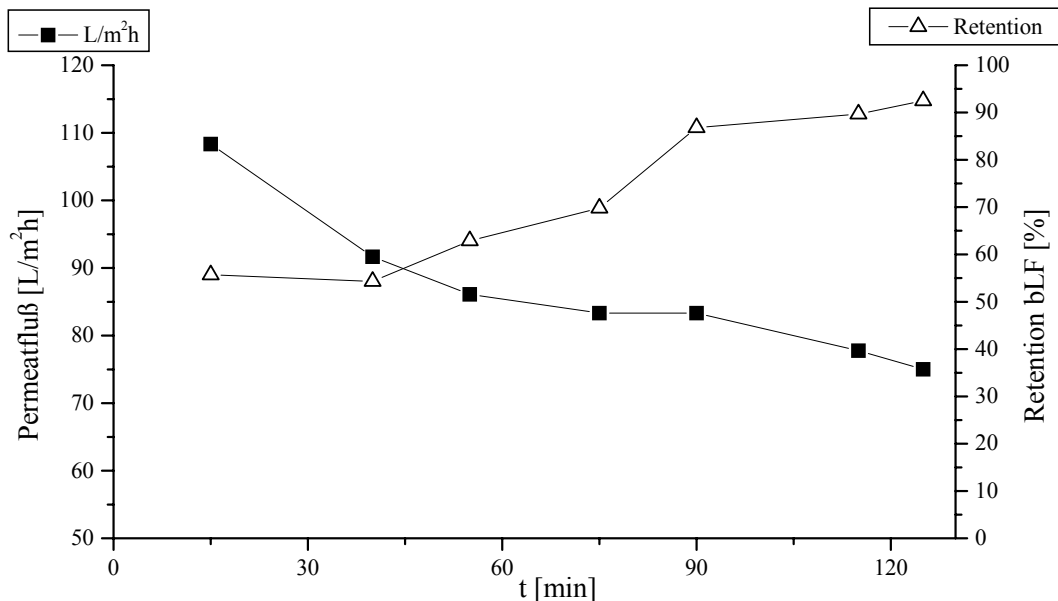


Abb. 4.09: Molkenfiltration mit DSS-Plattenmodul; Material Polytetrafluorethylen; Porengröße 0,45 μm ; $T_{\text{Filtration}}=20^{\circ}\text{C}$, Überströmung 570 L/h, $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=20\%$, Membranfläche $A=0,036\text{ m}^2$

Die zwei Polysulfon-Membranen zeigen das gleiche Verhalten unabhängig von den Porengrößen 0,1 und 0,2 μm . Die Transmissionen der Permeate von 70 % weisen einen für den weiteren Lactoferrin-Gewinnungsprozess ausreichenden Wert auf. Die Flüsse beider Filtrationen liegen zu Beginn der Versuche jeweils bei 50 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$ und fallen innerhalb von zwei Stunden kontinuierlich um 20 % auf 40 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$. Die Retentionswerte liegen von Anfang an bei nahezu 100 %, d.h. das Zielprotein wird komplett auf der Retentatseite zurückgehalten.

Die Polytetrafluorethylen-Membran zeigt ein anderes Verhalten. Der Transmissionswert des erhaltenen Permeats beträgt nur 20 %, liegt also unterhalb des Mindestwertes von 30 %. Bei gleicher Überströmung wie die zwei Polysulfon-Membranen liegt der Permeatfluss hier zu Versuchsbeginn mit 110 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$ mehr als doppelt so hoch und fällt anschließend über zwei Stunden Filtrationszeit bis auf 80 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$ ab. Die Retention an Lactoferrin beträgt anfangs 50 % und steigt reziprok zum Permeatfluss auf über 90 % an.

Die Ergebnisse dieser drei Filtrationsversuche müssen unter dem Vorbehalt beurteilt werden, dass die Filtrationstemperatur mit 20°C nicht optimal eingestellt war (siehe Kapitel 4.1.1). Von einer weiteren Versuchsreihe mit vorgeheizter Molke ist jedoch abgesehen worden, da die Filtrationsleistungen sehr deutlich unter denen von Rohr-, Kapillar- und Spiralmodul liegen.

Die Ergebnisse des Membranscreenings lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Tab. 4.03: Vergleichende Übersicht über die Ergebnisse der Crossflow-Mikrofiltrationsversuche [PLATE ET AL., 2001]

Hersteller	Koch-Abcor	ENKA			DSS			APV
Porengrösse [μm]	0,2 μm	0,2 μm	0,4 μm	1,0 μm	0,1 μm	0,2 μm	0,45 μm	0,8 μm
Modulgeometrie	Spiral	Rohr	Kapillar	Rohr	Platten	Platten	Platten	Keramik
Transmission [%]	54	80	80	23	70	73	20	70
Ret.-fluß [L/h]	1400	1600	560	1400	570	570	570	1600
Perm.-fluß [L/m ² h]	45	450	300	1150	45	45	90	60
Permeation LF [%]	65	95	90→20	85	10→0	0	50→0	50→0

Die 1 μm -Rohrmembran und die 0,45 μm -Flachmembran sind grundsätzlich nicht für die Lactoferrin-Gewinnung einsetzbar. Die Transmissionswerte von unter 30 % zeigen, dass sie die Molke nicht ausreichend klären können und im laufenden Prozess den Membranadsorber nicht vor Verblockung schützen.

Die anderen zwei Flachmembranen sowie die keramische Membran sind ebenfalls nicht geeignet, da sie das Zielprotein auf der Retentatseite zurückhalten und somit dem weiteren Gewinnungsprozess entziehen.

Mit dem 0,4 μm -Kapillarmodul sowie dem 0,2 μm -Spiralmodul kann über einen bestimmten Zeitraum hinweg eine konstante Filtrationsleistung bei guter Lactoferrin-Permeation beobachtet werden. Dabei zeigt die Kapillarmembran die höhere Filtrationsleistung, jedoch auch die kürzere Standzeit. Der Einsatz dieser Module in einem kontinuierlich betriebenen Prozess ist prinzipiell möglich. Allerdings muss alle 60 Minuten (Kapillarmodul) bzw. 180 Minuten (Spiralmodul) ein Reinigungszyklus gefahren werden, um die ursprünglich gute Filtrationsleistung wiederherzustellen. Die Gesamtmembranfläche der Crossflow-Mikrofiltration müsste mit erheblichem finanziellen Mehraufwand diesem Umstand angepasst und entsprechend grösser ausgelegt werden, um kontinuierlich eine gleichbleibende Menge auftragungsfähiges Molkenpermeat für die zweite Prozess-Stufe zu produzieren.

Die besten Ergebnisse liefert das 0,2 μm -Rohrmodul der Firma Microdyn. Der Transmissionswert liegt weit über den Mindest-Anforderungen, und die Retention von Lactoferrin beträgt maximal 5 %. Hohe Strömungsgeschwindigkeiten entlang der Membraninnenoberflächen verhindern das Ausbilden einer Deckschicht und sorgen für eine nicht nur hohe, sondern auch konstante Filtrationsleistung über die gesamte Versuchszeit von dreieinhalb Stunden. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse ist ein Langzeit-Test mit der Membran durchgeführt worden (ohne Abbildung). Über sieben Stunden hinweg ist eine vergleichbar konstante und hohe Filtrationsleistung bei gleicher Lactoferrin-Permeation sowie Transmission beobachtet worden.

4.1.1.2 Filtration mit Molkenkonzentrat als Filtrationsmedium

Die meisten Molken-Prozesslinien in Deutschland sind auf die Verarbeitung von Molkenkonzentrat hin ausgelegt. Molkenkonzentrat ist 5-fach durch Einengen aufkonzentrierte Molke und stellt durch seinen deutlich höheren Anteil an Schweb- und Inhaltsstoffen ein Medium mit völlig neuen Filtrationseigenschaften dar.

Es ist mit dem 0,2 μm Rohrmodul, das sich bei der Molkenfiltration bewährt hat, ein Versuch mit Molkenkonzentrat als Filtrationsmedium durchgeführt worden. Abbildung 4.10 zeigt den Filtrationsverlauf:

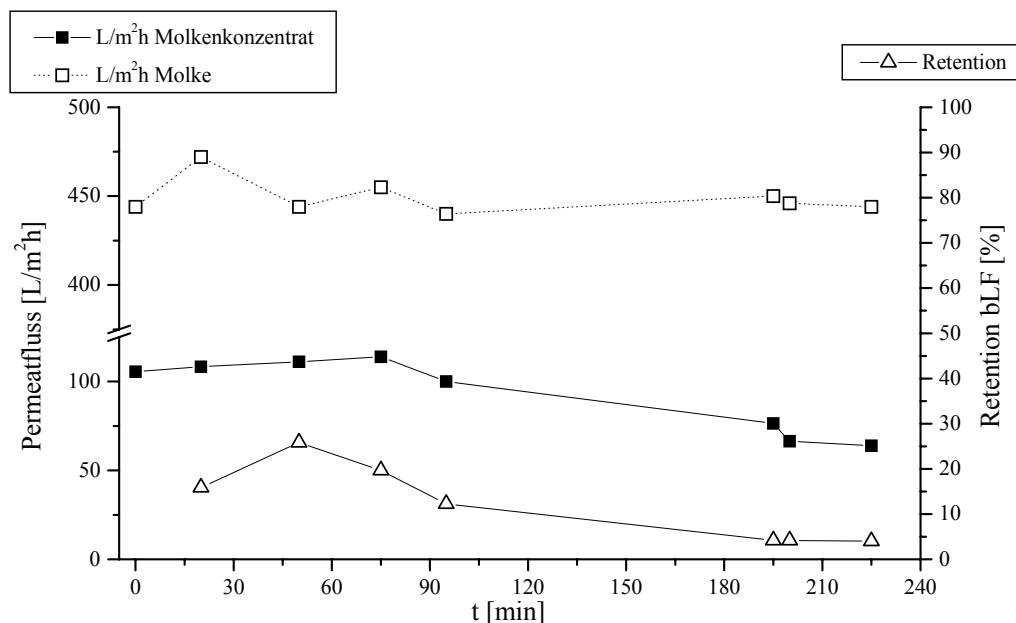


Abb. 4.10: Filtration von Molkenkonzentrat mit Microdyn-Rohrmodul; Material Polypropylen; Porengröße 0,2 μm ; $T_{\text{Filtration}}=50^{\circ}\text{C}$, Überströmung 1600 L/h, $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=60\%$, Membranfläche $A=0,036\text{ m}^2$

Die Transmissionen der Permeatproben liegen bei Werten von 60 %. Der Grad der Aufreinigung der Filtration ist also ausreichend, um für die nächste Prozess-Stufe, den Membranadsorber, eingesetzt zu werden. Die Retentionswerte sind um ca. 15 % höher als bei der Molkenfiltration. Vor allem der Permeatfluss liegt deutlich niedriger, wie in Abbildung 4.10 durch Darstellung des Permeatflusses der Molkenfiltration angedeutet (siehe auch Abb. 4.3). Auch ist er nicht konstant, sondern fällt langsam und kontinuierlich von einem Anfangswert von 110 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$ innerhalb von zwei Stunden auf 70 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$ ab.

Auf eine geringere durchschnittliche Filtrationsleistung kann bei der Auslegung einer großtechnischen Anlage mit einer entsprechend größeren Filterfläche reagiert werden. Das macht die Anlage zwar teurer, garantiert jedoch eine gleichbleibende Menge an auftragungsfähigen Permeaten für die zweite Prozess-Stufe. Problematisch ist hier vielmehr die Tatsache, dass die

Filtrationsleistung des 0,2 μm -Moduls nicht mehr konstant ist, was die Berechnung der benötigten Filterfläche erschwert. Weiterhin muss bei der Filtration des Konzentrates ein Reinigungszyklus deutlich früher gefahren werden als bei der Molkenfiltration, was die Dimension der Mikrofiltrationsanlage und damit ihren Preis zusätzlich weiter nach oben treibt.

Es ist ein zusätzlicher Versuch mit Molkenkonzentrat gefahren worden, diesmal mit einem Sartorius-Flachmembran-Kassettenmodul, Material Hydrosart, Porengröße 1,2 μm , Membranfläche 0,6 m^2 . Es sollte getestet werden, wie stark sich der Unterschied im Filtrationsmedium bei einer anderen Modulgeometrie auswirkt. Den Verlauf dieses Versuchs zeigt Abbildung 4.11:

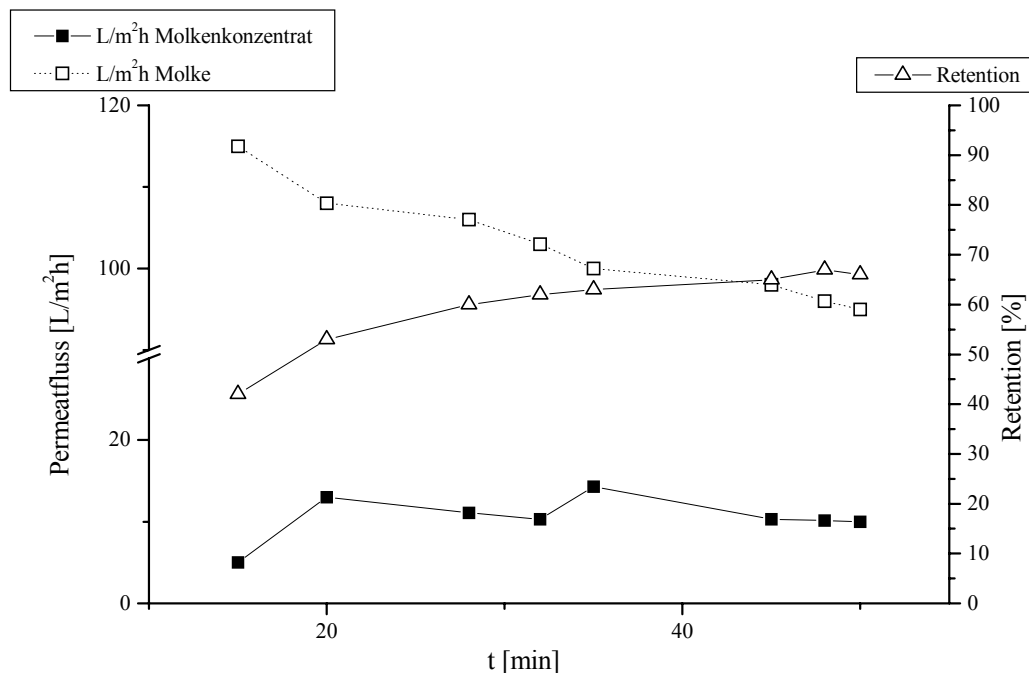


Abb. 4.11: Filtration von Molkenkonzentrat mit Sartorius-Kassettenmodul; Material Hydrosart; Porengröße 1,2 μm ; $T_{\text{Filtration}}=50^\circ\text{C}$; Überströmung 900 L/h; $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=20\%$; Membranfläche $A=0,6\text{ m}^2$

Auch bei der Filtration mit einem Flachmembran-Kassettenmodul nimmt die Filtrationsleistung nach der Umstellung auf Molkenkonzentrat erwartungsgemäß deutlich ab. Der durchschnittliche Permeatfluss beträgt nur noch 12 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$ anstatt 105 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$ bei der Molkenfiltration; das ist ein Leistungsabfall von fast 90 %. Das Modul ist ungeeignet für den Lactoferrin-Gewinnungsprozess, da die Transmissionswerte der erhaltenen Permeate unterhalb von 30 liegen. Unabhängig davon lohnt ein Vergleich der zwei Module, um den Einfluss der Modul-Geometrie auf die Filtrationsleistung zu verdeutlichen.

Die zwei Filtrationen sind unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt worden. Die Filtrationstemperatur lag jeweils bei 50°C , und der Eingangsdruck auf der Retentatseite war auf 2 bar eingestellt. Tabelle 4.04 stellt die technischen Daten der zwei Module und ihre Filtrationsleistung für die Molkenkonzentrat-Filtration gegenüber:

Tab. 4.04: Vergleich 0,2 µm-Rohrmodul und 1,2 µm-Plattenmodul bei der Filtration von Molkenkonzentrat

	Rohrmodul 0,2 µm	Kassettenmodul Weitspalt 1,2 µm
Filtrationsfläche [cm ²]	3 x 120 = 360	6000
• Spacerbreite / -höhe [cm]	---	14 / 0,065
• InnenØ Kapillare [cm]	0,55	---
Anströmfläche [cm ²]	0,72	13,65
Strömungsgeschwindigkeit v [cm/s]	617	18,32
Scherrate γ [1/s]	8975	1691
Retentatfluss [L/h]	1600	900
Permeatfluss [L/m ² h]	100	10
Permeation LF [%]	80	40
Transmission _{600nm} [%]	55	20

Obwohl das Kassettenmodul eine 19-mal größere Anströmfläche besitzt, lässt das Rohrmodul den deutlich höheren Retentatfluss zu. Nach Eintritt in das Flachmodul verteilt sich hier das Retentat auf 15 separate Retentaträume, die in dem fest verschweissten Modul vorliegen. Dadurch ist hier die Strömungsgeschwindigkeit entlang der Membranlagen gering im Vergleich zum Rohrmodul, in dem das Retentat mit der Eintrittsgeschwindigkeit direkt an den Innenwänden der drei Membranröhren entlangströmt und sich nicht verteilen muss. Die resultierenden Scherraten von 1691 1/s für das Flachmembran-Kassettenmodul und 8975 1/s für das Rohrmodul - das ist mehr als das 5-fache - zeigen, dass im Rohrmodul die Bedingungen für die Ausbildung einer die Filtration limitierenden Foulingschicht schlechtere Voraussetzungen herrschen. Die zehnmal höhere Filtrationsleistung des Rohrmoduls gegenüber dem Flachmodul ist die Konsequenz.

Die Höhe der Strömungsgeschwindigkeit scheint also ein direktes Maß zu sein für die Eignung eines Moduls für die Crossflow-Mikrofiltration in diesem Prozess (siehe auch Vergleich Rohr- und Kapillarmodul, Kap. 4.1.1.1).

Das Ergebnis des Membran-Screenings ist eindeutig:

- Bei der Filtration von Molke ist das 0,2 µm-Rohrmodul am besten geeignet.
- Die Filtration von Molkenkonzentrat ist problematisch.
- Es wird im weiteren Verlauf der Arbeit mit Molke und nicht mit Molkenkonzentrat gearbeitet. Die Filtration mit dem 0,2 µm-Rohrmodul wird einem Up-Scaling unterzogen.

4.1.2 Up-Scaling auf 1 m² und 4 m²

Für ein erstes Up-Scaling stand eine Kompaktanlage der Firma Koch-Abcor zur Verfügung, in die ein 0,2 µm-Rohrmodul mit einer Filtrationsfläche von 1 m² integriert worden ist. Das Filtrationsmedium ist über einen Wärmetauscher vor Filtrationsbeginn auf 50°C erwärmt worden. Es ist nicht mehr im Recycled-batch-Modus filtriert worden, um Permeat für die zweite Prozess-Stufe zu gewinnen. 200 L Molke sind im Vorlagebehälter der Anlage vorgelegt worden. Das Volumen, das die Kompaktanlage in Form von Permeat verlässt, wird durch Molke, die in den Vorlagebehälter gepumpt wird, wiederaufgefüllt. Abbildung 4.12 zeigt den Verlauf der Filtration:

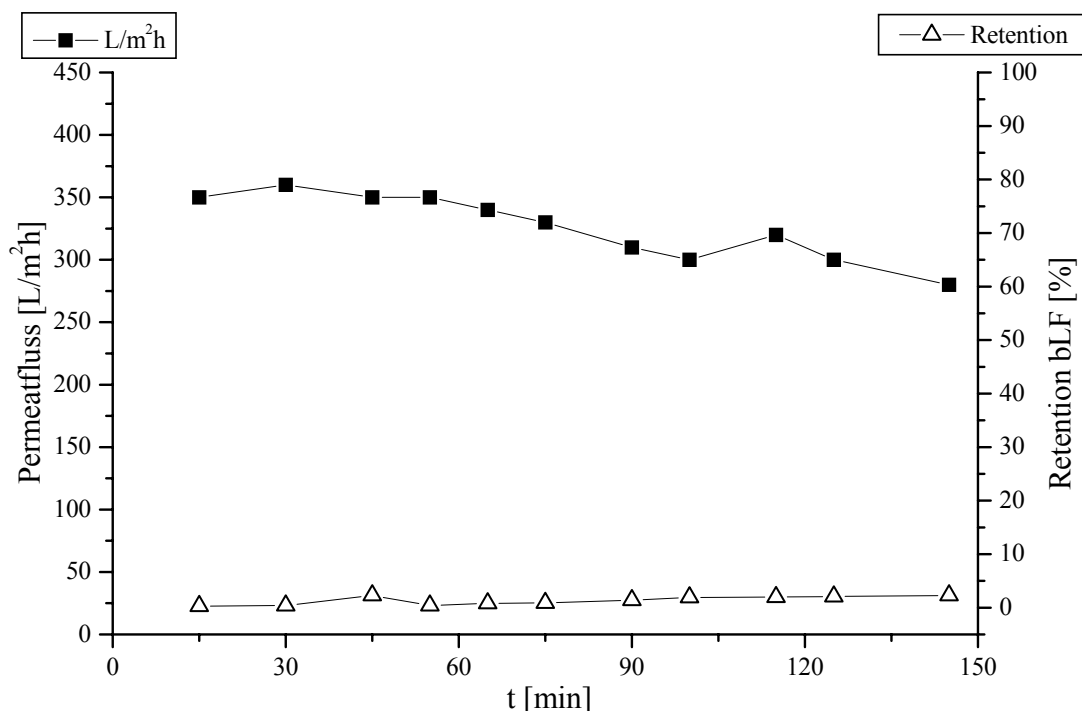


Abb. 4.12: Filtration von Molke mit Microdyn-Rohrmodul; Material Polypropylen; Porengröße 0,2 µm; $T_{\text{Filtration}}=50^{\circ}\text{C}$, Überströmung 10000 L/h, $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=80\%$, Membranfläche $A=1\text{ m}^2$

Zwei Unterschiede zur Filtration im kleinen Maßstab fallen auf:

- Der Permeatfluss ist über die Filtrationszeit hinweg nicht konstant, sondern fällt innerhalb von zweieinhalb Stunden von 350 L/m²h auf 280 L/m²h ab. Dies ist nicht auf eine schlechtere Leistung des Moduls zurückzuführen, vielmehr macht sich die zunehmende Aufkonzentrierung des Filtrationsmediums im Vorlagebehälter (Konzentrierungsfaktor $f_{145\text{min}}=4$) bemerkbar, bedingt durch die Art der Prozessführung.
- Der Permeatfluss liegt von Beginn an unter dem erwarteten Startwert von 450 L/m²h, der bei der Filtration im kleinen Maßstab gemessen worden ist. Die Erklärung hierfür ist bei den technischen Daten des 1 m²-Moduls zu suchen, dessen Dimensionen nicht exakt im Verhältnis von 1:1 zum 0,036 m²-Modul stehen. Tabelle 4.5 zeigt die Unterschiede auf:

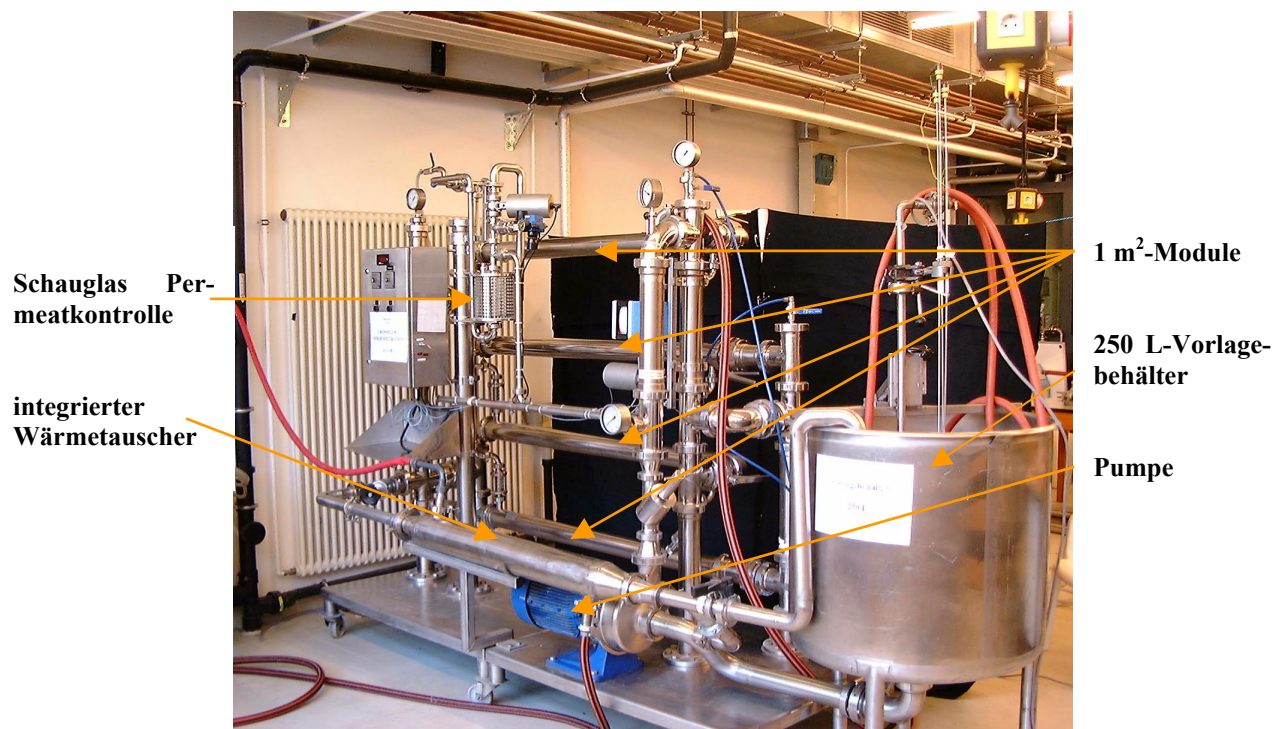
Tab. 4.5: Vergleich der technischen Daten von 0,036 m²- und 1 m²-Rohrmodul:

	0,036 m ² -Modul	1 m ² -Modul
Modullänge [m]	0,75	1,5
Anzahl der Rohre	3	43
InnenØ Membran [cm]	0,55	0,55
Anströmfläche [cm ²]	0,72	10
Anströmfläche : Membranfläche	2·10 ⁻³	1·10 ⁻³
Strömungsgeschwindigkeit v [cm/s]	617	278
Scherrate γ [1/s]	8975	4044
Reynoldszahl	31.880	14.364

Das Verhältnis von Anströmfläche zu Membranfläche ist bei dem kleinen Modul doppelt so hoch wie bei dem großen Modul. Die Strömungsgeschwindigkeit v entlang der Membran sowie die resultierende Reynoldszahl als Maß der Turbulenz der sich ausbildenden Strömung ist bei einem einheitlichen Eingangsdruck auf der Retentatseite von 2 bar bei dem 1 m²-Modul kleiner.

Die Retentionswerte des 1 m²-Moduls sind mit maximal 5 % ebenso gut wie die des kleinen Moduls. Auch der Grad der Aufreinigung, Transmissionswert = 80 %, ist gleich. Obwohl die Filtrationsleistung durch die Umstellung auf das 1 m²-Modul abgenommen hat, ist ein weiteres Up-Scaling durchgeführt worden.

Im zweiten Up-Scaling ist die Membranfläche von 1 m² auf 4 m² erweitert worden. Dafür stand eine Kompaktanlage der Firma Microdyn zur Verfügung, in die vier Module mit 1 m² Filterfläche parallelgeschaltet integriert werden können:

Abb. 4.13: Verwendete 4 m²-Crossflow-Kompaktanlage zur Mikrofiltration von Molke, Firma Microdyn

Es sind pro Versuch 1000 L Molke filtriert worden. Durchschnittlich konnten in einem Versuch 800 L Permeat für die Auftragung auf den Membranadsorber gewonnen werden; das entspricht einem Konzentrierungsfaktor von 5. Die Filtrationstemperatur betrug zu Filtrationsbeginn 10°C. Das Vorheizen der Molke war mit der Anlage nicht möglich; im Verlauf der Filtration stieg die Betriebstemperatur jedoch auf 30°C an. Ab dieser Temperatur ist wie bei der 1 m²-Anlage Permeat entnommen und der 250 L-Vorlagebehälter wiederholt mit Molke nachgefüllt worden. Leider erlaubte die Anlage nicht die Messung des Retentatflusses, daher können Strömungsgeschwindigkeit v und Scherrate γ für diesen Filtrationsmaßstab nicht angegeben werden. Die Abbildung 4.14 skizziert den Verlauf einer Filtration:

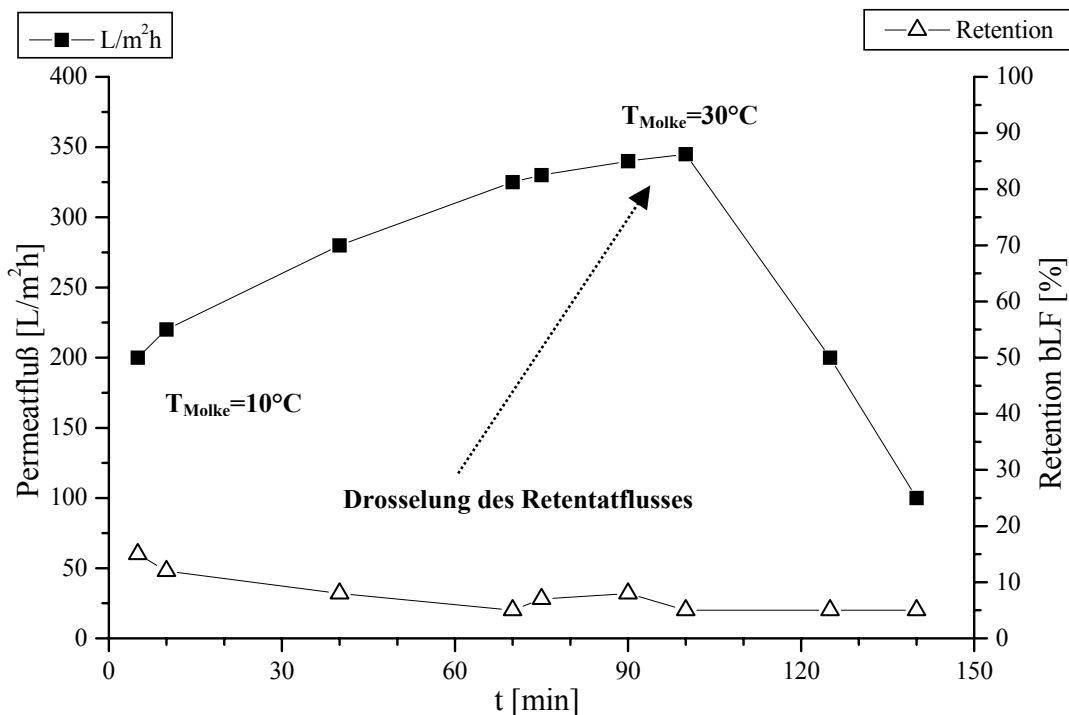


Abb. 4.14: Filtration von Molke mit Microdyn-Rohrmodulen; Material Polypropylen; Porengröße 0,2µm; $T_{\text{Filtration}}=10\text{-}30^{\circ}\text{C}$; $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=80\%$; Membranfläche $A=4\text{x}1\text{m}^2$

Die Abbildung macht die große Abhängigkeit der Filtrationsleistung von der Betriebstemperatur deutlich. Der Permeatfluss steigt über die ersten 90 Minuten hinweg stark an. Nach 70 Minuten wird das Permeat in einen 1000 L-Vorlagebehälter für die zweite Prozess-Stufe geleitet und kalte Molke nachgefüllt. Bereits 30 Minuten später muss der Retentatfluss gedrosselt werden, weil die 1000 L fast durchfiltriert sind. Die Retentions- und Transmissionswerte sind wie bei den Filtrationen im kleineren Maßstab für den weiteren Lactoferrin-Gewinnungsprozess gleichbleibend gut.

Auch im 4 m²-Maßstab zeigt die Crossflow-Mikrofiltration mit dem 0,2 µm-Rohrmodul sehr gute Ergebnisse. Auf der Basis der großen Temperaturabhängigkeit der Filtration kann die Anlage aber noch optimiert werden.

4.1.3 Optimierung

Zur Verbesserung der Filtrationsleistung bietet sich anhand der vorigen Ergebnisse das Vorwärmen des Filtrationsmediums (die 1000 L Molke wurden gekühlt auf 5-10°C aus der Molkerei angeliefert) vor dem Eintritt in die Filtrationsanlage an. Hierfür ist ein externer Wärmetauscher zwischen den 1000 L-Molkentank und den 250 L-Vorlagebehälter der Filtrationsanlage geschaltet worden. Die Starttemperatur für die Filtration wurde so von 10°C auf 28°C erhöht, hierdurch war der Einfluss auf die Betriebstemperatur beim Nachfüllen des Vorlagebehälters mit Molke aus dem Tank weniger stark.

Weiterhin ist der anlageninterne Wärmetauscher in Betrieb genommen worden. Durch den gemeinsamen Einsatz beider Wärmetauscher konnte die optimale Filtrationstemperatur von 50°C erreicht werden. Die folgende Abbildung zeigt einen Filtrationsverlauf mit optimierter Anlage. Der Verlauf des Permeatflusses der nicht optimierten Filtration ist mit dargestellt:

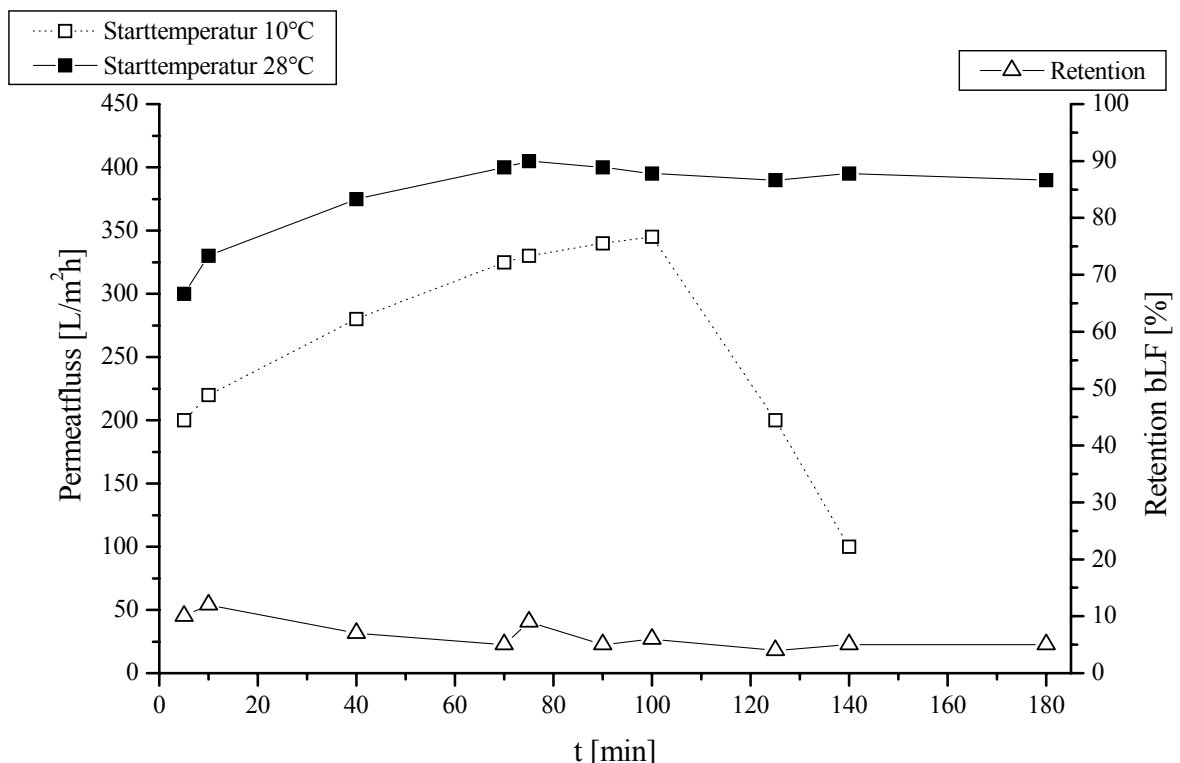


Abb. 4.14: Filtration von Molke mit Microdyn-Rohrmodulen; Material Polypropylen; Porengröße 0,2 µm; $T_{\text{Filtration}}=28-50^{\circ}\text{C}$; $\text{Transmission}_{600\text{nm}}=80\%$; Membranfläche $A=4\text{x}1\text{ m}^2$

Der Leistungsunterschied der Filtrationsanlage bei den verschiedenen Starttemperaturen ist deutlich zu erkennen. Aufgrund des vorgeschalteten Wärmetauschers startet die Filtration bei 28°C mit 100 L/m²h höherer Permeatleistung. Durch den integrierten zweiten Wärmetauscher erreicht das Filtrationsmedium bereits nach 70 Minuten die Idealtemperatur von 50°C. Diese optimierte Filtration ist über drei Stunden im Recycled-batch-Verfahren betrieben worden, um zu testen, ob der Permeatfluss konstante Werte liefert. Erst dann ist mit Permeatentnahme und Aufkonzentrierung begonnen worden (ohne Abbildung). Auf die Transmissions- und Retentionswerte hat die erhöhte Filtrationstemperatur erwartungsgemäß keinen Einfluss.

Eine Optimierung auf der Basis höherer Retentatflüsse (und somit höherer Überströmungen und Scherraten) konnte nicht durchgeführt werden, da die in die Anlage fest integrierte Pumpe bereits an ihrer Leistungsgrenze gefahren worden ist.

4.1.4 Reinigung

Eine effiziente Reinigungsprozedur mit preiswerten Chemikalien bei möglichst geringem Zeitaufwand ist Grundvoraussetzung für jede neu in einen Gesamtprozess zu integrierende großtechnische Anlage. Es sind für die Crossflow-Mikrofiltration mehrere Kombinationen von verschiedenen Reinigungsschritten getestet worden. Die folgenden Chemikalien wurden eingesetzt:

1. Natronlauge pH 14
2. Zitronensäure pH 2
3. Reinigungsmittel Ultrasil P3-53 (Firma Henkell), 5 %ige Lösung

Natronlauge und Zitronensäure sind gängige Reinigungsmittel, die auch zum Reinigen der bestehenden Molken-Prozesslinie bei dem Projektpartner Biolac zum Einsatz kommen. Das enzymatische Reinigungsmittel Ultrasil P3-53 ist ein von der Firma Microdyn zur Membranreinigung, besonders bei Proteinfouling, empfohlenes Mittel.

Da die Anlage CIP-fähig ist, war es ausreichend, die Reinigungslösung in den Vorlagebehälter zu geben und im Kreis zu pumpen. Einzige Ausnahme stellt der Vorgang Rückspülung dar. Hier wird die Reinigungslösung aus einem eigenen Reservoir über die Permeatseite der Module durch die Membranen in die Vorlage gepumpt (siehe Kapitel 2.1).

Die folgenden vier Reinigungsprozeduren sind mit der 4 m²-Kompaktanlage gefahren worden. Die Betriebstemperatur lag für die Schritte mit Lauge und Säure bei 50°C, für die P3-53-Lösung bei 38°C (Temperaturoptimum der enthaltenen Enzyme).

REINIGUNGS-METHODE NR. 1:

•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	
•	Säure im Kreis gepumpt	30 min	
•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	
•	Lauge im Kreis gepumpt	45 min	
•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	Σ 2 h

REINIGUNGSMETHODE NR. 2:

•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	
•	Säure im Kreis gepumpt	30 min	
•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	
•	Lauge im Kreis gepumpt	30 min	
•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	
•	Ultrasil P3-53 im Kreis gepumpt	60 min	
•	über Nacht einwirken lassen		
•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	Σ ca. 16 h

REINIGUNGSMETHODE NR. 3:

•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	
•	Ultrasil P3-53 im Kreis gepumpt	30 min	
•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	
•	Säure im Kreis gepumpt	30 min	
•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	
•	Lauge im Kreis gepumpt	30 min	
•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	Σ 2,5 h

REINIGUNGSMETHODE NR. 4:

•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	
•	Ultrasil P3-53 im Kreis gepumpt	30 min	
•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	
•	Rückspülung mit Lauge	45 min	
•	ausspülen mit H ₂ O	15 min	Σ 2 h

Bei der ersten Reinigungsmethode handelt es sich um eine Standard-Prozedur, die in vielen Prozessen zum Einsatz kommt. Sie nimmt nicht mehr als zwei Stunden Zeit in Anspruch, und es werden ausschließlich Standard-Reagenzien benutzt. Für die effektive Reinigung nach der Molken-Filtration ist sie allerdings nicht geeignet. Nach der Reinigung beträgt der Wasserwert nur etwa 70 %.

Reinigungsmethode Nr. 2 entspricht Methode Nr. 1, mit einem zusätzlichen Reinigungsschritt unter Einsatz von Ultrasil P3-53. Durch die lange Einwirkzeit dieser 5 %igen Lösung auf enzymatischer Basis über Nacht werden Fouling-Substanzen auf der Membranoberfläche abgebaut. Mit dieser Prozedur lässt sich der Wasserwert zu 100 % wiederherstellen. Diese Methode ist also gut für den Prozess geeignet, jedoch sehr zeitintensiv.

Bei der Reinigungsmethode Nr. 3 ist der enzymatische Reinigungsschritt verkürzt und an erste Stelle gesetzt worden. Der zeitliche Aufwand beträgt nur 2,5 Stunden, der Wasserwert liegt bei 85 % gegenüber dem vor der Molkenfiltration.

Bei Reinigungsmethode Nr. 4 ist ausgenutzt worden, dass sowohl die Module rückspülfähig sind als auch die Kompaktanlage für eine Spülung von der Permeatseite her ausgelegt ist. Nach einem enzymatischen Reinigungsschritt sind 45 L Lauge mit einer Flussrate von 0,25 L/ m²min durch die vier Membranen gepumpt worden. Nach Ausstoß dieser Lösung aus dem Vorlagebehälter ist der Wasserwert nach nur zwei Stunden Zeitaufwand zu 100 % wiederhergestellt worden.

Eine Übersicht über die Effizienz der vier Methoden gibt die folgende Abbildung 4.15.

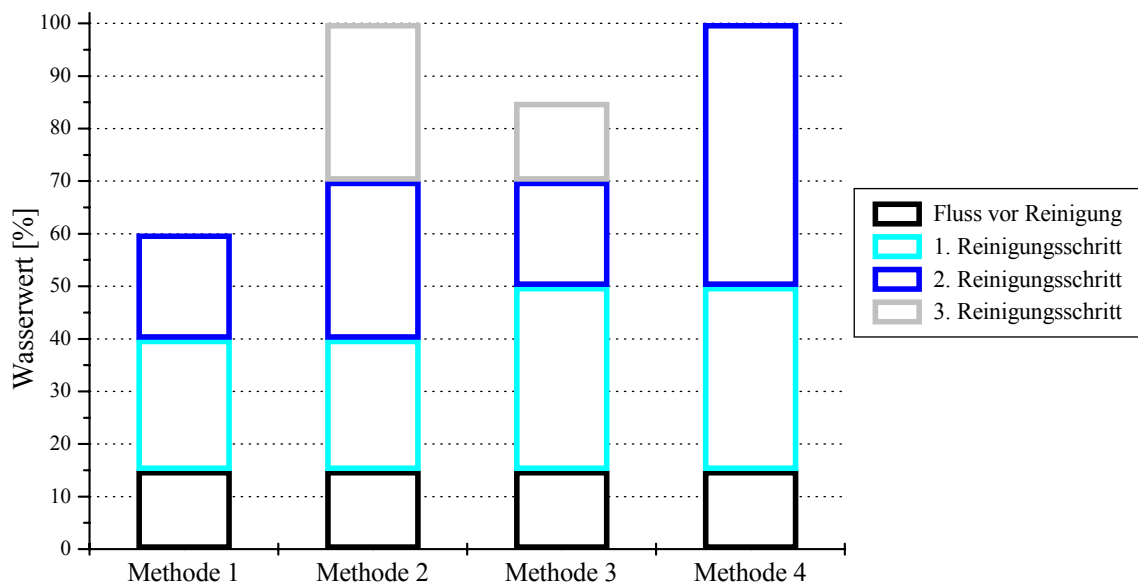


Abb. 4.15: Darstellung der Zunahme der Wasserwerte/Permeatflüsse während eines Reinigungszyklusses

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 4.1 zur ersten Prozess-Stufe lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Es ist mit der Microdyn-0,2 μm -Rohrmembran ein Modultyp gefunden worden, bei dem die Molkenfiltration
 - konstant über mindestens sieben Stunden
 - mit effektiver Aufreinigung der Molke
 - mit guter Filtrationsleistung
 - mit hoher Permeation des Zielproteinsverläuft.
- Die Filtration von Molkenkonzentrat mit diesem Modultyp ist prinzipiell durchführbar, führt aber zu schlechteren Raum-Zeit-Ausbeuten.
- Es ist eine Reinigungsmethode für den Molkenfiltrations-Prozess entwickelt worden, die
 - unter 100%iger Regeneration des Wasserwertes
 - mit einem Zeitaufwand von nur zwei Stundengefahren werden kann.

4.2 2. Prozess-Stufe: Isolierung von Lactoferrin

Es sind im Rahmen einer früheren Dissertation [WEISS, 1999] bereits grundlegende Untersuchungen zur Isolierung von Lactoferrin mittels Kationenaustauschermembranen durchgeführt worden. Die Resultate dieser Vorarbeiten werden an dieser Stelle kurz zusammengefasst, da sie die Grundlage bilden für die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeiten.

Zunächst ist die Bindekapazität der Austauschermembran für das Zielprotein Lactoferrin bestimmt worden. Die statische Kapazität ist nach einer Prüfvorschrift der Herstellerfirma Sartorius AG (PV 73A) zu $0,7 \text{ mg/cm}^2$ Membranfläche bestimmt worden. Im Anschluss sind Untersuchungen sowohl mit 100 cm^2 -Flachmembranen, Sartobind S, als auch mit Spiralmodulen der Sartobind[®] Factor Two Family durchgeführt worden. Hierbei hat sich für das SartobindS-Modul eine Abhängigkeit der dynamischen Bindekapazität von der Auftragsflussrate herausgestellt, während die Spiralmodule eine von der Auftragsflussrate unabhängige dynamische Kapazität von $0,2 \text{ mg/cm}^2$ aufwiesen. Die nachfolgende Abbildung 4.16 zeigt diese Ergebnisse.

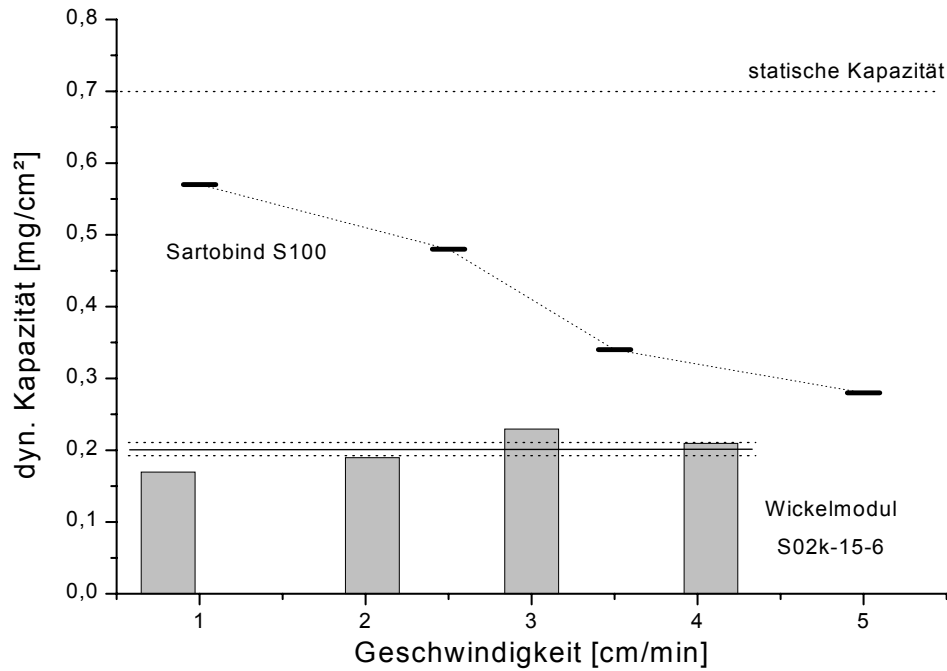


Abb. 4.16: Abhängigkeit der dynamischen Kapazität bei Platten- und Wickelmodulen von der Auftragungsgeschwindigkeit [WEISS, 1999]

Untersuchungen zur Elution von Lactoferrin von dem Membranadsorber haben ergeben, dass neben Lactoferrin eine zweite minore Komponente aus der Molke, das Enzym Lactoperoxidase, an die Kationenaustauschermembran bindet (siehe auch Kapitel 2.1). Die Stärke der Bindung dieses Enzyms an den Adsorber ist jedoch schwächer als die des Lactoferrins. Daher lassen sich die zwei Proteine unter Anwendung eines Stufen-Salzgradienten selektiv von der Membran eluieren. Mit NaCl-Lösung als Elutionsmittel konnte sowohl ein Zweistufigengradient zur Gewinnung von Lactoferrin als auch ein Dreistufigengradient zur Gewinnung beider Komponenten erarbeitet werden. Die folgenden Abbildungen dokumentieren die Ergebnisse:

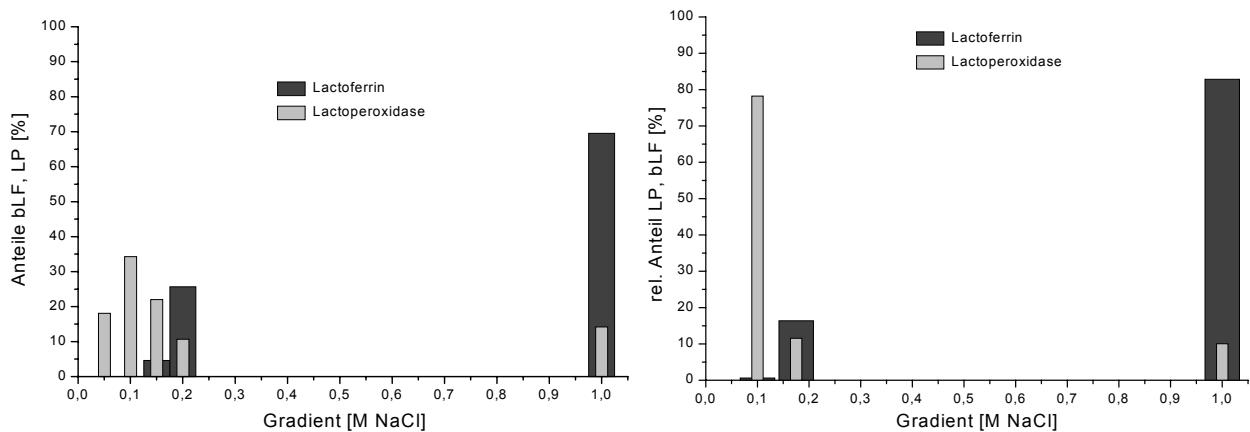


Abb. 4.17: Elutionen von Lactoperoxidase und Lactoferrin zur Gradienten-Optimierung [WEISS, 1999]

Die linke Abbildung macht das unterschiedliche Elutionsverhalten der zwei Proteine bei geringen Salzkonzentrationen deutlich. Unter Anwendung eines Zweistufen-Gradienten mit den NaCl-Konzentrationen 0,15 M und 1 M kann der Verlust an Lactoferrin auf 5 % begrenzt werden. In der rechten Abbildung ist die optimierte Dreistufen-Elution zur Gewinnung beider Proteine dargestellt. Bei der Elution mit 0,1 M NaCl können knapp 80 % der Lactoperoxidase nahezu Lactoferrin-frei gewonnen werden, bei 0,175 M NaCl wird eine Mischfraktion aufgefangen, und bei 1 M NaCl eluiert das Lactoferrin gemeinsam mit knapp 10 % der Lactoperoxidase. Nach einem Up-Scaling auf insgesamt 1 m² Membranfläche und der Automatisierung der Anlage können die Ergebnisse zur dynamischen Kapazität von 0,2 mg/cm² für Lactoferrin sowie zum Elutionsverhalten der zwei Proteine im NaCl-Stufengradienten bestätigt werden [WEISS, 1999].

Die Bindung der Zielkomponenten Lactoferrin und des Nebenproduktes Lactoperoxidase an den Membranadsorber sowie ihre selektive Elution werden von verschiedenen Parametern beeinflusst. Die Optimierung dieser Parameter wie die Wahl des Elutionssalzes, des Puffersystems und des pH-Wertes in den Elutionslösungen sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Anschließend ist ein Up-Scaling auf insgesamt 4 m² Membranfläche durchgeführt worden.

4.2.1 Bestimmung der optimalen Elutionsparameter

Die Ergebnisse der früheren Dissertation sind unter den folgenden Bedingungen erzielt worden:

- Puffersystem der Elutionslösungen: Natriumphosphatpuffer, 20 mM
- verwendetes Salz für die Elutionslösungen: Natriumchlorid
- pH-Wert der Elutionslösungen: pH 7

In den folgenden Kapiteln sind diese Prozessparameter in eigenen Versuchsreihen überprüft worden. Die Untersuchungen sind mit Ideal-Lösungen als Auftragungsmedium, d.h. Lactoferrin-Lösungen eingestellt auf den pH-Wert von Molke (pH 6,2), und nicht mit Realmedium durchgeführt worden. Die einzige Ausnahme stellt Kapitel 4.2.1.1 dar, in dem mit Molke gearbeitet worden ist. Durchgeführt wurden die Versuche an einer FIA-Apparatur, in die ein Kationenaustauscher-Modul Sartobind S15 integriert war (siehe Kapitel 3.5.2). Pro Messzyklus wurde das Adsorbermodul zunächst mit lactoferrinhaltiger Lösung beladen. Nach einer kurzen Spülphase ist das Protein mit 1 M Salzlösung eluiert worden. Die Programmierung und Datenaufnahme erfolgte über CAFCA, Auftragung und Elution von Lactoferrin wurden mittels UV-Messung verfolgt. Die Auswertungen der Versuche wurden über die Elutions-Peakfläche gemacht, die proportional der eluierten Lactoferrinmenge ist. Einen typischen Messzyklus mit Beladungs- und Elutionspeak zeigt Abbildung 4.18.

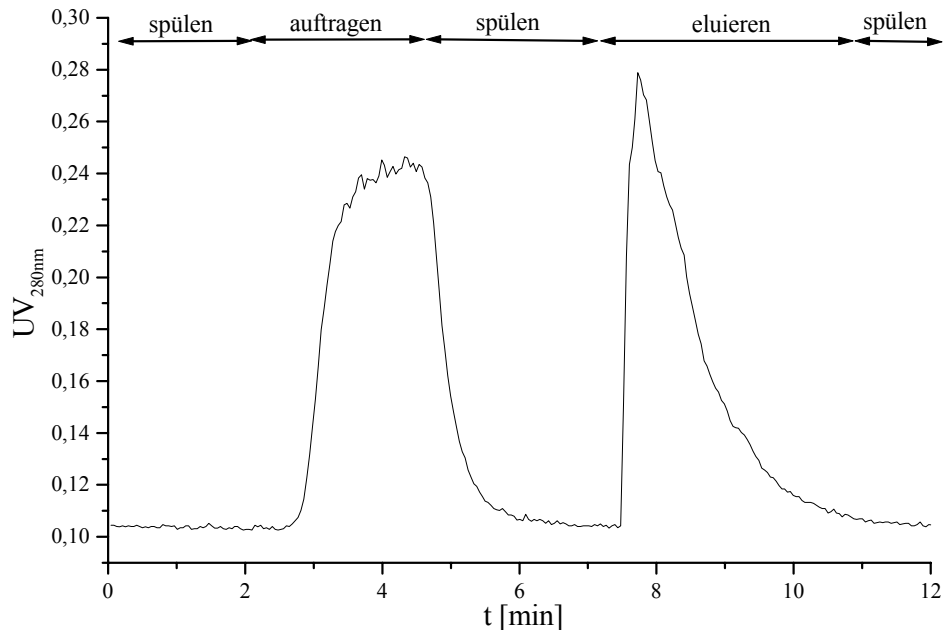


Abb. 4.18: Verlauf eines Messzyklusses an der FIA-Anlage mit Beladungs- und Elutionspeak, detektiert via UV-Messung

4.2.1.1 Wahl des Puffersystems

Molke enthält eine Reihe anorganischer Salze (siehe Kapitel 2.1.1). Durch den Einsatz von Phosphat im Puffersystem kann es zur Niederschlagsbildung von schwerlöslichen Phosphatsalzen, insbesondere Calciumphosphat, kommen. Ausgefallenes Calciumphosphat auf der Kationenaustauschermembran führt zur raschen Verblockung des Adsorbersystems und stellt ein großes Reinigungs-Problem dar. Es sind daher zwei weitere Puffer, Natriumcitrat und Natriumtartrat, auf ihre Eignung hin getestet und mit Natriumphosphat verglichen worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.19 dargestellt:

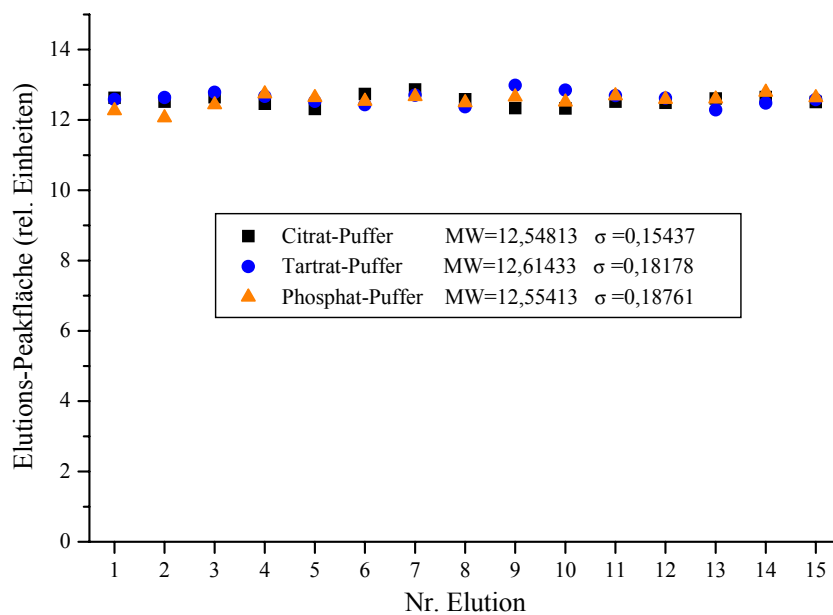


Abb. 4.19: Elutions-Peakflächen mit 1 M NaCl, drei verschiedene Puffersysteme 20 mM, pH=7, je 15 Zyklen in Folge

Mit allen drei Puffersystemen können 15 Auftragungen hintereinander ohne Reinigungszyklus gefahren werden, ohne dass Verblockungs-Erscheinungen wie Fluss- oder Kapazitätsabfall auftreten. Keines der drei Puffersalze reagiert demnach mit Molkenbestandteilen in der Art, dass der Isolierungs-Schritt für Lactoferrin beeinträchtigt wird. Das in der Molke enthaltene Calcium, bis 0,6 g/L [DE WIT, 2001], liegt also überwiegend nicht in freier Form, sondern gebunden an andere Molkenbestandteile vor. Auch die Bindekapazität für Lactoferrin wird durch die Wahl des Puffersalzes nicht beeinflusst. Die Werte der Elutionspeakflächen liegen bei allen drei angewendeten Puffern sehr dicht beieinander.

Ökonomisch betrachtet ist der Einsatz des Phosphatpuffers am interessantesten. Die Preise für Citrat- und Tartratsalze liegen deutlich über denen der Phosphatsalze. Daher sind alle weiteren Versuche mit Natriumphosphatpuffer durchgeführt worden.

4.2.1.2 Wahl des Salzes zur Elution

Neben Natriumchlorid-Lösung, die sich in früheren Arbeiten als geeignet zur Elution von Lactoferrin erwiesen hat (s.o.), ist Magnesiumchlorid als Elutions-Lösung eingesetzt worden. Als zweiioniges Salz hat Magnesiumchlorid eine größere Ionenstärke. Es sollte getestet werden, ob dadurch mit geringer konzentrierter Salzlösung das Lactoferrin vom Adsorber eluiert werden kann. Hieraus ergäbe sich durch geringere Einsatzmengen eine Verringerung der Kosten sowohl im Einkauf als auch beim Abwasser. Die Versuche sind an einer LPLC-Anlage durchgeführt worden (siehe Kapitel 3.5.3). Es ist mit beiden Salzen ein Stufengradient von 0,1 M bis 1 M gefahren worden. Der Verlauf von Auftragung und Elution wurde über die Messung von UV-Absorption und elektrischer Leitfähigkeit verfolgt. Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden gesammelt und mittels HPLC-Messung ihr Lactoferringehalt bestimmt. Die folgenden Abbildungen dokumentieren die Ergebnisse der Versuche:

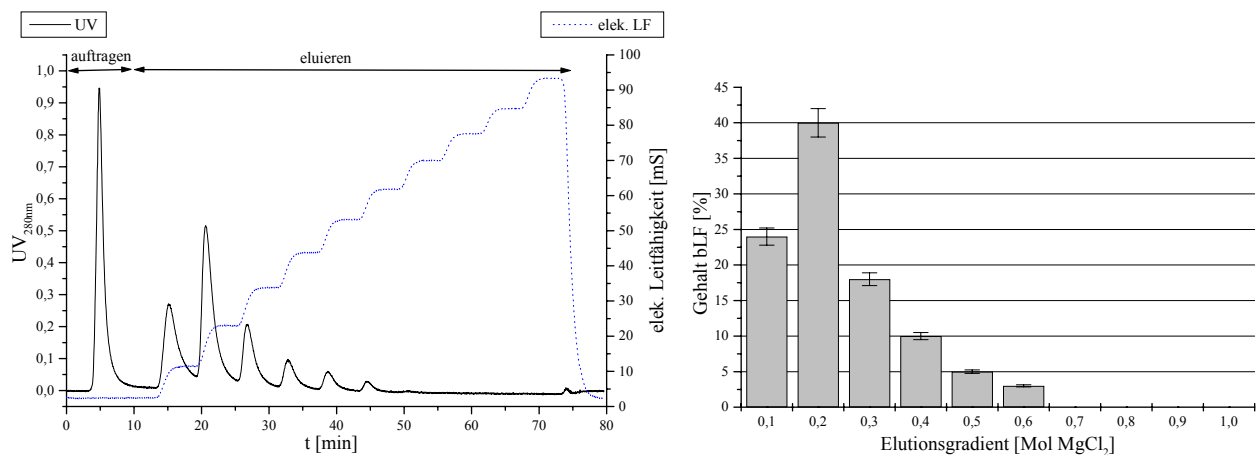


Abb. 4.20: links: Elution von Lactoferrin im Stufengradienten 0,1 M bis 1 M Magnesiumchlorid
rechts: Prozentuale Verteilung von Lactoferrin in den Elutionsfraktionen, bestimmt mit HPLC

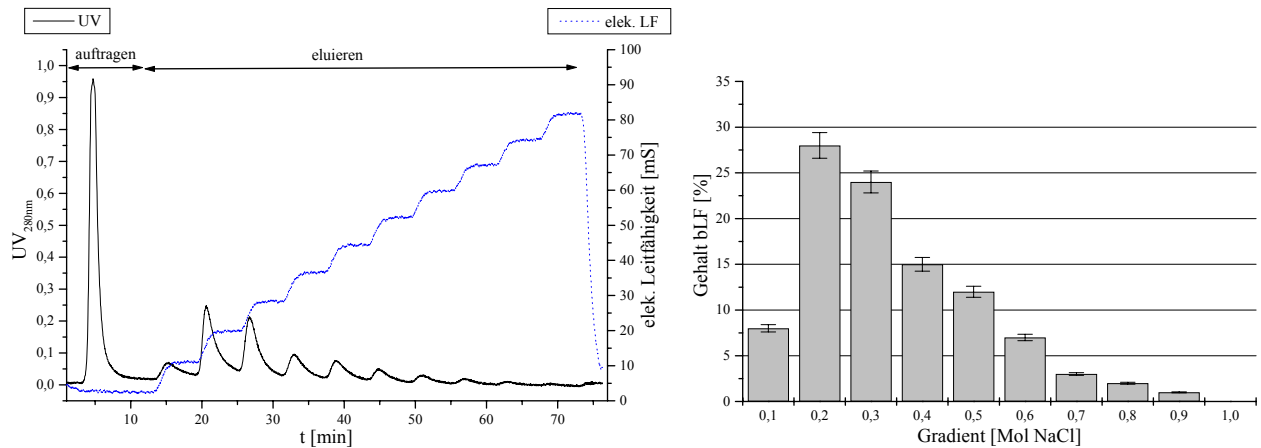


Abb. 4.21: links: Elution von Lactoferrin im Stufengradienten 0,1 M bis 1 M Natriumchlorid
rechts: Prozentuale Verteilung von Lactoferrin in den Elutionsfraktionen, bestimmt mit HPLC

Prinzipiell sieht das Elutionsprofil für Lactoferrin bei beiden Salzen gleich aus: bereits in der 0,1 M-Fraktion ist Lactoferrin enthalten, und der größte Anteil an Zielprotein lässt sich in der 0,2 M-Fraktion nachweisen. In den darauffolgenden Fraktionen eluiert das Lactoferrin in abnehmendem Maße. Allerdings ist die Elution mit Magnesiumchlorid bereits bei einer Salzkonzentration von 0,6 mol/L abgeschlossen, während bei Natriumchlorid noch in der 0,9 molaren Lösung Lactoferrin nachgewiesen werden kann. Der Versuch zeigt, dass die Konzentration des Eluenten für Lactoferrin salzabhängig ist: wird Natriumchlorid verwendet, so muss die Konzentration der Lösung mindestens 0,9 M betragen, während für Magnesiumchlorid bereits eine 0,6 M-Lösung ausreichend ist. Der Preis von Magnesiumchlorid liegt mehr als doppelt so hoch wie der von Natriumchlorid. Daher ist der Einsatz von Natriumchlorid für den Prozess-Schritt ökonomischer, obwohl durch den Einsatz des zweiionigen Salzes nicht nur geringere Salzmenen benötigt würden, sondern auch weniger salzbelastetes Abwasser anfielen. Weiterhin ist die Trennung von Lactoferrin und Lactoperoxidase im Magnesiumchloridgradienten problematisch. Für die weiteren Versuche ist Natriumchloridlösung als Elutionsmittel eingesetzt worden.

4.2.1.3 pH-Abhängigkeit, Trennung von Lactoferrin und Lactoperoxidase

Auch der pH-Wert der Puffer- und Elutionslösungen spielt eine Rolle bei der Isolierung von Lactoferrin aus Molke. Je niedriger der pH-Wert gewählt wird, desto mehr Molkenkomponenten liegen im isoelektrischen oder sogar kationischen Zustand vor und binden gemeinsam mit Lactoferrin an die Kationenaustauschermembran, und das Problem der selektiven Elution des Zielproteins wird größer. Je höher der eingestellte pH-Wert ist, desto näher liegt er am isoelektrischen Punkt von Lactoferrin, das dann nicht mehr vollständig kationisch geladen vorliegt und nur anteilig an den Membranadsorber bindet. Es ist in einer Versuchsreihe ein pH-Bereich von 6,0 bis 9,5 getestet worden. Dafür sind Puffer- und Elutionslösungen auf die entsprechenden pH-

Werte eingestellt und in einer Reihe von Auftrags-Elutions-Zyklen eingesetzt worden. Abbildung 4.22 zeigt die Ergebnisse:

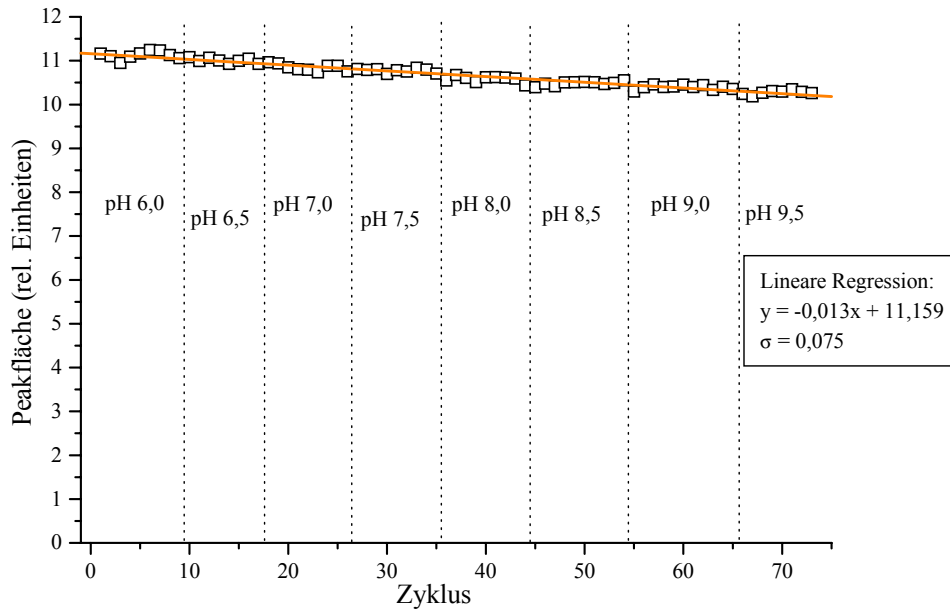


Abb. 4.22: Peakflächen von Lactoferrin-Elutionen bei verschiedenen pH-Werten

Obwohl bei allen Zyklen dieselbe Menge an Lactoferrin aufgetragen worden ist, nimmt die Fläche der Elutionspeaks mit zunehmendem pH-Wert kontinuierlich ab. Durchschnittlich verringert sich die Peakfläche pro 0,5-pH-Einheit um 1,3 %. Die folgende Abbildung macht deutlich, dass mit zunehmenden pH-Werten von Puffer- und Elutionslösungen mehr Lactoferrin die Adsorbermembran passiert, ohne zu binden. Dieser nicht bindende Proteinanteil, der im Durchlauf verbleibt, geht für den Gewinnungsprozess verloren.

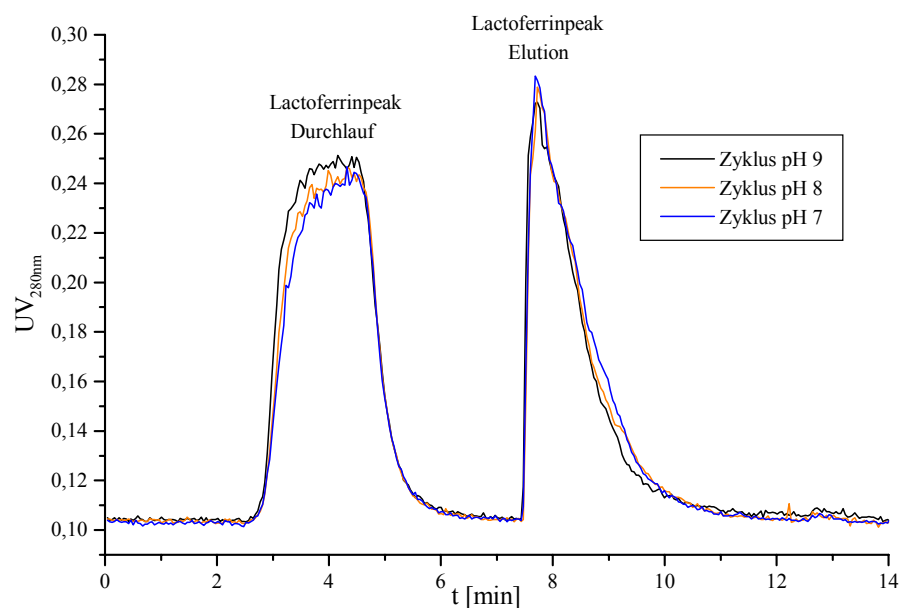


Abb. 4.23: Versuchsprofile von drei Zyklen, durchgeführt mit Puffer- und Elutionslösungen eingestellt auf drei verschiedene pH-Werte

Ein weiterer Umstand, der bei der Einstellung des pH-Wertes für das System berücksichtigt werden muss, ist der Anteil an Lactoferrin, der sich bereits wieder bei niedrigen Konzentrationen der Elutionslösung vom Membranadsorber löst. Je näher der pH-Wert im System an dem isoelektrischen Punkt des Proteins liegt, desto schwächer ist auch die Bindung zwischen Membran und Molekül, und geringere Salzkonzentrationen sind zur Elution erforderlich. Was aus ökonomischer Sicht positiv erscheint, ist problematisch bezüglich der Trennschärfe zum Nebenprodukt Lactoperoxidase. Die Lactoperoxidase wird in einer 0,15 M Natriumchlorid-Fraktion vor dem Lactoferrin eluiert [WEISS, s.o.]; je weniger Lactoferrin in diese Fraktion gelangt, desto besser für den Prozess. Die folgende Abbildung dokumentiert einen Versuch, in dem bei verschiedenen eingestellten pH-Werten niedrige Eluentenkonzentrationen angewendet worden sind:

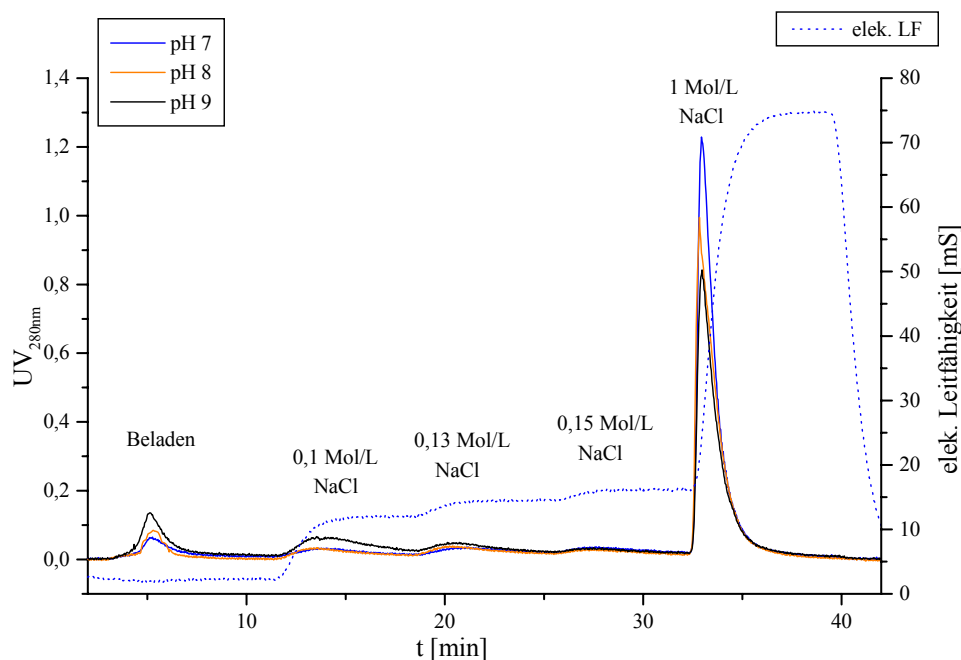


Abb. 4.24: Lactoferrin-Elutionen im vier-Stufen-Salzgradienten bei drei verschiedenen pH-Werten

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei höheren pH-Werten

- der Anteil an ungebundenem Lactoferrin größer wird
- der Anteil an Lactoferrin in den Eluaten mit niedriger Salzkonzentration größer wird und somit in die Lactoperoxidase-Fraktion gelangt
- der Anteil an Lactoferrin in der 1 M-Fraktion kleiner wird.

Die Versuche zeigen, dass der isolierbare Anteil an Lactoferrin in der Molke um so größer ist, je weiter der im System eingestellte pH-Wert vom isoelektrischen Punkt des Zielproteins entfernt liegt. Am empfehlenswertesten für die Lactoferrin-Isolierung sollte also der pH-Wert 6,0 sein. Für Ideal-Lösungen (nur Lactoferrin in Lösung, s.o.) trifft das zu. Beim Auftragen von Realmedium, Permeat aus der Crossflow-Mikrofiltration, binden bei pH-Werten unter 7 andere Molkenproteine wie z.B. Transferrin (isoelektrischer Punkt 6,7; siehe Kapitel 2.1.1) zunehmend an den Kationen-

austauscher, was zwei Probleme zur Folge hat:

- Die Lactoferrin-Fraktion, die vom Adsorber eluiert wird, enthält neben Lactoferrin andere Molkenproteine \Rightarrow Problem der weiteren Aufreinigung
- Die anderen an die Membran bindenden Moleküle treten in Konkurrenz zum Lactoferrin um die am Adsorber vorhandenen Bindungsstellen \Rightarrow die Bindekapazität des Adsorbers für Lactoferrin nimmt ab

Aufgrund dieser Erkenntnisse sind die weiteren Versuche mit auf pH 7,0 eingestellten Lösungen durchgeführt worden.

4.2.1.4 Untersuchungen zur Langzeitstabilität

Nachdem die optimalen Parameter Puffersystem, Elutionssalz und pH-Wert der Lösungen zur Lactoferrin-Isolierung überprüft worden sind, ist die Langzeitstabilität einer Sartobind S15-Austauschermembran untersucht worden. Ein Vorteil des Membranadsorbers gegenüber Säulenchromatographie besteht darin, dass nicht nach jedem Auftragszyklus ein Regenerationsschritt betrieben werden muss. Die nächste Auftragung führt automatisch zu einer Regeneration der Austauschermembran. Nach einer bestimmten Anzahl an Auftragszyklen lässt jedoch die Adsorberkapazität nach und der Gegendruck im System nimmt zu. Danach muss eine Reinigung der Adsorberanlage erfolgen. Nachstehend sind die maximalen und optimalen Zyklenzahlen für ideale Lösungen, d.h. Lactoferrinlösung eingestellt auf den pH-Wert von Molke, bestimmt worden. Erste automatisierte Langzeitversuche sind an einer LPLC-Anlage (siehe Kapitel 3.5.3) durchgeführt worden. Den Verlauf eines solchen Langzeittests zeigt Abbildung 4.25:

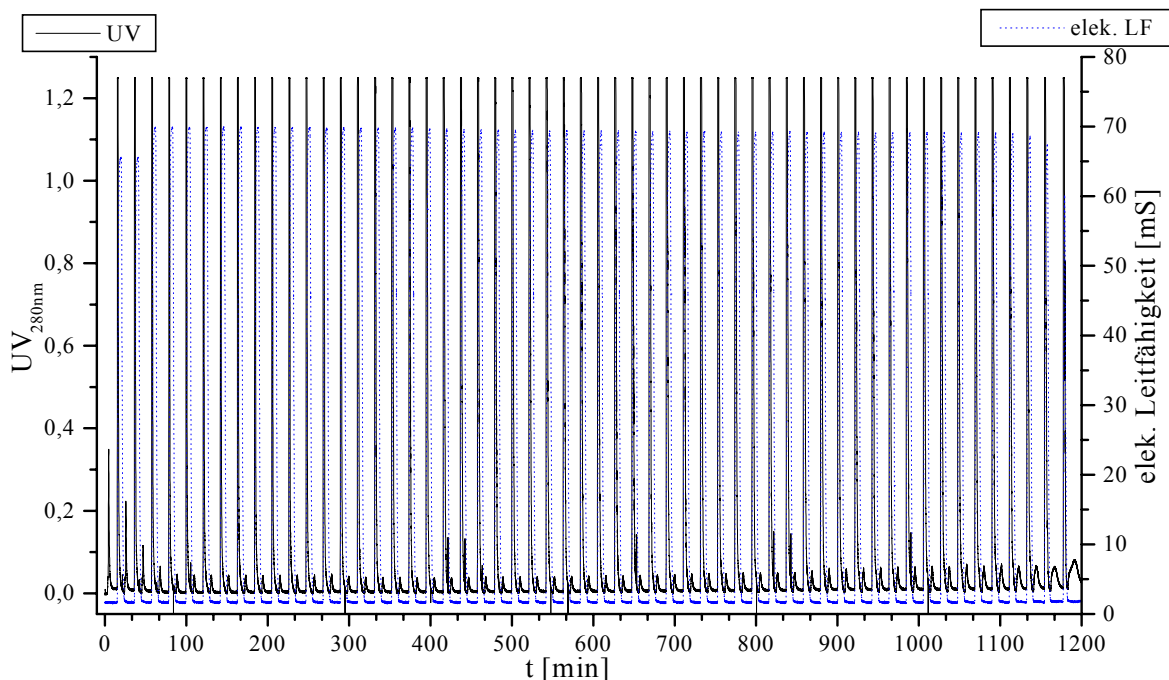


Abb. 4.25: Automatisierter Test zur Langzeitstabilität von SartobindS-Membran; 56 Zyklen

Nach 56 Zyklen wird der Versuch abgebrochen, da der Gegendruck in der Apparatur zu groß und der Fluss durch die Membran zu klein wird: das Modul ist verblockt und muss gereinigt werden. Die folgende Grafik zeigt das Verhalten der Membran zu Beginn und am Ende des Versuchs:

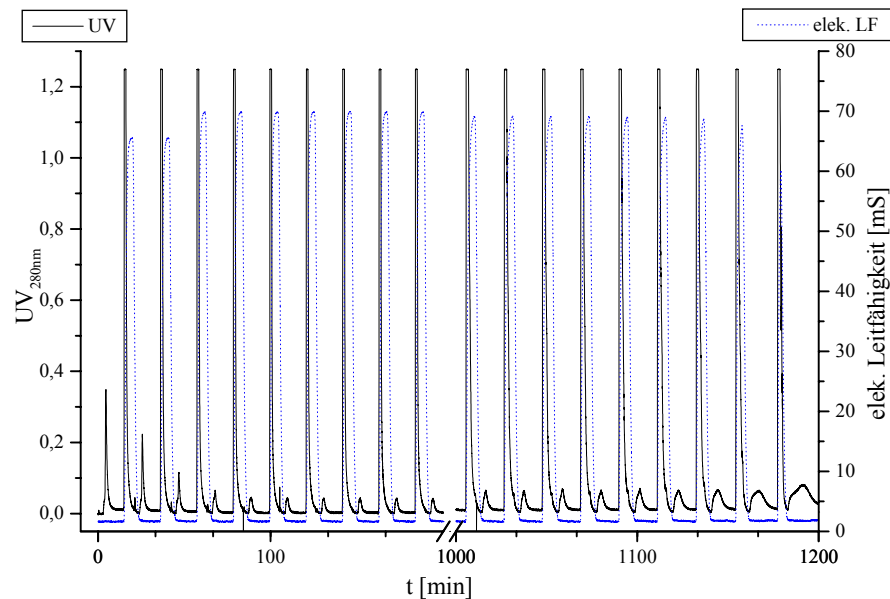


Abb. 4.26: Anlauf- und Endphase des Tests zur Langzeitstabilität von SartobindS-Membran

Es ist deutlich zu erkennen, dass zu Beginn des Versuchs der Lactoferringehalt im Durchbruch größer ist als über den Rest der Zeit hinweg. Dies könnte daran liegen, dass es im Adsorbermodul noch Toträume gibt, die während der ersten Auftrugungen nicht überströmt worden sind. Im Anschluss an diese Anlaufphase arbeitet der Membranadsorber konstant, bis nach 52 Zyklen bedingt durch den zunehmenden Gegendruck des Moduls die Flussrate abnimmt. Zur Aufklärung des Anlauf- und Langzeitverhaltens sind weitere Versuche an einer FIA-Anlage (siehe Kapitel 3.5.2) durchgeführt worden. Sowohl ungebrauchte als auch gebrauchte und gereinigte Module wurden verwendet. Die folgende Abbildung veranschaulicht die Ergebnisse der Langzeitmessungen:

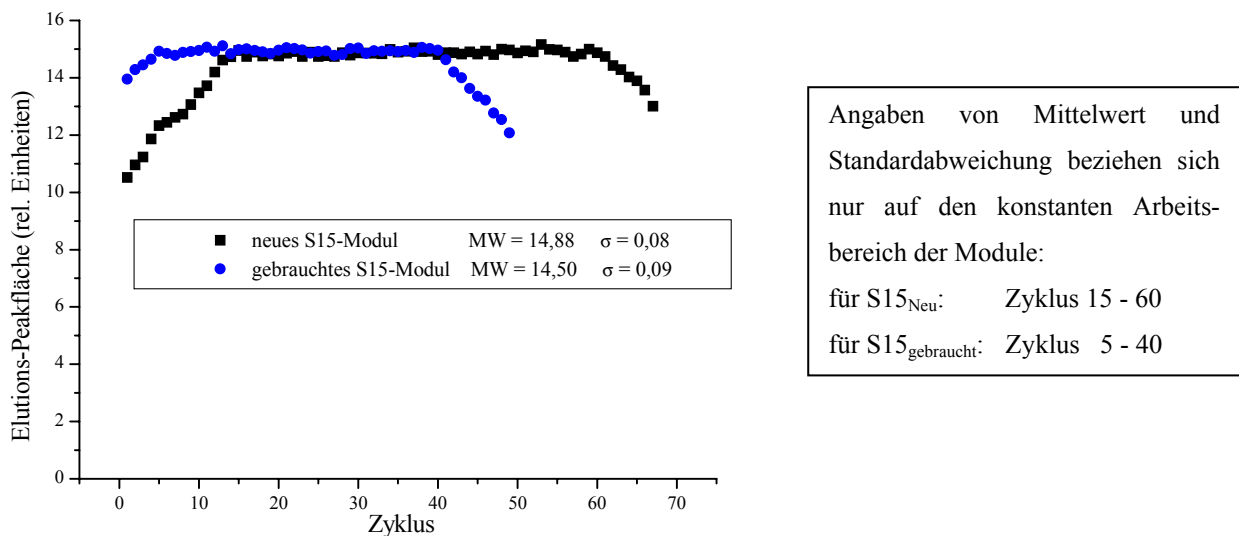


Abb. 4.27: Elutionspeakflächen zweier Langzeit-Tests mit SartobindS-Modulen zur Lactoferrin-Isolierung

Das gebrauchte Modul zeigt nach kurzer Anlaufphase (vier Zyklen) ein konstantes Arbeitsverhalten; die Schwankungen in der Peakfläche betragen weniger als 10 %. Ab dem 41. Zyklus sinkt die Kapazität des Adsorbers deutlich um 2,15 % pro Zyklus. Nach 50 Zyklen ist das Modul völlig verblockt, und es muss gereinigt werden. Das neue Modul hingegen benötigt eine viel längere Anlaufzeit, erst mit dem 15. Zyklus beginnt die stabile Arbeitsphase des Moduls. So lange braucht ein bis dahin unbenutztes Modul, bis es vollständig durchströmt und die gesamte Membranfläche zur Isolierung von Lactoferrin ausgenutzt wird. Der konstante Arbeitsbereich, in dem die Schwankungen der Peakflächen gleich dem gebrauchten Modul unter 10 % liegen, endet mit dem 60. Zyklus. Dann sinkt auch hier die Bindungskapazität, und nach dem 67. Zyklus ist der Fluss durch die Membran fast gleich Null.

Die SartobindS-Adsorbermodule brauchen also mehrere Zyklen zu Beginn eines jeden Versuchs, bis sie ihre maximale Kapazität erreichen. Die Anzahl der hintereinander fahrbaren Zyklen ist vom Gebrauchzustand der Module abhängig; neue Module verblocken später als gebrauchte. Es können jedoch in jedem Falle mindestens 45 Zyklen hintereinander gefahren werden, bevor eine Reinigung nötig wird.

4.2.1.5 Mehrfach-Elution

Für die Verarbeitung großer Mengen Molke werden für die zweite Prozess-Stufe große Adsorberflächen benötigt. Diese Membranen müssen zur optimalen Kapazitätsauslastung mit maximaler Überströmung, d.h. mit so vielen Auftrags-Elutions-Zyklen wie möglich pro Tag betrieben werden, um ökonomisch zu arbeiten (siehe Kapitel 4.5). Hierfür werden Elutionslösungen im Tonnenmaßstab benötigt. Um die anfallenden Mengen Natriumchloridlösung in Grenzen zu halten, sind Versuche zur wiederholten Verwendung von 1 M NaCl-Elutionslösung durchgeführt worden. Es sollte getestet werden, ob bereits in der Elutionslösung enthaltenes Lactoferrin Einfluss nimmt auf die Elution von weiterem Protein. Hierfür ist vom Adsorber eluierte 1 M NaCl-Fraktion gesammelt und erneut als 1 M NaCl-Elutionslösung verwendet worden. Die Versuche sind an einer FIA-Anlage durchgeführt (siehe Kapitel 3.5.2) und der Verlauf der Elutionen mittels UV-Messung online verfolgt worden. Die folgende Abbildung zeigt die ersten Ergebnisse auf:

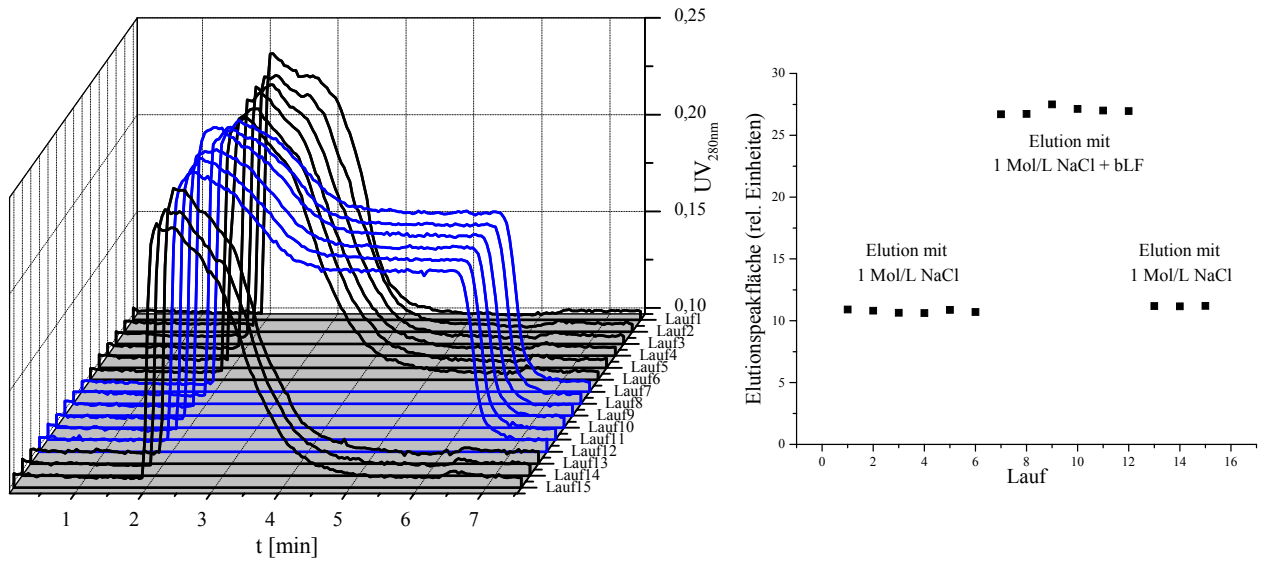


Abb. 4.28: links: Verlauf von 15 Auftragungen von Lactoferrin auf SartobindS; Elution mit bereits verwendeten 1 M NaCl-Elutionslösungen in den Läufen 7 - 12
rechts: Darstellung der Peakflächen der Lactoferrin-Elutionskurven

Zunächst sind mehrere Läufe mit reiner 1 M NaCl-Elutionslösung gefahren worden, um sicher zu sein, dass sich das Adsorbermodul im konstanten Arbeitsbereich befindet (s.o.) sowie um Lactoferrin-haltiges Eluat sammeln zu können. Nach sechs Zyklen ist auf die Lactoferrin-haltige NaCl-Lösung zur Elution umgestellt worden. Die Graphiken machen deutlich, dass sich hieraus keine Probleme für den laufenden Versuch ergeben; die Elution von Lactoferrin verläuft weiterhin unter konstanten Bedingungen. Nach sechs Elutionen mit Protein-haltiger Lösung sind noch drei Läufe mit einfacher NaCl-Lösung gefahren worden. Die Profile und die Elutionspeakflächen dieser drei Elutionen entsprechen denen vor der Zweifach-Elution (s.o.). Das Protein in der Elutionslösung hat also keine Auswirkungen auf die Kapazität des Moduls.

Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse sind weitere Versuche nach dem gleichen Prinzip durchgeführt worden. Erhaltene Elutions-Lösungen sind aufgefangen, gesammelt und bis zu dreimal wiederverwendet worden. Abbildung 4.29 zeigt ausschnittsweise die mit UV-Messung detektierten Elutionen. Es kann festgestellt werden, dass die 1 M NaCl-Lösungen zur Lactoferrin-Elution mindestens viermal eingesetzt werden können, ohne dass das Modul verblockt.

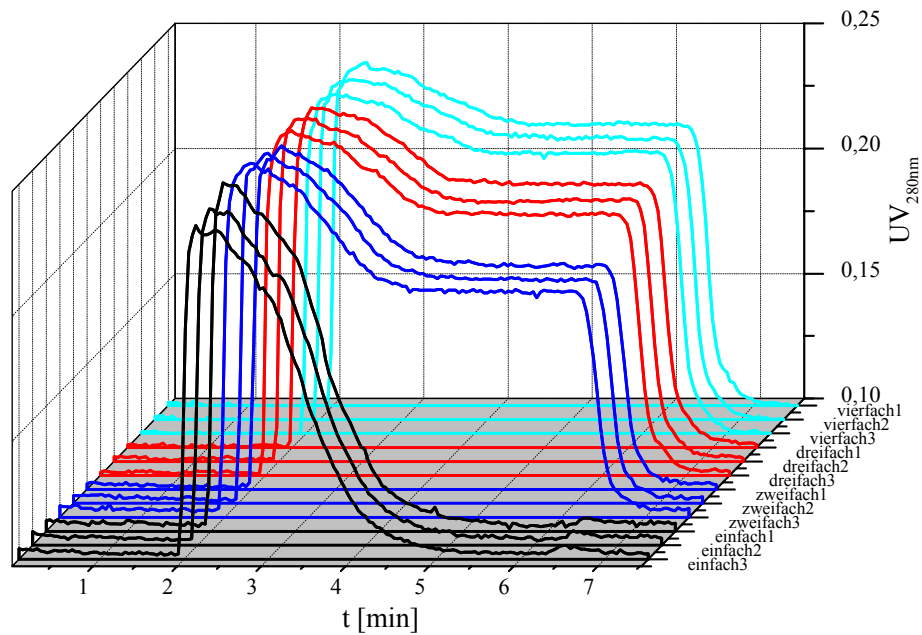


Abb. 4.29: Einfach-, Zweifach-, Dreifach- und Vierfach-Elutionen von Lactoferrin mit 1 M NaCl

Es sind bei den Versuchen jeweils 4 mg Lactoferrin auf das SartobindS 15-Modul aufgetragen und mit 8 mL 1 M NaCl eluiert worden. Bei jeder wiederholten Elution mit Protein-haltiger Salzlösung erhöht sich die Lactoferrinkonzentration in der 1 M NaCl-Fraktion um 0,5 g/L, d.h. nach dem viermaligen Einsatz derselben Lösung beträgt die Lactoferrinkonzentration 2 g/L. Es sind weitere Versuche mit Elutionslösungen durchgeführt worden, denen Lactoferrin in unterschiedlichen Mengen zugesetzt wurde. Die folgenden Abbildungen dokumentieren einen Langzeittest, bei dem mit 1 M NaCl-Lösung gearbeitet wurde, die 4,5 g/L Lactoferrin enthielt.

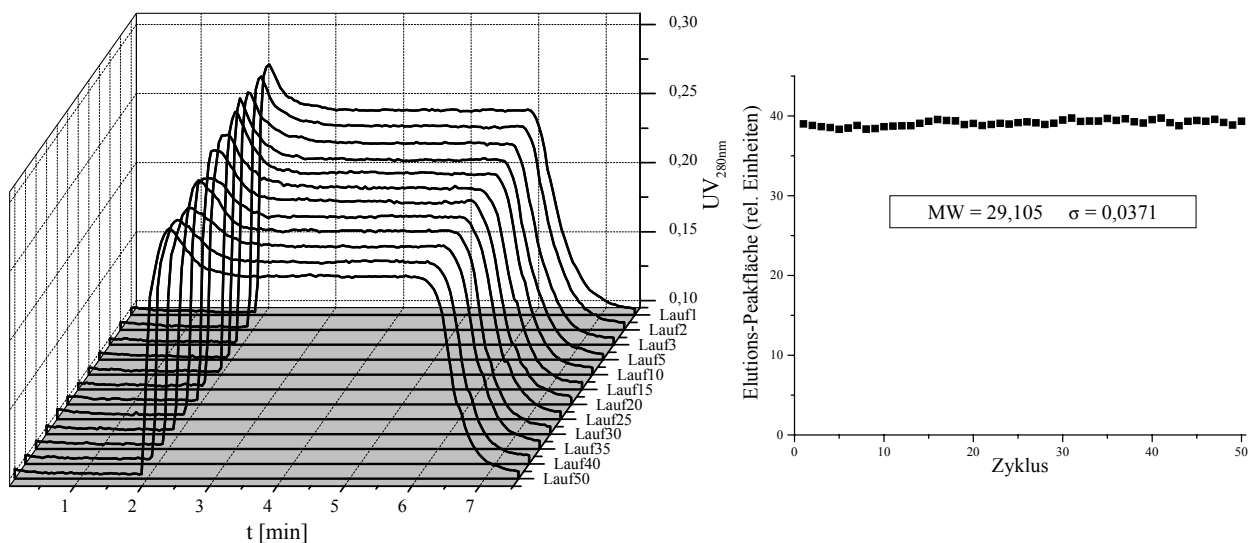


Abb. 4.30: links: Elutionsprofile eines Tests zur Langzeitstabilität mit 4,5 g/L Lactoferrin in 1 M NaCl als Eluent
rechts: Darstellung der Peakflächen der Lactoferrin-Elutionskurven

Es konnten 50 Auftrags-Zyklen hintereinander gefahren werden, ohne dass eine Reinigung notwendig war oder die Bindekapazität des Moduls abgenommen hat. Die Anzahl der fahrbaren Zyklen entspricht der bei den Versuchen zur Langzeitstabilität mit reinen NaCl-Lösungen (siehe Kapitel 4.2.1.4).

Diese Ergebnisse zur Mehrfachverwendung der Elutionslösung bedeuten einen großen ökonomischen Fortschritt im Lactoferrin-Gewinnungsverfahren (siehe Kapitel 4.5).

4.2.2 Up-Scaling auf 4 m²

In früheren Arbeiten zur Lactoferrin-Isolierung über Membranadsorber ist eine automatisierte Anlage mit 1 m² Membranfläche aufgebaut worden [WEISS, Dissertation 1999]. Nachdem das Problem der Vorreinigung der Molke mittels Crossflow-Mikrofiltration gelöst werden konnte, ist ein Up-Scaling durchgeführt worden. Hierfür wurde die etablierte Anlage umgerüstet. Die Membranfläche ist auf zwei parallel geschaltete 2 m²-Module der Sartobind Factor Two Family, Firma Sartorius, erweitert worden. Weiterhin wurde das Polysulfon-Gehäuse der alten Module durch einen Edelstahlmantel ausgetauscht, wodurch die Anlage druckstabiler wurde.

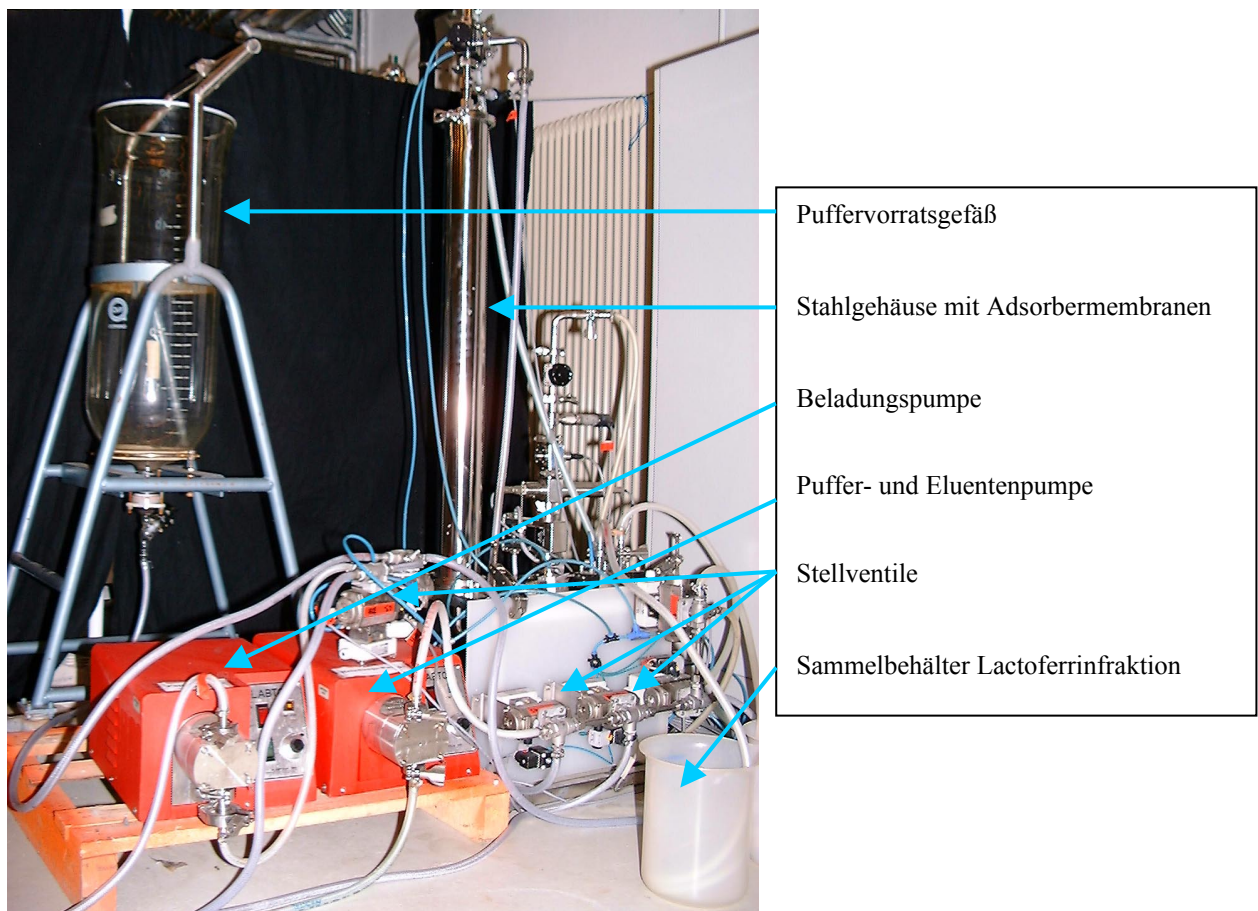


Abb. 4.31: Automatisierte 4 m²-Anlage zur Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat

Die nachstehende Abbildung zeigt eine Auftragung von Molkenpermeat aus der 1. Prozess-Stufe auf den Adsorber. Der Verlauf des Versuchs ist mittels UV-Messung, elektrischer Leitfähigkeitsmessung und Volumendurchflussmessgerät sowohl verfolgt als auch gesteuert worden.

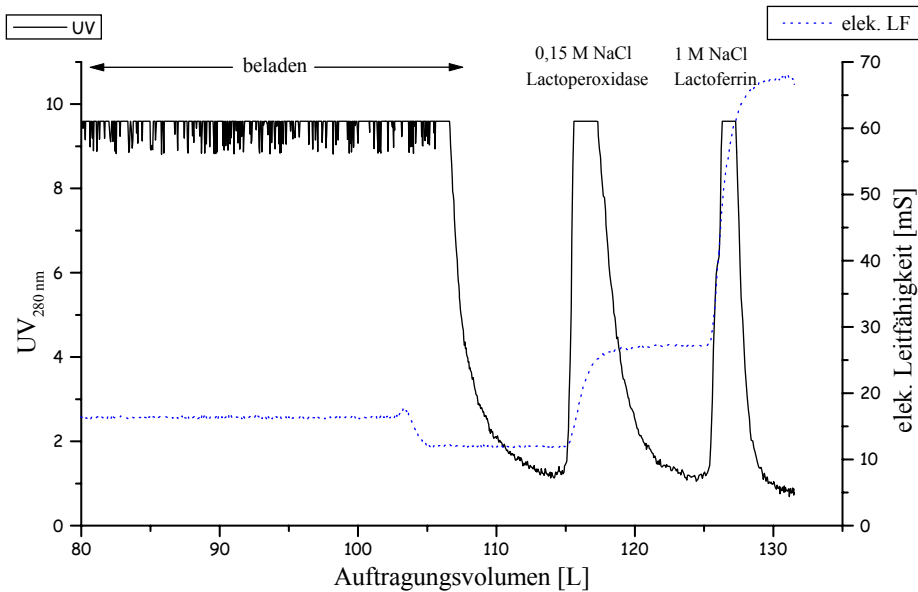


Abb. 4.32: Auftragungs-Zyklus an der automatisierten 4 m²-Membranadsorberanlage; Flussrate 8 L/min ($p_{\text{ein}}=2$ bar) [PLATE ET AL., 2002]

Es sind 105 L Molkenpermeat mit einer Auftragungsflussrate von 8 L/min (Eingangsdruck $p_{\text{ein}}=2$ bar) über die Adsorbermodule gepumpt worden. Anschließend ist mit 8 L Puffer gespült worden, um nicht gebundene Bestandteile aus der Anlage auszutragen und das UV-Signal abzusenken. Anschließend ist auf 0,15 M NaCl-Eluent umgestellt worden, um die gebundene Lactoperoxidase zu eluieren. Die Fraktion wird in dem Bereich, in dem das UV-Signal größer 2 ist, gesammelt, der Rest verworfen. Im Anschluss erfolgt nach gleichem Prinzip die Elution von Lactoferrin mit 1 M NaCl-Lösung.

Die Bindekapazität der 4 m²-Anlage für Lactoferrin beträgt 8 g pro Auftragung. Mittels HPLC-Messung wurde die Menge an Lactoferrin im 1 M NaCl-Eluat zu 7,04 g \pm 0,35 g bestimmt; das entspricht einer Ausbeute von 88 % \pm 4 %. Weitere 0,72 g \pm 0,04 g (9 %) Lactoferrin können in der Lactoperoxidasefraktion festgestellt werden. Die nicht auffindbaren restlichen 0,24 g (3 %) liegen im Rahmen der Fehlergrenze der HPLC-Analytik (siehe Kapitel 3.5.1). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen an Lactoferrin auf der Austauschermembran verblieben sind. Eventuell werden die Wickelmodule nicht optimal von den Eluenten überströmt, und es existieren Toträume in der Anlage. In Abbildung 4.33 ist die Durchbruchkurve für Lactoferrin während der Auftragung von Molkenpermeat auf den Membranadsorber dargestellt:

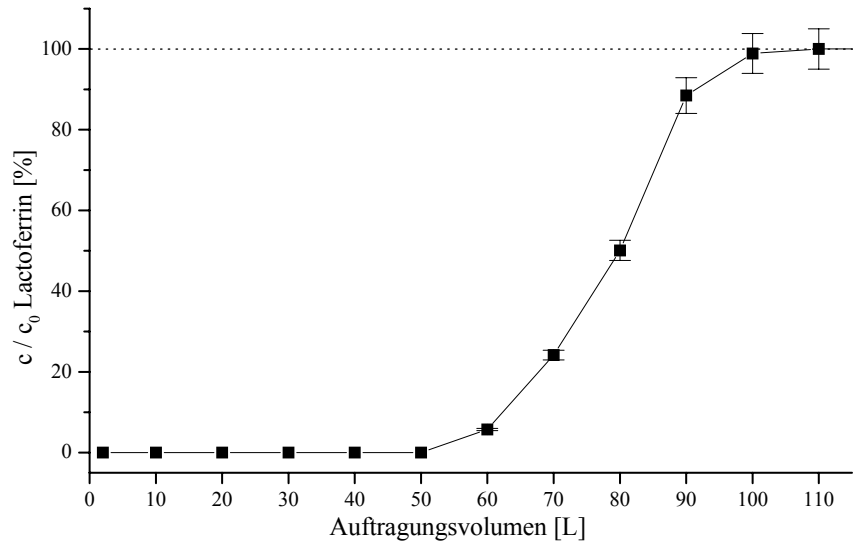


Abb. 4.33: Durchbruchkurve für Lactoferrin im Durchlauf der Auftragung auf die 4 m²-Adsorberanlage; bestimmt mit HPLC

Zur Aufnahme der Durchbruchkurve für Lactoferrin ist während der Auftragung alle 10 Liter eine Probe vom Durchlauf genommen und off-line mit HPLC der Lactoferringehalt gemessen worden. Während der ersten 50 Liter wird das Zielprotein zu 100 % von der Adsorbermembran gebunden. Dann steigt die Menge an Lactoferrin im Durchlauf stetig an und erreicht nach 105 Litern die Maximalkonzentration. Die Steigung der Durchbruchkurve kann noch erhöht werden, indem die Module hintereinander geschaltet werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass Lactoferrinmoleküle beide Module nacheinander passieren ohne zu binden, solange Bindeplätze an den Membranen unbesetzt sind, ist dann noch geringer. Der Nachteil der Serienschaltung der Module im Vergleich zur etablierten Parallelschaltung liegt im höheren Druckabfall entlang der Membranen und folglich einer abnehmenden Auftragsflussrate.

4.2.3 Direkte Kopplung von 1. und 2. Prozess-Stufe, reale Zyklenzahlen

Nachdem der Membranadsorber im 4 m²-Maßstab charakterisiert worden ist, sind die ersten zwei Prozess-Stufen miteinander gekoppelt worden. 1000 L Molke wurden in der ersten Prozess-Stufe zu 800 L Molkenpermeat verarbeitet. Der Lactoferringehalt des Permeates betrug 80 mg/L. Zur Auslastung der Kapazität des Adsorbers (8 g, s.o.) mussten daher jeweils 100 L Permeat pro Zyklus auf die Adsorberstufe aufgetragen werden. Der Verlauf der Auftragung ist wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben verfolgt und dokumentiert worden. Die folgende Tabelle zeigt die Bilanz der Adsorberstufe:

Tab. 4.06: Verarbeitung von 1 m³ Molke; Bilanz der zweiten Prozess-Stufe

	Permeat-Volumen [L]	Auftragungs-Flussrate [L/min]	bLF-Gehalt 1M-NaCl-Fraktion		bLF-Gehalt 0.15M-NaCl-Fraktion	
			[g]*	[%]	[g]*	[%]
A 1	100	8,5	7,116	88,95	0,544	7,80
A 2	100	7,5	7,001	87,51	0,020	0,25
A 3	100	6,8	7,115	88,94	0,062	0,78
A 4	100	6,1	7,070	88,38	0,010	0,13
A 5	100	5,7	6,518	81,48	0,006	0,08
A 6	100	5,4	5,619	70,24	0,016	0,20

* = bestimmt mit HPLC, Fehlertoleranz der Messungen 5 %

Die Lactoferrin-Ausbeuten der ersten 4 Zyklen liegen sehr konstant um 88 %. Ab dem 5. Zyklus nimmt die Menge an eluiertem Zielprotein deutlich ab. Im ersten Zyklus können 7,8 % des aufgetragenen Lactoferrins in der Lactoperoxidase-Fraktion detektiert werden. Die Wiederfindungsrate an Lactoferrin beträgt hier noch fast 100 %. Ab dem 2. Zyklus findet sich jedoch kaum noch Lactoferrin im 0,15 M-Eluat, ohne dass die Proteinmenge in der 1 M-Fraktion ansteigt. Auch konnte in den Durchläufen während der Auftragungen kein Lactoferrin nachgewiesen werden. Es muss demnach fest gebundenes Lactoferrin auf der Adsorbermembran verblieben sein. So entziehen sich in den Zyklen 2 - 4 durchschnittlich 11 % des aufgetragenen Lactoferrins der Bilanz, ab dem 5. Zyklus entsprechend noch mehr.

Die Auftragsflussrate fällt kontinuierlich während des Versuches. Dies beruht auf einer ständigen Zunahme des Gegendrucks der Adsorbermodule, woraufhin der Fluss aus Sicherheitsgründen heruntergeregelt werden musste. Abbildung 4.34 zeigt die Abhängigkeit von Flussrate und Druckanstieg:

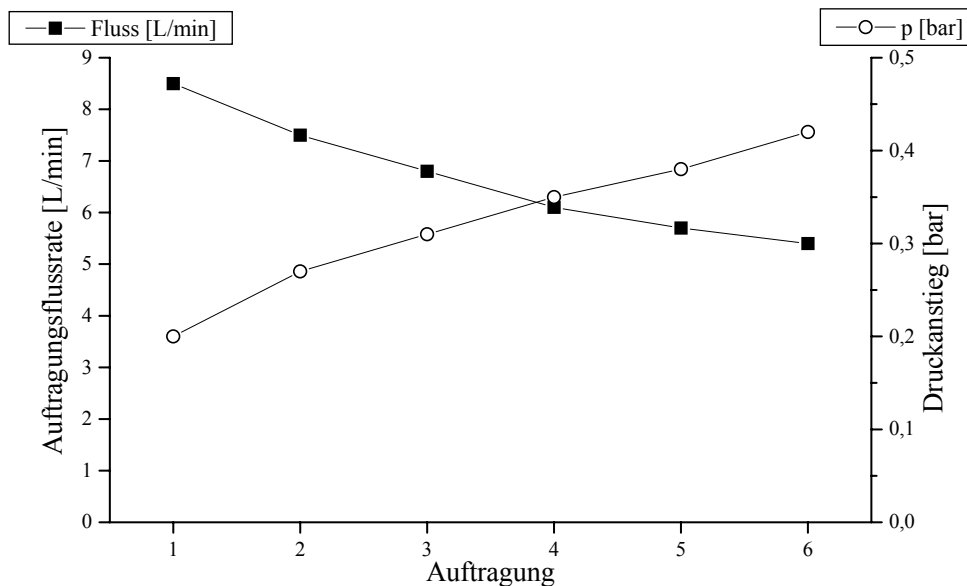


Abb. 4.34: Anstieg des Gegendruckes der Adsorbermodule und daraus resultierende Auftragsflussraten

Unter der Annahme, dass tatsächlich ein Teil des aufgetragenen Lactoferrins im Adsorber verbleibt und die Membranporen zunehmend verblockt, lässt sich das Druckverhalten der Anlage erklären. Auch die abnehmenden Lactoferrin-Ausbeuten sind danach nur eine logische Konsequenz: Die Austauscherplätze, die von irreversibel gebundenem Lactoferrin besetzt sind, stehen für weitere Adsorptionsprozesse nicht mehr zur Verfügung; die Adsorberkapazität sinkt.

Nach 6 Zyklen ist der Versuch abgebrochen worden. Bevor die Reinigungsprozedur für die zweite Prozess-Stufe begonnen wurde, ist der Versuch unternommen worden, das eventuell noch an den Adsorber gebundene Lactoferrin durch Spülen mit 2 M NaCl-Lösung zu eluieren. Es konnte in dieser Lösung jedoch kein Lactoferrin detektiert werden, auch der Fluss durch die Anlage blieb unverändert.

Ein weiteres Problem neben der sinkenden Lactoferrin-Ausbeute im Verlauf des Versuches ist der immer größer werdende Zeitaufwand. Je niedriger die Flussrate ist, desto länger dauert das Auftragen von 100 Litern Molkenpermeat. Die folgende Abbildung macht den Zeitverlust deutlich:

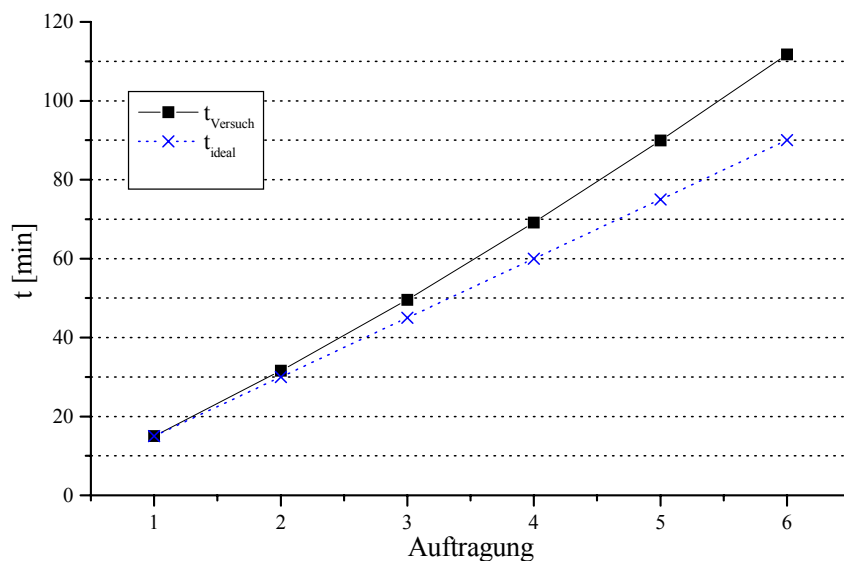


Abb. 3.35: Zeitbilanz für die zweite Prozess-Stufe; t_{versuch} = im Versuch benötigte Zeit für die Auftragungen; t_{ideal} = benötigte Zeit für die Auftragungen ohne Abfall der Auftragsflussrate

Bei einer konstanten Auftragungsgeschwindigkeit von 8,5 L/min hätten die 6 Auftragungen in 90 Minuten durchgeführt werden können. Tatsächlich sind fast 2 Stunden benötigt worden. Der Unterschied scheint nicht groß zu sein. Gerechnet in Dimensionen einer Anlage im Industriemaßstab und über lange Zeiträume hinweg ergibt sich jedoch ein hoher Verlust an Zyklen und somit an Produkt und Prozess-Rentabilität.

4.2.4 Reinigung

Es ist mit den gleichen Reagenzien gearbeitet worden wie bei der Mikrofiltration. Die Adsorbermembranen sind aufgrund ihres Aufbaus nicht rückspülfähig, daher konnte die effiziente Reinigungsmethode Nr. 4 aus der ersten Prozess-Stufe nicht übernommen werden (siehe Kapitel 4.1.4). Weiterhin war die Tatsache zu berücksichtigen, dass die Membranen in Abhängigkeit des sie durchströmenden Mediums verschiedene Quell-Zustände annehmen. Bei zu geringen Ionenstärken quellen die Membranen in dem Maße auf, dass die Porengröße abnimmt und damit mögliche Flussraten und Bindekapazitäten. Die folgende Abbildung zeigt das Verhalten auf:

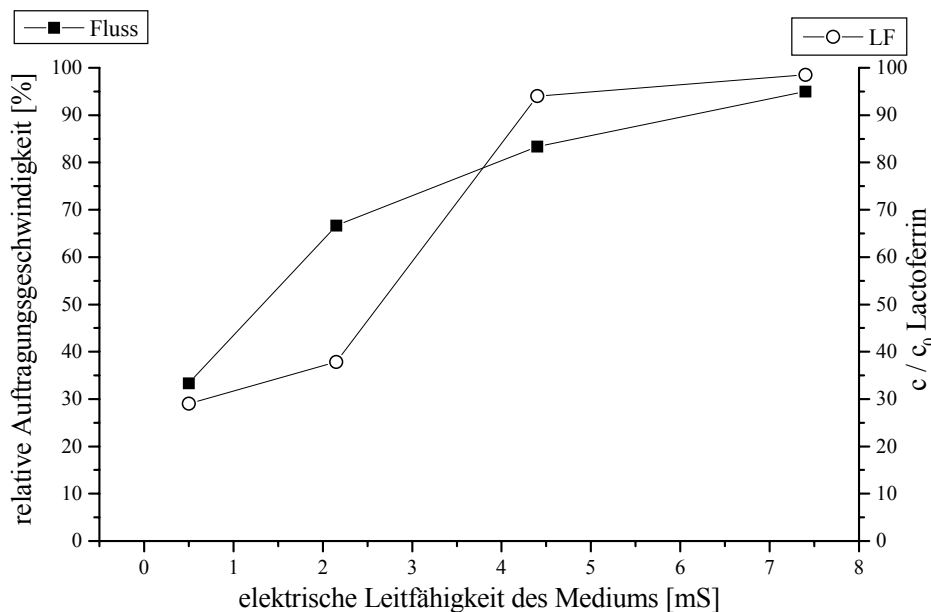


Abb. 4.36: Abhängigkeit von Auftragsflussrate und Bindekapazität für Lactoferrin von der elektrischen Leitfähigkeit des aufgetragenen Mediums

Molke besitzt eine Leitfähigkeit von ca. 7,5 mS und liegt damit in einem Bereich, wo hohe Bindekapazitäten und gute Durchflussverhältnisse gegeben sind. Medien mit elektrischen Leitfähigkeiten von unter 3 mS können nur mit niedrigen Flussraten gefahren werden. Die Membran quillt auf, die Poren werden kleiner, und der Fluss nimmt ab. Daher darf im Rahmen einer Reinigung nicht mit reinem Wasser gearbeitet werden, der Gegendruck der Anlage würde innerhalb von Sekunden stark ansteigen und der Fluss einbrechen. Es ist deshalb Natriumphosphat-Puffer 20 mM anstelle von Wasser verwendet worden. Auch der für die Beurteilung der Reinigung charakteristische Wasserwert wurde mit Pufferlösung aufgenommen.

Die Reinigungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei einer Betriebstemperatur von 20°C durchgeführt. Der Wasserwert lag vor einer Reinigung durchschnittlich bei 4,5 L/min. Die folgenden Prozeduren sind gefahren worden:

REINIGUNGSMETHODE NR. 1:

•	ausspülen mit Puffer	5 min	
•	Säure im Kreis gepumpt	10 min	
•	ausspülen mit Puffer	5 min	
•	Lauge im Kreis gepumpt	10 min	
•	ausspülen mit Puffer	5 min	Σ 35 min

REINIGUNGSMETHODE NR. 2:

•	ausspülen mit Puffer	5 min	
•	Lauge im Kreis gepumpt	10 min	
•	ausspülen mit Puffer	5 min	
•	Ultrasil P3-53 im Kreis gepumpt	10 min	
•	ausspülen mit Puffer	45 min	Σ 75 min

REINIGUNGSMETHODE NR. 3:

•	ausspülen mit Puffer	5 min	
•	Ultrasil P3-53 im Kreis gepumpt	10 min	
•	über Nacht einwirken lassen		
•	ausspülen mit Puffer	10 min	Σ ca. 14 h

REINIGUNGSMETHODE NR. 4:

•	ausspülen mit Puffer	5 min	
•	Säure im Kreis gepumpt	10 min	$T_{\text{HCl}} = 40^{\circ}\text{C}$
•	ausspülen mit Puffer	5 min	
•	Lauge im Kreis gepumpt	10 min	$T_{\text{NaOH}} = 40^{\circ}\text{C}$
•	ausspülen mit Puffer	5 min	
•	Lauge im Kreis gepumpt	10 min	$T_{\text{NaOH}} = 40^{\circ}\text{C}$
•	ausspülen mit Puffer	5 min	Σ 45 min

Die erste gefahrene Reinigungsmethode nimmt nur 35 Minuten Zeit in Anspruch. Es wurden ausschließlich Standard-Reagenzien verwendet. Der Aufreinigungseffekt war jedoch mit nur 80 % des Wasserwertes nicht ausreichend.

Bei der zweiten Methode ist auf den Einsatz von Säure als Reagenz verzichtet worden. Stattdessen ist nach einer Laugenspülung enzymatisches Reinigungsmittel eingesetzt worden. Dies führte zu einem großen Problem: Die Adsorberanlage war nicht luftdicht. Durch das Umpumpen der Flüssigkeit bildete sich Schaum, der nur schwer wieder aus dem System zu entfernen war. Daher war der Zeitaufwand dieser Prozedur entsprechend höher als für Reinigungsmethode Nr. 1. Der Wasserwert nach 75 Minuten betrug nur 75 %.

Der dritte Reinigungsversuch ist ohne Säure und ohne Lauge durchgeführt worden. Zunächst wurde Ultrasil P3-53 für 10 Minuten im Kreis gepumpt. Durch die anschließende Einwirkzeit über Nacht wurde das Schaum-Problem umgangen, da der Schaum ohne Umpumpen der Flüssigkeit innerhalb mehrerer Stunden in sich zusammenfällt. Der gemessene Wasserwert nach dem Ausspülen der Enzymlösung betrug 80 %.

Bei der vierten Reinigungsprozedur ist auf den Einsatz von enzymatischem Reinigungsmittel, dessen Einsatz zeitaufwändig ist (s.o.), verzichtet worden. Die eingesetzten Lösungen wurden im Vorfeld des Versuchs über einen Wärmetauscher auf 40°C erwärmt. Die ersten zwei Reinigungsschritte entsprechen denen der ersten Methode (s.o.). Durch die erhöhte Reaktionstemperatur wurden pro Reinigungsschritt 5 % höhere Flussraten erzielt, nach 35 Minuten lag der Wasserwert bei 90 %. Durch eine zweite Laugenspülung konnte die maximale Flussrate für 20 mM Natriumphosphatpuffer auf 8,5 L/min gebracht werden. Das entspricht einer Steigerung um nochmals 5 % auf insgesamt 95 %.

Es ist keine Reinigungsprozedur gefunden worden, die den Wasserwert zu 100 % wieder herstellt. Die besten Ergebnisse lieferte die Reinigungsmethode Nr. 4.

Eine Übersicht über die Effizienz der vier Reinigungsmethoden gibt die folgende Abbildung:

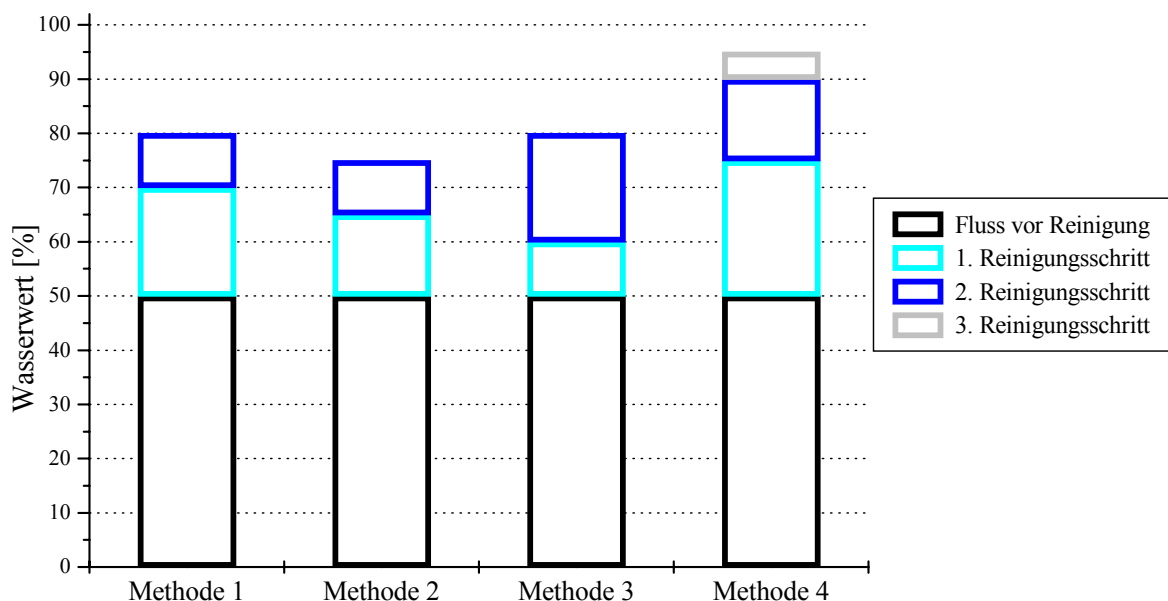


Abb. 4.37: Schematische Darstellung der Zunahme des Wasserwertes während der Reinigung

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 4.2 zur zweiten Prozess-Stufe lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Bedingungen, unter denen in früheren Arbeiten zur Lactoferrin-Isolierung gearbeitet wurde, konnten als ideale Versuchsbedingungen bestätigt werden. Die besten Ergebnisse wurden erzielt mit
 - 20 mM Natriumphosphat-Puffer
 - Natriumchloridlösung als Elutionsmittel
 - pH-Wert 7,0
- Mit idealen Lösungen können mindestens 45 Auftragungen direkt hintereinander ohne Reinigung unter konstanten Bedingungen gefahren werden.
- Die 1 M Natriumchlorid-Elutionslösungen können wiederholt verwendet werden. Lactoferrin-Konzentrationen bis 5 g/L im Eluenten sind möglich.
- Das Verhalten der 4 m²-Adsorberanlage mit Molkenpermeat als Auftragsmedium ist mit den Ergebnissen unter idealen Bedingungen nicht vergleichbar. Aus noch nicht geklärten Gründen verbleibt ein Teil des adsorbierten Lactoferrins auf der Membran und führt zur raschen Verblockung des Systems.
- Es ist eine Reinigungsmethode entwickelt worden, die den Wasserfluss nach Versuchsende zu 95 % wieder herstellt.

4.3 3. Prozess-Stufe: Lactoferrin-Gewinnung aus den Eluaten

Nach der zweiten Prozess-Stufe liegt das aus Molkenpermeat isolierte Lactoferrin in 1 M Natriumchloridlösung vor. In einem ersten Aufarbeitungsschritt wird das Salz aus der Proteinlösung entfernt; dies wird durch eine Ultra-/Diafiltration erreicht. Die entsalzte, aufkonzentrierte Lactoferrinlösung muss anschließend nur noch getrocknet werden, bis das Protein als feines braunrotes Pulver vorliegt.

4.3.1 Ultrafiltration

Pro Elution von der 4 m²-Anlage fallen etwa 7 g Zielprotein in 7 Litern einer 1 M Salzlösung an. Bei sechs gefahrenen Auftragungen entspricht das einer Gesamtmenge von 42 L (siehe Kapitel 4.2.3). Die Ultrafiltration ist an einer LabStak20-Kompaktanlage der Firma Danish Separation Systems durchgeführt worden (siehe Abb. 4.38 und Kapitel 3.3.1). Es wurde mit drei Flachmembran-Einheiten zu je 0,036 m² gearbeitet. Dabei handelte es sich um Celluloseacetat-Membranen derselben Firma mit einem MWCO von 10 kDa. Nachdem die Proteinlösung bis auf

5 Liter aufkonzentriert worden war, ist auf Diafiltration umgestellt worden, d.h. das Volumen der Lactoferrinlösung im Vorlagebehälter ist durch Zugabe von dest. Wasser konstant auf 30 L gehalten worden. Der Grad der Entsalzung wurde durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit verfolgt. Ab einer Leitfähigkeit von weniger als 1 mS ist wieder ultrafiltriert und die Lösung dadurch auf 5 Liter aufkonzentriert worden. Den Verlauf der Entsalzung zeigt Abbildung 4.39.

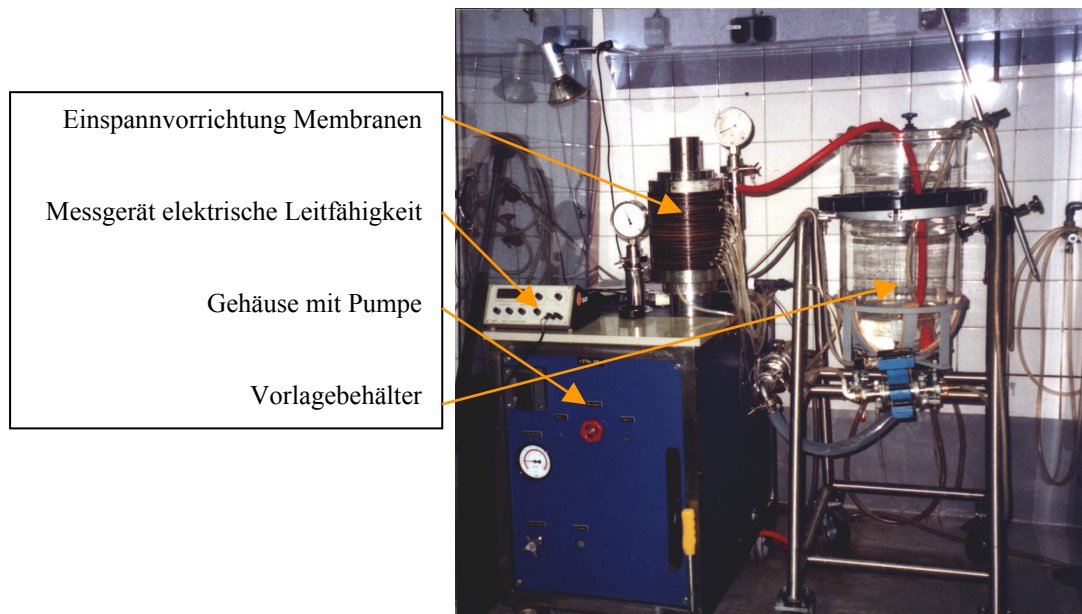


Abb. 4.38: Verwendete LabStak20-Kompaktanlage zur Ultra-/Diafiltration; Firma Danish Separation Systems

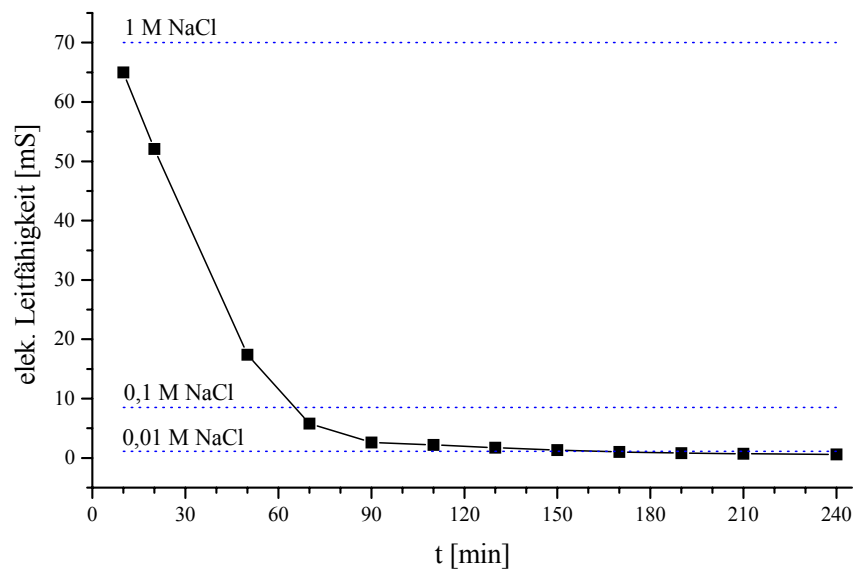


Abb. 4.39: Verlauf der Entsalzung von ca. 42 Litern 1 M NaCl-Eluat aus der zweiten Prozess-Stufe; Membranfläche 0,108 m²; MWCO 10 kDa; Überströmung 850 L/h; mittlerer Permeatfluss 40 L/h

Innerhalb von 4 Stunden konnten die gesammelten 1 M NaCl-Eluate entsalzt und aufkonzentriert werden. Der Permeatfluss sank über die Versuchszeit hinweg von anfangs 50 L/h auf 30 L/h während der letzten Aufkonzentrierungsphase. Die Lactoferrinlösung verursachte starkes Fouling

auf den Membranen. Nach Ausstoß aus der Anlage wurde ein Verlust an Protein von 6 % mittels HPLC-Messung festgestellt.

Die LabStak20 mit den Celluloseacetat-Membranen wurde für die Entsalzung eingesetzt, weil sie vor Ort und einsatzbereit war. Eine Optimierung der Ultrafiltration ist nicht durchgeführt worden. Sowohl die Zeit- als auch die Lactoferrin-Bilanz könnten erwartungsgemäß durch weitere Forschungsarbeiten noch deutlich verbessert werden. Ein weiteres zukünftiges Arbeitsfeld stellt die Wiederaufbereitung der Natriumchloridlösungen dar, die auf der Permeatseite der Ultrafiltration anfallen.

4.3.2 Gefriertrocknung

Zur Trocknung der konzentrierten entsalzten Proteinlösung ist eine Liophylle verwendet worden. Die Lactoferrinlösung wurde tiefgefroren und das enthaltene Wasser in dem Gerät unter Vakuum abgezogen. Der Vorteil dieser Methode liegt einerseits darin begründet, dass keine Produktverluste auftreten. Weiterhin ist es eine schonende Methode, in der das Protein keinem thermischen Stress ausgesetzt wird.

Für den großtechnischen Prozess ist die Sprühtrocknung die Methode der Wahl, da sie deutlich preiswerter ist. Bei dieser Technik wird die Lösung durch eine Düse in feinen Tröpfchen in einen Reaktionsraum gesprüht, im warmen Luftstrom getrocknet und in einem Zyklon gesammelt. Geeignet für die Sprühtrocknung sind nur Lösungen mit mindestens 5 % Trockenmasse. Bei geringeren Feststoffanteilen besteht die Gefahr, dass das Produkt mit der feuchten Warmluft aus dem Zyklon ausgetragen wird. Im Gegensatz zur Gefriertrocknung kann es also bei dieser Technik zu Produktverlusten kommen. Ausserdem wird mit Betriebstemperaturen von mindestens 50°C gearbeitet, was bei Proteinen zur Denaturierung führen kann. Eine Sprühtrockner-Anlage stand für diese Arbeit leider nicht zur Verfügung.

4.4 Qualitätskontrolle

Das gewonnene Lactoferrin ist sowohl auf seine Reinheit als auch auf seine biologische Aktivität hin untersucht worden.

4.4.1 Reinheitskontrolle

Zur Reinheitskontrolle sind **M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onization - **M**ass **S**pektrometry- (MALDI-MS) Messungen durchgeführt worden. Diese speziell für Makromoleküle entwickelte Form der Massenspektrometrie ist sehr sensitiv (Nachweisgrenze im Femtomol-Bereich) und daher zum Nachweis eventueller Verunreinigungen gut geeignet. Im Rahmen früherer Arbeiten ist

eine optimale Methode zur Qualitätskontrolle des Endproduktes im Lactoferrin-Gewinnungsprozess entwickelt worden [WALDEN, 1999]. Proben des gewonnenen Lactoferrins wurden in dest. Wasser gelöst und mit einem MALDI-MS-Kompaktgerät vermessen (siehe Kapitel 3.4.1). Das Spektrum einer solchen Messung zeigt Abbildung 4.40:

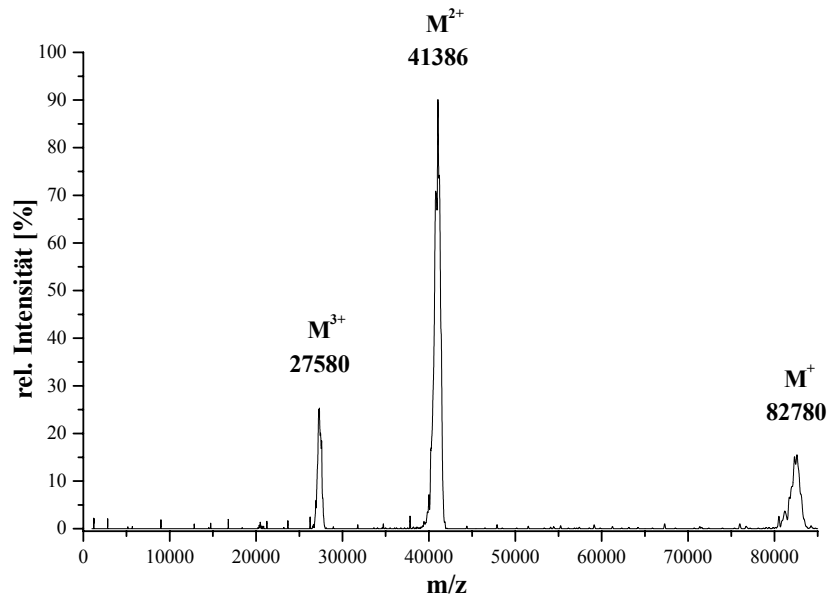


Abb. 4.40: MALDI-MS-Spektrum einer in dest. Wasser gelösten Probe von gefriergetrocknetem Lactoferrin; Matrix: α -Cyano-Zimtsäure 15 g/L; Beschleunigungs-Spannung 15 kV; 50 Einzelschüsse; Probenkonzentration 1 mg/mL

Das gewonnene Protein besitzt eine Masse von knapp 82,8 kDa. Die Detektion von Molekülen der Proben erfolgt bei MALDI-MS nach Masse:Ladung. Bei dem Peak mit der größten Intensität bei 41386 Da handelt es sich um keine Substanz entsprechender Molmasse, sondern um das Signal des zweifach geladenen Lactoferrin-Moleküls. Auch das Signal bei 27580 Da lässt sich Lactoferrin zuordnen. Abgesehen von einem für diese Form der Massenspektrometrie typischen Grundrauschen mit relativen Intensitäten von $< 5\%$ sind keine weiteren Peaks im Spektrum zu erkennen. Auch Lactoperoxidase (Molmasse 78431, [HERANDEZ et al., 1990]), das am ehesten als Nebenbestandteil im Endprodukt des Prozesses zu erwarten wäre, lässt sich nicht detektieren.

Das Endprodukt des entwickelten Lactoferrin-Gewinnungsprozesses weist also einen hohen Reinheitsgrad auf.

4.4.2 Biologische Aktivität des Produktes

Bei der Gewinnung und/oder Verarbeitung von Proteinen müssen extreme Reaktionsbedingungen, wie z. B. hohe Temperaturen oder pH-Werte, vermieden werden. Sowohl thermischer als auch mechanischer Stress führen bei diesen Makromolekülen mit vielen reaktiven Bindungen zum Zerfall (saure bzw. basische Hydrolyse) oder zur Denaturierung (Veränderung der räumlichen Struktur des Proteins). Die Veränderung der nativen Struktur ist bei den meisten Proteinen mit

dem Verlust der biologischen Aktivität verbunden. Dem großen Interesse an Lactoferrin liegen seine biologische Aktivität und seine daraus resultierenden antimikrobiellen, antiviralen und immunoregulatorischen Eigenschaften zugrunde. Denaturiert das Protein während des Gewinnungsprozesses, so ist das Endprodukt wertlos. Daher ist das isolierte und gefriergetrocknete Lactoferrin einer Kontrolle seiner biologischen Aktivität unterworfen worden. Hierfür ist in früheren Arbeiten ein Hemmtest mit einem Lactoferrin-sensitiven Mikroorganismus, *Bacillus subtilis* DSM 10, entwickelt worden [WALDEN, 1998; PLATE, 1999]. Es wurden Kulturen von *Bacillus subtilis* mit Lactoferrin in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und das Wachstum dieser Kulturen durch optische Dichtemessung über mehrere Stunden verfolgt (siehe Kapitel 3.4.2). Der Hemmtest ist sowohl mit selbst isoliertem als auch zum Vergleich mit handelsüblichem Lactoferrin der Firma Morinaga Milk Industries, Japan, durchgeführt worden. Die Ergebnisse des Vergleichstests dokumentiert die folgende Abbildung:

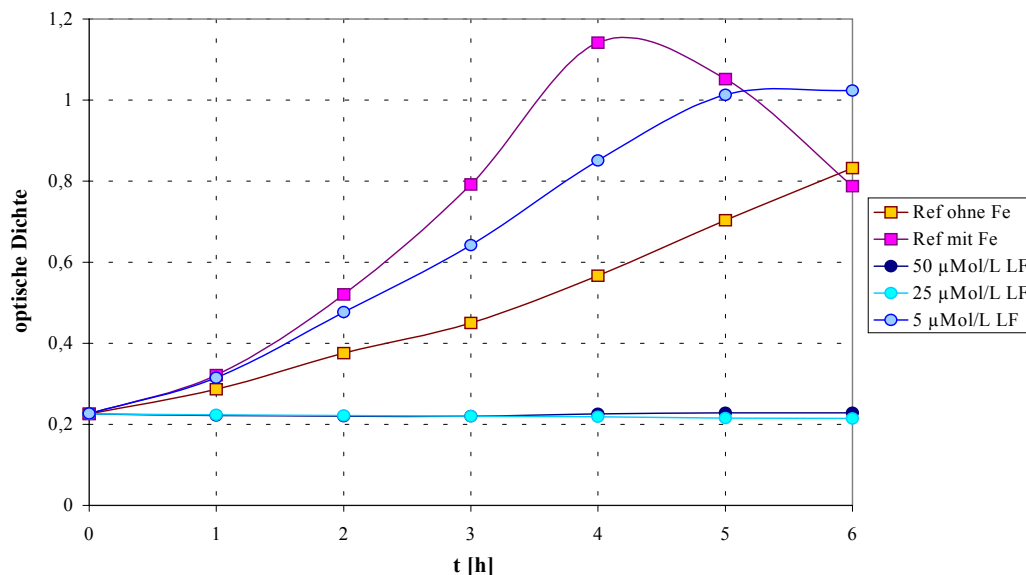


Abb. 4.41: Wachstumskurven des Hemmtests mit handelsüblichem Lactoferrin; verwendeter Mikroorganismus: *Bacillus subtilis* DSM 10 [PLATE 1999]

Es sind zwei Referenz-Kulturen vermessen worden, denen kein Lactoferrin zugesetzt worden ist. Das Nährmedium einer Referenzkultur war eisenhaltig. In beiden Kulturen stieg die optische Dichte über den Versuchszeitraum von 6 Stunden hinweg an, dabei wuchs der Mikroorganismus in der eisenhaltigen Kultur erwartungsgemäß deutlich schneller. Zeitgleich wurden drei Kulturen mit unterschiedlichen Mengen an Lactoferrin versetzt und vermessen. In Abbildung 4.41 ist deutlich zu erkennen, dass Lactoferrin in den zwei höheren Konzentrationen von 50 µmol/L und 25 µmol/L das Bakterienwachstum vollständig hemmt. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Literatur [TOMITA, 1994], nach der die minimale Hemmkonzentration von Lactoferrin bei 20 µmol/L liegt. Dagegen wirkt die niedrigste eingesetzte Protein-Konzentration von 5 µmol/L nicht nur nicht hemmend, sondern hat sogar einen positiven Einfluss auf das Bakterienwachstum.

Dieser Umstand ist bereits in früheren Arbeiten erwähnt worden [WALDEN, 1998; PLATE, 1998]. Der gleiche Test ist mit Lactoferrinproben aus dem entwickelten Gewinnungsprozess durchgeführt worden. Den Verlauf des Versuchs zeigt Abbildung 4.42:

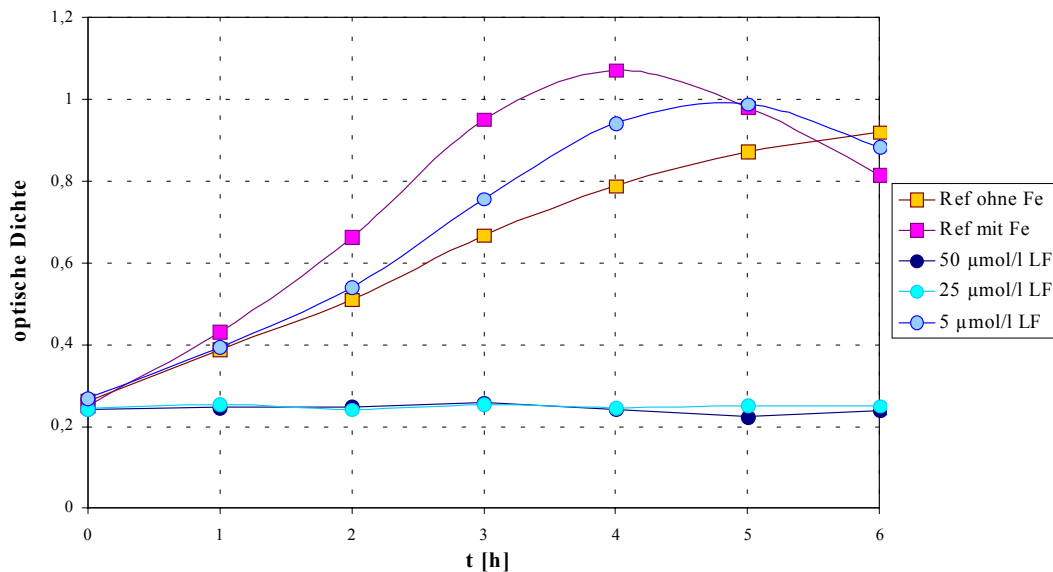


Abb. 4.42: Wachstumskurven des Hemmtests mit selbst isoliertem und gefriergetrockneten Lactoferrin; verwendeter Mikroorganismus: *Bacillus subtilis* DSM 10

Dieser Test liefert die gleichen Ergebnisse wie der vorige Test mit handelsüblichem Lactoferrin. Wieder hemmt das Protein in höherer Konzentration (50 µmol/L und 25 µmol/L) das Bakterienwachstum, während die Kultur mit 5 µmol/L Lactoferrinzusatz sogar schneller anwächst als die Eisen- und Lactoferrinfreie Referenzkultur.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass

- das Endprodukt des entwickelten Gewinnungsprozesses eine hohe Reinheit besitzt.
- in Übereinstimmung mit der Literatur (s.o.) Lactoferrin-Konzentrationen ab 25 µmol/L das Wachstum des Mikroorganismus vollständig unterbinden. Das Endprodukt des entwickelten Gewinnungsprozesses verfügt über seine volle biologische Aktivität.

4.5 Prozess-Rentabilität: Kostenabschätzung und Prozessbewertung

Ein neu entwickelter Prozess ist für die Industrie nur interessant, wenn die Anlage rentabel gefahren werden kann, d.h. die Gesamtkosten für das Produkt müssen deutlich unter den erzielbaren Einnahmen liegen. Daher ist für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Technik zur Lactoferrin-Isolierung eine Kostenabschätzung durchgeführt worden. Diese Rechnung zeigt zum einen auf, welche Bestandteile des Prozesses die höchsten Kosten verursachen und wo weitere Optimierungs-Arbeit somit am notwendigsten ist. Zum anderen ist ein Vergleich der Rentabilität mit alternativen Technologien zur Isolierung von Lactoferrin möglich.

4.5.1 Kostenabschätzung

Sowohl die Vorbehandlung der Molke (Kapitel 4.1) als auch die Aufbereitung der lactoferrinhaltigen Eluate (Entsalzung und Trocknung, Kapitel 4.3) sind bei dieser Kostenabschätzung nicht berücksichtigt worden. Diese zwei Prozess-Schritte sind unabhängig von der Methode der Lactoferrin-Isolierung notwendig und stellen somit feste Kostenfaktoren in jeder Prozess-Bilanz zur Lactoferrin-Gewinnung dar.

Die folgenden Betriebsparameter sind der Berechnung zugrundegelegt worden. Die Betriebszeiten der Anlage entsprechen den Arbeitsbedingungen des molkenverarbeitenden Projektpartners Biolac, Harbarnsen, Deutschland:

- Betriebszeit / Tag: 24 h (20 h Protein-Isolierung, 4 h Reinigung)
- Betriebszeit / Jahr: 300 Tage
- Beladungsflussrate: 23 L/min (Eingangsdruck $p_{\text{ein}}=7$ bar) *
- Zykluszeit: 3,5 min *

* Angaben der Herstellerfirma des Membranadsorber-Systems Sartorius AG

Zunächst sind die Chemikalienmengen kalkuliert worden, die für die Elutionslösungen einer Adsorber-Anlage mit $2 \cdot 4 \text{ m}^2$ Austauschfläche benötigt werden. Eine solche Zwillings-Anordnung zweier Austauscher-Einheiten erlaubt kontinuierlichen Betrieb, wobei im ständigen Wechsel eine Einheit beladen wird, während von der anderen Einheit das gebundene Protein eluiert werden kann. Abbildung 4.43 zeigt den Aufbau einer solchen Zwillings-Anlage:

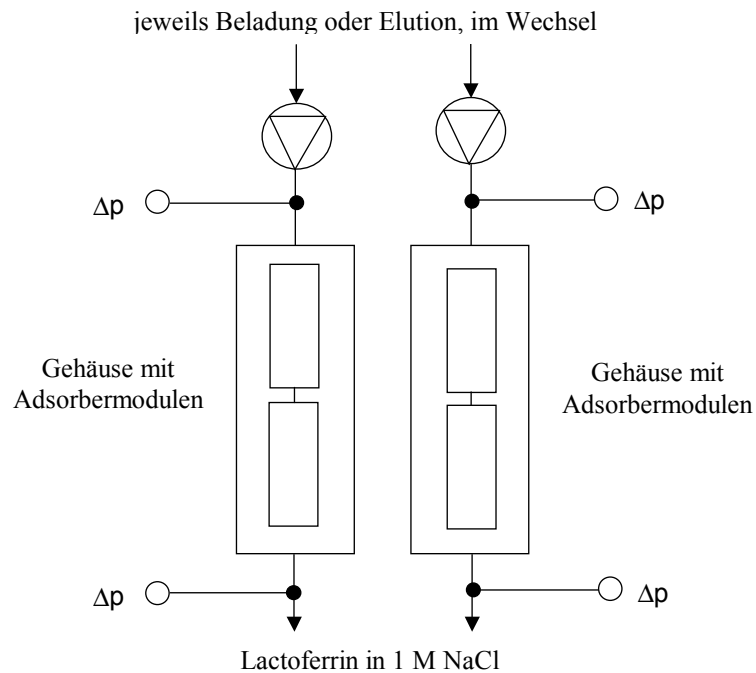


Abb. 4.43: Aufbau einer kontinuierlich betriebenen Adsorber-Anlage nach dem Zwillings-Prinzip [PLATE ET AL., 2002]

Jede dieser zwei Einheiten besitzt eine Fläche von 4 m^2 ; das entspricht der in Kapitel 4.2.2 diskutierten Anlage. Zur Elution des Nebenproduktes Lactoperoxidase mit $0,15 \text{ M}$ Natriumchlorid-Lösung wurden 9 L Elutionslösung benötigt. Anschließend ist das Lactoferrin in 7 L 1 M Salzlösung eluiert worden. Die pro Zyklus eingesetzte Menge an 20 mM Natriumphosphatpuffer betrug 16 L . Die Ausbeute an Lactoferrin lag bei $7,04 \text{ g}$ (88% , siehe Kapitel 4.2.2 und 4.2.3). Die nachstehende Tabelle zeigt den Bedarf an Wasser, Elutions- und Puffersalz unter den oben genannten Betriebsbedingungen:

Tab. 4.07: Wasser-, Elutions- und Puffersalz-Verbrauch einer 8 m^2 -Zwillingsanlage

	H_2O	NaCl	NaH_2PO_4	Na_2HPO_4
Zyklus (3,5 min)	32 L	0,49 kg	0,05 kg	0,057 kg
Stunde	544 L	8,33 kg	0,85 kg	0,97 kg
Tag (20 h)	$10,8 \text{ m}^3$	166,6 kg	17 kg	19,38 kg
Jahr (300 Tage)	3264 m^3	50 t	5,1 t	5,8 t

Die Prozesslinie des Projektpartners verarbeitet 100.000 m^3 Molke pro Jahr. Der hier entwickelte Lactoferrin-Gewinnungsprozess soll in diese Prozesslinie integriert bzw. vorgeschaltet werden (siehe Kapitel 4.1, Abbildung 4.01). Die für die zweite Prozess-Stufe benötigte Filterfläche berechnet sich wie folgt:

- anfallende Molke pro Jahr (s.o.): 100.000 m³
- auftragungsfähiges Permeat pro Jahr: 80.000 m³ (siehe Kapitel 4.1.2)
- ⇒ auftragungsfähiges Permeat pro Stunde: 13,33 m³
- Adsorberfläche für 80 L/3,5 min: 8 m²
- ⇒ Adsorberfläche für 1360 L/h: 8 m²
- **benötigte Adsorberfläche für 13,33 m³/h: 80 m²**

Eine Adsorberanlage mit einer Membranfläche von 80 m², kontinuierlich betrieben als Zwillingsanlage, ist also notwendig, um die in Harbarnsen täglich angelieferte Molke verarbeiten zu können. Die Chemikalienmengen für die Elutionslösungen aus Tabelle 4.07 müssen somit verzehnfacht werden, weiterhin werden die Reinigungssubstanzen Natronlauge und Zitronensäure benötigt. Die folgende Tabelle zeigt alle Reagenzien, die zum Betreiben der Adsorberanlage gebraucht werden, sowie ihre in der Berechnung zugrundegelegten Preise:

Tab. 4.08: Verwendete Reagenzien und Preise *

Reagenz	Preis *
Natriumchlorid	281 € / t
Natriumdihydrogenphosphat	2500 € / t
Dinatriumhydrogenphosphat	2500 € / t
Natronlauge	102 € / t (50%ige Lösung)
Zitronensäure	1000 € / t
Wasser	4 € / m ³ inklusive Abwasserkosten **

* bulk prizes = Großhandelspreise; Quelle: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

** geschätzter, regional sehr unterschiedlicher Wert

Die folgende Aufstellung fasst noch einmal alle Parameter zusammen, auf denen die Kostenabschätzung basiert:

- Jahreskapazität Adsorber: 100.000 t Molke bzw 80.000 t Molkenpermeat
- Auslegung / Membranfläche: 2·40 m² Zwillingsanlage / 80 m²
- Beladung je 40 m² pro Zyklus: 800 L Molkenpermeat
- Beladungs-/Elutionszeit: 3,5 min
- Betriebsstunden / Tag: 20 h Protein-Isolierung, 4 h Reinigung
- Betriebstage / Jahr: 300 Tage

Die Tabelle 4.09 zeigt den Verbrauch einer solchen Anlage an Chemikalien und Wasser:

Tab. 4.09: Wasser- und Chemikalienbedarf einer 80 m²-Zwillingsanlage

pro Zyklus (3,5 min)	NaCl	4,9 kg
	NaH ₂ PP	500 g
	Na ₂ HPP	570 g
	H ₂ O	320 L
pro Tag (20h, 340 Zyklen)	NaCl	1.666 kg
	NaH ₂ PO ₄	170 kg
	Na ₂ HPO ₄	194 kg
	H ₂ O	109 m ³
pro Jahr (300 Tage)	NaCl	500 t
	NaH₂PO₄	51 t
	Na₂HPO₄	58 t
	H₂O	32.700 m³
Reinigung pro Tag 4 h, je 30min Säure und Lauge	NaOH (5%)	800 L 5% = 80 L 50%
	Zitronensäure (0,5 M)	800 L 0,5 M = 84 kg
	H ₂ O	1520 L
Reinigung pro Jahr	NaOH	24 m³ 50%
	Zitronensäure	25 t
	H₂O	456 m³

Aus diesen Bedarfsmengen ergeben sich unter Berücksichtigung von Tabelle 4.08 die folgenden Gesamtkosten für Wasser und Chemikalien pro Jahr:

- NaCl 140.500 €
 - NaH₂PO₄ 127.500 €
 - Na₂HPO₄ 145.500 €
 - NaOH 50%ige Lösung 2.500 €
 - Zitronensäure 25.000 €
 - Wasser 132.500 €
- 573.500 €**

Der Ertrag an Zielprotein aus dieser 80 m²-Adsorberanlage beträgt:

- pro Zyklus (3,5 min) 0,07 kg
- pro Tag (20 h, 340 Zyklen) 23,8 kg
- **pro Jahr (300 Tage) 7.140 kg**

Eine komplette Kostenrechnung beinhaltet neben den laufenden Kosten für Wasser und Chemikalien weitere Faktoren wie Anschaffungs-, Manpower- und Energiekosten. Eine erweiterte Jahresbilanz für die 80 m²-Adsorberanlage auf der Basis von Schätzwerten lautet:

FIXKOSTEN	- Abschreibung (10% linear über 10 Jahre)	51.000 € *
	- Zinsen	15.300 € **
	- Wartung	10.200 € ***
		<u>76.500 €</u>
VARIABLE KOSTEN	- Membranmodule (Listenpreis)	205.000 € *
	- Elutionssalze (NaCl, Puffer)	413.500 €
	- Wasser	132.500 €
	- Energie (18000 kW)	2.500 € *
	- Reinigungs-Substanzen	27.500 €
	- Manpower	76.500 € *
		<u>857.500 €</u>
GESAMTKOSTEN = FIXKOSTEN + VARIABLE KOSTEN		<u>934.000 €</u>
COSTS/UNIT (GESAMTKOSTEN / KG LACTOFERRIN)		<u>130,80 €/kg</u>

* Quelle: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

** entsprechend 3 % des Gesamtpreises der Anlage

*** entsprechend 2 % des Gesamtpreises der Anlage

Auch wenn diese Zahlen keine exakten Angaben darstellen, zeigt die obige Kostenaufstellung deutlich, dass die variablen Kosten viel größeren Einfluss auf den späteren Verkaufspreis des Endproduktes haben als die Fixkosten. Die benötigte Energie belastet die Prozessbilanz am wenigsten. Den kostenintensivsten Posten stellen die Salze zur Elution dar. Hier liegt der wichtigste Ansatzpunkt für Optimierungsarbeiten.

Im Kapitel 4.2.1.5 ist die Möglichkeit der mehrfachen Verwendung von Elutionslösungen aufgezeigt worden. Bei einem Langzeittest wurde 1 M-Natriumchloridlösung, die 4,5 g/L Lactoferrin enthielt, erfolgreich zur erneuten Elution des Zielproteins von der Adsorbermembran eingesetzt. Es kann also angenommen werden, dass Lactoferrin-Konzentrationen von mindestens 5 g/L in den Elutionslösungen toleriert werden. Bei den Versuchen im großtechnischen Maßstab mit der

4 m²-Adsorberanlage wurden zur Elution von 7 g Lactoferrin 7 L 1 M-Natriumchloridlösung benötigt (siehe oben und Kapitel 4.2.2), das entspricht einer Proteinkonzentration von 1 g/L. Ausgehend von der Tatsache, dass bei jeder Elution die Lactoferrinkonzentration in der Elutionslösung um 1 g/L ansteigt, können die Elutionslösungen mindestens fünfmal eingesetzt werden. Dieser Umstand senkt nicht nur die Kosten für die Elutionssalze deutlich, auch die benötigte Wassermenge verringert sich. Der reduzierte Bedarf an Wasser und Chemikalien unter Berücksichtigung der Mehrfach-Elution berechnet sich wie folgt:

Tab. 4.10: Wasser- und Chemikalienbedarf einer 80 m²-Zwillingsanlage, inkl. 5fach-Elution

pro Zyklus (3,5 min)	NaCl	4,9 kg
	NaH ₂ PO ₄	500 g
	Na ₂ HPO ₄	570 g
	H ₂ O	320 L
pro Tag (20h, 340 Zyklen)	NaCl	334 kg
	NaH ₂ PO ₄	102 kg
	Na ₂ HPO ₄	116,5 kg
	H ₂ O	65,5 m ³
pro Jahr (300 Tage)	NaCl	100 t
	NaH₂PO₄	30,6 t
	Na₂HPO₄	35 t
	H₂O	19.650 m³
Reinigung pro Tag je 4 x 30min	NaOH (5%)	800 L 5% = 80 L 50%
	Zitronensäure (0,5 M)	800 L 0,5 M = 84 kg
	H ₂ O	720 L + 800 L
Reinigung pro Jahr	NaOH	24 m³ 50%
	Zitronensäure	25 t
	H₂O	216 m³ + 240 m³

Die reduzierten Bedarfsmengen führen zu niedrigeren Gesamtkosten an Chemikalien pro Jahr:

- NaCl 28.000 €
- NaH₂PO₄ 76.500 €
- Na₂HPO₄ 87.500 €
- NaOH 50%ige Lösung 2.500 €
- Zitronensäure 25.000 €
- Wasser 80.500 €

300.000 €

Die alternative komplette Kostenabschätzung ergibt sich zu:

FIXKOSTEN	- Abschreibung (10% linear über 10 Jahre)	51.000 €
	- Zinsen	15.300 €
	- Wartung	10.200 €
		<u>76.500 €</u>
VARIABLE KOSTEN	- Membranmodule	205.000 €
	- Elutionssalze (NaCl, Puffer)	192.000 €
	- Wasser	80.500 €
	- Energie (18000 kW)	2.500 €
	- Reinigungs-Substanzen	27.500 €
	- Manpower	76.500 €
		<u>584.000 €</u>
GESAMTKOSTEN = FIXKOSTEN + VARIABLE KOSTEN		<u>660.500 €</u>
COSTS/UNIT (GESAMTKOSTEN / KG LACTOFERRIN)		<u>92,50 €/kg</u>

Im Vergleich zur ersten Kostenabschätzung ohne Fünffachelution können unter der Rubrik variable Kosten die Aufwendungen für Elutionssalze um 221.500 € und für Wasser um 52.000 € gesenkt werden; das entspricht einer Kostenreduktion von über 30 %. Die Gesamtkosten pro kg Lactoferrin sinken durch die Berücksichtigung der Fünffachelution um 38,3 € bzw. 29 %.

Diese Kostenrechnung unterstützt die Entwicklung sinnvoller Strategien bezüglich weiterer Optimierungsarbeiten, liefert jedoch keine exakten Daten. Von den hochgerechneten Wasser- und Abwasserkosten bis hin zum Kostenfaktor Manpower handelt es sich um gemeinsam mit den Projektpartnern Sartorius AG und Biolac erarbeitete Schätzwerte. Die Verblockungs- und Reinigungsprobleme, die bei dem Betreiben der 4 m²-Adsorberstufe aufgetreten sind (siehe Kapitel 4.2.3 und 4.2.4), wurden nicht berücksichtigt. Die Kostenabschätzung ist unter der Voraussetzung weiterer Optimierungsarbeiten zu diesen derzeit noch ungelösten Problemen erstellt worden.

4.5.2 Kostenvergleichsrechnung und Prozessbewertung

Es existieren weltweit bereits grosstechnische Produktionsanlagen zur Gewinnung von Lactoferrin aus Molke. Die Isolierung des Proteins wird in diesen Anlagen nicht mittels Membrantechnik, sondern unter Einsatz von Chromatographiesäulen erreicht.

Um die Rentabilität des charakterisierten Adsorbersystems im Vergleich zu dieser etablierten Technologie der Lactoferrin-Isolierung bewerten zu können, ist eine Kosten-Vergleichsrechnung durchgeführt worden. Die Betriebsparameter der Chromatographiesäule für diese Gegenüberstellung sind einem Vortrag auf der Third International Whey Conference in München im September 2001 entnommen worden [ETZEL ET AL, 2001].

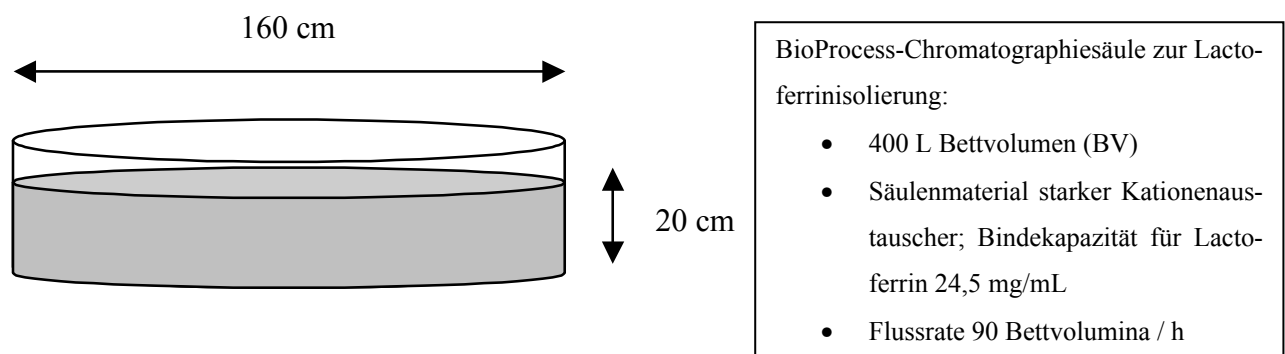


Abb. 4.44: Schematische Darstellung der Chromatographie-Säule zur grosstechnischen Lactoferrinisolierung aus Molke

Das Prinzip der Isolierung des Zielproteins ist analog dem des Membranadsorbers: beim Beladen der Säule mit Molke binden Lactoferrin sowie Lactoperoxidase als Nebenprodukt als einzige kationische Komponenten an die stark sauren Austauscherguppen des Säulenmaterials. Nach dem Ausspülen der Molke aus der Säule werden die zwei Proteine selektiv unter Anwendung eines Salzgradienten eluiert. Unter Annahme einer durchschnittlichen Lactoferrinkonzentration von 0,07 g/L in der Molke können pro Zyklus 9,8 kg Lactoferrin isoliert werden; dies entspricht einer Ausbeute von 100% [ETZEL ET AL, 2001].

Die benötigten Lösungen für den Betrieb der Säule sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

Tab. 4.11: Protokoll eines Isolierungs-Zyklusses der o.g. 400 L-Chromatographiesäule

Programmschritt	Anzahl Bettvolumina (BV)	Menge [L]
Beladen	350	140.000
Spülen	2	800
Eluieren Lactoperoxidase	8	3.200
Eluieren Lactoferrin	6	2.400
Spülen	2	800

Für die einzelnen Programmschritte sind die folgenden Lösungen eingesetzt worden:

Spülen:	50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5
Eluieren Lactoperoxidase:	0,35 M Natriumchlorid in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5
Eluieren Lactoferrin:	1,20 M Natriumchlorid in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5

Hier zeigen sich geringe Unterschiede zu den für den Membranadsorber ermittelten optimalen Elutionsparametern. Der pH-Wert ist bei dem Säulenprozess niedriger, die Salzkonzentrationen von Puffer- und Elutionslösungen höher eingestellt (siehe Kapitel 4.2).

Der Wasser- und Chemikalienbedarf der Chromatographiesäule ergibt sich pro Zyklus zu:

7,2 m ³ Wasser	(entsprechend 18 BV)
60,5 kg Natriumphosphatpuffer-Salze	(entsprechend 18 BV 50 mM NaH ₂ PO ₄ und Na ₂ HPO ₄)
232 kg Natriumchlorid	(entsprechend 8 BV 0,35 M NaCl + 6 BV 1,2 M NaCl)

Auf der Basis der Chemikalienpreise aus Kapitel 4.5.1, Tabelle 4.08, lassen sich die Kosten für Wasser und Elutionssalze berechnen:

Tab. 4.12: Kosten für Wasser und Elutionssalze pro Säulenzyklus zur Isolierung von 9,8 kg Lactoferrin

Wasser / Salz	Preis zur Isolierung von 9,8 kg Lactoferrin [€]
Puffersalze	151,25
Natriumchlorid	65,20
Wasser	28,80

GESAMTKOSTEN FÜR WASSER + ELUTIONSSALZE PRO ZYKLUS: 245,25 €

KOSTEN / KG LACTOFERRIN 25,03 €

Weitere Angaben zu variablen Kostenfaktoren wie Manpower oder Energiekosten liegen nicht vor. Daher kann keine umfassende Vergleichsrechnung nach dem Modell aus Kapitel 4.5.1 durchgeführt werden. Die Fixkosten der Chromatographiesäule betragen [ETZEL ET AL, 2001]:

FIXKOSTEN	- Abschreibung (10% linear über 10 Jahre)	100.000 €
	- Zinsen	30.000 €
	- Wartung	20.000 €
		<u>150.000 €</u>

Die Fixkosten der Chromatographiesäule sind also doppelt so hoch wie die einer 80 m²-Adsorberanlage, die zu 76.500 € bestimmt worden sind (siehe Kapitel 4.5.1).

Um auf der Basis der vorliegenden Daten für die Chromatographiesäule einen Vergleich mit dem Adsorbersystem anzustellen, werden zweckmäßigerweise der Wasser- und Chemikalienverbrauch für die Produktion von 9,8 kg Lactoferrin über eine 80 m²-Zwillingsanlage berechnet.

Pro Zyklus können mit einer 80 m²-Adsorberanlage 70 g Lactoferrin isoliert werden (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.5.1). Für die Isolierung von 9,8 kg Protein müssen 140 Zyklen gefahren werden. Die Preise für Wasser und Elutionssalze berechnen sich unter Berücksichtigung der Mehrfach-Elution (s.o.) zu:

Tab. 4.13: Kosten für Wasser und Elutionssalze zur Isolierung von 9,8 kg Lactoferrin über 140 Zyklen über Membranadsorber (80 m²)

Wasser / Salz	Preis zur Isolierung von 9,8 kg Lactoferrin [€]
Puffersalze	225,80
Natriumchlorid	38,00
Wasser	107,60

GESAMTKOSTEN FÜR WASSER + ELUTIONSSALZE PRO ZYKLUS: **371,40 €**

KOSTEN / KG LACTOFERRIN **37,90 €**

Die nachstehende Tabelle stellt die Kostenbilanz beider Technologien einander gegenüber:

Tab. 4.13: Kosten für Wasser und Elutionssalze zur Isolierung von 9,8 kg Lactoferrin, vergleichende Übersicht

Wasser / Salz	Chromatographiesäule 400 L	Adsorberanlage 80 m ²
Puffersalze	151,25 €	225,80 €
Natriumchlorid	65,20 €	38,00 €
Wasser	28,80 €	107,60 €
Gesamtkosten	245,25 €	371,40 €
Kosten / kg Lactoferrin	25,03 €	37,90 €

Der Verbrauch an Puffersalzen und Wasser ist bei dem säulenchromatographischen Prozess zur Lactoferrin-Isolierung deutlich geringer als bei dem Adsorbersystem, die Kosten liegen entsprechend niedriger. Ein Grund hierfür ist die hohe Bindekapazität des Austauschermaterials in der Säule von 24,5 mg/mL bzw. 9.800 g/400 L. Durch die Flussrate von 90 Bettvolumina pro

Stunde, das entspricht einem Molkedurchsatz von 140.000 L/Zyklus bzw. 600 L/min, kann diese Bindekapazität über eine Beladungszeit von 4 Stunden hinweg voll ausgenutzt und 9.800 g Lactoferrin pro Zyklus isoliert werden. Der Membranadsorber besitzt eine viel geringere Bindekapazität von $0,2 \text{ mg/cm}^2$. Es ist daher notwendig, viele Zyklen unter vergleichsweise hohem Pufferlösungs-Verbrauch zu fahren, um 9.800 g des Proteins zu isolieren.

Ein Vergleich der Kosten für Natriumchlorid fällt zugunsten des Adsorbersystems aus. Hier machen sich zum einen die niedrigeren Bedarfs-Konzentrationen in den Elutionslösungen (s.o.), zum anderen die Möglichkeit der Mehrfachelution bemerkbar. Die wiederholte Verwendung der Eluenten stellt eine Form der Optimierung dar, die dem Membranadsorber vorbehalten bleibt. Der säulenchromatographische Zyklus dauert ca. 4 Stunden. Eine analog zum Adsorbersystem fünfmal eingesetzte Elutionslösung wäre also zu Beginn des nächsten Prozess-Schrittes, der Entsalzung, 20 Stunden alt. Bei der Lagerung von Lactoferrin in 1,3 M-Natriumchloridlösung über diese Zeitspanne hinweg muss mit mindestens teilweiser Denaturierung des Proteins gerechnet werden; das Endprodukt wäre wertlos. Ein Adsorberzyklus hingegen wird innerhalb von 3,5 Minuten durchgeführt, eine fünfmal eingesetzte Elutionslösung kann bereits nach weniger als 20 Minuten der nächsten Prozess-Stufe zugeführt werden.

Der Kostenvergleich der zwei Technologien Säulenchromatographie und Membranadsorbertechnik zur Isolierung von Lactoferrin zeigt, dass die Fixkosten der 80 m^2 -Adsorberanlage niedriger, die variablen Kosten (soweit für die Chromatographiesäule Vergleichsdaten vorliegen) hingegen höher sind als die einer 400 L-Säule. Im Verlauf der Kostenrechnung im Kapitel 4.5.1 hat sich herausgestellt, dass die variablen Kosten größeren Einfluss auf die Gesamt-Prozesskosten nehmen als die Fixkosten. Derzeit ist also die etablierte, ausgereifte Säulenchromatographie zur Lactoferrinisolierung noch rentabler als der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte Membranadsorber, der eine noch vergleichsweise junge Technologie darstellt und über ein noch großes Optimierungspotenzial verfügt.

Die Betriebsdaten zur Chromatographiesäule und somit die Grundlagen der Kostenabschätzung stützen sich ausschließlich auf den Inhalt eines Vortrages aus dem Jahr 2001 (s.o.). Während einige dieser Daten wie z.B. die Bindekapazität des Säulenmaterials sehr gut mit anderen Publikationen und Herstellerangaben korrelieren, konnten andere Angaben wie z.B. die 100%ige Lactoferrinausbeute oder die Auftrags-Flussrate von 1,5 Bettvolumina pro Minute nicht aus anderen Quellen heraus bestätigt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Es ist im Rahmen dieser Arbeit ein Dreistufen-Prozess zur Gewinnung von bovinem Lactoferrin aus Süßmolke mit Membrantechnik entwickelt worden. Auf der Basis vorangegangener Forschungsarbeiten sind die einzelnen Prozess-Stufen optimiert, in großtechnischen Maßstab übertragen und unter Einsatz von Realmedium charakterisiert worden. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen hat die Abschätzung der Prozesskosten einen Vergleich mit der für die Lactoferrin-Gewinnung etablierten Säulenchromatographie in Bezug auf die Prozessrentabilität möglich gemacht.

1. PROZESS-STUFE: CROSSFLOW-MIKROFILTRATION

In einem Membran-Screening sind verschiedene Modulgeometrien auf ihre Eignung zur Molkenaufreinigung hin getestet worden. Es hat sich herausgestellt, dass die Geometrie der eingesetzten Module einen großen Einfluss auf den Verlauf der Molken-Filtration nimmt. Die besten Resultate wurden mit einem $0,2\mu\text{m}$ -Rohrmodul erzielt. Es zeigte mit $450\text{ L/m}^2\text{h}$ eine konstante und hohe Permeationsrate bei guter Aufreinigung (Transmissionswerte von 80 %), niedriger Retention von Lactoferrin (um 5%) und einer Mindest-Standzeit von sieben Stunden.

Rohrmodule werden in der Industrie zur Filtration von Medien eingesetzt, bei denen eine extrem hohe Überströmung und große Scherraten gefordert sind, um die limitierenden Faktoren Konzentrationspolarisation und Fouling in Grenzen zu halten. Molke stellt ein solches Medium dar. Die Tatsache, dass ein Rohrmodul zur Molkenfiltration gut geeignet ist, überrascht also nicht. Aufgrund der schlechten Energiebilanz dieser Modulgeometrie sowie ihrer niedrigen Packungsdichte (siehe Kap. 2.2.2) werden bei vergleichbaren Filtrationsergebnissen andere Geometrien bei industriellen Anwendungen bevorzugt. Hinsichtlich der Prozessökonomie wäre daher die Eignung einer anderen Modulgeometrie wünschenswert gewesen.

Im Anschluss ist ein Up-Scaling auf eine Membranfläche von 4 m^2 durchgeführt worden. Die Filtrationsleistung der vier 1m^2 -Polypropylen-Rohrmodule lag mit $400\text{ L/m}^2\text{h}$ geringfügig unter der des kleinen $0,036\text{m}^2$ -Moduls aus dem Screening bei gleichen Versuchsbedingungen. Eine Erklärung hierfür liegt in dem konstruktionsbedingten Unterschied des Verhältnisses Anströmfläche zu Membranfläche der beiden Module. Im Up-Scaling zeigte sich die starke Abhängigkeit der Permeationsleistung von der Temperatur des Mediums. Bei der Filtration von 10°C kalter Molke betrug der Permeatfluss nur $200\text{ L/m}^2\text{h}$. Durch die Integration von zwei Wärmetauschern in die Anlage konnte bei einer Betriebstemperatur von 50°C der hohe Permeatfluss von $400\text{ L/m}^2\text{h}$ etabliert werden.

Für die Reinigung der Anlage ist eine Methode entwickelt worden, die die vor der Molkenfiltration gemessenen Wasserwerte zu 100 % wieder herstellt. Durch den Einsatz von enzymatischem Reinigungsmittel und Natronlauge kann ein Reinigungszyklus innerhalb von zwei Stunden durchgeführt werden.

2. PROZESS-STUFE: ISOLIERUNG VON LACTOFERRIN

Für die Isolierung des Lactoferrins aus dem Filtrations-Permeat der ersten Prozess-Stufe über einen Membranadsorber sind zunächst die optimalen Elutionsparameter (Puffersystem, Elutions-salz, pH-Wert) bestimmt worden. Die besten Ergebnisse wurden mit Natriumphosphat-Puffer, eingestellt auf pH 7, und Natriumchlorid als Elutionssalz erhalten. Durch Untersuchungen zur Mehrfach-Elution konnte nachgewiesen werden, dass die im Prozess verwendeten Elutionslösungen wiederholt (mindestens 4mal bzw. bis zu einer Lactoferrinkonzentration von 5 g/L) eingesetzt werden können. Da ein Beladungs-Elutionszyklus nur wenige Minuten dauert, ist diese mehrfache Verwendung der proteinhaltigen Lösungen nicht mit einem Verlust an biologischer Aktivität des Lactoferrins verbunden. Die Mehrfach-Elution hat großen Einfluss sowohl auf die ökologische als auch ökonomische Bilanz dieser Prozess-Stufe (s.u.).

Im Anschluss ist ein Up-Scaling der automatisierten Anlage auf 4 m² Membranfläche durchgeführt worden. Mit dieser Anlage war es möglich, 7 g Lactoferrin in 7 L 1M-Natriumchlorid-lösung in einem Zyklus zu isolieren. Das entspricht einer Ausbeute von 88 %. Weitere 9 % des Zielproteins konnten in der Fraktion des Nebenproduktes Lactoperoxidase detektiert werden. Weitere Untersuchungen konnten mit dieser Elutions-Fraktion auf Grund der zeitlichen Rahmenbedingungen nicht durchgeführt werden. Hier existiert noch ein großes Optimierungspotenzial. Durch eine Aufreinigung der Lactoperoxidase könnte neben Lactoferrin ein zweites Produkt aus dem Isolierungsprozess gewonnen werden. Das würde den Prozess deutlich rentabler machen. Weiterhin würden die 9 % Lactoferrin, die in der Lactoperoxidase-Fraktion enthalten sind und derzeit nicht verwertet werden, gewonnen - die Gesamtausbeute würde sich dadurch von 88 % auf 97 % bzw. von 7 g auf 7,76 g pro Zyklus erhöhen.

Die Anzahl der Zyklen, die mit dieser Anlage ohne Reinigungszyklus mit Molkenpermeat hintereinander gefahren werden können, liegt weit unter der im kleinen Maßstab mit idealen Lösungen ermittelten. Die Module unterscheiden sich in ihrer Geometrie: die kleinen Labor-module sind Flachmodule, während es sich bei den großen Anlagenmodulen um spezielle Wickelmodule handelt, bei denen das Feed über den Modulkern durch die Membranlagen im dead-end-Modus nach aussen geführt wird. Möglicherweise bilden sich bei den Wickelmodulen Toträume aus, die von den Elutionslösungen nicht vollständig überströmt werden. Durch nicht

eluiertes, auf dem Adsorber verbleibendes Protein könnten der ansteigende Gegendruck der Adsorbermodule sowie die sinkende Ausbeute pro Zyklus erklärt werden. Andere Ursachen könnten bislang ungeklärte Wechselwirkungen weiterer Molkenpermeat-Bestandteile mit der Adsorbermembran oder das Ausfallen schwerlöslicher Salze auf der Membranoberfläche sein. Hier müssen weitere Forschungsarbeiten durchgeführt werden. Bevor das Problem der schnellen Verblockung nicht gelöst wird, ist mit dem Einsatz der Membranadsorber-Technologie in der Molkenverarbeitung nicht zu rechnen.

Ein anderes Gebiet zukünftiger Arbeiten ist die Weiterentwicklung der Reinigung der Adsorberanlage. Es konnte eine Methode entwickelt werden, die die Wasserwerte der Anlage innerhalb von 45 Minuten zu 95 % wieder herstellt. In der Kostenrechnung ist die Lebensdauer eines Adsorbermoduls auf ein Jahr, d.h. 300 Tage Produktion festgesetzt worden. Schätzt man vier Reinigungszyklen pro Tag, so wird deutlich, dass bei einer nur 95 %igen Wiederherstellung des Flusses die Produktivität des Moduls langfristig stark absinkt.

3. PROZESS-STUFE: LACTOFERRIN-GEWINNUNG AUS DEN ELUATEN

Auch zur Gewinnung des Lactoferrins aus den salzhaltigen Eluaten der zweiten Prozess-Stufe wurde Membrantechnik angewandt. Es ist eine Ultrafiltrationsanlage mit 0,108 m² Membranoberfläche, MWCO 10 kDa, aufgebaut worden, um die anfallenden Mengen an 1 M-Natriumchlorid-Eluatlösung aus der 4 m²-Adsorberanlage zu entsalzen. Am Ende der Ultra- bzw. Diafiltration lag das Protein aufkonzentriert in 5 L salzfreier Lösung vor.

Die Eluate konnten der Entsalzungsanlage direkt vor Ort zugeführt werden; daher kam es zu keinem Verlust an biologischer Aktivität des Lactoferrins, verursacht durch Lagerung in stark salzhaltigem Milieu. Eine Optimierung dieses Prozess-Schrittes ist nicht durchgeführt worden. Die verwendeten Celluloseacetat-Membranen zeigten starkes Fouling, resultierend in einem deutlichen Flussabfall über die Filtrationszeit hinweg. Der Verlust an Zielprotein nach Ausstoß aus der Anlage betrug durchschnittlich 6 %. Weitere Forschungsarbeiten könnten hier zu kürzeren Filtrationszeiten durch höhere Flussraten sowie zu geringeren Produktverlusten führen.

Ein weiteres Forschungsgebiet, das für die ökologische und ökonomische Prozessbilanz von großem Interesse ist, ist die Aufarbeitung des natriumchloridhaltigen Ultrafiltrations-Permeats. Für die Entsalzung von 42 L Eluat wurden ca. 100 L Wasser eingesetzt, das in Form verdünnter Natriumchloridlösung verworfen wurde. Die Rückgewinnung dieses Prozesswassers (und somit auch des Natriumchlorids) würde die Kosten erheblich reduzieren.

Die salzfreie Lactoferrinlösung wurde gefriergetrocknet. Diese besonders schonende Form der Trocknung des Produkts ist teuer im Vergleich zur alternativen Sprühtrocknung. Eine Sprüh-

trockneranlage stand leider nicht zur Verfügung, so dass keine Aussagen über die für diesen Prozess zu favorisierende Technologie getroffen werden konnten.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bereits in früheren Arbeiten ist eine prozessbegleitende Analytik sowohl zur Quantifizierung als auch zur Beurteilung von Reinheit und biologischer Aktivität des gewonnenen Lactoferrins entwickelt worden [WEISS, 1999; WALDEN, 1999; PLATE, 1999]. Durch den Einsatz von HPLC, MALDI-MS und mikrobiologischen Untersuchungen können Lactoferrin-Konzentrationen in wäßrigen Lösungen mit hoher Genauigkeit bestimmt, Verunreinigungen detektiert und der Denaturierungsgrad des Zielproteins festgestellt werden.

KOSTENABSCHÄTZUNG UND KOSTENVERGLEICHRECHNUNG

Für die zweite Prozess-Stufe des Lactoferrin-Gewinnungsprozesses, die Isolierung über Membranadsorber, ist unter Verwendung der erarbeiteten Daten eine Prozesskosten-Abschätzung für eine Anlage im Industriemaßstab durchgeführt worden. Eine solche Kostenorientierung zeigt auf, welche Prozessfaktoren die höchsten Kosten verursachen und wo weitere Optimierungsarbeiten somit am notwendigsten sind. Es hat sich herausgestellt, dass die variablen Kosten einer Adsorberanlage deutlich größeren Einfluss auf die Gesamtkosten des Prozess-Schrittes nehmen als die Fixkosten. Die jährlichen Aufwendungen für Energie und Reinigungs-Substanzen sind gering im Vergleich zu denen anderer Faktoren wie Prozesswasser oder Membranmodule. Einer der größten Kostenfaktoren, die Elutionssalze, konnte unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse zur Mehrfach-Elution von 413.500 € auf 192.000 € Aufwandskosten pro Jahr reduziert werden. Die Gesamtprozesskosten pro Kilogramm Lactoferrin (costs/unit) verringerten sich hierdurch um insgesamt 29 % von über 130 €/kg auf 92,50 €/kg.

Um die Rentabilität der alternativen Technologie Membranadsorber im Vergleich zur etablierten, ausgereiften Säulenchromatographie im Lactoferringewinnungsprozess abschätzen zu können, ist eine Kostenvergleichsrechnung durchgeführt worden. Diese Rechnung hat gezeigt, dass die Fixkosten einer Chromatographiesäule deutlich höher sind als die einer Adsorberanlage. Der Bedarf an Wasser und Puffersalzen ist bei der Chromatographiesäule geringer, der Eluentenverbrauch hingegen größer. Leider lagen nicht für alle Faktoren, die der Berechnung des Adsorbersystems zugrunde gelegt worden sind, gesicherte Daten der Chromatographiesäule vor (z.B. Ausbeute, Manpower, Reinigung, Energiekosten). Eine abschließende Bewertung zu Gunsten einer der beiden Technologien im Rahmen der Lactoferrin-Gewinnung kann hier daher nicht formuliert werden.

6 Literaturverzeichnis

- ADAMIK, B., WALSZCZYK, A., Lactoferrin: its role in defence against infection and immunotropic properties, *Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalnej*, **50** (1996) 33
- ADISAPUTRO, I.A., WU, Y.-J., ETZEL, M.R., Strong cation and anion exchange membranes and beads for protein isolation from whey, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19(9)** (1996) 1437
- ARNOLD, R.R., BREWER, M., GAUTHIER, J.J., Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms, *Infect. Immun.*, **28** (1980) 893
- ARNOLD, R.R., RUSSEL, J.E., CHAMPION, W.J., BREWER, M., GAUTHIER, J.J., Bactericidal Activity of Human Lactoferrin: Differentiation from the Stasis of Iron Deprivation, *Infect. Immun.*, **35** (1982) 792
- BAHR, U., KARRAS, M., HILLENKAMP, F., Analysis of biopolymers by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **384** (1994) 783
- BARTH, C.A., BEHNKE, U., Ernährungsphysiologische Bedeutung von Molke und Molkenbestandteilen, *Nahrung*, **41(1)** (1997) 2
- BELLAMY, W., TAKASE, M., YAMAUCHI, K., WAKABAYASHI, H., KAWASE, K., TOMITA, M., Identification of the bactericidal domain of lactoferrin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1121** (1992) 130
- BLÄCKBERG, L., HERNELL, O., Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step, *FEBS Letters*, **109(2)** (1980) 180
- BML, BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN, Land- und Forstwirtschaft in Deutschland - Daten und Fakten, Informationsbroschüre, 2000
- BOUNOUS, G., Immune-enhancing properties of whey protein isolates in HIV patients, International Whey Conference, Rosemont, 1997
- BOUNOUS, G., BARUCHEL, S., FALUTZ, J., GOLD, P., Whey proteins as a food supplement in HIV seropositive individuals, *Clin. Invest. Med.*, **16** (1993) 204
- BOUNOUS, G., GOLD, P., The biological activity of undenatured dietary whey proteins: Role of glutathione, *Clin. Investig. Med.* **14** (1991) 296
- BROCK, J., Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein?, *Immun. Today*, **16** (1995) 417
- CHERYAN, M., Ultrafiltration and Microfiltration Handbook, Technomic Publishing Company, Lancaster, Basel, 1998

CHIMIEL, J.F., Anti-tumor effects of dietary whey protein and its value for head and neck cancer patients, International Whey Conference, Rosemont, 1997

CHIU, C.K., ETZEL, M.R., Fractionation of Lactoperoxidase and Lactoferrin from Bovine Whey Using a Cation Exchange Membrane, *J. Food Sci.*, **65(5)** (1998) 996

CHU, R.M., WANG, S.-R., WENG, C.-N., PURSEL, V.G., Isolation and characterization of porcine milk lactoferrin, *Am. J. Vet. Res.*, **54(7)** (1993) 1155

CONNELLY, O.M., HEASON, D.R., O'MALLEY; B.W., Production of recombinant lactoferrin and lactoferrin polypeptides using cDNA sequences in various organisms, U.S. Patent 5 571 691 (1996)

CONNELLY, O.M., HEASON, D.R., O'MALLEY; B.W., Expression of processed recombinant and lactoferrin polypeptide fragments from a fusion product in *Aspergillus*, U.S. Patent 5 571 697 (1996)

DE WIT, J.N., VAN HOOYDONK, A.C.M., Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems, *Netherlands Milk Dairy J.*, **50** (1996) 227

DIONYSIUS, D.A., HERSE, J.B., GRIEVE, P.A., Extraction of Lactoperoxidase and Lactoferrin from Whey using Batch Ion Exchange Techniques, *Austr. J. Dairy Technol.*, **46** (1991) 72

DIONYSIUS, D.A., MILNE, J.M., Antibacterial Peptides of Bovine Lactoferrin: Purification and Characterization, *J. Dairy Sci.*, **80** (1997) 667

EKSTRAND, B., BJÖRCK, L., Fast protein liquid chromatography of antibacterial components in milk, *J. Chromatogr.*, **358** (1986) 429

ELLISON III, R.T., GIEHL, T.J., Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysosyme, *J. Clin. Invest.*, **88** (1991) 1081

ELLISON III, R.T., GIEHL, T.J., LAFORCE, F.A., Damage of the Outer Membrane of Enteric Gram-Negative Bacteria by Lactoferrin and Transferrin, *Infect. Immun.*, **56** (1988) 2774

ETZEL, M., LITEN, A.D., MOORE, P.M., Commercial-scale chromatographic fractionation of whey proteins, in: The Importance of Whey and Whey Components in Food and Nutrition, Proceedings of the third International Whey Conference Munich 2001, Behr's Verlag Hamburg, 2002, 83

EUROPEAN PATENT APPLICATION, EP 0 364 912 A2, Method for thermally treating lactoferrin, 1990

EUROPEAN PATENT APPLICATION, EP 0 437 958 A1, Method for heat treatment of lactoferrin without losing physiological activities thereof, 1991

- EUROPEAN PATENT APPLICATION**, EP 0 519 726 A2, A process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity, 1992
- FENG, M.**, VAN DER DOES, L., BANTJES, A., Preparation of apolactoferrin with a very low iron saturation, *J. Dairy Sci.*, **78 (11)** 1995 2352
- FOLEY, A.A.**, BATES, G.W., The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction, *Anal. Biochem.*, **162** (1987) 296
- FOX, P.F.**, MULVIHILL, D.M., Milk proteins: Molecular, colloidal, and functional properties, *J. Dairy Res.*, **49** (1982) 679
- FRANCIS, G.L.**, REGESTER, G.O., WEBB, H.A., BALLARD, F.J., Extraction from Cheese Whey by Cation-Exchange Chromatography of Factors that Stimulate the Growth of Mammalian Cells, *J. Dairy Sci.*, **78** (1995) 1209
- GOREWEIT, R.C.**, SPITSBERG, V.L., Anti-cancer properties of proteins in the milk fat globule membranes in whey, International Whey Conference, Rosemont, 1997
- GRANDISON, A.S.**, LEWIS, M.J., Separation process in the food and biotechnology industries, Technomic Publishing Company, Lancaster, Basel, 1996
- GROVES, M.L.**, Preparation of some iron-binding proteins and α -lactalbumin from bovine milk, *Biochim. Biophys. Acta*, **100** (1965) 154
- HAMBRAEUS, L.**, Importance of milk proteins in human nutrition: Physiological aspects, in: Milk Proteins '84, 63-79, Proceedings of the International Congress on Milk Proteins, Luxemburg, 7-11 May 1984, Ed.: T.E. Galesloot, B.J. Tinbergen, Pudoc, Wageningen, 1985
- HERANDEZ, M.C.**, VAN MARTIN-MARKWIJK, B.W., VREEMAN, H.R., Isolation and properties of Lactoperoxidase from bovine milk, *Neth. Milk Dairy H.*, **44** (1990) 213
- HOEK, K.S.**, MILNE, J.M., GRIEVE, P.A., DIONYSIUS, D.A., SMITH, R., Antibacterial Activity of Bovine Lactoferrin-Derived Peptides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41** (1997) 54
- IKEDA, M.**, NOZAKI, A., SUGIYAMA, K., TANAKA, T., NAGANUMA, A., KATSAKI, K., Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells, *Virus Research*, **66** (2000) 51
- JEKAT, F.**, KONFRANYI, E., Zur Bestimmung der biologischen Wertigkeit von Nahrungsproteinen, XV. Milch und Milchprodukte, Hoppe-Seyler's Z., *Physiol. Chem.*, **351** (1970) 47

- JIANG, D.M., LI, Y.M., ZHAO, Z.M.**, The research on effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption, *China Dairy Ind.*, **27 (1)** (1999) 22
- JAKUBITH, M.**, Chemische Verfahrenstechnik, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1991
- JORNITZ, M.W., MELTZNER, T.H.**, Sterile filtration - A practical approach, Marcel Dekker Inc., New York, 2001
- JOST, R., MONTI, J.C., PAHUD, J.J.**, Whey protein allergenicity and its reduction by technological means, *Food Technol.*, **41** (1987) 118
- JOST, R., MONTI, J.C., PAHUD, J.J.**, Reduction of whey protein allergenicity by processing, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **289** (1991) 309
- KAKURA, I., KUROKURA, H.**, Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against Cryptocaryon irritans infection of red sea bream, *Fish Pathology*, **30** (1995) 289
- KAWAKAMI, H., SHINMOTO, H., DOSAKA, S., AHIKO, K.**, Method for separating bovine lactoferrin from cow's milk and purifying same, U.S. patent 4,668,771, 1987
- KOSEMUND, D.**, Aufarbeitung von Süßmolke mittels Crossflowfiltration zur Isolierung von Lactoferrin, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1998
- KUWATA, H., YIP, T., TOMITA, M., HUTCHENS, T.W.**, Direct evidence of the generation in human stomache of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1429** (1998) 129
- LAMPREAVE, F., PINEIRO, A., BROCK, J.H., CASTILLO, H., SANCHEZ, L., CALVO, M.**, Interactions of bovine lactoferrin with other proteins of milk whey, *Int. J. Biol. Macromol.*, **12** (1990) 2
- LAW, B.A., REITER, B.**, The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey, *J. Dairy Res.*, **44** (1977) 595
- LEHRER, R.I., GANZ, T.**, Neutrophils and Host Defence, *Ann. Intern. Med.*, **109** (1988), 127
- LELIEVRE, J.**, Whey proteins in chesse – An Overview, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **367** (1995) 359
- LÖNNEDAL, B., ATKINSON, ST.**, Nitrogen components of milk, A. Human milk proteins, in: Handbook of Milk Composition, Ed.: R.G. Jensen, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1995, 351 - 368
- LÖNNEDAL, B., IYER, S.**, Lactoferrin: Molecular structure and biological function, *Annual Rev. Nutr.*, **15** (1995) 93-110

- LORENZEN, P.CHR.**, Molkenprotein: Das andere Eiweiß aus der Milch, in: Milcheiweiß für Lebensmittel, Ed.: A. Nienhaus, E. Reimerdes, Behr's Verlag, Hamburg, 1987, 221 - 236
- MARCHETTI, M., LONGHIM, C., CONTE, M.P., PISANTI, S., VALENTI, P., SEGANTI, L.**, Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to vero cells, *Antiviral Res.*, **29** (1996) 221
- MASSON, P.L., HEREMANS, J.F.**, Lactoferrin in milk from different species, *Comp. Biochem. Physiol.*, **39** (1971) 119
- MATTSBY-BALTZER, I., ROSEANU, A., MOTAS, C., ELVEERSFORS, J., ENGBERG, I., HANSON, L.A.**, Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin induced interleukin-6 response in human monocytic cells, *Ped. Res.*, **40** (1996) 257
- MAYNARD, F., PIERRE, A., MAUBOIS, J.L.**, Fractionation of human lactoferrin and α -lactalbumin using micro-filtration and ultrafiltration membranes, *Le Lait*, **69** (1989) 59
- MEISEL, H., FRISTER, H., SCHLIMME, E.**, Biologically active peptides in milk proteins, *Z. Ernährungswiss.*, **28** (1989) 267
- MIV MILCH UND MARKT INFORMATIONSBÜRO DER DEUTSCHEN MILCHINDUSTRIE**, Die deutsche Milchindustrie - Zahlen und Fakten, Informationsbroschüre, 2000
- MILISIC, V., BERSILLON, J.L.**, Anti-fouling Techniques in Cross-flow Microfiltration, *Filtration & Separation*, **23** (Nov. 1986) 347
- MINCHEVA NILSSON, L., HAMMARSTRÖM, M.L., JUTO, P., HAMMARSTRÖM, S.**, Human milk contains proteins that stimulate and suppress T-lymphocyte proliferation, *Clin. Exp. Immunol.*, **79** (1990) 463
- MITCHELL, I.R., SMITHERS, G.W., DIONYSIUS, D.A., GRIEVE, P.A., REGESTER, G.O., JAMES, E.A.**, Extraction of lactoperoxidase and lactoferrin from cheese whey using membrane cation exchangers, in: Indigenous Antimicrobial Agents of Milk – Recent Developments, 1994, 89 – 95, Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium
- MIYAUCHI, H., HASHIMOTO, S., NAKAJIMA, M., SHINODA, I., YASUO, Y.**, Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: Identification of its active domain, *Cellular immun.*, **187** (1) (1998) 34
- MIYAZAWA, K., MANTEL, C., LU, L., MORRISON, D.C., BROXMEYER, H.E.**, Lactoferrin-lipopolysaccharide binding to monocyte/macrophage-differentiated HL-60 cells, *J. Immunol.*, **146** (1991) 723
- MOGUILVSKY, N., RETEGUI, L.A., MASSON, P.L.**, Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes, *Biochem. J.*, **229** (1985) 353

MONSAN, P.F.E., THILBAULT, P.A., BROSSARD, C., BRUVIER, C.S.J., Extraction of milk proteins and manufacture of pharmaceutical products, German Patent DE 3,623,474, 1987

MOSTERT, J.F., ROBERTS, J.J., Whey and whey powders, in: Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, Ed.: R. Macrae, R.K. Robinson, M.J. Sadler, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1993, Vol. 7, 4888 - 4908

MULDER, M., Basic Principles of Membrane Technology, Kluwer Academic Publishers, 2. edition, 1996

NAGASAKO, Y., SAITO, H., TAMURA, Y., SHIMAMURA, S., TOMITA, M., Iron binding properties of bovine lactoferrin in iron rich solution, *J. Dairy Sci.*, **76** (1993) 1876

NELSON, R.W., MCLEAN, M.A., HUTCHENS, T.W., Quantitative Determination of Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 1408

NISBET, T.J., Observations on the Fouling of Polysulphone Ultrafiltration Membranes by Acid Whey, *New Zealand J. Dairy Sci. and Technol.*, **16** (1981) 113

NUIJENS, P., International Patent Classification WO 95/22258, Isolation of Lactoferrin from Milk, (1995)

OKONOGLI, S., TOMITA, M., TOMIMURA, T., TAMURA, Y., MIZOTA, T., Process for producing bovine lactoferrin in high purity, U.S. patent 4,791,193, 1988

PAFYLIAS, I., CHERYAN, M., MEHAIA, M.A., SAGLAM, N., Microfiltration of milk with ceramic membranes, *Food Res. International*, **29(2)** (1996) 141

PAHUD, J.J., MONTI, J.C., JOST, R., Allergenicity of whey protein: Its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **4** (1985) 408

PATENT COOPERATION TREATY, PCT WO 93/02098; Isolation of charged particles from fluids, 1993

PATENT COOPERATION TREATY, PCT WO 93/13676; Process for isolating lactoferrin and lactoperoxidase from milk and milk products, and products obtained by such process, 1993

PATENT COOPERATION TREATY, PCT WO 95/22258, Isolation of lactoferrin from milk, 1995

PATIL, G.R., PATIL, A.A., GUPTA, S.K., RAJOR, R.B., Manufacture of whey-soy beverages: A review, *J. Food Sci. Technol.*, **21** (1984) 340

PLATE, K., Optimierung im Downstreamprozeß zur Gewinnung von Lactoferrin und Lactoferricin, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1999

- PLATE, K., DEMMER, W., BUCHHOLZ, H., ULBER, R., SCHEPER, T.,** Gewinnung von bovinem Lactoferrin aus Molke über Membranadsorber, *CIT*, **73 (7)** (2001) 898
- PLATE, K., DEMMER, W., BUCHHOLZ, H., ULBER, R., SCHEPER, T.,** Recovery of bovine lactoferrin by ion exchange membrane adsorption, in: *The Importance of Whey and Whey Components in Food and Nutrition, Proceedings of the third International Whey Conference Munich 2001*, Behr's Verlag Hamburg, 2002, 103
- RÄIHÄ, N.C.R.,** Protein quantity and quality in infant feeding, in: *milk Proteins '84*, 142 - 153, Proceedings of the International Congress on Milk Proteins, Luxemburg, 7 – 11 May 1984, Ed.: T.E. Galesloot, B.J. Tinbergen, Pudoc, Wageningen, 1985
- RAUTENBACH, R., ALBRECHT, R.,** Membran-Trenn-Verfahren, Otto Salle Verlag, Frankfurt Berlin München, 1981
- RAUTENBACH, R.,** Membranverfahren - Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1997
- RECIO, I., VISSER, S.,** Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin, *J. Chromatogr. A*, **831** (1999) 191
- REITER, B.,** The biological significance and exploitation of the non-immunoglobulin protective proteins in milk: Lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase, Xanthinoxidase, *IDF Bull.*, **191** (1985) 2
- REITER, B., PERRAUDIN, J.P.,** Lactoperoxidase: Biological functions, in: *Peroxydases in Chemistry and Biology*, CRC Press Inc. 1991, 143
- RIEDEL, C.-L.,** Molke - Rohstoff für neue Produkte, *Dt. Milchwirtsch.*, **45** (1994) 174 – 179, 230 – 235, 278 - 283
- RIPPBERGER, S.,** Mikrofiltration mit Membranen, VCH Weinheim 1992
- SAITO, H., TAKASE, M., TAMURA, Y., SHIMAMURA, S., TOMITA, M.,** Physicochemical and antibacterial properties of lactoferrin and its hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH, in: *Lactoferrin: Structure and Function*, Ed.: T.W. Hutchens et al., Plenum Press, New York, 1994, 219
- SANCHEZ, L., PEIRO, J.M., CASTILLO, H., PEREZ, M.D., ENA, J.M., CALVO, M.,** Kinetic Parameters for Denaturation of Bovine Milk Lactoferrin, *J. Food Sci.*, **57(4)** (1992) 873
- SATUE-GRACIA, M.T., FRANKEL, E.N., RANGAVAJHYALA, N., GERMAN, J.B.,** Lactoferrin in infant formulas: effect on oxidation, *J. Agri. Food Chem.*, **48 (10)** (2000) 4984
- SCHIBLI, D.J., HWANG, P.M., VOGEL, H.J.,** The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles, *FEBS Letters*, **446** (1999) 213

- SCHLIMME, E., BUCHHEIM, W.**, Milch und ihre Inhaltsstoffe. Chemische und physikalische Grundlagen, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, 1995
- SCHOPPE, I., BARTH, C.A., HAGEMEISTER, H.**, The nutritive value of bovine lactoferrin, in: Milk Proteins. Nutrition, Clinical, Functional and Technological Aspects, 108 – 109, Ed.: S.A. Barth, E. Schlimme, Steinkopff Verlag, Darmstadt und Springer-Verlag, New York, 1989
- SCOPES, R.K.**, Protein Purification, Springer Verlag, 3. Auflage, 1994
- SCOTT, G.H., LUCAS, D.O.**, Immunologically active whey fraction and recovery process, U.S. patent 4,834,974, 1989
- SHIMAZAKI, K., TAZUME, T., UJI, K., TANAKA, M., KUMURA, H., MIKAWA, K., SHIMO-OKA, T.**, Properties of a Heparin-binding Peptide Derived from Bovine Lactoferrin, *J. Dairy Sci.*, **81** (1998) 2841
- SHIMAZAKI, K., NISHIO, M., KAWANO, N.**, Separation of biologically active proteins from whey, *Japanese J. Dairy Food Sci.*, **37(2)** (1988) 45
- SIENKIEWICZ, T., RIEDEL, C.-L.**, Whey and Whey Utilization, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, 2. bearbeitete und erweiterte Auflage, 1990
- SMITHERS, G.W., MCINTOSH, G.H., REGESTER, G.O., JOHNSON, M.A., ROYLE, P.J., LE LEU, R.K., JELEN, P.**, Anti-cancer effects of dietary whey proteins, International Whey Conference, Rosemont, 1997
- SPREER, E.**, Technologie der Milchverarbeitung, VEB Fachbuchverlag Leipzig, 5. Auflage, 1984
- STEINMANN, V.**, Entwicklung von Analysenverfahren für Molkeproteine über Membranadsorber am Beispiel von Lactoferrin, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1997
- STRYER, L.**, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage, 1991
- SUZUKI, T., YAMAUCHI, K., TOMITA, M., KIOSAWA, I., OKONOJI, S.**, Collaborative bacteriostatic activity of bovine lactoferrin with lysozyme against *E. coli* 0111, *Agr. Biol. Chem.*, **53** (1989) 1705
- TANAKA, K., IKEDA, M., NOZAKI, A., KATO, N., TSUDA, H., SAITO, S., SEKIHARA, H.**, Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in patients with chronic hepatitis C - A pilot study; *Japanese Journal of Virus Research*, **90** (1999) 367
- TOMITA, M.**, Biological functions of lactoferrin: Basic research and applications, Informationsblatt der Morinaga Milk Industry Co. Ltd (Japan), 1997
- TOMITA, M., TAKASE, M., WAKABAYASHI, H., BELLAMY, W.**, Antimicrobial Peptides of Lactoferrin, in: Lactoferrin: Structure and Function, Ed.: T.W. Hutchens et al., Plenum Press, New York, 1994

- UCHIDA, Y, SEKINE, K., KUHARA, T., TAKASUKA, N., LIGO, M., MAEDA, M., TSUDA, H., Possible chemopreventative effects of bovine lactoferrin on esophagus and lung carcinogenesis in the rat, *Jap. J. Cancer Res.*, **90** (1999) 262
- WALDEN, M., Untersuchung zur biologischen Aktivität von bovinem Lactoferrin, Schwerpunktarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1998
- WALDEN, M., Aufbau einer Qualitätskontrolle für die isolierten Molkeproteine Lactoferrin und Lactoperoxidase, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1999
- WEINBERG, E.D., Iron and Infection, *Microbiol. Reviews*, **42** (1978) 45
- WEISS, T., Neue Membrantechnologien zur Isolierung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke - Methodenentwicklung für den industriellen Einsatz, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1999
- WENTEN, I.G., Mechanisms and Control of Fouling in Crossflow Microfiltration, *Filtration & Separation*, **23(3)** (1995) 253
- WENZEL, H., EPELT, S., SPLITT, S., SWOBODNIK, W., WECHSLER, J.G., DITSCHUNEIT, H., Ergebnisse der Adipositasbehandlung mit eiweißangereicherter Molke, *Akt. Ernährungsmed.*, **11** (1986) 71
- WONG, N.P., Fundamentals of Dairy Chemistry, Van Nostrand Reinhold, New York, 3rd edition, 1988
- WONG, CH.W., WATSON, D.L., Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice, *J. Dairy Res.*, **62** (1995) 359
- WÜNSCH, G., Optische Analysenmethoden zur Bestimmung anorganischer Stoffe, de Gruyter, Berlin, 1976
- YOSHIDA, S., YE-XIUYUN, Isolation of Lactoperoxidase and Lactoferrin from Bovine Milk Acid Whey by Carboxymethyl Cation Exchange Chromatography, *J. Dairy Sci.*, **74** (1991A) 1439
- YOSHIDA, S., YE-XIUYUN, Isolation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine milk rennet whey and acid whey by sulphopropyl cation-exchange chromatography, *Neth. Milk Dairy J.*, **45** (1991B) 273
- ZADOW, J.G., Whey and Lactose Processing, Elsevier Applied Science, London, New York, 1992
- ZIETLOW, M.F., ETZEL, M.R., Evaluation of sulfopropyl ion-exchange membrane cartridges for isolation of proteins from bovine whey, *J. Liq. Chromatogr.*, **18(5)** (1995) 1001