

**Proteinauftrennung aus Standardproteinmischungen und
industriellem Kartoffelfruchtwasser mittels Membranadsorber**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Chem. Frauke Menzel
geboren am 19.12.1966
in Hannover

Langenhagen, im Januar 2006

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Diethardt Hesse

Tag der Promotion: 15.12.2005

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

Langenhagen, im Juli 2005

(Frauke Menzel)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Februar 2001 bis Juni 2005 am Institut für Technische Chemie im Arbeitskreis Biotechnologie unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper, dem ich für das interessante Thema und die guten Arbeitsbedingungen am Institut danken möchte. Ich danke Herrn Prof. Dr. Diethardt Hesse für die Übernahme des Koreferates.

Ich danke dem Kooperationspartner Emsland-Stärke für die Bereitstellung der vielen Kartoffelfruchtwasserproben. Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Martin Lotz für die Unterstützung und die vielen Antworten auf die vielen, vielen Fragen zum Thema Kartoffeln.

Vielen Dank auch Frau Dr. Cornelia Kasper für ihre Unterstützung während der Arbeit, die Korrekturen, Gummibärchen und viele gute Gespräche.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Martina Weiss, die immer da war und viele technische und gärtnerische Fragen klären konnte.

Vielen Dank an Daniel und Alex für die schnellen Computerhilfen, wenn es mal wieder nicht weiter ging und das „Biest“ abgestürzt war. Martin danke ich für den guten Kaffee, der morgens immer schon fertig war. Johanna für das schnelle Korrekturlesen und Kirstin für die Unterstützung bei der Gelelektrophorese und vielem anderen. Und vielen Dank an Olli für den Mohnkuchen, Dänemarkbilder und das Korrigieren dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht natürlich an Veronika, die sich auch analytisch mit der „Kartoffelmatsche“ beschäftigt hat. Ohne sie wären die tryptischen Verdaue nur halb so schön gewesen.

Allen Institutsmitgliedern ein herzliches Dankeschön für die tolle Zeit. Es gab immer etwas zu lachen, auch wenn etwas wieder mal nicht geklappt hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Mann und meinen Kindern bedanken. Ohne ihre Geduld und Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht durchführen können.

Zusammenfassung

Proteinauftrennung aus Standardproteinmischungen und industriellem Kartoffelfruchtwasser mittels Membranadsorbern

Im Bereich der Proteinforschung ist in den letzten Jahren das Probenaufkommen enorm gestiegen. Neue Methoden die zur Verkürzung der Untersuchungszeit führen, müssen im Bereich der Trennung und Aufreinigung von Proteingemischen untersucht und erarbeitet werden. Die Membrantechnologie bietet zur klassischen Chromatographiesäule eine schnelle und leicht durchführbare Alternative in der Proteintrennung und Aufreinigung. In dieser Arbeit wurden Zentrifugationseinheiten und Durchflussmembranadsorber verwendet, die mit Ionenaustauschermembranen bestückt waren. Es wurde ihre Anwendbarkeit auf Trennungen von Standardproteinmischungen und die Abtrennung von Kartoffelproteinen aus Kartoffelfruchtwasser untersucht.

Die Zentrifugationseinheiten mit Membranoberflächen bis zu 7,48 cm² wurden zur Auftrennung von Standardproteinmischungen im Mikrolitermaßstab eingesetzt und bieten eine schnelle Möglichkeit zur Auftrennung von HSA und IgG- Proteingemischen. Eine gute Auftrennung in die einzelnen Proteine der Standardproteingemische konnte über die Durchflussadsorber mit Membranoberflächen von 15 cm² erzielt werden.

Neben Standardproteingemischen wurde als komplexes Gemisch Kartoffelfruchtwasser untersucht und versucht in seine Hauptbestandteile aufzutrennen. Kartoffelfruchtwasser ist ein Abfallprodukt aus der industriellen Stärkeherstellung und enthält neben dem Hauptprotein Patatin (43 kDa) eine Vielzahl unterschiedlicher Protease Inhibitoren (9-22 kDa). Die biologisch hohe Wertigkeit des Patatins macht dieses Protein auf dem Markt der Nahrungsmittelveredelung interessant.

Die Abtrennung der Kartoffelproteine über Ionenaustauschermembranen wurde zuerst im Mikrolitermaßstab über Zentrifugationseinheiten nach dem Scouting Prinzip durchgeführt. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse wurden auf größere Adsorbereinheiten mit Flächen von 15 und 75 cm² angewandt und optimiert. Unterschiedliche Puffersysteme, Elutionssalze sowie Elutionsprofile wurden untersucht. Die Patatinabtrennung erfolgte über starke Anionenaustauschermodule, die Protease Inhibitoren wurden über starke Kationenaustauschermembranen abgetrennt. Die Abtrennung wurde über gekoppelte Adsorbermodule in der FPLC durchgeführt. In einer anschließenden durchgeführten zweistufigen Elution in der FPLC wurden die Proteine von den entkoppelten Membranenadsorbern gelöst. Es wurde mit einem 0,5 M NaCl Eluenten eine maximale Ausbeute von 62% an Patatin erzielt, das entspricht einer Bindungskapazität von 0,31 mg Protein/cm² Membran.

Stichworte: Membranadsorber, Ionenaustauschchromatographie, HSA-IgG, Kartoffelfruchtwasser, Kartoffelproteine, Patatin, Protease Inhibitoren, FPLC

Abstract

Separation of proteins from standard protein mixtures and industrial potato fruit juice with membrane adsorber

The requirement of analysing samples in protein research increased in the last years. New methods for a faster separation and purification of protein mixtures must be analysed and developed. The membrane technology is an alternative method to the classical column chromatography in protein separation and purification. In this work spin columns and membrane adsorber were used with ion-exchange membranes. The applicability of the modules for the separation of standard protein mixtures and proteins of potatoe fruit juice were tested.

Spin column with a membrane area of 7.48 cm² were applied to separate proteins from mixtures in the microliter format. The separation of HSA-IgG mixtures were successful with the spin column. Membrane adsorbers with a membrane area of 15 cm² were applied to separate proteins from standard mixtures.

Potatoe fruit juice is a by-product from the industrial starch production. It contains the main protein patatin (43 kDa) and different protease inhibitores (9-22 kDa). The interesting side of the patatin is the high nutritional value comparable to the whole egg and the employment in the market of the aliment.

For a first screening the separation of the potato protein was performed using ion-exchange membranes in the spin columns format according to the scouting principle. After evaluation of the ideal separation method, membrane adsobers with membrane areas of 15 and 75 cm² were used and the methods were optimized. The separation of patatin from the potato fruit juice was effective with strong anion membrane adsorbers. Strong cation membrane adsorbers were applied for the separation of the protease inhibitors. Both membrane modules were coupled and embedded into a FPLC. The elution was done in two steps. The maximum yield of 62% patatin was achieved with 0.5 M NaCl in the elution buffer, this corresponds to 0.31 mg protein /cm² membrane area.

Keywords: membrane adsorber, ion-exchange chromatography, HSA-IgG, potato fruit juice, potato proteins, patatin, protease inhibitors, FPLC

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung und Zielsetzung | 1 |
| 2 | Theoretischer Teil | |
| 2.1 | Kartoffeln | 3 |
| 2.1.1 | Verarbeitung von Industriekartoffeln in der Stärkeindustrie | 5 |
| 2.1.2 | Kartoffelfruchtwasser aus der Stärkeindustrie | 6 |
| 2.1.3 | Kartoffelproteine | 7 |
| 2.1.4 | Patatin | 7 |
| 2.1.5 | Protease Inhibitoren | 8 |
| 2.1.6 | Andere Proteine im Kartoffelfruchtwasser | 9 |
| 2.2 | Membranen und Membranverfahren | 10 |
| 2.2.1 | Membranfiltration | 11 |
| 2.2.2 | Membranadsorber | 12 |
| 3 | Praktischer Teil | |
| 3.1 | Verwendete Membransysteme | 14 |
| 3.1.1 | Sartobind 15 und 75 | 14 |
| 3.1.1.1 | Ionenaustauschchromatographie | 15 |
| 3.1.2 | Spinmodule Vivapure | 17 |
| 3.2 | Auftrennungsversuche von Standardproteinmischungen über Ionenaustauschermodule | 18 |
| 3.2.1 | Trennung eines Standardproteingemisches mittels Vivapure S (mit Kationenaustauschermembranen) | 19 |
| 3.2.2 | Trennung eines Standardproteingemisches mittels Vivapure Q (mit Anionenaustauschermembran) | 21 |
| 3.2.3 | Trennung eines Standardproteingemisches mittels Sartobind S | 23 |
| 3.2.4 | Trennung eines Standardproteingemisches mittels Sartobind Q | 24 |
| 3.3 | Trennung von Blutproteinen über Zentrifugeneinheiten | 26 |
| 3.3.1 | Trennung von IgG und HSA mittels Vivapure Q Einheiten | 27 |
| 3.3.2 | Albuminabtrennung aus humanem Serum mittels Vivapure Q Einheiten | 28 |
| 3.4 | Scoutingversuche mit Zentrifugeneinheiten Vivapure | 29 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.4.1 | Scoutingversuch eines HSA/IgG –Gemisches | 30 |
| 3.4.2 | Scoutingversuch mit Kartoffelfruchtwasser | 33 |
| 3.5 | Trennung von Kartoffelfruchtwasser über Sartobind Adsorbermodule | 38 |
| 3.5.1 | LPLC | 38 |
| 3.5.2 | Kartoffelfruchtwasserproben | 40 |
| 3.5.2.1 | Probenvorbereitung | 42 |
| 3.5.3 | Vorversuche zur Kapazitätsbestimmung der Adsorbermembranen | 43 |
| 3.5.4 | Trennung von KFW mittels linearen Gradientenprofils | 45 |
| 3.5.5 | Vergleich unterschiedlicher Salzeluenten | 46 |
| 3.5.6 | Trennung von KFW mittels Stufengradientenprofil | 47 |
| 3.6 | Trennung von KFW über gekoppelte Sartobind Adsorbermodule | 50 |
| 3.6.1 | Kopplung von 2 Modulen- dreistufiges Elutionsprogramm | 50 |
| 3.6.2 | Kopplung von 2 Modulen- zweistufiges Elutionsprogramm | 53 |
| 3.6.3 | Bilanzierung-Ausbeutebestimmung | 57 |
| 3.6.4 | Reinigung und Lagerung von Adsorbermodulen | 60 |
| 3.7 | Proteinauftrennung über schwache Adsorbermodule | 63 |
| 3.8 | Reinheitskontrolle | 65 |
| 3.8.1 | Probenbehandlung: Aufkonzentration und Entsalzung | 65 |
| 3.8.1.1 | Vivaflow 50 | 65 |
| 3.8.1.2 | Vivaspin 20 | 66 |
| 3.8.2 | Enzymatischer Verdau | 67 |
| 3.8.3 | MALDI | 67 |
| 3.8.3.1 | Ergebnisse einer unverdauten Probe | 68 |
| 3.8.3.2 | Ergebnisse einer verdauten Probe | 70 |
| 3.8.4 | 2-D-Elektrophorese | 73 |
| 3.9 | Langzeitstabilitätstest und Mehrfach- Elutionen | 77 |
| 3.9.1 | Langzeitstabilitätstest mit BSA | 77 |
| 3.9.2 | Langzeitstabilitätstest mit KFW | 81 |
| 3.9.3 | Mehrfach-Elutionen: Anreicherung von Protein im Eluat | 84 |
| 4 | Diskussion und Ausblick | 86 |
| 5 | Literatur | 90 |
| 6 | Abkürzungsverzeichnis | 94 |
| 7 | Anhang | 95 |

1 Einleitung und Zielsetzung

In den letzten zwei Jahrzehnten hat die Proteinforschung an Bedeutung gewonnen und ist neben der Molekulargenetik ein wichtiger Bestandteil der Biowissenschaften geworden. Man erkannte, dass nicht nur die Entschlüsselung und Sequenzierung der Genome von Organismen wichtig ist, sondern dass die Proteinidentifizierung ein ebenso wichtiges Arbeitsgebiet ist. Obwohl die Proteomforschung eine längere Tradition als die Genomforschung hat, gestaltet sie sich doch wesentlich schwieriger. Da die Kombinationsmöglichkeiten der 20 Aminosäuren zu den unterschiedlichen Proteinen ungleich höher sind als die der 4 Bausteine der DNS, benötigt man umfangreichere Methoden zur Proteomanalytik, die erst in den letzten Jahren entwickelt worden sind. Erst die Proteomic gibt einen Einblick in das Geschehen in einer lebendigen Zelle [Schrattenholz, 2001].

Biowissenschaften und Biotechnologie beinhalten aber nicht nur die Erforschung biologischer Substanzen, sondern auch die Erschließung und Verarbeitung neuer Rohstoffe, vor allem mit Schwerpunkt auf die nachhaltige Gewinnung von Rohstoffen mit hoher Wertschöpfung.

Das dadurch entstehende hohe Aufkommen an zu untersuchenden Proben erfordert eine Verkürzung der Untersuchungszeit für einzelne Proben. Die klassischen säulenchromatographischen Verfahren zur Trennung und Aufreinigung von Proteingemischen sind für viele Untersuchungen zu zeit- und personalaufwendig. Neue Möglichkeiten bietet die Membrantechnologie in ihren unterschiedlichen Einsatzgebieten und Anwendungsformen. Die Abtrennung von Proteinen oder anderen Substanzen erfolgt nicht mehr nur über Größenausschluß durch Membranen, sondern kann durch die bekannten Chromatographiemethoden wie Ionenaustausch (IEX), Größenausschluß (SEC) und Affinitätschromatographie (AC) erfolgen. Die Industrie bietet dem Anwender eine große Auswahl von Medien für eine schnelle Trennung an.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Auftrennung von Proteingemischen unter Verwendung von Membranadsorbern. Verwendet werden dazu zum einen Zentrifugationseinheiten sowie Adsorberkartuschen mit Ionenaustauschermembranen im Labormaßstab.

Zentrifugationseinheiten bieten dem Anwender eine Möglichkeit zur schnellen Proteinabtrennung und Anreicherungen im Labormaßstab. Ziel ist es, die Trennungsleistung der Zentrifugationsmodule für unterschiedliche Proteingemische zu untersuchen. Neben der Trennung von Standardproteingemischen wurden auch die Möglichkeiten der Trennung und

Aufreinigung aus komplexen Gemischen wie Kartoffelfruchtwasser untersucht. Zusätzlich wurde untersucht, in wie weit die gewonnenen Daten auf größere Membranadsorbermodule übertragbar sind.

Die Hauptprobe für die Membranadsorbermodule war das komplexe Proteingemisch Kartoffelfruchtwasser, das ein Abfallprodukt aus der Stärkeindustrie ist.

Die bei der Stärkeproduktion anfallenden Kartoffelfruchtwässer belaufen sich pro Jahr auf 6 Millionen Tonnen in Europa. Kartoffelfruchtwasser enthält neben Mineralstoffen, Vitaminen und Reststärke auch ca. 2 % Protein und ist somit eine preiswerte Proteinquelle.

Patatin als Hauptprotein der Kartoffel stellt ein ernährungsphysiologisch wertvolles Protein dar, das zukünftig als Nahrungsmittelzusatzstoff für Spezialnahrung (Sportler, Kleinkinder, Krankenbereich) angewendet werden könnte. Die in der Kartoffel vorkommenden Protease Inhibitoren stellen die andere Hauptgruppe der Proteine dar. Da sich die isoelektrischen Punkte der Proteine unterscheiden, ist die Abtrennung über Ionenaustauscher möglich. Der Einsatz von Membranadsorbern ermöglicht im Gegensatz zur klassischen Säulenchromatographie hohe Flussraten sowie kurze Beladungs- und Elutionszeiten. Die Membranen sind als Module in Größen von 15 cm² (Labormaßstab) bis zu 8 m² (großtechnischer Maßstab) erhältlich und lassen sich auf Grund der einfachen Handhabung für jede Anwendung anpassen und kombinieren.

Ziel war daher, die Grundlagen zur großtechnischen Abtrennung der Kartoffelproteine aus Kartoffelfruchtwasser im Labormaßstab mit Adsorbermodulen von 15 und 75 cm² Membranfläche zu untersuchen. Die optimalen Parameter zur Beladung der Module sowie die Elutionsbedingungen der einzelnen Proteine sollten ermittelt werden.

2 Theoretischer Teil

2.1 Die Kartoffel (*solanum tuberosum*)

Unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten ist die Kartoffel neben der Tomate die wichtigste Art aus der Gattung der Nachtschattengewächsen (Solanaceae) und mit ihrem Artenreichtum eine sehr vielfältige Pflanze. Die krautige Pflanze wächst mit gefiederten Blättern und ist in Kultur einjährig. Alle oberirdischen, grünen Pflanzenteile, sowie grüne Teile der Knollen und Keime enthalten erhöhte Anteile an dem Alkaloid Solanin und sind für den Menschen giftig. Die Kartoffelknolle kann je nach Sorte rund, eiförmig oder lang gestreckt sein. Die Farben variieren von dunkelbraun bis hin zu rostrot. Die Knolle dient der Pflanze als Vermehrungs – und Überwinterungsorgan und speichert vor allem Stärke als Reservestoff [Brockhaus, 1998; Heiligmann, 1979].

Ihre ursprüngliche Heimat sind die Hochanden in Südamerika. Dort wird sie seit Jahrtausenden als Kulturpflanze angebaut. Nach Europa wurde die Pflanze in der zweiten Hälfte des 16. Jahrhunderts gebracht. Die Kartoffel wurde in den Lustgärten der europäischen Höfe hauptsächlich als Zierpflanze angebaut und galt später als Delikatesse. Es dauerte einige Zeit bis auch ihr Nutzen erkannt wurde. Während des Dreißigjährigen Krieges wurde sie gelegentlich angebaut und damit zum Nahrungsmittel der einfachen Leute. Neben vielen anderen Pflanzen erwies sich die Kartoffel als billiges und nahrhaftes Lebensmittel, das relativ einfach anzubauen war und ertragreich in unserer Klimazone wuchs. Im 18. Jahrhundert befahlen viele Landesfürsten (u.a. Friedrich der Große) während des Siebenjährigen Krieges per Dekret den Anbau von Kartoffeln, um die hungernde Bevölkerung und Soldaten mit Lebensmitteln zu versorgen. Seit den Napoleonischen Kriegen im 19. Jahrhundert ist die Kartoffel zu der meist angebauten Feldfrucht in Mitteleuropa geworden und wurde zur Speise der unteren, schnell wachsenden Bevölkerungsschichten.

Durch den einseitigen und verstärkten Kartoffelanbau ergaben sich bald Probleme mit Schädlingen und eingeschleppten Krankheiten. Die starke Abhängigkeit vom Gedeih der Kartoffel löste im Laufe der Zeit wiederum Hungersnöte aus. Agrarökonomien und Agrarwissenschaftler zogen aus diesen Ereignissen den Schluß, dass eine Artenvielfalt und Mischkultur beim Anbau nötig sind, um solche Katastrophen zu verhindern [Hobhouse, 1996; bioSicherheit, 2002].

Obwohl die Kartoffel eine wichtige Rolle in der Ernährung spielt, geht der Pro-Kopf-Verbrauch in Deutschland zurück. In den 50er Jahren lag der Pro-Kopf-Verbrauch an Kartoffeln in Deutschland bei 150 kg und sank stetig. In den letzten Jahren hat er mit 67 kg den niedrigsten Wert in Deutschland erreicht. In der EU liegt der durchschnittliche Verbrauch mit 75 kg deutlich höher. Davon sind ca. 40 % industrielle Kartoffelerzeugnisse [Bayrischer Agrarbericht 2005; bioSicherheit, 2004].

Die Anbauggebiete der Kartoffel sind hauptsächlich die nördlichen Teile der EU. Die Anbaufläche für Kartoffeln verringerte sich von 1985 bis 2003 von 1,56 Mio ha auf 1,21 Mio ha in der EU. Durch die Wiedervereinigung Deutschlands kam es zunächst zu einer Steigerung der Anbaufläche, die in den folgenden Jahren verringert wurde. Eine erhebliche Auswirkung auf den Kartoffelanbau hatte die EU-Osterweiterung 2004. Die Anbaufläche in der EU erhöhte sich um 78% auf 2,2 Mio ha. Da die Ertragsrate in den neuen Beitrittsländern nicht so hoch ist stieg die Erntemenge der Kartoffeln um 39 % auf 65 Mio t 2004 an. Die Bevölkerung in der EU stieg durch die Osterweiterung nur um ca. 20 % auf 454 Mio Menschen an [Bayrischer Agrarbericht 2005].

Auch wenn die Bedeutung der Kartoffel als Grundnahrungsmittel stetig abnimmt, ist sie aus unserer Ernährung doch nicht weg zu denken. Neben 15-18 % Kohlenhydrate enthalten Kartoffeln 0,1 % Fett, 2 % Ballaststoffe, 2 % Protein und 77 % Wasser auch Vitamine (Vitamin B1, B6, C) und Mineralstoffe. Der Solanin Gehalt in rohen Kartoffeln schwankt je nach Sorte. Im Durchschnitt enthalten 100 g Kartoffeln 1,8 bis 9,4 mg Solanin. Der Gehalt an Kalium ist mit 411 mg/100g Kartoffel relativ hoch [CMA-Information, 2004].

Auf Grund der hohen biologischen Wertigkeit des Proteins mit 68 % (zum Vergleich: Hühnereiweiß hat eine Wertigkeit von 100) ist die Kartoffel ein ernährungsphysiologisch wertvolles Nahrungsmittel. Nach dem Sojabohneneiweiß hat die Kartoffel die zweithöchste Wertigkeit eines pflanzlichen Proteins. In Kombination mit Ei, Milch und Fischeiweiß kann die biologische Wertigkeit noch aufgewertet werden [Strahlmann, 2000; Kadamm, 1992; Meuser, 1980].

Als Stärkelieferant ist die Kartoffel in Deutschland sehr verbreitet. Dazu werden besonders stärkereiche Kartoffelsorten angebaut. Der Anteil der aus Kartoffeln gewonnenen Stärke belief sich 1998 auf 36 % der Gesamtstärkeproduktion. Im Gegensatz zu Weizen und Mais, die einen Stärkegehalt von 60-70 % haben, liegt der Stärkegehalt der Kartoffel nur bei 18 % im Durchschnitt. Dennoch werden in Deutschland auf Grund der hohen Erträge pro Hektar Anbaufläche mehr Kartoffeln als Getreide zur Stärkegewinnung angebaut [BMBF, 2002].

60 % der hergestellten Stärke werden in der Lebensmittelindustrie bei Süßwaren, Getränken und anderen Produkten dieser Sparte verarbeitet. Neben der Lebensmittelindustrie findet Stärke weitere industrielle Anwendung in der Papier- und Pappeherstellung, Baustoffindustrie, Textilherstellung, Klebstoffe, Kunststoffe und der Kosmetik- und pharmazeutische Produkte. Allein der Anteil der 2002 in der Papierindustrie verwendeten Stärke beläuft sich auf 29 % [bioSicherheit, 2004].

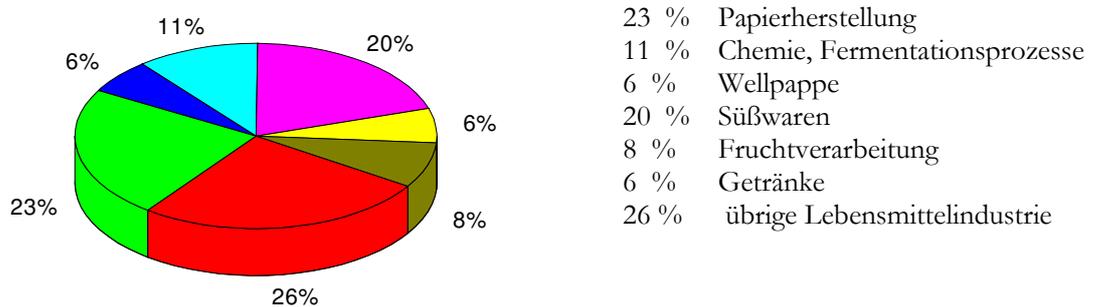


Abb. 2.1.: Verwendung von Stärke in der Industrie

2.1.1 Verarbeitung von Industriekartoffeln in der Stärkeindustrie

Zugelassen zur industriellen Verarbeitung sind ca. 20 verschiedenen Kartoffelsorten mit hohem Stärkeanteil. Der durchschnittliche Stärkegehalt einer industriellen Stärkekartoffel liegt bei 18,7 %. Eine Speisekartoffel enthält dagegen 15 % Stärke.

Die Stärkegewinnung beginnt mit der Reinigung und dem Zerkleinern der Kartoffeln. Anschließend trennen Dekanter das entstandene Kartoffelfruchtwasser (KFW) von den unlöslichen Bestandteilen wie Stärke und Fasern. Die Stärke wird durch Waschen in Separatoren von den Fasern getrennt und anschließend getrocknet.

Das verbleibende Kartoffelfruchtwasser darf nicht in die Kanalisation eingeleitet werden, da der Gehalt an löslichen Proteinen im Durchschnitt bei 20 g/L liegt. Europaweit fallen jährlich bei der Herstellung von 1,7 Millionen Tonnen Stärke 120000 t lösliche Proteine in 6 Millionen Tonnen Kartoffelfruchtwasser an. Würden diese Mengen an Abwasser abgeführt, wäre eine Überdüngung der Gewässer die Folge. Das KFW wird durch Umkehrosmose aufkonzentriert. Damit die folgenden Schritte der Weiterverarbeitung energieökonomischer ausgeführt werden können. Aus dem Konzentrat des KFW werden durch Hitzeagulation, Dekantierung und Trocknung

Kartoffeleiweiß gewonnen. Dieses Roheiweiß und die Pülpe (Fasern, bei denen auf Grund der Feuchtigkeit eine spontane Milchsäurevergärung stattfindet) werden momentan als Viehfutter verkauft. Das proteinfreie KFW wird dem Gesamtprozess als Prozesswasser und Waschwasser wieder zugeführt [Strolle, 1973; Heyde, 1998].

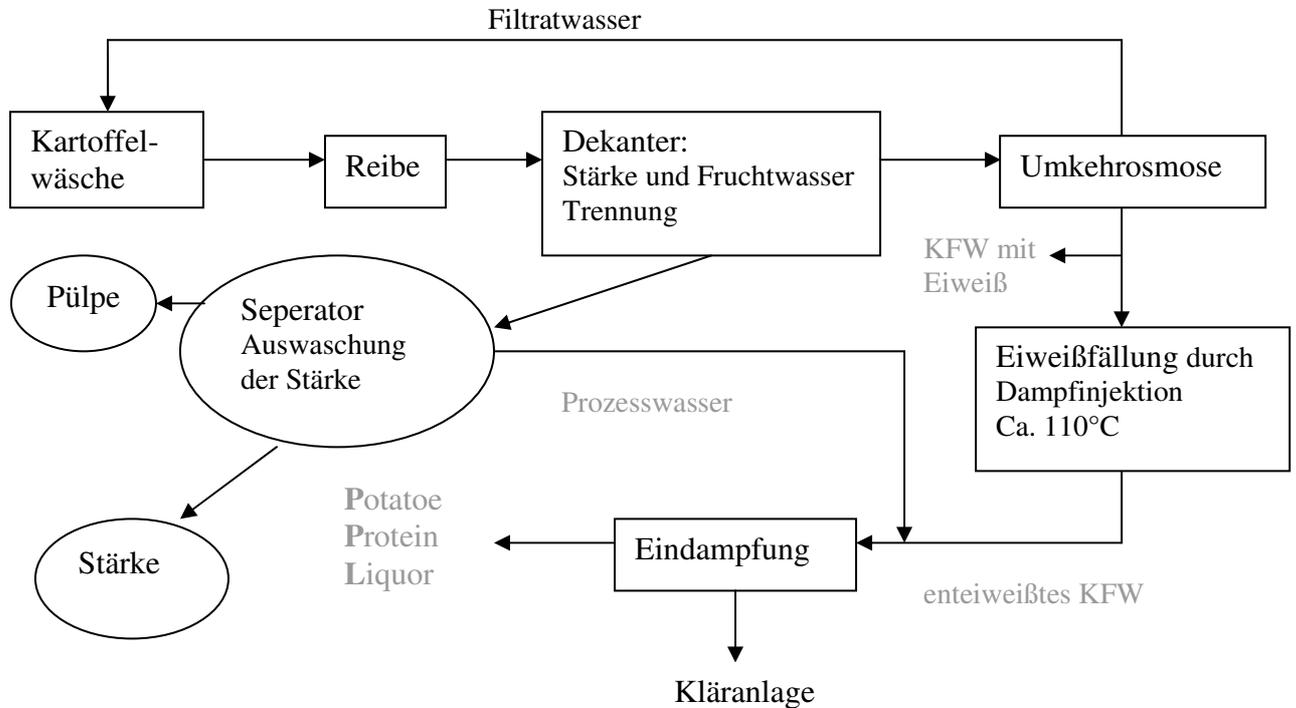


Abb. 2.2: Schema der industriellen Kartoffelbruchwassergewinnung [Lotz, 2003]

2.1.2 Kartoffelbruchwasser aus der Stärkeindustrie

Das in dieser Arbeit verwendete Kartoffelbruchwasser ist ein Nebenprodukt der industriellen Stärkeherstellung. In der Kampagne 2001/2002 waren die am häufigsten verwendeten Sorten Seresta, Producent, Elkana, Aurora und Allure. Die Stärkekonzentration dieser Sorten liegt bei 18,5 bis 19,6 %. Die Anlieferung und Verwendung der Sorten Senestra und Producent lag in der Kampagne 2001/2002 bei 19,4 % bzw 15,2 %. Der Anlieferungsanteil der restlichen Sorten lag unter 10 % [Emslandstärke GmbH, 2002].

Durch die verschiedenen verwendeten Sorten sind der Proteingehalt und pH-Wert des Kartoffelbruchwassers in jeder Kampagne, zum Teil von Tag zu Tag unterschiedlich. Ebenso hat die Wetterlage einen großen Einfluss auf den Protein- und Stärkegehalt der Kartoffel [Rosenau et al, 1979; Finley/Hautala, 1976].

2.1.3 Kartoffelproteine

Die Kartoffelproteine des Kartoffelfruchtwassers können in drei Hauptgruppen eingeteilt werden [Pots 1999, van Koningsveld 2001]. Patatin ist das Hauptprotein der Kartoffel und hat einen Anteil von ca. 40 % löslichem Protein im Kartoffelfruchtwasser. Die Gruppe der Proteaseinhibitoren haben einen Anteil von 50 % am löslichen Protein der Kartoffel und stellen damit mengenmäßig die größte Gruppe. Sie besteht aber aus einer Mischung vieler unterschiedlicher Proteine. Die restlichen 10 % sind Proteine, die nicht weiter klassifiziert werden. Die Anteile der löslichen Proteine im Kartoffelfruchtwasser sind nicht genau zu bestimmen, da jede Kartoffelsorte abweichende Angaben zu den einzelnen Gruppen aufweist [Pouverein et al, 2001; Ralet/ Gueguen, 1999; Allen et al, 1996; Horn, 1979; Kapoor, 1975; Labib, 1962].

2.1.4 Patatin

Der Name Patatin wurde von Racusen und Foote 1980 [Racusen and Foote, 1980] geprägt und leitet sich von Patate ab. Erste Untersuchungen an Kartoffelproteinen gab es bereits schon am Ende des 19. Jahrhunderts von Osborne und Campbell. Sie beschrieben in ihrer Arbeit ein Protein Tuberin, dass sie zu dem Hauptteil der löslichen Kartoffelproteine zählten. Mit der Einführung der Chromatographie und Gelelektrophorese standen den Wissenschaftlern weitere Methoden zur Untersuchung von Proteinen zur Verfügung. Anfang der 70er Jahre wurde das Protein von Galliard und Dennis eingehender untersucht und teilweise charakterisiert [Galliard, 1971; Dennis/Galliard, 1974; Knorr, 1977]. In den 80er Jahren setzten verschiedene Gruppen diese Untersuchungen fort [Knorr, 1980; Park, 1983; Paiva, 1983; Racusen und Weller, 1984; Lindner et al, 1980].

Patatin stellt eine Familie von 40-43 kDa schweren Glycoproteinen dar und ist ein Speicherprotein der Kartoffel. Racusen und Weller bestimmten vor 20 Jahren das Molekulargewicht des Patatins mit 45 kDa, neuere Messungen ergaben ein durchschnittliches Gewicht von 43 kDa. Untersuchungen von Pots zeigten die Existenz von Isoformen des Proteins mit Massen von 40,3 und 41,6 kDa (bestimmt über MALDI-TOF). Signifikante Unterschiede der einzelnen Isoformen in Bezug auf strukturelle und konformative Eigenschaften konnten nicht nachwiesen werden. [Pots, 1999].

Der isoelektrische Punkt von Patatin liegt zwischen pH 4,5 und 5,2. Er ist sortenabhängig, hängt aber auch von der Lagerung der Kartoffel und den damit verbundenen Abbauprozessen von Proteinen ab [Racusen and Foot, 1980; Rosahl et al, 1986; Pots, 1999]. Patatin liegt in wässrigen Lösungen bei pH 7 bis 9,4 dimer (80-88 kDa) vor. Durch den Einsatz von SDS oder Mercaptoethanol wird das Patatindimer teilweise gespalten.

Die Sequenz von Patatin besteht aus 362 Aminosäuren, die gleichmäßig verteilt sind und keinen hydrophoben oder hydrophilen Schwerpunkt haben. Auch sind die positiven und negativen Ladungen der Seitenketten gleichmäßig über das Molekül verteilt [Pots, 1999].

Trotz der Bedeutung der Kartoffel als Lebensmittel und Proteinlieferant haben sich nur wenige Arbeitsgruppen in den letzten 20 Jahren mit diesem Thema befasst. Erst Ende der 90er Jahre wurde vermehrt auf dem Gebiet geforscht.

2.1.5 Protease Inhibitoren

Die Protease Inhibitoren (PI) machen bis zu 50 % der löslichen Proteine der Kartoffel aus und bilden im Gegensatz zur Patatinfamilie eine Gruppe, die in Molekülmasse, Aminosäuresequenz, Inhibitoreigenschaften und Aktivität stark variiert [Kassam, 1978; Pouvreau, 2001; Hass, 1975; Huang, 1981; Richardson, 1974; Suh, 1990]. Sie haben eine wichtige Funktion in der Pflanze zur Bekämpfung von Schädlingen, Pilzen und Schädigung durch Umwelteinflüsse. Allgemein werden die PI als eine Gruppe kleiner, hitzeresistenter und cysteinreicher Proteine mit einer Masse von 3-23 kDa beschrieben. Sie können in sieben verschiedene Inhibitorgruppen eingeteilt werden [van Koningsveld, 2001]. Die folgende Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die Protease Inhibitoren und ihren Charakteristika.

Tab. 2.2: Protease Inhibitoren der Kartoffel

| Gruppe | Molmasse in kDa | pI-Wert | Anteil am löslichen Protein in % |
|---|------------------------|----------------|---|
| Protease Inhibitor I (PI 1) | 7,8 | 5,1-7,8 | 4,5 |
| Protease Inhibitor II (PI 2) | 10,2 (Dimer 20,4) | 5,5-6,9 | 22 |
| Potatoe Cystein Protease Inhibitor (PCPI) | 20,1- 22,8 | 5,8- 9 | 12 |
| Kunitz Protease Inhibitor (PKPI) | 20,2 | 8-9 | 4 |
| Carboxypeptidasen (PCI) | 4,3 | unbekannt | 1 |
| Serin Protease Inhibitoren (OSPI) | 21,8 | 7,5- 8,8 | 1,5 |
| Potatoe Aspartyl Protease Inhibitoren (PAPI) | 19,9- 22 | 6,2- 8,7 | 6 |

2.1.6 Andere Proteine im Kartoffelfruchtwasser

Im restlichen Proteinanteil von 10-12 % sind alle Proteine zusammengefasst, die nicht unter die erst genannten Gruppen fallen. Dazu gehören das 66,5 kDa schwere Lectin [Allen et al., 1996] und Phenoloxidasen mit einem Molekulargewicht von 60 bis 69 kDa [Partington and Bolwell, 1996]. Ebenso sind noch Proteinkinasen und hochmolekulare Enzyme [Gerbrandy and Doorgeest, 1972] mit 140, 180 und 600 kDa im Kartoffelfruchtwasser zu finden.

2.2 Membranen und Membranverfahren

Membranen kommen in der Natur vor (z.B. Pflanzenmembranen zur Osmose), finden aber auch Anwendung in der Technik und in der Medizin (Dialysemembranen). Schon 1861 wurden von Graham synthetische Membranen bei Dialyseversuchen verwendet. Die grundlegenden Membranprozesse sind heute die Umkehrosmose, die Pervaporation und die Gaspermeation. In der Umkehrosmose wird eine Aufkonzentration durchgeführt, wobei die Vorlage und das Permeat flüssig sind. Bei der Pervaporation ist das Einsatzgemisch (Vorlage) ebenfalls flüssig, das Permeat jedoch gasförmig. Bei der Gaspermeation sind beide Komponenten gasförmig. Die Grundanwendungen sind Konzentrierung von Lösungen oder Partikeln, Aufreinigung durch Abtrennung von unerwünschten Stoffen und Fraktionierung einer Mischung in einzelne Komponenten [Rautenbach, 1997; Dellweg, 1987].

Wichtig für jeden technischen Prozeß ist die Wirtschaftlichkeit. Dabei sind die zwei Eigenschaften Selektivität und Leistungsfähigkeit von großer Bedeutung. Über die Selektivität wird die Gewinnung des Produktes gesteuert. Je nach Art des Produktes fällt es als Permeat oder Retentat an, die Membranen müssen entsprechend der Eigenschaften des Produktes ausgewählt werden. Die Selektivität S ist über die Zusammensetzung des Produkts und des Ausgangsgemisches definiert. Ein Mangel an Selektivität kann nicht wie die Leistungsfähigkeit über eine Vergrößerung der Membranfläche ausgeglichen werden. Stattdessen müssen meist mehrstufige Prozesse durchgeführt werden.

Membranen können auf Grund ihrer Porengrößen in vier Gruppen unterteilt werden. Die Gruppen gehen von Mikrofiltrationsmembranen ($10\text{-}0,1\ \mu\text{m}$) über Ultrafiltrations- ($0,2\ \mu\text{m}$ - $1\ \text{nm}$) und Nanofiltrationsmembranen ($1\ \text{nm}$ - $0,1\ \text{nm}$) bis hin zu Membranen für Umkehrosmose (Porengröße $< 0,1\ \text{nm}$) [Plate, 2003].

Neben der reinen Größenfiltration der Partikel werden Membranen mit aktivierten Oberflächen in verschiedenen Bereichen eingesetzt. So können Membranen als Adsorber in chromatographische Prozesse eingesetzt werden.

2.2.1 Membranfiltration

Grundsätzlich wird die Separation von Partikeln aus einem Fluid mit Hilfe von Membranen als Filtration bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine rein physikalische Trennmethode. Das zu filtrierende Fluid wird als *Feed* bezeichnet. Der *Feed*-Strom teilt sich in zwei Ströme im Membranprozess. Das überfließende und nicht durch die Membran tretende Fluid wird als Retentat bezeichnet und das durch die Membran geführte Fluid ist das Permeat. Je nach Versuchsanordnung und Bedingungen kann das konzentrierte Retentat oder das Permeat das Produkt sein oder enthalten [Mulder, 1991; Gasper et al, 2000].

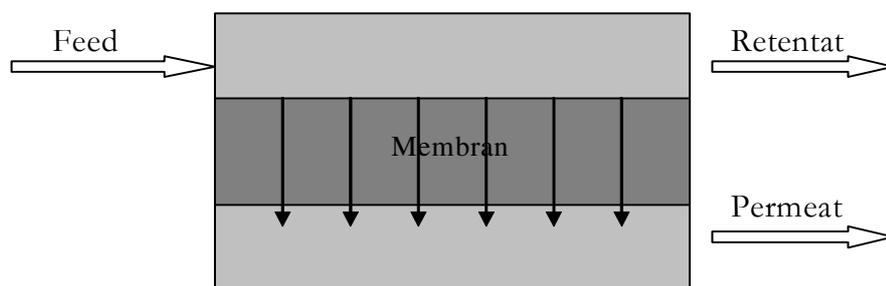


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Membranfiltration

Während einer Membranfiltration wird die zu trennende Probe mittels hydrostatischem Druck durch die Membran gedrückt. Ein Teil der Probe passiert die Membran, ein anderer wird von der Membran zurück gehalten. Um Probleme zu umgehen, gibt es zwei Arten der Prozessführung mit Membranen. Die am häufigsten verwendete Prozessführung ist die Querstrom- oder *Cross-Flow*-Filtration. Das zu filtrierende Fluid wird nicht orthogonal, sondern parallel zur Membranoberfläche geführt. Sich dabei bildende Sedimentschichten oder Filterkuchen werden durch die Strömung und die Scherkräfte wieder abgetragen. Im Gegensatz dazu ist die Bildung einer Deckschicht aber bei manchen Filtrationen im Mikro- und Ultrafiltrationsbereich erwünscht. So kann eine Verblockung der feinen Innenporen der Membran verhindert werden. Die *Cross-Flow*-Filtration findet vielseitige Anwendung in der Lebensmittelindustrie und in der Pharmazeutischen Industrie. Bevorzugt eingesetzt wird sie zur Abtrennung großer Moleküle, sowie bei hohen Produktkonzentrationen im Fluid.

Eine weitere Prozessführung ist die statische Filtration, auch *Dead-end*-Filtration genannt. Dabei wird das zu filtrierende Fluid orthogonal zur Membranoberfläche durch die Membran geführt. Der Nachteil dieser Methode ist der dabei entstehende Filterkuchen auf der Membran, durch den die Filtrationszeit limitiert ist. Die Filtration muss gestoppt, der Filterkuchen entfernt und die

Membran gereinigt werden. Daraus resultiert eine begrenzte Lebensdauer. Vorteile bietet diese Methode jedoch beim Einsatz von Lösungen, deren Inhaltsstoffe niedrige Konzentrationen aufweisen. Ebenso wird diese Methode in der Adsorbertechnik eingesetzt, wo partikelfreie Lösungen verwendet werden. Die Bildung eines hemmenden Filterkuchens wird dabei größtenteils verhindert [Mulder, 1991; Ho, 1992].

Beide Techniken bieten insgesamt Vorteile gegenüber anderen klassischen Trennmethode, wie zum Beispiel Zentrifugation, Destillation, Gelfiltration und chromatographischen Techniken. Ein entscheidender Punkt ist die Variabilität und die Anpassungsfähigkeit der Membranen an das zu gewinnende Produkt. Die Energiekosten sind niedrig und eine Integration in bestehende Prozesse ist meist mit einfachen Mitteln möglich. Da die Filtrationen bei Raumtemperatur stattfinden, ist der Prozess schonend für das Produkt und gewährleistet eine hohe Qualität.

2.2.2 Membranadsorber

Unter Adsorbiersystemen versteht man Module, die mit adsorbierenden Membranen bestückt sind. An den Poreinnenwänden der Membranen sind funktionelle Gruppen fixiert. Diese können je nach Eigenschaften der Gruppen in der Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie verwendet werden. Die Adsorber werden nach dem *Dead-end*-Prinzip betrieben.

Als Membranmaterial werden Cellulose, Polymerträger oder Silicagel in Form von dünnen Disks verwendet. An der Membranmatrix Cellulose können unterschiedliche Liganden und funktionelle Gruppen in Schichten angebracht werden. Für Ionenaustauschchromatographie sind im Handel Adsorber mit schwachen und starken Kationen- und Anionenaustauschern für den Labor- und den Technikumsmaßstab erhältlich. Protein A- Membranen, Epoxy und IDA-Membranen werden für die Affinitätschromatographie angeboten.

Die Trennung von Proteinen und Peptiden aus einem Gemisch durch Membranchromatographie erfolgt über den Rückhalt der Substanzen. Die Komponenten der mobilen und stationären Phase interagieren miteinander in unterschiedlichem Maß. Bei starker Bindung an die stationäre Phase werden Teilchen stärker zurückgehalten und sie wandern unterschiedlich schnell und unabhängig von der Flussrate durch das Membranbett. Ein weiterer Trenneffekt betrifft die Fortbewegung der Teilchen durch die stationäre Phase mit ihren Zwischenräumen und Poren. In der Membranchromatographie tritt eine geringere Zonenverbreiterung als bei den konventionellen Säulen auf. Bei Durchfluss der Teilchen durch das Membranbett treten durch Inhomogenitäten

(Diffusion, ungleichmäßige Substanzverteilung und nichtlineare Flusseigenschaften) diese Zonenverbreiterungen auf.

Der Einsatz von Membranadsorbern bietet in der Chromatographie viele Vorteile gegenüber den klassischen Füllmaterialien in Chromatographiesäulen. 95 % der Aufnahmekapazität eines Partikels (Bead) in einem klassischen Gel liegen in seinem Innern. Die Moleküle gelangen durch die Poren an der Oberfläche in das Bead und erhalten somit nur durch Porendiffusion Zugang. Daraus resultieren lange Diffusionsstrecken (Durchschnittsgröße eines Partikels beträgt 90 μm) für ein Molekül in einem Gel.

Kurze Diffusionsstrecken ergeben sich bei Membranadsorbern. So sind die adsorptiven Schichten bei Ionenaustauschermembranen 0,5 -1 μm dick. Die Moleküle müssen nur eine Filmdiffusion durchlaufen, wodurch eine porendiffusionskontrollierte Austauschkinetik entfällt. Die Flussraten können so gegenüber der klassischen Säulenchromatographie erhöht werden [Sartorius, 2004]. Der herabgesetzte Widerstand auf Grund einer erhöhten Porosität bei Membranen erlaubt einen größeren Volumendurchsatz. Die Verweilzeit eines Teilchens im Membranbett ist verkürzt und damit auch die Prozesszeit

Ein weiterer Vorteil der Membranadsorber im Vergleich zu dem klassischen Säulenmaterial sind die konstanten dynamischen Bindungskapazitäten. Die Flussgeschwindigkeiten zur Beladung der Adsorbermembranen können auf bis zu 100 ml/min erhöht werden, eine vergleichbare Säule kann nur mit einer Flussgeschwindigkeit von maximal 10 ml/min gefahren werden. Diese Möglichkeit reduziert ebenfalls die Prozesszeiten erheblich.

Ein Nachteil der Membranadsorber ist die im Verhältnis zur konventionellen Chromatographiesäule geringere Kapazität. Dadurch können Minorkomponenten aus Proteingemischen oftmals nur unzureichend abgetrennt und aufgereinigt werden.

Der Hauptvorteil der Adsorber- und Membrantechnik liegt in der einfachen Handhabung der Membranadsorber. Sie erleichtert das Arbeiten und ermöglicht ein schnelleres *Up-Scaling* vom Labor- in den Technikumsmaßstab. Niedrige Anlage- und Prozesskosten machen die Adsorbertechnik zu einer leistungsstarken Alternative.

In dieser Arbeit wurde nur mit Ionenaustauschermodulen im Labormaßstab der Firma Sartorius AG gearbeitet.

3 Praktischer Teil

3.1 Verwendete Membranensysteme

3.1.1 Sartobind 15 und 75

Die Matrix der in dieser Arbeit verwendeten Membranen der Firma Sartorius AG, Göttingen besteht aus regenerierter Cellulose. Sie haben eine Porenweite von $0,45 - 3 \mu\text{m}$ und gehören zu den makroporösen Membranen. Die Membranen sind in Adsorbermodule aus Kunststoff (Polysulfon) eingefügt. Verwendet wurden Module MA 15 mit 3 Lagen Membranen und einer Oberfläche von 15 cm^2 und Module MA 75 mit 15-lagigen Membranen mit einer Gesamtoberfläche von 75 cm^2 . Die Flussrichtung ist orthogonal zur Membranoberfläche. Die maximale Flussrate der Module beträgt 50 ml/min für die Sartobinds 15 und 75 ml/min für die größeren 75er Module.

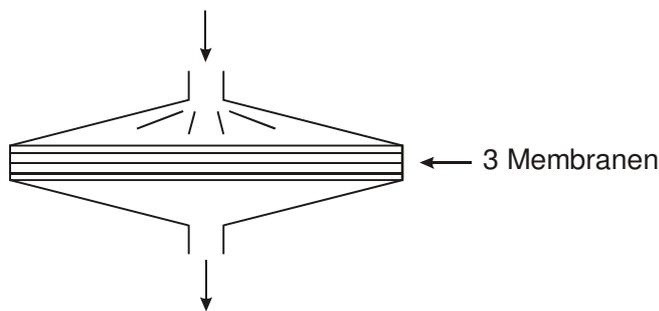


Abb 3.1: Schematische Darstellung eines Adsorbermoduls



Die Module wurden in einer PC gesteuerten FPLC eingesetzt. Vor dem Beladen mit KFW müssen die Adsorber mit Puffer equilibriert werden. Verwendet wird dazu der jeweilige Laufpuffer, ein niedrig konzentrierter Phosphatpuffer. Spülen mit 10-15 ml ist bei den kleinen Einheiten zur Equilibrierung ausreichend. Für eine optimale Auftragung und Verteilung auf den Membranen ist es essentiell, dass die Module blasenfrei betrieben werden. Die Adsorbermodule werden in der FPLC nach verschiedenen Programmen beladen und eluiert (siehe Kap 3.5 und Anhang).

Nach Benutzung der Module müssen die Membranen gegebenenfalls mit 0,2 bis 1 M Natronlauge gespült oder für 1 Stunde in NaOH gelagert werden. Die Lauge wird anschließend durch gründliches Spülen wieder entfernt. Die Module müssen bei Benutzung laugenfrei sein.

Um eine Besiedelung mit Bakterien zu vermeiden wurde eine Lösung aus 20 % Ethanol und 1 M KCl verwendet oder Natriumazid der Lösung zugefügt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Adsorber arbeiten nach dem Ionenaustauschprinzip, bzw. nach der Ionenaustauschchromatographie. Verwendet wurden Membranadsorber mit starken Kationen (S)- und Anionenaustauschern (Q), ebenso schwache Kationen (C)- und Anionentauscher (D). Die Bindungskapazitäten der einzelnen Membrantypen wurden mit Standardproteinen bestimmt und sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tab 3.1: Bindungskapazitäten der Membranadsorber [Quelle: Sartorius, Technical specification]

| Typ | Standardprotein | MA 15 | | MA75 | |
|----------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | Gesamtproteinmenge | mg/cm ² | Gesamtproteinmenge | mg/cm ² |
| S | Lysozym | 12 mg | 0,8 | 60 mg | 0,8 |
| C | Lysozym | 9 mg | 0,6 | 45 mg | 0,6 |
| Q | BSA | 12 mg | 0,8 | 60 mg | 0,8 |
| D | BSA | 9 mg | 0,6 | 45 mg | 0,6 |

3.1.1.1 Ionenaustauschchromatographie

In der Proteinreinigung ist die Ionenaustauschchromatographie eine grundlegende Technik und wird meist als erster Schritt im Aufarbeitungsprozess eingesetzt. Dabei konkurrieren die Proteinmoleküle mit den Salz-Ionen um die freien Plätze an der Ionenaustauschermatrix. Die Coulomb'schen Wechselwirkungen bewirken die Anziehung und Bindung der geladenen Gruppen.

Im ersten Schritt binden die Proteinmoleküle an die freien Plätze der Matrix und werden in einem zweiten Schritt durch eine höhere Konzentration einer zur Matrix affinen Ionensorte von den Plätzen verdrängt. Eine Trennung in einzelne Proteinfractionen erfolgt meist durch eine Veränderung der Salzkonzentration im Eluenten.

Die Grundlage dieser Technik ist, dass Proteine aufgrund der sauren und basischen Seitenketten positive und negative Ladungen tragen. Der Gesamtladungszustand ist abhängig vom pH-Wert des umgebenden Puffers. Auf Grund des charakteristischen, amphoteren Verhaltens der Proteine kann ein Punkt der Ladungsäquivalenz bestimmt werden, der pI-Wert. An diesem neutralen

Punkt kompensieren sich die negativen und positiven Ladungen des Proteinmoleküls und haben eine Nettoladung von Null. Der pH-Wert bei dem dieser Zustand vorliegt ist der isoelektrische Punkt und ist spezifisch für das jeweilige Molekül.

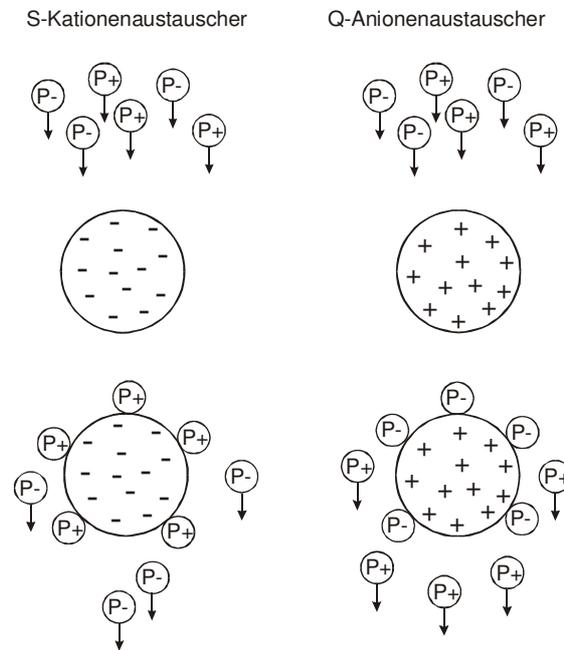


Abb 3.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Anionen- und Kationenmembran

Wichtig ist diese Eigenschaft bei Einsatz eines Ionenaustauschers. Um eine starke Bindung an den Ionenaustauscher zu gewährleisten, muss der pH-Wert des Puffers sich vom pI-Wert um ca. 1-2 Einheiten unterscheiden. Die Moleküle liegen dann geladen vor und können mit der Ionenaustauschermatrix wechselwirken. Bei den hier eingesetzten Adsorbentien sind die Austauscherguppen an der Poreninnenoberfläche fixiert.

Unterschiedliche funktionelle Gruppen werden als Austauscherguppen bei Ionenaustauschern eingesetzt (siehe Tabelle 3.2). Generell unterteilt man in starke und schwache Anionen- und Kationenaustauscher. Zu den starken kationischen Austauschern zählen die Sulfomethyl (S) und Sulfopropylgruppen (SP), starke anionische Austauscher sind quarternäre Ammoniumverbindungen wie Trimethylaminoethyl (Q) und Hydroxylpropyldiethylaminoethyl (QAE). Als starke Ionenaustauscher bezeichnet man Gruppen, die ihren Ladungszustand über einen weiten pH-Bereich beibehalten und der Ionenaustausch stattfinden kann. Schwache Ionenaustauscher haben dagegen nur einen eng begrenzten pH-Bereich, in dem sie aktiv sein können. Entscheidend für den Ladungszustand des Austauschers ist der pK-Wert. Liegt ein pK von 4,5 vor, so bedeutet das bei einem pH-Wert unter 5, dass zum Beispiel eine Carboxylgruppe ungeladen vorliegt und nicht als austauschende Gruppe genutzt werden kann. Zu den schwachen kationischen Austauschern gehören Carboxymethylgruppen (C), schwache anionische

Austauscher sind Diethylaminoethylgruppen (D) [Lottspeich, 1998; Righetti, 1983; Yamamoto, 1988].

Tab. 3.2: Funktionelle Gruppen an Ionenaustauschern

| Bezeichnung | Abkürzung | Typ |
|---|-----------|--------------------|
| quartäre Hydroxylpropyldiethylaminoethyl | QAE | Stark anionisch |
| quartäre Trimethylaminoethyl | Q | Stark anionisch |
| Diethylaminoethyl | DEAE | Schwach anionisch |
| Carboxymethyl | C | Schwach kationisch |
| Sulfomethyl | S | Stark kationisch |
| Sulfopropyl | SP | Stark kationisch |
| Diethylamin | D | Schwach anionisch |

3.1.2. Spinmodule Vivapure

Neben den größeren Adsorbermodulen wurden für Vorversuche und zur Trennung von Standardproteinen Spinmodule mit einem Fassungsvermögen von 500 µl verwendet. Die Spinmodule Vivapure Mini sind von der Firma



Vivascience, Hannover. Die Spinmodule enthalten Ionenaustauschermembranen in 1 bis 5 Lagen. Die Membranoberflächen betragen bei den Vivapure Mini M-Einheiten 1,87 cm² und bei den Mini H-Einheiten 7,48 cm². Bestimmt wurden die Bindungskapazität der Membranen mit dem Standardprotein BSA für die Q und D Spinmodule, Cytochrom C wurde als Standardprotein für die S und C Spinmodule verwendet. Die Bindungskapazität liegt bei 0,53 mg/cm² [Herstellerangaben Vivascience, 2000].

Die Spinmodule werden mit der Probe befüllt und durch Zentrifugation nach einem bestimmten Zeit- und Geschwindigkeitsprofil betrieben. Die auf der Oberfläche der Membranen adsorbierten Moleküle werden durch Elution mit steigender Salzkonzentration im Puffer von der Membran

gelöst. Durch Zentrifugation gelangt der Eluent durch die Membran und wird in einem Behältnis aufgefangen. Das verwendete Standardprotokoll ist im Anhang beschrieben.

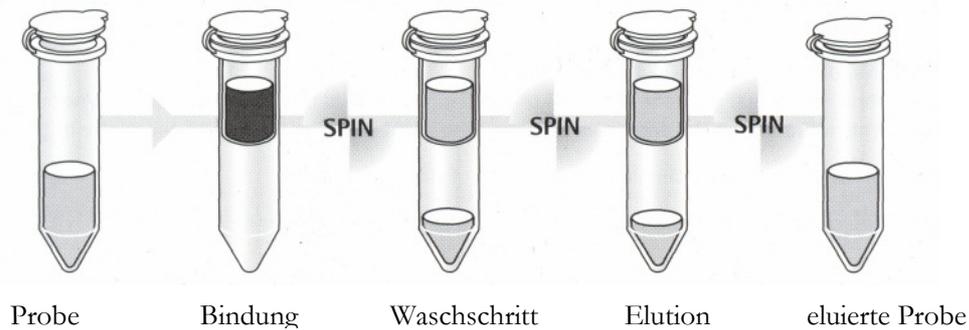


Abb. 3.3: Ablaufschema zur Handhabung der Vivapure Spineinheiten [Vivascience, 2000]

3.2 Auftrennungsversuche von Standardproteinmischungen über Ionenaustauschermodule

Um die Leistungsfähigkeit von Ionenaustauschermembranen in Spinmodulen und Adsorbereinheiten nach dem *Dead-end*-Prinzip zu testen, sollten Standardproteinmischungen aufgetrennt werden. Verwendet wurden dafür Zentrifugenmodule (Vivapure mini H) der Firma Vivascience AG und Adsorbermodule der Firma Sartorius mit starken Ionenaustauschermembranen. Die Auswahl der Proteine erfolgte derart, dass jeweils ein Protein der Mischung unter den gewählten Bedingungen nicht an die Membran binden sollte.

Tab. 3.3: Proteingemisch 1 zur Trennung über Kationenaustauscher-Membranen

| Proteine | Isoelektrischer Punkt | Molekülmasse [kDa] |
|---------------------|-----------------------|--------------------|
| Humanes Albumin | pI 4,8 | 66,5 |
| Trypsinogen | pI 9,3 | 25,0 |
| Lysozym (Egg white) | pI 11,0 | 14,3 |

Tab. 3.4: Proteingemisch 2 zur Trennung über Anionenaustauscher-Membranen

| Proteine | Isoelektrischer Punkt | Molekülmasse [kDa] |
|------------------|-----------------------|--------------------|
| Amyloglucosidase | pI 3,5 | 97 |
| Carboxypeptidase | pI 6,0 | 34 |
| Lysozym | pI 11,0 | 14,3 |

[Righetti, 1983; Vivascience, 2000]

Das Gemisch zur Trennung über eine S-Membran enthält humanes Albumin, das auf Grund des niedrigen pI-Wertes bei den gewählten pH-Werten des Auftragspuffers nicht auf der Membran binden sollte. Die andere Standardmischung enthält Lysozym, welches nicht auf der Q-Membran bindet. Diese beiden Proteine sollen bei den jeweiligen Versuchen durch die Membran fließen, ohne zurückgehalten zu werden.

Zur Herstellung der Standardproteingemische wurden die entsprechenden Proteine zu gleichen Anteilen eingewogen und entsprechend einer Konzentration von 5 mg/ml Gesamtprotein gelöst. Die Konzentration der einzelnen Proteine betrug 1,67 mg/ml.

3.2.1 Trennung eines Standardproteingemisches mittels Vivapure S (Spinmodul mit Kationenaustauscher-Membran)

Alle Arbeiten in diesem Abschnitt wurden in Vivapure Mini H –Einheiten, die S-Membran beinhalteten, durchgeführt. Verwendet wurde 400 µl Standardproteingemisch 1. Die Arbeiten wurden gemäß Protokoll (siehe Anhang) durchgeführt. Die Ionenaustauschermembranen mussten vor der Verwendung mit Puffer equilibriert werden. Die S-Membranen wurden mit Acetatpuffer (pH 5,5) equilibriert. Anschließend wurden die Membranen mit jeweils 400 µl Standardgemisch (entspricht 2 mg Gesamtprotein) beladen. Um eine Überladung der Membranen zu verhindern, wurden nur 50 % der Kapazität ausgenutzt (Bindungskapazität 4 mg/pro Kartusche, siehe Herstellerangaben). Überschüssige Proteine, die nicht auf der Membran gebunden wurden, wurden in einem Waschschrift von der Membran gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden anschließend mit NaCl in Puffer in 0,1 molaren Schritten im Bereich von 0,1 bis 1,5 M von der Membran eluiert. Die so gewonnenen proteinhaltigen Fraktionen wurden einem Protein Test (Coomassie Plus, Pierce, Großbritannien) unterzogen und der Gesamtproteingehalt bestimmt.

Die Untersuchung ergab für die Fraktionen von der S-Membran, dass 79,2 % der eingesetzten Proteine auf der Membran binden, obwohl die Beladungskapazität von 4 mg Protein/ Modul nicht ausgeschöpft wurde. 20,8% der eingesetzten Proteine haben nicht auf der Membran gebunden und konnten im Durchlauf nachgewiesen werden. Die Hauptmenge der gebundenen

Proteine (13,1%, 12,5% und 10,7%) wurde mit 0,1 M, 0,2 M und 0,5 M NaCl in Acetatpuffer pH 5,5 von der Membran eluiert,

Tab. 3.5: Ergebnisse der Proteingehaltsbestimmung (Coomassie Plus Test, Pierce)

| Fraktion | Gesamtproteingehalt [%] | Gesamtproteingehalt in [mg] |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Durchlauf | 20,8 | 0,42 |
| 0,1 M NaCl in Puffer | 13,1 | 0,26 |
| 0,2 M NaCl in Puffer | 12,5 | 0,25 |
| 0,3 M NaCl in Puffer | 9,9 | 0,2 |
| 0,4 M NaCl in Puffer | 8,8 | 0,18 |
| 0,5 M NaCl in Puffer | 10,7 | 0,21 |
| 0,6 M NaCl in Puffer | 8,5 | 0,17 |

In den restlichen Elutionsschritten lag der Anteil an gelöstem Protein unter 10 %. Es scheint ein gleichförmiger Ionenaustausch in den einzelnen Elutionsschritten statt zu finden. Das weist auf keine spezifische Separation in einzelne Proteinfractionen hin. Bestätigt wird die Annahme durch eine gelelektrophoretische Untersuchung.

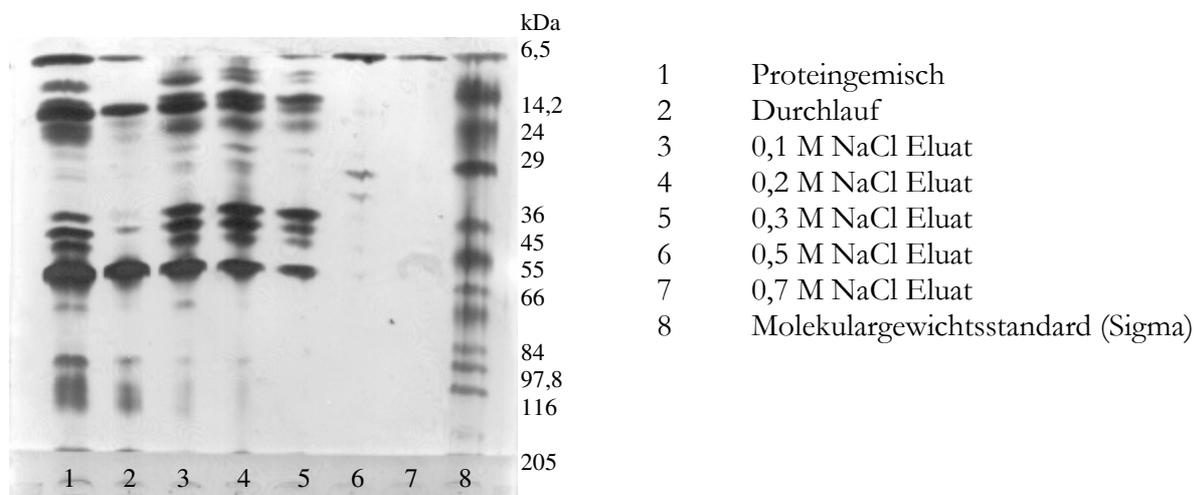


Abb 3.3: Proteintrennung über Vivapure S, SDS-PAGE-Gel (12,5 %, Silberfärbung; Phast-System, Amersham Pharmacia)

Es konnte keine Auftrennung der Proteine unter den gewählten Bedingungen erreicht werden. HSA erscheint in der Durchlaufraction und in jeder Elutionsfraction. Trypsinogen und Lysozym werden ebenfalls nicht separat von der Membran gelöst, sondern nur als Gemisch.

3.2.2 Trennung eines Standardproteingemisches mittels Vivapure Q (Spinmodul mit Anionenaustauscher-Membran)

Die Arbeiten mit den Vivapure Mini H-Modulen mit Q-Membran wurden mit 400 µl Standardproteingemisch 2 gemäß Protokoll (siehe Anhang) durchgeführt. Als Auftragspuffer wurde 25 mM Tris-HCl-Puffer pH 8 verwendet.

Die Untersuchungen der gewonnenen Fraktionen der Q-Membran ergaben, dass 49,18 % der eingesetzten Proteine auf der Membran binden. 50,8 % der Proteine blieben ungebunden und wurden im Durchlauf nachgewiesen. Auch in diesem Fall wurde die Beladungskapazität von 4 mg Protein/ Modul nicht voll ausgeschöpft. Die Hauptmenge der Proteine wird mit 0,1, 0,2 und 0,4 M NaCl in Tris-HCl- Puffer pH 8 von der Membran eluiert.

Tabelle 3.6: Ergebnisse der Proteingehaltsbestimmung (Coomassie Plus Test)

| Fraktion | Gesamtproteingehalt [%] | Gesamtproteingehalt [mg] |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| Durchlauf | 50,8 | 1,02 |
| 0,1 M NaCl in Puffer | 17,3 | 0,35 |
| 0,2 M NaCl in Puffer | 13,6 | 0,27 |
| 0,3 M NaCl in Puffer | 4,9 | 0,1 |
| 0,4 M NaCl in Puffer | 11,7 | 0,23 |
| 0,5 M NaCl in Puffer | 1,3 | 0,03 |

In den folgenden Elutionsfraktionen konnten keine Proteine mehr nachgewiesen werden.

Die Untersuchung mittels Gelelektrophorese hat gezeigt, dass sich Lysozym im Durchlauf befindet. Die Bindung kann auf der Q- Membran nicht erfolgen. Die Durchlauf fraktion (Abb. 3.4: Gel 2, Bahn 6) ist frei von den anderen Proteinen. In den folgenden Elutionsfraktionen wurden nur Gemische der Proteine nachgewiesen; eine weitere Auftrennung konnte nicht erreicht werden.

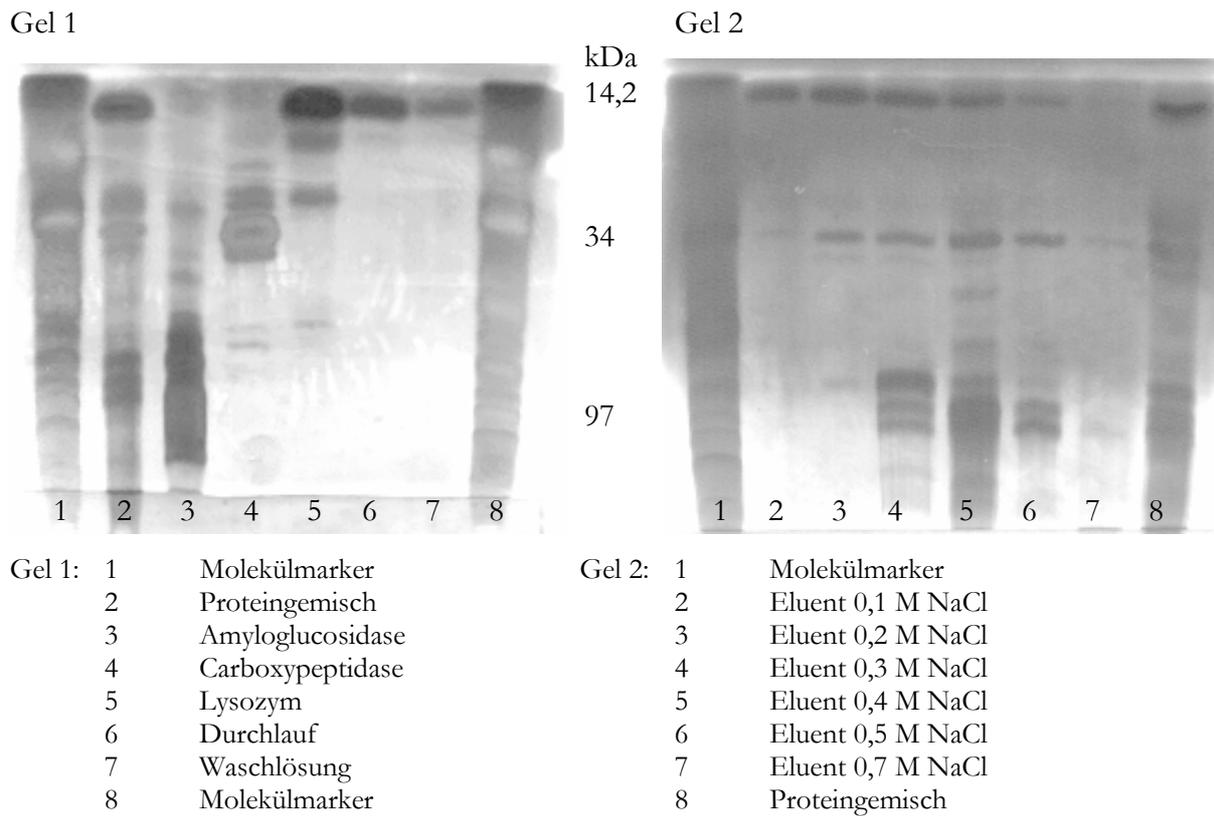


Abb 3.4.: Proteintrennung über Vivapure Q, SDS-PAGE-Gel (12,5 %, Silberfärbung; Phast-System, Amersham Pharmacia)

In beiden Versuchen wurde keine vollständige Trennung erzielt. Die verwendeten Proteingemische sind für eine Trennung über Zentrifugeneinheiten nicht geeignet. Der kurze Kontakt der Proteine mit den dünnen Membranenschichten ist für eine Trennung nicht ausreichend. Grundsätzlich ist eine Trennung in anionische und kationische Proteine aber zu erkennen.

3.2.3 Trennung eines Standardproteingemisches über Sartobind S 15 (Membranadsorber mit Kationenaustauscher-Membran)

Um den Einfluß der unterschiedlichen geometrischen Gegebenheiten von Spinmodulen und Sartobind-Einheiten zu untersuchen, wurde eine Auftrennung der gleichen Proteingemische über Membranadsorbereinheiten Sartobind- S15 und Q15 durchgeführt. In den Versuchen sind für alle Beladungs-, Wasch und Elutionsschritte Spritzen verwendet worden.

Die S-Einheit wurde zunächst mit 25 mM Acetatpuffer pH 5,5 gespült und dabei equilibriert. Um eine Überladung der Membran zu verhindern wurde auch hier die Membran nur mit maximal 50 % der maximalen Proteinbindungskapazität beladen. Das Gemisch 1 (siehe Kap.3.2) wurde mit einer Spritze auf die Membran gebracht und der Durchlauf gesammelt. Nicht gebundene Proteine wurden mit dem Puffer von der Membran gewaschen. Die Elution erfolgte anschließend schrittweise. Die Fraktionen wurden gesammelt und mittels Gelelektrophorese untersucht. In folgenden Abbildung 3.5 ist die Trennung in die einzelnen Proteine des Gemisches dargestellt.

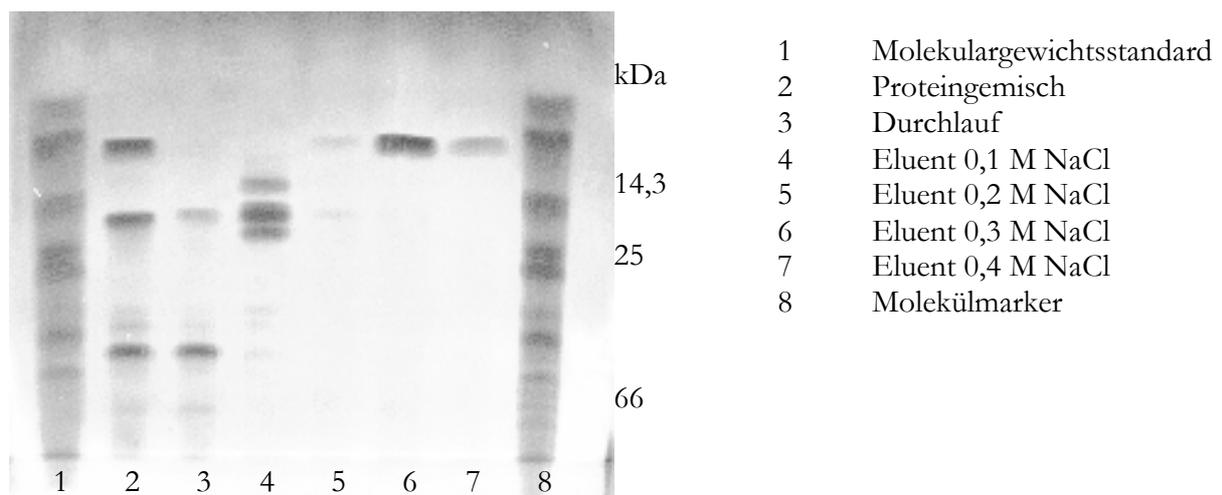


Abb. 3.5: Proteintrennung über Sartobind S15 , SDS-PAGE-Gel (12,5 %, Silberfärbung; Phast-System, Amersham Pharmacia)

Die Trennung in einzelne Proteine ist bei diesem Versuch deutlicher zu erkennen. In der Durchlaufraction (Spur 3) werden HSA, sowie Spuren von Trypsinogen nachgewiesen. Die folgenden Fraktionen sind frei von HSA. Mit 0,1 M NaCl im Puffer kann Trypsinogen von der Membran eluiert werden. Eine sichere Zuordnung in Spur 4 ist nicht möglich, da die obere der drei Banden keinem Protein zugewiesen werden kann. Lysozym kann erst mit einem erhöhten Salzgehalt von 0,3 M und 0,4 M NaCl von der Membran gelöst werden.

Eine Auftrennung Gemisch 1 in die Bestandteile HSA, Trypsinogen und Lysozym ist über die Adsorbermodule S15 möglich.

3.2.4 Trennung eines Standardproteingemisches über Sartobind Q 15 (Membranadsorber mit Anionenaustauscher-Membran)

Unter Einsatz einer anionischen Ionenaustauschermembran wurde eine Proteintrennung mit einem Sartobind Q15 Modul durchgeführt. Eingesetzt wurde das Proteingemisch 2 aus Abschnitt 3.2. Die Proteinmenge wurde der Bindungskapazität der Membranen angepasst und es erfolgte eine 50 % Ausschöpfung der Membrankapazität. Zum Equilibrieren wurde nach Protokoll ein leicht alkalischer 25 mM Tris-HCL Puffer pH 8 verwendet. Der Versuch wurde ebenfalls, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, als Spritzenversuch durchgeführt.

Die folgende gelelektrophoretische Darstellung (Abb. 3.6) der aufgefangenen Fraktionen bestätigt auch hier die Möglichkeiten der Proteinabtrennung durch Ionenaustauschermembranen. Lysozym bindet unter den gegebenen Bedingungen nicht auf einer Anionenaustauschermembran und wird im sonst proteinfreien Durchlauf wieder gefunden. Auch in der Waschfraktion und in der ersten Elutionsfraktion ist Lysozym zu finden. Es ist anzunehmen, dass ein Teil des Lysozyms nicht vollständig durch den Waschvorgang von der Membran gespült wurde und daher auch noch in die Elutionsfraktion gelangte. In Spur 5 ist neben Lysozym auch eine Bande der Carboxypeptidase zu finden. In Spur 6 und 7 liegen Amyloglucosidase und Carboxypeptidase nebeneinander vor. Eine Trennung der beiden Proteine war mit niedrigen Salzkonzentrationen nicht möglich. Bei der Erhöhung der Salzkonzentration wurden keine Proteine mehr von der Membran gelöst. Erst bei einer Konzentration von 0,7 M NaCl im Eluenten war es möglich Spuren von reiner Carboxypeptidase zu eluieren (nicht dargestellt).

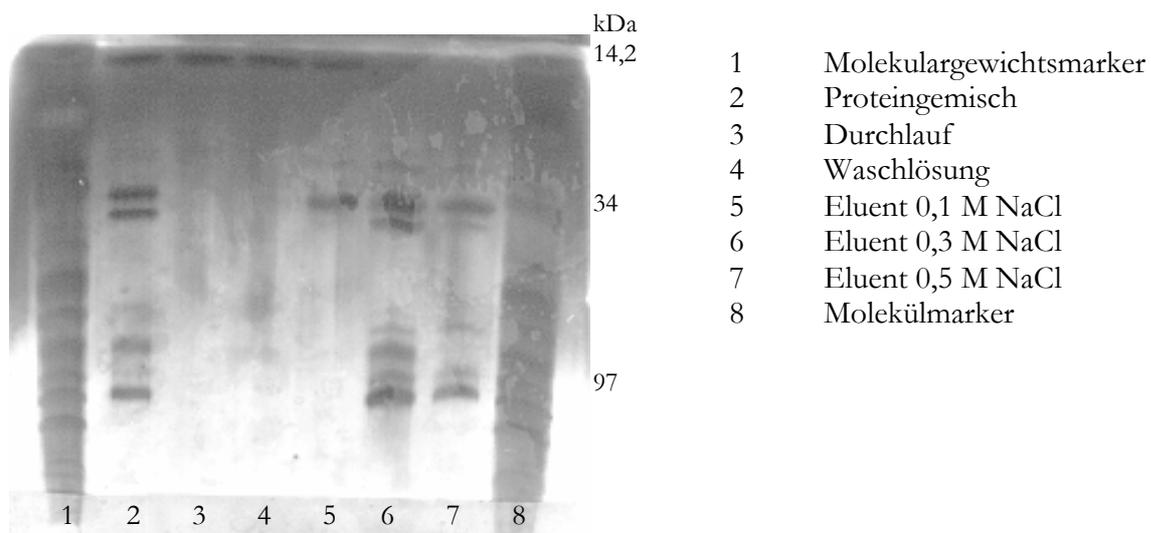


Abb 3.6: Proteintrennung über Sartobind Q15, SDS-PAGE-Gel (12,5 %, Silberfärbung; Phast-System, Amersham Pharmacia)

Eine Abtrennung von Lysozym aus dem Gemisch war nur unvollständig möglich. Um ungebundenes Lysozym vollständig von der Membran zu waschen ist eine Erhöhung des Waschpuffervolumens nötig. Dadurch können die Verunreinigungen mit Lysozym in den folgenden Elutionsschritten vermieden werden. Eine Trennung der beiden anderen Proteine in einzelne Fraktionen ist auch hier durch Änderung der Salzkonzentration nicht durchführbar.

Generell ist die Proteinabtrennung aus Gemischen mit beiden Systemen problematisch. Die Zentrifugeneinheiten weisen erhebliche Defizite bei beiden Membrantypen auf. Ein Grund können die kurzen Kontaktzeiten der Proteine mit der Membran und der beim Zentrifugieren auftretenden Druck sein. Die erfolgreichere Proteinabtrennung mit den Sartobind-Einheiten liegt in der anderen geometrischen Anordnung und dem Aufbau der Einheit begründet. Die Proteinlösungen werden in den Sartobind-Einheiten besser über die ganze Membran verteilt und haben eine längere Verweilzeit im Modul. Die Möglichkeiten einer Bindung und eines anschließenden Austausches sind höher. Die Sartobindmodule sind nicht für den μl -Maßstab geeignet.

3.3 Trennung von Blutproteinen über Zentrifugeneinheiten

Um die Möglichkeiten der Proteintrennung mittels Ionenaustauschermembranen in Zentrifugeneinheiten weiter zu untersuchen, wurden die Blutproteine HSA und IgG, sowie Human-Serum ausgewählt. Blut besteht aus zahlreichen Komponenten zu denen die hauptsächlich vorkommenden Albumine, Plasmaglobuline und Immunglobuline zählen.

Albumin (HSA) hat ein Molekulargewicht von 66 500 Da. Zu seinen Funktionen im Blut gehören Carrierfunktionen von Metallionen und lipophiler Substanzen. Darüber hinaus dient es als Eiweissreservoir des Körpers. Die primäre Funktion ist aber die Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes.

Plasmaglobuline sind eine uneinheitliche Gruppe die sich in α 1, α 2 und β -Globuline unterteilen lassen. Sie besitzen hauptsächlich Transportfunktionen im Blut. Die Gruppe der Immunglobuline (γ -Globuline) enthält die wichtigsten immunologisch wirksamen Proteine und unterteilen sich in verschiedene Untergruppen (IgA, IgG, IgM). Die Klasse der IgG bildet dabei die Hauptgruppe.

Die folgende Tabelle 3.7 gibt Auskunft über die Charakteristika der eingesetzten Moleküle.

Tab. 3.7: Verwendete Blutproteine

| Protein | Molekülmasse (kDa) | Isoelektrischer Punkt |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| Humanes Serum Albumin | 66,5 (Hauptbande) | 4,9 |
| IgG | 150 | 7,1-7,3 |
| Human Serum AB | Proteingemisch des Blutes | |

Der Versuch wurde unterteilt: zunächst sollte ein Gemisch aus IgG und HSA mittels Zentrifugeneinheiten getrennt werden. Im zweiten Ansatz sollte eine Isolierung von Albumin aus humanem Serum durchgeführt werden.

Verwendet wurde eine Vivapure Q-Zentrifugeneinheit. Da HSA anionische Eigenschaften hat sollte es auf der Membran binden und zurückgehalten werden. Bei großtechnischen Fraktionierungen von Human-Serum werden Ionenaustausch-Chromatographiesäulen eingesetzt die Albumin zurückhalten, während IgG im Durchlauf zu finden ist [Berglöf et al, 1989].

3.3.1 Trennung von HSA und IgG über Vivapure Q-Einheiten

Da mit einer Anionenaustauschermembran gearbeitet wurde, wurde ein Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 8 verwendet (Herstellerangaben). IgG und HSA wurden jeweils in Puffer gelöst und zu gleichen Teilen gemischt. Die Kapazität der Module beträgt 4 mg/Modul. Um diese Grenze nicht zu überschreiten wurde jeweils 500 µl Lösung mit der Konzentration 2 mg Gesamtprotein/ml eingesetzt. Die Spinmodule wurden nach Vorschrift beladen, zentrifugiert und gewaschen (Protokoll siehe Anhang).

Die Elution wurde in einem Schritt mit einer konzentrierten 1,5 M NaCl-Lösung durchgeführt. Die Fraktionen wurden aufgefangen und untersucht.

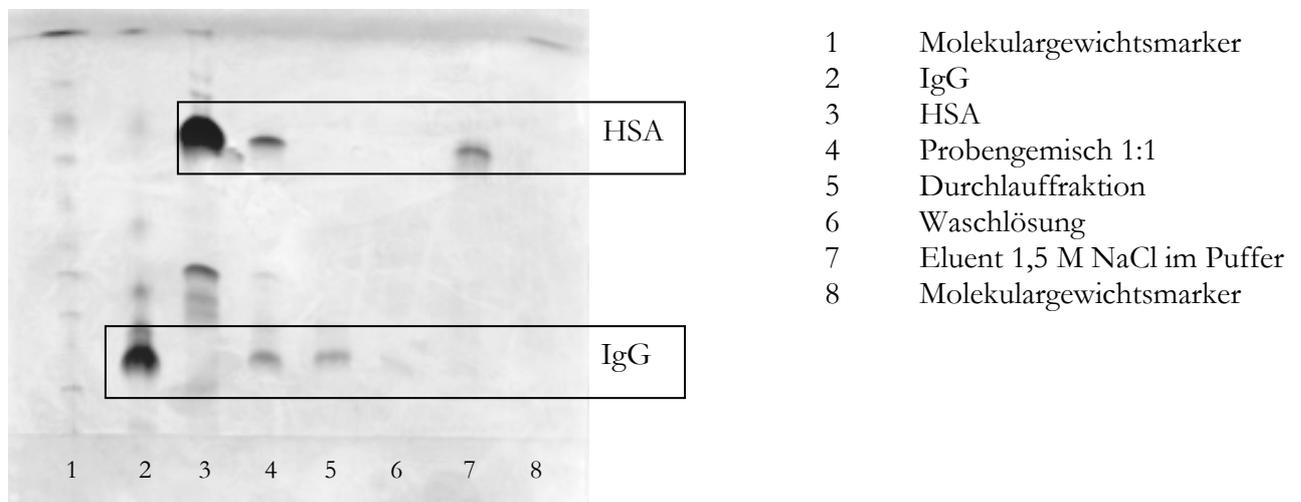


Abb. 3.7: Trennung von HSA und IgG mittels Vivapure Q, SDS-PAGE-Gel (7,5%, Coomassiefärbung; Phast-System, Amersham Pharmacia))

Die gelelektrophoretische Darstellung in Abbildung 3.7 zeigt die deutliche Abtrennung von HSA und IgG. Im Durchfluss (Spur 5) sind 40,5 % der Proteine zu finden (Bestimmung erfolgte mit Lowry-Test der Firma Pierce, USA). Das entspricht in etwa dem Anteil der ungebundenen IgG-Proteine. Im Gel sind die unterschiedlichen Fraktionen aufgetragen. In Spur 4 ist das verwendete Gemisch aufgetragen. Die Durchlaufraction ist in der Spur 5 dargestellt. Nur die Bande des IgG ist zu erkennen, HSA wurde auf der Membran gebunden. Mit der Elutionsfraction wurde nur HSA von der Membran eluiert. IgG konnte erwartungsgemäß nicht auf der Anionenaustauscher-Membran binden.

3.3.2 Albuminabtrennung aus humanem Serum mittels Vivapure Q-Einheiten

Humanes Serum wurde mit 10 mM PBS Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Gesamtproteinmenge in dieser Probe betrug 2,4 mg/ml. Da auch in diesem Versuch 500 µl eingesetzt wurden liegt die verwendete Proteinmenge bei 1,2 mg/ml. Die Durchführung entspricht der aus Abschnitt 3.4.1.

Der Proteintest (Lowry-Test, Pierce) der aufgefangenen Fraktionen ergab, dass 47,8 % der eingesetzten Proteine auf der Membran gebunden haben. 11% wurden durch Waschen von der Membran gelöst, die restlichen 36,7 % wurden eluiert.

Das Gel in Abbildung 3.8 belegt, dass eine Abtrennung von HSA aus humanem Serum nur eingeschränkt möglich ist. Die Kapazität der Membran wird weit überschritten, was sich deutlich im Durchlauf (Spur 5) zeigt.

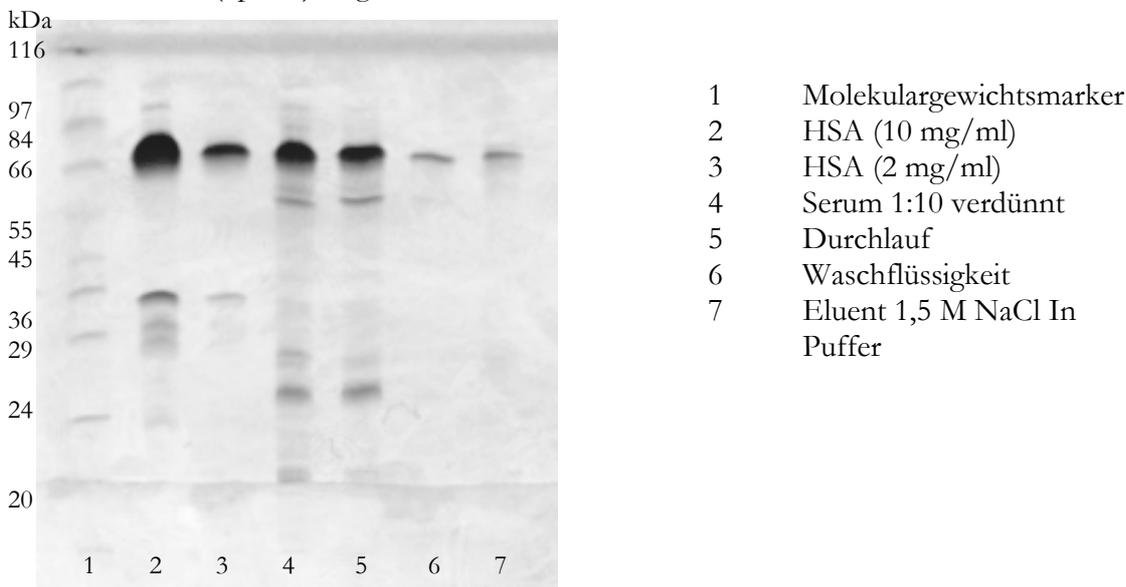


Abb. 3.8: Trennung von HSA aus Humanserum mittels Vivapure Q, SDS-PAGE-Gel (7,5%, Coomassiefärbung; Phast-System, Amersham Pharmacia)

Sowohl in der Wasch- und auch in der Elutionsfraktion findet man hauptsächlich HSA. Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde die Kapazität der Trenneinheit deutlich überschritten, eine Optimierung der Ergebnisse kann durch Verwendung geringerer Proteinmengen erreicht werden.

Die beiden Versuche haben gezeigt, dass Proteinabtrennungen aus einfachen Gemischen in guter Qualität durchführbar sind. Komplexe Gemische bereiten Schwierigkeiten, insbesondere wenn große Moleküle in den Gemischen enthalten sind. Je größer die Proteine sind, desto mehr Bindungsplätze werden auf der Membran benötigt. Die Kapazität der Membranen wird dadurch verringert.

3.4 Scoutingversuche mit Vivapure- Zentrifugeneinheiten

Wie in den voran gegangenen Abschnitten gezeigt wurde, ist es möglich über Zentrifugeneinheiten Proteingemische aufzutrennen. Im folgenden Abschnitt wird ein Verfahren vorgestellt, das bei Ermittlung von optimalen Bindungs- und Elutionsbedingungen von Proteingemischen helfen soll. Das Prinzip beruht auf einer breit angelegten Untersuchung im Mikrolitermaßstab, um einen Überblick über die Bindungsaffinitäten und –möglichkeiten zu untersuchender Proteine bei verschiedenen pH-Werten auf unterschiedlichen Ionenaustauschermembranen zu erhalten. Bezeichnet wird dieses Verfahren als *Scouting*. Verwendet wurden die Zentrifugeneinheiten Vivapure aus einem von der Firma Vivascience bereit gestellten *Scouting-Kit*.

Proteingemische wurden mit vier Puffersystemen unterschiedlicher pH-Werte versetzt. Die so behandelten Proben wurden in Einheiten mit starken Anionen (Q)- und Kationenaustauscher (S) gegeben. Die Auftrennung in einzelne Proteine erfolgte unter Verwendung steigender Salzkonzentrationen (Scoutingprotokoll, s. Anhang). Die dabei gewonnenen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch untersucht und ausgewertet.

Die *Scouting*-Versuche wurden mit zwei unterschiedlichen Proteingemischen durchgeführt. Im ersten Abschnitt wurde erneut das Gemisch HSA-IgG untersucht. Hierbei sollen insbesondere die Elutionsbedingungen für von HSA näher untersucht werden.

Im zweiten Abschnitt wird Kartoffelfruchtwasser als Proteingemisch untersucht. Die Bindungs- und Elutionsbedingungen der unterschiedlichen Proteine im Fruchtwasser sollen näher betrachtet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen die Grundlage für die weiterführenden Versuche der Proteinabtrennungen mit größeren Adsorbentien sein.

Tab. 3.8: Verwendete Puffersysteme des Scoutingversuchs

| Puffer | Puffersystem | Konzentration | pH-Wert |
|----------|-------------------|---------------|---------|
| A | Natriumacetat | 25 mM | 4,5 |
| B | MES | 25 mM | 6 |
| C | Tris-HCl | 25 mM | 7,5 |
| D | Natriumbicarbonat | 25 mM | 9 |

3.4.1 Scoutingversuch mit einem HSA/IgG-Gemisch

Für den *Scouting*versuch wurde ein Proteingemisch aus gleichen Anteilen von HSA und IgG verwendet. 200 µl des Gemisches wurden jeweils mit 800 µl eines Puffers versetzt. So wurden 4 verschiedene Proben in unterschiedlichen pH-Bereichen von 4,5 bis 9 erhalten, welche auf Q- und S-Membranmodule gegeben wurden. Die Proben wurden nach Protokoll (siehe Anhang) in die Zentrifugeneinheiten gegeben und aufgearbeitet. Jede Probe hatte einen Gesamtproteingehalt von 0,8 mg. Alle gewonnenen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch untersucht und bewertet. Basierend auf diesen Untersuchungen kann man Aussagen über das Verhalten des Proteingemisches bei unterschiedlichen pH-Werten treffen. Das verwendete HSA liegt nicht rein vor. Die HSA-Hauptbande liegt bei 66 kDa, schwächere Nebenbanden (Isoformen) liegen bei 200 kDa. IgG mit einem Gewicht von 150 kDa, wird unter den gewählten Bedingungen der SDS-PAGE in 25 kDa- und 50 kDa-Fragmente gespalten.

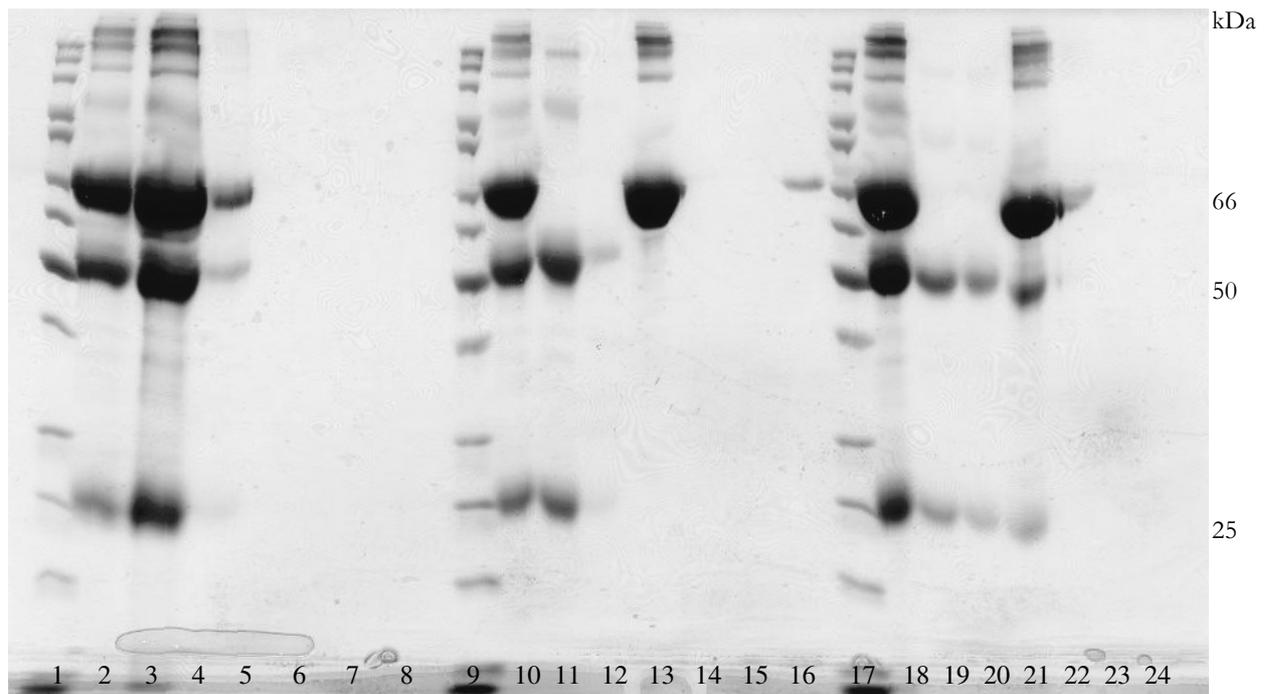


Abb. 3.9: Gel 1 (12,5 % Tris-HCl, Bio-Rad, Coomassiefärbung)

| | | | |
|---------|----------------------------------|---------|-----------------------------------|
| Spur 1 | Molekulargewichtsmarker | Spur 13 | Q, Elution mit 300 mM NaCl |
| Spur 2 | HSA und IgG in Puffer A (pH 4,5) | Spur 14 | Q, Elution mit 600 mM NaCl |
| Spur 3 | Q, Durchlauf mit Puffer A | Spur 15 | Q, Elution mit 900 mM NaCl |
| Spur 4 | Q, 1. Waschen | Spur 16 | Q, Elution mit 1,5 M NaCl |
| Spur 5 | Q, Elution mit 300 mM NaCl | Spur 17 | Molekulargewichtsmarker |
| Spur 6 | Q, Elution mit 600 mM NaCl | Spur 18 | HSA und IgG in Puffer C (pH 7,5) |
| Spur 7 | Q, Elution mit 900 mM NaCl | Spur 19 | Q, Durchlauf mit Puffer C |
| Spur 8 | Q, Elution mit 1,5 M NaCl | Spur 20 | Q, 1. Waschen |
| Spur 9 | Molekulargewichtsmarker | Spur 21 | Q, Elution mit 300 mM NaCl |
| Spur 10 | HSA und IgG in Puffer B (pH 6) | Spur 22 | Q, Elution mit 600 mM NaCl |
| Spur 11 | Q, Durchlauf mit Puffer B | Spur 23 | Q, Elution mit 900 mM NaCl |
| Spur 12 | Q, 1. Waschen | Spur 24 | Q, Elution mit 1,5 M NaCl |

Bei der Verwendung des Acetatpuffers bei pH 4,5 (Spur 2-8) konnte keine Bindung der Proteine auf der Q-Membran festgestellt werden. Eine Abtrennung und Elution von der Q-Membran ist für HSA bei pH 6 erfolgt. Im Gel 1 ist dies deutlich in der Spur 13 zu erkennen. Der optimale pH-Wert des Bindungspuffers sollte 1 bis 1,5 pH Einheiten über dem isoelektrischen Punkt der Proteine liegen. Da der pI-Wert des HSA bei 4,9 liegt entspricht dieses Ergebnis auch der Theorie.

Bei pH 7,5 erfolgt auch eine Anbindung des HSA auf der Q-Membran (Spur 18 bis 24). Es kann jedoch nicht erreicht werden, das HSA sauber von der Membran zu eluieren. In allen Elutions- und Waschfraktionen sind deutliche Banden der beiden IgG-Fragmente bei 25 und 50 kDa zu erkennen (Spur 21). Bei pH 9 binden alle Proteine auf der Membran, können aber nicht getrennt von einander eluiert werden.

Anders verhält sich das Proteingemisch gegenüber der S-Membran. Hier ist eine Anbindung des IgG an die Kationenaustauschermembran und ein Durchtreten des HSA zu erwarten. In der folgenden Abbildung 3.10 ist das tatsächliche Verhalten der Proteine dokumentiert.

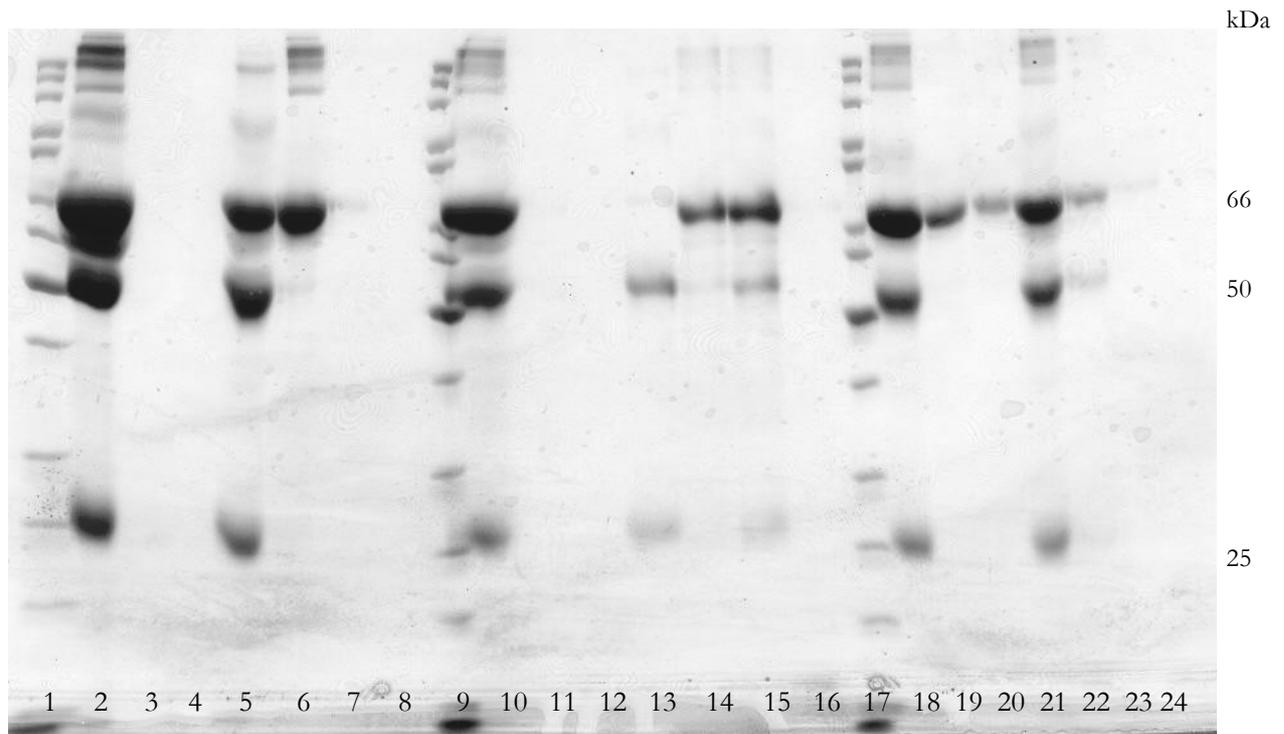


Abb. 3.10: Gel 2 (12,5 % Tris-HCl, Bio-Rad, Coomassiefärbung)

| | | | |
|---------|----------------------------------|---------|--------------------------------|
| Spur 1 | Molekulargewichtsmarker | Spur 13 | S, Elution mit 300 mM NaCl |
| Spur 2 | HSA und IgG in Puffer D (pH 9) | Spur 14 | S, Elution mit 600 mM NaCl |
| Spur 3 | Q, Durchlauf mit Puffer D | Spur 15 | S, Elution mit 900 mM NaCl |
| Spur 4 | Q, 1. Waschen | Spur 16 | S, Elution mit 1,5 M NaCl |
| Spur 5 | Q, Elution mit 300 mM NaCl | Spur 17 | Molekulargewichtsmarker |
| Spur 6 | Q, Elution mit 600 mM NaCl | Spur 18 | HSA und IgG in Puffer B (pH 6) |
| Spur 7 | Q, Elution mit 900 mM NaCl | Spur 19 | S, Durchlauf mit Puffer B |
| Spur 8 | Q, Elution mit 1,5 M NaCl | Spur 20 | S, 1. Waschen |
| Spur 9 | Molekulargewichtsmarker | Spur 21 | S, Elution mit 300 mM NaCl |
| Spur 10 | HSA und IgG in Puffer A (pH 4,5) | Spur 22 | S, Elution mit 600 mM NaCl |
| Spur 11 | S, Durchlauf mit Puffer A | Spur 23 | S, Elution mit 900 mM NaCl |
| Spur 12 | S, 1. Waschen | Spur 24 | S, Elution mit 1,5 M NaCl |

Nur bei Einsatz eines Acetatpuffers bei pH 4,5 konnte IgG separat abgetrennt werden (Spur 10-16). Dabei wurden HSA und IgG gänzlich an die Membran gebunden (Spur 11), die Waschschritte enthielten kein Protein. Mit 300 mM NaCl im Acetatpuffer konnte IgG von der Membran eluiert werden (Spur 13). Die Banden sind schwach, aber HSA frei. In der folgenden Fraktion mit 600 mM NaCl im Acetatpuffer wurde HSA eluiert (Spur 14). Mit steigendem Salzgradienten wurden die restlichen HSA und IgG-Moleküle von der Membran gelöst und eluiert.

Im Gel 2 erscheinen HSA-Banden im Durchlauf bei pH 6. Eine Abtrennung des IgG von HSA konnte über die S-Einheiten bei den pH Werten 7,5 und 9 ebenfalls nicht erreicht werden, denn bei den verwendeten Puffern wurde auch HSA von der Membran eluiert (siehe Anhang).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass HSA über eine starke Anionenaustauschermembran von IgG bei pH 6 getrennt werden kann. Die Elution erfolgt bei 300 mM NaCl. IgG kann über die S-Membran von HSA getrennt werden. Eine Bindung an die S-Membran erfolgte immer, eine Trennung von HSA erfolgte nur bei pH 4,5. IgG scheint zu der S-Membran eine besondere Affinität zu haben und nicht vollständig von der Membran eluiert werden können. Die IgG-Banden der eluierten Fraktionen haben eine geringere Intensität als in den Versuchen mit der Q-Membran.

3.4.2 Scoutingversuche mit Kartoffelfruchtwasser

Um die Einsatzmöglichkeiten des „Scouting Kit“ weiter zu testen, wurde das komplexe Kartoffelproteingemisch verwendet, welches einen hohen Anspruch an die Selektivität der Membranen darstellt.

Diese Testreihe wurde wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden Kartoffelfruchtwasserproben mit vier Puffern auf verschiedene pH-Bereiche eingestellt (siehe Tab. 3.8). Die so behandelten Proben wurden in Einheiten mit starken Anionen (Q)- und Kationenaustauscher (S) pipettiert und aufgearbeitet. Das genaue Protokoll ist dem Anhang zu entnehmen. Die dabei gewonnenen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch untersucht. Die beiden folgenden Abbildungen 3.11 und 3.12 dokumentieren die Ergebnisse.

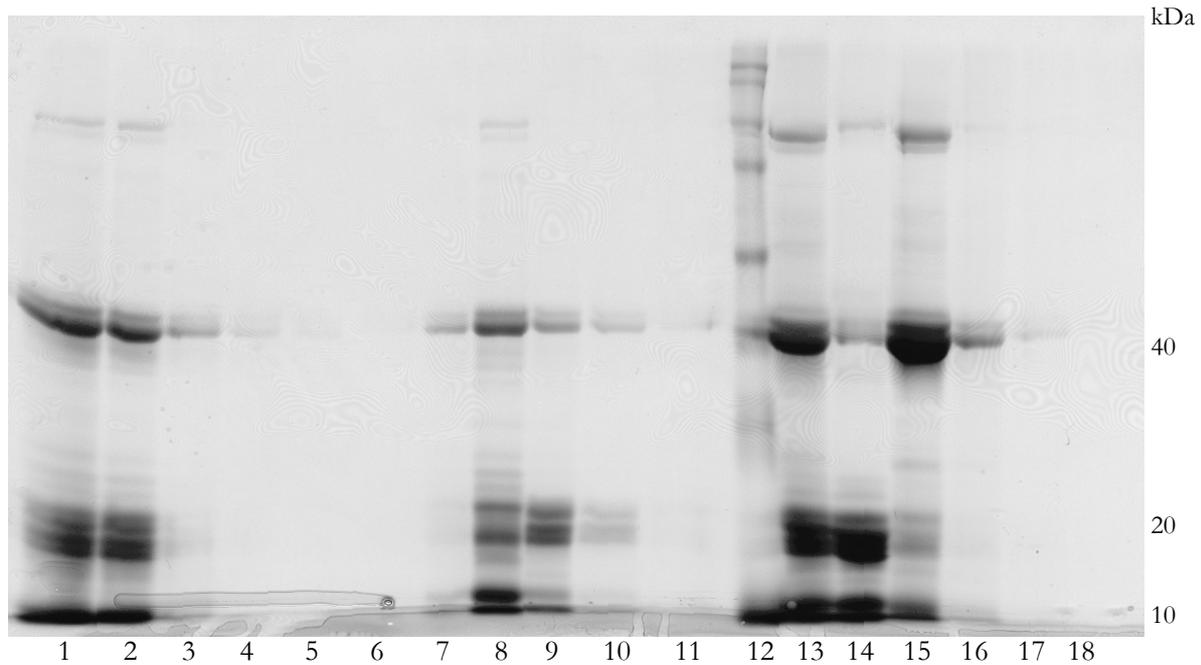


Abb. 3.11: Scoutgel 1, pH-Bereich 4,5 und 7,5 (12,5 % Tris-HCl-Gel, SDS-PAGE, Coomassiefärbung)

| | | | |
|--------|--|---------|--|
| Spur 1 | Probe Kartoffelfruchtwasser mit Puffer A, pH 4,5 | Spur 10 | S, Elution mit 900 mM NaCl |
| Spur 2 | Q, Durchlauf A | Spur 11 | S, Elution mit 1,5 M NaCl |
| Spur 3 | Q, Elution mit 300 mM NaCl | Spur 12 | Molekulargewichtsmarker |
| Spur 4 | Q, Elution mit 600 mM NaCl | Spur 13 | Probe Kartoffelfruchtwasser mit Puffer C, pH 7,5 |
| Spur 5 | Q, Elution mit 900 mM NaCl | Spur 14 | Q, Durchlauf C |
| Spur 6 | Q, Elution mit 1,5 M NaCl | Spur 15 | Q, Elution mit 300 mM NaCl |
| Spur 7 | S, Durchlauf A | Spur 16 | Q, Elution mit 600 mM NaCl |
| Spur 8 | S, Elution mit 300 mM NaCl | Spur 17 | Q, Elution mit 900 mM NaCl |
| Spur 9 | S, Elution mit 600 mM NaCl | Spur 18 | Q, Elution mit 1,5 M NaCl |

Die Bindung des Patatin bei pH 4,5 an die Q-Membran erfolgte nicht. Die Durchlauf fraktion hat die gleichen Bestandteile wie die ursprüngliche Probe (Abb. 3.11, Spuren 1-6).

Auf der Q-Membran bleibt Patatin (40 kDa) bei pH 6 haften (Abb. 3.12, Spur 2), während die kleineren Proteine vollständig durchlaufen und sich in der Durchbruchfraktion befinden. Der Hauptanteil des gebundenen Patatins wird mit einer 0,3 M NaCl-Lösung von der Membran eluiert. Mit 0,6 M NaCl im MES-Puffer werden noch Reste von der Membran eluiert (Abb. 3.12, Spuren 3 und 4).

Bei einem pH-Wert von 7,5 sind im Durchlauf (Abb.3.11, Spur 14) die niedermolekularen Proteine und Spuren von Patatin zu finden. Mit 0,3 M NaCl im Puffer wurde Patatin von der Membran eluiert, 0,6 M NaCl lösten nur Spuren von der Membran (Abb. 3.11, Spuren 15 und 16). Die Fraktionen wiesen Spuren von Protease Inhibitoren auf.

Die Bindung an die Q-Membran ist auch bei pH 9 möglich, jedoch sind Elutionsfraktionen nicht rein und mit dem zweiten Elutionsschritt (0,6 M NaCl) wird der größte Anteil des Patatins von der Membran gelöst.

An die S-Membran wurde ein Großteil der Protease Inhibitoren (15-20 kDa) gebunden. Ein geringer Anteil der Protease Inhibitoren passiert die Membran und befindet sich neben Patatin in der Durchlauffraktion. Eine Trennung in einzelne Proteingruppen erhält man bei der Verwendung der Puffer bei pH 6 und 7,5. Die Bindung an die Membran war nicht vollständig, denn auch hier befinden sich Proteine mit einer Masse von 15-20 kDa in der Durchlauffraktion. Bei beiden pH-Werten konnten die Protease Inhibitoren mit 0,3 mol NaCl-Puffer von der Membran eluiert werden. Die Trennung bei pH 6 war erfolgreich, es sind nur geringe Spuren von Patatin auf dem Gel zu sehen (Abb. 3.12, Spur 8).

Eine Trennung der Proteine über die S-Membran bei Verwendung des Acetatpuffers bei pH 4,5 konnte nicht erreicht werden (Abb. 3.11, Spuren 7-11). Der Hauptanteil des Patatins und ein Teil der Protease Inhibitoren wurde mit 0,3 M NaCl-Puffer von der Membran gelöst, mit 0,6 M NaCl-Puffer wurde der Großteil der Inhibitoren von der Membran eluiert..

In der Durchlauffraktion des Puffers bei pH 9 sind alle Proteine der ursprünglich eingesetzten Probe zu finden. Es konnten keine Proteine in den einzelnen Waschsritten und Elutionsfraktionen nachgewiesen werden (siehe Anhang). Die S-Membran kann bei pH 9 nicht verwendet werden, da keinerlei gebundene Proteine nachgewiesen werden konnten.

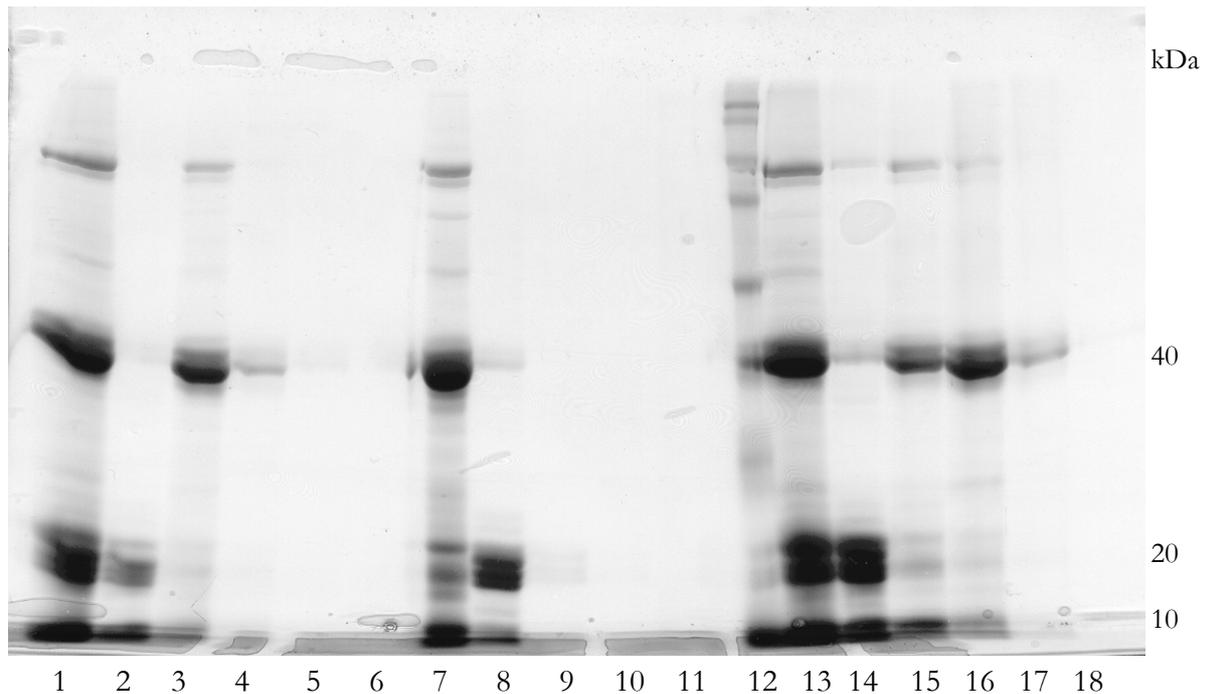


Abb. 3.12: Scoutgel 2, pH-Bereich 6 und 9 (12,5 % Tris-HCl, SDS-PAGE, Coomassiefärbung)

| | | | |
|--------|--|---------|--|
| Spur 1 | Probe Kartoffelfruchtwasser mit Puffer B, pH 6 | Spur 10 | S, Elution mit 900 mM NaCl |
| Spur 2 | Q, Durchlauf B | Spur 11 | S, Elution mit 1,5 M NaCl |
| Spur 3 | Q, Elution mit 300 mM NaCl | Spur 12 | Molekulargewichtsmarker |
| Spur 4 | Q, Elution mit 600 mM NaCl | Spur 13 | Probe Kartoffelfruchtwasser mit Puffer D, pH 9 |
| Spur 5 | Q, Elution mit 900 mM NaCl | Spur 14 | Q, Durchlauf D |
| Spur 6 | Q, Elution mit 1,5 M NaCl | Spur 15 | Q, Elution mit 300 mM NaCl |
| Spur 7 | S, Durchlauf B | Spur 16 | Q, Elution mit 600 mM NaCl |
| Spur 8 | S, Elution mit 300 mM NaCl | Spur 17 | Q, Elution mit 900 mM NaCl |
| Spur 9 | S, Elution mit 600 mM NaCl | Spur 18 | Q, Elution mit 1,5 M NaCl |

Ergebnis:

Die zuvor angenommene Bindungsfähigkeit des Patatins (40 kDa-Bande) an die Q-Membran und die Anlagerung der Protease Inhibitoren (9-22 kDa Proteine) an die S-Membran wurden bestätigt.

Da der pI-Wert des Patatins bei ca. 5 liegt ist ein Einsatz der Membranen bei einem etwas höheren pH-Wert von ca.7 am effektivsten. Empfohlen werden von den Herstellern bei Benutzung der Anionenaustauschermembranen Puffer in pH-Bereichen die 1- 1,5 pH-Einheiten über dem pI-Wertes des Proteines liegen.

Eine Trennung des Proteingemisches über die S-Membran konnte in den pH-Bereichen 4,5 und 9 nicht erreicht werden. Der ideale pH-Bereich für den Einsatz der S-Membran ist im Bereich pH 6 bis 7,5 festzulegen.

Die gesuchte Gruppe der Protease Inhibitoren besteht aus vielen einzelnen Proteinen, die unterschiedliche pI-Werte haben. Eine vollständige Abtrennung aller Protease Inhibitoren bei nur einem pH-Wert ist daher nicht zu erwarten. Die Verwendung von Puffer im Bereich pH 7 bietet die größten Möglichkeiten zur Trennung der Hauptproteine.

Die mit Hilfe des *Scouting*-Verfahren gewonnenen Erkenntnisse bilden in den folgenden Abschnitten die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Trennung von Kartoffelproteinen über Membranadsorber.

Die folgenden beiden Tabellen stellen die Ergebnisse in einer kurzen Übersicht dar. Die erste Tabelle gibt Auskunft über das Auftreten von Patatinbanden in den einzelnen Elutionsfraktionen. In der zweiten Tabelle wird das Auftreten von Protease Inhibitoren bei den unterschiedlichen pH-Werten dokumentiert.

Tab 3.8: Auftreten von Patatinbanden in den Fraktionen des Scouting-Versuchs

| pH | Durchlauf | | 300mmol | | 600mmol | | 900mmol | | 1,5mol | |
|-----|-----------|----|---------|----|---------|---|---------|---|--------|---|
| | Q | S | Q | S | Q | S | Q | S | Q | S |
| 4,5 | xx | x | x | xx | - | x | - | - | - | - |
| 6 | - | xx | xx | x | x | - | - | - | - | - |
| 7,5 | x | - | xx | - | x | - | - | - | - | - |
| 9 | x | xx | xx | - | xx | - | x | - | - | - |

x: Auftreten schwacher Banden

xx: Auftreten starker Banden

- : keine Banden

Tab 3.9: Auftreten von Protease-Inhibitorenbanden in den Fraktionen des Scouting-Versuchs

| pH | Durchlauf | | 300mmol | | 600mmol | | 900mmol | | 1,5mol | |
|-----|-----------|----|---------|----|---------|----|---------|---|--------|---|
| | Q | S | Q | S | Q | S | Q | S | Q | S |
| 4,5 | xx | - | - | xx | - | xx | - | x | - | - |
| 6 | x | x | - | xx | - | - | - | - | - | - |
| 7,5 | xx | x | x | xx | - | - | - | - | - | - |
| 9 | xx | xx | x | x | x | - | - | - | - | - |

x: Auftreten schwacher Banden

xx: Auftreten starker Banden

- : keine Banden

3.5 Trennung von Kartoffelfruchtwasserproteinen über Sartobind –Adsorbermodule

Die in Abschnitt 3.5 beschriebenen Scoutingversuche gaben einen Überblick über die Möglichkeiten zur Trennung des Kartoffelfruchtwassers in Proteingruppen. Die Wahl des Puffers und des Eluenten wurden ebenfalls durch den Versuch eingegrenzt. Als Ergebnis des Scoutingversuchs liegen folgende Parameter vor:

- Die Bindung von Patatin an eine Q-Membran ist in einem pH-Bereich von 6 bis 7,5 optimal.
- Der Hauptteil des Patatins kann mit 0,3 M NaCl in einem pH-Bereich von 6 bis 7,5 von der Membran eluiert werden.
- Protease Inhibitoren binden bei pH 6 und 7,5 an die S-Membranen und können bei pH 6 mit 0,3 M NaCl von der Membran gelöst werden.
- Als Puffer bei pH 6 wurde ein 25 mM Acetatpuffer verwendet.
- Als Puffer bei pH 7,5 wurde ein 25 mM Kaliumphosphatpuffer verwendet.

Die Ergebnisse der Zentrifugeneinheiten wurden auf die größeren Durchflussadsorbereinheiten übertragen. In den folgenden Abschnitten sind diese Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Zu den relevanten Parametern zählen auch Flussgeschwindigkeit, maximale Proteinmenge sowie Elutionsprofile und die Art des Puffers.

In den folgenden Versuchen wurden keine Zentrifugeneinheiten zur Trennung verwendet, sondern ausschließlich Sartobind Adsorbermodule Q und S mit Austauschflächen von 15 cm² und 75 cm². Die Adsorbereinheiten wurden in einer *Low Pressure Liquid Chromatography*-Anlage eingesetzt und als Spritzenaufsätze verwendet.

3.5.1 LPLC

Die in dieser Arbeit verwendeten *Low Pressure Liquid Chromatography*-Anlagen sind FPLC-Anlagen (*Fast Protein Liquid Chromatography*) der Firma BioRad, München, Deutschland. Die eine Anlage besteht aus einer Perestaltikpumpe mit Mischkammer, einem manuellen Injektionsventil, sowie einem UV-Detektor und einer Leitfähigkeitsmesszelle. Die Pumpeinheit wird elektronisch gesteuert.

Die zweite Anlage (Duoflow) besteht aus zwei Kolbenpumpen, einer Mischkammer, einem automatisch gesteuertem Injektionsventil (AVR7-3) und einer elektronischen Steuereinheit. Als Detektionseinheit ist ein UV-Detektor mit Filter für 254 und 280 nm und ein

Leitfähigkeitsmesser für den Bereich von 1 bis 500 mS/cm integriert. Die maximale Flussgeschwindigkeit liegt bei 10 ml/min. Der maximale Druck liegt bei 1000 psi. Zur Isolierung der Fraktionen wurde ein automatischer Fraktionssammler eingesetzt.

In die Anlagen können Chromatographiesäulen sowie Membranadsorber eingefügt werden. Über Steuerprogramme ist es möglich durch das Injektionsventil genaue Probenvolumina aus einer Probenschlaufe die Membranen passieren zu lassen. In diesen Versuchen wurden Probenschlaufen mit einem Volumen von 1 und 3 ml verwendet. Bei größeren Probenmengen und Dauerversuchen wurde die Schaltung am Ventil umgebaut und die Probe konnte direkt aus einem Vorratsbehälter in das System transportiert werden.

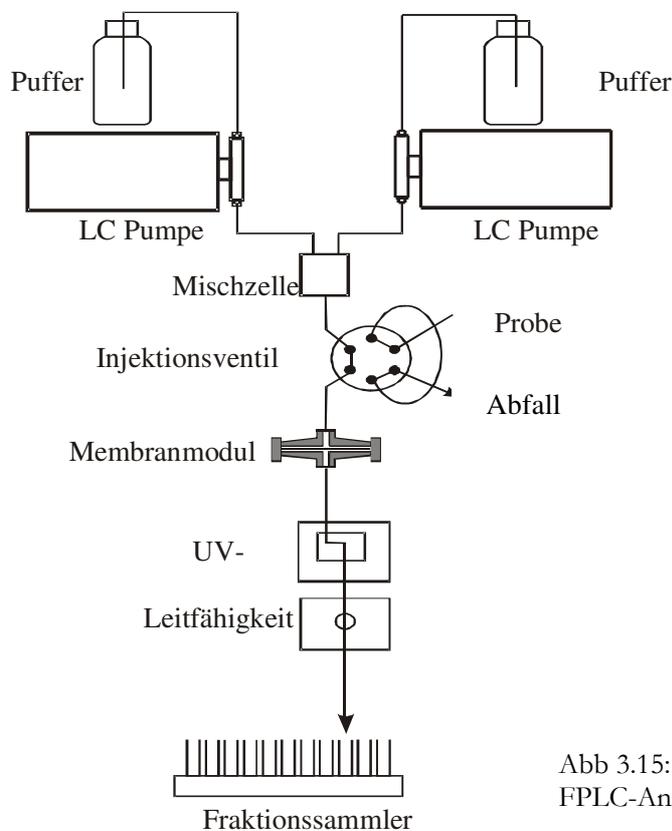


Abb 3.15: Schematische Darstellung der FPLC-Anlage

Das Prinzip der FPLC besteht darin, eine flüssige Probe durch schmale Schläuche als eine Art Segment zu transportieren. Als mobile Phase wird dabei ein Puffer (A) eingesetzt, der die Probe aus der Probenschlaufe spült und ohne Konvektion als Segment zur Säule, bzw. zum Adsorbermodul transportiert. Durch Einsatz eines Elutionspuffers (B) können die Proteine von der Membran anschließend eluiert werden. Der Elutionspuffer (B) kann über ein Steuerprogramm dem Trägerpuffer (A) beigemischt werden. Die Werte sind in % angegeben und beziehen sich auf den Gehalt des Elutionspuffers (B) im Puffer (A). Die anfallenden Eluate

wurden über einen programmierten Fraktionssammler aufgefangen und konnten anschließend untersucht werden. Die entwickelten Steuerprogramme sind dem Anhang zu entnehmen.

3.5.2 Kartoffelfruchtwasserproben

Das verwendete Kartoffelfruchtwasser stammt aus der Stärkeproduktion der Firma Emslandstärke aus Emlichheim. Die Produktion von Kartoffelstärke läuft im Kampagnebetrieb von August bis Januar. Daher werden die KFW-Proben in dieser Zeit aus dem Produktionszyklus entnommen und in 0,5 – 2 l Gebinden abgefüllt. KFW ist bei Raumtemperatur nicht haltbar und wird zu Transport- und Lagerungszwecken bei -20°C eingefroren. Die Behälter wurden im gefrorenen Zustand anschließend in die Universität Hannover transportiert. Der Bestand von homogenen Probenmaterial wurde so gewährleistet.

Die Proben wurden an verschiedenen Stellen des Produktionszyklus entnommen. Dazu zählen KFW vor der Umkehrosmose (vUO) und nach der Umkehrosmose (nUO). Diese Proben unterscheiden sich nur im Proteingehalt voneinander. Kartoffelfruchtwasser nach dem Erhitzen (enteiweisste Probe) und das Potatoe Protein Liquor (PPL) wurde nicht verwendet, da beide am Ende der Produktionskette stehen und einen geringen Proteingehalt haben.

Um eine starke Braunfärbung, bedingt durch Polyphenoloxidasen, und eine Zersetzung zu vermeiden, wird dem KFW im Werk Bisulfid zugesetzt. Ohne Zusatz eines Antioxidationsmittels würde sich eine KFW-Probe binnen weniger Stunden dunkelbraun verfärben. Nach 24 h weist eine unbehandelte Probe ein Sediment und einen unangenehmen säuerlichen Geruch auf. Unter dem Mikroskop ist ein starker Bakterienbefall sichtbar. Nach 4-5 Tagen ist die Oberfläche der Probe mit einer weißlichen Schimmelschicht überzogen und für weitere Versuche unbrauchbar.

Proben die auf 4°C gekühlt wurden, zeigten ähnliches Verhalten, wenn auch die Braunverfärbung später einsetzte. Neben Bisulfid wurden auch Ascorbinsäure und Natriumazid als Konservierungsmittel eingesetzt. Proben die mit Ascorbinsäure behandelt wurden zeigten eine auffällige gelbbraune Färbung. Nach 24 h war die Lösung noch hellgelb und wies einen schleimigen, flockigen Niederschlag auf. Nach weiteren 24 h war die Probe nicht mehr flüssig, sondern wies in unteren Schichten, die nicht mit Sauerstoff in Verbindung gekommen waren, eine gallertartige Konsistenz auf.

Nur durch den Einsatz von 0,2 % Natriumazid konnte ein Bakterienbefall verhindert werden.

Tiefgefrorene Proben wiesen nach dem Auftauen eine bräunliche Verfärbungen auf. Bei einer Lagerung an Luft bei Raumtemperatur verfärbten sich unkonservierte Proben schneller als

konservierte Proben. KFW-Proben die bei -80°C gelagert wurden, zeigten weniger starke Verfärbungen auf und die abschließende Dunkelbraunfärbung setzte verzögert ein. Anscheinend werden die enzymatischen Abbauprozesse erst bei -80°C unterbunden, bzw. verlangsamt. Eingefrorenen Proben die mit Ascorbinsäure versetzt wurden, hatten eine hellgelbe bis hellbraune Färbung. Die flüssige Probe wurde nach einiger Zeit gallertartig.

Eine gänzliche Verhinderung der Verfärbung konnte bei keiner Probe erreicht werden. Da später das industriell anfallende KFW weiter verarbeitet werden soll, wurden sämtliche Untersuchungen mit dem von der Emslandstärke gestellten Proben durchgeführt. Andere Konservierungs- und Antioxidationsmittel fanden keine Verwendung.

Neben der Verfärbung ist auch der Proteingehalt in den Proben entscheidend. So weisen Proben, die längere Zeit eingefroren waren, einen niedrigeren Proteingehalt auf als am Tag ihres Einfrierens. Um einen Überblick über den Proteinabbau im gefrorenen Zustand zu erhalten, wurden mehrere tiefgekühlte Proben aus unterschiedlichen Kampagnen mehrerer Jahre aufgetaut und anschließend untersucht. Diese Proben waren ununterbrochen tiefgekühlt.

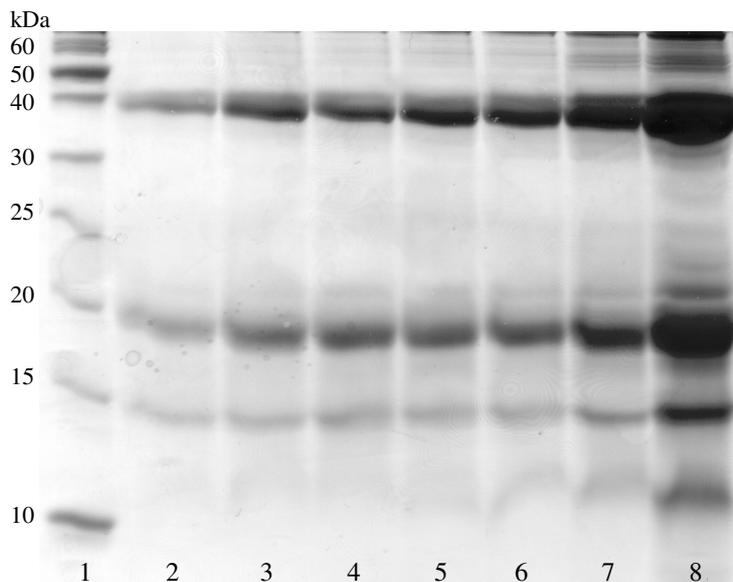


Abb 3.16: SDS-PAGE Darstellung (18% Tris-HCl, BioRad, Coomassiefärbung)

| Spur | Kampagne | Datum (eingefroren am) |
|------|--------------------------------------|---------------------------|
| 1 | Molekularmassen Marker von Fermentas | |
| 2 | 2001/2002 | 22.1.02 |
| 3 | 2002/2003 | 31.10.02 |
| 4 | 2002/2003 (KFW vUO) | 21.1.03 |
| 5 | 2003/2004 | 12.11.03 |
| 6 | 2003/2004 | Nov 03 |
| 7 | 2004/2005 | 2.9.04 |
| 8 | 2004/2005 | 2.9.04 |

Anmerkung: alle Proben sind 1:20 verdünnt worden. Probe 8 ist 1: 10 verdünnt und

Eine deutliche Abnahme der unterschiedlichen Proteine im KFW ist sichtbar. Niedrigmolekulare Protease Inhibitoren (ca. 10 kDa) werden fast vollständig abgebaut und sind nur in konzentrierten Proben sichtbar. Eine drastische Abnahme ist besonders deutlich am Protein Patatin zu erkennen. Eine Gehaltsbestimmung mittels Lowry-Test bestätigt die Abnahme des Gesamtproteingehalts.

Tab. 3.10: Gesamtprotein von eingefrorenen KFW-Proben

| Kampagne | Datum der Probe | Gehalt in [mg/ml] gemessen am 10.2.05 | Vergleich [mg/ml] |
|------------------------|-----------------|--|------------------------------------|
| 2001/2002 | 22.1.02 | 8,22 | 21,24 (17.10.02) |
| 2002/2003 | 31.10.02 | 11,58 | 28,5 (3.12.02) |
| 2002/2003 (KFW vUO) | 21.1.03 | 11,55 | 22,11 (11.02.03) 18,4 (14.2.03) |
| 2003/2004 | 12.11.03 | 13,9 | 27,8 (26.6.04) |
| 2003/2004 | Nov 03 | 12,24 | 15,21 (28.9.04) |
| 2004/2005 | 2.9.04 | 14,71 | 25,3 (5.10.04) 21,51 (22.11.04) |

Nach längerer Lagerung weisen die Proben nur noch einen Gehalt von 40 % bis maximal 68 % des ursprünglichen Proteingehaltes auf. Der größte Anteil an Protein wird zu Beginn des Einfrierens zersetzt. Vorhandene Proteasen sind noch aktiv und beschleunigen den Prozess. Nach längerer Einfrierzeit lässt die Proteaseaktivität nach und der Prozess kommt zum Stillstand.

Alle aufgetauten und verwendeten Proben wiesen Ausflockungen und Sedimente auf. Die Sedimente einer KFW Probe vom Sep 2004 betragen bei einer Messung im Januar 2005 5,7 % der gesamten Probe, bei einer Probe vom Nov 2003 betragen die Sedimente im Januar 2005 4,7 % der Gesamtprobe. Die Massenbestimmung der Sedimente erfolgte über die Trockenrückstandsbestimmung. Die Sedimente konnten optisch in zwei Gruppen unterschieden werden: zum einen lag ein feinkörniger und weißer Niederschlag vor, der Reste von Stärke aufwies. Zum anderen lagen meist helle bis mittelbraune grob voluminöse Ausflockungen vor. Hierbei handelt es sich um ausgefallenes Protein.

3.5.2.1 Vorbereitung der Kartoffelbruchwasserproben

Die oben beschriebenen Ausflockungen mussten vor dem Einsatz der Adsorber aus den Proben entfernt werden, da sie die Membranen zusetzten würden. Um die Partikel aus der Lösung zu entfernen, wurden die Proben bei 3000 x g für 5 min zentrifugiert. Die fast klaren Überstände wurden über 0,2 µm Spritzenfilter filtriert. Anschließend wurden die so behandelten Proben in den Versuchen eingesetzt.

3.5.3 Vorversuche zur Kapazitätsbestimmung von Adsorbermembranen

Für ein effektives Arbeiten mit Membranadsorbentien ist es nötig, die Kapazitäten der Membranen festzustellen. Um die Kapazität der Membranen zu bestimmen, wurden die Membranadsorbentien als Spritzenaufsätze verwendet. Die KFW-Probe wurde mittels einer Spritze durch den Adsorbent gespritzt. Anschließend wurde der Adsorbent mit 20 ml Puffer gespült und die Proteine im folgenden Schritt von der Membran eluiert. Dazu wurde eine 1 M NaCl-Lösung verwendet. Um einen Überblick über pH-Abhängigkeiten zu erhalten, wurden die Spritzenversuche bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlichen Puffern durchgeführt. Da die Versuche nur mit Spritzen durchgeführt worden sind, entfällt eine Überwachung der Leitfähigkeit und der Druckverhältnisse. In den aufgefängenen Fraktionen wurde mittels Proteintest nach Lowry der Gesamtproteingehalt bestimmt. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Ergebnisse:

Tab. 3.11 : Übersicht über die Proteingehälter verschiedener Fraktionen aus dem Spritzenversuch, %-Angaben beziehen sich auf die eingesetzten Proteinmengen

| Probe | Membran | Proben- volumen | Protein- gehalt | Durch- bruch | Wasch- fraktion | Elutions- fraktion | Kapazität |
|----------------------------------|---------|--------------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------------|----------------------------|
| KFW pur, KPP pH 7 | Q15 | 10 ml | 281,5 mg | 78,2 % | 5,8 % | 4,3 % | 0,8 mg/cm ² |
| KFW pur, KPP pH 7 | S15 | 10 ml | 281,5 mg | 71,9 % | 8,1 % | 0,4 % | 0,08 mg/cm ² |
| KFW 1:1, KPP pH 7 | Q15 | 20 ml | 231,1 mg | 86,7 % | 12,5 % | 0,7 % | 0,1 mg/cm ² |
| KFW 1:1, KPP pH 7 | S15 | 20 ml | 231,1 mg | 85,3 % | 13,7 % | 0,3 % | 0,05 mg/cm ² |
| KFW 1:10, KPP pH 7 | Q15 | 100 ml | 241,1 mg | 95 % | 2,3 % | 2,6 % | 0,42 mg/cm ² |
| KFW 1:10, KPP pH 7 | S15 | 100 ml | 241,1 mg | 83,1 % | 6,1 % | 0,8 % | 0,13 mg/cm ² |
| KFW 1:10 Citratpuffer, pH3 | Q15 | 100 ml | 239,4 mg | 91,5% | 0,9 % | 0,3 % | 0,05 mg/cm ² |
| KFW 1:10 Citratpuffer, pH3 | S15 | 100 ml | 239,4 mg | 69 % | 0,5% | 0,4 % | 0,06 mg/cm ² |

Die Membranen wurden gezielt überladen, um eine vollständige Absättigung zu erzielen. Die eingesetzten Proteinmengen binden nicht annähernd auf den Membranen. Den geringsten Anteil an ungebundenen Proteinen findet man bei der Verwendung von Citratpuffer bei pH 3. Demnach haben auf der S-Membran 31% der Proteine gebunden. Die Elutionsbedingungen waren jedoch nicht ausreichend um den Hauptteil der Proteine von der Membran zu lösen. Dies war bei allen Versuchen der Fall. Nach der Tabelle ist der Proteinanteil im Durchbruch bei

Verwendung der S-Membranen geringer, der Anteil an Proteinen in den Waschfraktionen deutlich höher als in den vergleichbaren Fraktionen der Q-Membranen. Auf den Q-Membranen wird nicht soviel Protein gebunden wie auf den kationischen Membranen, dafür haften die anionischen Proteine des KFW besser auf der Q-Membran als die kationischen Proteine auf der S-Membran. Im Elutionsprofil spiegelt sich ebenfalls ein Q-S-Unterschied wieder. Der Proteinanteil der Q-Elutionen (liegt im Durchschnitt bei 2 %) ist höher als das der S-Fraktionen (liegt bei 0,5 %). Die anionischen Proteine lassen sich scheinbar leichter eluieren als die kationischen Proteine des KFW.

Betrachtet man die aus den Elutionsdaten berechneten statischen Kapazitäten so zeichnet sich folgendes ab. Nur die erste Versuchreihe der Q15-Adsorber hat eine vollständige Absättigung der Membran erbracht. Dabei wurde natives, nicht verdünntes KFW eingesetzt und ein KPP-Puffer von pH 7 verwendet. Die vom Hersteller angegebene Kapazität von 0,6-0,8 mg Protein/Adsorber wurde mit 0,8 mg Kartoffelprotein erreicht. Die nachfolgenden Versuche erreichten diese Auslastung nicht mehr, obwohl der Überschuss an Protein annähernd gleich war und nur das Probenvolumen sich vergrößert hat. Eine Vergrößerung des Probenvolumens verringert anscheinend die Bindungskapazität der Membranen. Die Konkurrenz der Proteine gegeneinander ist auf Grund der niedrigeren Konzentration pro ml geringer und die Proteine haben die Möglichkeit mehrere Bindungsplätze auf der Membranoberfläche einzunehmen. Dies hat eine geringere Auslastung und Kapazität der Membranen zur Folge. Der Einsatz von konzentrierten Kartoffelfruchtwasserproben erscheint in diesem Zusammenhang sinnvoll.

In der Testreihe mit dem kationischen S 15-Modul wurden die angegebenen Kapazitäten von 1-2 mg Protein/Modul nicht erreicht. Es wurden im Durchschnitt lediglich 4 % der vom Hersteller angegebenen Kapazität erreicht.

3.5.4 Trennung von KFW mittels linearem Gradienten-Profil

Die folgenden Untersuchungen sind mit Q15-Sartobind Adsorbermodulen in der FPLC durchgeführt worden.

Im *Scouting*-Versuch konnte Phosphatpuffer als geeignetes Puffersystem ermittelt werden. Um die Trennmöglichkeiten über Adsorbermodule zu beurteilen, wurde 1 ml unbehandeltes KFW mit geringer Flussgeschwindigkeit 1ml/min auf die Membran aufgebracht und mit einem linearen Salzgradienten von der Membran eluiert.

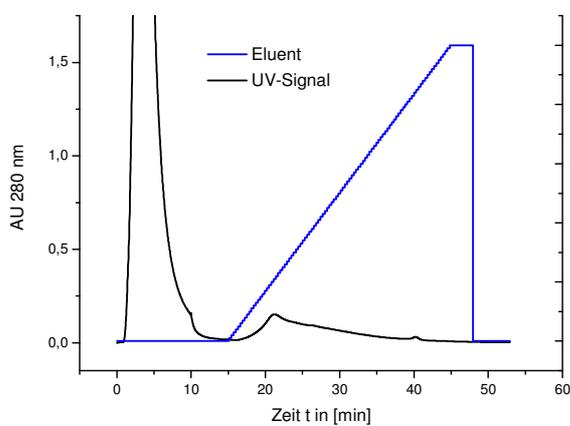


Abb. 3.17, links: lineares Elutionsprofil eines Q15- Adsorbers

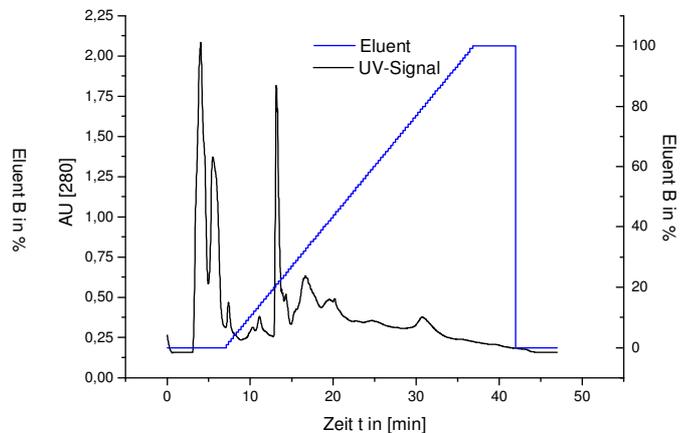


Abb. 3.18, rechts: lineares Elutionsprofil einer UNO Q-Gelsäule

Puffer A: 50 mM KPP, pH 7; Puffer B: 1 M NaCl in Puffer A

Bei der Auftrennung über das Q15 Adsorbermodul (Abbildung 3.17) erhält man einen breiten nicht spezifischen Peak als Elutionssignal. In der Grafik 3.18 ist im Vergleich dazu die Trennung einer 1 ml KFW-Probe über eine UNO Q-Austauschersäule ebenfalls mit einem linearen Gradientenprofil dargestellt. Es sind mehrere Peaks im Elutionsprofil der Gelsäule erkennbar. Ein signifikanter Peak ist bei einer Eluentenzumischung von ca. 20 % zu erkennen. Die anderen Signale sind nicht so signifikant und verbreitern die Basis des ganzen Signals. Eine Fraktionierung in einzelne Proteine und Proteingruppen ist über die Chromatographiesäule möglich.

Eine Auftrennung in einzelnen Proteingruppen mittels linearen Gradienten war über die Q15-Adsorber nicht möglich. Der langsam steigende Salzgehalt ist nicht ausreichend um die Proteine konzentriert von der Membran zu lösen. Im folgenden Abschnitt wurde die Wirkung unterschiedlicher Stufengradientenprofile zur Elution untersucht.

3.5.5 Vergleich unterschiedlicher Salzeluenten

Natriumchlorid ist eines der am häufigsten verwendeten Salze zur Elution. Eingesetzt wird es als 1 molare Lösung im Puffer (B). In der FPLC Anlage wird der Salzpuffer B mit dem Puffer A automatisch nach dem vorgegebenen Programm gemischt. Neben Natriumchlorid wurden auch Kaliumchlorid und Magnesiumchlorid getestet. Kaliumchlorid und Natriumchlorid wiesen in ihrer Anwendung keine signifikanten Unterschiede auf.

Magnesiumchlorid bietet als zweiwertiges Salz erweiterte Möglichkeiten zur Elution. Da es eine größere Ionenstärke hat, ist zu erwarten, dass bei geringerer Salzkonzentration Proteine von der Membran eluiert werden können. Die Verringerung der eingesetzten Salzmenge und damit eine Verringerung der Puffermenge und der Salzfracht im Abwasser bieten ökonomisch und ökologisch interessante Aspekte. Um die Unterschiede der Eluenten zu untersuchen, wurde jeweils 1 ml KFW-Probe auf einen Q15-Adsorber aufgebracht und mit einem Gradientenprogramm in 5 %-Stufen von der Membran gelöst.

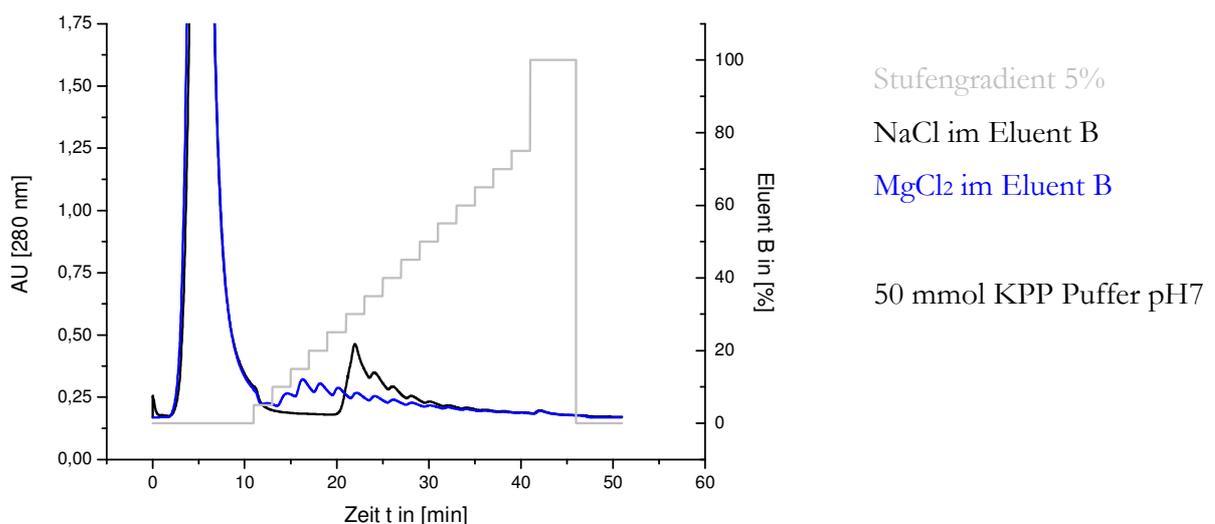


Abb. 3.19: Elution von Patatin im Stufengradienten von 5 % bis 70 % Natriumchlorid und Magnesiumchlorid

Die Abbildung 3.19 zeigt zwei unterschiedliche Elutionsprofile. Magnesiumchlorid eluiert Patatin mit einer geringeren Salzkonzentration von der Membran. Die Konzentration liegt bei 15 % Puffer B, das entspricht einer 0,15 M NaCl-Lösung. Das Signal ist breit und weniger signifikant als das, das bei Verwendung von NaCl generiert wurde. In den nachfolgenden Schritten wurden noch erhebliche Mengen Patatin mit dem Magnesiumsalzeluenten von der Membran gelöst. Ein

weiterer Nachteil des Magnesiumchlorids wurde in der folgenden Untersuchung ermittelt, bei der eluiertes Protein in der Magnesiumchloridfraktion ausgefallen war.

Der Hauptpeak des NaCl-Eluenten liegt bei einer Konzentration von 0,3 M NaCl und bestätigt das Ergebnis des *Scouting*-Tests. Auch hier werden noch erhebliche Mengen Patatin mit den folgenden Schritten von der Membran eluiert.

Der Versuch zeigt, dass die Wahl des Salzes Auswirkungen auf die zur Elution benötigte Konzentration hat. Wird ein einwertiges Salz eingesetzt muss die Salzkonzentration bei mindestens 0,3 M liegen. Bei Einsatz eines zweiwertigen Salzes sinkt die benötigte Konzentration auf die Hälfte. Nachteilig ist aber der verbreiterte Peak des Magnesiumchlorid-Eluenten, der zur Folge hat, dass zwar bei einer geringeren Salzkonzentration begonnen werden kann zu eluieren, es aber zur vollständigen Elution nicht ausreicht. Die benötigte Salzmenge wäre größer und somit stehen die Ersparnisse an Salz und Wasser in keinem Verhältnis mehr zum Einsatz von Natriumchlorid. Da die Kosten für Magnesiumchlorid (98 % ig 94,50 €/kg) um ein Vielfaches höher sind als für Natriumchlorid (99 % ig 21,40 €/kg), ist der Einsatz von Mg-Salzen ökonomisch nicht sinnvoll.

3.5.6 Trennung von KFW mittels Stufengradientenprofil

Die Erkenntnisse aus den Versuchen mit linearen und Stufengradientenprofilen zeigen, dass mit einem konzentrierten Salzpuffer Kartoffelproteine gezielt von der Membran gelöst werden können. Darauf aufbauend wurden unterschiedliche Profile mit drei bis vier Schritten untersucht. In einem 4-stufigen Profil wurde der Elutionspuffer B mit 10, 25, 50 und 100 % eingesetzt. In einem 3-stufigen Profil wurde der Elutionspuffer B mit 10, 50 und 100 % eingesetzt. Anschließend wurde in dem 3-stufigen Profil nur die Konzentration der ersten Stufe mit 20 % und 30 % in zwei weiteren Profilen variiert. Die in den folgenden Abbildungen dargestellten Messreihen wurden mit Q15-Adsorbentien durchgeführt. Als Proben wurde je 1 ml unverdünntes, gefiltertes Kartoffelfruchtwasser verwendet.

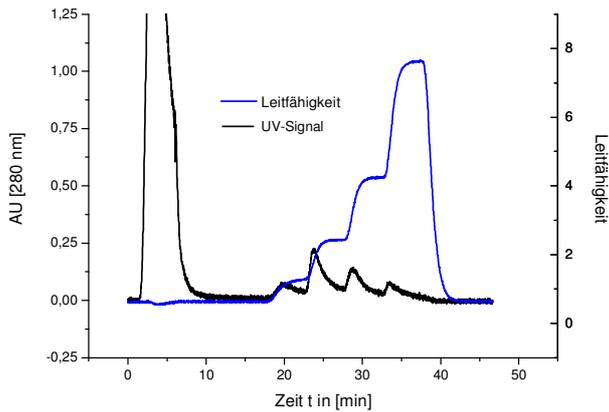


Abb.3.20: 4-stufiges Elutionsprofil

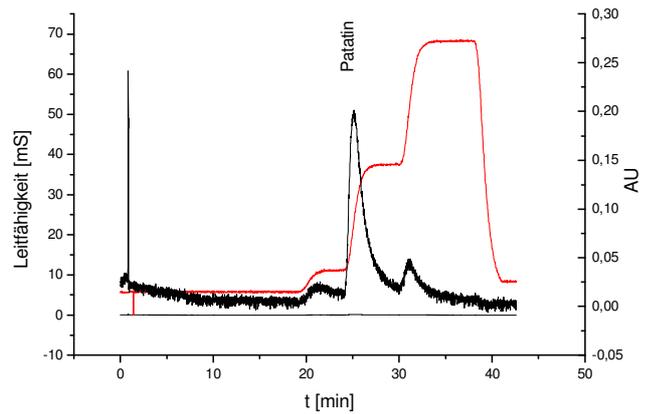


Abb.3.21: 3-stufiges Elutionsprofil,

Bei Einsatz des 4-stufigen Profils wird der Hauptteil des gebundenen Proteins bei einer Konzentration von 0,25 M NaCl (entspricht 25 % Puffer B) von der Membran eluiert. Es handelt sich jedoch nicht um eine gezielte Elution, da in den anderen Stufen des Profils ebenfalls Signale zu erkennen sind die auf einen Proteingehalt hinweisen. Eine bessere Elution ist mit dem 3-stufigen Programm (10, 50 und 100 %) möglich. Die Hauptmenge an Protein wird mit 50 % des Elutionspuffers B (entsprechend einer 0,5 M Salzlösung) von der Membran eluiert. Die Proteinmengen die mit 10 und 100 % Puffer B gelöst werden sind im Verhältnis dazu vernachlässigbar.

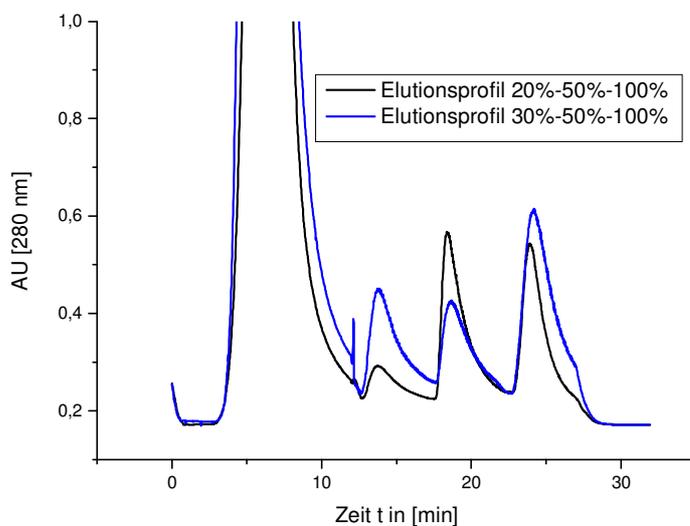


Abb. 3.22: Vergleich der Elutionsprofile eines Q15-Adsorbers

In weiteren Versuchen wurde die Salzkonzentrationen der ersten Stufe des 3-stufigen Profils in auf 20 % und anschließend auf 30 % Puffer B erhöht. Bei den Variationen wird deutlich, dass

eine Anfangskonzentration von 30 % Puffer B nicht ausreichend ist. Die Signale und die Proteinkonzentrationen der nachfolgenden Stufen sind zu hoch. Eine gezielte Abtrennung der Proteinfractionen in einem Schritt ist mit Konzentrationen unter 50 % an Elutionspuffer nicht möglich. Das Ergebnis aus dem Scouting-Experiment, dass die Elution mit 0,3 M NaCl durchgeführt werden kann, wird nicht bestätigt.

Nachfolgende gelelektrophoretische Untersuchungen haben gezeigt, dass in den einzelnen Fraktionen, die bei der 4-stufigen Elution gewonnen wurden, keine unterschiedlichen Proteine zu finden waren, sondern nur Patatinfraktionen vorlagen. Da ein Q-Adsorber verwendet wurde, konnten keine Protease Inhibitoren eluiert werden.

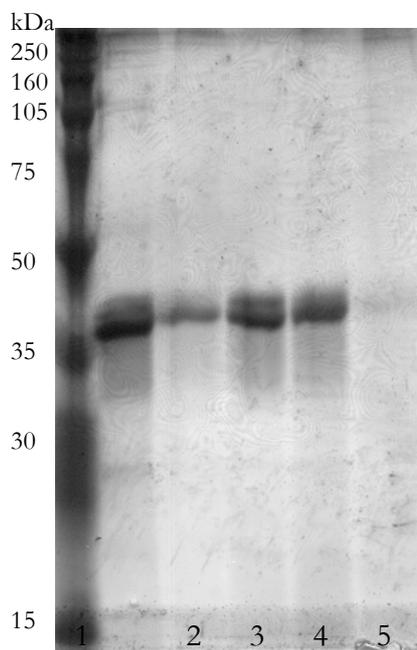


Abb. 3.23: SDS-PAGE (12,5 % Tris-HCL, Silberfärbung) Aufgefangene Fraktionen eines 4-stufigen Gradientenprofils (Versuch vom 14.3.03)

Spur 1: Molekular Marker
 Spur 2: Fraktion mit 10 % Elutionspuffer
 Spur 3: Fraktion mit 25 % Elutionspuffer
 Spur 4: Fraktion mit 50 % Elutionspuffer
 Spur 5: Fraktion mit 100 % Elutionspuffer

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass drei- und vierstufige Elutionsprofil nicht eingesetzt werden können, wenn die Proteine in einer Fraktion angereichert werden sollen. Die einzelnen Fraktionen eines Profils enthalten zuviel Protein. Es kann nur bei dem Versuch mit dem Elutionsprofil 10 %-50 %-100% eine Anreicherung von Patatin in einer Fraktion erreicht werden. Der Hauptproteinanteil wurde mit 0,5 M NaCl im Puffer (entspricht 50 % Puffer B) von der Membran eluiert.

Um die gewünschte hohe Proteinanreicherung in einer Fraktion zu erhalten, werden in den folgenden Untersuchungen zweistufige Gradientprofile zur Elution verwendet werden. Der Hauptproteinanteil soll ebenfalls mit 0,5 M NaCl im Puffer von der Membran eluiert werden.

3.6 Trennung von KFW über gekoppelte Sartobind Adsobermodule

3.6.1 Kopplung von zwei Modulen - dreistufiges Elutionsprogramm

Die in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Versuche wurden mit einer Adsorbereinheit durchgeführt, das heißt es wurden jeweils nur die anionischen oder kationischen Bestandteile aus der Lösung entfernt. Im Hinblick auf einen großtechnischen Einsatz ist es aber sinnvoll, mehrere unterschiedliche Membranmodule hintereinander zu schalten. Man erreicht dadurch Anreicherungen unterschiedlicher Proteine einer Lösung auf den entsprechenden Membranen in einem Arbeitsschritt.

Für die folgenden Messungen wurden eine Q 15- und eine S 15-Adsorbereinheit miteinander durch Luer-Lock-Verschlüsse verbunden und in die FPLC eingesetzt. Die Probe durchfließt zuerst das S-Modul, anschließend das Q-Modul. Die Adsorber werden in einem Schritt beladen. Während des folgenden Spülschrittes fällt das UV Signal auf ein Minimum ab. Nicht gebundene oder nur lose haftende Proteine wurden von der Membran entfernt. Nach dem Programmschritt 2 (Tab.3.12) wurden die Adsorber getrennt und separat voneinander eluiert. Als Steuerprogramm wurde ein dreistufiges Gradientenprogramm entwickelt.

Tab.3.12: dreistufiges Elutionsprogramm

| | Puffer | Volumen [ml] | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] | Programmpunkt |
|----------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | 100 % A | 3 | 0,5 | 6 | Probenauftrag |
| 2 | 100 % A | 20 | 2 | 10 | spülen |
| 3 | Mix: 90 % A+10 % B | 10 | 2 | 5 | eluiere |
| 4 | Mix: 50 % A+50 % B | 10 | 2 | 5 | eluiere |
| 5 | 100 % B | 10 | 2 | 5 | spülen und equilibrieren |
| 6 | 100 % A | 10 | 2 | 5 | spülen |

Als Probe wurde 1 ml einer unverdünnten, vorbehandelten (von Schwebstoffen befreit, siehe Kap.3.5.2.1) auf die Membranen aufgegeben. Der verwendete Puffer war ein 50mM Kaliumphosphatpuffer. Die Fraktionen wurden aufgefangen und untersucht. In der folgenden gelelektrophoretischen Darstellung (Abb.3.24) sind die Fraktionen über den gesamten Elutionszeitraum dargestellt. Man erkennt die Abnahme des Proteingehalts während der einzelnen Gradientenschritte.

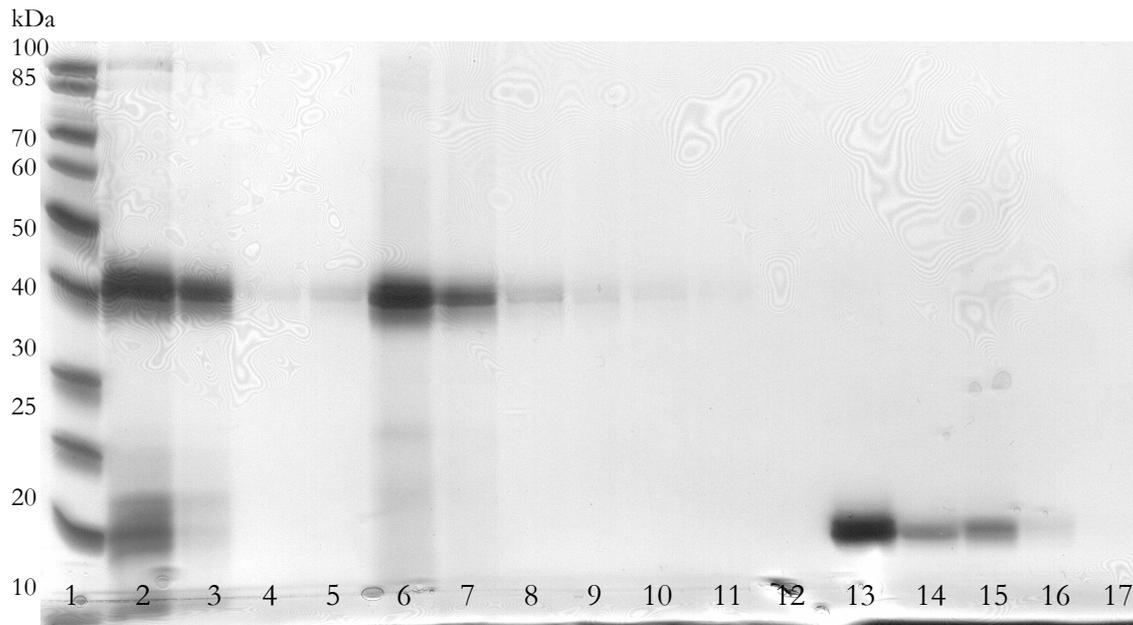


Abb. 3.24: SDS-Gel der einzelnen Elutionsfraktionen eines Q-15- und S-15-Adsorber (12,5 % Tris-HCl, Silberfärbung)[Reck, 2003]

| | | | |
|--------|---|---------|---|
| Spur 1 | Molekulargewichtsmarker (Fermentas) | Spur 10 | Q15-Fraktion eluiert mit 1 M NaCl (32.-33. min) |
| Spur 2 | KFW-Probe vom 26.8.03 (verdünnt, 1:75) | Spur 11 | Q15-Fraktion eluiert mit 1 M NaCl (34.-35. min) |
| Spur 3 | Durchlauf fraktion | Spur 12 | Membran mit Puffer gespült (36.-37. min) |
| Spur 4 | Q15-Fraktion eluiert mit 0,1 M NaCl (20.-21. min) | Spur 13 | S15-Fraktion eluiert mit 0,1 M NaCl (20.-21. min) |
| Spur 5 | Q15-Fraktion eluiert mit 0,1 M NaCl (22.-23. min) | Spur 14 | S15-Fraktion eluiert mit 0,1 M NaCl (22.-23. min) |
| Spur 6 | Q15-Fraktion eluiert mit 0,5 M NaCl (24.-25. min) | Spur 15 | S15-Fraktion eluiert mit 0,5 M NaCl (24.-25. min) |
| Spur 7 | Q15-Fraktion eluiert mit 0,5 M NaCl (26.-27. min) | Spur 16 | S15-Fraktion eluiert mit 0,5 M NaCl (26.-27. min) |
| Spur 8 | Q15-Fraktion eluiert mit 1 M NaCl (28.-29. min) | Spur 17 | S15-Fraktion eluiert mit 1 M NaCl (28.-29. min) |
| Spur 9 | Q15-Fraktion eluiert mit 1 M NaCl (30.-31. min) | | |

Die Probe wurde im Überschuß auf die Membran gegeben. Die Durchlauf fraktion enthält neben Patatin noch Reste von Protease Inhibitoren. Nach der Probenaufgabe wurden die Module voneinander getrennt. Zunächst wurden die Proteine des Q-Moduls eluiert. Zu erkennen ist in Spur 6 die Patatinbande bei ca. 42 kDa. Die Abtrennung von Patatin aus KFW ist über eine Q-Membran erfolgt. In der stark konzentrierten Fraktion mit einem Proteingehalt von 623 µg/ml sind nur schwach Proteinbanden von niedermolekularen Proteinen zu erkennen. In den darauf folgenden Fraktionen befinden sich nur geringe Mengen Patatin (siehe Tabelle 3.13).

Die in der Durchlaufraction fehlenden Protease Inhibitoren wurden durch den S15-Adsorber aufgefangen. Um die auf der S-Membran gebundenen Proteine zu eluieren, wurde das gesamte Programm ohne erneute Probenaufgabe wiederholt. In den Spuren 13 bis 17 sind die im zweiten Durchgang eluierten Proteaseinhibitoren bei 20 kDa zu sehen.

Tabelle 3.13 : Proteinkonzentration einzelner Elutionsfraktionen, Lowry-Protein-Test

| Fraktion | Proteinkonzentration $\mu\text{g/ml}$ |
|------------------------------------|---|
| Kartoffelruchtwasser | 24800 |
| Q15-Fraktion 20.-21. min (Spur 4) | 4,01 |
| Q15-Fraktion 22.-23. min (Spur 5) | 4,05 |
| Q15-Fraktion 24.-25. min (Spur 6) | 623 |
| Q15-Fraktion 26.-27. min (Spur 7) | 12,1 |
| Q15-Fraktion 28.-29. min (Spur 8) | 5,37 |
| Q15-Fraktion 30.-31. min (Spur 9) | 4,73 |
| Q15-Fraktion 32.-33. min (Spur 10) | 1,63 |
| Q15-Fraktion 34.-35. min (Spur 11) | 0,7 |
| S15-Fraktion 20.-21. min (Spur 13) | 11,5 |
| S15-Fraktion 22.-23. min (Spur 14) | 7,8 |
| S15-Fraktion 24.-25. min (Spur 15) | 11 |
| S15-Fraktion 26.-27. min (Spur 16) | 5,14 |
| S15-Fraktion 28.-29. min (Spur 17) | 2,46 |

Wie die Untersuchung bestätigt ist mindestens eine Salzkonzentration von 0,5 M im Eluenten nötig, um eine hochkonzentrierte Proteinfraction von den Membranen zu eluieren.

3.6.2 Kopplung von zwei Modulen- zweistufiges Elutionsprogramm

Wie aus dem voran gegangenen Abschnitt ersichtlich, ist ein Gradientenprofil mit einer hohen Anfangskonzentration nötig. Die erste Elutionsstufe wurde daher in den folgenden Messungen bei 50 % Elutionspuffer festgelegt. Als zweite Elutionsstufe wurde der Elutionspuffer B zu 100 % verwendet. Diese zweite Stufe dient hauptsächlich dazu, noch vorhandene Proteine endgültig von der Membran zu lösen. Da die Proteinlösung in einem Schritt über beide Adsorbermodule geführt wurde, musste ein Puffer in einem pH-Bereich gewählt werden, in dem beide Membransysteme beladungsfähig sind. Im Laufe der Voruntersuchungen erwies sich ein 20 mmol Kaliumphosphatpuffer bei pH 7 als am besten geeignet.

Tab. 3.14: Beladungsprogramm 10.3 für die gekoppelten Module Q15 und S15
Puffer A: 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7; Puffer B: 20 mM Kaliumphosphatpuffer + 1 mol NaCl pH 7

| | Puffer | Volumen [ml] | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] | Programmpunkt |
|----------|---|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | 100 % A | 2 | 2 | 1 | spülen |
| 2 | 100 % A | 3 | 0,5 | 6 | beladen |
| 3 | 100 % A | 10 | 1 | 10 | spülen |
| 4 | Stoppen des Programms, trennen der Module | | | | |
| 5 | 50 % A +50 % B | 15 | 2 | 7,5 | eluiere |
| 6 | 100 % B | 15 | 2 | 7,5 | eluiere |
| 7 | 100 % A | 10 | 2 | 5 | spülen und equilibrieren |

Tab. 3.15: Elutionsprogramm 10.2 für das getrennte Modul S15
Puffer A: 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7; Puffer B: 20 mM Kaliumphosphatpuffer + 1 mol NaCl pH 7

| | Puffer | Volumen [ml] | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] | Programmpunkt |
|----------|------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | Mix: 50% A+50% B | 15 | 2 | 7,5 | eluiere |
| 2 | 100% B | 15 | 2 | 7,5 | eluiere |
| 3 | 100% A | 10 | 2 | 5 | spülen und equilibrieren |

Die folgende Abbildungen 3.25 und 3.26 zeigen ein Beladungs- und Elutionsprofil gekoppelter Q15 und S15- Module, sowie das Elutionsprofil des S-Modul. Aufgegeben wurde 1 ml einer unverdünnten KFW-Probe.

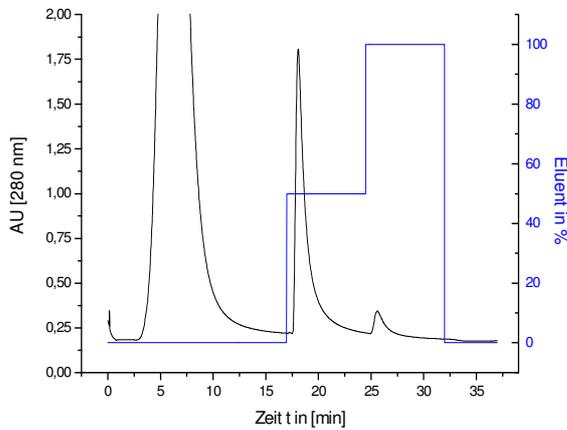


Abb.3.25: Beladungs- und Elutionsprofil eines Q15- Moduls

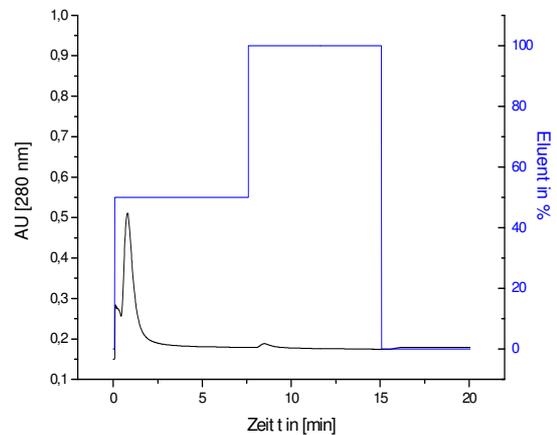


Abb.3.26: Elutionsprofil eines S15-Moduls

Die Abbildung 3.25 zeigt das gesamte Beladungs- und Elutionsprofil der Q-Membran. Ein Großteil der eingesetzten Proteine passiert die Membran ungehindert und kann auf keiner der beiden Ionenaustauscher binden. Dieses Durchbruchsignal tritt auf, wenn die Membranen überladen werden, aber auch bei Einsatz verdünnter Lösungen, die die angegebene Kapazität der Adsorbermodule nicht überschreiten. Es ist möglich aus dem komplexen Gemisch des KFW Patatin und Proteaseinhibitoren abzutrennen, aber die Abtrennung ist nicht vollständig. Ursache hierfür kann die Struktur von Patatin und den vorhandenen PI sein. Da Patatin nicht nur als 40 kDa Molekül vorliegt, sondern auch als Dimer auftritt, kann die größere Variante des Patatins mehr Bindungsplätze auf der Membran belegen als das vergleichbare Patatin-Monomer oder andere Proteine. Zusätzlich treten Konkurrenzreaktionen mit den anderen vorhandenen Proteinen auf der Membran auf. Die Folge davon ist eine Minderung der Bindungskapazität der Membranen.

Um die Reinheit der gewonnenen Fraktionen zu ermitteln, wurden gelelektrophoretische Untersuchungen durchgeführt. In der folgenden Darstellung Abb. 3.27 sind von Q15 und S15 Adsorbieren gewonnenen Fraktionen verwendet worden. In den Spuren 3 und 4 ist Patatin in den Eluaten zu erkennen. Es sind nur geringe Mengen von Protease Inhibitoren enthalten. In der Spur 6 ist eine Elutionsfraktion der Kationenaustauschermembran zu sehen. Patatin ist in dieser Probe nicht zu erkennen. Es wurden nur kationische Proteine aus der Lösung gebunden. Als

Hauptprotein ist eine Gruppe von 20 kDa schweren Proteaseinhibitoren zu erkennen. Geringe Anteile von niedermolekularen Proteinen sind in Form von dünnen Banden bei den Massen 18, 14 und 10 kDa zu erkennen.

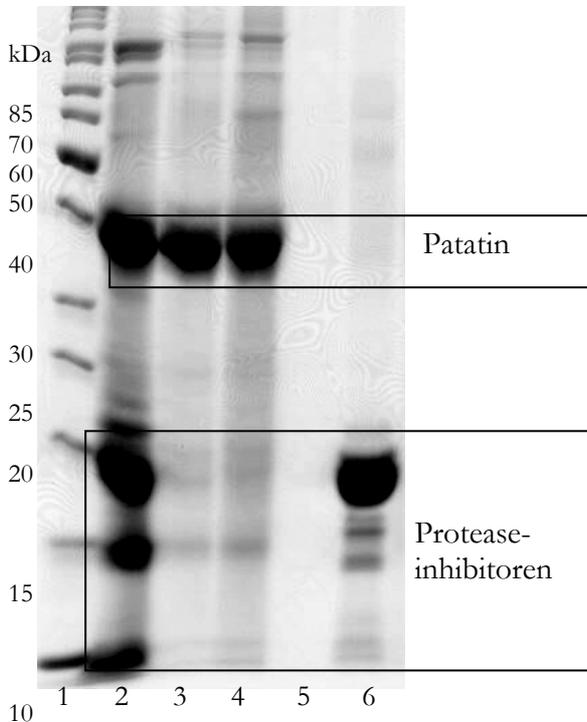


Abb.3.27: SDS-PAGE (Tris-HCL, 18%, BioRad, Coomassiefärbung)

Spur 1: Molekulargewichtsmarker
 Spur 2: Kartoffelruchtwasser 1:10 verdünnt
 Spur 3 und 4: Elutionsfraktion (0,5 M NaCl, Q 15)
 Spur 5: Waschfraktion
 Spur 6: Elutionsfraktion (0,5 M NaCl, S 15)

Die Ausbeute an Patatin aus KFW-Proben der Kampagne 2003 betrug durchschnittlich 26 % (bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge), das entspricht einer Bindungskapazität der Q-Membran von 0,31 mg Patatin pro cm² Fläche. Die Ausbeute an Protease Inhibitoren war geringer und lag bei 9,5 %. Es haben 0,11 mg PI pro cm² S-Membran gebunden.

Für die folgenden Messungen mit 75er Modulen wurde das Steuerprogramm in zwei einzelne Abschnitte getrennt. Das erste Programm dient nur zum Beladen der Membranen. In einem weiteren Programm wurden die getrennten Module nacheinander eluiert. Die folgenden Steuerprogramme in Tabelle 3.16 und 3.17 wurden für Messungen mit S75 und Q75-Adsorbermodulen verwendet.

Tab. 3.16: Beladungsprogramm für die Module Q 75 und S 75

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

Fraktionen haben ein Volumen von 2 ml

| | Puffer | Volumen [ml] | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] | Programmpunkt |
|---|---------|-----------------|-----------------------|---------------|---------------|
| 1 | 100 % A | 2 | 2 | 1 | spülen |
| 2 | 100 % A | 10 | 2 | 5 | beladen |
| 3 | 100 % A | 25 | 2 | 12,5 | spülen |

Tab 3.17: Elutionsprogramm für die Module Q 75 und S 75

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

Fraktionen haben ein Volumen von 2 ml

| | Puffer | Volumen [ml] | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] | Programmpunkt |
|---|--------------------|-----------------|-----------------------|---------------|--------------------------|
| 1 | 100 % A | 4 | 2 | 2 | spülen |
| 2 | Mix: 50 % A+50 % B | 20 | 2 | 10 | eluiere |
| 3 | 100 % B | 20 | 2 | 10 | eluiere |
| 4 | 100 % A | 10 | 2 | 5 | spülen und equilibrieren |

Im Gegensatz zu den kleineren Modulen wurde hier eine erhöhte Beladungsgeschwindigkeit von 2 ml/min verwendet. Signifikante Unterschiede zu geringeren Beladungsgeschwindigkeiten konnten in den Messungen nicht ermittelt werden.

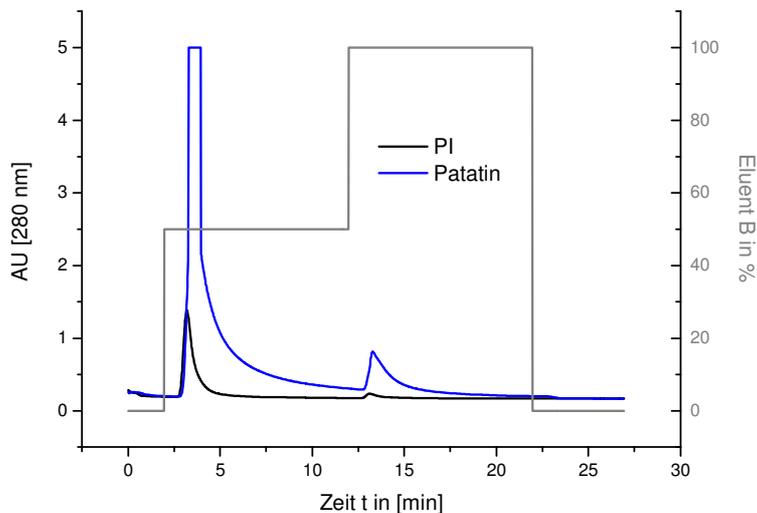


Abb. 3.28: Vergleich der Elutionssignale (UV) von Patatin und PI unter Verwendung von Q 75 und S 75 - Modulen

Die Signale der beiden Elutionen liegen direkt übereinander. Es wird deutlich, dass im zweiten Schritt nur minimale Mengen an Protease Inhibitoren von der Membran eluiert werden. Die Vergrößerung der Membranoberfläche hat eine Vergrößerung der Elutionssignale und damit eine Steigerung der Proteinausbeuten bewirkt.

Von dem Q 15-Modul konnten im Durchschnitt 4,65 mg Patatin eluiert werden. Die Elutionen des größeren Q75-Moduls ergaben bei vergleichbaren eingesetzten Probenmengen durchschnittlich 21,9 mg. Die Mengen an Protease Inhibitoren lagen bei S 15-Modulen bei 1,7 mg und bei S 75-Modulen bei durchschnittlich 7,7 mg.

Tab 3.18: Vergleich der eluierten Proteinmengen von den MA 15 und MA 75 Modulen

| Modul | Eluierte Proteinmenge in mg |
|-------|-----------------------------|
| Q 15 | 4,65 |
| Q 75 | 21,9 |
| S15 | 1,7 |
| S75 | 7,7 |

3.6.3 Bilanzierung der Ausbeute an gewonnenem Proteinen

Um einen wirtschaftlichen und rentablen Prozess zu entwickeln, mussten die Ausbeuten der unterschiedlichen Fraktionen bestimmt werden. Verwendet wurde dazu der Lowry Proteintest von der Firma Pierce (siehe Anhang). Zum besseren Vergleich wurden neben den absoluten Erträgen die prozentualen Anteile sowie die Menge gebundenen Proteins auf der Membran in mg/cm² bestimmt.

Die Untersuchungsreihen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Protein im KFW durchgeführt. Die Vergleichsdaten wurden daher in drei Kategorien zusammengefasst: in Versuchreihen mit geringer Proteinkonzentration (durchschnittlich 4,5 bis 6,3 mg/ml) im eingesetzten KFW, mit mittlerer Konzentration (durchschnittlich 10,75 bis 12,6 mg/ml) und hoher Konzentration (durchschnittlich 25,3 bis 27,8 mg/ml). Durchgeführt wurden die Messungen mit 75 cm² großen Modulen und mit Kartoffelfruchtwasser der Kampagnen 2003 und 2004.

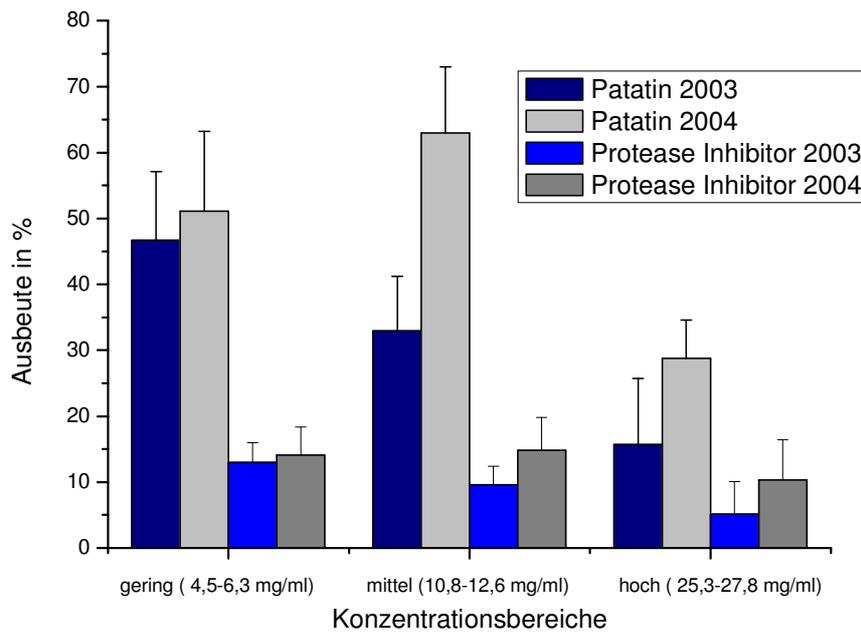


Abb.3.29: Vergleich der Ausbeuten von eluiertem Patatin und PI in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen

Aus der Abbildung 3.29 ist ersichtlich, dass eine Erhöhung der Proteinkonzentration nicht grundsätzlich eine Erhöhung der Ausbeute, bzw. Bindungskapazität zur Folge hat. Die Ausbeuten an Patatin und Protease Inhibitoren sinken bei der Verwendung von hoch konzentrierten Proteinlösungen. Die höchsten Ausbeuten gab es in der Kampagne 2003 bei gering konzentriertem KFW und in der Kampagne 2004 bei mittel konzentriertem KFW. Die Ausbeuten des Jahres 2004 haben sich im Falle des Patatins verdoppelt. Bei der Ausbeute der PI liegt eine Ausbeutesteigerung von 62 % vor.

Diese Ergebnisse aus den Vorversuchen von Kap. 3.5.3, die die besten Bindungskapazitäten mit hoch konzentrierten KFW-Lösungen hatten, konnten mit diesen Versuchsreihen nicht bestätigt werden.

Berücksichtigt werden muss bei der Betrachtung der Ausbeuten auch den Anteil an nicht gebundenen Proteinen im Durchbruch (dargestellt in Abbildung 3.30). Die gering konzentrierten KFW-Lösungen weisen nach Verlassen der Membran noch einen Proteingehalt von 33,7 % (Kampagne 2003) bzw. 21,3 % (Kampagne 2004) auf. Es ist nur eingeschränkt möglich, sämtliche Proteine aus dem Kartoffelfruchtwasser zu entfernen. Die Proteinbelastung der Abwässer könnte aber durch den Einsatz von Membranadsorbentien dennoch erheblich herab gesetzt werden.

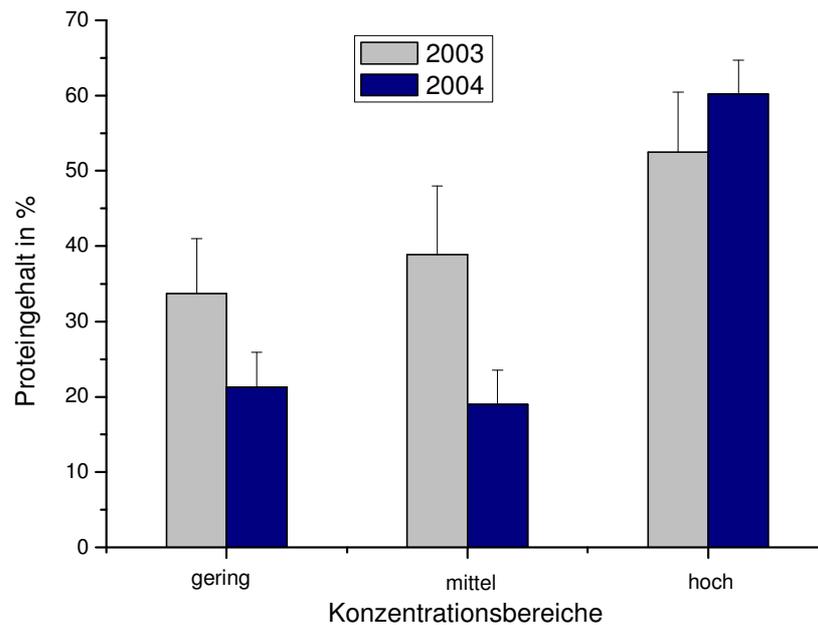


Abb 3.30: Proteingehalt der Durchbruchfraktionen in den unterschiedlichen Konzentrationsbereichen (bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge)

In der folgenden Abbildung 3.31 sind die Bindungskapazitäten von anionischen und kationischen Membranadsorbentien zusammengefasst. Berechnet wird die Kapazität in diesem Fall über die von den Membranen eluierten Mengen an Patatin und Protease Inhibitoren. Die höchste Bindungskapazität im Bereich von $0,3 \text{ mg/cm}^2$ weisen die Q-Membranen bei der Verwendung von mittel und hochkonzentriertem KFW der Kampagne 2004 auf. Die Protease Inhibitoren der Kampagne 2004 binden um durchschnittlich 70 % besser auf der S-Membran als die Protease Inhibitoren der Kampagne 2003. Die durchschnittlichen Ausbeuten mit Proben der Kampagne 2004 liegen im mittleren Konzentrationsbereich bei Patatin um 91 % über denen des Vorjahres. Im höher konzentrierten Bereich ist eine Steigerung von 83 % zu beobachten. Die prozentualen Unterschiede der Ausbeute und Bindungskapazitäten der Membranen in den beiden Kampagnen liegen teilweise an der geringen Lagerungszeit des KFW, aber auch an der jeweiligen Zusammensetzung der verarbeiteten Kartoffelsorten.

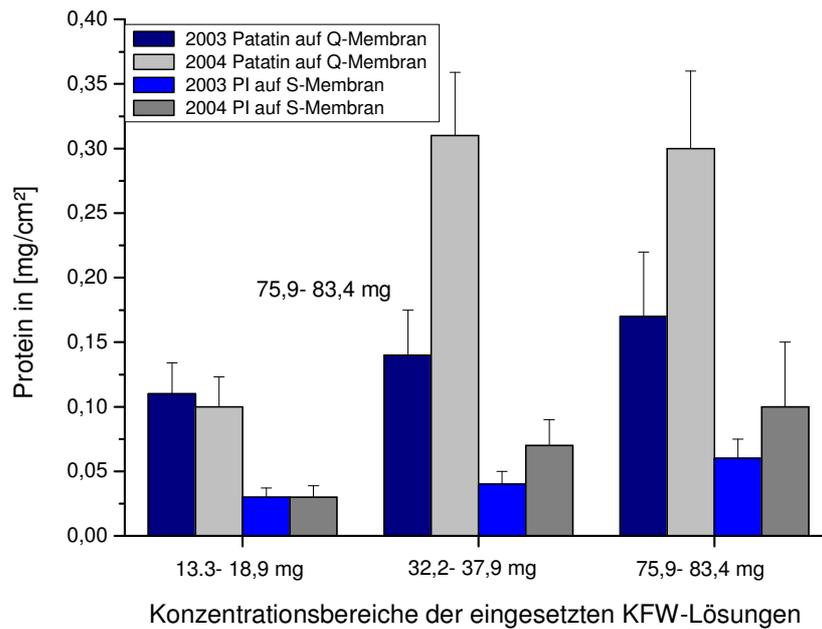


Abb. 3.31: Gebundene Mengen Patatin und Protease Inhibitoren auf den Membranen der Kampagnen 2003 und 2004

3.6.4 Reinigung und Lagerung von Adsorbermodulen

Nach mehrfacher Beladung der Adsorbermembranen traten immer wieder Verblockungen auf. Die Membranen wurden undurchlässig und es konnte keinerlei Stofftransport durch die Membranen erzielt werden.

Da die in dieser Arbeit verwendeten Adsorbermodule als Spritzenvorsatz verwendet werden können, wurden die Reinigungsschritte manuell und nicht automatisch in der FPLC durchgeführt. Zum Reinigen wurde 0,1 M Natronlauge verwendet. 10 bis 20 ml der Lauge wurden langsam mit Spritzen durch den Adsorber gedrückt. Bei leichten Verblockungen kam es bereits nach wenigen Millilitern zu einer Erhöhung des Durchflusses. Bei schwerwiegenden Verblockungen wurden die Adsorber mit Natronlauge befüllt und bei Raumtemperatur für eine Stunde oder über Nacht im Kühlschrank gelagert. Hat die Lagerung in 0,1 M Natronlauge zur Lösung der Verblockungen nicht ausgereicht wurden auch 0,5 und 1 M Natronlaugen verwendet. Nach jeder Reinigung mit Natronlauge wurden die Module ausführlich mit 20 mM Kaliumphosphat-Puffer gespült, bis keine alkalische Reaktion im austretenden Puffer mehr

auftritt. Wasser kann zum Spülen nicht verwendet werden, da die Membran aufquillt und die Poren sich verkleinern. Die zum Spülen verwendete Lösung muss eine Leitfähigkeit von mindestens 3 mS aufweisen [Plate, 2003].

Da die Membranen beim Beladen mit KFW nach einigen Zyklen braune Verfärbungen aufwiesen, wurden die Membranen auch mit Zitronensäure behandelt. Die Membranen hellten sich auf, aber eine Reinigung der Membran und damit eine Erhöhung der Flussrate konnte nur bei leichten Verblockungen festgestellt werden. Bei stärkeren Verschlüssen der Membran musste zusätzlich eine Reinigung mit Natronlauge erfolgen.

Waren die Module alkalifrei oder säurefrei wurden sie in der FPLC auf ihre Durchlässigkeit getestet. Dazu wurde ebenfalls 20 mM Kaliumphosphat-Puffer verwendet. Laut Herstellerangaben dürfen die Membranen mit einem maximalen Druck von 105 psi betrieben werden. Wurde der Gegendruck zu hoch, musste die Membran erneut gereinigt werden. Generell wurden Reinigungen schon bei den ersten Anzeichen einer Verblockung durchgeführt um eine schonende Reinigung zu gewährleisten. Module die nach einer vollständigen Verblockung wieder eingesetzt wurden, konnten meist nur für wenige Beladungszyklen eingesetzt werden bevor erneut eine vollständige Verblockung auftrat.

Die Lagerung der Membranen erfolgte bei 4°C. Um eine Besiedelung von Mikroorganismen zu unterbinden, wurden die Membranen in einem Gemisch aus 20 % Ethanol und 1 M KCl-Lösung gelagert. Bei längeren Lagerungen wurden die Membranadsorber in einer Natriumazidlösung aufbewahrt.

Durch die Verwendung von Proben aus verschiedenen Kampagnen in unterschiedlichen Konzentrationen und mit variierenden Proteinzusammensetzungen erlangten die Membran zu sehr unterschiedlichen Zeiten ihren Arbeitspunkt.

Wurden Membranadsorber längere Zeit beladen und eluiert, ohne dass sie zwischengelagert wurden, war die Lebensdauer wesentlich höher. Die Reinigungen wurden dann nach der 16. bis 20. Messung durchgeführt und die Adsorber konnten erneut eingesetzt werden.

Sind nur wenige Messungen durchgeführt und die Membran zwischengelagert worden, musste eine Reinigung meist schon nach dem 8. Zyklus erfolgen. Die Lagerung der Membranen hat nicht nur negative Wirkung auf vorzeitige Verblockung sondern auch auf die Bindungskapazität.

In der folgenden Grafik ist das Absinken der Bindungskapazität auf ein Drittel der Anfangskapazität eines Q75 Adsorbermoduls deutlich sichtbar. Das Modul wurde nach dem 4. Durchlauf für längere Zeit in einer Natriumazidlösung bei 4°C aufbewahrt. Bei der

anschließenden Benutzung sinkt die Bindungskapazität von 0,31 mg Protein/cm² auf 0,1 mg/cm² ab, bleibt aber während der weiteren Verwendung konstant. Auf der S-Membran liegt die Bindungskapazität durchschnittlich bei 0,1 mg Protein/cm² während der ersten Durchläufe und sinkt erst im Laufe der weiteren Benutzung auf 0,05 mg Protein/cm² und weniger.

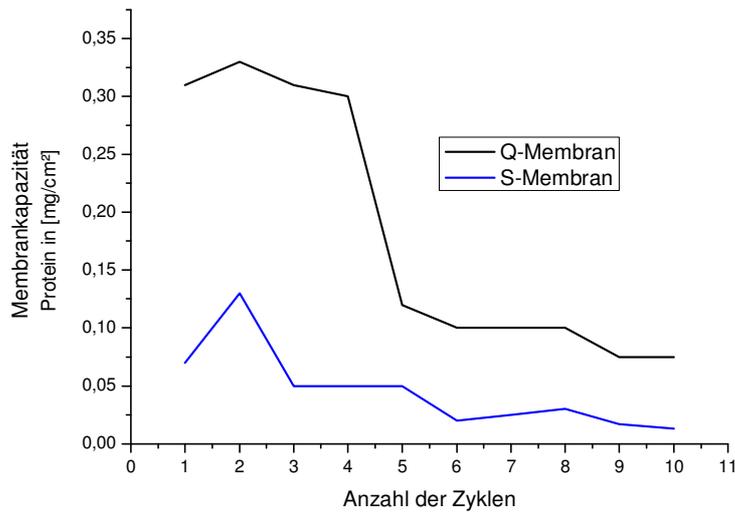


Abb. 3.32: Membrankapazitätsverhalten bei zwischen gelagerten Adsorbentien

3.7 Proteinauftrennung über schwache Ionenaustauschmembranen

In dieser Versuchsreihe wurde das adsorptive Verhalten der Kartoffelproteine gegenüber schwachen Ionenaustauschermembranen untersucht. Es sollte speziell getestet werden, ob unter der Verwendung der schwachen Kationenaustauschermembran C eine Auftrennung der Proteine der Gruppe der Protease Inhibitoren erreicht werden kann. Die Protease Inhibitoren haben unterschiedlichste Eigenschaften und es besteht daher die Möglichkeit, dass einige der PI auf schwachen Ionenaustauschermembranen leichter binden.

Verwendet wurden dazu Sartobind D15 Membraneinheiten für die Patatinfraction, die Sartobind C15 Membranen wurden für die minoren Proteine (PI) eingesetzt. Im Vergleich zu den starken Ionenaustauscher-Membranen Q und S haben diese einen Arbeitsbereich im pH-Bereich von 4 bis 10. Die Bindungskapazität der Adsorber liegt bei 9 mg pro Modul.

Der Versuch wurde analog zu den voran gegangenen (siehe Abschnitt 3.6.2) durchgeführt. Verwendet wurde ebenfalls ein 20 mM KPP Puffer (A), zum Eluieren wurde derselbe Puffer mit 1 M NaCl versetzt (B). Die gekoppelten Adsorber wurden mit 1 ml KFW der Kampagne 2004 mit einer Konzentration von 6,13 mg/ml beladen, die Probe wurde vor Verwendung über eine 0,2 µm Membran gefiltert. Das Steuerprogramm ist dem Anhang zu entnehmen. Nach dem Beladen wurden die Module entkoppelt und getrennt eluiert.

Die Untersuchung der gewonnenen Proteinfractionen ergab eine wesentlich geringere Ausbeute an Protein als unter der Verwendung der starken Ionenaustauscher.

Tab. 3.19: Vergleich der Proteinmengen pro cm²

| Modul | Ausbeute Patatin | Ausbeute minore Proteine |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| D 15 und C15 | 0,048 mg/cm ² | 0,013 mg/cm ² |
| Q 15 und S15 | 0,1 mg/cm ² | 0,03 mg/cm ² |

Der Anteil des mit Hilfe der C-Membran isolierten Patatins beträgt 48 % bezogen auf die Ausbeute der Versuche mit starken Ionenaustauscher (Kap.3.6.2). Bei den Protease Inhibitoren liegt der Anteil bei 43 %. Die graphische Darstellung des Vergleichs der Elution von einer Q- und einer D-Membran machen die Unterschiede deutlich.

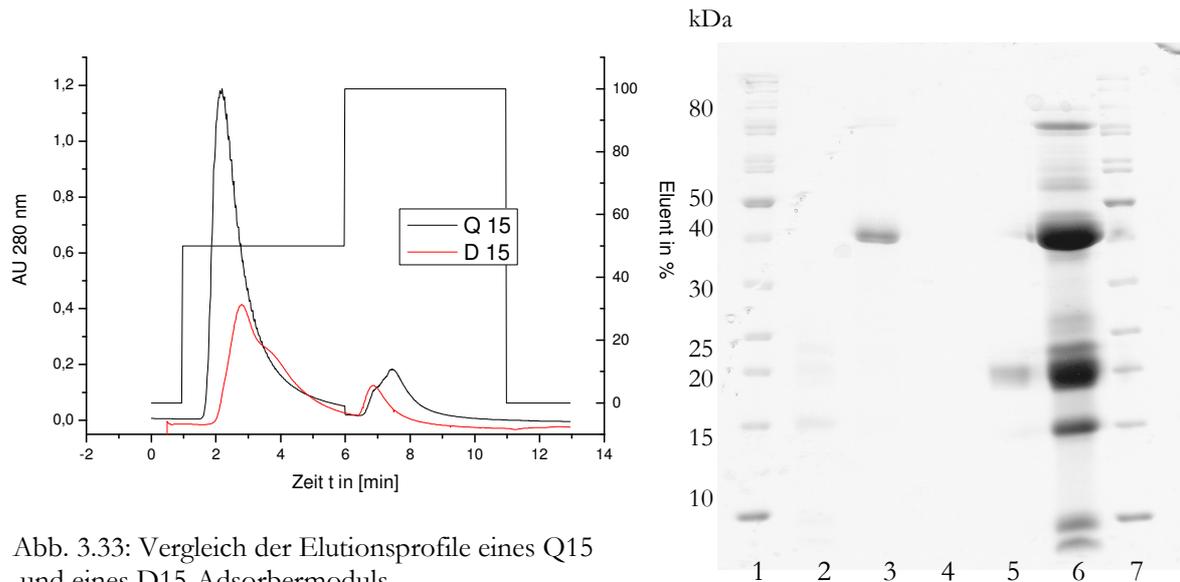


Abb. 3.33: Vergleich der Elutionsprofile eines Q15 und eines D15-Adsorbermoduls

Abb. 3.34 rechts: SDS-PAGE (15% Tris-HCl, BioRad, Coomassiefärbung)
 Spur 1 und 7: Molekularmassen Marker, Spur 2: Durchbruchfraktion 1:10, Spur 3: Fraktion 1 der D-Membran, Spur 4: Fraktion 2 der D-Membran, Spur 5: Fraktion der C-Membran, Spur 6: KFW Probe

Mit der SDS-PAGE Gelelektrophorese wurde nachgewiesen, dass keine Verbesserung der Ergebnisse im Vergleich mit starken Ionenaustauschern erzielt wurde.

In den Spuren 1 und 7 befinden sich Markerproteine. In der Spur 2 wurde der Durchbruch 1:10 verdünnt aufgetragen. Es sind noch schwach Proteinbanden im unteren Bereich (15, 20, 23 kDa) zu erkennen. Die Verdünnung der Probe war in diesem Fall zu stark gewesen.

Die Bande bei 40 kDa in der Spur 3 ist das Protein aus dem gewonnenen Eluat der D-Membran. Das Patatin konnte mit der schwachen Anionenaustauschermembran aus dem Fruchtwasser entfernt werden. In der Spur 4 wurde eine Probe einer weiteren Fraktion, die von der D-Membran erhalten wurde, aufgetragen. Der Proteingehalt war zu gering um eine Proteinbande zu erhalten.

Die 20 kDa Bande in Spur 5 entstammt aus dem Eluat der C-Membran. Die Protease Inhibitoren konnten auf dieser Membran angereichert und anschließend eluiert werden.

Eine weitere Auftrennung in Protease Inhibitoren, die nicht der 20 kDa Gruppe zugeordnet werden können, konnte nicht durchgeführt werden. Die Selektivität der schwachen Ionenaustauschermembranen ist zur Trennung in weitere Gruppen der PI nicht geeignet.

3.8 Reinheitsprüfung

Die in den voran gegangenen Versuchen gewonnenen patatin- und proteaseinhibitorhaltigen Proteinfraktionen wurden gelelektrophoretisch untersucht. Um die Proteinfraktionen in ihrer Zusammensetzung genauer zu bestimmen, wurden zusätzlich MALDI-Untersuchungen durchgeführt. Probleme bereiteten der zum Teil niedrige Proteingehalt der einzelnen Fraktionen, sowie der hohe Salzgehalt, der die MALDI-Messung beeinflusst. Die Proteinfraktionen mussten aufkonzentriert und entsalzt werden. Dazu wurden unterschiedliche Methoden verwendet.

Neben der Untersuchung aufkonzentrierter Proben wurden auch enzymatische Verdaue einzelner Patatin- und Protease Inhibitorbanden aus SDS-PAGE Gelen durchgeführt

3.8.1 Probenbehandlung: Aufkonzentrationen und Entsalzungen

3.8.1.1 Vivaflow 50

Die Vivaflow 50 Kassette der Firma Vivascience AG ist eine *Cross-Flow* Membraneinheit. Eingesetzt werden sie zur Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinlösungen. Moleküle, deren Massen kleiner als die Ausschlussgrenze der Membran sind, werden abgetrennt. Die größeren Proteine werden im Retentat angereichert. Im Permeat befinden sich Salze und niedermolekulare Bestandteile.

Als Ausschlussgrenze wurden 30 kDa gewählt um die gesammelten patatinhaltigen Fraktionen mehrerer Durchläufe damit aufzukonzentrieren. Die aufkonzentrierten Proben wurden zusätzlich über Dialyseschläuche entsalzt. Die so gewonnenen salzfreien Proben wurden im MALDI untersucht.

Ein großer Nachteil dieser Methode war der große Verbrauch an Ausgangsmaterial. Um eine Vivaflow-Kartusche zu betreiben, waren ca 100 bis 130 ml an Lösung notwendig, da das Totvolumen bedingt durch Schlauchverbindungen und Kartusche selbst erheblich war. Ein weiterer negativer Faktor war der hohe Zeitaufwand. Für eine Aufkonzentration wurden durchschnittlich 8 Stunden benötigt, hinzu kam die Zeit für eine Dialyse die zwischen 12 und 48 h betrug.

Als Aufkonzentrierungseinheit für größere Mengen war dieses System gut geeignet. Die Trennleistung für ein komplexes Gemisch in einzelne Proteingruppen wurde in Nebenversuchen untersucht. Für unverdünntes natives Kartoffelfruchtwasser mit einem Proteingehalt von 24,3 g/L sind diese Kartuschen nicht geeignet. Ein dauerhafter Einsatz war nicht möglich, da die

Membranen nach kurzer Zeit verblockten. Aus verdünnter KFW-Lösung können die Patatinmoleküle mit einer 30 kDa-Membran herausgefiltert werden. Die Proteinlösung wird um den Faktor 3 aufkonzentriert.

3.8.1.2 Vivaspin 20

Die *Cross-Flow*-Einheit Vivaspin 20 der Firma Vivascience ist im Gegensatz zur Vivaflow-Kassette eine Zentrifugeneinheit. Sie ist geeignet, um im Millilitermaßstab proteinhaltige Lösungen aufzukonzentrieren. Diese Einheit wurde hauptsächlich zum Aufkonzentrieren der fraktionierten Eluate aus den Adsorber-Versuchen (Abschnitt 3.5) verwendet. Um eine Abtrennung von störenden niedermolekularen Proteinen zu erlangen, wurden zur Aufkonzentration der patatinhaltigen Fraktionen Vivaspin 20 Einheiten mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa verwendet. Zur Aufkonzentrierung der Proteaseinhibitoren wurden Membranen mit einer Ausschlussgrenze von 5 und 10 kDa verwendet. Diese Spineinheiten konnten mit maximal 20 ml Proteinlösung bestückt werden und wurden anschließend nach einem festgelegten Protokoll zentrifugiert (siehe Anhang).

Die Aufkonzentration erfolgte bei den Patatinfraktionen bei einer eingesetzten Konzentration von durchschnittlich 1,1 mg/ml auf eine Konzentration von 21,4 mg/ml. Das Volumen wurde von 20 ml auf durchschnittlich 0,75- 1,5 ml reduziert. Teilweise waren dabei mehrere Zentrifugationsdurchgänge notwendig.

Die Aufkonzentration der proteaseinhibitorreichen Fraktionen betrug lediglich einen Faktor 5 gegenüber der eingesetzten Lösung. Trotz mehrfachem Zentrifugieren konnte eine Volumenreduktion wie bei der aufkonzentrierten Patatinfraktionen nicht erreicht werden. Die konzentrierten Proben hatten nach den Behandlungen mit den Vivaspineinheiten ein Restvolumen von ca. 3-4 ml.

Zur weiteren Entsalzung wurde die aufkonzentrierte Probe mit dest. Wasser (maximal 5 ml) versetzt und nach Protokoll zentrifugiert. Diese erneute Verdünnung und Aufkonzentration kann dazu führen, dass die gelösten Proteine ausfallen, da ihnen die Salze zur Stabilisierung entzogen werden. Dieser Schritt der Entsalzung wurde daher nur maximal zweimal hintereinander durchgeführt.

Mit diesen aufkonzentrierten und entsalzten Proben wurden anschließende MALDI-Untersuchungen durchgeführt.

3.8.2 Enzymatischer Verdau (In-Gel-Verdau)

Um eine spezifischere Analyse der gewonnenen patatin- und proteaseinhibitorhaltigen Fraktionen zu erhalten, wurden enzymatische Verdauungen mit Proteinbanden aus SDS-Gelelektrophoren durchgeführt. Dazu wurden Proteinbande aus einem Gel ausgeschnitten und mit Trypsin behandelt. Zum enzymatischen Verdau geeignet sind nur Gele die nach der Coomassiemethode gefärbt sind.

Trypsin ist als Endoprotease in der Lage Peptidbindungen nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin zu hydrolysieren. Die Aminosäureketten der Proteine werden in Bruchstücke geteilt. Die KR-Spaltung ist C-terminal. Die so behandelte Proteinprobe wird anschließend über die MALDI-Technologie analysiert. Das entstehende Fragmentierungsmuster ist nicht zufällig und liefert eine Identifizierungsmöglichkeit des gesuchten Proteins. Über die so bestimmte Masse der Bruchstücke kann in einem Datenbankenabgleich das Protein identifiziert werden. [Schrattenholz, 2001]

Der Vorteil dieser Methode liegt unter anderem in der direkten Verwendung von Proteinbanden, die nach einer gelelektrophoretischen Behandlung „sauber“ im Gel vorliegen und verdaut werden können. Zum anderen sind die hergestellten Proben salzarm und die entstandenen kleinen Peptidstücke sind zur Vermessung am MALDI gut geeignet.

Das für die Experimente verwendete Trypsin war „Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade“ der Firma Promega, Madison (USA). Durch Methylierung der Lysinreste ist das Trypsin weitgehend gegen Autolyse resistent. Das Verfahrensprotokoll ist dem Anhang zu entnehmen.

3.8.3 MALDI-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Analysenmethode zur Molmassenbestimmung freier Ionen im Hochvakuum. Die gasförmigen Ionen können mit unterschiedlichen Techniken getrennt und analysiert werden.

Die MALDI-Technik (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*) erlaubt es auch große Moleküle wie Peptide und Proteine massenspektrometrisch zu untersuchen. Seit Einführung dieser schonenden Technik Anfang der 80er Jahre gehören MALDI Untersuchungen zum festen Bestandteil der Proteinanalytik.

Im Gegensatz zur herkömmlichen Massenspektrometrie werden die Moleküle in einer Matrix aus kleinen organischen Molekülen eingebettet. Verwendet werden dazu Bersteinsäure, Cyano-4-

hydroxyzimtsäure oder Nicotinsäure. Die Proteine gehen mit den Matrixmolekülen eine Cokristallisation ein, wobei das Protein in den Matrixkristall eingebaut wird. Der Cokristall wird im Gerät einem intensiven Impuls mit kurzweiliger Laserstrahlung (Nd-YAG bei 355 nm; N₂ bei 337 nm) ausgesetzt. Durch den Laserimpuls erfahren die Matrixmoleküle ein thermisches Ungleichgewicht (die in den Matrixmolekülen gespeicherte Anregungsenergie erzeugt Störungen und Ausdehnungen) das sich in Form eines Phasenübergangs bemerkbar macht und dabei explosionsartig Matrixmoleküle und Proteinmoleküle als Ionen aus der Matrixoberfläche freisetzt. Durch die Matrixmoleküle wird verhindert, dass die großen Proteinmoleküle in zu kleine Peptide fragmentieren, die nicht mehr eindeutig zu zuordnen sind. Die Ionen gelangen zu einem Massenanalysator. Die Trennung und anschließende Detektion erfolgt in einem TOF-Analysator (*Time of flight*), in dem die Ionen nach Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt werden.

Die Untersuchungen wurden mit einem MALDI-Gerät der Firma Kratos Analytical, Manchester, Großbritannien durchgeführt. Zur Kalibrationen dienen intern gespeicherte Referenzspektren, sowie mit Insulin durchgeführte Messungen.

Weitere MALDI-Messungen wurden am IPF (Institut für Peptidforschung), Hannover durchgeführt.

3.8.3.1 MALDI-Ergebnisse einer unverdauten Probe

Für die folgende Messung ist eine gepoolte Probe von Eluaten der Q-Membran verwendet worden. Sie wurde über eine Vivaflow 50 Kassette aufkonzentriert und mittels Dialyse entsalzt. Der Gehalt an Protein nach der Dialyse betrug 1,67 mg/ml. Als Matrix diente Sinapinsäure, ein Zimtsäurederivat und 2,5-Dihydroxybenzoesäure, als Referenz wurde Insulin sowie Myoglobin, Lysozym und Trypsinogen verwendet.

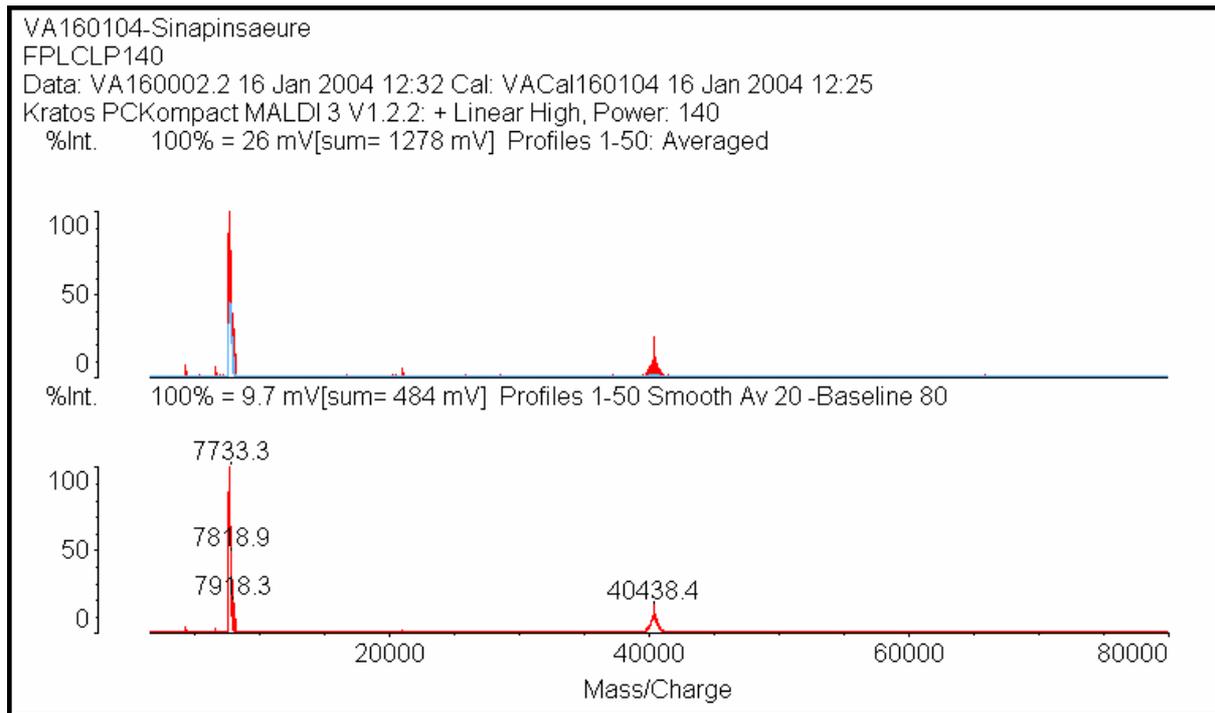


Abb.3.35: MALDI-Spektrum einer über Vivaflow 50 aufkonzentrierten Probe [Reck, 2003]

Die Messung ergab einen Peak bei 40438,4 Da und ein Signal bei 7733,3 Da. Bei dem Signal von 7733 Da kann es sich um einen Proteaseinhibitor (PI I) handeln, der in der Literatur mit einer Masse von 7,7-7,9 kDa angeführt wird. Da er zu den sauren Proteinen zählt ist seine Bindung auf der Q-Membran möglich. Bei gelelektrophoretischen Untersuchungen konnte das Protein nicht detektiert werden, da es auf Grund der geringen Masse auf SDS-PAGE Gelen nicht nachgewiesen werden kann. Das es sich bei dem Peak um eine Untergruppe des Patatins handeln könnte ist eher unwahrscheinlich, da die Fragmentierung zu weit von der Masse der Patatinfragmente abweicht.

Der Massepeak 40438 entspricht dem Wert des Patatins. Die geringe Intensität des Hauptproteins Patatin liegt unter anderem daran, dass die technische Messgrenze der Apparatur für große Moleküle erreicht ist.

Die folgende Abbildung zeigt das Signal des 40 kDa Peak vergrößert.

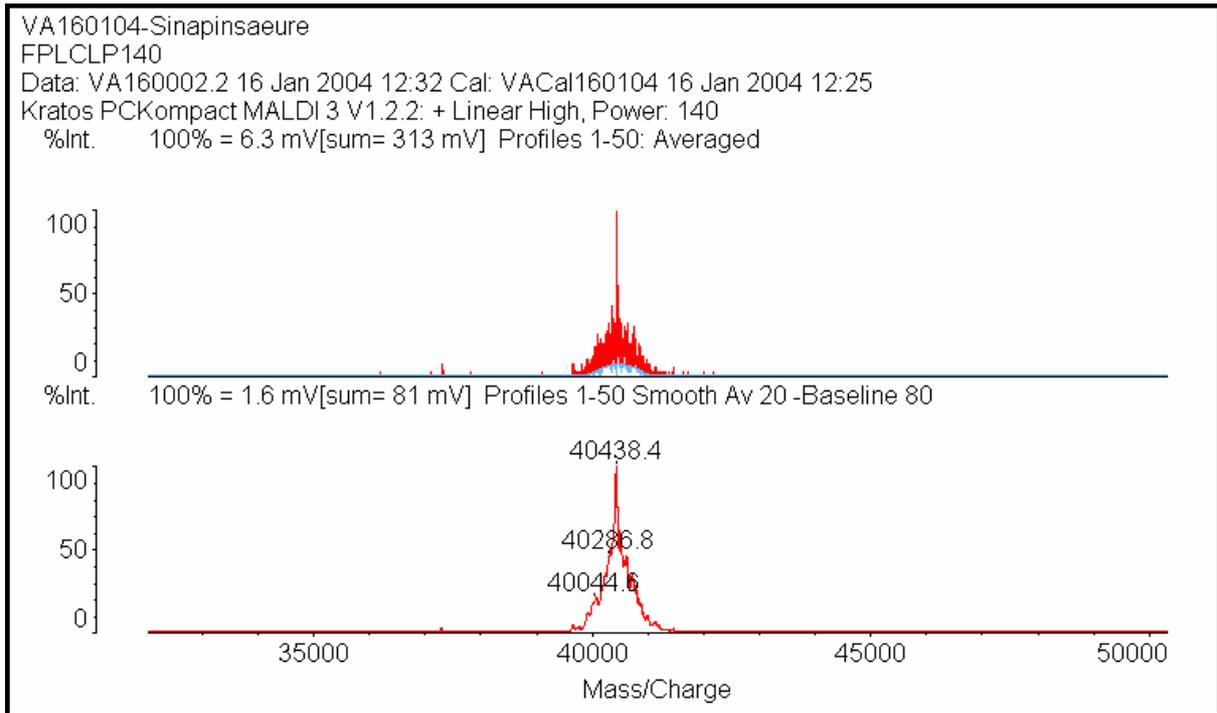


Abb. 3.36: Vergrößerte Darstellung des Patatinpeaks [Reck, 2003]

3.8.3.2 MALDI-Ergebnisse einer verdauten Probe

Eine 40 kDa-Bande wurde aus einem Coomassie gefärbten SDS-Gel mit einem Skalpell heraus geschnitten und mit Trypsin verdaut. Die so erhaltene Probe wurde mit Hilfe der MALDI – Technologie untersucht. Die folgende Abbildung zeigt das Muster der entstandenen Peptidfragmente.

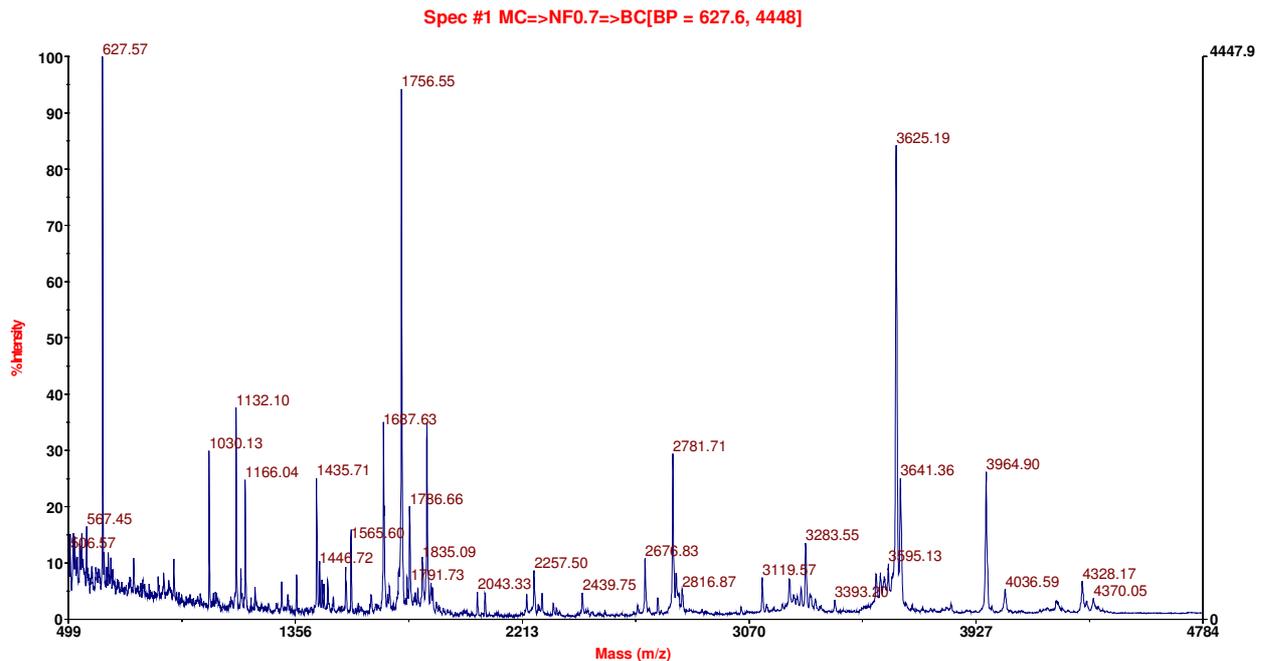


Abb.3.37: MALDI-TOF-Spektrum: Peptidfragmente einer 40 kDa-Bande nach einem Tryptischer In-Gel-Verdau (Aufnahme vom IPF, Hannover)

Im Spektrum erscheinen nur 3 Peaks hoher Intensitäten von 90 bis 100 % in den Bereichen 627,6; 1756,6; 3625,2 Da. Die restlichen Peaks liegen nur im Intensitätsbereich von 10 bis 40 %. Die meisten Peptidfragmente sind im unteren Bereich von 1030 bis ca. 2000 Da zu finden.

Die erhaltenen Peaks mit den höchsten Intensitäten wurden in Tabelle 3.20 aufgelistet und mit einer Datenbank abgeglichen.

Tab.3.20: Gemessene und erwartende Fragmente der 40 kDa-Fraktion

| Gemessene Masse [Da] | Patatin (S05592) | | Patatin T58 (B26017) | |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| | Theoretische Masse [Da] (berechnet) | Abweichung [Δ] | Theoretische Masse [Da] (berechnet) | Abweichung [Δ] |
| 627,57 | 626,67 | -0,11 | 627,74 | -1,18 |
| 1030,5 | 1031,1 | -1,6 | 1031,1 | -1,6 |
| 1132,1 | 1133,35 | -2,26 | 1133,35 | -2,26 |
| 1435,7 | 1437,53 | -2,83 | 1437,53 | -2,83 |
| 1687,6 | 1689,97 | -3,38 | 1689,97 | -3,38 |
| 1757,9 | 1758,00 | -1,11 | 1758,00 | -1,11 |
| 2781,7 | n.a. | - | n.a. | - |
| 3283,5 | n.a. | - | n.a. | - |
| 3626,8 | 3628,07 | -2,28 | 3628,07 | -2,28 |
| 3964,9 | 3966,46 | -2,57 | 3966,46 | -2,57 |

Von den 10 eingegebenen Peptidfragmenten konnten mit Hilfe des Programms Mascot 8 Fragmente Patatin (S05592) und dem Patatin T58 (B26017) zu geordnet werden. Die Masse des Proteins wird mit 42613 Da bzw. 42639 Da angegeben. Der pI-Wert (berechnet) des Patatin (S05592) wird mit 5,46 angegeben, der pI- Wert des Patatin (B26017) liegt bei 5,38 (berechnet). Eine Abweichungen in der berechneten Peptidmasse eines Fragments liegt nur in einem Fall des Fragments mit der Größe 627,57 Da vor. Die Sequenzabdeckung der Peptide mit der Aminosäuresequenz liegt bei beiden Proteinen bei 33%. Die abgetrennte 40 kDa Fraktion ist demnach eine Patatinfraktion. Da das Ausgangsprodukt KFW aus einen Gemisch unterschiedlichen Kartoffelsorten besteht, ist das Vorhandensein unterschiedlicher Patatinmoleküle nicht überraschend.

Eine 20 kDa Bande eines Coomassie gefärbten Gels wurde ebenfalls tryptisch verdaut und mit MALDI-TOF vermessen. Aus dem Spektrum folgt ein anderes Ergebniss. Im unteren

Massebereich von 500 bis 1700 Da sind nur Peptidfragmente mit geringer Intensität im Bereich von 10 % bis 25 % zu finden. Die höchste Intensität hat ein einzelner Peak mit einer Masse von 1728,37 Da. Ein Peakbündel mit hohen Intensitäten bis zu 72 % liegt im Bereich von 1980 bis 2033 Da. Über 2261 Da wurden keine Peptidfragmente mehr detektiert.

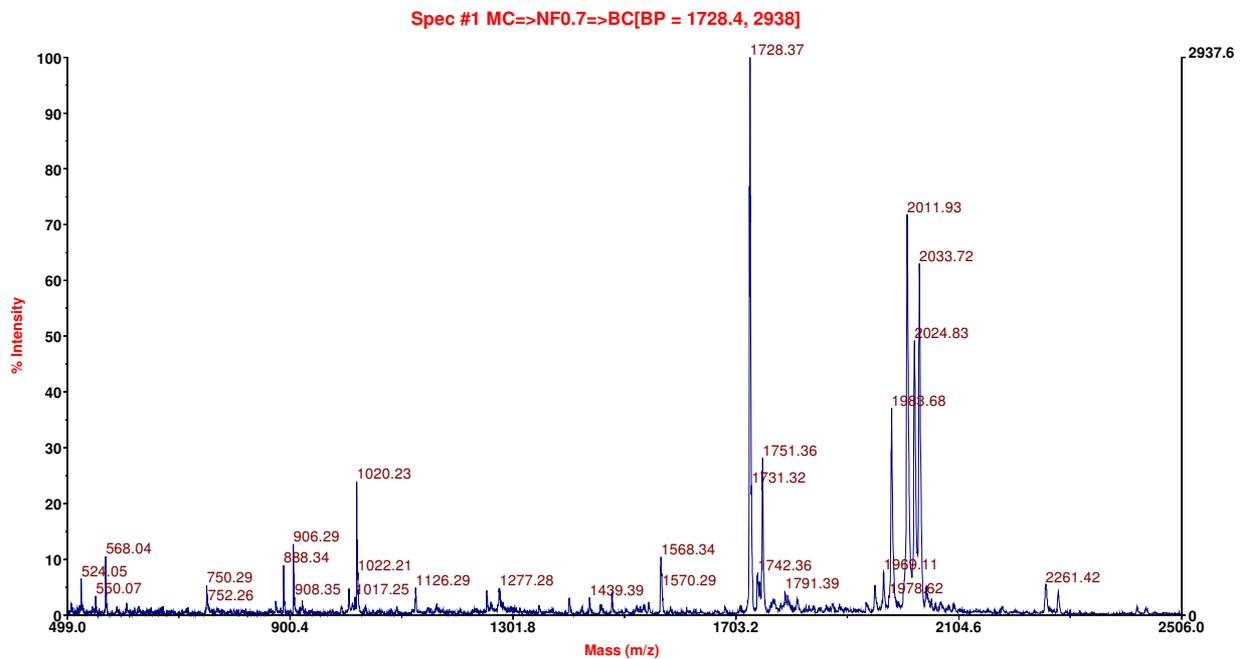


Abb.3.38: MALDI-TOF-Spektrum: Peptidfragmente einer 20 kDa-Bande nach einem Tryptischer In-Gel-Verdau (Aufnahme vom IPF, Hannover)

Folgende Peptidfragmente wurden in den Datenbanken „Mascot“ und „ExPASy“ eingegeben und anschließend bestimmt::

Tab.3.21: Gemessene und erwartete Peptidmassen der 20 kDa-Fraktion

| Gemessene Masse [Da] | PCPI 10 (Cystein Protease Inhibitor) | | Kunitz PI | |
|----------------------|--------------------------------------|----------------|-------------------------------------|----------------|
| | Theoretische Masse [Da] (berechnet) | Abweichung [Δ] | Theoretische Masse [Da] (berechnet) | Abweichung [Δ] |
| 524,18 | n.a. | - | n.a. | - |
| 750,33 | n.a. | - | n.a. | - |
| 888,34 | 888,07 | -0,7 | 887,52 | -0,19 |
| 906,29 | n.a. | - | n.a. | - |
| 1020,23 | 1019,18 | 3,56 | 1015,62 | 3,56 |
| 1126,29 | 1125,49 | -0,21 | 1125,49 | -0,21 |
| 1277,28 | 1278,62 | -1,63 | 1278,62 | -2,35 |
| 2024,83 | n.a. | - | n.a. | - |
| 2260,89 | 2259,11 | 0,77 | 2259,11 | 0,77 |

Obwohl nur 5 von 9 eingegebenen Fragmenten zugeordnet werden konnten war eine Bestimmung möglich. Die Fragmente weisen mit 27 % Sequenzübereinstimmung auf einen Cystein Proteaseinhibitor 10 (PCPI 10) mit der Nummer O24383 hin. Dieses Protein hat eine Größe von 20949 Da und einen berechneten pI von 7,57. Das andere Ergebnis weist auf ein Kunitz Protease Inhibitor (PKPI) Q6PMR6 hin. Auch hier konnten 5 von 9 Fragmenten zugeordnet werden. Die berechnete Masse liegt mit 24740 Da etwas über dem des PCPI 10. Der pI-Wert liegt bei 8,21. Die Sequenzübereinstimmung lag bei 23 %.

Beide Proteine sind Bestandteile der Kartoffel und liegen im gleichen Molmassenbereich. Eine Überlagerung der Proteine im SDS-PAGE-Gel ist möglich, da eine Auftrennung nur nach dem Parameter Molmasse und nicht nach dem pI-Wert durchgeführt wurde. Da der Anteil an PCPI von durchschnittlich 12 % am Gesamtprotein der Kartoffel beträgt, ist es nicht überraschend diese Proteingruppe zu identifizieren.

3.8.4 2-D-Elektrophorese

Neben der in dieser Arbeit eingesetzten eindimensionalen Elektrophorese sind auch zweidimensionale gelelektrophoretische Untersuchungen durchgeführt worden.

Im Gegensatz zur eindimensionalen Elektrophorese bietet die 2-D-Elektrophorese die Möglichkeit der Trennung eines Proteingemisches nach zwei Parametern. In diesem Fall wurde im ersten Schritt eine isoelektrische Focussierung durchgeführt. Dabei werden die Proteine nach ihrem pI-Wert aufgetrennt. Erst im zweiten Schritt erfolgt eine klassische Trennung nach der Molmasse der einzelnen Proteine in einer SDS-PAGE Elektrophorese. Man erhält so die Möglichkeit, Proteine mit dicht bei einander liegenden Molmassen über den isoelektrischen Punkt zu trennen und zu untersuchen.

Die aus den voran gegangenen Abschnitten isolierten Proben wurden mittels 2-D-Elektrophorese auf ihre Reinheit hin untersucht. Die verwendete Anlage ist eine Multiphast II der Firma Amersham Pharmacia.

Für die folgende Aufnahme wurde im ersten Schritt ein nichtlinearer IPG-Streifen zur isoelektrischen Focussierung im Bereich von pH 3 bis 9 verwendet. Für die SDS-PAGE im zweiten Schritt wurde ein 12,5% Tris-HCl-Gel verwendet. Probleme bereitete der Salzgehalt der Proben. Bei zu hohem Salzgehalt bilden sich Schlieren und Streifen auf dem Gel, was zur Folge hat, dass die Proteinspots unscharf dargestellt sind.

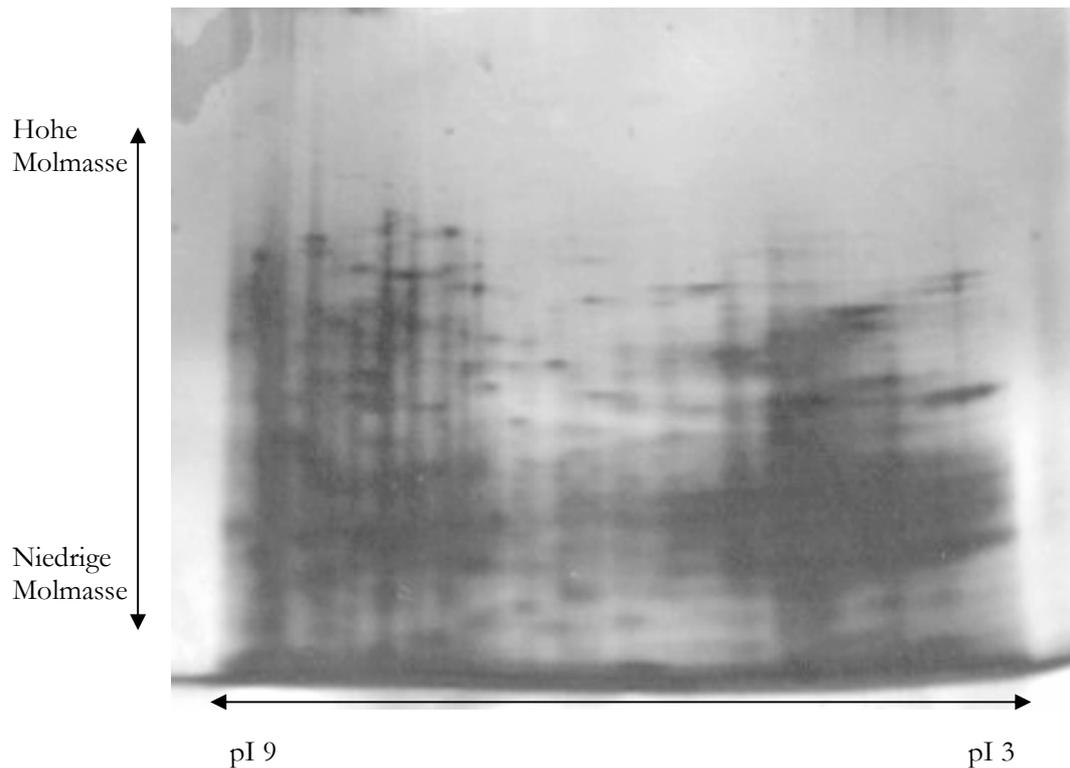


Abb. 3.39: 2-D-SDS-PAGE einer Kartoffelfruchtwasserprobe (12,5% Tris-HCl, Silberfärbung)

Die hohe Anzahl der zu erkennenden Proteinspots macht deutlich, wie viele unterschiedliche Proteine im KFW enthalten sind. Eine besondere Anhäufung von Proteinen ist im pI-Bereich von 4 bis 5,5 zu erkennen. Dies ist der Bereich in dem unter anderem Patatin liegt. Eine weitere Anhäufung von Proteinspots sind im pI-Bereich von 7 bis 9 zu erkennen. In diesem Abschnitt liegen hauptsächlich Protease Inhibitoren. Ein Molekularmassen Marker ist nicht mitgeführt worden.

In einer weiteren gelelektrophoretischen Untersuchung wurden isolierte Fraktionen, die von den Q 75 und S 75 Adsorber gewonnen worden sind, verwendet. Dazu wurden die Proben mit Hilfe der Vivaspin 20 Einheiten (Größenausschluß von 30 kDa für die Patatinfraction und Größenausschluß von 10 kDa für die PI-Fraktion) aufkonzentriert und entsalzt. Die Entsalzung wurde nicht vollständig durchgeführt, da sonst ein Ausfallen des Proteins zu erwarten ist. Für die Untersuchung der Patatinfraction sind nicht lineare IPG-Streifen NL 3-10 zur Focussierung und 12,5 % EXEL-Gele (Tris-HCL-Gele) zur Molmassenauftrennung eingesetzt worden.

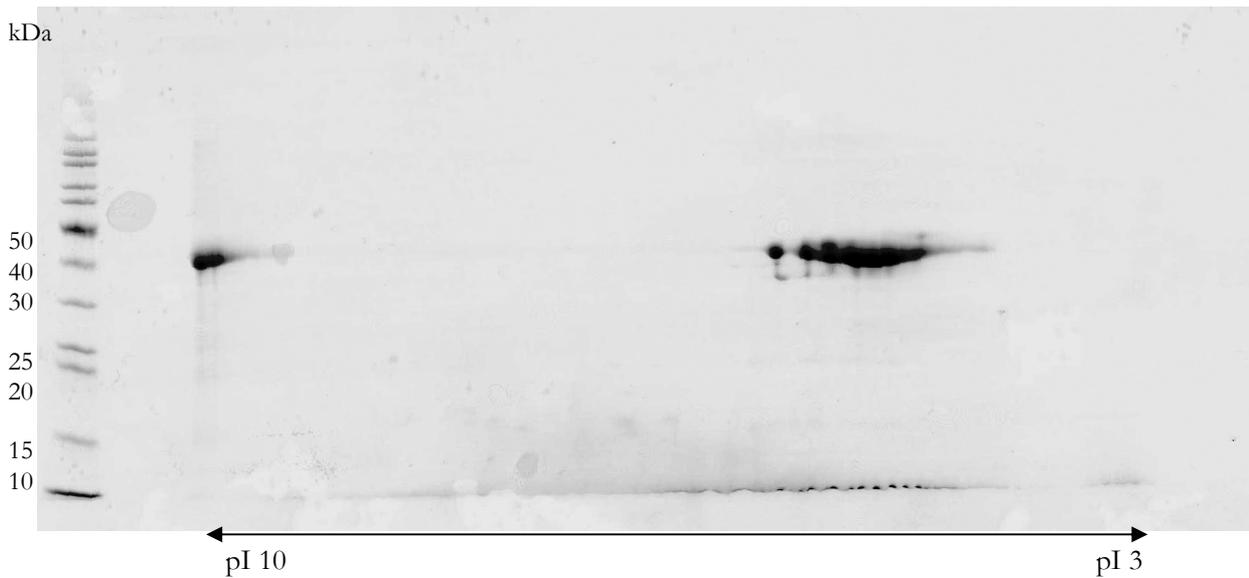


Abb. 3.40: 2-D-SDS-PAGE einer Patatinfraktion (12,5 % Tris-HCl, Coomassiefärbung)

Deutlich zu erkennen ist eine Anhäufung einzelner Peaks im Bereich 40 kDa und bei einem pI-Wert von ca. 5. Der genaue pI-Wert kann nicht ermittelt werden, da die Verteilung des pH-Wertes der IPG-Streifen nicht linear ist. Der Bereich von ca 4,5 bis 7,5 ist in diesem Fall gestreckt, die Randbereiche sind verkürzt. Die Lage der Spots entspricht den Literaturdaten von Patatin mit einer Masse von 40 bis 43 kDa und einem pI-Wert von 4,5 bis 5,2. Die einzelnen Spots der Bande sind als Isoformen des Patatins zu erklären. Da Kartoffelfruchtwasser, das aus unterschiedlichen Sorten besteht, eingesetzt wurde, erscheint eine gewisse Varianz des pI-Wertes möglich. Die gewonnenen Daten aus der MALDI-Untersuchung decken sich mit den hier vorliegenden. Die berechneten pI-Werte der gefundenen Patatine liegen bei 5,38 und 5,46. Das erklärt die Verbreiterung des Spots sowie die auftretenden Isoformen.

Der andere Spot bei 40 kDa und pI 10 kann nicht erklärt werden. Einige Proteasen haben pI-Werte im Bereich von 9 (PCPI und OCPI), aber die Molmassen der genannten Proteaseinhibitoren liegen im Bereich von 20 bis 22 kDa

Die Abbildung 3.41 stellt das Ergebnis der 2-dimensionalen gelelektrophoretischen Untersuchung der proteaseinhibitorreichen Fraktion dar. Verwendet wurde dazu ein lineares IPG-Streifengel im ersten Schritt. Im zweiten Schritt wurde die SDS-PAGE mit einem 12,5 % Exel-Gel der Firma Amersham Pharmacia durchgeführt.

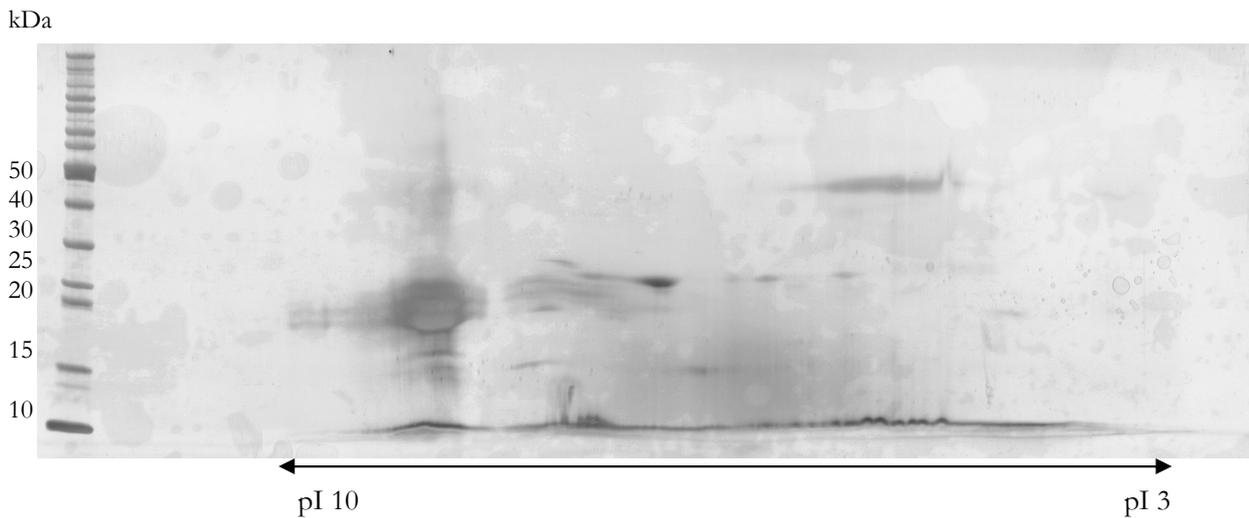


Abb. 3.41: 2 dimensionale gelelektrophoretische Darstellung der proteaseinhibitorreichen Fraktion (12,5 % Tris-HCl Gel, Silberfärbung)

Der Hauptspot befindet bei pI 8,5-8,7 mit einer Molmasse von 20 kDa. Auf Grund einer Überkonzentration der Probe ist der Spot großflächig. Die gefundenen Proteinparameter decken sich mit den durch die MALDI-Untersuchung erhaltenen Daten der PCPI (Cystein Protease Inhibitoren) und den PKPI (Kunitz Protease Inhibitoren). Den berechneten Daten zu Folge entspricht der Hauptspot einem Kunitz Protease Inhibitor mit einem pI von 8,21 und einer Molmasse von 24 kDa.

Neben den genannten Protease Inhibitoren könnten auch die PAPI und OSPI vorliegen, da ihre pI-Werte im alkalischen Bereich liegen. Auf Grund ihrer geringen Konzentration im Kartoffelfruchtwasser ist ein Spot dieser Intensität unwahrscheinlich. Die auftretenden Spots im Bereich von pI 6 und 7 weisen auf weitere Isoformen der PI hin. Der unscharfe Spot im Bereich von pI 5 und mit einer Masse von 45 kDa resultiert aus nicht abgetrenntem Patatin. Ein zusätzlicher enzymatischer Verdau der erhaltenen Spots war nicht möglich, da das Gel einer Silberfärbung unterzogen wurde.

3.9 Langzeitstabilitätstests und Mehrfach- Elutionen

Um den technischen Maßstab einer Ionenaustauschermembran beurteilen zu können, wurden Versuche zur Langzeitstabilität einer Sartobind Q15 Adsorbermembran durchgeführt.

Durch die vorangegangenen Versuche ist bekannt, dass die Aufnahmekapazität der Membranen nach mehrfachem Gebrauch sinkt. In dieser Versuchsreihe wurde getestet, wie viele Auftragszyklen bei einer Q15 Adsorbermembran ohne Reinigungsschritt möglich sind. Dazu wurde zunächst ein automatisierter Langzeittest mit einer Standardproteinlösung (BSA) und anschließend mit einer Realprobe (Kartoffelfruchtwasser) durchgeführt. Die Versuchsreihen wurden an einer FPLC-Anlage durchgeführt, wobei vor jeder Probenauftragung die Regeneration und Equilibration der Membran durch ein vom PC gesteuertes Programm gewährleistet wurde.

Bei der Verarbeitung großer Mengen KFW muß nicht nur die Belastbarkeit von Membranen betrachtet werden, sondern auch die Wirtschaftlichkeit des Prozesses und Kosten der eingesetzten Substanzen. Eine Möglichkeit zum Einsparen von Puffersalzen und Wasser bzw. Abwassermengen bietet der mehrfache Einsatz der Elutionslösung (Mehrfach-Elution). In diesem Versuch sollte getestet werden, ob es möglich ist, Protein angereicherten Elutionspuffer mehrfach zu verwenden und so zum einen eine Konzentrationserhöhung an Protein im Eluat zu erlangen, zum anderen Salzmengen ein zu sparen.

3.9.1 Langzeitstabilitätstest mit BSA

Um einen Richtwert für die Stabilität zu erhalten wurden zuerst Versuche mit einem Standardprotein durchgeführt. Verwendet wurden 1,5 ml einer BSA-Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml. Die eingesetzte Menge entspricht der angegebenen Proteinbindungskapazität von 9-20 mg Protein für die Q 15-Membran. Um eine Überladung der Membran zu verhindern wurde die Kapazität nicht vollständig ausgeschöpft. Der Versuch wurde immer nach dem gleichen Schema an der FPLC durchgeführt: Beladen-Spülen-Eluieren-Spülen. Als Puffer wurde ein 50 mM KPP-Puffer bei pH 7 verwendet, als Eluent wurde ein 1 M NaCl in 50 mM KPP-Puffer eingesetzt. Ein Zyklus dauerte 21,5 min. Das genaue Steuerprogramm der FPLC ist dem Anhang zu entnehmen.

Ein gleichmäßiges Extinktionsverhalten konnte in dem Dauerversuch nicht beobachtet werden. Zu Beginn des Dauerversuchs variierten die Messwerte sehr stark und erst ab dem 20. Zyklus

weisen die Werte eine gewisse Gleichförmigkeit auf. Ein schnelles Beladen und sauberes Spülen ist bei der Membran möglich. Die einzelnen Peaks der Zyklen sind unterschiedlich hoch, sowohl bei dem Beladen als auch beim Eluieren.

Trotz einer angepassten Proteinmenge, die die maximale Kapazität nicht übersteigt, erhält man ein deutlich größeres Signal beim Durchbruch des BSA durch die Membran, als bei der Elution selber. Es scheint daher nicht möglich die gesamte Proteinmenge zu binden. In Abbildung 3.42 ist der Verlauf eines solchen Dauertests dargestellt:

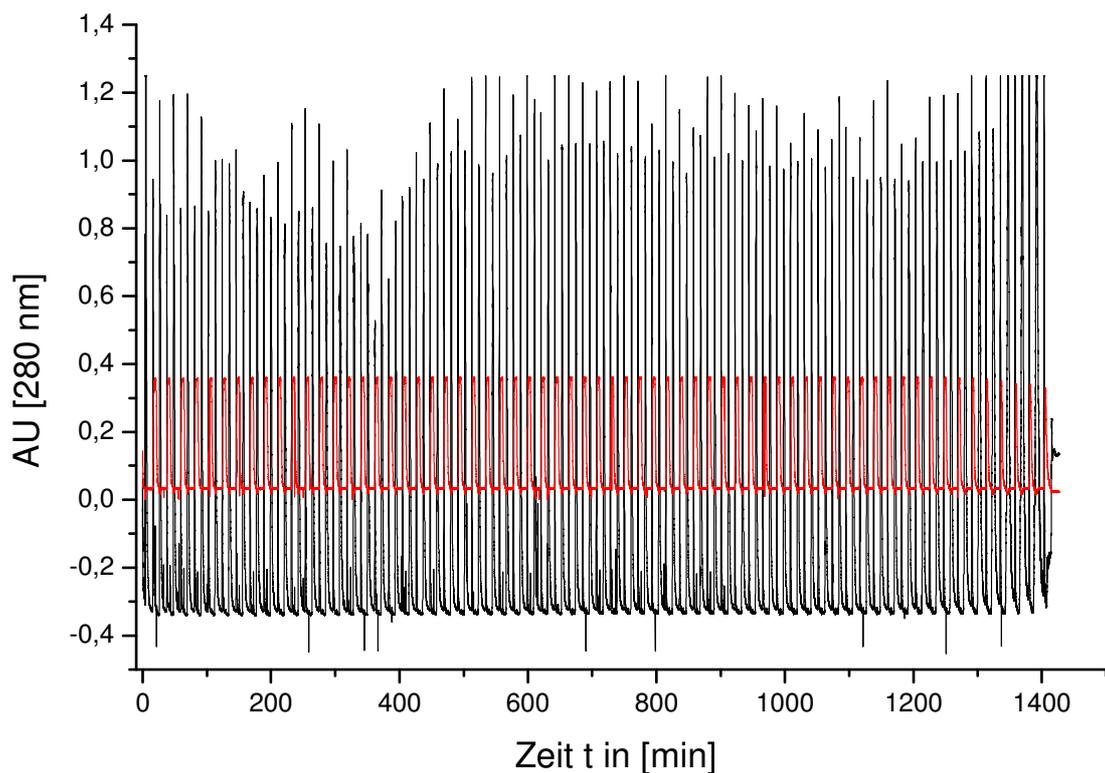


Abb. 3.42.: Automatisierter Dauertest zur Langzeitstabilität eines Q15-Moduls

Ab dem 54. Zyklus (1161 min) setzt eine erneute Veränderung der Signale ein. Die Peaks verbreitern sich mit jedem weiteren Durchgang und das Signal des Durchbruchs erhöht sich. Die Membran kann nicht mehr genügend Protein aufnehmen und nicht fest haftende Proteine werden von der Membran gespült. Im Elutionsschritt werden die Proteine nicht mehr vollständig von der Membran entfernt. Ein Teil der Proteine behindert sich gegenseitig und es kommt zu Verblockungen.

Da sich die Signale ab dem 63. Zyklus veränderten und unregelmäßig wurden, wurde der Versuch nach 65 Zyklen abgebrochen. Eine vollständige Verblockung wurde somit verhindert.

Um die Stabilität der Membranen zu testen wurde in einem weiteren Langzeittest der Spülschritt nach dem Beladen der Membran um 5 min verlängert und der Versuch wiederholt. Ein Zyklus dauert nun 26,5 min. Der eingesetzte Membranadsorber ist der in dem voran gegangenen Versuch verwendete Q 15-Adsorber. Nach einer Reinigung mit 0,5 M Natronlauge konnten die Proteinrückstände wieder entfernt werden.

In diesem Langzeittest stellte sich ein gleich bleibendes Arbeitsverhalten schon nach ca. 10 Zyklen ein. Die folgende Graphik stellt zwei Zyklen zu Beginn des Versuchs dar:

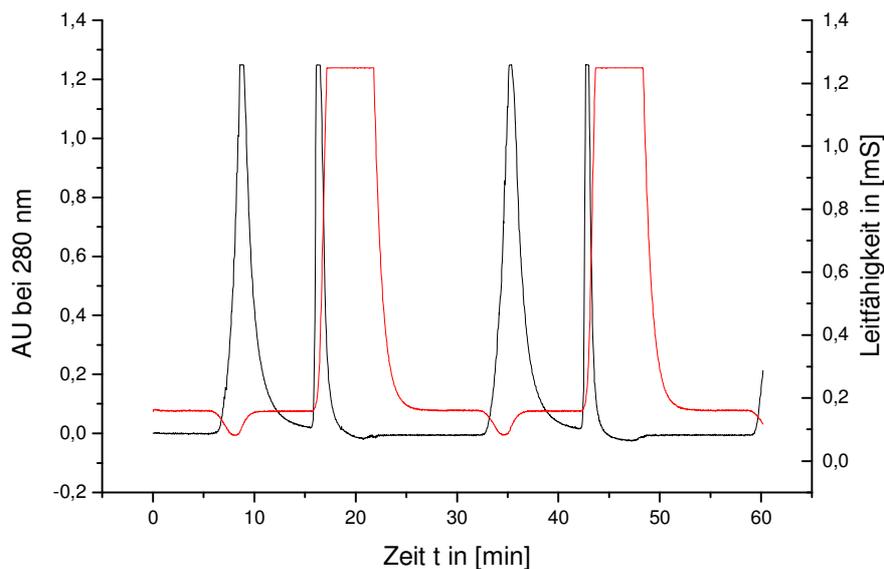


Abb.3.43: Darstellung zweier Zyklen, Extinktions- und Leitfähigkeitskurve zu Beginn des Tests

Zuerst ist der breitere Peak des Durchbruchs zu sehen, als zweiter Peak ist das Elutionssignal bei steigender Leitfähigkeit dargestellt. Auch hier ist wie in dem voran gegangenen Test das Durchbruchssignal in der Basis breiter. Nicht alle Proteine werden gebunden und im Spülschritt von der Membran gewaschen. Ab dem 86. Zyklus beginnen sich die Signale zu verändern. Die Peaks verbreitern sich an der Basis und werden kleiner. In der folgenden Graphik sind Signale ab dem 103. Zyklus dargestellt.

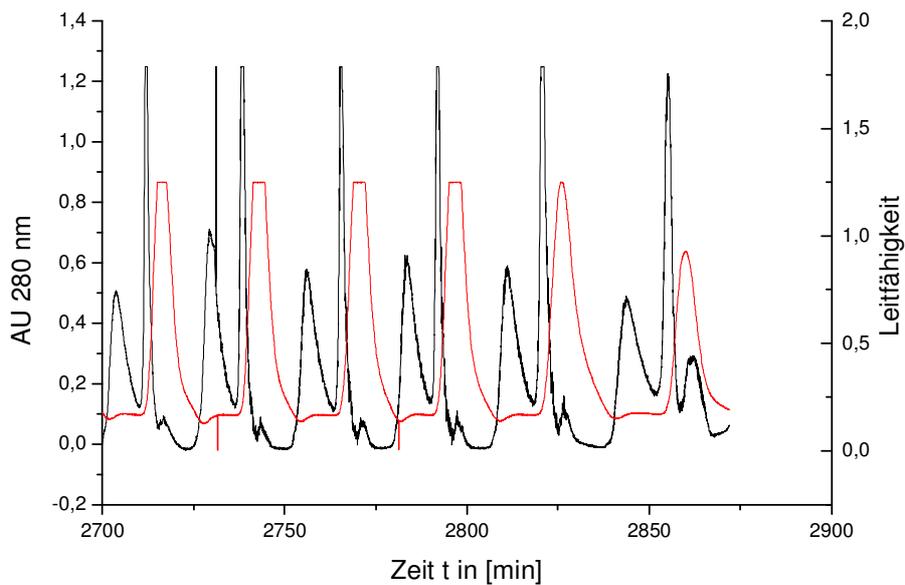


Abb. 3.44: Darstellung der Beladungs- und Elutionssignale am Ende des zweiten Langzeittests

Das Signal beim Beladungsvorgang sinkt rasch auf die Hälfte ab und wirkt verbreitert. Der Spülschritt zwischen Beladen und Eluieren ist zu kurz geworden, es können nicht mehr alle locker haftenden Proteine von der Membran gewaschen werden. Die Signale verschlechtern sich, denn die Basislinie kann nicht mehr während des Spülschrittes erreicht werden.

Die folgenden Elutionssignale sind nicht mehr einzelne Peaks, ein zweites nachfolgendes Signal ist hinzugekommen. Die Peaks sind nicht mehr eindeutig von einander zutrennen. Die Elution scheint in zwei Abschnitten zu erfolgen. Nach 108 Zyklen stieg der Druck im FPLC-System an und die Membran blockierte. Ein Durchfluß war nicht mehr möglich und der Versuch wurde abgebrochen.

Die Sartobindmodule haben sich als geeignet erwiesen, Proteine auch nach einer hohen Anzahl von Zyklen aus einer Lösung abzutrennen. Durch Verlängerung des Spülschrittes im Steuerprogramm wurde eine Steigerung der Lebensdauer um 107 % im zweiten Versuch bewirkt.

Die Reinigung der fast verblockten Membran nach dem ersten Test erwies sich nicht als Nachteil, da die Membran anschließend länger funktionsfähig war und schneller die optimale Arbeitphase erreichte. Anscheinend werden auf der Membranoberfläche einige Kontaktplätze durch Proteinen schon beim ersten Beladungsvorgang irreversibel besetzt. Diese Plätze werden auch durch eine Reinigung mit Natronlauge nicht vollständig freigegeben. Bestätigt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass im zweiten Langzeittest die Anlaufphase kürzer ist und die Kontinuität mit der der Adsorber im 2. Langzeittest arbeitet. Auf der gebrauchten Membran

waren Plätze schon irreversibel belegt und ein Gleichgewicht zwischen freien Plätzen und belegten Plätzen auf der Membran konnte sich schneller einstellen. Zum anderen weist auch das hohe Durchbruchsignal der Proteinlösung auf schon belegte Kontaktstellen hin. Obwohl die Menge an eingesetztem BSA nicht die vom Hersteller angegebene Kapazität der Module überschreitet ist es nicht möglich die gesamte Proteinmenge zu binden.

3.9.2 Langzeitstabilitätstest mit KFW

Da das Kartoffelfruchtwasser eine komplexe Proteinlösung ist, wurde ebenfalls ein Langzeittest durchgeführt. Verwendet wurde dazu ein unbenutzter Q15 Membranadsorber. Aufgetragen wurde in jedem Zyklus 1 ml einer verdünnten KFW-Probe mit einem Gehalt von 5,36 mg/ml. Die Probe wurde mit einem 0,2 µm Filter (Spritzenvorsatz) vorbehandelt, um Schwebstoffe aus der Lösung zu entfernen. Das Programm entspricht dem des vorangegangenen Versuches (siehe Kap.3.9.1). Lediglich sind die Spülschritte an das KFW angepasst worden. Ein Zyklus dauert 24 min, das Programm ist dem Anhang zu entnehmen.

Der Langzeitversuch wurde bei pH 7 durchgeführt, was den Bedingungen bei der Patatinabtrennung entspricht. Als Eluent wurde eine 1 M NaCl-Pufferlösung verwendet. Um Patatin von der Membran zu eluieren reicht eine 0,5 M NaCl-Lösung aus. Mit dem Einsatz der höherkonzentrierten Lösung wird die Membran besser gereinigt und ist anschließend erneut nutzbar.

Die Graphik in Abb. 3.45 gibt einen Überblick über die Beladungs- und Elutionssignale.

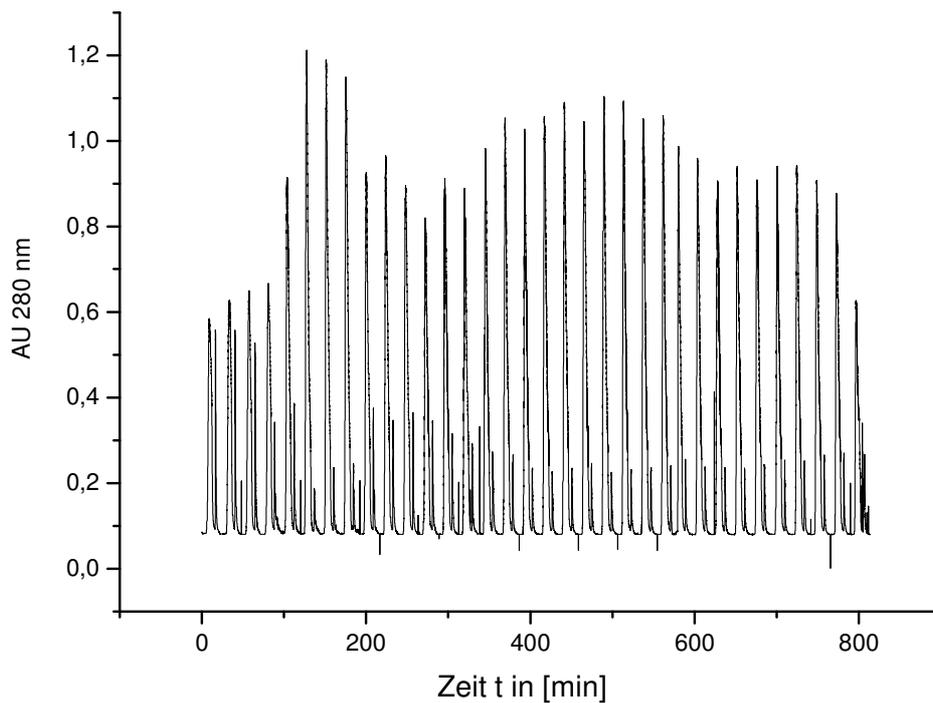


Abb.3.45: Automatisierter Dauertest zur Langzeitstabilität eines Q-15 Moduls mit KFW

Obwohl die Kapazität der Membran (Bindungskapazität von 12 mg BSA) mit Einsatz von 1 ml KFW (Gesamtproteingehalt 5,36 mg/ml) nicht überschritten wurde, liegt ein deutliches Signal des Durchbruchs nach dem Beladen der Membran vor. Da nur ein Teil der eingesetzten Proteine auf der Anionenaustauschermembran binden können sind im Durchbruch hauptsächlich die PI enthalten.

Die Peaksignale sind ungleichmäßig, sowohl die des Durchbruchs als auch die der Eluenten. Nach 380 min (16.Zyklus) wird das Muster gleichmäßiger. Nach 35 Zyklen wurde der Versuch abgebrochen. In der folgenden Abbildung 3.46 sind die Signale der letzten Zyklen vergrößert dargestellt. In der Vergrößerung kann man deutlich erkennen, dass das Signal des 35. Zyklus breiter und undeutlicher wurde. Der Versuchabbruch nach dem 35. Zyklus ermöglicht eine Reinigung und damit einen erneuten Einsatz. Nach der Reinigung war der Adsorber wieder verwendbar, die Kapazität ließ jedoch schnell nach.

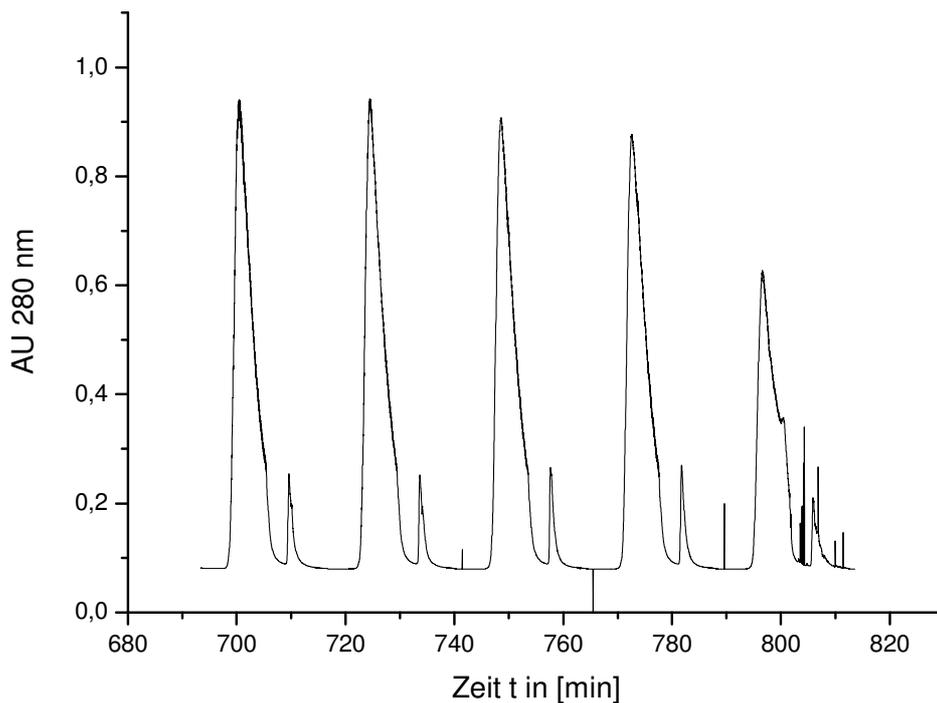


Abb.3.46: UV-Signal der letzten fünf Zyklen vor Abbruch des Tests

Unbenutzte Q15 Adsorber benötigen eine längere Anlaufzeit als benutzte Adsorber, um eine stabile Arbeitsphase zu erreichen. Um eine stabile Phase zu erreichen waren mit KFW 16 Zyklen nötig, bei der Verwendung von BSA waren bis zu 20 Zyklen notwendig. Die gereinigte und wieder verwendete Membran erreichte ihren Arbeitsbereich schon nach 10 Zyklen. Vergleichbare Untersuchungen sind mit S15 Adsorbern durchgeführt worden. Ein unbenutzter S15 Adsorber benötigt im Dauerbetrieb bei der Abtrennung von Lactoferrin aus Molke 15 Zyklen, ein gereinigter Adsorber erreicht nach dem 5. Zyklus ein kontinuierliches Arbeitsverhalten [Plate, 2003].

Da im Kartoffelbruchwasser unterschiedliche Proteine vorliegen, kann es nach längerer Benutzung zu Ablagerungen und Zusammenballung von nicht erwünschten Proteinen auf der Membranoberfläche kommen. Ein Membranfouling kann einsetzen und eine kontinuierliche Adsorption somit verhindern. In der BSA-Standardproteinlösung sind keine störenden Proteine enthalten, auf der Membranoberfläche können sich nur Ablagerungen von nicht eluiertem BSA befinden. Das komplexe Proteingemisch des Kartoffelbruchwassers stellt höhere Ansprüche an die Trennleistung eines Membranadsorbers. Trotzdem konnte die Trennung über 35 Zyklen erfolgreich durchgeführt werden. Die Adsorbereinheiten zeichnen sich durch eine hohe Belastbarkeit und gute Trennleistung aus.

3.9.3 Mehrfach-Elutionen: Anreicherung von Protein im Eluat

Bei der Auftrennung von KFW über Membranadsorber fallen große Mengen an salzhaltigem und proteinhaltigem Eluat an. Um diese Mengen zu reduzieren und eine Erhöhung der Proteinkonzentration zu erlangen, besteht die Möglichkeit des mehrfachen Einsatzes von Eluat.

Ziel des Versuches war es fest zu stellen, ob eine mehrfache Anreicherung der Elutionslösung mit Protein möglich ist und ob schon vorhandenes Protein den Ertrag und die Elutionsfähigkeit beeinträchtigt.

Die Untersuchung wurde mit Q 15 Adsorbereinheiten an der FPLC durchgeführt. Die verwendeten Steuerprogramme sind dem Anhang zu entnehmen.

Im ersten Schritt wurde die Membran Q15 mit 1 ml KFW (verdünnt 1:3) beladen und die auf der Q-Membran gebundenen Patatinmoleküle mit 10 ml einer 1 M NaCl im 20 mM KPP Puffer von der Membran eluiert. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt um ausreichend Elutionspuffer für die erneute Verwendung zu erzeugen. Der durchschnittliche Proteingehalt in der vereinigten Elutionslösung betrug 0,39 mg/ml.

Im zweiten Schritt wurden die gewonnenen und vereinigten Eluate erneut als Elutionspuffer eingesetzt. Dieser Schritt konnte ebenfalls mehrfach durchgeführt werden. Die gewonnenen Eluate wurden erneut vereinigt und wiesen einen Gehalt von 0,86 mg/ml auf.

Es wurde anschließend noch eine 2. und 3. Anreicherung durchgeführt.

Wie in der folgenden Graphik zu erkennen ist wird der Elutionspeak mit jedem neuen Anreicherungsschritt breiter und verliert an Schärfe.

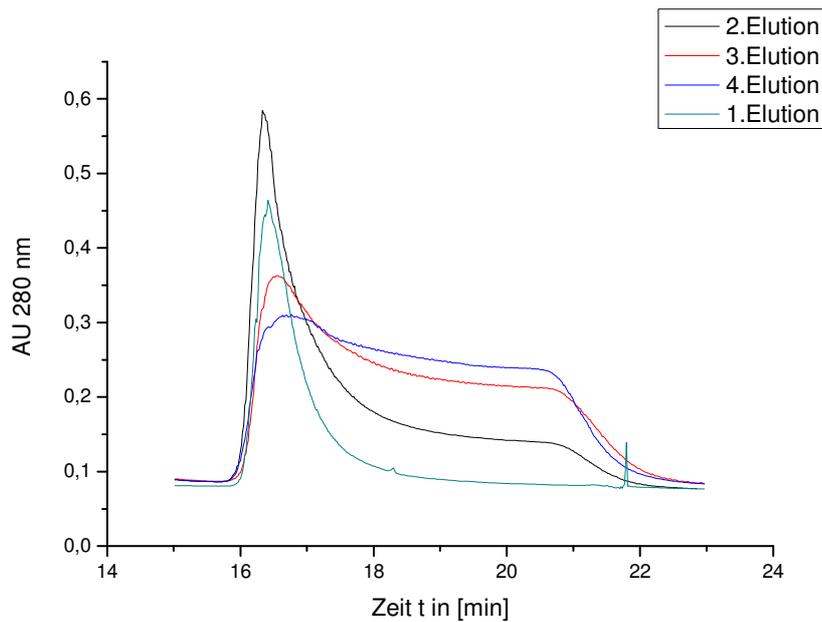


Abb. 3.47: Graphische Darstellung der Signale der Elutionen 1-4

Tab. 3.21: Gehaltsangaben zu den einzelnen gewonnenen Elutionsgemischen

| Schritt | Gehalt in mg/ml | Steigerung in % |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| 1.Elution | 0,39 | - |
| 2. Elution (1. Anreicherung) | 0,86 | 120,5 |
| 3. Elution (2. Anreicherung) | 1,05 | 22 |
| 4. Elution (3. Anreicherung) | 1,18 | 12,4 |

In diesem Versuch ist mit einem 1 M Salzeluenten gearbeitet worden. Da eine Konzentration von 0,5 M NaCl für die Elution von Patatin ausreicht, ist genug Kapazität bei einem 1 M Salzpuffer vorhanden, um eine Mehrfachnutzung durchzuführen. Der Puffer bietet genug Kapazität für weitere Elutionen.

Das Vorhandensein von Patatin in dem wieder verwendeten Puffer scheint den Elutionsvorgang nicht zu beeinträchtigen. Die Daten bestätigen eine Steigerung des Patatingehalts um 120,5 % im Schritt der ersten Anreicherung. Die weiteren Proteinanreicherungen erzielen nur noch Steigerungen von 22 % und 12,4 %. Dadurch wird deutlich, dass eine ertragreiche Mehrfachnutzung des Puffers eingeschränkt möglich ist. Die Kapazität des Puffers ist nach zweimaliger Verwendung weitestgehend erschöpft, aber Anreicherungen sind noch möglich. Die Steigerung der Proteinausbeuten in den weiteren Schritten scheint nicht ausreichend für einen großtechnischen Einsatz zu sein. Solche Aspekte müssen mit dem verminderten Wasserverbrauch und erhöhtem Salzeinsatz gegeneinander abgewogen werden.

4 Zusammenfassung und Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Trennung von einzelnen Proteinen aus Proteingemischen über Membranadsorber. Untersucht wurden zwei Typen von Adsorbereinheiten mit unterschiedlichen Geometrien und unterschiedlicher Art der Prozessführung. Beide basierend auf der Ionenaustauschchromatographie. Die eingesetzten Adsorbereinheiten der Firma Vivascience sind Zentrifugeneinheiten und werden im Mikroliterbereich eingesetzt. Die anderen Adsorbereinheiten sind Sartobind Adsorber der Firma Sartorius. Diese Adsorber werden nach dem Dead-End Verfahren betrieben. Neben Standardproteingemischen wurde Kartoffelfruchtwasser, ein aus der Kartoffelstärkeproduktion anfallender Abfallstoff, als Realprobe untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Trennung von einfachen und komplexen Proteingemischen untersucht. Neben selbst zusammengestellten Standardproteinmischungen, die nicht vollständig aufgetrennt werden konnten, wurde auch ein realitätsnahes Gemisch aus HSA und IgG untersucht. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Trennung von Kartoffelfruchtwasser in das Hauptprotein Patatin und die Nebenbestandteile wie Protease Inhibitoren. Das Protein Patatin hat einen hohen ernährungsphysiologischen Wert und soll aus dem bei der Stärkeproduktion anfallenden Kartoffelfruchtwasser gewonnen werden. So gewonnenes Patatin kann bei ausreichender Reinheit als Lebensmittelzusatzstoff Verwendung finden. Die abgetrennten Protease Inhibitoren können Forschungen zur Folge als Diätetikum eingesetzt werden. Durch die extrem großen Mengen anfallenden Kartoffelfruchtwassers bietet sich daher eine großtechnische Aufarbeitung der Abwässer an. Da die Proteine später Verwendung im Lebensmittelbereich finden sollen, ist eine schonende Abtrennung der Bestandteile ohne Einsatz von gesundheitsschädlichen Chemikalien empfehlenswert. Die Membrantechnologie bietet hier einen günstigen Ansatzpunkt. Die Trennung über die Membranen erfolgt ausschließlich unter Verwendung unbedenklicher Puffer- und Salzlösungen.

Zunächst wurden Trennungsversuche von Standardproteingemischen mit den Zentrifugeneinheiten Vivapure durchgeführt. Die mit maximal 500 µl zu befüllenden Einheiten sind mit unterschiedlichen Ionenaustauschermembranen bestückt und sollen schnelle und einfache Trennungen in einzelne Proteine ermöglichen. Liegen die pI-Werte der Proteine im Gemisch zu dicht zusammen, machen sich die Schwächen der Zentrifugeneinheiten bemerkbar. Vollständige Trennungen sind meist nicht möglich, da sich Reste der auf den Membranen bindenden Proteine im Durchlauf und in den Elutionsfraktionen nachweisen lassen. Bedingt

durch die kurze Kontaktzeit zwischen Proteinlösung und Membran, haben die Proteine komplexer Gemische nicht die nötige Zeit und Gelegenheit auf der Membran zu binden.

Bei der Trennung der zwei Komponenten HSA und IgG voneinander erwies sich die Anwendung der Zentrifugeneinheiten Vivapure als problemlos. Die Trennung der beiden Proteine konnte durch eine Anreicherung von HSA auf der Q-Membran durchgeführt werden. Mit Hilfe eines hochmolaren Salzpuffers (1,5 M NaCl) konnte eine vollständige Elution des Protein HSA durchgeführt werden (Kap. 3.3.1).

Auf Grund der einfachen und schnellen Handhabung wurden die Zentrifugeneinheiten auch für Vorversuche zur Feststellung der Bindungsfähigkeit von Proteinen auf unterschiedlichen Membranen eingesetzt. In dem Scouting-Verfahren wurden auf die Ionenaustauschermembranen der Zentrifugeneinheiten die zu trennenden Proteingemische in verschiedenen Puffern und pH-Bereichen aufgegeben. Die anschließende gelelektrophoretische Untersuchung gibt dem Anwender einen Überblick und hilft langwierige Untersuchungen nach den Versuchsparametern für Bindung und Elution von Proteinen abzukürzen. Angewendet wurde das Scouting-Verfahren in dieser Arbeit für das HSA/IgG-Gemisch, sowie bei den komplexen Kartoffelfruchtwasser- und Erbsenfruchtwassergemischen.

Die gelelektrophoretische Untersuchung ergab, das HSA bei den pH-Werten 6, 7,5 und 9 an die Q-Membran bindet, aber nur bei pH 6 von der Membran eluiert werden kann. IgG hat eine besondere Affinität zur starken Kationenaustauschermembran und bindet in allen pH-Bereichen. IgG kann bei einem pH-Wert von 4,5 über die Kationenaustauscher-Membran von HSA getrennt und mit 0,3 M NaCl im Puffer von der Membran eluiert werden (Kap.3.4.1).

Auch Kartoffelfruchtwasser wurde nach dem Scouting-Verfahren untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung ergaben, dass die Anbindung des Hauptproteins Patatin bei pH 6 und 7,5 an die Q-Membran optimal ist und mit 0,3 M NaCl im gleichen pH Bereich von der Membran eluiert werden kann. Die Protease Inhibitoren können bei pH 6 und 7,5 an die S-Membran binden und bei pH 6 mit 0,3 M NaCl im Puffer eluiert werden (Kap.3.4.2).

Mit Hilfe des Scouting-Test wurden die Versuchsparameter wie pH-Bereich, Puffer und geeignete Membran für die weiterführenden Untersuchungen von KFW bestimmt. Die einfach zu handhabenden Zentrifugeneinheiten Vivapure bieten dem Anwender im Labor eine schnelle Möglichkeit Bindungs- und Trennverhalten von Proteinen auf Ionenaustauschermembranen zu testen.

Um Kartoffelfruchtwasser aufzutrennen wurden die aus dem Scouting-Versuch gewonnenen Erkenntnisse auf Membranadsorber im Labormaßstab übertragen. Die Trennung des

industriellen Kartoffelfruchtwassers über Sartobind Membranadsorber wurde in 15 und 75 cm² großen Modulen untersucht. Die Versuche wurden in einer mit PC steuerbaren FPLC-Anlage durchgeführt.

Da die Probenaufgabe auf die Q- und S-Membranen in einem Schritt erfolgen sollte, wurde ein pH-Bereich von 7 festgelegt und während der gesamten Trennung konstant gehalten. Die Module sind bei der Beladung miteinander verbunden und werden zur Elution von einander getrennt und einzeln eluiert. Die Elutionsbedingungen von 0,3 M NaCl im Eluenten, die im Scouting gefunden wurden, reichten zur Abtrennung der Proteine über Adsorber nicht aus. Weitere Untersuchungen ergaben, dass eine Salzkonzentration von 0,5 M NaCl im Eluenten nötig ist, um die Hauptmenge an Protein in einem Schritt von der Membran zu waschen (Kap. 3.5.6).

Neben den Elutionsbedingungen wurde ein Steuerprogramm zur Beladung und Elution der Membran entwickelt. Als beste Methode erwies sich ein 2-stufiges Gradientenprogramm zur Elution, dessen erster Elutionsschritt bei 0,5 M NaCl liegt. Im zweiten Schritt erfolgt mit einem 1 M NaCl-Puffer die Reinigung der Membran (Kap.3.6.2).

Als mögliche Elutionssalze wurden neben NaCl auch KCl und MgCl₂ untersucht. KCl und NaCl unterschieden sich in ihrer Wirkung nicht. Mit 0,3 M MgCl₂ konnte zwar eine Elution durchgeführt werden, die Proteinkonzentration war aber nicht ausreichend hoch und bot daher keine Verbesserung gegenüber dem NaCl. (Kap.3.5.5)

Schwierigkeiten gab es mit den unterschiedlichen Proben des KFW. Die Herstellung von Stärke erfolgt im Kampagnebetrieb von August bis Januar. Nur in diesem Zeitraum war es möglich Proben zu erlangen. Da Kartoffeln ein biologisches Produkt sind und der Stärke-, sowie der Proteingehalt witterungsabhängig sind, unterschieden sich die Kartoffelfruchtwässer von Jahr zu Jahr, aber auch je nach verwendeten Kartoffelsorten von einem Tag auf den anderen.

Da Kartoffelfruchtwasser schnell altert und sich zersetzt wurden Proben in ausreichender Menge eingefroren. Die aufgetauten Proben wiesen meist starke Trübungen und Ausflockungen auf, die durch Zentrifugieren bei 3000 x g und Ultrafiltration mit 0,2 µm Membranen entfernt wurden. Diese Probenvorbereitung war nötig, um ein Verschließen der Ionenaustauschmembranen zu verhindern.

Die Proben wurden im Überschuss über die gekoppelten Adsorbermodule geführt. Das Patatin wurde auf der Q-Membran zurückgehalten, Protease Inhibitoren lagerten sich auf der S-Membran an. Es wurde eine Trennung von Patatin mit einer maximalen Ausbeute von 63 % (Proben der Kampagne 2004) bezogen auf das eingesetzte KFW erreicht. Maximal konnten 0,31

mg Patatin pro cm^2 Membran binden (Kap.3.6.3). MALDI- Untersuchungen haben bestätigt, dass es sich um Patatin handelt (Kap.3.8.3.2).

Von den unterschiedlichen Protease Inhibitoren, die im KFW enthalten sind, konnten nur Proteine mit einer Masse von ca. 20 kDa auf der S-Membran angelagert und eluiert werden. Nachfolgende gelelektrophoretische und MALDI-Untersuchungen zeigten, dass es sich bei der 20 kDa-Gruppe um überwiegend PCPI (Potato Cystein Protease Inhibitor) handelt. In geringen Mengen wurden auch Kunitz-Inhibitoren nachgewiesen (Kap.3.8.3.2). Die Ausbeute der Protease Inhibitoren lag bei maximal 14,8 % (Proben der Kampagne 2004). Die höchste Bindungskapazität der S-Membran lag bei $0,1 \text{ mg/cm}^2$ (Kap.3.6.3).

Die Trennung von industriell anfallendem Kartoffelfruchtwasser in die Hauptproteine Patatin und eine Proteinfraction von 20 kDa schweren Protease Inhibitoren ist über Membranadsorber im Labormaßstab möglich. Bei einem *Up-scaling* des Prozesses mit Membranadsorbern mit Oberflächen im Quadratmeterbereich wären Ausbeuten von 3 g Patatin pro m^2 Membranoberfläche möglich. Für einen industriellen Einsatz wären Anpassungen in der Flussgeschwindigkeit und den Volumenströmen notwendig. Um die Ausbeuten zu erhöhen müssten die Bindungskapazitäten der Membranen und die Anbindungsmöglichkeiten der Proteine verbessert werden. Eine Optimierung der Stabilität und Einsatzfähigkeit der Membranen im Dauerbetrieb ist nötig.

Schwierigkeiten kann es im industriellen Maßstab in der Probenlagerung geben. Da Kartoffelfruchtwasser bei Raumtemperatur nicht lagerfähig ist, muss es eingefroren oder sofort weiterverarbeitet werden. Zusätzlich müssen große Mengen des Kartoffelfruchtwassers zentrifugiert und vorfiltriert werden, damit die verwendete Lösung klar und schwebstofffrei eingesetzt werden kann.

An der Umsetzung in einen technischen Maßstab mit Membranen von 1 bis 4 m^2 Oberfläche wird derzeit gearbeitet.

5 Literatur

- Allen et al.: Potato lectin; Int. J. Biochem. Cell. Biol. 28 (1996) 1285-1291
- Bayerischer Agrarbericht, 2005
- Berglöf, J.H. et al: Biotechnologie des proteine du plasma; Colloque Inserm 175 (1989) p 201-206
- Biosicherheit; BMBF; www.biosicherheit.de/kartoffel; 2002
- Brockhaus, Lexikon 1998
- CMA-Information: Broschüre 2004
- Cutler, Paul: Protein Purification Protocols; Methods in Molecular Biology Vol 244, Humana Press, 2004
- Dellweg, Hanswerner: Biotechnologie, Grundlagen und Verfahren; VCH-Verlag 1987
- Dennis, S; Galliard, T.: Wax ester formation catalysed by isoenzymes of lipolytic acyl hydrolase. Phytochem.(1974) 13, p 2469-2473
- Emsland-Stärke GmbH, Emlichheim, Übersicht 2002
- Finley/ Hautala: Recovering of soluble protein from waste; Food production development 10 (1976) p 92-93
- Galliard, T.: The enzymic decylation of phospholipids and galactolipids in plants. Biochem J.(1971) 121, p 379-390
- Gasper, H.: Handbuch der industriellen Fest/Flüssig- Filtration, Wiley-VCH Verlag, 2000
- Gerbrandy S.J.; Doorgeest,A.: Potatoe phosphorylase isoenzymes. Phytochemistry (1972), 11, 2403-2407
- Handbooks from Amersham Biosciences: Gel Filtration, 2002
- Handbooks from Amersham Biosciences: Protein Purification, 2001
- Handbooks from Amersham Biosciences: Ion exchange, 2001
- Hass, G.M.; Nau ,H.; Biemann, K.; Grahn, D.T.; Neurath, H.: The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. Biochemistry (1975),14,1334-1342
- Heiligmann, W. et al: Die Pflanze, Klett Verlag, 1979
- Ho, Winston: Membrane Handbook, Van Nostrand Reinhold Verlag, New York, 1992

-
- Heyde, Michael: Membrantechnische Abtrennung von Proteinen aus Kartoffelfruchtwasser; Fortschrittsbericht VDI , Nr. 575, 1998
 - Hobhouse, H: Fünf Pflanzen verändern die Welt. Chinarinde, Zucker, Tee, Baumwolle, Kartoffeln; Hamburg 1996
 - Huang, D.Y.; Swanson, B.G.; Ryan, C.A.: Stability of protease inhibitors in potato tuber during cooking; J.Food Sci. (1981) 46, 287-290
 - Horn, Hildegard: Analytische Charakterisierung von Kartoffelfruchtwasserproteinen; Dissertation München 1979
 - Kadamm, S.S.; Dhumal, S.S.; Jambahl, N.D: Structure, nutritional composition and quality, “ Potato: Production, Processing, and products “, CRC-Press, 1991
 - Kapoor et al.: Potato tuber proteins ; Potato research 18 (1975) p 469-478
 - Kassam, Kamaluddin: Gewinnung und Charakterisierung von Proteinen aus Kartoffelfruchtwasser; Dissertation München 1978
 - Knorr, Dietrich: Effect of recovery methods on yield, quality and functional properties of potato protein concentrates; Journal of food science, Vol 45 (1980) p 1183-1186
 - Knorr, D.; Kohler, G. ; Betschart, A.: Potato protein concentrates; Journal of Food process and preservation 1 (1977) p 235-246
 - Labib, A.I.: Potato proteins, Dissertation Wageningen 1962
 - Lindner, Pinhas; Kaplan, Batia ; Weller, Elmar: Fractionation of potato juice protein into acid-soluble and acid-coagulable fractions; Food chemistry 6 (1980-1981) p 323-335
 - Lottspeich, F.; Zorbas, H.: Bioanalytik, Spektrum Verlag, 1998
 - Lotz, M: Biokonversion nachwachsender Rohstoffe: Die Stärkekartoffel als Rohstoff für die Biokonversion, Emsland-Stärke, Emlichheim, 2003
 - Meuser, F.; Kohler, F.; Mohr, G.; Steyrer, W.: Verbesserung des ernährungsphysiologischen Wertes von Maisextrudaten unter Verwendung von Kartoffelproteinen; Starch/ Stärke 32 (1980) Nr 7, p 238-243
 - Mulder, Marcel: Basic Principles of Membranetechnology, 1991
 - Paiva, E. et al.: The major tuber proteins of potato can be induced to accumulate in stems and petioles; Plant Physiol. (in press) 1983
 - Partington/ Blowell : Purification of polyphenyloxidase of the storage protein patatin from potato tuber ; Journal Phytochemistry 42 (1996), Nr.6, p 1499-1502
 - Park, William D.: Tuberproteins ; Plant molecular biology reported 1 (1983), p 61-66

-
- Park, William D.: Potato tuber protein: 40000 molecular glycoprotein; *Plant. Physiol.* 71 (1983) p 146-160
 - Plate, Kerstin: Großtechnische Gewinnung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke unter Verwendung von Membrantechnologie, Dissertation, Universität Hannover, 2003
 - Pouvreau, L; Gruppen, H; Piersma, S.R.; Van den Broek, L.M.A.: Relative abundance and inhibitory distributions of protease inhibitors in potatoe fruit juice c.v. Elkana. *J.Agric.Food Chem.* 2001. Submitted.
 - Pots, Andre et al.: The pH-dependence of the structural stability of patatin; *J. Agri. Food Chem.*46 (1998) p 2546-2553
 - Pots, A.: Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin; Wageningen 1999
 - Racusen, David; Weller, David: Molecular weight of patatin, a major potato tuber protein; *Journal of Food Biochemistry* 8 (1984) p 103-107
 - Racusen, David; Foote, Murray: A major soluble glycoprotein of potato tubers; *Journal of Food Biochemistry* 4 (1980) p 43-52
 - Ralet, M.C. ; Gueguen, Jacques: Potato proteins: composition, recovery and functional properties; *Sciences des aliments* 19 (2) (1999), p 147-165
 - Rautenbach, R.; *Membranverfahren*, Springerverlag Berlin-Heidelberg, 1997
 - Reck, Michael: Protokoll zum Schwerpunktpraktikum: Proteingewinnung aus Kartoffelfruchtwasser mittels verschiedener Membranmodule, Universität Hannover, 2003
 - Richardson, M; Cossins, L.: Chymotryptic inhibitor I from Potatoes: the amino acid sequences of subunits B, C, and D. *FEBS Lett.* 1974, 45, 11-13
 - Righetti, P.G.: *Isoelectric focussing: Theory, methodology and applications*; Laboratory techniques, Elsevier Verlag, 1983
 - Rosahl, S. et al.: Isolation and characterization of a gene from *solanum tuberosum* encoding patatin, the major storage protein of potato tuber. *Mol. Gen. Genet.* (1986) 203, p 214-220
 - Rosenau, J. ; Lester, F.: *LCW Wastewater potato starch / protein production process*, Industrial environment research laboratory, Springfield, 1979
 - Sartorius AG: Fischer-Frühholz, S.: Vortrag "Schneller am Ziel in der Biochromatographie mit Membranadsorbern", 2004
 - Sartorius AG: Technical Specifications, Sartobind Membrane Adsorbers, 85030-500-14

-
- Schrattenholz, Andre: Methoden der Proteomforschung, Spektrum Verlag, 2001
 - Strahlmann, Simone: Die Kartoffel; www.fak-hauswirtschaft.de/kartoff.htm; 2000
 - Strolle / Cording: Recovering potato proteins; Journal of agriculture and food chemistry 21 (1973) p 974-977
 - Suh et al.: Purification and characterization of the 22-kilodalton potato tuber protein; Plant Physiology 94 (1990) p 40-45
 - van Koningsveld, Gerriet A et al: Effects of pH and treatment on the structures and solubility of potato proteins in different preparations, J.Agric. Food chem. 49 (2001), p 4889-4897
 - van Koningsveld, Gerriet A.: Physiko-chemical and functional properties of potato proteins; 27.6.2001, Doktorarbeit, Wageningen
 - Van der Plas, L.H.W: Potato Tuber proteins storage: biochemical and physical changes Aus: Biotechnology in agriculture and forestry 3
 - Vivascience AG: Herstellerangaben, Protein purification handbook, 2000
 - Yamamoto, Shuichi et al. Ion-Exchange :Chromatography of Proteins; Chromatographic Science Series Vol 43, 1988

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| ACN | Acetonitril |
| AU | Absorption Unit |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| C | Carboxymethyl |
| cm ² | Quadratcentimeter |
| D | Diethylamin |
| Da | Dalton |
| FPLC | Fast Protein Liquid Chromatography |
| HSA | Humanes Serum Albumin |
| IgG | Immunglobulin G |
| kDa | Kilo Dalton |
| KFW | Kartoffelfruchtwasser |
| M | Mol |
| MA | Membranadsorber |
| MALDI | Matrix Assisted Laser Desorption Ionization |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| Mio. | Millionen |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol |
| nm | Nanometer |
| nUO | nach Umkehrosrose |
| PAGE | Poly Acryl Gel Elektrophoresis |
| PC | Personalcomputer |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| PI | Protease Inhibitoren |
| PPL | Potato Protein Liquor |
| Q | Quartenäre Trimethylaminoethyl |
| S | Sulfomethy |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| t | Tonnen |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Tris-HCl | Tris (hydroxymethyl)aminoethan |
| vUO | vor Umkehrosrose |

Anlage zum Kap. 3.4:**Scouting Protokoll**

Folgende Bindungspuffer wurden verwendet:

Tab 6.1: Verwendete Puffersysteme des Scoutingversuchs

| Puffer | Puffersystem | Konzentration | pH-Wert |
|---------------|---------------------|----------------------|----------------|
| A | Natriumacatat | 25 mM | 4,5 |
| B | MES | 25 mM | 6 |
| C | Tris-HCl | 25 mM | 7,5 |
| D | Natriumbicarbonat | 25 mM | 9 |

Als Elutionspuffer wurden die Bindungspuffer mit 300 mM, 600 mM, 900 mM und 1,5 M NaCl versetzt.

Durchführung:

1. 200 µl Probe werden jeweils mit 800 µl Puffer A-D versetzt. Man erhält 4 Proben mit unterschiedlichem pH-Wert. Die Proteinmenge darf die Bindungskapazität des Moduls nicht überschreiten und soll zwischen 0,2 und 0,7 mg liegen.
2. Es werden jeweils 4 Q und 4 S Zentrifugenmodule verwendet. Zur Equilibrierung werden die Module mit 400 µl eines jeden Puffers beladen und für 5 min bei 500 g zentrifugiert.
3. Es werden 400 µl einer jeden Probe entsprechend dem pH-Wert auf die Module gegeben und für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Der Durchfluss wird für folgende Untersuchungen zurück behalten.
4. Die Module werden mit 400 µl des entsprechenden Puffers gewaschen und für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Die Waschfraktion wird für weitere Analysen zurück behalten.
5. Der Waschvorgang wird wiederholt.
6. Der Elutionsvorgang wird schrittweise durchgeführt. Im ersten Schritt werden 400 µl des entsprechenden Puffers mit 300 mM NaCl eingesetzt und die Module für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Die Elutionsfraktion wird für weitere Analysen zurück behalten.
7. Anschließend werden mit 600 mM, 900 mM und 1,5 M Elutionspuffer die Elution durchgeführt. Die Fraktionen werden zurück gehalten.
8. Die gewonnenen Fraktionen werden zu weiteren Analysen gelelektrophoretisch untersucht.

Anmerkung: Es kann bei einigen Proteinen vorkommen, dass sich die Membranen zusetzen und der Puffer nicht mehr die Membran passieren kann. Die Zentrifugalkraft muss daraufhin erhöht werden.

Anlage zum Kap. 3.4.1:

In der folgenden Abbildung ist das Verhalten der Proteine bei pH 7,5 und 9 auf der S-Membran dokumentiert.

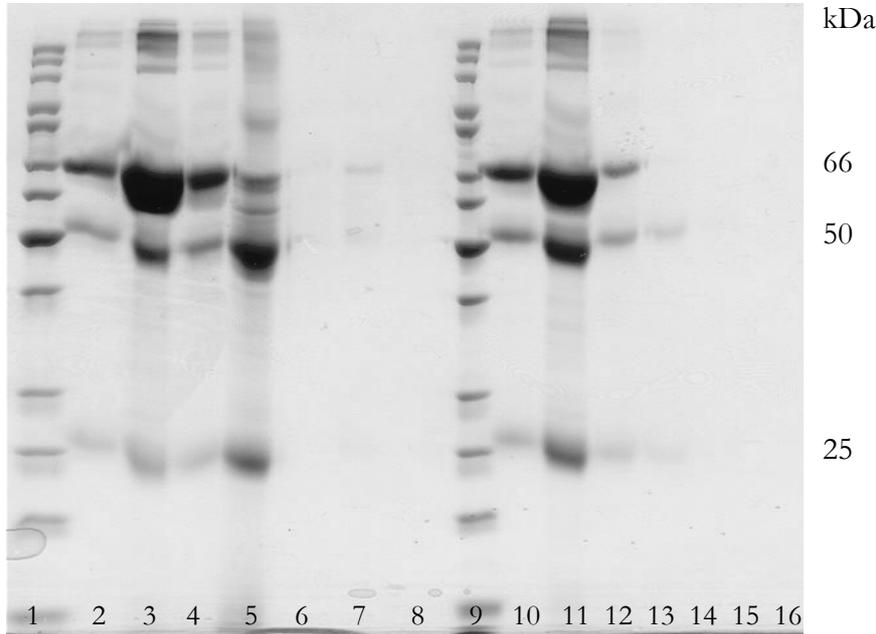


Abb. 6.1:
Scoutingversuch
mit HSA/IgG bei
pH 7,5 und 9

Spur 1 Molekulargewichtsmarker
Spur 2 HSA und IgG in Puffer C (pH
7,5)
Spur 3 S, Durchlauf mit Puffer C
Spur 4 S, 1. Waschen
Spur 5 S, Elution mit 300 mM NaCl
Spur 6 S, Elution mit 600 mM NaCl
Spur 7 S, Elution mit 900 mM NaCl
Spur 8 S, Elution mit 1,5 M NaCl

Spur 9 Molekulargewichtsmarker
Spur 10 HSA und IgG in Puffer D
(pH 9)
Spur 11 S, Durchlauf mit Puffer D
Spur 12 S, 1. Waschen
Spur 13 S, Elution mit 300 mM NaCl
Spur 14 S, Elution mit 600 mM NaCl
Spur 15 S, Elution mit 900 mM NaCl
Spur 16 S, Elution mit 1,5 M NaCl

Anlage zum Kap. 3.4.2:

Die folgende Abbildung zeigt, dass bei pH 9 die Kartoffelproteine nicht auf der S-Membran haften. Die Durchbruchfraktion enthält alle Proteinfractionen. Im ersten Elutionsschritt sind nur Spuren von niedermolekularen Protease Inhibitoren nach zu weisen..

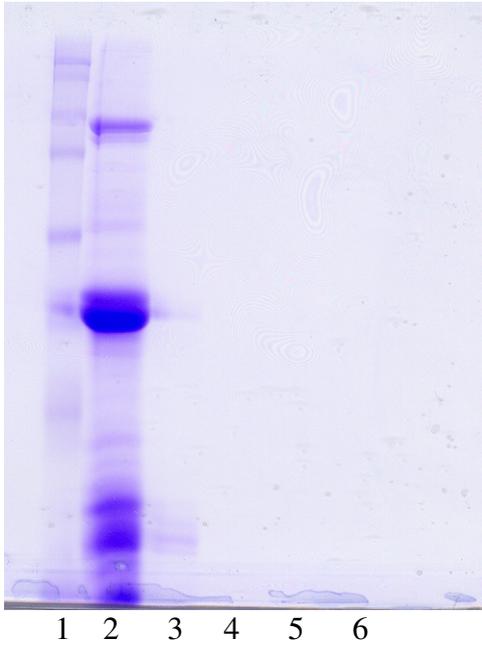


Abb. 6.2: Scoutingversuch mit Kartoffelfruchtwasser bei pH 9

Spur 1: Marker
 Spur 2: S, Durchlauf fraktion mit Puffer D, pH 9
 Spur 3: S, Elution mit 300 mM NaCl im Puffer
 Spur 4: S, Elution mit 600 mM NaCl im Puffer
 Spur 5: S, Elution mit 900 mM NaCl im Puffer
 Spur 6: S, Elution mit 1,5 M NaCl im Puffer

Anlage zu Kap. 3.5.4

Tab. 6.3: lineares Elutionsprogramm

| | Puffer | Volumen [ml] | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] | Programmpunkt |
|---|-------------|-----------------|-----------------------|---------------|---------------|
| 1 | 100 % A | 5 | 0,5 | 10 | Probenauftrag |
| 2 | 100 % A | 10 | 2 | 5 | Spülen |
| 3 | 0 %-100 % B | 60 | 2 | 30 | eluieren |
| 4 | 100 % B | 6 | 2 | 3 | eluieren |
| 5 | 100 % A | 10 | 2 | 5 | spülen |

Anlage zum Kap 3.5.5:

Tab. 6.4: Elutionsprogramm in 5% Stufen

| | Puffer | Volumen [ml] | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] | Programmpunkt |
|-----------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | 100 % A | 3 | 0,5 | 6 | Probenauftrag |
| 2 | 100 % A | 5 | 1 | 5 | spülen |
| 3 | Mix: 95 % A+5 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 4 | Mix: 90 % A+10 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 5 | Mix: 85 % A+15 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 6 | Mix: 80 % A+20 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 7 | Mix: 75 % A+25 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 8 | Mix: 70 % A+30 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 9 | Mix: 65 % A+35 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 10 | Mix: 60 % A+40 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 11 | Mix: 55 % A+45 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 12 | Mix: 50 % A+50 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 13 | Mix: 45 % A+55 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 14 | Mix: 40 % A+60 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 15 | Mix: 35 % A+65 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 16 | Mix: 30 % A+70 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 17 | Mix: 25 % A+75 % B | 4 | 2 | 2 | eluieren |
| 18 | 100 % B | 10 | 2 | 5 | spülen und equilibrieren |
| 19 | 100 % A | 20 | 2 | 10 | spülen |

Anlage zum Kap. 3.5.6:

Tab. 6.5.: dreistufiges Elutionsprogramm 20 % -50 % -100 %

| | Puffer | Volumen [ml] | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] | Programmpunkt |
|----------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | 100 % A | 2 | 2 | 1 | spülen |
| 2 | 100 % A | 3 | 0,5 | 6 | Probenauftrag |
| 3 | 100 % A | 5 | 1 | 5 | spülen |
| 4 | Mix: 80 % A+20 % B | 10 | 2 | 5 | eluieren |
| 5 | Mix: 50 % A+50 % B | 10 | 2 | 5 | eluieren |
| 6 | 100 % B | 10 | 2 | 5 | spülen und equilibrieren |
| 7 | 100 % A | 10 | 2 | 5 | spülen |

Tab. 6.6: dreistufiges Elutionsprogramm 30 % -50 % -100 %

| | Puffer | Volumen [ml] | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] | Programmpunkt |
|---|--------------------|-----------------|-----------------------|---------------|--------------------------|
| 1 | 100 % A | 2 | 2 | 1 | spülen |
| 2 | 100 % A | 3 | 0,5 | 6 | Probenauftrag |
| 3 | 100 % A | 5 | 1 | 5 | spülen |
| 4 | Mix: 70 % A+30 % B | 10 | 2 | 5 | eluieren |
| 5 | Mix: 50 % A+50 % B | 10 | 2 | 5 | eluieren |
| 6 | 100 % B | 10 | 2 | 5 | spülen und equilibrieren |
| 7 | 100 % A | 10 | 2 | 5 | spülen |

Tab. 6.7: vierstufiges Elutionsprogramm: 10 % -25 % -50 % -100 %

| | Puffer | Volumen [ml] | Flussrate [ml/min] | Zeit [min] | Programmpunkt |
|---|--------------------|-----------------|-----------------------|---------------|--------------------------|
| 1 | 100 % A | 3 | 0,5 | 6 | Probenauftrag |
| 2 | 100 % A | 20 | 2 | 10 | spülen |
| 3 | Mix: 90 % A+10 % B | 10 | 2 | 5 | eluieren |
| 4 | Mix: 75 % A+25 % B | 10 | 2 | 5 | eluieren |
| 5 | Mix:50 %A+50 % B | 10 | 2 | 5 | eluieren |
| 5 | 100 % B | 10 | 2 | 5 | spülen und equilibrieren |
| 6 | 100 % A | 20 | 2 | 10 | spülen |

Anhang zu den gelelektrophoretischen Untersuchungen:

Gearbeitet wurde mit dem horizontalen Elektrophoresesystem Phast der Firma Amersham Pharmacia, sowie mit dem vertikalen System Criterion der Firma BioRad. Der Probenpuffer und die Probenvorbereitung sind bei beiden Systemen gleich. Bei dem Phastsystem wird kein Laufpuffer benötigt, stattdessen werden Gelpufferstreifen eingesetzt.

Die 2-D Gelelektrophorese wurde an einer Multiphast II Anlage von Amersham Pharmacia durchgeführt.

Probenpuffer: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8

2% SDS

25% Glycerol

0,01% Bromophenol blue

5% 2-mercaptoethanol

Probenvorbereitung:

- Die optimale Ladung (Proteingehalt, Angaben vom Hersteller) pro Bande liegt bei 0,01 µg Protein bei Silberfärbung
0,5 µg Protein bei Coomassiefärbung
- Die Proben sollten nicht mehr als 50 mmol Salz enthalten (zu viel Salz erzeugt Schlieren und unscharfe Peaks).

- Probenpuffer (blau) vor dem Einsetzen frisch mit 10% Mercaptoethanol versetzen (900 µl Puffer + 100 µl Mercaptoethanol).
- Die Proben werden mit dem Probenpuffer 1:1 verdünnt, man benötigt bis zu 30 µl fertig verdünnte Probe pro Tasche (abhängig von der Taschenanzahl).
- Die Proben werden im Heizblock auf 95 °C für 5 min erhitzt.
- Proben werden kurz zentrifugiert.

Arbeitsanweisung für das Elektrophoresegerät von BioRad mit Fertiggelele

Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl
 192 mM Glycine
 0,1% SDS pH-Wert nicht einstellen

Verwendet wurden Tris-HCl Fertiggelele der Firma BioRad, München. Die Elektrophoresen wurden für ca. 1h bei 200 V in einer Criterion-Kammer von BioRad durchgeführt.

Arbeitsanweisung für die 2-D-Elektrophorese

1.Dimension

A) Rehydrierung der IPG-Streifen

Für die IPG-Streifen werden Rehydrierungslösung (vom Hersteller) und Probe vermischt. Das Gesamtvolumen von 340 µl darf nicht überschritten werden. Die Rehydrierung der Streifen dauert 12 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur.

B) IEF mit Rehydration loading

- 1) 3-4 mL Coverfluid auf die Kühlplatte pipettieren. Das DryStrip Tray (Glas) auflegen.
- 2) Aufsatz für die IEF montieren und anschließen. Die rote anodische Elektrode soll am oberen Teil an den Kühlstützen positioniert werden. Rote und schwarze Elektroden anschließen.
- 3) In den Glasrahmen sollen 10 mL Coverfluid gegossen werden.
- 4) Anschließend wird die „Folie“ aufgelegt.
- 5) Papier Elektrodenstreifen müssen auf eine Länge von 11 cm gekürzt werden und mit dest. Wasser angefeuchtet werden. Die Streifen sollen nur feucht und nicht nass sein.
- 6) Den Gelstreifen vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Reswellingtray nehmen. Dabei nur an den Enden berühren. Die Streifen werden auf die Folie in die Vertiefungen gelegt. Dabei soll das saure Ende (+) nach oben an die rote Elektrode (Anode) gelegt werden.
- 7) Die feuchten Elektrodenstreifen werden auf die IPG Streifen quer gelegt. Nicht über die Plastikenden, sondern direkt auf die Geloberfläche.
- 8) Die Elektroden werden nun auf die Papierstreifen gesetzt.
- 9) Das ganze Tray wird mit Coverfluid bedeckt, ca 70 mL.
- 10) Die isoelektrische Focussierung wird nach dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Laufprotokoll für die IEF, 1. Dimension:

| | | | | |
|----------|-------|------|----|--------|
| Phase 1: | 500V | 2mA | 5W | 0:01h |
| Phase 2: | 3500V | 2 mA | 5W | 1:30h |
| Phase 3: | 3500V | 2mA | 5W | 20:00h |

2. Dimension

- A) Equilibrierung der eingefrorenen und schon nach der 1. Dim. gelaufenen Streifen
- 1) 10 ml Puffer mit 100 mg DTT versetzen, schütteln (100 mL Mercaptoethanol ist auch möglich)
 - 2) Die IPG Streifen in individuellen Gefäßen (Dry Strip Folie vom ersten Schritt) mit der vorbereiteten Lösung equilibrieren, 15 min.
 - 3) 10 ml Puffer mit 250 mg Iodaceamid versetzen (kein DTT in der Lösung!!), schütteln
 - 4) Die IPG Streifen jetzt für 15 min in der zweiten Lösung equilibrieren.
 - 5) Die IPG Streifen anschließen auf ein mit Dest. Wasser befeuchtetes Filterpapier legen. Die überschüssige Pufferlösung wird so aufgenommen. 3 min
 - 6) Die Streifen sind zur weiteren Verwendung einsatzfähig.

B) SDS-PAGE

- 1) Thermostat auf 15°C einstellen
- 2) 2,5 bis 3 mL Kerosin auf die weiße Oberfläche der Kühlplatte (MultiphorII) pipettieren.
- 3) Das Gel den Kathoden (-) und Anodensymbolen (+) auf die Kühlplatte legen.
- 4) Den Kathodenpufferstreifen aus der Folieverpackung nehmen und mit der schmalen Seite nach unten auf den Rand des Gels legen.
- 5) Den Anodenstrip auch aus der Folie nehmen und auf die Anodenseite des Gels legen.
- 6) Die IPG streifen mit der Gelseite nach unten auf das Gel legen. Die Gelstreifen müssen im vollen Kontakt mit dem SDS-Gel stehen. Luftblasen und Unebenheiten entfernen. Die Plastikenden werden mit sample application pieces bedeckt.
- 7) Markerproteine: Will man Markerproteine mitlaufen lassen muß am Ende des Gelstreifens ein Applikationstück (Filterpapier) auf das SDS-Gel gelegt werden. Die Markerproteine können nun in einem Volumen von 15 bis 20 µL auf das Filterpapier aufgegeben werden.
- 8) Anschließend werden die Elektroden mit der Glasplatte über das Gel gestellt und positioniert. Die Elektrodendrähte sollten in der Mitte der Gelstreifen aufliegen. Elektroden absenken und fixieren.
- 9) Starten des Laufprogramms S2 und S3:
Nach 30-40 min stoppen (nach Schritt 1) und den IPG streifen entfernen, den Kathodengestreifen eventuell vor den IPG streifen plazieren. Anschließend läuft das Programm weiter. Nach ca. 1,5 h ist der Lauf abgeschlossen.

Programm S2

| | | | |
|--------|-------|-------|------|
| 0:40 h | 120 V | 20 mA | 30 W |
|--------|-------|-------|------|

wenn das Programm durchgelaufen ist wird der IPG Streifen entfernt und der Puffergelstreifen versetzt. Der Puffergelstreifen wird vor den entnommenen IPG-Streifen gelegt. Anschließend wird das Programm S3 gestartet.

Programm S3

| | | | |
|--------|------|-------|------|
| 1:10 h | 600V | 50 mA | 30 W |
|--------|------|-------|------|

Anschließend kann das Gel mit einem der folgenden Färbeprotokolle gefärbt werden.

Die folgenden Färbeprotokolle können für alle Gele einer Elektrophorese verwendet werden. Bei besonders großen oder auf einer Folie aufgezogenen Gelen werden die Waschzeiten verlängert.

Coomassiefärbeprotokoll

Material: Coomassiefärbetabletten Amersham Pharmacia

Stammlösung: 1 Tablette wird in 80 ml dest. Wasser und 120 ml Methanol unter rühren gelöst. Die Lösung muss anschließend filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Färbereagenz: Vor Gebrauch wird das Färbereagenz zu gleichen Teilen mit 20 % Essigsäure gemischt. Das Reagenz besteht nun aus einer Mischung von 10 % Essigsäure, 30 % Methanol und 60 % Wasser, sowie 0,1 % Coomassiefarbstoff.

Fixierungs- und Entfärbereagenz: Es wird eine Lösung aus 10 % Essigsäure, 30 % Methanol und 60 % Wasser hergestellt.

Durchführung:

- Nach der durchgeführten Elektrophorese wird das Gel vorsichtig aus der Plastikummantelung entfernt.
- Das Gel wird anschließend eine Stunde in das Coomassiefärbereagenz bei Raumtemperatur gelegt.
- Ist das Gel tiefblau angefärbt, erfolgt die Entfärbung des Hintergrunds mit Entfärberreagenz. Das Reagenz wird auf das Gel gegeben und nach einer halben Stunde gegen eine frische Lösung ausgetauscht. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, bis der Hintergrundfärbung hell genug ist und die Proteinbanden deutlich zu sehen sind.
- Der Entfärbeprozess kann mit Wasser langsam durchgeführt werden.
- Das Gel wird zur Datenerfassung gescannt.

Silberfärbeprotokoll

Lösungen und Chemikalien:

- Entfärber/ Fixierer: 5 Teile dest Wasser; 5 Teile Ethanol; 1 Teil Essigsäure
- Reduzierreagenz (Farmers reducer): 1 Spatelspitze Kaliumhexacyanoferrat II und 1 Spatelspitze Natriumthiosulfat in Wasser
- Formaldehyd
- 5 % Essigsäure
- 0,1 % Silbernitratlösung (frisch hergestellt)
- 2,5 % Natriumcarbonatlösung

Durchführung:

Alle Schritte werden auf einem niedrig eingestellten Schüttelautomaten durchgeführt.

- Das Fertiggel wird nach der beendeten Elektrophorese aus der Plastikummantelung entfernt und 30 min in die Fixierlösung gelegt.
- Das Gel wird zweimal kurz mit dest Wasser gewaschen.
- Für 2,5 min das Gel in die Reduzierlösung legen. Die Kristalle nicht direkt auf das Gel geben. Lösung anschließend verwerfen.
- Mit dest. Wasser das Gel bis zur völligen Entfärbung mehrfach waschen.

- 30 min lang in die Silbernitratlösung legen. Lösung verwerfen.
- Zweimal für 30 sec mit dest. Wasser waschen.
- Das Gel mit Natriumcarbonatlösung waschen. Lösung verwerfen.
- Das Gel in Natriumcarbonatlösung legen und mit 300- 500 µl Formaldehyd versetzen. ACHTUNG: unverdünntes Formaldehyd darf nicht direkt auf das Gel gegeben werden! Nur am Rand der Färbekammer in die Lösung geben.
- Die Banden der Proteine färben sich nach wenigen Minuten schwarz. Die Färbung muss bei ausreichender Stärke sofort mit 5 % Essigsäure gestoppt werden. Das Gel wird 10 min in der Essigsäure gewaschen.
- Anschließend wird das Gel in Wasser bis zur Datenerfassung gelagert.

Anhang zum Kap. 3.8.2

Arbeitsprotokoll : Tryptischer In-Gel Verdau

Das für die Experimente verwendete Trypsin war „Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade“ der Firma Promega, Madison (USA). Durch Methylierung der Lysinreste ist das Trypsin weitgehend gegen Autolyse resistent.

Verwendete Lösungen:

- 50 % Acetonitril (ACN) /0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)
- 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (pH 7,8)/50 % ACN
- 100 % ACN
- 50 mM Essigsäure mit 98 µl einer Lösung von
- 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (pH 7,8)/ 10 % ACN
- 50 % CAN/ 5 % TFA
- 5 % Ammoniak/ 30 % Methanol

Durchführung

Die gewünschte Proteinbande wurde mit einem sauberen Skalpell aus einen in Coomassie gefärbten Polyacrylgel herausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden in mit 50 % Acetonitril (ACN) und 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gespülten Eppendorfgefäßen überführt. Anschließend wurde zweimal mit 200 µl 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (pH 7,8)/ 50 % ACN bei 37°C für 45 min inkubiert. Das Gel entfärbt sich und wird milchig trübe. Darauf folgend wurde das Stückchen in 100 µl 100%ACN für 5 min eingelegt. Das Gel schrumpft und das ACN wurde durch 30 min lyophilisieren entfernt.

Im folgenden Schritt wurde der eigentliche Verdau durchgeführt und das Trypsin zugegeben. Dazu wurden 2 µl einer Trypsinlösung aus 100 µg Trypsin in 100 µl 50 mM Essigsäure mit 98 µl einer Lösung aus 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (pH 7,8)/ 10 % ACN versetzt. 20 µl dieses Gemisches wurden auf das getrocknete Gelstück gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gelstück nimmt Flüssigkeit auf und nimmt seine ursprüngliche Form wieder an. Es wurden 100 µl 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (pH 7,8)/ 10 % ACN zum Gelstück dazu gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag versetzt man das Gemisch mit 150 µl Wasser und inkubiert für 10 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde aufbewahrt. Anschließend wurde das Gel zweimal für 60

Minuten mit 50 µl einer Mischung aus 50 % ACN, 5% TFA versetzt. Alle Überstände wurden vereinigt und über Nacht in der Lyophilie getrocknet.

Zur weiteren Behandlung mussten die lyophilisierten Proben aufgereinigt werden. Dazu wurden ZipTip[®]_{SCX}-Pipettenspitze der Firma Millipore, Bedford (USA) verwendet. Diese Spitzen enthalten ein starkes Kationenaustauschermaterial, was zur Peptidaufreinigung verwendet werden kann. Um die Spitzen einsatzfähig zu machen wurden sie durch mehrmaliges auf- und abpipettieren mit 0,1% ACN vorbereitet. Die Proben werden in 20 µl 0,1 % ACN aufgenommen und durch 15-maliges auf- und abpipettieren an das Material gebunden. Anschließend werden die Spitzen wieder mit 0,1% ACN gewaschen. Eluiert wurden die Proteine mit 2µl einer Lösung aus 5% Ammoniak/30% Methanol und sofort auf ein vorbereitetes MALDI- Slide pipettiert. Die Probe wurde anschließend massenspektrometrisch untersucht.

Proteintest nach Lowry:

Verwendet wurde der Modified Lowry Protein Test von pierce, Rockford, USA. Der Test kann als Küvettentest und als Multiplate angewandt werden.

1. Das 2 M Phenolreagenz wird mit Wasser 1: 1 verdünnt.
2. 0,2 ml Probe werden mit 1 ml Lowry Reagenz versetzt. Die Lösungen werden vermischt und für exakt 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Anschließend werden 0,1 ml 1M Phenolreagenz zur Lösung zugegeben, vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.
4. Die Messung erfolgt bei 750 nm.
5. Über eine gleichzeitig mit gemessene BSA-Standardreihe kann der Proteingehalt ermittelt werden.

Lebenslauf

Name: Frauke Menzel, geb. Herrmann

Geburtsdatum: 19.12.1966

Geburtsort: Hannover

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung:

1973-1977 Grundschule Uhlandschule, Hannover

1977-1986 Gymnasium Lutherschule Hannover

Abitur Mai 1986

Berufsausbildung:

1986-1989 Abgeschlossene Ausbildung zur Chemielaborantin in der Firma Riedel-de Haen, Seelze

Mai 1989- Sep 1989 Angestellte der Firma Riedel-de Haen

Hochschulausbildung:

Sep 1989 – Okt 1999 Studium der Chemie an der Universität Hannover

Nov 1999- Mai 2000 Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Scheper am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover

Feb 2001-Juni 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover

Durchführung der vorliegenden Dissertation