

Downstream-Processing und Biotransformation von nachwachsenden Rohstoffen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Johann Schwarz
geboren am 25.04.72 in Karaganda (Kasachstan)

Hannover, Juli 2006

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Roland Ulber

Tag der Promotion: 19.07.2006

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel, sowie eventuell zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, Juli 2006

Johann Schwarz

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Schwarz
Vorname: Johann
Geburtsdatum: 25.04.1972
Geburtsort: Karaganda (Kasachstan)
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder
Ehefrau: Natali Schwarz, geb. Kunz
Kinder: Eduard Schwarz
Karina Schwarz

SCHULBILDUNG

1979 – 1985 Mittelschule, Karaganda
1985 – 1989 Mittelschule, Ust – Kamenogorsk (Kasachstan)
Abschluss: Abitur, Gesamtnote: gut (anerkannt:
Niedersächsisches Kultusministerium)

STUDIUM

1989 – 1993 Chemie, Chemiefakultät, (8 Semester)
Universität, Ust – Kamenogorsk (Kasachstan)
1995 – 2001 Studiengang Chemie (Diplom) am Fachbereich Chemie,
Universität Hannover, mit Schwerpunkt Technische Chemie;
Biotechnologie, Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie:
*Optimierung der biologischen Stufe bei der gekoppelten
chromatographischen – biologischen Nitratentfernung
aus flüssigen Lebensmitteln*
Jun. 2002 Diplom, Gesamtnote: gut
2002 – 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische
Chemie, Universität Hannover

Publikationen

Vorträge:

J. Schwarz, A. Maack, R. Ulber;

Production of sporopollenin from green algae (chlorella);

BioPerspectives – DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (2004)

Wiesbaden, Deutschland

R. Ulber, S. Lenzen, J. Schwarz, H. Schmidt, R. Steinhof;

Aufarbeitung nachwachsender Rohstoffe für die Lebensmittel- und

Pharmaindustrie - Downstream-Processing und Biotransformation;

BioPerspectives - DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (2004)

Wiesbaden, Deutschland

Posterpräsentationen:

J. Schwarz, T. Scheper, H. Buchholz, R. Ulber;

Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from whey;

BioPerspectives – DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (2005)

Wiesbaden, Deutschland

R. Steinhof, K. Plate, J. Schwarz, S. Beutel, H. Buchholz, W. Demmer, S. Fischer-Frühholz, O. Reif, T. Scheper, R. Ulber;

Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from whey: production and applications;

European Downstream Technology Forum, Sartorius College (2006)

Göttingen, Deutschland

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum von September 2002 bis Dezember 2005 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper, dem ich für die interessante Themenstellungen und uneingeschränkte Unterstützung danke.

Herrn Prof. Dr. Roland Ulber möchte ich für die optimale Arbeitsmöglichkeiten, für sehr gute Betreuung und für die Übernahme des Korreferates danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Sascha Beutel für die zahlreichen Anregungen und die gründlichste Korrektur dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei Dr. H. Buchholz, Dr. W. Demmer, Dr. M. Lotz, A. Evers und Dr. H.-J. Denzler für die hilfsbereite Arbeit sowie für sehr viel Molke bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Martina Weiß für ihre stete Hilfsbereitschaft hinsichtlich der HPLC- und FPLC-Analytik.

Ein riesiges Dankeschön an meine Mitdoktoranden Heiko Rackel und Rafael Steinhof für ihre uneigennützig Hilfe, für das gute Laborklima, anregenden Diskussionen und kurzweiligen Kaffeepausen.

Allen Kaiserslauterer und Hannoverschen Biotechnologen danke ich für die freundliche Aufnahme und für die gute Stimmung während und nach der Arbeit.

Ein ganz dickes Dankeschön an Dr. Patana Thavipoke für die großartige Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Besonderer Dank gilt auch allen denjenigen, die durch ihre wissenschaftlichen Untersuchungen im Rahmen von Schwerpunkt- und Diplomarbeiten zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben: Jan Aschenmann, Christian Benecke und Donaldo Jose' Alvarez-Cuadrado.

Meinen Eltern, meiner Frau und meinen Kindern danke ich dafür, das sie für mich da waren und mich in jeder Art und Weise während des Studiums vorbehaltlos unterstützt haben.

Abstract (D)

Schwarz, Johann

Die Erschließung bislang ungenutzter Rohstoffquellen zur Isolierung hochwertiger Komponenten, die als Nutraceuticals in verschiedenen Bereichen wie Pharmazie, Kosmetik oder Lebensmittelindustrie vermarktet werden können, gewinnt zunehmend an Bedeutung. Eine dieser Komponenten in Algen ist Sporopollenin.

Für die Gewinnung von Sporopollenin aus Algen werden, parallel zur Entwicklung eines enzymatischen Verfahrens, verschiedene Parameter des chemischen Verfahrens, der Acetolyse, untersucht. Zunächst werden Untersuchungen zur mechanischen Zerkleinerung der harten Zellwand der Algen vorgestellt. Für die Extraktion des Chlorophylls werden verschiedene organischen Lösemittel eingesetzt. Es werden weitere Optimierungen der oben genannten Verfahren zur Gewinnung von Sporopollenin vorgestellt, bevor das Produkt letztlich zur Schwermetallanreicherung eingesetzt wird. Die Charakterisierung des Produktes erfolgt mittels IR- und 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie.

Eines der ernährungsphysiologisch bedeutsamsten Proteine in Molke ist das Lactoferrin. Es werden zwei Verfahren zur Isolierung von Lactoferrin aus Molke vorgestellt. Die direkte Isolierung von Lactoferrin aus Molke im Durchlaufverfahren ist problematisch, sofern keine Vorbehandlung der Molke stattfindet. Deswegen wird die Molke vorab mikrofiltriert. Die Mikrofiltration erfolgt in einem Crossflow-Verfahren. Der Grad der Aufreinigung durch die Mikrofiltration wird durch Transmissionsmessungen von Permeaten und Molke bestimmt. Die Isolierung von Lactoferrin aus Molke im Rezirkulationsverfahren erfolgt mittels eines besonders konstruierten Membranadsorbers, wodurch der Mikrofiltrationsschritt eingespart wird. Für die Isolierung von Lactoferrin aus Molke werden stark saure Kationenaustauschermembranen eingesetzt. Der quantitative Lactoferrin Gehalt in Lösung wird mittels HPLC-Analytik bestimmt.

Die Biotransformation von Lactoferrin zu Lactoferricin erfolgt mittels Pepsinverdau. Die biologische Aktivität des Lactoferricins ist sehr hoch und im Gegensatz zum Lactoferrin unabhängig vom Eisengehalt der Umgebung. Für die Isolierung von Lactoferricin aus dem Peptidgemisch wird auch hier eine stark saure Kationenaustauschermembran verwendet. Zur Entsalzung der Lactoferricin-Fraktion wird zuerst auf ein säulenchromatographisches Verfahren nach dem Größenausschluss-Prinzip zurückgegriffen, bevor eine Methode zur Einsparung des Entsalzungsschrittes entwickelt wird. Die Reinheit des gewonnenen Lactoferricins wird mittels MALDI-MS bestimmt. Zuletzt werden Untersuchungen zur kontinuierlichen Herstellung des Zielproteins präsentiert.

Stichworte: Algen, Sporopollenin, Acetolyse, Molke, Lactoferrin, Crossflow-Mikrofiltration, Membranadsorber, Pepsinverdau, Lactoferricin

Abstract (E)

Schwarz, Johann

The screening for new raw material sources for the isolation of high-quality components gains increasingly meaning. These components can be commercialized as nutraceuticals in different areas like pharmaceutical, cosmetic or food industry.

One of these components is sporopollenin. Concurrent to the development of the enzymatical method for the production of sporopollenin from algae different parameters of the chemical method, the acetolyse, are tested. At first investigation to the mechanical milling of the hard cell wall of the algae are introduced. Different organic solvents are used for the chlorophyll extraction. Furthermore optimizations of the extraction methods of sporopollenin are introduced before the product finally is used for heavy metal depletion. The characterisation of the product is carried out by means of IR- and 2D-fluorescence spectroscopy.

Whey contains a variety of proteins and enzymes that make it an even more valuable raw material. One of the physiologically most interesting proteins in whey is lactoferrin. In this work two methods are presented for the isolation of lactoferrin from whey. The direct capture of lactoferrin from whey in the flow path method requires pretreatment of the whey. A crossflow microfiltration is necessary to prevent blocking of the membranes. The purity degree of whey permeate of the microfiltration is determined by transmission measurements.

The recovery of lactoferrin from whey in recirculation mode is carried out by means of a specially designed membrane adsorber, which has no need for a formed microfiltration step. For the isolation of lactoferrin from whey strongly acidic ion-exchange membrane adsorbers are used. The concentration of solved lactoferrin is determined by means of HPLC analysis.

All of the physiological properties of lactoferrin appear to be related to its highly basic N-terminal region. This part of the protein is called lactoferricin. In this work the enzymatic pepsin digestion of lactoferrin to lactoferricin is presented. Compared to lactoferrin, the biological activity of lactoferricin is very high and independent of the iron content of the solution. The isolation of lactoferricin is carried out with membrane adsorber technology. The use of various elution salts and buffer systems is discussed. The purity of the isolated lactoferricin is determined by means of MALDI-MS. Furthermore tests for a continuous production of the aim protein are presented.

Keywords: algae, sporopollenin, acetolyse, whey, lactoferrin, crossflow-microfiltration, membrane adsorber, pepsin digestion, lactoferricin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Algen als Rohstofflieferant	1
1.2	Molkenaufarbeitung	3
1.3	Biotransformation von Lactoferrin.....	6
2	Chlorella-Algen	7
2.1	Allgemeines	7
2.2	Sporopollenin.....	8
3	Gewinnung von Sporopollenin	10
3.1	Zellaufschluss-/Zellwandzerkleinerung	10
3.2	Extraktion.....	14
3.3	Acetolyse.....	16
3.3.1	Optimierung des Acetolyseverfahrens	16
3.4	Enzymatische Hydrolyse	25
3.5	Schwermetallanreicherung	30
3.6	Gesamtprozess: von Alge zum Sporopollenin.....	32
4	Molke	36
4.1	Molkenproteine	37
4.1.1	Lactoferrin	39
4.1.2	Lactoferricin	41
4.1.3	Lactoperoxidase	43
5	Membranfiltration	45
5.1	Filtrationsverfahren	45
5.2	Arten der Prozessführung.....	48
5.3	Membranfouling und Reinigung.....	50
5.4	Membranen mit aktivierten Oberflächen.....	52

6 Molkenaufarbeitung	54
6.1 Crossflow-Mikrofiltration	55
6.1.1 Reinigung	58
6.2 Haltbarkeit von Molkenpermeat	60
7 Isolierung von Lactoferrin	63
7.1 Bindekapazität	64
7.2 Untersuchungen zur Langzeitstabilität	66
7.2.1 Messung mit Lactoferrinlösung	66
7.2.2 Messung mit Molkenpermeat	69
8 Isolierung von Lactoferrin im technischen Maßstab	72
8.1 Optimierung des Prozesses zur Isolierung von Lactoferrin	73
8.1.1 Reinigung der Membran	79
8.2 Ultra-/Diafiltration	81
9 Isolierung von Lactoferrin aus Molke im Rezirkulationsverfahren	83
9.1 Verwendung von Recuperator 72	84
9.2 Verwendung von Recuperator 68	90
9.3 Reinigung der Module	94
10 Isolierung von Lactoferrin aus Molkenkonzentrat im Rezirkulationsverfahren	97
10.1 Verwendung von Recuperator 73	97
11 Lactoperoxidase-Assay	100
12 Herstellung und Isolierung von Lactoferricin	104
12.1 Bestimmung des optimalen pH-Wertes der Reaktionslösung	105
12.1.1 Enzymkinetik	109
12.2 Abtrennung des Pepsins vom Lactoferricin	113

12.2.1	Reinigung der Sartoccon-Micro Filtrationseinheit	115
12.3	Isolierung von Lactoferricin aus dem Hydrolysat mittels Kationenaustauscher-Membran	117
12.4	Entsalzung der Lactoferricin-Fraktion	121
12.5	Kontinuierliche Gewinnung von Lactoferricin.....	124
12.6	Gesamtprozess: von Molke zum Lactoferricin	129
13	Zusammenfassung und Ausblick	136
14	Anhang.....	143
14.1	Acetolyse	143
14.2	IR-Spektren.....	152
14.3	2D-Fluoreszenzspektroskop	156
14.4	Messprinzip (ICP-OES)	157
14.5	Untersuchungen zur Bindekapazität und Langzeitstabilität	157
14.6	Berechnung des Konzentrierungsfaktors.....	158
14.7	Mahltechnik.....	159
14.8	HPLC-Analytik	159
14.8.1	Durchbruchskurve für Lactoferrin.....	161
14.9	FPLC-Analytik.....	161
14.10	Gelelektrophorese	163
14.11	MALDI-MS	164
14.12	Ammonium-Test	165
14.13	Verweilzeit- und Umsatzverhalten.....	166
14.14	Kontinuierliche Gewinnung von Lactoferricin	168
14.15	Abkürzungsverzeichnis	168
15	Literaturverzeichnis	170

1 Einleitung und Zielsetzung

Der Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen gewinnt in der chemischen Industrie zunehmend an Bedeutung. Ungefähr 30 Mio. Tonnen an Grund- und Feinchemikalien werden zur Zeit mittels biotechnologischer Prozesse hergestellt. Diese sind ungefähr 5 % der Produkte der chemischen Industrie. Die Prognose lautet, dass bis zum Jahr 2010 rund 20 % der Umsätze der gesamten Chemieindustrie auf die Nutzung weißer Biotechnologie zurückzuführen sein werden [1]. Im Fokus der Weißen Biotechnologie steht die Herstellung von Produkten mit biotechnischen Verfahren im industriellen Maßstab. Was schon vor hundert Jahren mit Amylasen, Proteasen und Lipasen in Bäckereien, Gerbereien und Brauereien begann, ist heute die Weiße Biotechnologie – ein wichtiges Potenzial der Life-Science-Branche. Millionen Menschen haben täglich Kontakt mit Produkten, in denen Weiße Biotechnologie steckt. Aktuelle Anwendungsbeispiele sind das Bleichen von Jeansstoffen mit Enzymen, LopopanTM als Ersatz von Emulgatoren in Weizengebäck und Hyaluronsäure als Wasserbinder in der Medizin. Basierend auf optimierten Biotransformationen und Aufarbeitsverfahren kann eine Vielzahl interessanter Produkte für pharmazeutische Anwendungen oder funktionalisierte Lebensmittel aus nachwachsenden Rohstoffen bzw. landwirtschaftlichen Reststoffen wie z.B. Algen und Molke hergestellt oder isoliert werden.

1.1 Algen als Rohstofflieferant

Der sprachliche Ausdruck „Alge“ ist ein überlieferter naiver Ausdruck, der sich mit der naturgegebenen Ordnungskategorie in Sinne von Systematik und Klassifikation nicht in Übereinstimmung bringen lässt. Oft versteht man unter dem Begriff Algen zusammengefasste Abteilungen und Stämme, die keine verwandtschaftlichen Beziehungen mehr aufweisen. Fossile Spuren dieser Lebensformen lassen sich bis in das Präkambrium zurückverfolgen und werden auf 2,5 Milliarden Jahre datiert. Mit ihrer Photosyntheseleistung trugen sie wesentlich dazu bei, den

CO₂-Gehalt der Uratmosphäre zu verringern und somit die Basis für die weitere Entfaltung des Lebens auf der Erde zu schaffen [2 – 4].

Die Verwendung von Algen als Nahrungs- und Heilmittel ist bereits Jahrtausende alt. Medizinische Anwendungen von Algen sind insbesondere in Asien weit verbreitet (z.B. als Verdauungshilfe). Darüber hinaus wird in Japan eine besondere Algenart (*Tolypothrix*) als Stickstoffbinder gezüchtet und dem Wasser für die Reisfelder zur Ertragssteigerung beigegeben [5].

Neben den Anwendungen der gesamten Algen, gibt es bereits eine Vielzahl von Verbindungen, die aus oder mit Hilfe von Mikro- und Makroalgen gewonnen werden. Zum Beispiel werden aus Mikro- und Makroalgen Proteine, Polysaccharide, Antioxidantien (z.B. β -Carotin), Verdickungsmittel, Stabilisatoren (z.B. Alginsäure, Calciumalginat, Carragen), Farbstoffe (z.B. Erythrosin, Tartrazin, Phycocyanin) und Futtermittelzusätze (z.B. Astaxanthin) isoliert [7].

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich unter anderem mit der Gewinnung von Sporopollenin aus *Chlorella*-Algen. Hierzu wurden innovative Gewinnungs- und Aufarbeitungsstrategien in Kooperation mit der RTC GmbH, Nordsehl, Deutschland, entwickelt.

Sporopollenin ist ein Ballaststoff mit besonderer Wirkung bei der Entgiftung schädlicher Umweltstoffe aus dem menschlichen Organismus. Die Alge nimmt mit Hilfe von Sporopollenin größere Mengen Schwermetall und Pestizide über die Zellwand auf, die über die Leber in den Darm gelangt sind [8]. Eine der Hauptanwendungen des zu isolierenden Sporopollenins ist jedoch der Kosmetiksektor (Antiaging und Antiwrinkle).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen Verfahren zur Gewinnung von Sporopollenin im Labormaßstab entwickelt werden. Die Arbeiten zur Isolierung von Sporopollenin aus Algen gliedern sich somit in folgende Teilbereiche:

- Zellaufschluss/Zellwandzerkleinerung

Die harte Zellwand der Algen erschwert die Chlorophyllextraktion und die Gewinnung von Sporopollenin. Aus diesem Grund müssen verschiedene Zellaufschlussmethoden getestet und optimiert werden.

- **Abtrennung des Chlorophylls/Extraktion**
Der hohe Gehalt von Chlorophyll in den Algen erschwert die Herstellung von Sporopollenin. Aus diesem Grund müssen entsprechende Abtrennungsstrategien entwickelt werden. Für die Extraktion des Chlorophylls sollen organischen Lösemittel (DMSO, Isopropanol, Ethanol und Aceton) eingesetzt werden.
- **Optimierung des Acetolyseverfahrens**
Das bisher in der Literatur beschriebene Acetolyseverfahren ist in keiner Hinsicht optimiert worden. Es sollen daher verschiedene Parameter (Temperatur, Reaktionszeit, Massenverhältnisse) untersucht und optimiert werden.
- **Test eines enzymatischen Verfahrens**
In diesem Arbeitspaket sollen verschiedene technische Enzyme und Enzymgemische getestet werden. Aufgrund der Inhaltsstoffe der Algen ist der Einsatz von diversen Lipasen und Proteasen vorgesehen. Für eine optimale Prozessführung ist es notwendig zu untersuchen, in welcher Reihenfolge die Enzyme zugegeben werden können. Ebenfalls wichtige sind Untersuchungen in Hinblick auf den Einsatz von Exo- und Endoproteasen.

Zusätzlich zu diesen Arbeiten soll der Einsatz von Sporopollenin zur Schwermetallabreicherung und das Schwermetallabreicherungsverhalten der acetylierten Algen untersucht werden. Hier steht insbesondere die Abreicherung von giftigen Verbindungen (Arsen(v)oxid-Hydrat, Cadmiumnitrat-Tetrahydrat, Bleiacetat-Trihydrat) im Mittelpunkt des Interesses.

1.2 Molkenaufarbeitung

In den landwirtschaftlichen Reststoffen wie Melasse, Kartoffelfruchtwasser und Molke findet sich eine Vielzahl von bioaktiven Proteinen und Verbindungen, deren Aufarbeitung und Biotransformation die Wertschöpfung aus den entsprechenden Rohstoffen Zuckerrübe, Kartoffel und Milch stark ansteigen lässt. Sie bilden eine

kostengünstige Grundlage für neue hochwertige Produkte, beispielsweise in der Pharmazie, in der Lebensmittelindustrie und in der Kosmetik.

Die Jahre, in denen die Molke als Abfallprodukt des Käseherstellungsprozesses betrachtet und ungenutzt entsorgt wurde oder als Tierfutter an die Bauern ging, sind vorbei. Aufgrund zunehmender Käseproduktion und damit steigenden Entsorgungskosten wurde nach Möglichkeiten zur Verwendung der Molke gesucht. Im Jahr 2004 lag der Molkeanfall in Deutschland mit 11,2 Mio. Tonnen um 3 % höher als im Vorjahr. Hiervon wurden rund 6 Mio. Tonnen für Nahrungszwecke verwendet. Neben der Gewinnung von Laktose ist die Isolierung der bioaktiven Molkeproteine aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften von großem Interesse. Neue Märkte können nur durch die Isolierung einzelner Proteine erschlossen werden. Dazu zählen vor allem die Herstellung von Nahrungsmitteln, pharmazeutischen Präparaten und Nutraceuticals (Functional Food). Als Functional Ingredients bezeichnet man die biologisch aktiven Inhaltsstoffe, die in Functional Food vorkommen und physiologisch wirksam sind.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich unter anderem mit der Gewinnung und Biotransformation eines dieser bioaktiven Proteine aus Molke, dem verschiedene gesundheitsfördernde Wirkungen bei der Verdauung zugeschrieben werden: Lactoferrin. Es gehört zur Gruppe der Transferrine und ist in der Lage zwei Eisenatome zu binden. Die Bindungsaffinität ist im Vergleich zum Transferrin etwa 300 mal höher. Diese Eigenschaft verleiht dem Lactoferrin eine antimikrobielle Wirkung, da durch Entzug des für Mikroorganismen lebenswichtigen Eisens das Wachstum direkt gehemmt wird. Neben diesen Funktionen wirkt Lactoferrin anticancerogen, greift in das Immunsystem ein und steht als potentiell HIV-Präventionsmittel in der Diskussion. Die Isolierung von Lactoferrin basierend auf Säulenchromatographie ist in Japan und USA bereits ein großtechnischer Standard. Neben dem Einsatz dieser Säulen werden auch Membranverfahren angewendet. Die Verwendung von Membranen ermöglicht

- hohe Flüsse, da die Adsorption nicht diffusionslimitiert abläuft,
- geringe Produktionskosten,
- eine einfache Handhabung und ein einfaches Scale up.

Dabei macht man sich die Eigenschaft des Lactoferrins zu nutze, das es durch seinen hohen isoelektrischen Punkt von 8-9 in der Molke kationisch vorliegt. Dadurch lässt es sich von den anderen Molkenbestandteilen abtrennen, weil alle anderen Bestandteile bis auf Lactoperoxidase in Molke ungeladen oder anionisch vorliegen.

In einer bereits abgeschlossenen Dissertation wurde die Isolierung von Lactoferrin und Lactoperoxidase als Nebenprodukt aus Molke mittels eines Membranadsorbersystems durchgeführt [9]. Um den Membranadsorber vor Verblockung zu schützen, wurde eine Crossflow-Mikrofiltration zur Vorklärung der Molke vorgeschaltet. Dabei wurde ein dreistufiger Prozess entwickelt:

- 1 Crossflow-Mikrofiltration der Molke
- 2 Isolierung von Lactoferrin mittels eines Membranadsorbers
- 3 Gewinnung von Lactoferrin aus den Eluaten (Ultrafiltration/Trocknung)

Die vorliegende Dissertation baut auf diesen Ergebnissen auf. Einer der Ziele dieser Arbeit ist eine Optimierung der einzelnen Prozessstufen. Unter anderem soll der Einfluss der Temperatur auf die Langzeitstabilität von Membranen untersucht werden. Hintergrund dieser Untersuchungen ist, dass sich das Molkenpermeat durch die Mikrofiltration auf 50°C erhitzt. Um diesen Prozess jedoch kontinuierlich ablaufen zu lassen, ist es notwendig, das mikrofiltrierte Molkenpermeat sofort auf ein Membranadsorber zu geben, ohne das es vorher abgekühlt werden muss. Eine Kühlung des Molkenpermeates würde im industriellen Maßstab sehr hohe Kosten verursachen. Die Arbeiten zur Isolierung von Lactoferrin aus Molke lassen sich somit in folgende Teilbereiche gliedern:

- Optimierung der Crossflow-Mikrofiltration von Molke
- Untersuchungen zur Langzeitstabilität der Austauschermembran bei 50°C
- Optimierung des Prozesses zur Isolierung von Lactoferrin mittels eines Membranadsorbers
- Isolierung von Lactoferrin mittels einer neuartigen Bauform des Membranadsorbers im Rezirkulationsverfahren

- Bestimmung der enzymatischen Aktivität der als Nebenprodukt isolierten Lactoperoxidase

1.3 Biotransformation von Lactoferrin

Das isolierte Lactoferrin wird zu einer weitaus antimikrobiell wirksameren Molekülsequenz, dem Lactoferricin, biotransformiert. Unter Biotransformation wird meist die Umwandlung von Stoffen in Produkte mit wertvolleren Eigenschaften verstanden. Biotransformationen können durch Mikroorganismen oder Enzyme erfolgen. Für die Biotransformation des Lactoferrins zu Lactoferricin wird Pepsin als Biokatalysator eingesetzt. Entsprechend dem notwendigen systematischen Vorgehen beim Aufbau eines Biotransformationsverfahrens ist die Arbeit wie folgt in verschiedene Bereiche gegliedert:

- Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur
- Bestimmung des optimalen pH-Wertes der Reaktionslösung
- Untersuchungen zur Beständigkeit des Lactoferrins im saueren Milieu
- Abtrennung des Enzyms aus der Reaktionslösung mittels Crossflow-Filtration
- Entwicklung einer optimalen Reinigungsmethode für das Filtrationsmodul
- Isolierung des Lactoferricins aus dem Hydrolysat mittels Kationenaustauscher-Membran
- Optimierung der Entsalzung der Lactoferricin-Fraktion
- Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens zur Herstellung von Lactoferricin
- Produktkontrolle mit MALDI-Massenspektrometrie und HPLC

2 *Chlorella*-Algen

2.1 Allgemeines

Die *Chlorella*-Algen, aus der im Rahmen dieser Arbeit Sporopollenin gewonnen werden soll, wurden 1890 von dem holländischen Mikrobiologen M. W. Beijerinck entdeckt [10]. Die Bezeichnung *Chlorella* leitet sich von dem griechischen Wort „*chloros*“, grün und dem lateinischen „*ella*“ was klein bedeutet, ab. Fast alle natürlichen Vorkommen dieser Algen sind jedoch durch Umwelteinflüsse für technische oder gar pharmazeutische Applikationen zu verschmutzt. Man begann daher sie in Zuchtbecken zu kultivieren. Versuche zur industriellen Nutzung scheitern aber immer wieder an den mit der Kultivierung verbundenen hohen Kosten. Eine Ausnahme bilden einige asiatische Länder wie Japan oder Taiwan, die auf Grund der günstigen klimatischen Bedingungen, verbunden mit der traditionellen Akzeptanz von Algenprodukten durch die einheimischen Bevölkerung, *Chlorella*-Algen in großem Umfang (ca. 500 Mio. US \$ pro Jahr) in diversen Freilandanlagen kultivieren. Bis Mitte 2000 stammten auch alle in Deutschland erhältlichen *Chlorella*-Produkte aus dieser Region. Hinsichtlich einer industriellen Nutzung hat sich *Chlorella vulgaris* als besonders geeignet erwiesen. *Chlorella vulgaris*, bis vor wenigen Jahren unter anderem auch unter dem nicht mehr existenten Taxon *Chlorella pyrenoidosa* geführt, wächst sowohl unter phototrophen als auch mixotrophen Bedingungen bei Einhaltung von für diese Alge günstigen Kultivierungsbedingungen äußerst rasch. Dadurch lässt sich ein Befall der Kultur mit parasitären oder konkurrierenden, potentiell schädlichen Fremdorganismen gut beherrschen [11 – 13].

Chlorella wird in der Therapie maligner Tumore eingesetzt. Antitumorale Effekte sind vorrangig unter dem Aspekt der Stimulation körpereigener Abwehrkräfte zu erwarten. In neueren Untersuchungen gelang es aber auch, Substanzen wie z.B. diverse Sterole und Glucero glycolipide aus *Chlorella* zu isolieren und deren inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Tumoren nachzuweisen [14 – 16].

Diese außergewöhnliche Mikroalge ist auch ein natürlicher Helfer bei der Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen. In einer Reihe von empirischen

Untersuchungen wurde der Nachweis erbracht, dass durch *Chlorella*-Anwendungen Blutdruck, Cholesterinstoffwechsel und Arteriosklerose im positiven Sinne beeinflusst werden können. Als Ursache für diese Effekte ist neben den ernährungsphysiologischen Eigenschaften die Wirkung diverser ungesättigter Fettsäuren und des Chlorophylls (Chlorophyllgehalt: 2 – 3%) verantwortlich [17 – 18]. Die mehrschichtige Zellwand der *Chlorella*-Alge besitzt stark adsorbierende Eigenschaften gegenüber Xenobiotika, so dass ein grundlegendes Potential zur Aufnahme sowohl affiner organischer Schadstoffe als auch diverser Schwermetalle vorliegt. In der Umwelttechnik wurde das Adsorptionsverhalten der *Chlorella* intensiv untersucht. Die hohe Affinität dieser Mikroalge zu toxischen Metallen wie z. B. Quecksilber, Blei, Cadmium und Arsen ist gut belegt [19 – 24]. Am Beispiel des Cadmiums konnten die entgiftenden Eigenschaften der *Chlorella* eindrucksvoll nachgewiesen werden. HAGINO et al. berichten über eine 3- bis 7-fache Beschleunigung sowohl fäkalen als auch der renalen Cadmiumausscheidung durch Mikroalge bei der Behandlung der Itai-Itai-Krankheit [25].

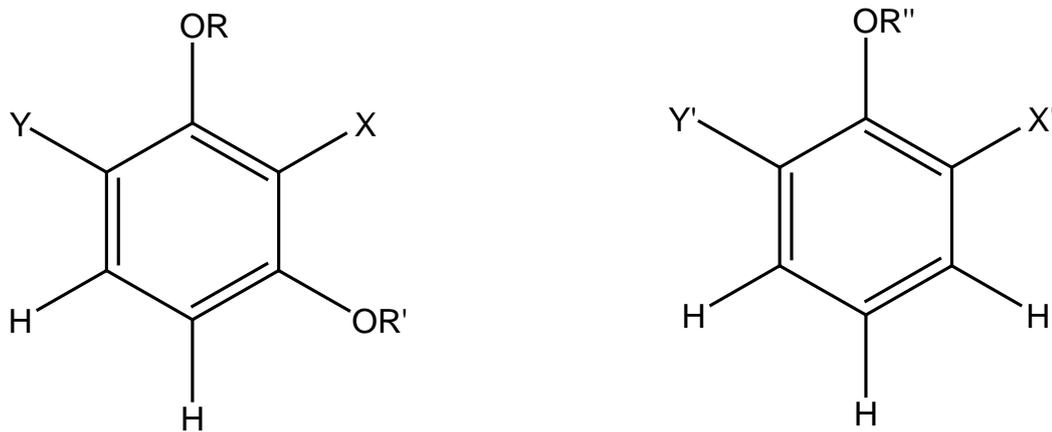
Diese Eigenschaften, wie die Aufnahme von Schwermetallen, sind dem Sporopollenin, dessen Gewinnung einer der Hauptziele diese Arbeit ist, zu verdanken. Wie sich das Sporopollenin auf den Schwermetallanreicherungsverhalten auswirkt, zeigen die Ergebnisse aus den in Kapitel 3.5 durchgeführten Anreicherungsversuchen.

2.2 Sporopollenin

Sporopollenin ist ein Biopolymer, aus welchem der größte Teil der äusseren Schicht der Pollenzellwand (Exine) aufgebaut ist. Die Exine weisen eine fast unüberschaubare Vielfalt an Formen und Strukturen auf. Sie gehört zu den komplexesten Zellwandsystemen im Lebenszyklus einer Pflanze. Ursprünglich wurde Sporopollenin aus Blüten gewonnen und hat daher auch seinen Namen erhalten. Nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnisse handelt es sich bei Sporopollenin um ein Makromolekül, das aus langkettigen aliphatischen Verbindungen und aromatischen Komponenten in wechselnden Anteilen aufgebaut ist, die über Etherbrücken miteinander verbunden sind. Die drei-

schichtige Zellwand der in dieser Arbeit benutzten *Chlorella*-Alge enthält ebenfalls hohe Konzentrationen an Sporopollenin (3 – 8 Gew.%). Sporopollenin ist ein Ballaststoff mit besonderer Wirkung bei der Entgiftung schädlicher Umweltstoffe aus dem menschlichen Organismus [25].

In der Literatur ist eine Vielzahl von Veröffentlichungen zum Thema Sporopollenin erschienen; dabei handelt es sich um Strukturaufklärung und Solubilisierung von Sporopollenin aus Pollen [26 – 36]. In diesen Artikeln wird die Möglichkeit einer Solubilisierung von Sporopollenin in 2-Aminoethanol beschrieben wodurch eine bessere Strukturaufklärung mit Hilfe der FTIR-, NMR-, UV/Vis-Spektroskopie möglich wird. So wurden dann bei den ersten $^1\text{H-NMR}$ Untersuchungen zwei Phenol-Formen im Sporopollenin gefunden [28].



R, R', R'' = H oder Alkyl

X, X', Y, Y' = Alkyl, Carbonyl, Ester oder Säure

Abbildung 2.01: $^1\text{H-NMR}$ Analyse von Sporopollenin aus Pollen (*Thypha angustifolia*)
gelöst in $\text{NH}_2\text{CD}_2\text{CD}_2\text{OH}(98\%)\text{-D}_2\text{O}$ (2:5) [28]

3 Gewinnung von Sporopollenin

In der Literatur werden zwei Methoden beschrieben, um die Zellen aufzuschließen und das Sporopollenin aus den Zellwänden zu gewinnen.

Die erste Methode ist die Acetolyse, welche eine Standardmethode zur Aufbereitung von fossilen und rezenten Pollenkörnern zur mikroskopischen Untersuchung ist [37]. Die zweite für Pollen beschriebene Methode ist die enzymatische Hydrolyse [29], die in dieser Arbeit auf *Chlorella*-Algen übertragen werden soll. Es steht aber zu erwarten, dass aufgrund der deutlich anderen Zellstruktur das Verfahren nicht problemlos auf Algen übertragen werden kann. Vorversuche mit Algen haben bereits gezeigt, dass die harte Zellwand der Algen die Gewinnung des Produktes und die Chlorophyllextraktion erschwert. Aus diesem Grund müssen verschiedene Zellaufschlussmethoden getestet und optimiert werden.

3.1 Zellaufschluss-/Zellwandzerkleinerung

Zunächst wurden in Vorversuchen verschiedene Methoden, die in der Literatur für die Zellaufschlüsse beschrieben werden, auf ihre Eignung getestet. Die Zellaufschlüsse bzw. Zerkleinerungen wurden mit den im Institut für Technische Chemie vorhandenen Geräten durchgeführt; bei den Geräten handelt es sich um einen Ultraturrax (Janke & Kunkel GmbH, Staufen), eine Ultraschallsonde (B. Braun AG, Melsungen) sowie um eine Schwingmühle (Retsch GmbH, Haan).



Abbildung 3.01: Schwingmühle (Mahltechnik: s. Anhang 14.7) [97]

Ebenso wurde das Einfrieren und Auftauen der Algen als weitere Zellaufschlussmethode getestet. Nach jedem Versuch wurden mikroskopische Aufnahmen (Olympus, Cover 018) der Zellen gemacht, um den Grad des Zellaufschlusses bestimmen zu können. Anschließend wurde die Extraktion des Chlorophylls durchgeführt [26, 27]. Es wurde exemplarisch mit der Algensorte OPZ (ÖPA GmbH, Klötze) gearbeitet. Diese wurde in gefriergetrockneter Form geliefert. Die Algen wurden in verschiedenen Kombinationen der Zellwandzerkleinerung unterzogen. In Abbildung 3.02 ist der Versuchsverlauf zusammengefasst.

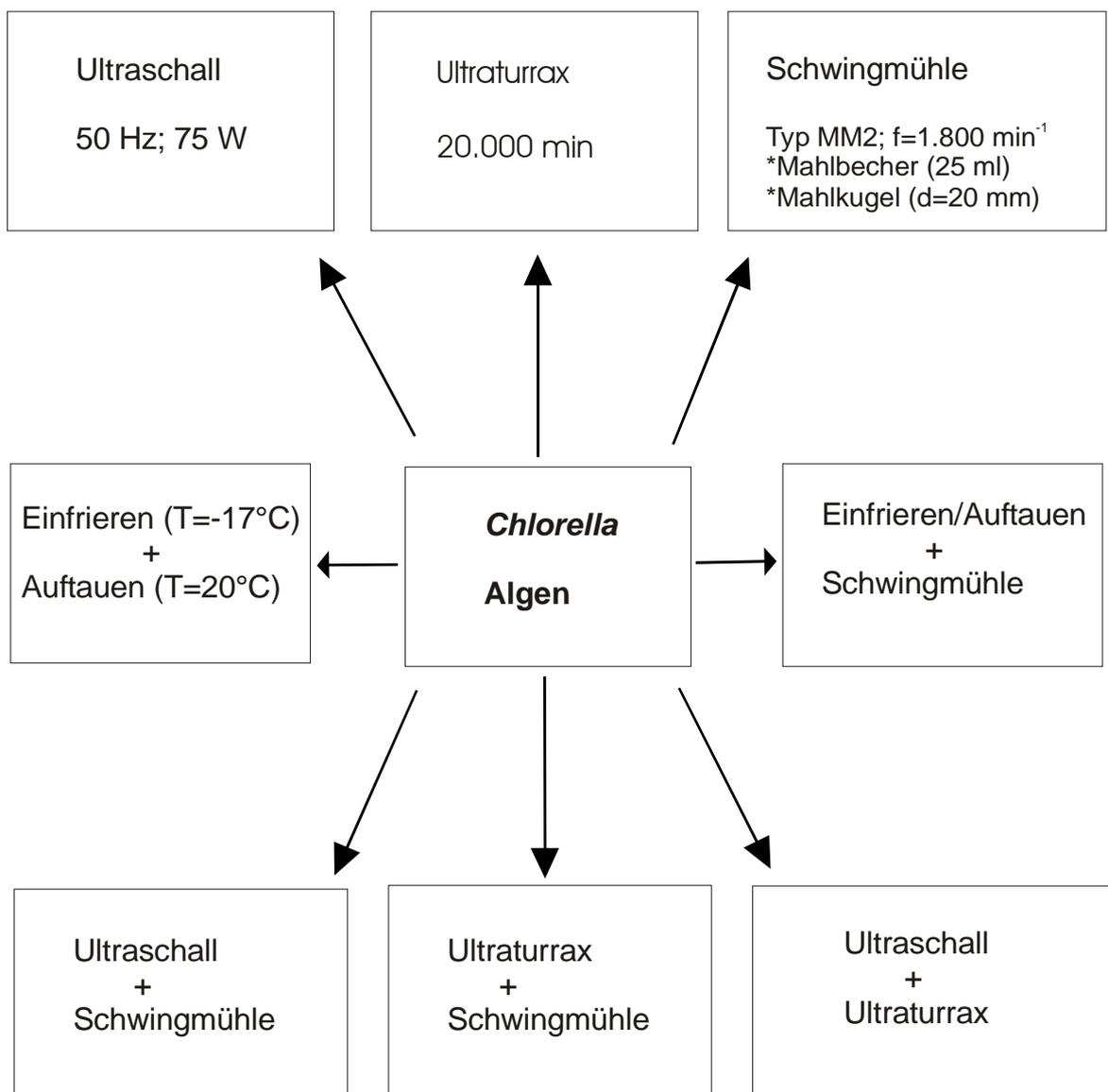


Abbildung 3.02: Aufschluss-Methoden; f = Schwingungsfrequenz (min^{-1}); * = Material – Stahl
d = Durchmesser (mm)

Diese Versuche zeigten, dass die Algenzellen sehr robust sind und sich auch mit kombinierten Verfahren nur sehr schwer aufschließen lassen. Auch die lichtmikroskopische Untersuchung lieferte nur beschränkte Aussagen darüber, welche Methode des Zellaufschlusses am effektivsten ist.

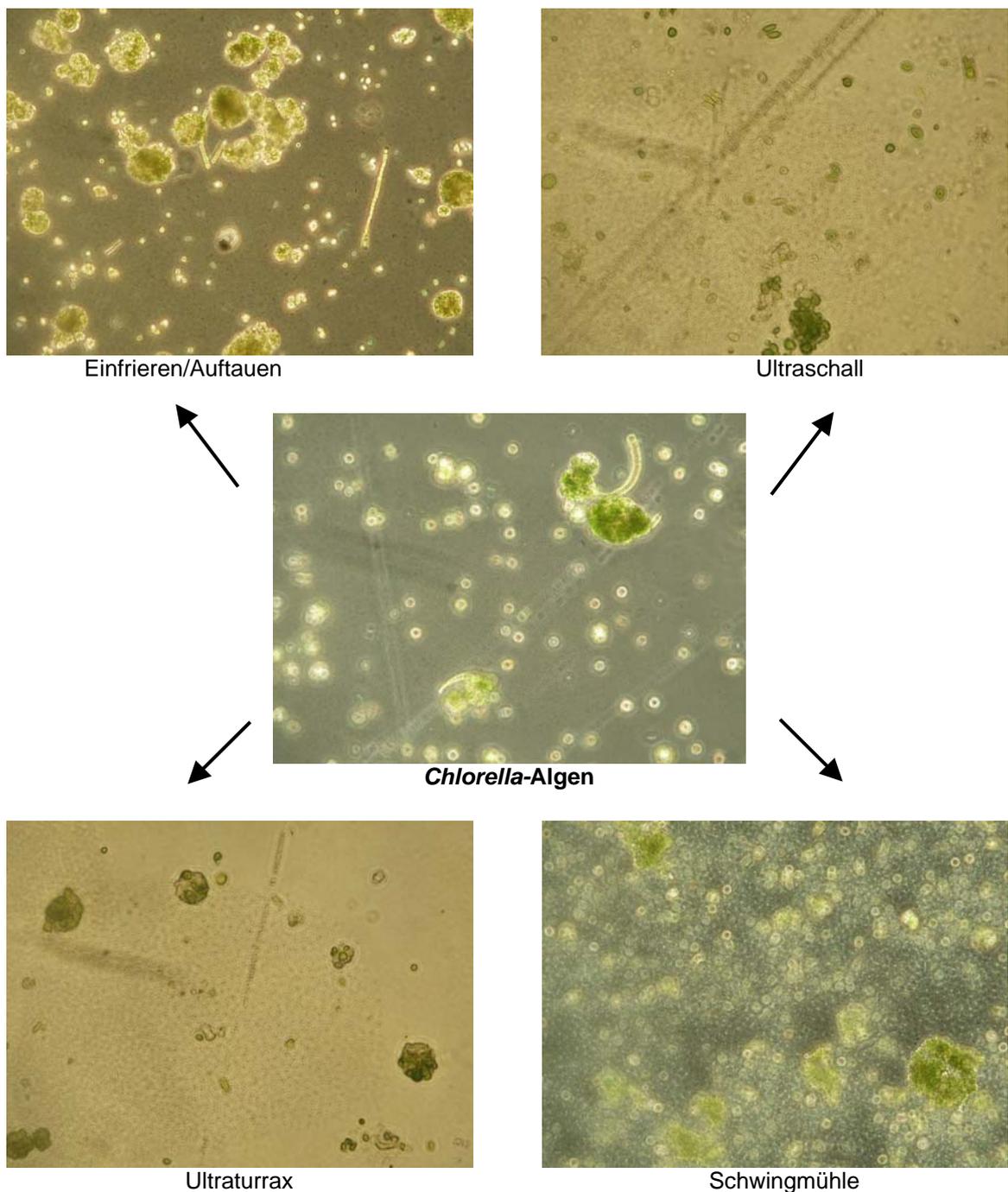


Abbildung 3.03: Mikroskopische Aufnahmen der Zellen vor und nach dem Zellaufschluss (400fache Vergrößerung)

Im Sinne eines effizienten Up-Scalings des Prozesses und auch in Hinblick auf die Kosten der Verfahren, sind Kombinationen mehrerer Verfahren sicherlich weniger sinnvoll, da sie keinen entscheidenden Vorteil gegenüber einem einstufigen Verfahren haben. Die jeweiligen Parameter der einzelnen Versuche finden sich im Anhang 14.1.

Um bessere Aussagen über die Effizienz des Zellaufschlusses zu treffen, wurde eine indirekte Methode eingesetzt. Hierzu wurde das in den aufgeschlossenen Algen enthaltene Chlorophyll mittels eines organischen Lösemittels (DMSO) extrahiert. Als Maß für den Grad des Zellaufschlusses wurde die Menge an DMSO herangezogen, die benötigt wird, um das Chlorophyll nahezu vollständig zu extrahieren. Je kleiner das benötigte Volumen, umso effizienter war der vorherige Zellaufschluss. Die Extraktion von jeweils 0,2 g Algen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. In der Tabelle 3.1 sind die Gesamtmengen an verbrauchtem DMSO dargestellt.

Tabelle 3.1: Lösemittelverbrauch; Bestimmung der Effizienz des Zellaufschlusses

Zellaufschluss-/Zellwandzerkleinerungs- methoden	V _{DMSO} [ml/0,2 g Algen]
Ultraschall	1.200
Ultraturrax	1.000
Schwingmühle	240
Einfrieren/Auftauen	1.200

Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass für die mit der Schwingmühle (Retsch GmbH, Haan) zerkleinerten Algen ca. 6mal weniger Lösemittel verbraucht wird, als für die anders behandelten Algen. Daraus folgt, dass sich die harte Zellwand der Algen nur mechanisch aufschließen lässt. Die minimale anzusetzende Zerkleinerungszeit in der Schwingmühle bei einer Schwingungsfrequenz von 1.800 min⁻¹ betrug 4 h. Alle nachfolgenden Extraktionsversuche wurden mit den in der Schwingmühle zerkleinerten Algen durchgeführt.

3.2 Extraktion

Im Verlauf der Arbeiten wurde festgestellt, dass die Produktausbeute und damit eng verbunden die Produktqualität von dem Chlorophyllanteil abhängt. Für ein hochwertiges Produkt wäre es wünschenswert, dass Chlorophyll vor der Acetolyse nahezu vollständig abzutrennen. Aus diesem Grund müssen entsprechende Abtrennungsstrategien entwickelt werden.

Bei den eingesetzten organischen Lösemittel handelte es sich um Aceton, Isopropanol, Ethanol und DMSO. Die Extraktionen mit Aceton, Isopropanol und Ethanol wurden nur bei Raumtemperatur (20°C) durchgeführt. Um 1 g Algen zu extrahieren, wurden unabhängig von der Art des Lösemittels jeweils 1.200 ml an Lösemittel verbraucht. Der Nachweis des extrahierten Chlorophylls erfolgte photometrisch (s. Abbildung 3.04). Die Chlorophyllextraktion mit DMSO (Siedepunkt: 189°C) wurde bei 20°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C und 80°C durchgeführt. Zur Extraktion wurde 1 g Algen mit 100 ml DMSO versetzt und in einem Wasserbad bei den jeweiligen Temperaturen 1 h lang extrahiert. Der Feststoff wurde abzentrifugiert und erneut zur Extraktion eingesetzt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die Algen chlorophyllfrei waren. Die erhaltenen Filtrate (Extraktionslösungen) wurden auf Chlorophyllrückstände mittels eines Photometers (Uvikon 922 Fa. Kontron) untersucht. Die Bestimmung der absoluten Chlorophyllkonzentration in den Algen wurde an dieser Stelle nicht als sinnvoll erachtet, da es sich allein um die Abtrennung von Chlorophyll handelt. *Chlorella* enthält 2 – 3% Chlorophyll, das ist die höchste bei einer Pflanze bekannte Chlorophyllkonzentration (s. Kapitel 2.1). Es sei aber angemerkt, dass das auf diese Weise extrahierte Chlorophyll ein interessantes Koppelprodukt des Prozesses darstellen kann. Abbildung 3.04 stellt die Bestimmungsverläufe im Vergleich dar.

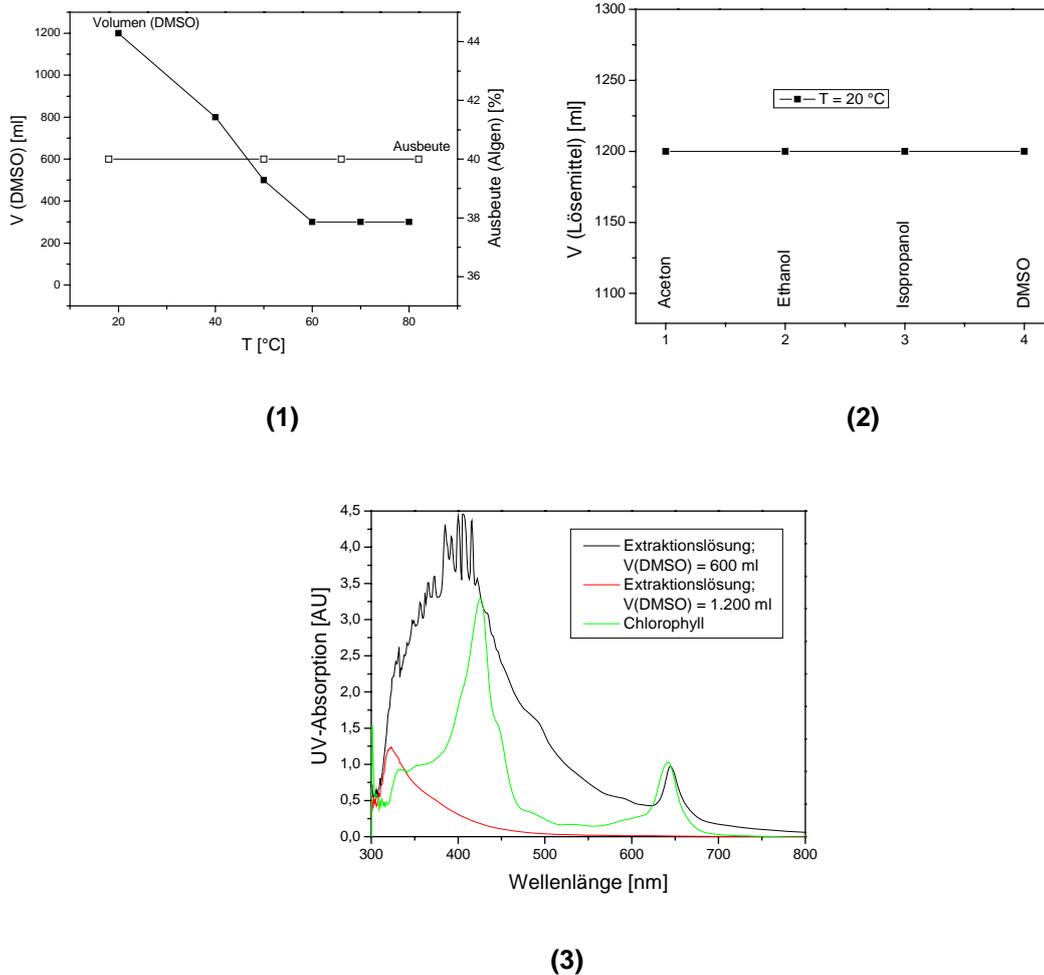


Abbildung 3.04: **(1)** Verbrauch von DMSO und erzielte Ausbeuten an chlorophyllfreien Algen bei verschiedenen Extraktionstemperaturen; **(2)** Chlorophyllextraktion mit verschiedenen Lösemitteln bei 20°C; **(3)** Typisches Spektrum von der Extraktionslösung (DMSO; T = 20°C) und Chlorophyll

Die erhaltenen Produkte wurden an der Luft getrocknet. Dabei wurde festgestellt, dass die Temperaturerhöhung zur Minimierung des Lösemittelverbrauches und zu kleineren Ausbeuten an Restmasse der Algen führt, was auf eine effizientere Extraktion hinweist. Ab der Extraktionstemperatur von 60°C wurde aber keine Minimierung des Lösemittelverbrauches mehr beobachtet. Die Ausbeute an chlorophyllfreien Algen blieb ab dieser Extraktionstemperatur konstant und betrug 40 %. Insgesamt wurden für die Extraktion von 1 g Algen bei 60°C 300 ml DMSO verbraucht. Im Vergleich zur Extraktion mit den anderen Lösemitteln ist dieser Verbrauch bis zu 30 % geringer. Die hohe Temperatur des Lösemittels wirkte sich

positiv auf die Extraktionszeit aus. Je höher die Extraktionstemperatur ist, desto schneller verläuft der Abtrennungsprozess. Die folgende Tabelle 3.2 macht den Zeitverlust bzw. Zeitgewinn deutlich.

Tabelle 3.2: Zeitbilanz für den Extraktionsprozess

V (DMSO) [ml]	Extraktionstemperatur [°C]	Extraktionszeit [h]
1.200	20	12
800	40	8
500	50	5
300	60	3

Die Extraktion von Algen bei 20°C dauert 12 h. Für die Chlorophyllextraktion bei 60°C sind nur noch 3 h notwendig. Die durchgeführte Chlorophyll – Extraktions-optimierung zeigt, dass sich die zerkleinerten Algen am effektivsten mit DMSO bei 60°C extrahieren lassen. Das Extraktionsprodukt wurde zur Gewinnung von Sporopollenin eingesetzt. Die Ergebnisse des Gewinnungsprozesses sind im Kapitel 3.3.1 und 3.4 dargestellt.

3.3 Acetolyse

Die Acetolyse ist eine Standardmethode zur Aufbereitung von fossilen und rezenten Pollenkörnern zur mikroskopischen Untersuchung. Dabei werden durch Behandlung mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure die Intine und der Zellinhalt herausgelöst [33].

3.3.1 Optimierung des Acetolyseverfahrens

Die Acetolyse von Algen wurde zu Beginn der Arbeit mit Hilfe einer Standardmethode, die für die Acetolyse von Pflanzen benutzt wird, durchgeführt. Dazu wurden 1 l Essigsäureanhydrid und 110 ml konzentrierte Schwefelsäure unter Kühlung vereinigt. Die Lösung wurde auf 40°C erwärmt und unter starkem Rühren wurden über einen Zeitraum von 1 h langsam 100 g Algen zugegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass sie nicht aggregieren. Nach der Zugabe wurde

für weitere 10 h bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss die dunkle Reaktionslösung mit 5 kg Eis verdünnt. Dabei entstand ein flockiger Niederschlag, der abfiltriert wurde. Der abfiltrierte Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen, abfiltriert und an der Luft getrocknet. Die Ausbeute des Produktes betrug 30 %. Die Farbe des Produktes enthält einen chlorophyllgrünen Ton. Das bedeutet, dass das Produkt noch nicht abreagierte Teile des Eduktes enthält. Abbildung 3.05 zeigt die schematische Darstellung der Sporopollenin-Gewinnung.

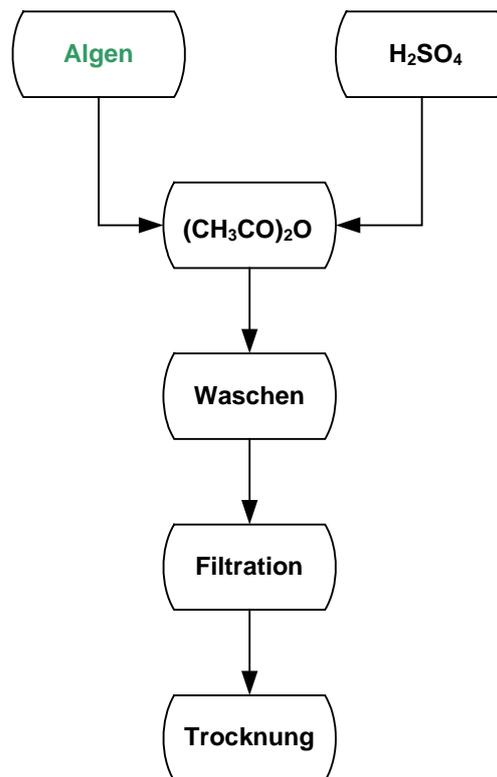


Abbildung 3.05: Schematische Darstellung der Sporopollenin-Gewinnung

Laut Literaturangaben sollte die Farbe des Acetolyseproduktes gelb sein und die Ausbeute sollte zwischen 3 – 5 % liegen [27 – 28]. Um bessere Ergebnisse zu erzielen, wurden verschiedene Parameter wie Temperatur, Reaktionszeit und Massenverhältnisse im Verlaufe der Acetolyse variiert. Außerdem wurden zerkleinerte und extrahierte Algen als Edukt eingesetzt (s. Kapitel 3.2). Eine detaillierte Beschreibung der durchgeführten Versuche bzw. Optimierungen findet sich in Anhang 14.1. Es wurde festgestellt, dass die Acetolyse von chlorophyllfreien Algen bessere Ergebnisse liefert, als die von den nicht

extrahierten Algen. Die Acetolyse von nicht extrahierten Algen führte zum grünlichen Produkt, was auf das Vorhandensein des durch die Acetolyse nicht zerstörten Chlorophylls deutete (s. Abbildung 3.06). Die Farbe des Produktes aus extrahierten Algen veränderte sich mit steigender Temperatur des Reaktionsmediums von hellgelb bis zu dunkelbraun. Es wurden minimale Ausbeuten von 8 % erhalten. In der folgenden Abbildung 3.06 sind diese Qualitätsunterschiede vergleichend dargestellt.

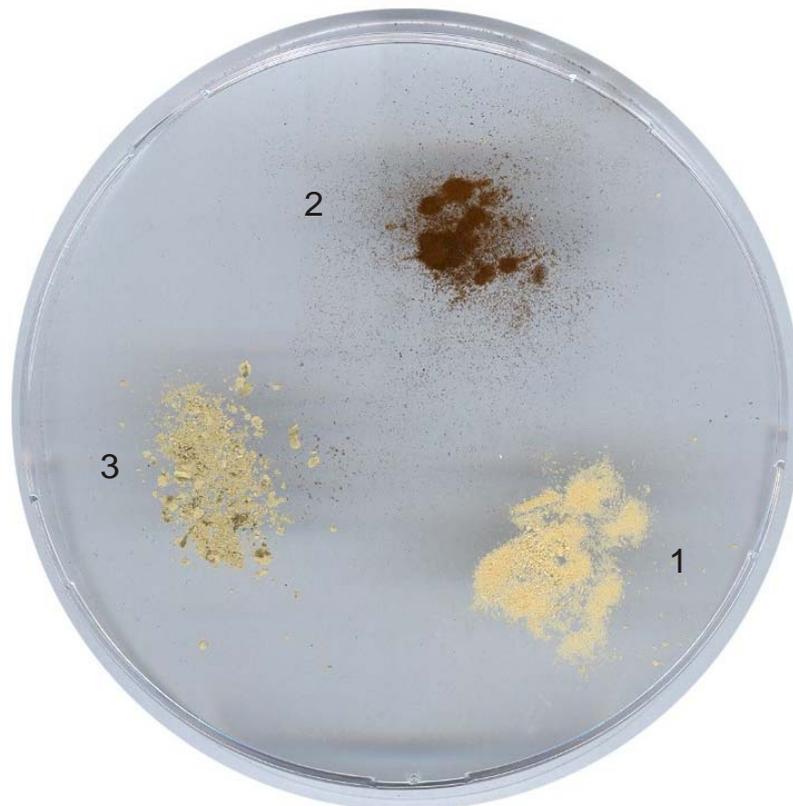


Abbildung 3.06: Einfluss von Temperatur und Extraktion auf die Qualität des Produktes
1. Produkt aus extrahierten Algen, hergestellt bei 60°C; 2. Produkt aus extrahierten Algen, hergestellt bei 100°C; 3. Produkt aus nicht extrahierten Algen, hergestellt bei 40°C

Außerdem wurde festgestellt, dass die Variation der Reaktionszeiten ebenfalls einen Einfluss auf die Farbe des Produktes hat. Je länger die Reaktionszeit ist, desto dunkler die Farbe des Produktes. Abbildung 3.07 stellt das optimierte Aufschlussverfahren von *Chlorella*-Algen dar (vergl. Anhang 14.1; Versuchsnummer 38).

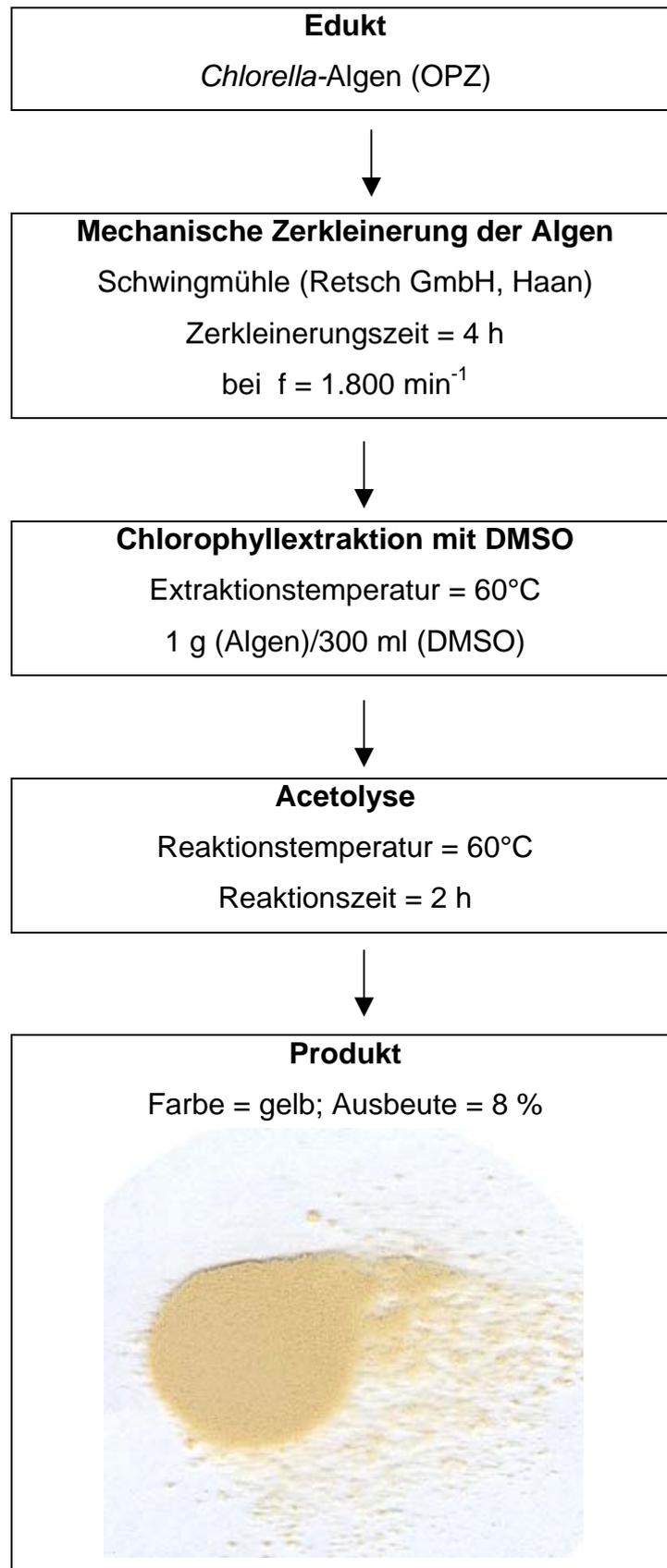
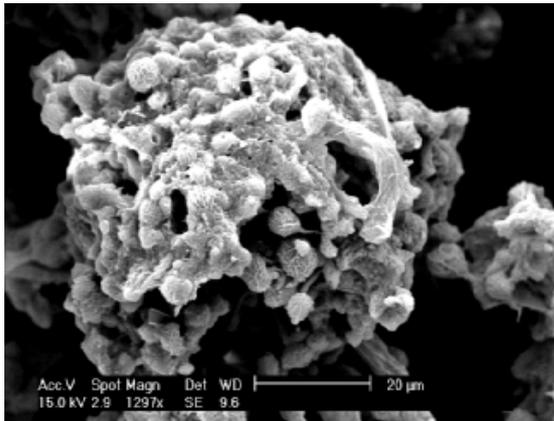
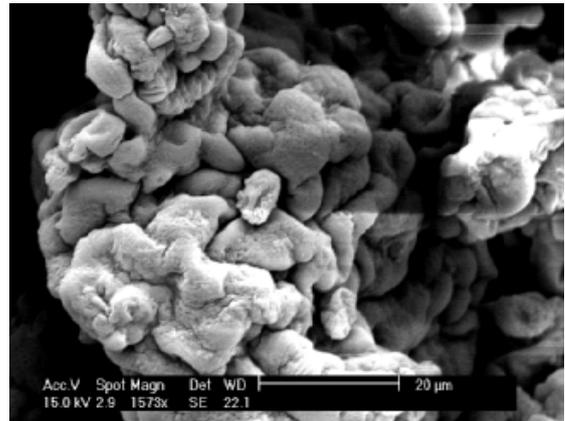


Abbildung 3.07: Optimiertes Aufschlussverfahren für *Chlorella*-Algen (s. Anhang 14.1; Versuchsnummer 38); f = Schwingungsfrequenz

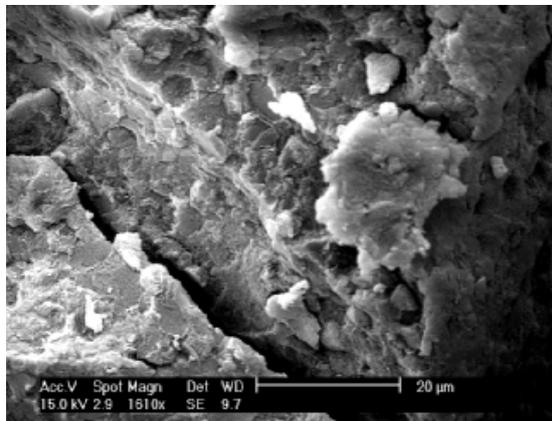
Sporopollenin ist ein gelber nur in 2-Aminoethanol solubilisierbarer Feststoff, was seine Charakterisierung erschwert. Es wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen sowohl von den Algen, den extrahierten Algen und dem Produkt nach der Acetolyse angefertigt (s. Abbildung 3.08). Wie in den Aufnahmen zu sehen ist, bleibt die äußere Struktur der Algen bei der Extraktion erhalten. Nach der Acetolyse hingegen ist keine Zellstruktur mehr erkennbar, was auf einen vollständigen Aufschluss der Zellen hinweist.



Chlorella-Alge



Chlorella-Alge nach der Extraktion mit DMSO



Chlorella-Alge nach der Acetolyse

Abbildung 3.08: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Algen und des Produktes (s. Anhang 14.1; Optimiertes Verfahren; Versuchsnummer 38)

Um die nach dem Zellaufschluss erhaltenen Produkte charakterisieren zu können, wurden sie IR-spektroskopisch untersucht. Mehrere funktionelle Gruppen von Sporopollenin sollten sich in definierten Bereichen des IR-Spektrums identifizieren lassen (s. Abbildung 3.09).

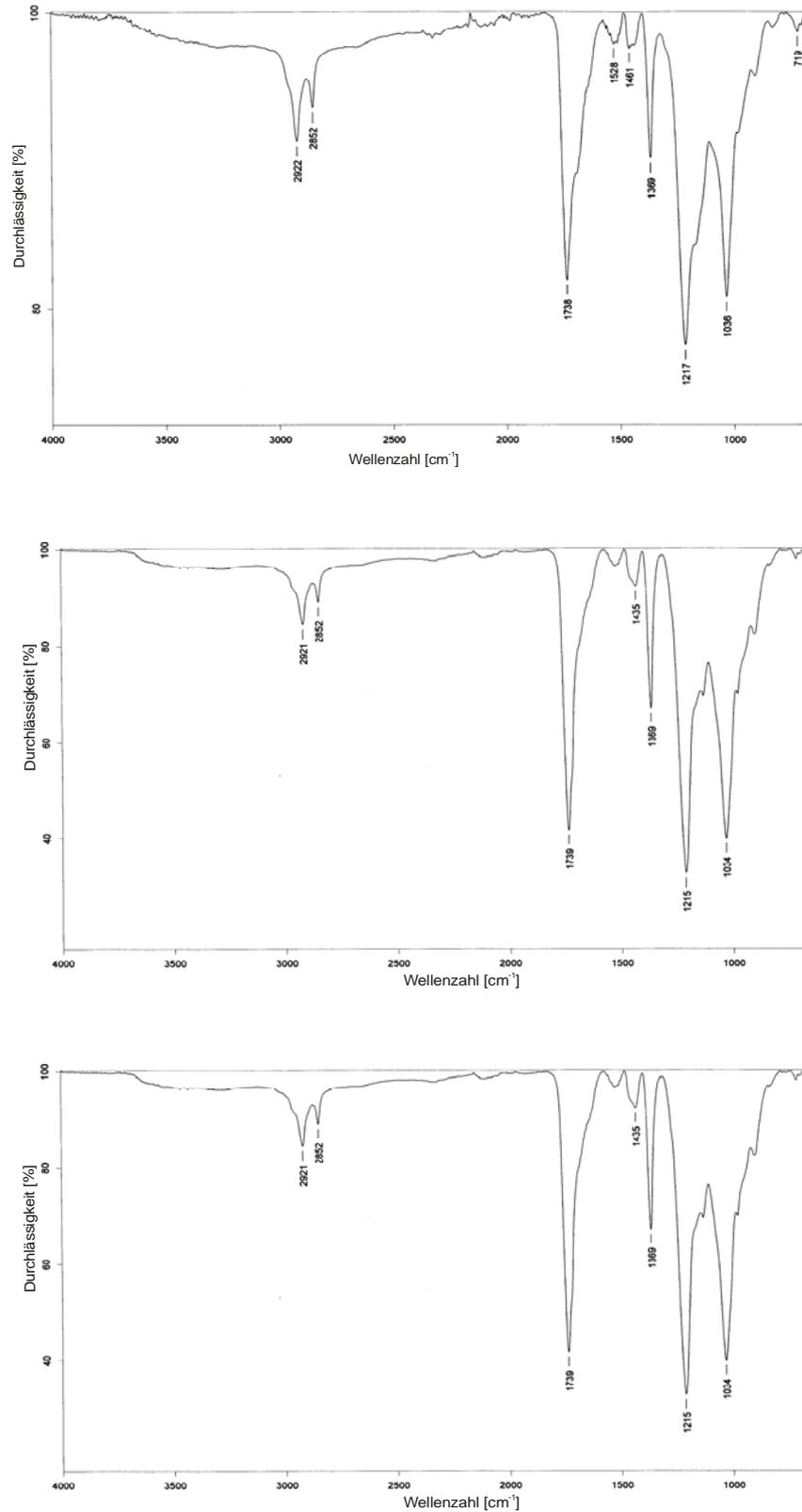


Abbildung 3.09: IR-Spektren (exemplarisch) der unterschiedlichen Acetylierungsverfahren (Verfahrensvarianten (v. o.): 100°C/1 min, 40°C/20 h und 60°C/40 min)

Die Aufnahmen der IR-Spektren erfolgten mit Hilfe eines IR-Spektrophotometers (Bruker Optik GmbH, Ettlingen). Alle wichtigen IR-Spektren der einzelnen Acetolyseverfahren sind im Anhang 14.2 zusammengefasst.

Aus der Abbildung 3.09 ist ersichtlich, dass die Spektren nahezu identisch sind. Die Absorptionsbanden im Bereich von 1.650 bis 1.800 cm^{-1} entsprechen einer Carbonylabsorption. Die Absorptionen im Bereich von 2.960 bis 2.850 cm^{-1} sind den (O – H) – Gruppen zu zuordnen. Die Absorption bei einer Wellenzahl von 1.036 cm^{-1} ist für (C – O) – Banden typisch. Die Zuordnung der Banden im Absorptionsbereich von 1.200 bis 1.500 cm^{-1} ist schwierig, weil viele Banden in diesem Bereich absorbieren (fingerprint). Die Aufnahmen zeigten jedoch, dass sich die erhaltenen Spektren mit den sich ändernden Ausbeuten und Farben der Produkte nicht wesentlich verändern. Generell ist eine Aussage über die Produktreinheit oder über das Produkt an sich äußerst schwierig, da keine verlässlichen Strukturangaben zu Sporopollenin in der Literatur vorliegen. Eine Identifikation konnte somit ausschließlich über den Vergleich des IR-Spektrum von Produktmustern der Firma RTC GmbH und aus Pollen gewonnenen Sporopollenin erfolgen. Als weiteres Kriterium zur Produktidentifizierung stand lediglich das Lösungsverhalten zur Verfügung (Unlöslichkeit in allen wässrigen und organischen Lösemittel mit der Ausnahme von 2-Aminoethanol).

Um eine weitere Identifikationsmöglichkeit zu erhalten und um eine weitere Charakterisierung des Produktes zu erlauben (Verunreinigungen etc.) wurden zweidimensionale Fluoreszenzspektren mittels eines Hitachi F-4.500 aufgenommen (s. Anhang 14.3). Es wurde festgestellt, dass Sporopollenin im festen Zustand nicht fluoresziert (Oberflächenfluoreszenz). Deswegen erfolgte eine Solubilisierung des hergestellten Sporopollenins in 2-Aminoethanol. Bei den Untersuchungen wurden festgestellt, dass sich die Spektren des nach verschiedenen Methoden hergestellten Acetolyseproduktes unterscheiden. So ist es mit Hilfe der 2D-Fluoreszenz möglich, Verunreinigungen die eine deutliche Eigenfluoreszenz aufweisen, im Produkt nachzuweisen. Dieses ist z.B. beim β -Carotin der Fall. In der nachfolgenden Abbildung 3.10 sind die 2D-Fluoreszenzspektren von β -Carotin, der extrahierten Algen und des Acetolyseproduktes gegenübergestellt.

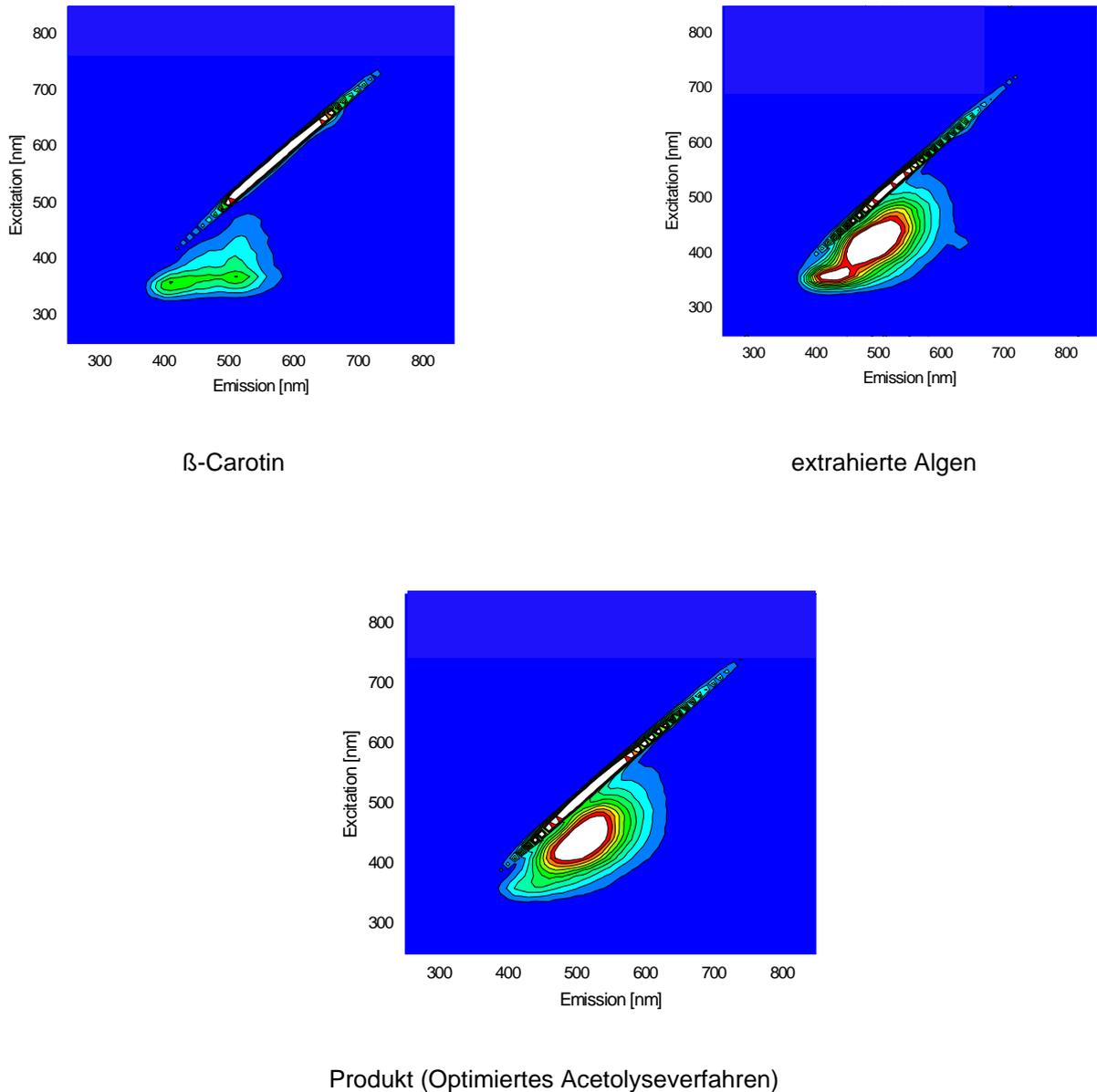


Abbildung 3.10: Vergleich der Fluoreszenz-Spektren

Die Wellenlängenpaare Ex/Em = 360/420 nm und 370/510 nm sind charakteristisch für β -Carotin. Der Vergleich des Spektrums von β -Carotin mit dem von extrahierten Algen zeigt, dass die mit DMSO extrahierten chlorophyllfreien Algen noch ein Teil des β -Carotins enthalten (Wellenlängenpaar 360/420 nm). Den Spektren zufolge kann das β -Carotin auch durch die Acetolyse nicht vollständig entfernt werden, da der entsprechende Fluoreszenzpeak im Fluoreszenzspektrum des Acetolyseproduktes eine kleine Schulter aufweist. Das Acetolyseprodukt zeigt

eine deutliche Fluoreszenzaktivität im Bereich 440/500 nm. Zur weiteren Überprüfung der Reinheit des Produktes wurden UV/Vis-Spektren von Sporopollenin und Chlorophyll mittels eines Spektrophotometers (Uvikon 922 Fa. Kontron) aufgenommen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 3.11 wiedergegeben.

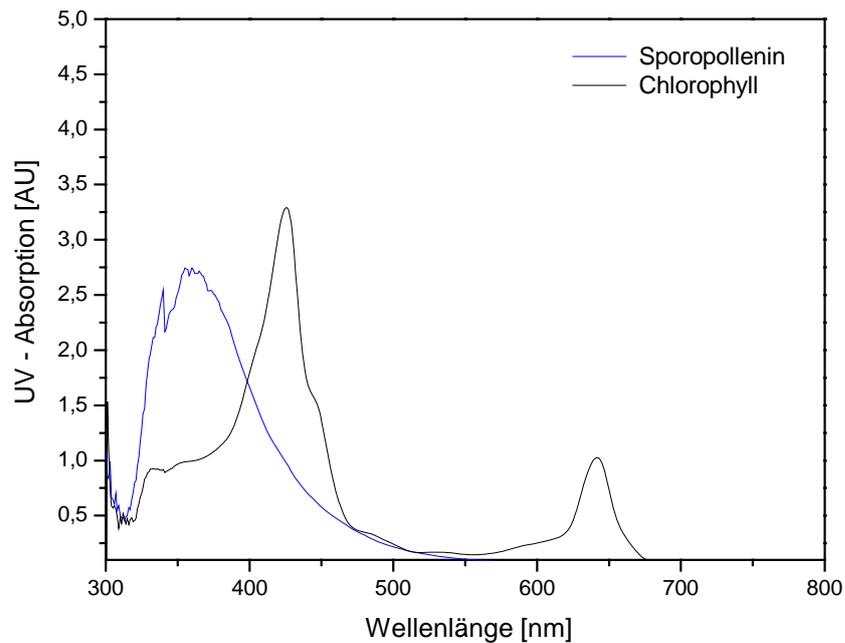


Abbildung 3.11: UV/Vis-Spektren des Acetolyseproduktes und Chlorophyll (gelöst in 2-Aminoethanol);

Aus der Abbildung 3.11 ist ersichtlich, dass das Extinktionsmaximum des Acetolyseproduktes bei 370 nm liegt. Die eingesetzte Reinsubstanz (Chlorophyll) zeigt deutlich unterschiedliche Absorptionsspektren. Anhand dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass beim optimierten Acetolyseverfahren ein Produkt gewonnen wird, das kein Chlorophyll enthält.

3.4 Enzymatische Hydrolyse

Wie eingangs erwähnt besteht auch die Möglichkeit, ein enzymatisches Verfahren zur Gewinnung von Sporopollenin einzusetzen [28]. Ein enzymatisches Verfahren hätte den Vorteil, dass das Entfernen der störenden Zellbestandteile unter relativ milden Bedingungen erfolgen kann. Ein solches Verfahren macht wirtschaftlich aber nur dann Sinn, wenn die Kosten die der Acetolyse nicht überschreiten bzw. eine entsprechende Gewinnsteigerung durch die Koppelprodukte (Aminosäuren, Peptide) zu erwarten ist.

Die enzymatische Hydrolyse von *Chlorella* wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichen technischen Enzymen sowie Enzymgemischen durchgeführt. Im ersten Versuchsteil wurde mit den Enzymgemischen der Fa. Serva gearbeitet. Als Edukt wurden zerkleinerte und mit DMSO extrahierte Algen verwendet. Das Algenmaterial wurde 4 Tage lang in einer schwach sauren Lösung (Natriumacetatpuffer 1 M, pH 4,5) von 1 % Cellulase Onozuka R-10 und 1 % Macerozym zur Auflösung der Intine bei 31°C inkubiert. Danach wurde für weitere 24 h in einer neutralen Pufferlösung (Natriumacetatpuffer 1 M) mit Trypsin (1 %) zur Solubilisierung von Proteinen und Nukleinsäuren inkubiert. Das Produkt konnte daraufhin von der Reaktionslösung getrennt und mit Wasser gewaschen werden. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das Produkt mit 4 %iger KOH- und 0,2 %iger Natriumdithionitlösung 4 h lang bei Zimmertemperatur gerührt, mit einer 0,1 %iger Lösung von Natriumdodecylsulfat und danach dreimal mit Wasser gewaschen. Zur Entfernung von Restlipiden erfolgen nochmaliges Waschen mit Aceton, Isopropanol und Wasser. Die erhaltenen Hydrolyseprodukte wurden an der Luft getrocknet, wodurch eine 9 %ige Ausbeute in Bezug auf die eingesetzten Algen erreicht werden konnte.

Im zweiten Versuchsteil wurden technische Enzyme der Firma Novozymes für die Hydrolyse von Algen eingesetzt (Alcalase und Flavourzym). Die Hydrolyse wurde wie im ersten Versuchsteil beschrieben durchgeführt. Der pH-Wert der Reaktionslösung musste allerdings den eingesetzten Enzymen angepasst und auf pH 8,5 eingestellt werden. In diesem Versuchsteil wurden entweder zerkleinerte, mit DMSO extrahierte Algen oder nur mit DMSO extrahierte Algen verwendet. Die

Ausbeuten nach der Hydrolyse von zerkleinerten und mit DMSO extrahierten Algen lagen bei 8 %. Mit den nur mit DMSO extrahierten Algen wurden Ausbeuten von 12 % erreicht. Je höher die Ausbeute, desto niedriger die Reinheit des Produktes. Das Produkt enthält wahrscheinlich nicht abgebaute Zellbestandteile der eingesetzten Algen. Die folgende Tabelle 3.3 stellt die Ausbeuten der einzelnen Hydrolyse-Methoden vergleichend gegenüber.

Tabelle 3.3: Vergleich der Ausbeuten verschiedener Herstellungsmethoden

Algen	Enzyme	Ausbeute [%]
Nicht zerkleinert nur extrahiert	Alcalase Flavourzym	12
Zerkleinert und extrahiert	Macerozym Cellulase	9
Zerkleinert und extrahiert	Alcalase Flavourzym	8

Der Unterschied dieser Ausbeuten ist auf die mechanische Zerkleinerung zurückzuführen. Bei den zerkleinerten Algen gelangen die Enzyme schnell in das Innere der Zellen und beschleunigen somit die enzymatische Reaktion. Der Einsatz von nicht zerkleinerten Algen führte zur Verlangsamung der enzymatischen Reaktion und zur Erhöhung der Produktausbeuten. Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig die Vorbehandlungsschritte (Zerkleinerung – Extraktion) für den optimalen Gewinnungsprozess sind. Abbildung 3.13 stellt die optimierte enzymatische Hydrolyse von *Chlorella*-Algen dar.

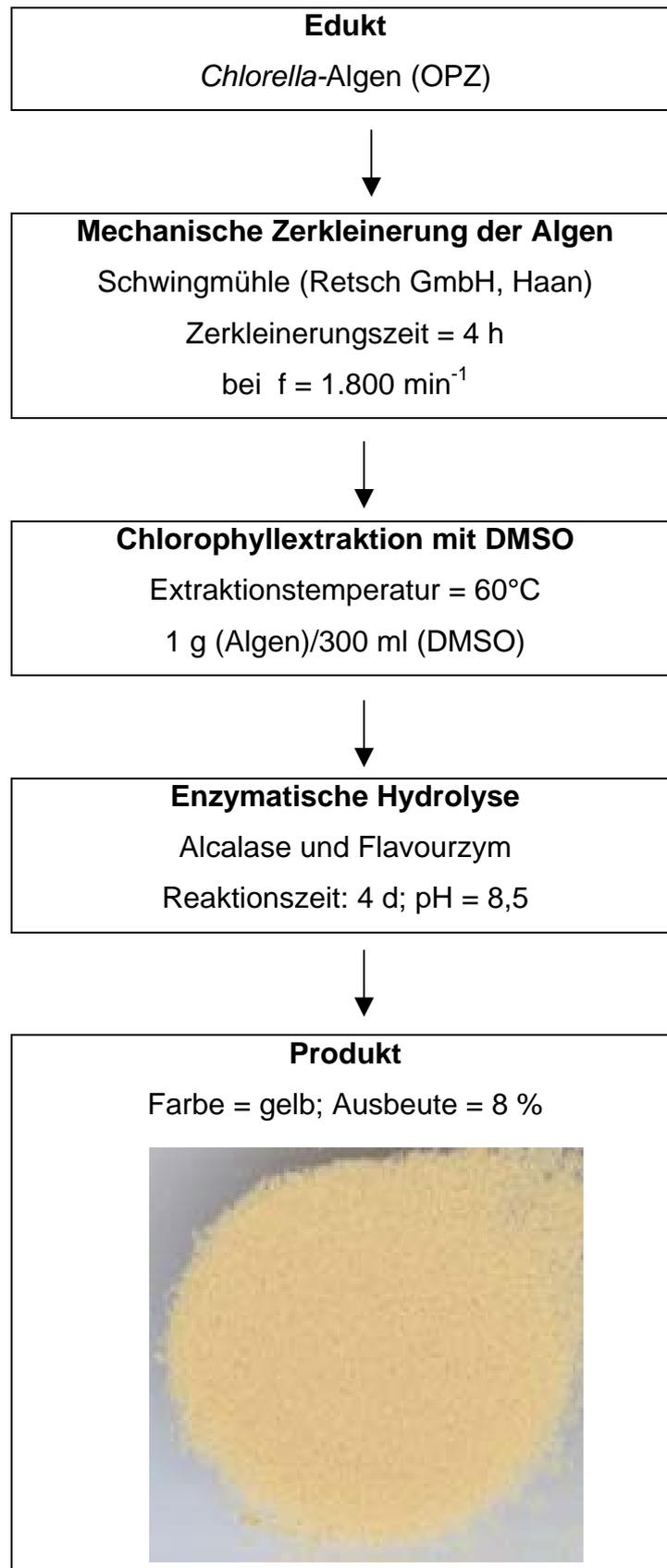
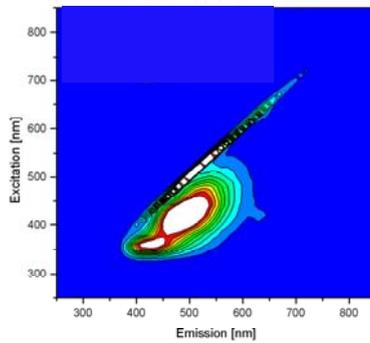
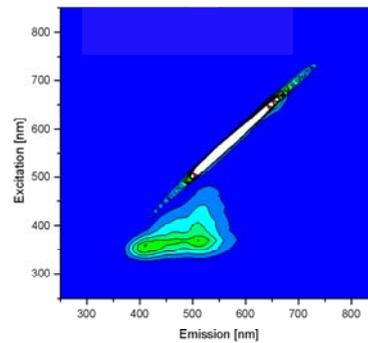
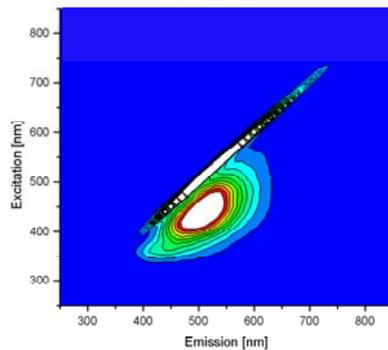


Abbildung 3.13: Optimiertes Hydrolyseverfahren für *Chlorella*-Algen; f = Schwingungsfrequenz

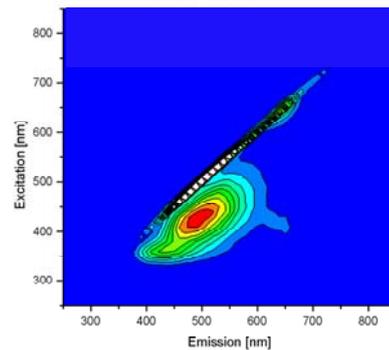
Die durch enzymatische Hydrolyse erhaltenen Produkte wurden mittels UV/Vis- und Fluoreszenzspektren charakterisiert. Die erhaltenen Spektren sind in den Abbildungen 3.14 und 3.15 wiedergegeben.



extrahierte Algen

 β -Carotin

Produkt der Acetolyse



Produkt der enzymatischen Hydrolyse

Abbildung 3.14: 2D-Fluoreszenzspektren der extrahierten Algen, β -Carotin und den Produkten der Acetolyse und der enzymatischen Hydrolyse

Aus der Abbildung 3.14 ist ersichtlich, dass das Produkt der enzymatischen Hydrolyse genauso wie das Acetolyseprodukt leichte Verunreinigung durch β -Carotin aufweist (kleine Schulter im Bereich 360/420 nm). Es zeigen sich jedoch leichte Unterschiede zum Spektrum des Produktes der Acetolyse und eine größere Ähnlichkeit zum Spektrum der mit DMSO extrahierten Algen. Dieses liegt wahrscheinlich daran, dass durch die eingesetzten Enzyme die Intine der Zellen nicht vollständig herausgelöst werden und das Produkt vermutlich noch Restlipide enthält. Aus diesem Grund wären vor der Anwendung des enzymatischen

Verfahrens im größeren Maßstab weitere Optimierungsschritte notwendig. Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektren konnte das Produkt identifiziert werden. Da das Wellenlängenpaar 440/500 nm bekannt ist, kann auf die Aufnahme des Gesamtspektrums verzichtet und Sporopollenin so sehr schnell identifiziert werden. Um ausschließen zu können, dass das Produkt Chlorophyllreste enthält, wurden UV/Vis-Spektren von Sporopollenin und Chlorophyll aufgenommen. Die Abbildung 3.15 zeigt, dass das enzymatisch hergestellte Produkt (Extinktionsmaximum 370 nm) keine Verunreinigungen durch Chlorophyll zu enthalten scheint.

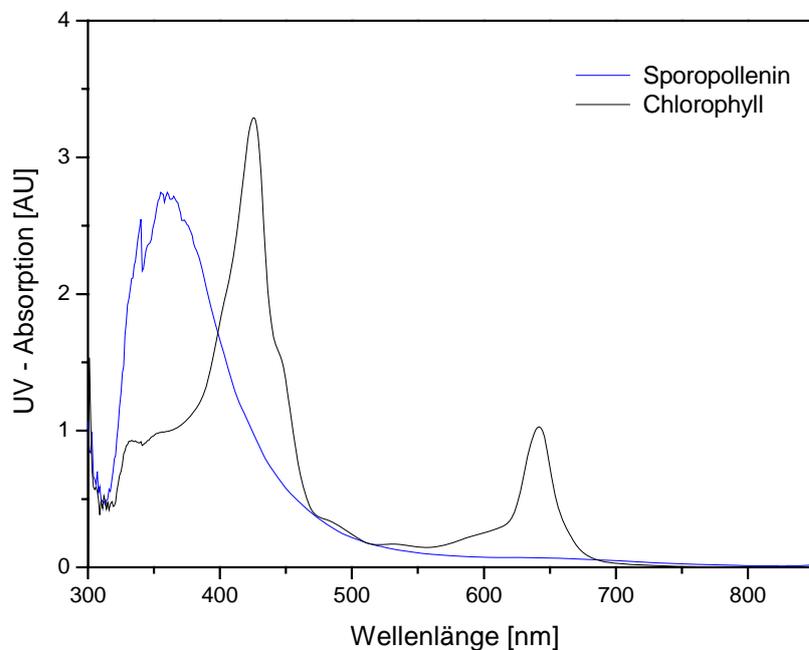


Abbildung 3.15: UV/Vis-Spektren des enzymatischen Hydrolyseproduktes und Chlorophyll (gelöst in 2-Aminoethanol);

In Hinblick auf die Arbeits- und Anlagensicherheit wäre das enzymatische Verfahren sicherlich vorteilhaft, da im Vergleich zum Acetolyseverfahren keine ätzenden Flüssigkeiten eingesetzt werden. Dies würde zur Einsparung von zusätzlichen Schutzmaßnahmen und damit verbundenen Kosten führen (vgl. Kapitel 3.6).

3.5 Schwermetallabreicherung

In Ergänzung zu den durchgeführten Herstellungsverfahren wurde das Schwermetallabreicherungsverhalten des Acetolyseproduktes und der *Chlorella*-Algen durch verschiedene Testreihen untersucht. Hier stand insbesondere die Abreicherung von As, Cd und Pb im Mittelpunkt des Interesses. Die Abreicherungsversuche wurden jeweils 5 Tage lang in wässrigen Medien (pH 6) und bei Raumtemperaturen durchgeführt. Die genauen Eduktmengen und verwendeten Metallsalze sind in der Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Für die Abreicherung eingesetzte Edukt- und Metallmengen; Verwendete Metallsalze: Bleiacetat-Trihydrat (Pb-Gehalt 99,5%), Cadmiumnitrat-Tetrahydrat (Cd-Gehalt 99%), Arsen(v)oxid-Hydrat (As-Gehalt 97%), Eisen(III)chlorid-Hexahydrat (Fe-Gehalt 99%), Kupfer(II)chlorid wasserfrei (Cu-Gehalt 98%)

Testreihe	Metall	c(Metall) [mg/ml]	m(Algen) [mg]	m(Acetolyseprodukt) [mg]	V(Wasser) [ml]
1	As	0,72		60	10
2	Cd	0,44		60	10
3	Pb	0,79		60	10
4	As	0,72		150	30
	Cd	0,57			
	Pb	0,60			
5	As	0,69	60		10
6	Cd	0,37	60		10
7	Pb	0,50	60		10
8	As	0,76	150		30
	Cd	0,56			
	Pb	0,89			
9	Fe	0,40	60		10
10	Cu	0,54	60		10
11	Fe	0,29		60	10
12	Cu	0,71		60	10

Die Testreihen 4 und 8 wurden unter Einsatz von Salzgemischen durchgeführt. Bei allen anderen Versuchen wurden entsprechende Metallsalze eingesetzt. Nach Ablauf der Abreicherungszeit wurden die Reaktionslösungen von den Feststoffen befreit und auf den Metallgehalt untersucht. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe des Spektrometers Spectroflame – ICP OES (Fa. Spectro Analytical Instruments,

Kleve) simultan durchgeführt (s. Anhang 14.4). Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Gemessene Metallkonzentrationen; As bei 193,696 nm, Cd bei 226,502 nm, Pb bei 220,351 nm, Fe bei 259,94 nm, Cu bei 324,754 nm; *blau-kursiv*: Abreicherungen unter Einsatz des Acetolyseproduktes, schwarz: Abreicherungen unter Einsatz der Algen

Testreihe	Metall	c(Anfang) [mg/ml]	c(Ende) [mg/ml]	Abreicherung [%]
1	<i>As</i>	<i>0,72</i>	<i>0,56</i>	<i>22,22</i>
2	<i>Cd</i>	<i>0,44</i>	<i>0,02</i>	<i>95,45</i>
3	<i>Pb</i>	<i>0,79</i>	<i>0,01</i>	<i>98,73</i>
4	<i>As</i>	<i>0,72</i>	<i>0,12</i>	<i>83,33</i>
	<i>Cd</i>	<i>0,57</i>	<i>0,10</i>	<i>82,46</i>
	<i>Pb</i>	<i>0,60</i>	<i>0,004</i>	<i>99,33</i>
5	As	0,69	0,68	1,45
6	Cd	0,37	0,39	5,41
7	Pb	0,50	0,48	4,00
8	As	0,76	0,18	76,32
	Cd	0,56	0,22	60,71
	Pb	0,89	0,16	82,02
9	Fe	0,40	0,39	2,50
10	Cu	0,54	0,52	3,70
11	<i>Fe</i>	<i>0,29</i>	<i>0,25</i>	<i>13,09</i>
12	<i>Cu</i>	<i>0,71</i>	<i>0,65</i>	<i>8,45</i>

Es ist zu erkennen, dass die Schwermetallkonzentration bei den durch das Acetolyseprodukt durchgeführten Abreicherungen deutlicher abnimmt, als bei den Versuchen mit den Algen. Im Durchschnitt nahm die Schwermetallkonzentration beim Einsatz des Acetolyseproduktes um 61 %, bei der Verwendung von Algen um nur 32 % ab. Besonders auffällig ist der Unterschied bei der Abreicherung von reinen Bleisalzlösungen. Beim Acetolyseprodukt finden sich Abreicherungsraten von 80 – 99 %, bei der Alge lediglich 5 %. Eisen- und Kupferverbindungen werden sowohl mit dem Acetolyseprodukt als auch mit Algen nur wenig abgereichert. Bei der Abreicherung durch das Acetolyseprodukt nahm die Konzentration von Eisen um 13 % und von Kupfer um 8,5 % ab. Sollte das Produkt in vivo eingesetzt werden, so ist dieses Ergebnis sehr Wünschenswert, da Kupfer und Eisen als Spurenelemente im menschlichen Körper eine Fülle von Funktionen haben (z.B.

über die Beteiligung am Stoffwechsel von Eisen ist Kupfer außerdem an der Bildung der Erythrozyten (rote Blutkörperchen) beteiligt).

Eine sehr starke Abnahme der Schwermetallkonzentration ist weiterhin bei den eingesetzten Salzgemischen zu beobachten. Dieser Effekt findet sich sowohl beim Acetolyseprodukt als auch bei den Algen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Bildung von Komplexverbindungen, die generell besser akkumuliert werden können. Dies sollte jedoch in weiteren Experimenten detailliert untersucht werden.

3.6 Gesamtprozess: Von der Alge zum Sporopollenin

Die Gewinnung von Sporopollenin aus *Chlorella*-Algen ist, aufgrund der mechanischen Stabilität und des hohen Chlorophyllgehalts dieser Alge, ein schwieriger Prozess. Die Ursache für die außergewöhnliche mechanische Stabilität der Alge liegt in der kugelförmigen Gestalt in Kombination mit der dreischichtigen, sehr robusten Zellwand. Es wurden diverse Untersuchungen zum Aufschluss der harten Zellwand durchgeführt (s. Kapitel 3.1). Dabei wurde festgestellt, dass sich die Algen am besten mechanisch aufschließen lassen. Mit Hilfe der verwendeten Schwingmühle konnte die Zellwandstruktur innerhalb von 4 h zerstört und somit die nachfolgende Chlorophyllextraktion vereinfacht werden. Für die Chlorophyllextraktion wurden verschiedene Lösemittel getestet. DMSO stellte sich als sehr geeignet heraus. Bei einer Extraktionstemperatur von 60°C konnten die zerkleinerten Algen innerhalb von 3 h extrahiert werden. Für die Extraktion von 1 g Algen wurden insgesamt 300 ml DMSO verbraucht. Beim Extraktionsschritt ergab sich eine Ausbeute von 40 % (0,4 g). Um die verbrauchte Lösemittelmenge wiedergewinnen zu können, müsste eine Lösemittel-Rückgewinnungsanlage etabliert werden. Als mögliches Nebenprodukt könnte Chlorophyll erhalten werden, das z.B. in der Pharmaindustrie Anwendung finden kann (vgl. Abbildung 3.16). Die zerkleinerten und extrahierten Algen wurden zur Gewinnung von Sporopollenin eingesetzt. Für die Sporopollenin-Gewinnung aus *Chlorella*-Algen standen zwei Methoden zu Verfügung: Acetolyse und die enzymatische Hydrolyse. Nach zahlreichen Optimierungen dieser Herstellungsmethoden, war es möglich das Produkt mit einer Ausbeute von 8 % herzustellen

(s. Kapitel 3.3 – 3.4). Abbildung 3.16 zeigt das Schema des Sporopollenin-Gewinnungsprozesses.

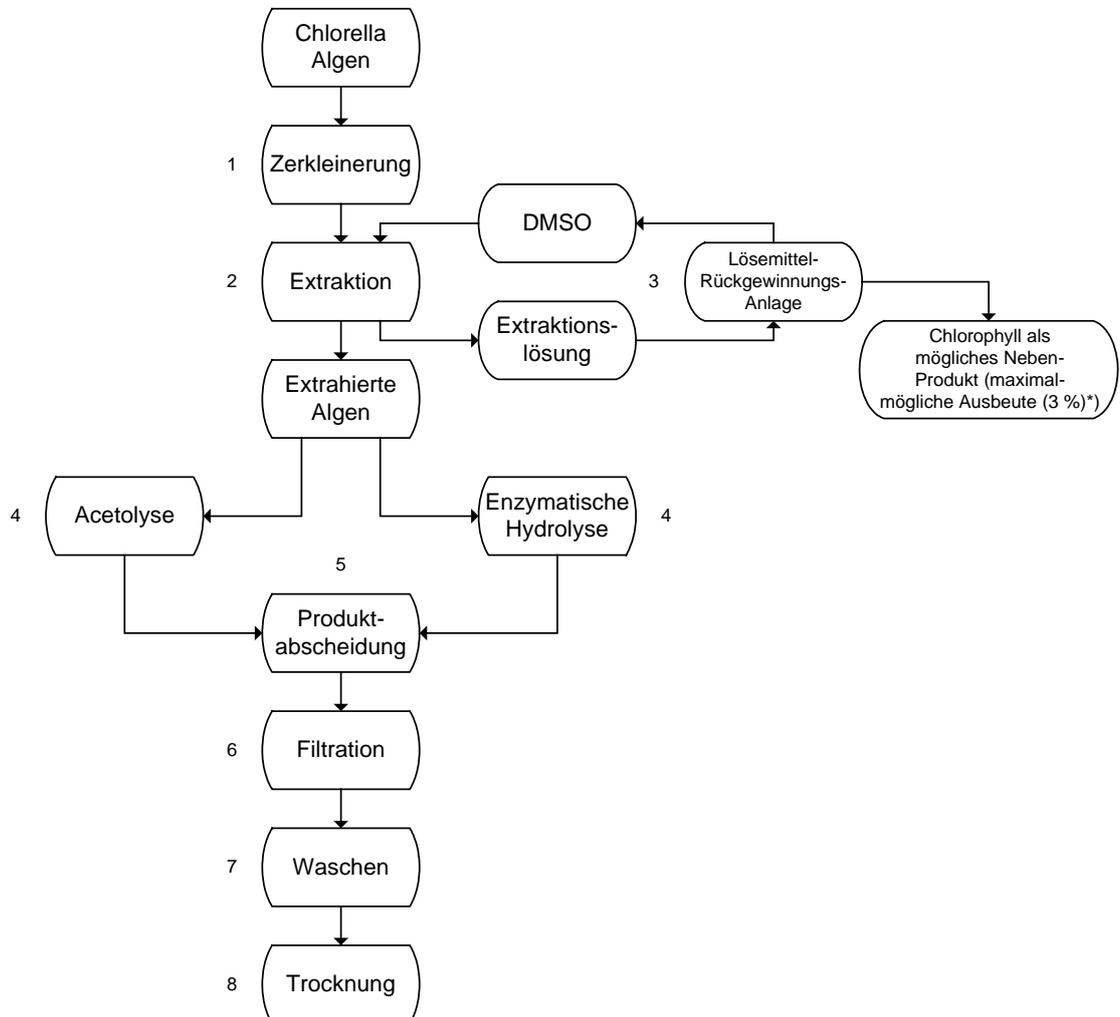


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der Sporopollenin-Gewinnung aus *Chlorella*-Algen

* maximal mögliche Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Alge

Es lässt sich erkennen, dass sich der Herstellungsweg, nur in einem Prozessschritt (4) (Gewinnungsprozess) unterscheidet. Die anderen Prozessschritte sind unabhängig von den Herstellungsmethoden notwendig und stellen somit auch die feste Kostenfaktoren für den Gesamtprozess dar. Durch die Zerkleinerung und Extraktion von Algen wurden Ausbeuten von 40 % erzielt (s. o). Diese Ausbeuten an extrahierten Algen sind auch bei Scale Ups zu erwarten, da eine gute Eduktqualität für die Sporopollenin-Gewinnung gewährleistet sein muss. Sollte eine Sporopollenin-Gewinnung aus 10 kg extrahierten Algen geplant werden, so

müssten 25 kg Algen zerkleinert und extrahiert werden. Aus 10 kg extrahierten Algen könnten 2 kg Sporopollenin gewonnen werden. Für die Herstellung von 2 kg Produkt mittels enzymatischen Verfahrens, würden 96 h gebraucht werden. Beim Acetolyse-Verfahren könnte die gleiche Produktmenge innerhalb von 2 h hergestellt werden. Für die Acetolyse von 10 kg extrahierten Algen müssten 100 l Essigsäureanhydrid und 11 l Schwefelsäure eingesetzt werden. Die Handhabung dieser Volumina erfordert den Einsatz von speziellen Reaktor (säurestabil, explosionsgeschützt etc.) mit dem entsprechend leistungsfähigen Thermostat, um die Reaktionslösung abkühlen bzw. die Reaktionstemperatur konstant halten zu können. Für die enzymatische Hydrolyse würde ein einfacher Glas-Reaktor (Reaktorvolumen: ca. 100 l) ausreichen, da nur Enzym-Puffergemisch eingesetzt wird. Um die Herstellungsmethoden besser vergleichen zu können, werden die Chemikalien- und Anlagenkosten miteinbezogen. Die genauen Chemikalienmengen und Preise sind in der nachstehenden Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tabelle 3.4: Vergleich der Isolierungsmethoden und damit verbundener Chemikalien-, Anlagen und Kostenbedarf; Verarbeitung von 10 kg extrahierten Algen; * = Büchi AG, Uster, Schweiz; ** = Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg, Deutschland; *** = Betriebsdauer: 300 d/a; ^P = Großhandelpreise (zuzüglich der gesetzlichen Mehrwertsteuer)

Materialien	Acetolyse	Enzymatische Hydrolyse	Preis ^P [€]
Schwefelsäure [l]	11		16,5
Essigsäureanhydrid [l]	100		480
Alcalase [l]		1	27,4
Flavourzym [l]		1	69,7
Natriumacetat-3-hydrat [kg]		18,5	17,5
Essigsäure [ml]		1	0,1
Reaktionszeit [h]	2	96	
Ausbeute (Sporopollenin) [kg]	2	2	
Jahresproduktion an Sporopollenin [kg] ^{***}	7.200	150	
Reaktorpreis [€]	ca. 74.000 [*]	ca. 50.000 [*]	
Thermostatpreis [€]	28.000 ^{**}	8.000 ^{**}	
Investitionskosten [€]	102.000	58.000	
Chemikalienkosten [€]	496,5	114,7	

Obwohl die Zahlen keine exakten Angaben darstellen, wird deutlich, dass die Acetolyse das kostenintensivste Verfahren ist. Die größten Posten stellen die Investitionskosten bzw. Anlagenkosten dar. Dies hängt mit den Maßnahmen, die zur Erfüllung sicherheits- und umwelttechnischer Anforderungen (Personen-/Explosions-/Emissionsschutz, Gewässerschutz etc.) ergriffen werden müssen. Demnach stellt die enzymatische Hydrolyse die kostengünstigere Herstellungsvariante dar. Im Hinblick auf die Chemikalienkosten (variable Kosten) ergibt sich ein ähnliches Bild. Mit 248,25 Euro/kg (Produkt) stellen die Chemikalienkosten des Acetolyseverfahrens einen nicht unbedeutenden Kostenfaktor dar. Die Chemikalienkosten der enzymatischen Hydrolyse sind um den Faktor 4,3 geringer. Die Acetolyse würde daher nur im Labormaßstab und im Rahmen der Forschung Interesse darstellen. Für die großtechnische Produktgewinnung würde sich enzymatische Hydrolyse als besser geeignet darstellen. Bezüglich der Wiederverwendung der eingesetzten Enzyme besteht noch Optimierungsbedarf, der zu einer Kostenreduktion beitragen könnte. Wie sich diese Tatsachen auf den Verkaufspreis des Produktes auswirken würden, hängt natürlich auch von der Produkt-Nachfrage bzw. Produkt-Akzeptanz ab. Allerdings stellt Sporopollenin kein Produkt für den Massenmarkt (Nahrungsmittel) dar, sondern wird eher in speziellen Bereichen des Pharmazie- und Kosmetiksektors eine Anwendung finden.

4 Molke

Molke ist die Flüssigkeit, die sich nach der Dicklegung von Milch bei der Käseherstellung von der Gallerte, dem gewonnenen Eiweiß, absetzt. Die Milch kann durch Zugabe von Milchsäurebakterien oder Lab, ein Enzym aus dem Kälbermagen, dickgelegt werden. So entstehen zwei unterschiedliche Sorten Molke: die Sauermolke oder die Labmolke, auch Süßmolke genannt. Durch Zugabe von Mineralsäure zur Milch bei der Caseinherstellung, entsteht eine besondere Form der Sauermolke, die Caseinmolke [38].

Anfang der 70er Jahre wurde noch über die Molkenbeseitigung nachgedacht und kaum eine wirtschaftliche Nutzung in Erwägung gezogen. Diese Situation hat sich in den letzten Jahren grundlegend geändert. Der ausschlaggebende Faktor hierfür war der hohe Molkenanfall, der durch die stark gestiegene Käseproduktion hervorgerufen wurde. Die heute anfallenden Molkenmengen jedoch lassen sich durch Verfütterung nicht mehr beseitigen. Die Molke wird zum Abfallprodukt, wodurch die Kosten bei der Käseproduktion erheblich steigen.

Diesen Ursachen zu Folge gewann die Molkenverarbeitung immer mehr an Bedeutung. Seitdem wird auf dem Gebiet umfangreiche Forschung betrieben, um wirtschaftlich effiziente Wege zu finden, die Molkenbestandteile zu isolieren. Außerdem wird versucht, die in natura sowohl geschmacklich als auch optisch wenig ansprechende Molke, durch verschiedene Zusatzstoffe als Wellness- oder Fitnessdrink auf dem Markt zu platzieren.

Seit 1992 hat sich der für die Nahrungsmittelherstellung verwendete Anteil an Molke nahezu verdoppelt. Folgende Abbildung 4.01 zeigt die Entwicklung des Molkenanfalls und der Molkenverwendung in Deutschland.

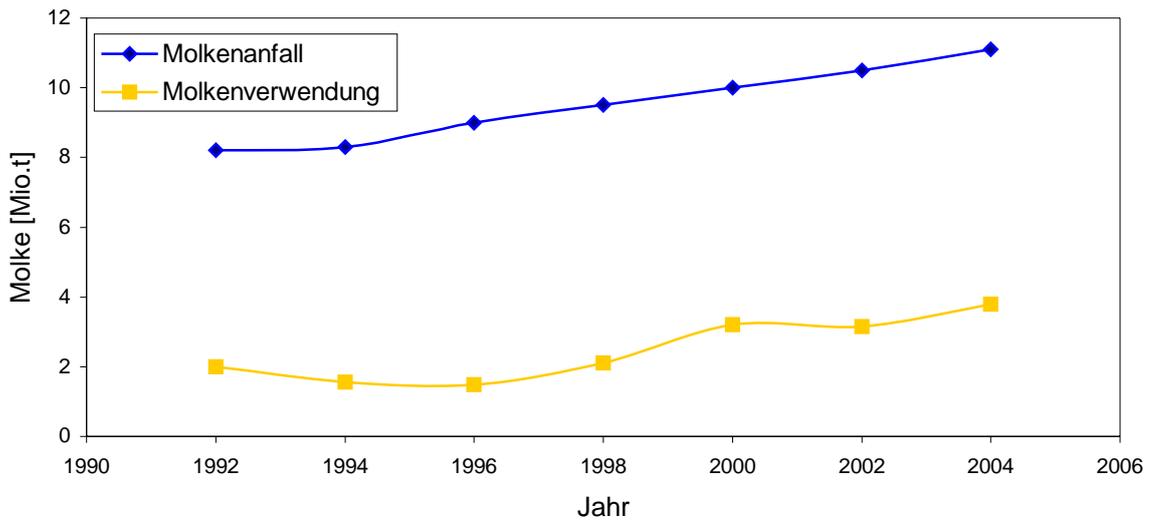


Abbildung 4.01: Molkenanfall und Molkenverwendung in der Bundesrepublik Deutschland [1]

Für die Weiterverarbeitung der anfallenden Molke zu Molkenderivaten wie Milchzucker oder Molkenpulver, sowie zur Isolierung von Molkenproteinen eignet sich aufgrund der Zusammensetzung und der anfallenden Menge nur die Süßmolke. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich Süßmolke (Dünnmolke und Molkenkonzentrat) verwendet. Bei Molkenkonzentrat handelt es sich um 5-fach aufkonzentrierte Dünnmolke.

4.1 Molkenproteine

Neben dem hohen Laktosegehalt befinden sich in der Molke vor allem wertvolle Molkenproteine. Den Hauptanteil (56 %) an den Molkenproteinen macht β -Lactoglobulin aus. Dieser hohe Anteil ist im Hinblick auf die Verwendung der Molkenprodukte problematisch, da β -Lactoglobulin eine hohe Allergenität aufweist. In humaner Milch kommt β -Lactoglobulin dagegen überhaupt nicht vor.

Die wasserlöslichen Molkenproteine gehen bei der Fällung von Casein in die Molke über und sind mit ihrem globulären Aufbau im Gegensatz zu den Caseinen kompakter strukturiert. Sie sind säureempfindlich, aber thermostabil, d.h. erst ab Temperaturen von ca. 60°C kommt es zur Denaturierung der Proteinstruktur. Gemäß ihrer prozentualen Anteile in der Molke lassen sie sich in majore und minore Proteinfraktionen einteilen.

Zu der Gruppe der majoren Molkenproteine gehören β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Bovines Serum Albumin sowie die Immunoglobuline. Neben den majoren Molkenproteinen können eine Reihe weiterer Proteine in der Molke nachgewiesen werden. Diese werden minore Molkenproteine genannt, da sie in nur sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Zu ihnen zählen unter anderem die zwei eisenbindenden Proteine Lactoferrin und Transferrin, das Enzym Lactoperoxidase sowie rund 60 weitere milchoriginäre Enzyme. Tabelle 4.1 gibt einen kurzen Überblick über die wichtigsten Molkenproteine.

Tabelle 4.1: Majore und minore Molkenproteine [39]

Majoren Molkenproteine	Konzentration [g/l]	Molgewicht [Da]	Isoelektrischer Punkt	Anzahl an Aminosäuren
β -Lactoglobulin	2,0 - 4,0	18.400	5,2	162
α -Lactalbumin	0,6 - 1,7	14.000	4,2 - 4,5	123
BSA	0,4	66.000	4,7 - 4,9	582
Immunoglobuline	0,4 - 1,0	>146.000	5,5 - 8,3	k. A.
Minoren Molkenproteine	Konzentration [g/l]	Molgewicht [Da]	Isoelektrischer Punkt	Anzahl an Aminosäuren
Lactoferrin	0,1	82.800	8,8	708
Transferrin	0,1	76.000	6,7	704
Lactoperoxidase	0,025	80.642	8,6	712
β_2 -Macroglobulin	0,004	11.636	5,6	98
Butyrophilin	k. A.	60.000	5,1	526
Ceruloplasmin	k. A.	121.404	5,4	1.062

Aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung zählen Molkenproteine zu den hochwertigsten Proteinen für die menschliche Ernährung. Durch ihren hohen Gehalt an essentiellen Aminosäuren ist Molke geeignet, insbesondere pflanzliche Proteine durch Zusatz aufzuwerten. Durch die Ausstattung der Molke mit zahlreichen B-Vitaminen (B1, B2, B6 und B12) wird ihre ernährungsphysiologische Bedeutung unterstrichen [38].

Einige der Proteine verfügen über interessante Eigenschaften im Hinblick auf sowohl pharmazeutische als auch technische Anwendungen, wie beispielsweise als Nahrungsmittelzusatz oder als Stabilisator von Lebensmitteln [39].

Von den vielen Bestandteilen der Molke verspricht man sich vor allem von Lactoferrin und Lactoperoxidase vielfältige Einsatzmöglichkeiten, beispielsweise im Lebensmittelbereich (Functional Food).

4.1.1 Lactoferrin

Lactoferrin ist ein natürliches Glykoprotein aus der Familie der Transferrine. 1960 wurde es von Groves und Johansson aus humaner Milch isoliert und in der Zwischenzeit in der Milch verschiedener anderer Säugetiere (Rind, Pferd, Maus, Schwein, Ziege) nachgewiesen [41 – 42]. Es besteht aus einer 708 Aminosäuren beinhaltenden einsträngigen Aminosäurekette, die zweilappig ist, und zwei N-glycosidisch gebundenen Glykanen. An jede dieser zwei Zonen kann ein Fe^{3+} - Ion koordinativ gebunden werden. In Anwesenheit eines Bicarbonat-Ions oder eines Carbonats-Ions kann jede Zone ein Fe^{3+} - Ion reversibel binden [43 – 44].

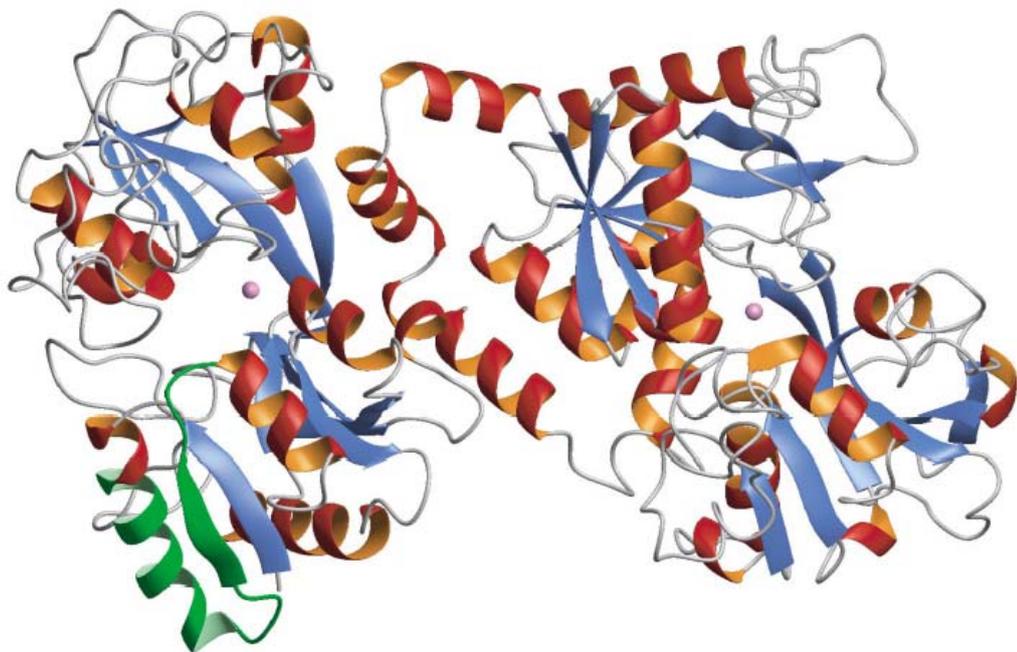


Abbildung 4.02: Kristallstruktur von bovinem Lactoferrin; grün dargestellt: Lactoferrinsequenz, blau: β -Faltblatt, rot: α -Helices [45]

Das im menschlichen Körper vorliegende Lactoferrin ist zu 15 bis 20 % mit Eisen gesättigt und wird als holo-Lactoferrin bezeichnet. Wenn die Eisensättigung weniger als 5 % beträgt, wird es als apo-Lactoferrin bezeichnet [46].

In großen Konzentrationen kommt Lactoferrin in der Muttermilch vor. Während der Lactoferringehalt in Kuhmilch zwischen 0,02 und 0,2 g/l beträgt, ist der Anteil in humaner Muttermilch mit 2 g/l bedeutend größer. In den Tagen nach der Geburt kann der Anteil in der Milch sogar bis auf 10 g/l ansteigen [50, 51, 57].

Lactoferrin spielt bei vielen physiologischen Vorgängen eine regulatorische Rolle. Abbildung 4.03 zeigt mögliche Funktionen von Lactoferrin zusammengefasst.

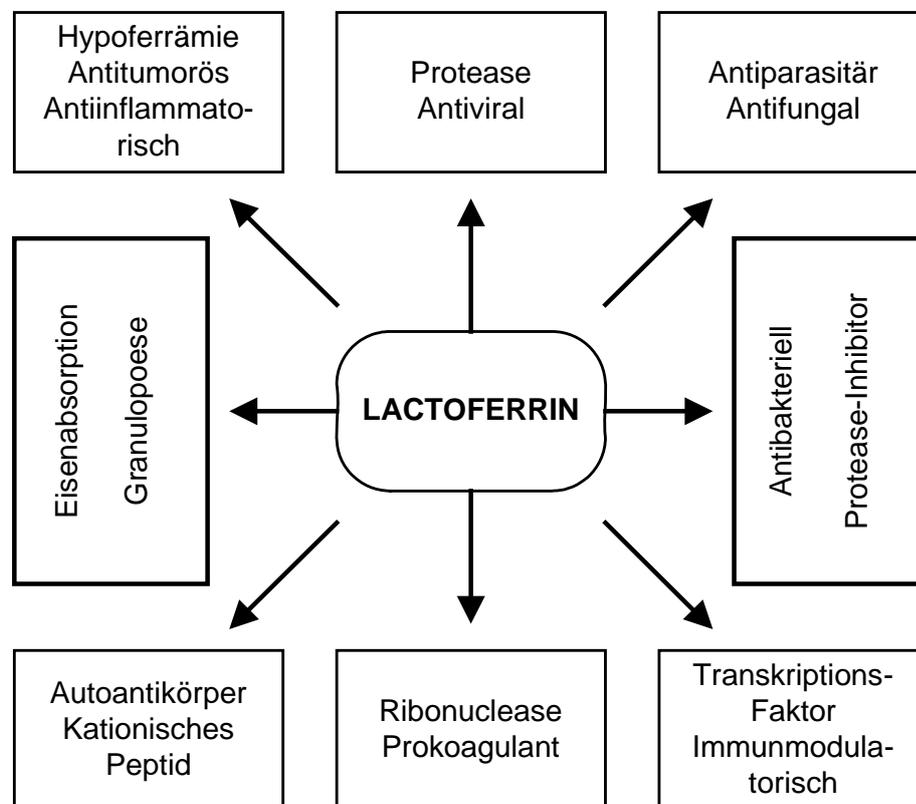


Abbildung 4.03: Mögliche Funktionen von Lactoferrin [43]

Lactoferrin besitzt bakterio-statische, gegenüber gram-negativen Bakterien auch bakterizide Wirkung. Dies gelingt dadurch, dass Lactoferrin das Eisen, das die Bakterien für ihr Wachstum benötigen, bindet. Wird Eisen bei einer Infektion durch Lactoferrin entzogen, ist eine Vermehrung der Erreger unmöglich. Durch Zugabe von Eisen kann dieser bakterio-statische Effekt aufgehoben werden. Außerdem

gibt es Bakterienspezies, die in der Lage sind, das gebundene Eisen mit Hilfe von Lactoferrinrezeptoren wieder herauszulösen oder durch Bildung von Chelatkomplexen die Bindung des Eisens an Lactoferrin zu verhindern und es auf diese Art selbst wieder zu verstoffwechseln [50]. Des Weiteren wurden für Lactoferrin deutliche Hinweise auf antivirale und antifungale Aktivität sowie auf Wirksamkeit gegen parodontaler Erkrankungen und Tumorstadium beobachtet [51 – 61].

Die genaue Wirkungsweise des Proteins ist noch nicht vollständig aufgeklärt, es wird aber vermutet, dass ein Molekülabschnitt nahe der N-Schleife des Lactoferrins für antibakterielle Eigenschaften verantwortlich ist. Diese Peptidsequenz erhielt von Tomita den Namen LactoferricinTM, in der Literatur auch unter dem Begriff Lactoferroxin bekannt. Das nachfolgende Kapitel beschäftigt sich genauer mit dieser Peptidsequenz.

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Gewinnung von Lactoferrin basieren auf der Säulenchromatographie [62 – 64]. In der vorliegenden Dissertation wurde anstelle einer Chromatographiesäule ein Membranadsorber verwendet [65 – 70].

4.1.2 Lactoferricin

Lactoferricin (LFcin) ist eine antimikrobiell wirkende Peptid-Sequenz von Lactoferrin, die in der N-terminalen Region sitzt und aus 18 Aminosäuren besteht. Dieser wird durch eine Cystin-Disulfid-Brücke zwischen den Aminosäuren 19 und 36 gebildet. Es entsteht durch die im Magen mittels Pepsin stattfindende Spaltung des Lactoferrins.

Verschiedene Lactoferricin-Moleküle sind bekannt, ihr exakter Aufbau variiert je nach Spezies. So wird zwischen dem Lactoferricin aus humanem Lactoferrin (LFcinH) und bovinem Lactoferrin (LFcinB) unterschieden. In der folgenden Abbildung 25 sind die Primärstrukturen im Ein-Buchstaben-Code von Lactoferricin H und Lactoferricin B dargestellt.

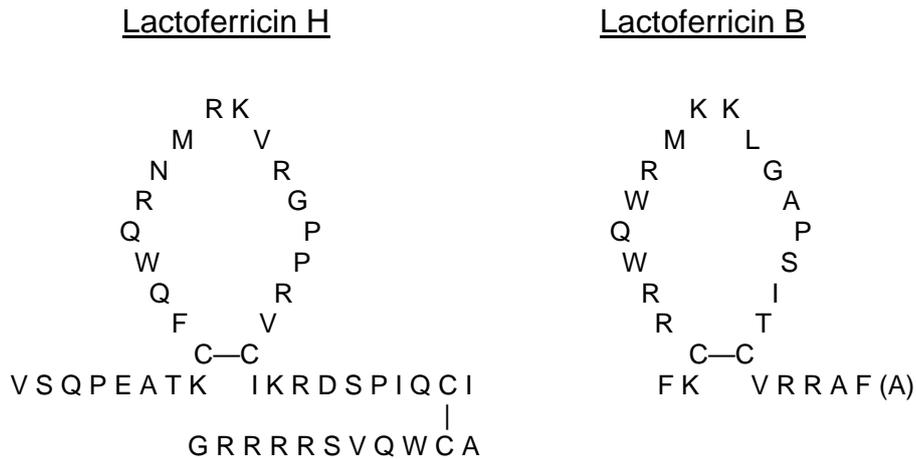


Abbildung 4.04: Primärstrukturen von Lactoferricin H (LFcinH) und Lactoferricin B (LFcinB) [71]

Das Lactoferricin H ist ein Heterodimer, in dem die zwei Lactoferrin-Fragmente mit den Aminosäuresequenz-Positionen 12 – 47 sowie 1 – 11 über eine Cystin-Einheit miteinander verknüpft sind.

Von dem kleineren Lactoferricin B wurden zwei Varianten gefunden, die sich durch eine Aminosäure mehr oder weniger unterscheiden. Die erste Variante hat die Aminosäure – Positionen 17 – 41 (LFcinB₁) und die zweite 17 – 42 (LFcinB₂). Die Molekulargewichte betragen 3.125 Da (LFcinB₁) und 3.195 Da (LFcinB₂). Diese Fragmente treten bei dem Lactoferrinverdau immer gemeinsam in wechselnden Mengenverhältnis auf [72].

Lactoferricin zeigt stark antimikrobielle Wirkung gegen eine große Anzahl von grampositiven als auch gramnegativen Bakterien sowie gegen Pilze und Hefen [73 – 77]. Die minimalen Wirkkonzentrationen von Lactoferricin sind im Vergleich zu Lactoferrin bis ca. 20 mal niedriger. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt in der Größe des Lactoferricins. Das Lactoferricin ist gegenüber dem Lactoferrin (ca. 82.000 Da) viel kleiner. Im Protein-Fragment des Lactoferricins liegt das aktive Zentrum frei im Raum, während beim Lactoferrin das aktive Zentrum sterisch gehindert ist [71].

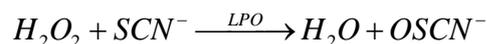
Die Lactoferricin-Sequenzen liegen außerhalb der eisenbindenden Domäne der N - Schleife des Lactoferrins. Die antibakterielle Wirkung des Lactoferricins ist daher im Gegensatz zum Lactoferrin unabhängig vom Eisengehalt der Umgebung und besteht darin, dass es nach der Bindung an die Bakterien zur Cytoplasmamembran gelangt und diese beschädigt. Dies führt zu einem schnellen Verlust des

elektrischen Transmembranpotentials und des pH-Gradienten, wodurch wichtige Prozesse wie z. B. ATP-Synthese, Na⁺- und K⁺- Ionen-Transport verhindert werden [77 – 80].

Das Interesse an Lactoferricin ist aufgrund seiner größeren Wirkung in den letzten Jahren gewachsen. In Japan wird das Peptid bereits im großtechnischen Maßstab auf Basis der Säulenchromatographie von der Firma Morinaga Milk Industries produziert [81]. In der vorliegenden Dissertation wurde anstelle einer Chromatographiesäule eine Kationenaustauscher-Membran verwendet.

4.1.3 Lactoperoxidase

Lactoperoxidase (LPO) ist ein Hämenzym mit einem Molekulargewicht von ca. 78 kDa. In der Milch ist es das am stärksten angereicherte Enzym [82]. Das Lactoperoxiase-System ist ein interessantes Biokonservierungsmittel, das in nativer Milch vorhanden ist und durch Pasteurisation zerstört wird. Es besteht aus drei Komponenten: Lactoperoxidase, Thiocyanat und Wasserstoffperoxid. Dieses System besitzt antimikrobielle Aktivität. Dabei liegen Lactoperoxidase und Thiocyanat jeweils frei in der Milch vor. Wasserstoffperoxid konnte in der Milch bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich wird Wasserstoffperoxid ständig produziert und aufgrund seiner starken zelltoxischen Eigenschaften sofort wieder abgebaut. Um die Wirksamkeit des Lactoperoxidase-Systems in-vitro zu gewährleisten, müssen die Systemkomponenten gleichzeitig in optimalem Verhältnis in der Milch vorhanden sein. Als mikrobiell wirksame Substanz wurde Hypothiocyanat identifiziert, welches mit Hilfe von Lactoperoxidase nach folgender Gleichung gebildet wird:



Das Hypothiocyanat oxidiert SH-Gruppen einiger Proteine zu Disulfidgruppen, wodurch der Mikroorganismus letal geschädigt wird. Die Aktivität und die Konzentration der Lactoperoxidase in Milch, dementsprechend auch in Molke, unterliegt starken Schwankungen. Diese Schwankungen sind auf die Fütterung,

Rasse und Laktation verschiedener Tiere, d. h. in dem Zeitraum der Milchabgabe, zurückzuführen. Fütterungsabhängig schwanken die in der Milch messbaren Lactoperoxidase-Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 mmol/l. Die Aktivitätsschwankungen können zwischen 0,05 U/ml und 5 U/ml liegen und sind besonders zu Beginn der Milchabgabe sehr groß [51, 83].

Lactoperoxidase fällt bei der Isolierung von Lactoferrin aus Molke als Nebenprodukt an. Wie bei jedem Enzym ist vor allem die Aktivität ein wichtiger und preisbestimmender Faktor. Lactoperoxidase kostet je nach Units/mg zwischen 60 und 120 € je 5 mg (Sigma). Typische Anwendungsgebiete sind diätische Lebensmittel, Sportler- und Babynahrung. Auch pharmazeutische und kosmetische Anwendungen sind denkbar.

In dieser Arbeit wurde deshalb auch die Aktivität der isolierten Lactoperoxidase mit einem enzymatischen Assay bestimmt. Die Auftrennung von Lactoferrin und Lactoperoxidase, die beide an Kationenaustauschermembran gebunden werden, erfolgte mit unterschiedlichen Salz-Stufengradienten, wobei Lactoperoxidase bei geringeren Salzkonzentrationen eluiert wurde als Lactoferrin.

5 Membranfiltration

Als Filtration wird eine physikalische Trennmethode bezeichnet, bei der gelöste oder suspendierte Teilchen oder Moleküle einer Lösung aufgrund ihrer Größe getrennt werden können. Die Separation von Partikeln mittels Membranen wird Membranfiltration genannt. Die Verwendung von Membranen zur Fraktionierung von Medien bietet einige Vor- und Nachteile gegenüber anderen Techniken wie z.B. Zentrifugation:

Vorteile:

- leichtes Up-Scaling
- milde Reaktionsbedingungen
- einfache Handhabung
- geringer Energieaufwand

Nachteile:

- geringe Selektivität
- begrenzte Lebensdauer der Membran
- Membranfouling (Partikelablagerungen an oder in die Poren der Membran)

5.1 Filtrationsverfahren

Die Möglichkeit, gezielte Stofftrennungen bei niedrigen Temperaturen bzw. Umgebungstemperaturen ohne Phasenänderung durchzuführen, führt dazu, dass die Membranfiltration in vielen Anwendungsbereichen eine kostengünstige Lösung ist, als die eher konventionellen Verfahren wie Vakuum-Drehfiltration oder Filterpressen. Die Membranfiltration umfasst die folgenden Trennverfahren:

- Reverse Osmose (RO-Membranen, Porengröße $< 0,0001 \mu\text{m}$)
- Nanofiltration (NF-Membranen, Porengröße $0,001 - 0,0001 \mu\text{m}$)
- Ultrafiltration (UF-Membranen, Porengröße $0,001 - 0,02 \mu\text{m}$)

- Mikrofiltration (MF-Membranen, Porengröße 0,02 – 10 µm)

Die Reverse Osmose ist ein wirtschaftliches Hochdruckverfahren, das zur Abtrennung von Wasser aus Prozessflüssigkeiten, Konzentrierung von niedermolekularen Lösungen oder zur Abwasserreinigung eingesetzt wird. Zum allgemeinen Einsatzbereich in der Nahrungsmittel- und Milchindustrie gehören auch das Aufkonzentrieren von Flüssigkeiten vor dem Verdampfungsprozess und die Filtration von Prozesswasser.

Die Nanofiltration ist ein Filtrationsverfahren zwischen UF und RO und dient der Abtrennung von niedermolekularen Verbindungen wie Zucker, gelösten Mineralien und Salzen. Typische Anwendungen sind Ascheentfernung aus Milchprodukten und Gewinnung von hydrolysierten Proteinen. Abbildung 5.01 stellt die Membranfiltrationsverfahren vergleichend dar.

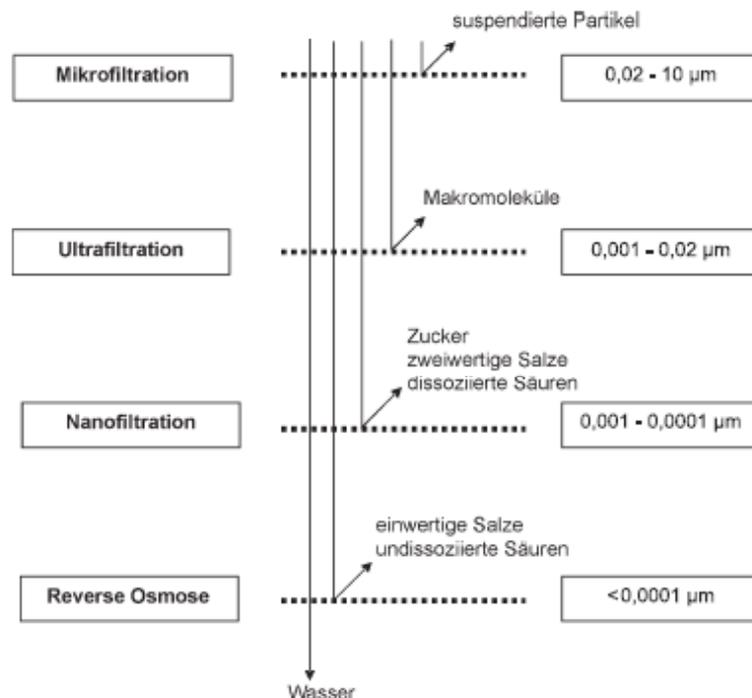


Abbildung 5.01: Klassifizierung der Filtrationsverfahren [84]

Bei der Ultrafiltration handelt es sich um ein Trennverfahren zur Konzentrierung und Reinigung von mittel- bis hochmolekularen Stoffen wie pflanzliches Eiweiß,

Milcheiweiß, Kohlenhydrate und Enzyme. Typische Anwendungsgebiete sind die Konzentrierung von Molkenproteinen sowie Klärung von Fruchtsäften.

Die Mikrofiltration ist ein Verfahren zur Abtrennung von hochmolekularen Schwebstoffen. Typische Anwendungen: Zellabtrennung aus Kulturlösungen, Fraktionierung von Milchproteinen und Rückgewinnung von chemischen Reinigungsmitteln. In der vorliegenden Dissertation wurde das Ultrafiltrationsverfahren zur Aufkonzentrierung von Molkenproteinen eingesetzt. Die in der Molke enthaltenen Schwebstoffe wurden mittels Mikrofiltration entfernt.

Die Selektivität einer Membran in einem Filtrationsprozess wird über den Retentionsfaktor (R) (Feststoff-Filtration) oder den Trennfaktor (α) (Gasfiltration; Filtration von Gemischen organischer Flüssigkeiten) definiert. Sie geben die Verteilung der Komponenten zwischen Permeat und Retentat an (Gleichung 5.1.1 und 5.1.2).

$$\alpha_{A/B} = \frac{\frac{c_P^A}{c_P^B}}{\frac{c_F^A}{c_F^B}} \quad (\text{Gl. 5.1.1})$$

Index A = Komponente A; Index B = Komponente B

Der Index der Komponente, dessen Permeation größer ist, wird an die erste Stelle gesetzt. Trennfaktor $\alpha_{A/B}$ bedeutet, dass die Permeation der Komponente A größer ist als die von Komponente B, bei Trennfaktor $\alpha_{B/A}$ ist genau umgekehrt. Ein Wert von 1 für beide Trennfaktoren ($\alpha_{A/B} = \alpha_{B/A} = 1$) bedeutet, dass keine Komponententrennung erreicht wurde.

$$R = \frac{c_F - c_P}{c_F} \quad (\text{Gl. 5.1.2})$$

c_F = Konzentration im Retentat; c_P = Konzentration im Permeat

Retentionsfaktor (R) kann zwischen 0 und 1 liegen. $R = 1$ bedeutet, dass die Komponente vollständig in der Feed-Lösung (Retentat) verbleibt. Ein Wert von 0 bedeutet totale Permeation der Komponente durch die Membran.

Zwei weitere wichtigen Größen sind die Ausbeute (S) und der Konzentrierungsfaktor (f).

$$S = \frac{q_P}{q_F} \quad (\text{Gl. 5.1.3})$$

q_P = Flussrate Permeat; q_F = Flussrate Feed

Es gibt je nach Prozessführung zwei Konzentrierungsfaktoren $f_{\text{kontinuierlich}}$ oder f_{batch} .

$$f_{\text{kontinuierlich}} = \frac{q_F}{q_R} \quad (\text{Gl. 5.1.4})$$

q_R = Flussrate Retentat

$$f_{\text{batch}} = \frac{V_{t=0}}{V_{\text{Ende}}} \quad (\text{Gl. 5.1.5})$$

V = Volumen

5.2 Arten der Prozessführung

Es wird zwischen zwei Betriebsarten der Membranfiltration unterschieden: statische (dead end) und dynamische (crossflow) Filtration. Abbildung 5.02 zeigt diese zwei Arten der Filtration im Vergleich.

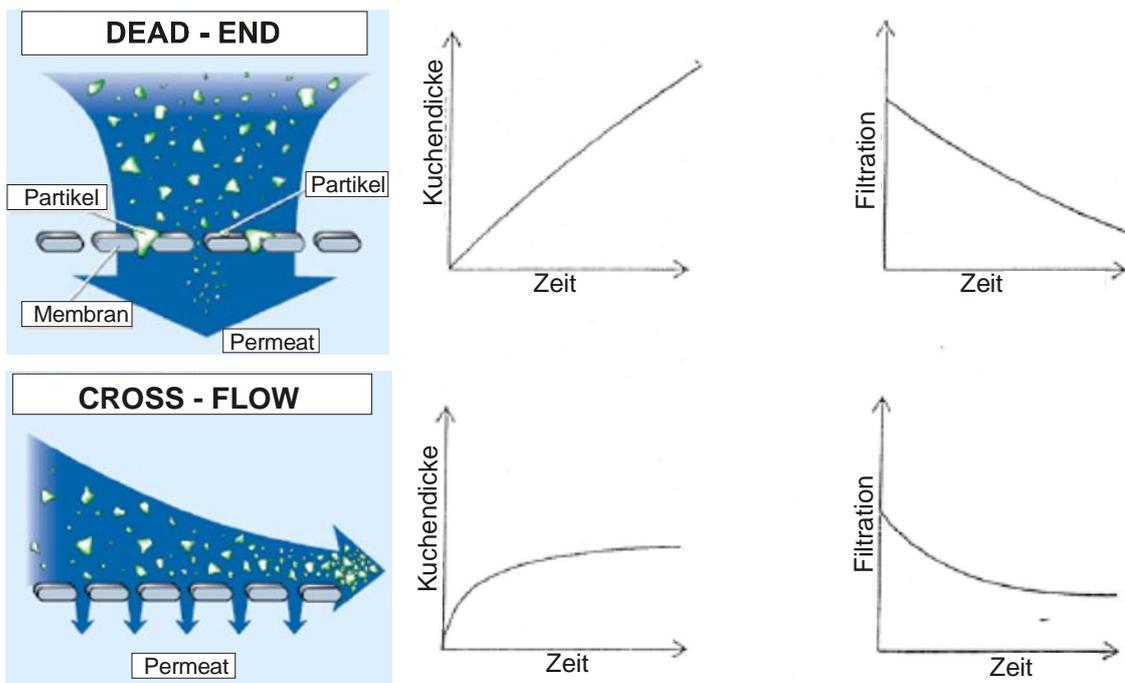


Abbildung 5.02: Vergleich der Filtrationsarten [101]

Bei der statischen (dead end) Filtration unterscheidet man in Tiefen- und Kuchenfiltration. In der Tiefen Filtration werden die Zellen auf der Oberfläche und in der Tiefe des Filtermediums zurückgehalten. Der Filterwiderstand nimmt in diesem Fall schlagartig beim Auftreten einer Verblockung des Filtermedium stark zu. Hier werden zunehmend verschiedene adsorptive grobe Filtermedien (Schichtenfilter) verwendet, die eine nachfolgende Klär- und Sterilfiltration schützen.

Bei der Kuchenfiltration lagern sich alle zurückgehaltenen Partikel auf der Membranoberfläche ab und bilden somit einen Filterkuchen. Dieser so genannte Filterkuchen wächst während der Filtration ständig an und es kommt zu einer Abnahme des Flusses durch die Membran bzw. Verblockung.

Bei der dynamischen Filtration, auch Querstrom- oder Crossflow-Filtration genannt, wird das Medium tangential zur Membranoberfläche geführt. Dabei werden Teile der gebildeten Deckschicht wieder abgetragen und somit längere Standzeiten ermöglicht. Crossflow-Membranfiltration gewinnt weltweit zunehmend Akzeptanz als ein wichtiger Verfahrensschritt in Prozessanlagen für die nahrungsmittelverarbeitende, pharmazeutische und biotechnologische Industrie, für die Stärke- und Süsstoffproduktion und die Milchwirtschaft.

Die statische Filtration (dead end) wird z.B. bei der Aufarbeitung von Oberflächenwasser zu Trinkwasser oder zur Entkeimung angewandt. Hier ist die Konzentration der abzutrennenden Inhaltsstoffe sehr niedrig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Molke und Molkenkonzentrat gearbeitet. Deswegen wurde die dynamische Filtration (crossflow) angewandt. Einige Anwendungsgebiete der Membranverfahren bei biotechnologischen Prozessen sind in Abbildung 5.03 gezeigt.

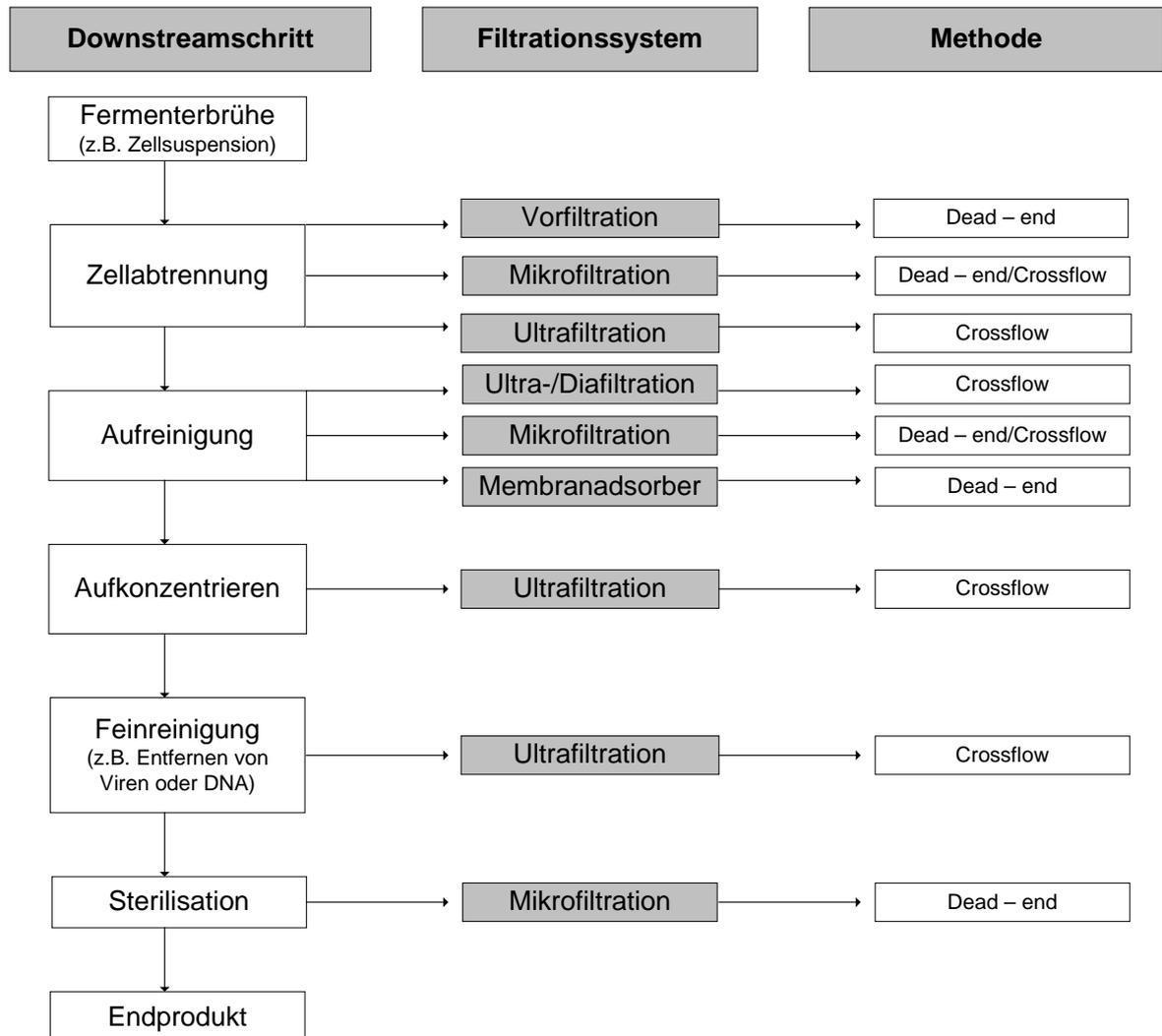


Abbildung 5.03: Einsatzgebiete von Membranverfahren in der Bioverfahrenstechnik [84]

5.3 Membranfouling und Reinigung

Membranfouling ist ein limitierender Faktor der Crossflow-Filtration. Es existieren für die mathematische Beschreibung der Vorgänge bei der Crossflow-Filtration verschiedenste Modelle [88 – 90]. Diese Modelle beschreiben den Verlauf der Filtration sehr ungenau, weil eine Berücksichtigung der komplexen Zusammensetzung der zu filtrierenden Lösung nur sehr schwer möglich sind. Während des Filtrationsvorgangs bildet sich eine Grenzschicht, die als Sekundärmembran oder dynamische Membran bezeichnet wird. Die Bildung einer Sekundärmembran führt zur Verringerung des Permeatflusses und des Retentionsverhalten der Membran. Einige Faktoren, die das Fouling beeinflussen, sind:

- Unspezifische, irreversible Wechselwirkung von Proteinen, Lipiden und Ölen mit dem Membranmaterial
- Geringer Retentatfluss
- Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membran
- Physikalisch-chemische Eigenschaften der Feedlösung:
 - Hohe Salzkonzentrationen
 - Temperatur
 - pH-Wert
- Membranmorphologie
- Porengröße
- Alter bzw. Betriebsstunden der Membran

Nach der Filtration muss jede Membran gereinigt werden. Bei der Reinigung der Membran sollten folgende Punkte berücksichtigt werden:

- Die Reinigung sollte bei möglichst hohen Temperaturen erfolgen, da die Kinetik chemischer Reaktionen stark temperaturabhängig ist.
Limitierende Faktoren sind:
 - Membranmaterial
 - Temperaturoptimum der verwendeten Enzyme
 - Zeit
- Die Reinigungslösung sollte mit hoher Flussgeschwindigkeit durch das Modul gepumpt werden, um gebildete Deckschichten weitgehend zu entfernen
- Das zu reinigende Membranmaterial sollte gegen die eingesetzten Reinigungsmitteln beständig sein. Limitierende Faktoren sind:
 - pH-Wert
 - Wasserqualität

Um den Umfang der Verschmutzung der Membran abschätzen zu können, wird vor Beginn der Filtration Wasserfluss durch die Membran, auch Wasserwert genannt, bestimmt. Der Fluss wird bei festgelegten Parametern (z.B. Ein-/Ausgangsdruck, Temperatur) mit Wasser oder Pufferlösung (Membranmaterial-abhängig) bestimmt. Nach der Filtration wird die Membran dann so lange mit

entsprechenden Reinigungsmitteln gereinigt, bis die zuvor ermittelte Wasserwert wiederhergestellt ist. Der wichtigste Faktor für Aufnahme des Wasserwertes ist die Wassertemperatur, da der Wasserfluss (Permeatfluss) stark temperaturabhängig ist [88]:

$$1,276 \cdot J_{\text{Wasser}}^{15^\circ\text{C}} = J_{\text{Wasser}}^{25^\circ\text{C}} = 0,615 \cdot J_{\text{Wasser}}^{50^\circ\text{C}} \quad (\text{Gl. 5.3.1})$$

5.4 Membranen mit aktivierten Oberflächen

Durch die Aktivierung der Oberflächen von Membranen können diese zu Adsorbersystemen umgestaltet werden. Dabei werden funktionelle Gruppen an die Porenwände einer mikroporösen Membran fixiert. Funktionelle Membranen können Moleküle anhand ihres chemischen Verhaltens selektiv binden. Membranadsorber werden zur Aufreinigung von Proteinen aus Zellkulturüberständen, Entfernung von DNA aus Produkten oder Entfernung von Endotoxinen aus Lösungen eingesetzt. Kommerziell erhältlich sind vier Ionenaustauschertypen.

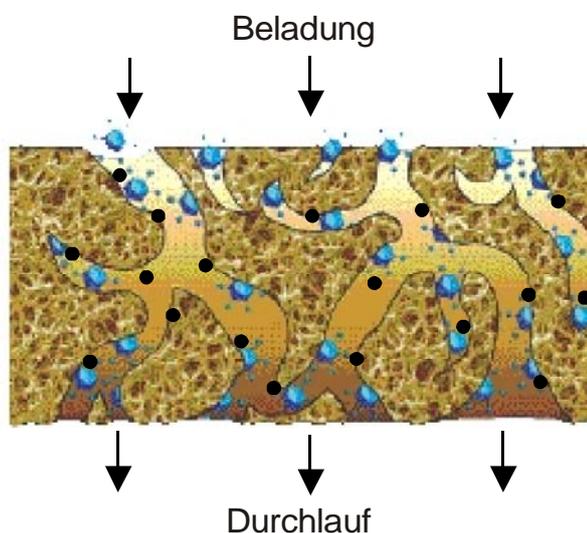


Abbildung 5.04: Schematische Darstellung einer mikroporösen Membran mit funktionellen Gruppen (• funktionellen Gruppen, s. Tabelle 5.1) [86]

Tabelle 5.1: Funktionelle Gruppen [86]

Sulfonsäure (S)	Quartäres Ammonium (Q)	Carboxyl (C)	Diethylamin (D)
$R-CH_2-SO_3^-Na^+$	$R-CH_2-N^+(CH_3)Cl^-$	$R-COO^-$	$R-CH_2-N(C_2H_5)_2$
Stark saurer	Stark basischer	Schwach saurer	Schwach basischer
Kationenaustauscher	Anionenaustauscher	Kationenaustauscher	Anionenaustauscher

Die Verwendung von Membranen als stationäre Matrix bei chromatographischen Prozessen bietet viele Vorteile im Vergleich zu konventioneller Säulenchromatographie:

- hohe Flussraten, da die Adsorption nicht diffusionslimitiert abläuft
- geringere Produktionskosten
- einfache Handhabung
- einfaches Scale up

Die Membranadsorber sind in den verschiedensten Bauformen vom Laboreinsatz bis hin zur industriellen Großanlage erhältlich.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ausschließlich mit stark sauren Membranadsorbern der Firma Sartorius AG, Göttingen, Deutschland zur Isolierung von Proteinen aus Molke und Molkenkonzentrat gearbeitet.

6 Molkenaufarbeitung

Zu der Vorbehandlung des Filtrationsmediums zum Schutz des Membranadsorbers vor Verblockung wurden bereits grundlegende Untersuchungen durchgeführt [9, 68, 87]. Die in der Molke enthaltenen Schwebstoffe wie Caseine, Lipide und Proteinpräzipitate führen zur Verblockung des Membranadsorbers und erschweren somit die Isolierung von Lactoferrin. Sowohl Molke als auch Molkenkonzentrat lassen sich nicht ohne Vorbehandlung auf den Membranadsorber auftragen. Die Filtration von Molke bzw. Molkenkonzentrat stellt den ersten Vorbehandlungsschritt bei der Lactoferrin-Gewinnung unter Verwendung eines Membranadsorbersystems dar.

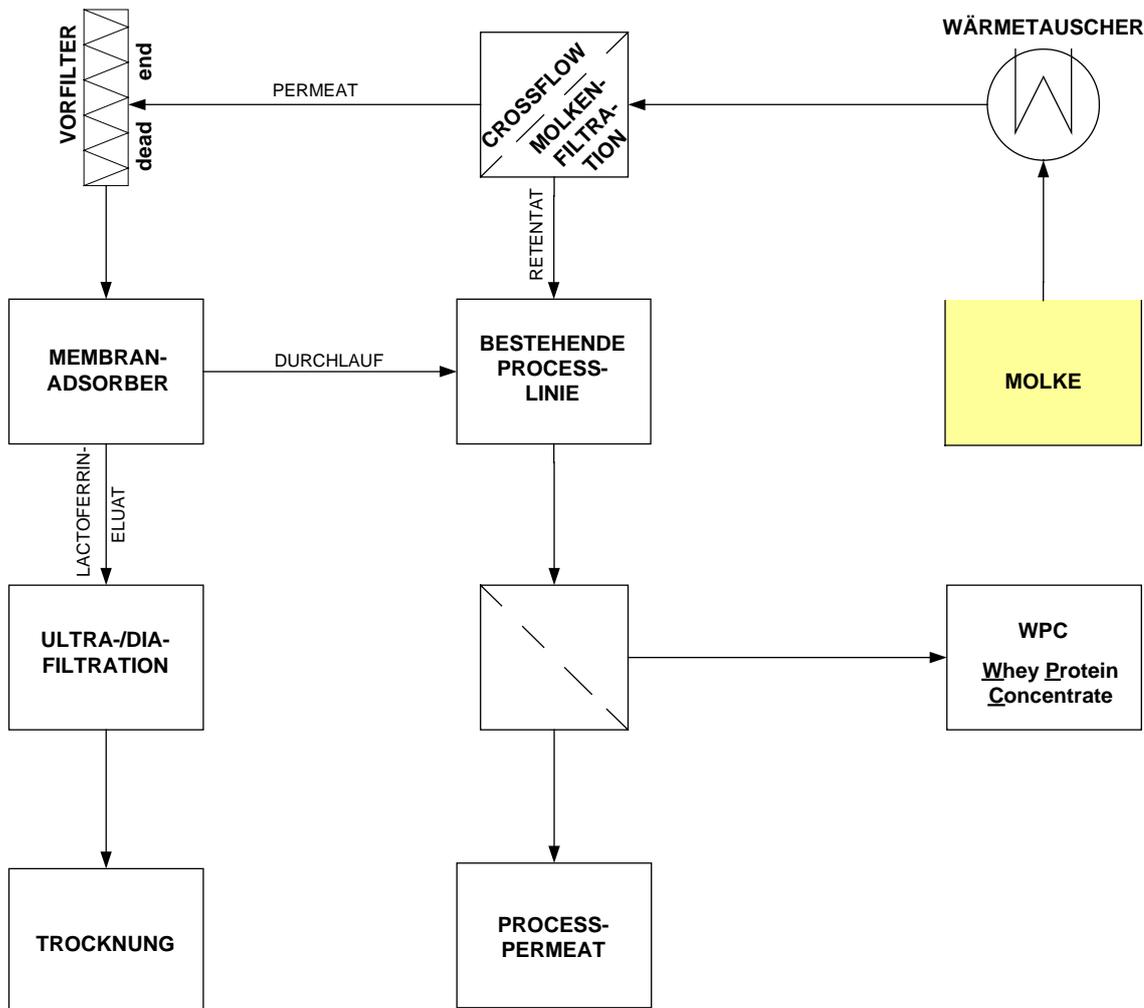


Abbildung 6.01: Schematische Darstellung der Lactoferrin-Gewinnung mit dem etablierten Molkenverarbeitungsprozess des Projektpartners (Biolac GmbH & Co. KG)

Abbildung 6.01 zeigt die schematische Darstellung des entwickelten Lactoferrin-gewinnungsprozesses mit dem etablierten Molkenverarbeitungsprozess des Projektpartners. Um einen reibungslosen kontinuierlichen Betrieb zu ermöglichen, wurden in der vorliegenden Dissertation Optimierungen der dargestellten Prozess-schritte durchgeführt.

6.1 Crossflow - Mikrofiltration

Für die Vorklärung der Molke stand eine 4 m²-Kompaktanlage der Firma Microdyn zur Verfügung. Die Anlage verfügt über vier 0,2 µm - Microdyn-Rohrmodule.

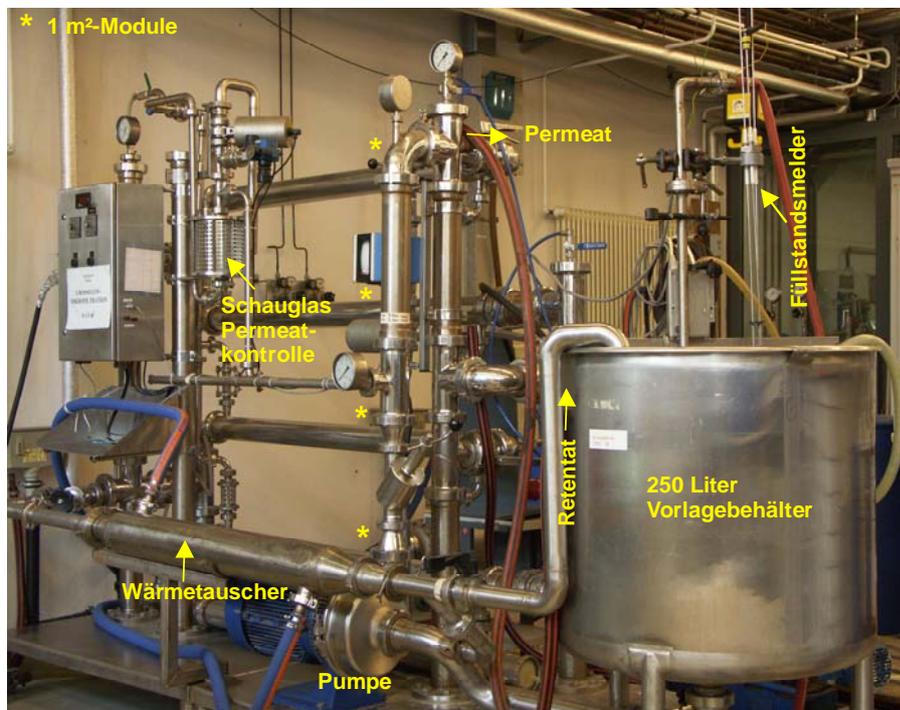


Abbildung 6.02: 4 m²-Anlage zur Mikrofiltration von Molke (Firma Microdyn)

Nach der gründlichen Überholung dieser Anlage wurde die Optimierung durchgeführt. Die Optimierung basierte darauf, dass die Crossflow-Mikrofiltration bei Temperaturen über 40°C schnell und effektiv verläuft [88]. Die Mikrofiltrationsanlage ist nur mit einem Wärmetauscher ausgestattet. Durch den Einsatz des anlageninternen Wärmetauschers konnte die optimale Filtrationstemperatur von 50°C erst nach einer Stunde erreicht werden. Um die optimale Filtrations-

temperatur schneller erreichen zu können, wurde ein externer Wärmetauscher in Betrieb genommen (s. Abbildung 6.01). Dadurch erfolgte das Vorwärmen des Filtrationsmediums vor dem Eintritt in die Filtrationsanlage. Die ersten Versuche zeigten, dass die Starttemperatur der Molke von 6°C auf 25°C erhöht werden kann. Durch den gemeinsamen Einsatz beider Wärmetauscher konnte schon nach 20 min die Filtrationstemperatur von 50°C erreicht werden. Molke als Rohstoff wurde von der Firma Kraft, Fallingbommel, zur Verfügung gestellt. Es wurden pro Versuch 1.000 l Molke filtriert. Nach der Mikrofiltration wurden durchschnittlich 800 l Permeat erhalten. Das entspricht einem Konzentrierungsfaktor (f_{batch}) von 5 (s. Kapitel 5; s. Anhang 14.6).

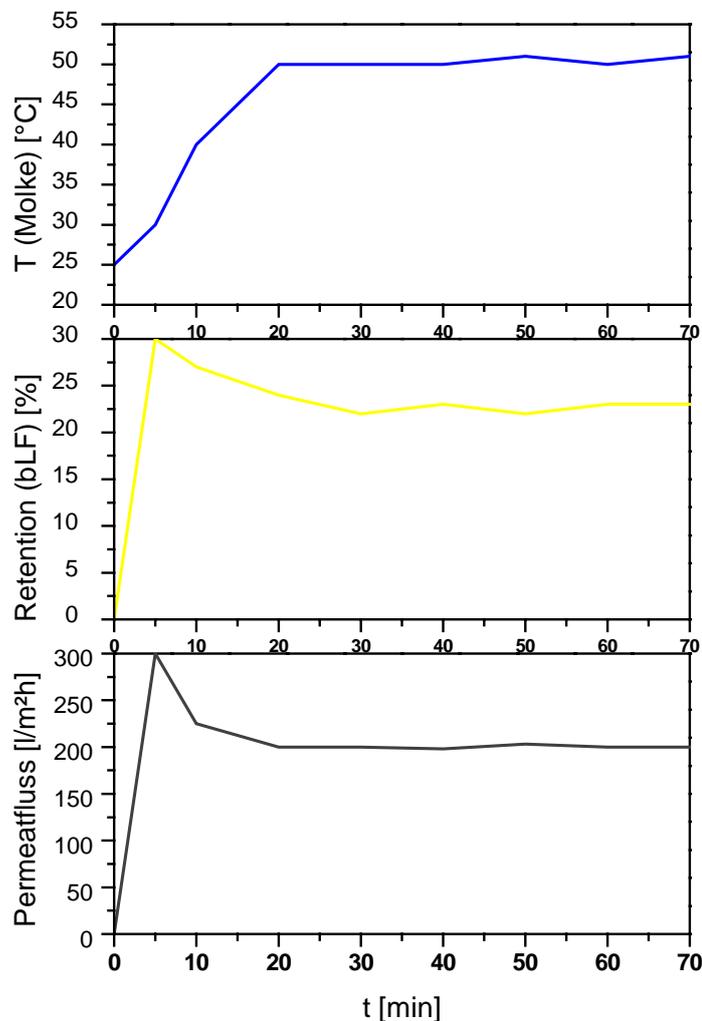


Abbildung 6.03: Verlauf der Mikrofiltration von Molke mit Microdyn-Rohrmodulen; Material Polypropylen; Porengröße 0,2 µm; Membranfläche 4 m²

Der Grad der Aufreinigung durch die Filtration wurde durch die Transmissionsmessungen von Molke und Permeaten mit einem Uvikon 922 Spektrometer, Kontron Instruments, bei 600 nm gegen Wasser bestimmt. Die Transmissionswerte der gelieferten Molke lagen im Durchschnitt bei 20 %. Bei den erhaltenen Permeaten wurden Transmissionswerte von ca. 80 % gemessen.

Es lässt sich erkennen, dass in den ersten Minuten ein sehr hoher Permeatfluss herrscht. Dieser fällt nach 5 min Crossflow-Mikrofiltration, lässt sich dann aber unter manueller Drosselung des Retentatflusses konstant halten. Auf diese Weise wurde auch der Eingangsdruck von 2,0 bar über die Filtrationszeit von 70 min konstant gehalten. Wie der Abbildung 6.03 zu entnehmen ist, stellen die Retentionswerte keine zufrieden stellenden Ergebnisse dar. Obwohl die gewählten Porendurchmesser (0,2 μm) eine vollständige Permeation des Lactoferrin erlauben sollten, wurde im Durchschnitt 25 % des Lactoferrins im Retentat nachgewiesen (s. Anhang 14.8). Dies wurde durch das Membranfouling verursacht. Eine mögliche Ursache dafür ist das Alter der verwendeten Membranen. Diese werden schon seit 1998 für die Crossflow-Mikrofiltration eingesetzt. Eine genaue Anzahl von Betriebsstunden kann leider nicht angegeben werden. Die Optimierung durch Erhöhung von Überströmungsgeschwindigkeit und somit von Scherraten konnte mit der verwendeten Anlage nicht durchgeführt werden. Die Erhöhung der Retentatflüsse war mit dieser Anlage nicht möglich, da die Leistung der anlageninternen Kreiselpumpe nicht regulierbar ist.

Leider erlaubte diese Anlage auch nicht die Messung des Retentatflusses, daher können technischen Daten wie Strömungsgeschwindigkeit und Scherrate nicht berechnet werden. Die maximale Filtrationstemperatur betrug 52°C. Der Permeatfluss lag im Mittel bei 220 l/(m²h). Unter diesen Bedingungen konnten innerhalb von 70 min 800 l Permeat gewonnen werden. Die so erhaltenen Permeate wurden weiterverarbeitet.

6.1.1 Reinigung

Nachdem die Molke aufgereinigt wurde, musste eine Reinigung der Rohrmodule durchgeführt werden. Für die Reinigung wurden preiswerte Chemikalien wie Natronlauge (pH 14), Salzsäure (pH 2) und Ultrasil P3-53 (3 %ige Lösung) verwendet. Die Reinigungstemperatur lag für die verwendeten Chemikalien bei 40°C. Diese Temperatur entsprach dem Temperaturoptimum der im Ultrasil P3 – 53 enthaltenen Enzyme. Die Reinigungslösungen wurden nacheinander in den Vorlagebehälter gegeben und im Kreis gepumpt. Die Filtrationsmodule wurden zwischen dem Wechsel der Reinigungslösungen mit Wasser gespült.

Eine Ausnahme stellt der Vorgang der Rückspülung dar. Hier wurde die Reinigungslösung aus einem externen Behälter über den Permeatausgang der Anlage durch die Membranen in den anlageninternen Vorlagebehälter gepumpt. Es wurden drei Reinigungsmethoden angewendet.

Tabelle 6.1: Reinigung der Rohrmodule; Reinigungsmethoden und Reinigungszeiten

Reinigungs- schritt	Reinigungsmethode		
	1	2	3
Spülen mit Wasser [min]	15	15	15
Ultrasil P3-53 im Kreis pumpen [min]	20	150	40
Über Nacht einwirken lassen [min]	960		
Spülen mit Wasser [min]	20	25	20
Lauge im Kreis pumpen [min]	40		
Säure im Kreis pumpen [min]		50	
Rückspülung mit Lauge [min]			45
Spülen mit Wasser [min]	30	30	30
Gesamtzeit [h]	18	4,5	2,5

Um die Effizienz dieser Reinigungsmethoden beurteilen zu können, wurden vor und nach der Reinigung der Module Wasserwerte bestimmt und miteinander verglichen. In Tabelle 6.2 sind die Ergebnisse des Reinigungsprozesses zusammengefasst.

Tabelle 6.2: Ergebnisse des Reinigungsprozesses

Reinigungsmethode	Wasserwert	Reinigungszeit
	[%]	[h]
1	100	18
2	80	4,5
3	100	2,5

Mit den Reinigungsmethoden 1 und 3 konnte der zuvor bestimmte Wasserwert zu 100 % wiederhergestellt werden. Unterschiedlich sind nur die Reinigungszeiten. Für die Reinigung mit der Methode 3 waren nur 2,5 h notwendig, um den Wasserfluss zu 100 % wiederherzustellen. Hier spielt wahrscheinlich die Rückspülung der Membranen eine entscheidende Rolle. Da die Reinigungszeit ein wichtiges Kriterium der Prozessoptimierung ist, wurden alle weiteren Reinigungsprozesse nach Methode 3 durchgeführt.

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 6.1 – 6.1.1 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Mit Hilfe der 4 m²-Kompaktanlage (Microdyn Rohrmodule; Porengröße 0,2 µm; Material Polypropylen) und externem Wärmetauscher (s. Abbildung 6.01) *war es möglich*

- die Starttemperatur der Molke von 6°C auf 25°C zu erhöhen
- die optimale Filtrationstemperatur von 50°C in 20 min zu erreichen und konstant über 1,5 h zu halten
- den Permeatfluss von 220 l/(m²h) über die gesamte Filtrationszeit konstant zu halten
- effektive Aufreinigung der Molke zu erreichen

war es nicht möglich

- den Permeationsgrad des Zielproteins von unter 90 % zu erreichen

Es wurde eine Reinigungsmethode für den Crossflow-Molkenmikrofiltrationsprozess entwickelt, wodurch eine 100%ige Regeneration des Wasserwertes in nur 2,5 h durchgeführt werden kann.

6.2 Haltbarkeit von Molkenpermeat

Es ist bekannt, dass pH- und Transmissionswerte von Molke bzw. Molkenpermeat mit der Zeit schnell sinken. Die Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat mit sehr niedrigen Transmissionswerten führt zur Verblockung von Membranadsorbern. Permeate, die Transmissionswerte von mindestens 35 % aufweisen, können auf den Membranadsorber aufgetragen werden, ohne dass dieser sofort verblockt [87]. Um zu untersuchen, wie lange das gewonnene Molkenpermeat gelagert werden kann, wurden drei Proben bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Die erste Probe wurde im Kühlschrank (4°C) gelagert. Die zweite Probe wurde tagsüber bei Raumtemperatur und nachts im Kühlschrank aufbewahrt. Durch diese Aufbewahrungsmethode sollte geklärt werden, ob das tagsüber bei Raumtemperatur gelagerte Molkenpermeat am nächsten Tag zur Isolierung von Lactoferrin wieder verwendet werden kann. Die dritte Probe wurde nur bei Raumtemperatur gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden Transmissionsmessungen des Permeats mit einem Uvikon 922 Spektrometer, bei 600 nm gegen Wasser durchgeführt und der pH-Wert des Mediums bestimmt. Die Änderungen der pH- und Transmissionswerte sind in folgenden Abbildungen 6.04 und 6.05 gezeigt.

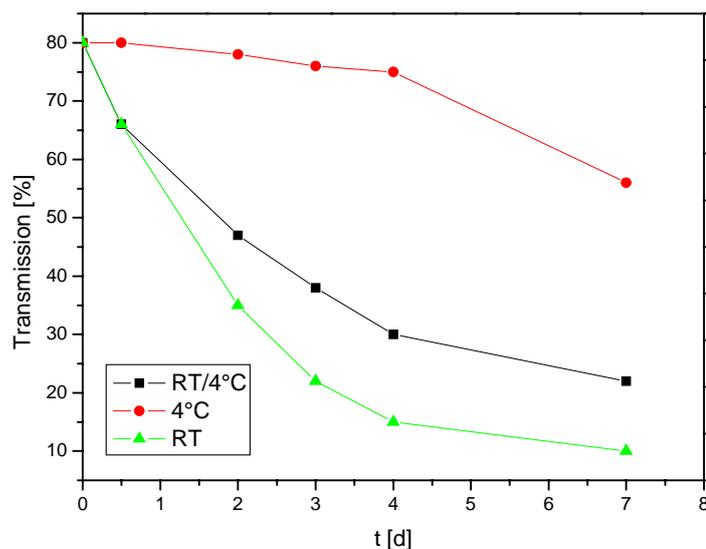


Abbildung 6.04: Änderung der Transmission von Molkenpermeat über einen Zeitraum von 7 d

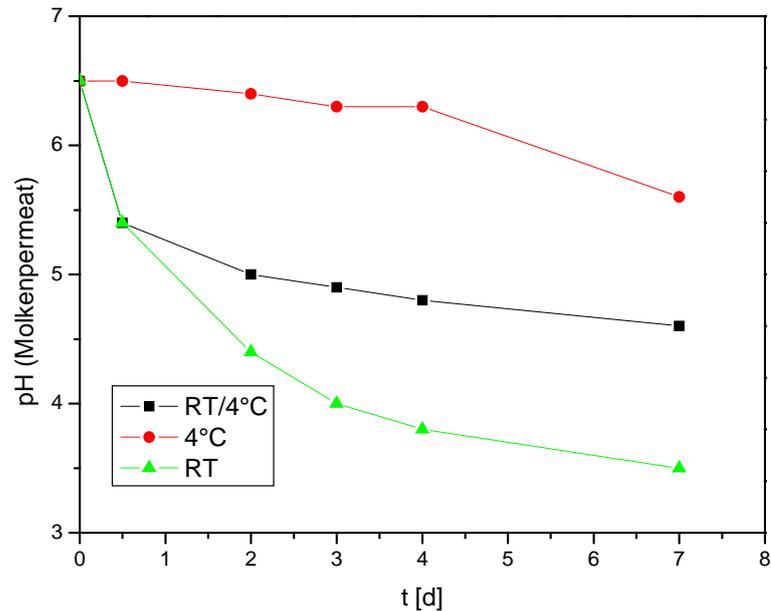


Abbildung 6.05: Änderung des pH-Wertes von Molkenpermeat über einen Zeitraum von 7 d

Abbildung 6.04 zeigt, dass die Trübung von Molkenpermeat bei der Lagerung stark temperaturabhängig sind. Bei 4°C nehmen die Transmissionswerte erst nach einer Lagerungszeit von 4 d deutlich ab. Die Transmissionswerte von Molkenpermeat, das bei Raumtemperatur gelagert wurde, sinken innerhalb von 5 h. Nach einer Lagerungszeit von 2 d lagen diese Transmissionswerte unter 50 %. Nach 4 d lagen die Transmissionswerte von Molkenpermeat bei 20 % und entsprachen damit den Werten von frisch gelieferter Molke.

Die Änderung des pH-Wertes von Molkenpermeat stellt die obige Abbildung 6.05 dar. In der Abbildung 6.05 ist zu erkennen, dass sich eine kühle Lagerung von Molkenpermeat positiv auf die Haltbarkeit in Bezug auf den pH-Wert auswirkt. Erst ab dem 3 d wurde ein leichter Abfall des pH-Wertes beobachtet. Der pH-Wert des abwechselnd gelagerten Permeats sinkt schon innerhalb 1 d von 6,5 auf 5,4. Die kurzzeitige Lagerung bei Raumtemperatur ist ausreichend, um Mikroorganismen (z.B. Lactobacillen) am Leben zu halten, wodurch der pH-Wert des Molkenpermeats sinkt. Lactobacillen gehören zu den Milchsäurebakterien und sind Gram-positiv Stäbchen-Bakterien. Sie werden bei der Käseherstellung als Starterkulturen eingesetzt. Die Menge an Starterkultur ist jeweils von der

Käsesorte abhängig und liegt, nach Angaben von Biolac GmbH & Co. KG, im Bereich zwischen ca. 10 – 20 % pro 1 l Milch. Bei der Mikrofiltration (Porengröße = 0,2 µm; T(Filtration) = 50°C) von Molke landen die Lactobacillen hauptsächlich im Molkenpermeat. Sie sind für den Lactat-Abbau in Molke verantwortlich und sind bei Temperaturen oberhalb 10°C aktiv. Infolge der Säurebildung durch die Lactobacillen sinkt der pH-Wert von Molkenpermeat. Das bei Raumtemperatur gelagerte Molkenpermeat ist schon nach 2 d nicht mehr für die Isolierung von Lactoferrin geeignet, da der pH-Wert deutlich unter 5 liegt. Der pH-Wert spielt eine große Rolle bei der Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat. Je niedriger der pH-Wert, desto mehr Molkenkomponenten liegen im isoelektrischen oder kationischen Zustand vor und binden gemeinsam mit Lactoferrin an die Kationenaustauschermembran, und das Trennungsproblem des Zielproteins wird größer. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchung geht hervor, dass das kühl gelagerte Permeat mindestens 4 d lang für die Weiterverarbeitung verwendet werden kann. Das kühle Lagern von Molke ist auch nach Angaben der Biolac GmbH & Co.KG eine der einfachsten und kostengünstigen Methoden um die Aktivität der Lactobacillen zu unterdrücken.

7 Isolierung von Lactoferrin

Das durch die Mikrofiltration gewonnene Molkenpermeat wird direkt zur Isolierung von Lactoferrin über Membranadsorber geleitet. Die Temperatur des Molkenpermeats beträgt dabei ca. 50°C.

Alle bisher gemachten Versuche zur Langzeitstabilität und Bindekapazität der verwendeten Sartobind S-Membran wurden jedoch bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei den Untersuchungen zur Langzeitstabilität der Membran bei höheren Temperaturen interessiert auch das eigentliche Bindevverhalten des Zielproteins mit der Membran. Diese Untersuchungen wurden mit der Lactoferrin-Lösung und Molkenpermeat im Labormaßstab durchgeführt. Die automatisierten Langzeitversuche wurden an einer FPLC-Anlage durchgeführt. Abbildung 7.01 stellt den Versuchsaufbau schematisch dar.

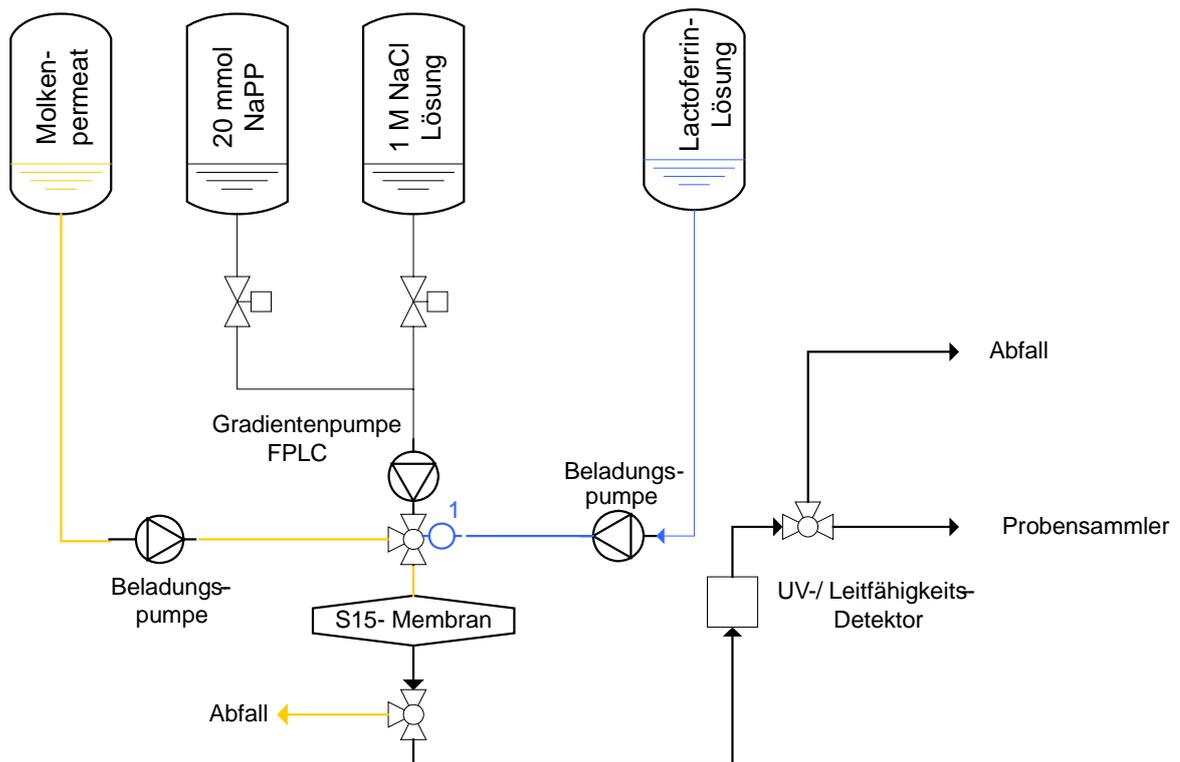


Abbildung 7.01: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe (FPLC); pH 7;
 1= Probenschleife; Gelb: Beladungsverlauf mit Molkenpermeat
Blau: Beladungsverlauf mit Lactoferrin-Lösung

7.1 Bindekapazität

Es sind im Rahmen einer früheren Dissertation bereits grundlegende Untersuchungen zur Bindekapazität von Lactoferrin an der Austauschermembran durchgeführt worden [87]. Die statische Kapazität wurde nach einer Prüfvorschrift der Firma Sartorius AG (PV 73A) zu $0,7 \text{ mg/cm}^2$ Membranfläche bestimmt [87]. Es wurde festgestellt, dass die dynamische Bindekapazität der Austauschermembran von der Beladungsgeschwindigkeit abhängt. Diese Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Molkenpermeat wird aber durch die Mikrofiltrationsanlage (Technikumsanlage) auf ca. $50 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Die Kationenaustauscheranlage (Membranadsorber) wird direkt an die Filtrationsanlage gekoppelt, um die Problematik der Nachtrübung der Permeate, die eine Auftragung auf den Adsorber erschwert, zu umgehen. Es sollte untersucht werden, ob sich hohe Temperaturen der Proteinlösungen auf die dynamische Bindekapazität der Austauschermembran auswirken. Für die Bestimmung der dynamischen Bindekapazität bei 50°C wurde eine stark saure Kationenaustauschermembran vom Sulfonyl-Typ (Sartobind S 15 - Membran) der Firma Sartorius AG, Göttingen, eingesetzt. Dieses Modul verfügt über 15 cm^2 Membranfläche, bestehend aus fünf Membranlagen von jeweils 3 cm^2 .

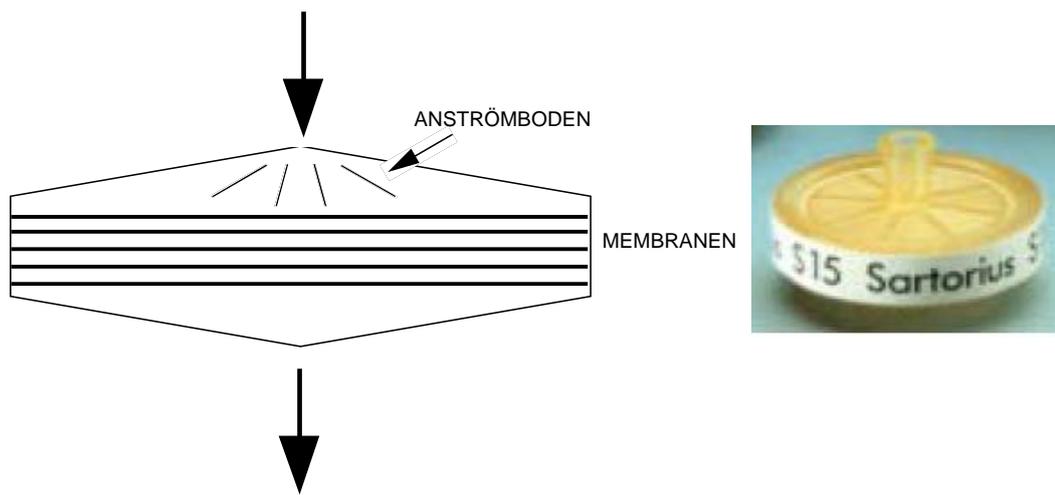


Abbildung 7.02: Sartobind S 15 - Modul (rechts) und prinzipieller Aufbau des Moduls (links)

Die Untersuchungen wurden mit Lactoferrin der Firma Morinaga Milk Industry Co., Japan durchgeführt. Zur Bestimmung der dynamischen Kapazität wurde eine Lactoferrin-Lösung mit der Konzentration 1 g/l in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7) angesetzt. Sowohl die Membran als auch die Lactoferrin-Lösung wurden während der gesamten Untersuchung auf 50°C temperiert. Der Versuchsverlauf wurde mittels FPLC verfolgt (s. Abbildung 7.01). Es wurde eine Strömungsgeschwindigkeit zwischen 1,0 und 3,0 cm/min gewählt (s. Anhang 14.5). Die dynamischen Kapazitäten wurden bei einem Durchbruch von 10 % des Lactoferrins im Durchlauf bestimmt. Die Messwerte wurden mit den Daten aus einer früheren Dissertation verglichen [87]. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Untersuchungen der früheren Arbeit mit Molkenpermeat durchgeführt wurden. Dadurch werden die Bindungsplätze nicht nur von Lactoferrin sondern auch von Lactoperoxidase (25 mg/l (Molke)) besetzt und somit die Menge an gebundenem Lactoferrin verringert. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurden die Daten aus früheren Arbeit um den in Molkenpermeat enthaltenen Lactoperoxidaseanteil korrigiert.

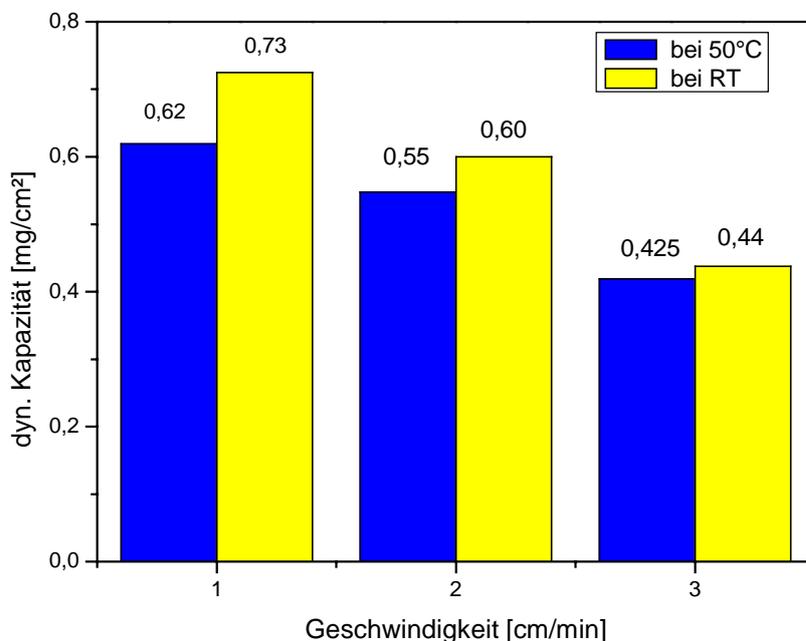


Abbildung 7.03: Vergleich der dynamischen Bindekapazitäten bei 50°C und bei RT bei unterschiedlichen Auftragungsgeschwindigkeiten

Es wurde wie erwartet eine Abnahme der dynamischen Bindekapazität von 0,62 auf 0,42 mg/cm² mit zunehmender Beladungsgeschwindigkeit festgestellt. Mit abnehmender Beladungsgeschwindigkeit geht die dynamische in die statische Kapazität (0,7 mg/cm²) über. Die dynamischen Kapazitäten bei 50°C liegen zwischen 88,6 % (1,0 cm/min) und 60 % (3,0 cm/min) der statischen Kapazität. Die Kapazitäten, die bei Raumtemperatur bestimmt wurden, liegen zwischen 100 % (1,0 cm/min) und 63 % (3,0 cm/min) der statischen Bindekapazität. Dies erscheint logisch, da mit abnehmender Beladungsgeschwindigkeit und mit zunehmender Temperatur das Gleichgewicht zwischen adsorbierten Molekülen und ungebundenen Molekülen im Medium in die Richtung der ungebundenen Moleküle verschoben wird. Die Differenz zwischen Kapazitäten bei 50°C und Raumtemperatur nimmt mit steigender Beladungsgeschwindigkeit ab. Sie beträgt bei 1,0 cm/min 15 % und bei 3,0 cm/min nur noch 3,6 %. Mit steigender Geschwindigkeit nimmt auch die Teilchenbewegung zu. Diese stärkere Teilchenbewegung überlagert den Temperatureffekt und führt zur Abnahme der Bindekapazitätsdifferenz zwischen den Temperaturen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Temperatur des Mediums bei hohen Beladungsgeschwindigkeiten nur sehr wenig die Bindekapazität der Sartobind-Membran beeinträchtigen.

7.2 Untersuchungen zur Langzeitstabilität

7.2.1 Messung mit Lactoferrin-Lösung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Langzeituntersuchungen zur Stabilität der Sartobind S 15 - Austauschermembran bei 40°C und 50°C durchgeführt. Es sollte getestet werden, ob die hohen Temperaturen des Proteinmediums einen Einfluss auf die Langzeitstabilität des verwendeten Adsorbermoduls haben. Zuerst wurde die Probenschleife mit 1 ml der Lactoferrinlösung einer Konzentration von 4 g/l befüllt. Um die maximale dynamische Kapazität, wie im Kapitel 7.1 festgestellt wurde, auszunutzen, wurde die Membran bei einer Flussrate von 1 ml/min beladen. Danach wurde mit 20 mM Natriumphosphatpuffer (NaPP, pH 7) gespült und mit 1 M NaCl-Lösung das Lactoferrin eluiert. Es wurden jeweils 50 Zyklen bei

40°C und 50°C durchgeführt. Die Membran wurde zwischen den Zyklen nicht gereinigt. In Tabelle 7.1 ist das Laufprogramm der FPLC-Analytik dargestellt.

Tabelle 7.1: Laufprogramm der FPLC-Analytik bei 40°C und 50°C

Laufzeit [s]	Programmschritt	Flussrate [ml/min]	Medium pH 7
120	Spülen	2	20 mmol NaPP
120	Beladen	1	Lactoferrin
180	Spülen	2	20 mmol NaPP
300	Eluieren	2	1 M NaCl
180	Spülen	2	20 mmol NaPP

Die folgende Abbildung 7.04 zeigt den Verlauf dieser Untersuchungen.

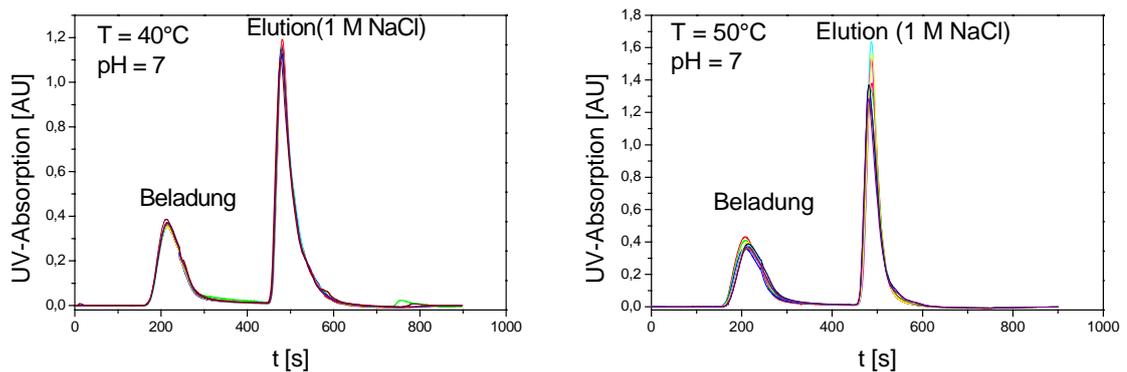


Abbildung 7.04: Versuchsprofile von je 50 Zyklen, durchgeführt mit Lactoferrin-Lösung, Natriumphosphatpuffer (pH 7) und Natriumchlorid (1 M) an der FPLC-Anlage

Es ist zu erkennen, dass die Elutionskurven bei allen Temperaturen keinen Trends unterliegen. Das bedeutet, dass das wiederholte Beladen und Eluieren im betrachteten Zeitraum von 50 Zyklen auch bei höheren Temperaturen möglich ist. Die Auswertungen der Versuche wurden über die Elutions-Perakflächen gemacht, die proportional zur eluierten Proteinmenge sind. Abbildung 7.05 zeigt die Peakflächen der Elutionssignale bei verschiedenen Temperaturen im betrachteten Zeitraum.

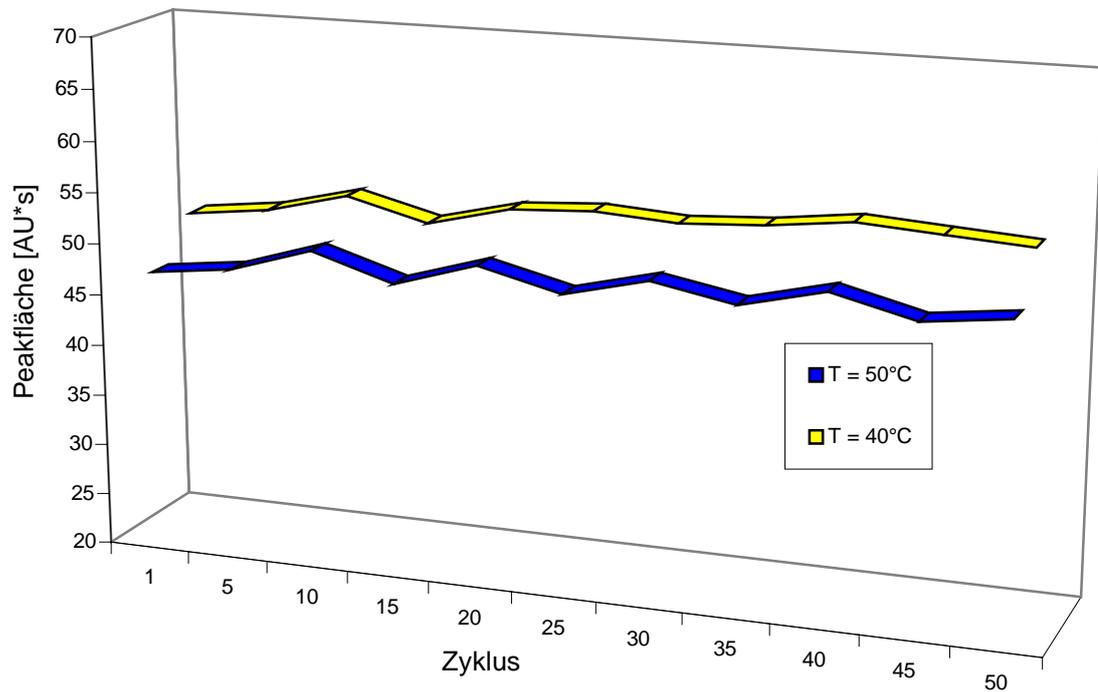


Abbildung 7.05: Elutionspeakflächen von Lactoferrin bei verschiedenen Temperaturen;
Sartobind S 15- Modul, Langzeittest; Lactoferrinlösung

Hier ist deutlich zu erkennen, dass die eluierte Menge an Lactoferrin während 50 Beladungszyklen weitgehend konstant bleibt. Die Schwankungen in der Peakfläche betragen weniger als 5 %. Das Membran-Modul weist auch nach 50 Zyklen keine Anzeichen einer Verblockung auf. Wie aber zu erkennen ist, wird bei einer Temperatur von 50°C weniger Lactoferrin gebunden und eluiert als bei 40°C. So beträgt die bei 50°C eluierte Proteinmenge 8,1 % weniger als bei 40°C. Dieser Temperatureffekt wurde auch bei der Bestimmung der dynamischen Bindekapazität beobachtet (s. Kapitel 7.1) und ist auf die niedrige Beladungsgeschwindigkeit zurückzuführen. Es ist auch zu erkennen, dass zu Beginn der Versuche (ca. je 5 Zyklen) die Peakflächen kleiner sind als über den Rest der Zeit hinweg. Dies könnte daran liegen, dass es im Sartobind S-Adsorbermodul noch Toträume gibt, die während der ersten 5 Beladungen nicht überströmt wurden. Im Anschluss an diese Anlaufphase arbeitete das Membranadsorbermodul konstant. Die Anzahl der hintereinander gefahrenen

Zyklen ist von der Temperatur des Mediums unabhängig. Es können in jedem Fall bei hohen Temperaturen 50 Zyklen hintereinander und ohne Zwischenreinigung gefahren werden.

7.2.2 Messung mit Molkenpermeat

Nachdem die Langzeitversuche mit Lactoferrin-Lösung zufriedenstellende Ergebnisse zeigten, wurden Langzeitmessungen mit frisch hergestelltem Molkenpermeat durchgeführt. Das Molkenpermeat wurde mit der Crossflow-Mikrofiltration (s. Kapitel 6.1) gewonnen, der Transmissionswert lag bei 80 %. Pro Zyklus wurde die Sartobind S 15 - Adsorbermembran mit 50 ml Molkenpermeat beladen (Flussrate 1 ml/min). Diese pro Zyklus eingesetzte Menge an Molkenpermeat enthielt 4 mg Lactoferrin (entspricht 80 mg/l). Eine Beladung über die Proben-schleife der FPLC-Anlage war aufgrund der Probenmenge an Permeat und damit verbundenes Temperierungsproblem technisch nicht möglich. Die Versuchsanlage wurde so modifiziert, dass vor und hinter der Membran zwei 3-Wege-Hähne eingebaut wurden (s. Abbildung 7.01). Vor Beginn des Laufprogramms wurde das Molkenpermeat über diese 3-Wege-Hähne auf die Membran gegeben. Das Spülen des Moduls erfolgte mit 20 mM Natriumphosphatpuffer (NaPP; pH 7). Die Elution der Proteine wurde mit einer 1 M NaCl-Lösung (pH 7) durchgeführt. Die Versuche wurden bei 40°C und 50°C durchgeführt.

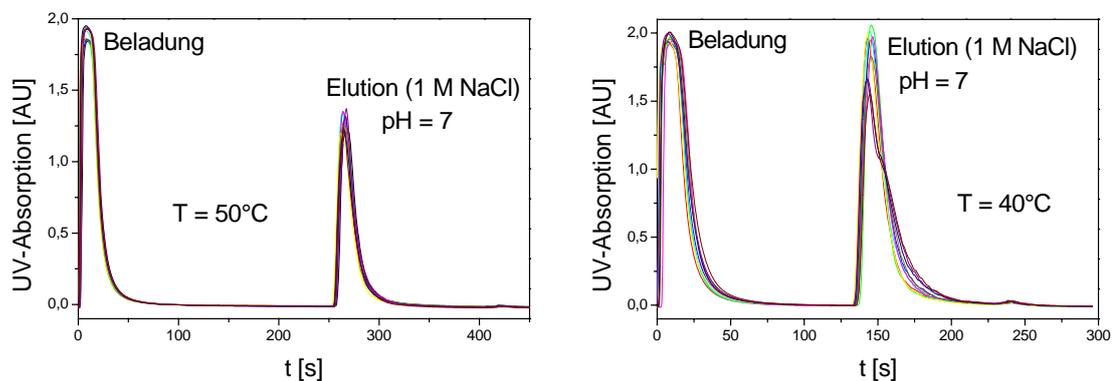


Abbildung 7.06: Versuchsprofile von je 50 Zyklen, durchgeführt mit Molkenpermeat, Natriumphosphatpuffer (pH 7) und Natriumchlorid (1 M) an der FPLC-Anlage

Der erste Peak im Elutionsverlauf kommt durch den Rest von Molkenpermeat, der in der Membran und der Leitung nach dem Beladen verblieben ist. Es ist zu erkennen, dass auch hier die Signale keine Tendenz aufweisen, sondern sich im Messbereich um einen Mittelwert bewegen. Anzeichen von Verblockung der Membran sind nicht zu erkennen. Der Druck in der FPLC-Anlage blieb während der Langzeitversuche konstant. Bei den letzten 20 Elutionspeaks ($T = 40^{\circ}\text{C}$) sind kleine Schultern zu sehen, die wahrscheinlich durch eine zweitägige Unterbrechung der Messung entstanden sind. Die Fläche der Elutionssignale und damit die Menge an eluierten Proteinen ist jedoch, trotz veränderter Form, gleich geblieben. Hier wurde auch wie im Kapitel 7.2.1 die Elutionspeakflächen berechnet und miteinander verglichen. Abbildung 7.07 stellt den Peakflächenvergleich dar.

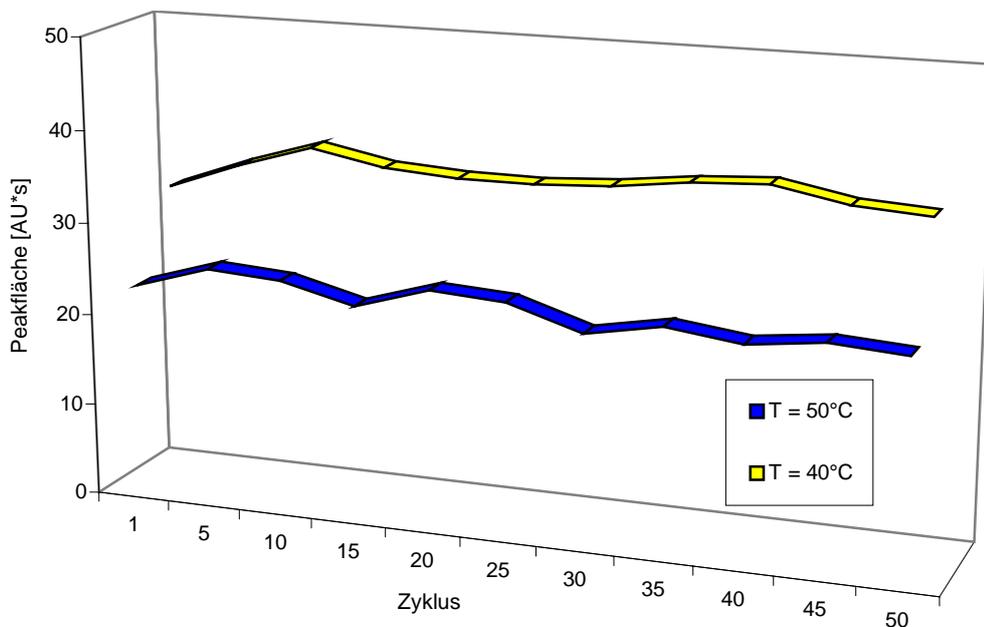


Abbildung 7.07: Elutionspeakflächen von Lactoferrin und Lactoperoxidase bei 40 und 50°C; Sartobind S 15 Modul, Langzeittest; Molkenpermeat

Abbildung 7.07 zeigt, dass die wiederholte Beladung der verwendeten Membran mit Molkenpermeat und anschließende Elution mit 1 M Natriumchlorid möglich ist. Es ist zu erkennen, dass bei 50°C weniger Lactoferrin gebunden und eluiert wird als bei 40°C. Während bei der Lactoferrin-Lösung die Differenz zwischen den Messungen bei 50°C und 40°C nur 8,1 % betragen hat, so ist die Differenz beim

Versuch mit Molkenpermeat mit 35,8 % deutlich größer. Anders als in der Lactoferrinlösung sind in Molkenpermeat neben Lactoferrin noch Lactoperoxidase und einige Mineralen (z.B. Calcium, 0,6 g/l) vorhanden, die ebenfalls an die Membran binden können und somit mit dem Lactoferrin um die Bindungsplätze konkurrieren [92]. Um die nicht gebundene Molkenteile aus dem Adsorbermodul auszutragen wurde Natriumphosphatpuffer (pH 7) verwendet. Dadurch kann es zur Bildung von schwerlöslichen Phosphatsalzen, insbesondere Calciumphosphat, kommen. Dieses führt zu schneller Verblockung der Austauschermembran. Das verwendete Permeat wurde 50 mal hintereinander ohne Reinigungszyklus aufgetragen. Dabei wurden keine Verblockungserscheinungen (Fluss-/Kapazitätsabfall, Druckanstieg in der Anlage) beobachtet. Das bedeutet, dass das in der Molke enthaltene Calcium überwiegend nicht in freier Form, sondern gebunden an andere Molkenbestandteile vorliegt, wodurch die Isolierung von Zielproteinen nicht beeinträchtigt wird. Eine mögliche Erklärung für den Verlust der Kapazität mit Molkenpermeat bei Sartobind S 15 - Modul ist die hohe Temperatur des Permeats und niedrige Auftragsflussrate (1 ml/min). Dies führt dazu, dass das Gleichgewicht zwischen adsorbierten und ungebundenen Molekülen im Molkenpermeat in die Richtung der ungebundenen Moleküle verschoben wird (vgl. Kapitel 7.1). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Temperaturerhöhung des Molkenpermeats die Kapazität und nicht die Langzeitstabilität des Sartobind S 15 - Moduls beeinträchtigt wird. Die Langzeitstabilität des Moduls wird auch durch die geringere Viskosität des Molkenpermeats bei höheren Temperaturen begünstigt.

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 7.1 – 7.2 lassen sich wie folgt zusammenfassen: Es wurde die dynamische Bindekapazität der Austauschermembran (Sartobind S 15) für das Zielprotein Lactoferrin bei 50°C bestimmt und mit Kapazitäten, die bei Raumtemperatur bestimmt wurden, verglichen. Hierbei hat sich herausgestellt, dass bei hohen Auftragsflussraten der Unterschied zwischen den Kapazitäten sehr gering ist. Bei einer Flussrate von 3 cm/min betrug der Bindekapazitätsunterschied nur noch 3,6 %. Die Langzeitstabilität der Sartobind S - Membran wurde sowohl bei Versuchen mit Lactoferrinlösung als auch bei Versuchen mit Molkenpermeat im betrachteten Zeitraum nicht beeinträchtigt.

8 Isolierung von Lactoferrin im technischen Maßstab

Zur Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat stand eine automatisierte 4 m²-Anlage zu Verfügung. Die Anlage ist mit zwei parallel geschalteten 2 m²-Wickelmodulen (S-20K-15-50) ausgestattet. Die schematische Darstellung der Anlage stellt folgende Abbildung 8.01 dar.

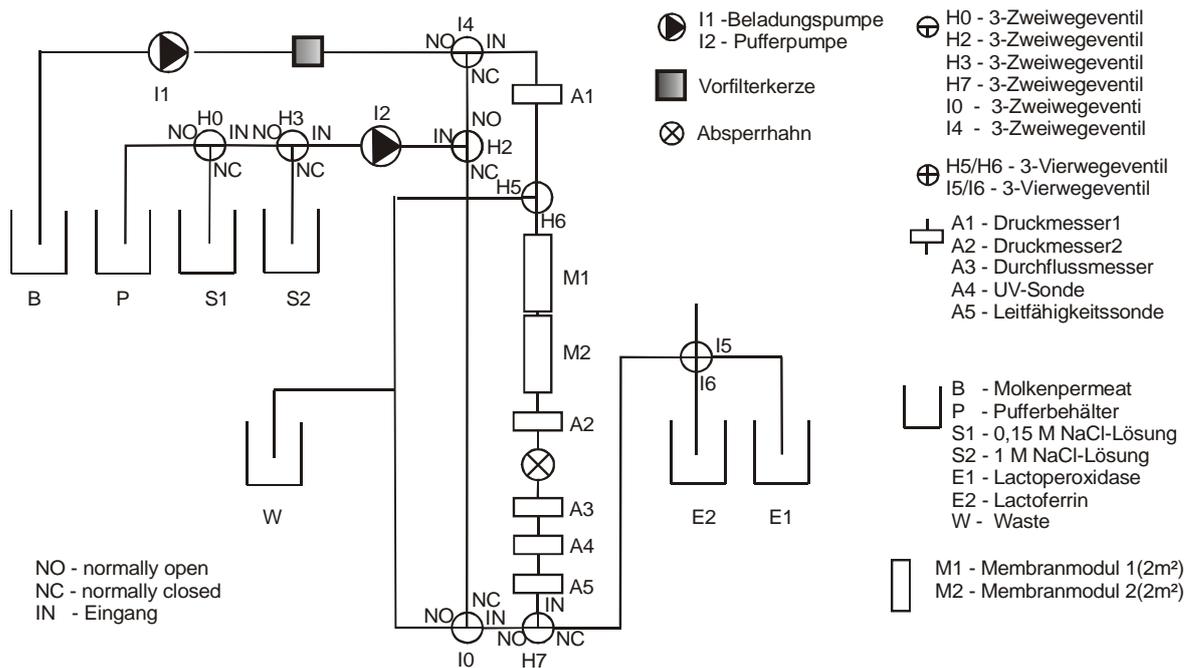


Abbildung 8.01: Schematische Darstellung der 4 m²-Anlage zur Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat

Im Rahmen von zwei früheren Dissertationen wurden bereits grundlegende Untersuchungen zur Isolierung von Lactoferrin mittels Kationenaustauschermembran im Technikumsmaßstab durchgeführt [9, 87]. Aufgrund des hohen isoelektrischen Punktes des Lactoferrin (pI 8,8) liegt es auch bei hohen pH-Werten kationisch vor. Alle anderen Molkenproteine mit der Ausnahme der Lactoperoxidase (pI 8,6) haben deutlich niedrigere pI-Werte und liegen anionisch oder neutral im Molkenpermeat vor. Deswegen konnte man Lactoferrin und Lactoperoxidase durch einen Kationenaustausch von den anderen Molkenproteinen abtrennen. Dazu wurden folgende Parameter bestimmt:

- Statische Bindekapazität: 0,7 mg/cm²

- Dynamische Bindekapazität: 0,2 mg/cm²
- Puffersystem der Elutionsmittel: 20 mM Natriumphosphatpuffer (NaPP)
- Verwendetes Salz für Elutionsmittel: Natriumchlorid (1 M für die Isolierung von Lactoferrin und 0,15 M für Isolierung von Lactoperoxidase)
- pH-Wert der Elutionslösungen: pH 7

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Optimierung der Vorfiltration bei der Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat im technischen Maßstab durchgeführt werden. Die Isolierung erfolgte im Durchlaufverfahren, d. h. das aufgetragene Molkenpermeat wird nicht in den Ausgangsbehälter zurück geleitet, sondern sofort verworfen. Alle weiteren Versuche zur Isolierung von Lactoferrin wurden unter Verwendung der 4 m²-Anlage durchgeführt (s. Abbildung 8.01).

8.1 Optimierung des Prozesses zur Isolierung von Lactoferrin

Die Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat erfolgte im Durchlaufverfahren mittels 4 m²-Anlage (s. Abbildung 8.01). Das Programm zur Isolierung von Lactoferrin beinhaltet folgende Schritte:

- Beladen (Molkenpermeat, pH 6,5)
- Waschen (20 mM Natriumphosphatpuffer (NaPP), pH 7)
- Eluieren + verwerfen (0,15 M NaCl-Lösung, pH 7)
- Eluieren + sammeln (0,15 M NaCl-Lösung, pH 7)
- Regenerieren + verwerfen (1 M NaCl-Lösung, pH 7)
- Regenerieren + sammeln (1 M NaCl-Lösung, pH 7)
- Waschen (20 mM Natriumphosphatpuffer (NaPP), pH 7)

Im ersten Programmschritt wurde das Molkenpermeat nicht direkt auf den Membranadsorber gegeben. Die Beladung erfolgte über eine Vorfilterkerze, deren Abscheiderate im Laufe der Versuche variiert wurde. Zur Auswahl standen drei Vorfilter (Sartofine PP, Sartorius AG, Göttingen) mit Abscheideraten von 0,5 µm, 1,0 µm und 10 µm.

Es wurden jeweils 700 l Molkenpermeat mit einer Lactoferrin-Konzentration von 75 mg/l vorfiltriert und entsprechend dem oben aufgeführten Programm aufgearbeitet. Die Aufteilung von jeweils 700 l erfolgte so, dass pro Beladungsschritt 100 l Molkenpermeat durch die Vorfilter gegeben wurde. Danach wurde zuerst die gebundene Lactoperoxidase mit 0,15 M NaCl-Lösung eluiert. Anschließend erfolgte nach dem gleichen Prinzip die Elution von Lactoferrin mit 1 M NaCl-Lösung (s. Anhang 14.9). Diese Fraktionen wurden mittels Ultra-/Diafiltration entsalzt und aufkonzentriert (s. Kapitel 8.2). Die Lactoferrin-Menge wurde mittels HPLC bestimmt (s. Anhang 14.8). Zur Trocknung der konzentrierten, entsalzten Eluate wurde eine Lyophilie verwendet. Die Proteinlösung wurde tiefgefroren und das enthaltene Wasser im Gerät unter Vakuum abgezogen. Die Prozessdaten sind in der Tabelle 8.1 dargestellt.

Tabelle 8.1: Prozessdaten; Vorfiltration von Molkenpermeat mittels Sartofine PP

Abscheiderate [µm]	Beladungsschritt	P (ein) [bar]		P (aus) [bar]		DF [l/min]		V (NaPP) [l]
		Adsorber	Vorfilter	Adsorber	Vorfilter	Adsorber		
0,5	1	1,2	2	0,34	1,6	5,3	8	
	2	1,44	2,1	0,3	1,7	4,8	12	
	3	1,3	2,1	0,3	1,7	4,3	18	
	4	1,1	2,2	0,15	1,3	3	20	
	5	1,1	2,3	0,1	2	3	25	
	6	1	3	0,05	1,6	2,5	25	
	7	0,4	3,2	0	0,5	1	25	
1,0	1	1,5	2,5	0,5	2,4	5,8	8	
	2	1,4	2,5	0,4	2,2	5,8	14	
	3	1,3	2,6	0,4	1,9	5,3	20	
	4	1,1	2,7	0,2	1,6	3,7	22	
	5	1,1	2,7	0,1	1,2	3	25	
	6	1	3	0,1	1	2,6	25	
	7	0,4	3,3	0	0,8	1	25	
10	1	1	2	0,5	1,7	6	8	
	2	1,2	2	0,5	1,7	5,7	14	
	3	1,2	2	0,4	1,7	5,5	18	
	4	1,2	2	0,4	1,7	5,5	20	
	5	1	2	0,3	1,6	5	25	
	6	1	2	0,3	1,5	4,5	30	
	7	1	2	0,2	1,5	4,4	35	

Aus den Daten lässt sich erkennen, dass durch die Nutzung der Vorfilterkerze mit der Abscheiderate von 10 μm konstante Ein- und Ausgangsdrücke erreicht wurden. Beim Einsatz der Vorfilterkerzen mit den Abscheideraten von 0,5 μm und 1,0 μm wurde festgestellt, dass die Eingangsdrücke im Laufe der Versuche stiegen. Dieser Druckanstieg ist mit der langsamen Verblockung der Vorfilterkerze zu erklären. Die Ausgangsdrücke nehmen dabei ab, was deutlich an den Durchflussdaten zu erkennen ist. Ein zweites damit verbundenes Problem ist die mit der Abnahme des Durchflusses steigende Beladungszeit. Die folgende Abbildung 8.03 stellt die im Versuch benötigte und für den Idealfall berechnete Beladungszeit vergleichend dar (s. u.). Bei der Berechnung für den Idealfall wurde davon ausgegangen, dass die maximale Auftragungsgeschwindigkeit über die Versuchszeit hinweg konstant bleibt.

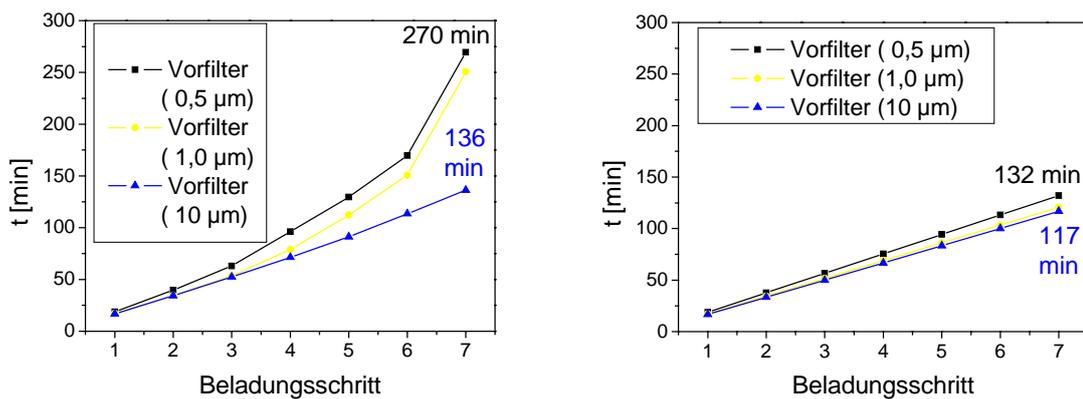


Abbildung 8.02: Zeitbilanz; Links: im Versuch benötigte Zeit für die Beladungen; Rechts: für den Idealfall berechnete Beladungszeit;

Für die Beladung von 700 l Molkenpermeat wurde unter Verwendung von Filterkerzen mit Abscheideraten von 0,5 und 1 μm ca. 270 min benötigt. Die Vorfilterkerze mit der Abscheiderate von 10 μm erlaubte innerhalb von 136 min die gleiche Menge an Molkenpermeat aufzutragen. Bei einer konstant gehaltenen Beladungsgeschwindigkeit von 6 l/min hätte die Beladung von 700 l Permeat in nur noch 117 min durchgeführt werden können. Der Unterschied ist nicht groß und beträgt nur 19 min. In einem Industriemaßstab und über die lange Zeiträume hinweg würde sich aber ein viel höherer Zeitverlust und somit Produktverlust ergeben.

Im weiteren Verlauf wurde die Bindungskapazität des Membranadsorbers genauer untersucht. Nach jedem Beladungsschritt musste die Adsorbermembran mit dem Natriumphosphat-Puffer (pH 7; 20 mM) gewaschen werden. Die rechte Spalte in der Tabelle 8.1 gibt den Verbrauch an Puffer pro Beladungsschritt an. Eine graphische Auftragung dieser Messergebnisse stellt folgende Abbildung 8.03 dar.

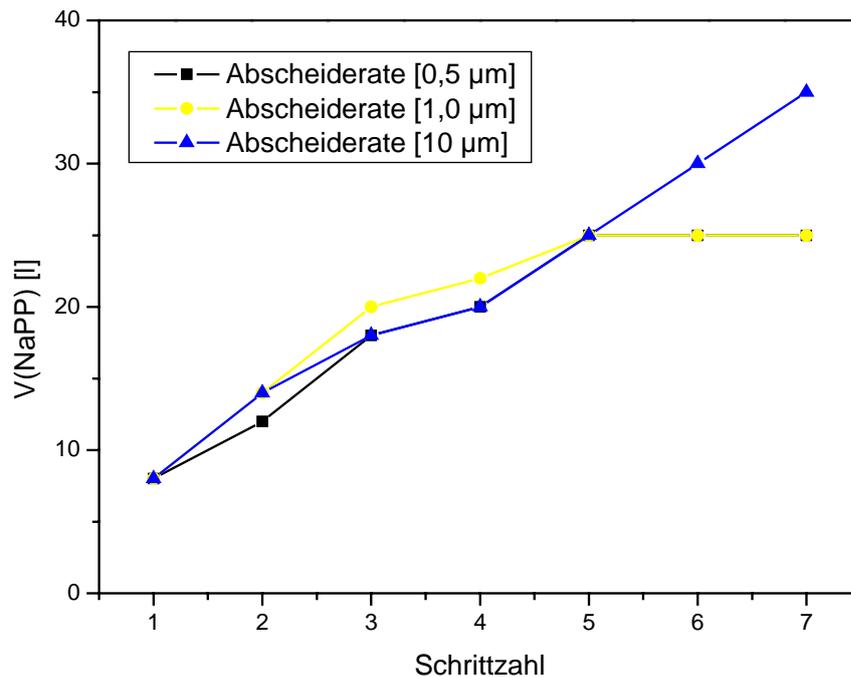


Abbildung 8.03: Verbrauch an NaPP (20 mM; pH 7) nach dem Beladen mit Molkenpermeat

Es lässt sich erkennen, dass der Verbrauch an Natriumphosphat-Puffer mit steigender Anzahl an Beladungszyklen zunimmt. Abbildung 8.03 zeigt, dass nach dem Beladen über die Filterkerze mit der Abscheiderate von 10 µm deutlich mehr Puffer verbraucht wurde als nach dem Beladen über andere Vorfilter. Das bedeutet, dass die Verblockung von Adsorbermembran mit der steigenden Zykluszahl zunimmt. Das heißt, dass in Molkenpermeat vorhandene Lactoferrin nicht durch die Filterkerze (10 µm) zurückgehalten, sondern verbleibt auf der Membran, die mit steigender Zykluszahl langsam verblockt.

Der quantitative Lactoferringehalt in Lösung wurde mittels HPLC-Messung (Mono S H/R 5/5, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) quantifiziert. Der Elutionsgradient lag bei 0,5 M NaCl für Lactoperoxidase und 2 M NaCl für Lactoferrin (bLF), jeweils in 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7 (s. Anhang 14.8). Die ermittelten Ausbeuten an Lactoferrin sind in Abbildung 8.04 dargestellt.

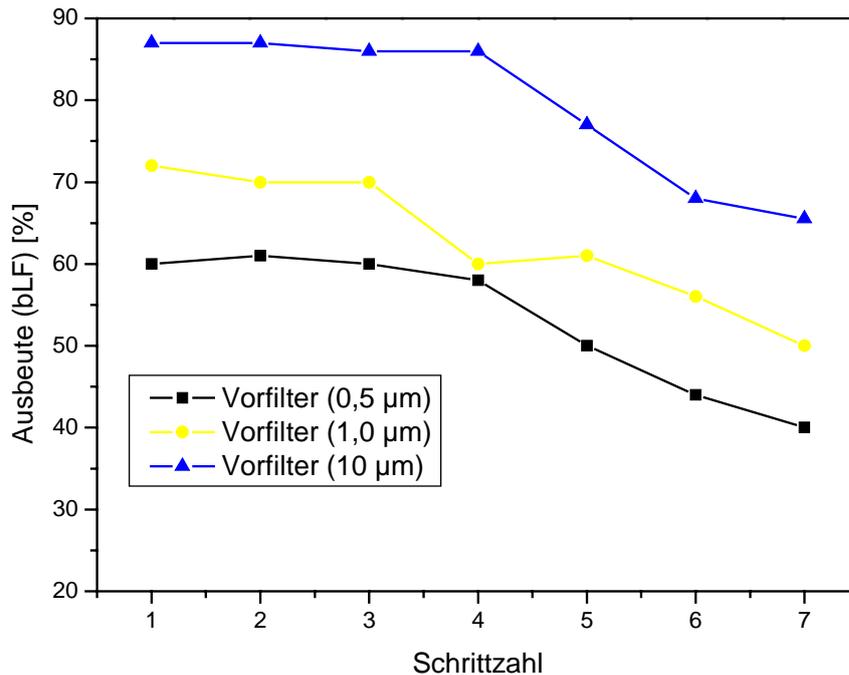


Abbildung 8.04: Erzielte Ausbeuten an Lactoferrin (bLF) bezogen auf den Gesamtprozess;

Die Nutzung der Vorfilterkerze mit der Abscheiderate von 10 µm führt zu höheren Ausbeuten bezogen auf den Gesamtprozess. Die Ausbeute beträgt hier im Durchschnitt 80 %. Die anderen Vorfilter verblocken schnell und führen zu kleinen Ausbeuten. Das bedeutet, dass die Vorfilterkerzen mit kleineren Abscheideraten zum Verlust an Lactoferrin (bLF) führen. Es konnte gezeigt werden, dass die Verarbeitung von 700 l Permeat mit Hilfe einer 10 µm Vorfilterkerze am besten verläuft. Um die Verluste zu ermitteln, wurden nach jedem Prozessschritt die Mengen an Lactoferrin mittels HPLC-Analytik bestimmt. Im 1 M NaCl-Eluat wurde ein Verlust von 10 % gemessen. In der Lactoperoxidasefraktion wurde 5 % Lactoferrin festgestellt. Das bedeutet, dass die restlichen 5 % im Vorfilter und

Membranadsorber verblieben sind. Weitere 7 % Lactoferrin gingen durch die Entsalzung verloren (s. Kapitel 8.2). Die gesamte Ausbeute an Lactoferrin unter Berücksichtigung der Verluste betrug durchschnittlich 80 %. In der Abbildung 8.05 ist die Bilanzierung des gesamten Prozessverlaufes unter Verwendung der Vorfilterkerze mit der Abscheiderate 10 μm dargestellt.

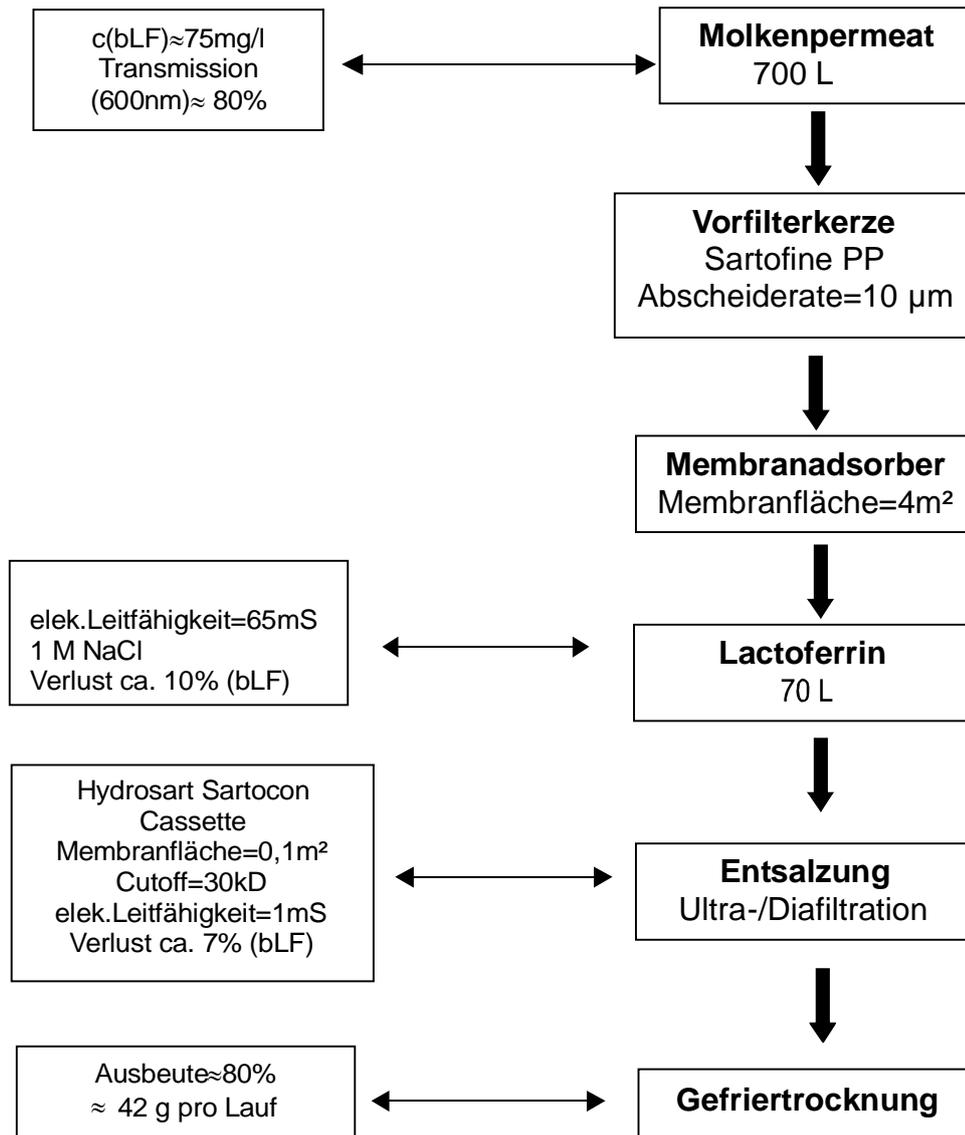


Abbildung 8.05: Prozessbilanzierung; Ausbeute (bLF)* = 80 %; * = bestimmt mit HPLC, Fehlertoleranz der Messungen 5 %; 4 m^2 -Anlage, Vorfilter (10 μm)

Aus 700 l Molkenpermeat mit einer Lactoferrinkonzentration von 75 mg/l wurden jeweils durchschnittlich 42,0 g an Produkt gewonnen. Der Einsatz von Vorfilterkerzen mit den Abscheideraten größer als 10 μm wird nicht empfohlen, da

dadurch die Adsorbermembran schnell verblockt. Dies kann zur Zunahme des Gegendruckes der Adsorbermodule führen, und somit letztlich zu geringeren Standzeiten und höheren Kosten.

8.1.1 Reinigung der Membran

Nachdem das Lactoferrin aus Molkenpermeat isoliert wurde, musste eine Reinigung der Adsorbermembran durchgeführt werden. Es wurde mit den gleichen Chemikalien und bei gleichen Temperatur gearbeitet wie bei der Mikrofiltration (s. Kapitel 6.1.1). Aufgrund der Tatsache, dass die verwendete Membran bei zu geringen Ionenstärken der Medien aufquellen kann, wurde beim Spülen auf das reine Wasser verzichtet. Die Benutzung von Medien mit elektrischen Leitfähigkeiten von unter 3 mS kann nur bei niedrigen Durchflussraten erfolgen. Andernfalls werden die Membranporen kleiner und die Durchflussrate nimmt ab. Dadurch würde der Gegendruck der verwendeten Anlage stark ansteigen und zum Prozessabbruch führen. Deswegen wurde für das Spülen der Membran und zur Bestimmung des Wasserwertes an Stelle reinen Wassers 20 mM Natriumphosphatpuffer (NaPP; pH 7) verwendet.

Es wurden drei Reinigungsprozeduren getestet. Die Reinigungsmethode 1 wurde aus dem Kapitel 6.1.1 übernommen, weil damit bei der Reinigung der Mikrofiltrationsmembran 100 %ige Wasserwerte erreicht wurden. Die für die Isolierung von Lactoferrin verwendete Adsorbermembranen sind aufgrund ihres Aufbaus nicht rückspülfähig. Aufgrund dieser Tatsache, konnte die effizienteste Reinigungsmethode 3 aus dem Mikrofiltrationsversuch nicht übernommen werden (s. Kapitel 6.1.1). In der folgenden Tabelle 8.2 sind die Reinigungsmethoden zusammengefasst.

Tabelle 8.2: Reinigung der Adsorbermembran; Reinigungsmethoden

Reinigungs- schritt	Reinigungsmethode		
	1	2	3
Spülen mit NaPP [min]	5	5	5
Spülen mit Lauge [min]			4
Lauge im Kreis pumpen [min]			30
Ultrasil P3-53 im Kreis pumpen [min]	20		
Über Nacht einwirken lassen [min]	960		
Säure im Kreis pumpen [min]		40	
Spülen mit NaPP [min]	20	5	5
Lauge im Kreis pumpen [min]	40	30	
Säure im Kreis pumpen [min]			30
Spülen mit NaPP [min]			5
Lauge im Kreis pumpen [min]			30
Spülen mit NaPP [min]	30	5	5
Gesamtzeit [h]	18	1,25	1,54

Vor und nach der Reinigung der Module wurden Wasserwerte bestimmt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8.3 zusammengefasst.

Tabelle 8.3: Ergebnisse des Reinigungsprozesses

Reinigungsmethode	Wasserwert [%]	Reinigungszeit [h]
1	90	18
2	80	1,25
3	100	1,54

Mit der Reinigungsmethode 3 konnte der zuvor ermittelte Wasserwert zu 100 % wiederhergestellt werden. Die Reinigungsmethoden 1 und 2 haben sich als ungeeignet erwiesen. Der Reinigungserfolg der dritten Methode kann auf das Spülen mit Lauge zurückgeführt werden. Hier wurden die ersten Liter der Reinigungslösung verworfen, bevor die restliche Reinigungslösung dann im Kreis gepumpt wurde. Mit der verworfenen Reinigungslösung wurde der Hauptteil an Verunreinigung aus dem Membranadsorber ausgeschieden, und so die Effizienz dieser Reinigungsmethode erhöht.

8.2 Ultra- /Diafiltration

Nach der Aufarbeitung von 700 l Molkenpermeat fallen ca. 70 l zu entsalzende Lactoferrinlösung und ca. 30 l Lactoperoxidaseelösung an. Um die biologische Aktivität der Proteine nicht zu beeinträchtigen, muss das Salz aus den Lösungen entfernt werden. Die Ultrafiltration der salzhaltigen Eluate wurde mittels Hydrosart Sartocon Cassette (0,6 m²; cutoff 30 kDa) durchgeführt. Nachdem die Proteinlösungen bis auf 5 l aufkonzentriert wurden, wurde die Versuchsanlage auf Diafiltration umgeschaltet. Das Volumen der Lactoferrin- bzw. Lactoperoxidaseelösung im Vorlagebehälter wurde dabei durch Zugabe von destilliertem Wasser konstant auf ca. 5 l gehalten. Der Grad der Entsalzung wurde durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit verfolgt. Ab einer Leitfähigkeit von weniger als 1,0 mS wurden die salzfreien Lösungen mit Hilfe einer Hydrosart Sartocon Slice Cassette (0,1 m²; cutoff 30 kDa) auf 0,5 l aufkonzentriert und abschließend lyophilisiert. Die Leitfähigkeitswerte von 0,1 – 1 mS entsprechen den Werten für die Trinkwasserqualität. Die typischen Entsalzungsverläufe sind in Abbildung 8.06 dargestellt.

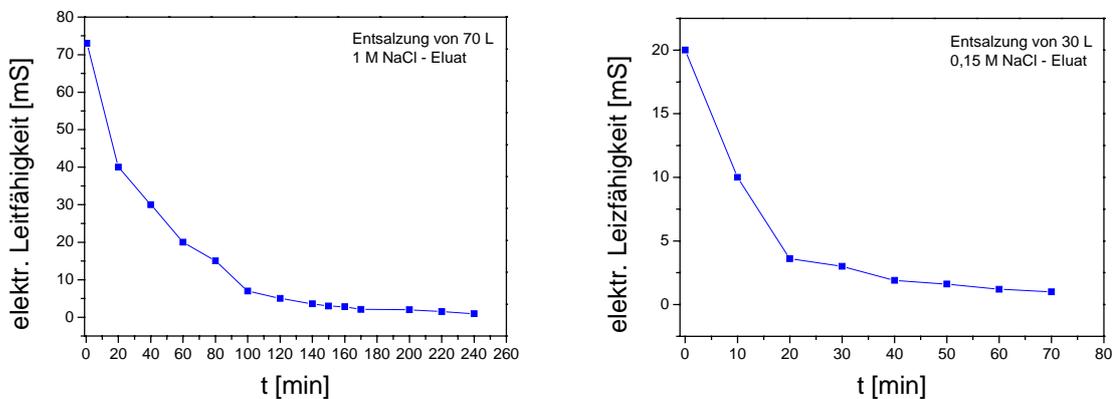


Abbildung 8.06: Entsalzung von salzhaltigen Eluaten; $p_{\text{ein}} = 2,7 \text{ bar}$; $p_{\text{aus}} = 1,4 \text{ bar}$;

Innerhalb von ca. 5,2 h konnten die gesammelten 0,15 M und 1 M NaCl-Eluate entsalzt und aufkonzentriert werden. Der Permeatfluss sank über die Versuchszeit hinweg von anfangs 1,2 l/min auf 0,5 l/min. Die Bildung einer Deckschicht ist einer der limitierenden Faktoren in der Membrantechnik und zeigt sich, wie hier im Versuch der Fall war, in kontinuierlich abfallenden Permeatflüssen unter

konstanten Betriebsbedingungen. Die Minimierung dieser Deckschicht kann durch die Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit erfolgen. Die Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit würde zum Anstieg des Betriebsdruckes führen, wodurch die verwendete Membran beschädigt werden könnte. Aus diesem Grund wurde auf die Optimierung dieses Schrittes verzichtet. Die im Versuch erreichten Filtrationszeiten lagen im akzeptablen Bereich. Ein höherer Permeatfluss konnte erst wieder nach einer Reinigung der Membran erreicht werden. Die Reinigung der Membran erfolgte mit 1 M NaOH bei 40°C. Mit dieser Reinigungsmethode könnten die zuvor ermittelten Wasserflüsse innerhalb von 50 min vollständig wiederhergestellt werden. Auf der Permeatseite wurde ein Verlust an Protein von ca. 5 % mittels HPLC-Messung festgestellt. Der Gesamtverlust an Zielprotein betrug aber 7 %. Der fehlende Proteinanteil (2 %) ist wahrscheinlich auf der Membran bzw. in der Anlage verblieben. Der Einsatz von Membranen mit Porengrößen kleiner als 30 kDa wird nicht empfohlen. Dadurch würde sich die Deckschicht viel schneller bilden und zur Permeatflusslimitierung führen. Dieses würde sich auch negativ auf die Filtrationszeiten auswirken. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden alle weiteren Versuche zur Ultra-/Diafiltration von salzhaltigen Protein-Eluaten aufgrund des relativ geringen Proteinverlustes und einfachen Handhabung mittels Sartocoon Cassette durchgeführt.

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 8.1 – 8.2 lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat erfolgte im Durchlaufverfahren mittels einer 4 m²-Anlage. Die besten Ausbeuten an Lactoferrin wurden unter Verwendung einer Sartofine PP - Filterkerze mit der Abscheiderate von 10 µm erreicht.

Es wurde eine Reinigungsmethode entwickelt, die den Wasserfluss nach Versuchsende vollständig wiederherstellt. Die Entsalzung der Proteinlösungen mittels einer Hydrosart Sartocoon Cassette (0,6 m²; cutoff 30 kDa) verlief unter einem Proteinverlust von 7 %.

9 Isolierung von Lactoferrin aus Molke im Rezirkulationsverfahren

Im Kapitel 8 wurde die Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat unter Einsatz einer Vorfilterkerze beschrieben. Wie sich herausstellte, konnte dadurch das Verblocken des Membranadsorbers vermieden werden. Diese Module werden im Dead-End-Modus von innen nach außen durchströmt. Der innere Zylinder verteilt dabei das Molkenpermeat gleichmäßig auf die Membranoberfläche. Das Permeat wird am unteren Ende des Moduls gesammelt und nach außen geführt. Das für die Beladung des Membranadsorbers benötigte Molkenpermeat wurde mittels 4m²-Anlage durch Mikrofiltration hergestellt (s. Kapitel 6). Als Alternative zum etablierten Prozess wurde zur Isolierung des Lactoferrins aus Molke ein neuentwickelter Recuperator der Firma Sartorius eingesetzt.

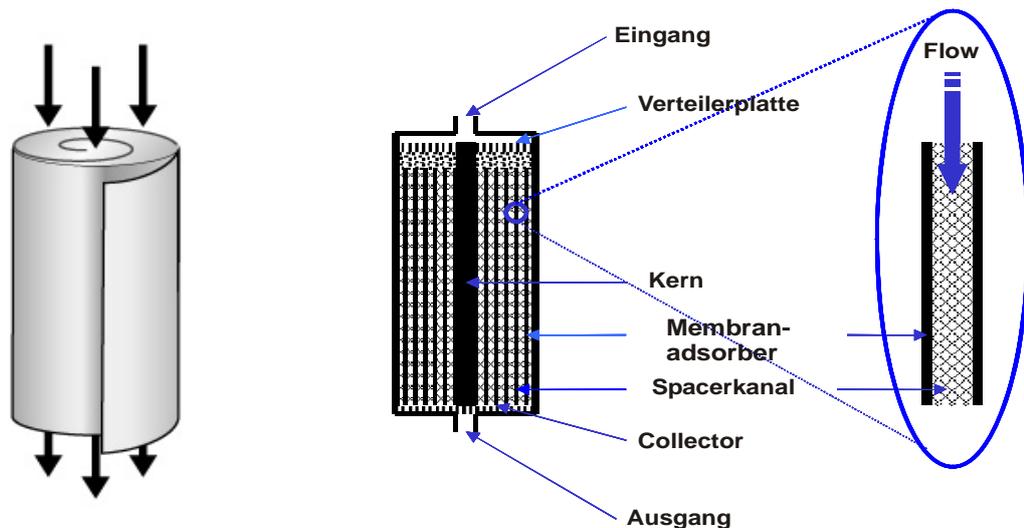


Abbildung 9.01: Aufbau des Recuperators (Sartorius AG, Göttingen)

Der Recuperator besteht aus einer Sartobind[®]-Membran und einem Spacer, die aufeinander, gleich einer Papierrolle, auf einem zylindrischen Träger (Kern) aufgewickelt und anschließend verkapselt wurden. Die im Eingang des Recuperators eingebaute Verteilerplatte sorgt für die gleichmäßige Verteilung der Feed-

Lösung. Die Feed-Lösung strömt durch die Spacerkanäle entlang der Membranoberfläche und wird durch das untere Ende des Recuperators (Collector) nach außen geführt. Diese besondere Konstruktion des Recuperators erlaubte die unfiltrierte Molke direkt zur Isolierung des Proteins einzusetzen, wodurch der Mikrofiltrationsschritt entfällt. Die Beladung erfolgte im Rezirkulationsverfahren, wobei die aufgetragene Molke in den Ausgangsbehälter zurückgeleitet, also im Kreis gepumpt, und nicht sofort verworfen wird. Da es sich um Testversuche handelte, wurde mit geringen Molkenmengen gearbeitet. Für die folgenden Testversuche wurden drei verschiedene Recuperatoren eingesetzt. Die Recuperatoren unterscheiden sich in Hinblick auf die Membranfläche, die Membranlänge und die Spacerart, bestehen aber aus dem gleichen Membrantyp (s. Kapitel 5.3). Die Spacer sind aus Polypropylenmaterial aufgebaut. Der extrudiert gebaute Spacer hat eine rau Struktur. Der Vlies-Spacer besteht aus langen feinen Fasern und hat eine glatte, unstrukturierte Oberfläche. In der Tabelle 9.1 sind die Recuperatoren vergleichend dargestellt.

Tabelle 9.1: Recuperatordaten

Parameter	Recuperator 72	Recuperator 68	Recuperator 73
Membranfläche [cm ²]	14.105	15.761	13.734
Membranlänge [mm]	6.470	7.230	6.300
Membranbreite [mm]	218	218	218
Spacerart	extrudiert	Vlies	extrudiert
Totvolumen [ml]	560	547	568
Membrantyp	S	S	S

Die Recuperatoren 72 und 68 wurden für die Isolierung von Lactoferrin aus Molke verwendet. Der Recuperator 73 wurde nur für die Aufarbeitung von Molkenkonzentrat eingesetzt.

9.1 Verwendung von Recuperator 72

Zuerst wurde die automatisierte Anlage zur Lactoferrin-Isolierung über Membranadsorber umgerüstet (s. Abbildung 8.01). Die 4 m² Membran wurde durch den Recuperator 72 ausgetauscht. Mit Hilfe dieser Anlage konnte der

Verlauf des Versuches mittels UV-Messung, elektrischer Leitfähigkeitsmessung und Volumendurchflussmessung verfolgt werden. Abbildung 9.02 stellt einen entsprechenden Versuchsverlauf dar.

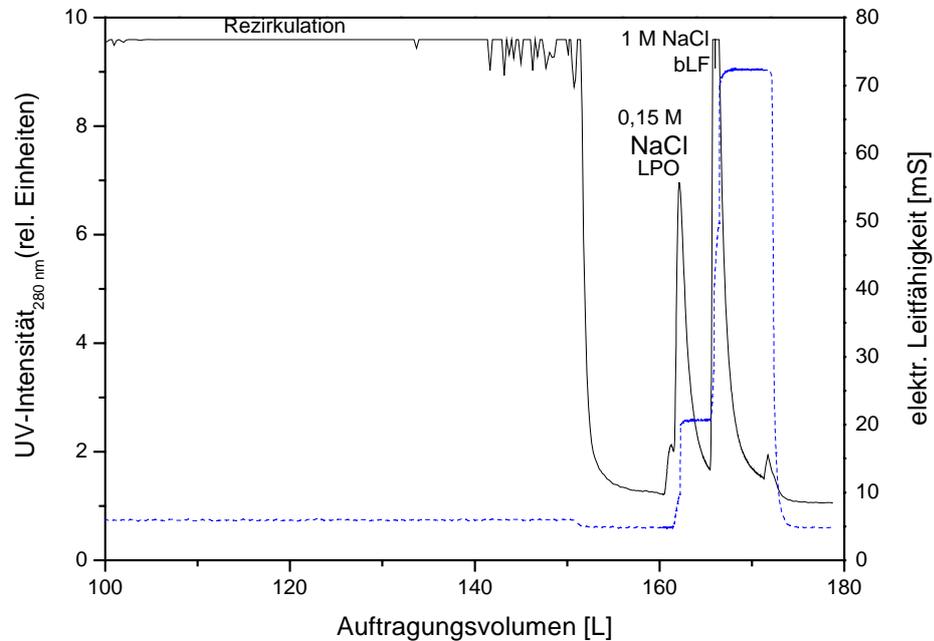


Abbildung 9.02: Typisches Beladungs- und Elutionsprofil bei der Aufarbeitung von Lactoferrin und Lactoperoxidase aus Molke mittels Recuperator; Zweistufige Elution

Es wurden 18 l Molke mit einer Flussrate von 7,5 l/min 20 min über den Recuperator im Kreis gepumpt. Alle 5 min wurde eine Probe genommen und der Lactoferrin-Gehalt mittels HPLC untersucht. Anschließend ist mit 10 l 20 mM Natriumphosphat-Puffer (NaPP; pH 7) gespült worden, um nicht gebundene Proteinteile aus dem Membranadsorber auszutragen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,4 l/min. Für die Elution wurde ein 2 – Stufengradient (0,15 und 1 M Natriumchlorid) verwendet. Die Trübung von Molke und der Eluate wurde mittels eines Turbiquant 1.100 IR, Merck KGaA, bestimmt. Der Trübungsgrad wird in NTU (Nephelometrische Trübungseinheiten) angegeben. Um das Verhalten des Recuperators bei längerer Benutzung zu untersuchen, wurde der Versuch unter jeweils gleichen Bedingungen sechs mal wiederholt. Zwischen den einzelnen Versuchen

erfolgte keine Reinigung des Recuperators. In der folgenden Tabelle 9.2 sind die wichtigsten Versuchsparameter zusammengefasst.

Tabelle 9.2: Molkenrezirkulation; Versuchsdaten

	t [min]	pH (Molke)	P (ein) [bar]	P (aus) [bar]	DF [l/min]
Versuch 1	0	6,6	2,5	0,7	7,5
	5	nb	2,5	0,7	7,5
	10	nb	2,5	0,7	7,5
	15	nb	2,5	0,7	7,5
	20	6,5	2,5	0,7	7,5
Versuch 2	0	6,55	2,5	0,7	7,5
	5	nb	2,5	0,7	7,5
	10	nb	2,5	0,7	7,5
	15	nb	2,5	0,7	7,5
	20	6,5	2,5	0,7	7,5
Versuch 3	0	6,62	2,5	0,7	7,5
	5	nb	2,5	0,7	7,5
	10	nb	2,5	0,7	7,5
	15	nb	2,5	0,7	7,5
	20	6,5	2,5	0,7	7,5
Versuch 4	0	6,55	2,5	0,6	7
	5	nb	2,5	0,6	7
	10	nb	2,5	0,6	7
	15	nb	2,5	0,6	7
	20	6,52	2,5	0,6	7
Versuch 5	0	6,5	2,5	0,6	7
	5	nb	2,5	0,6	7
	10	nb	2,5	0,6	7
	15	nb	2,5	0,6	7
	20	6,5	2,5	0,6	7
Versuch 6	0	6,6	2,5	0,6	7
	5	nb	2,5	0,6	7
	10	nb	2,5	0,6	7
	15	nb	2,5	0,6	7
	20	6,5	2,5	0,6	7

Die ersten drei Rezirkulationen wurden mit einer Durchflussrate von 7,5 l/min durchgeführt. Der Eingangs- und Ausgangsdruck blieb dabei konstant. Danach stieg der Eingangsdruck auf 3,0 bar. Da damit aber der maximal messbare Eingangsdruck erreicht war, wurde, um den Versuchsablauf besser verfolgen zu können, die Flussrate auf 7,0 l/min verringert. Dabei sank der Eingangsdruck auf 2,5 bar und blieb während der nächsten Beladungen konstant. Da die Durchflussrate und der Betriebsdruck während des Versuches konstant blieben,

konnte eine Verblockung der Membran ausgeschlossen werden. Die während der Rezirkulation entnommenen Molken-Proben wurden mittels HPLC untersucht (s. Anhang 14.8). Die folgende Tabelle 9.3 zeigt die Bilanz der Rezirkulationsstufe.

Tabelle 9.3: Prozessbilanz; Lactoferrin (bLF)*-Konzentrationen in Molke und auf der Membran
* = bestimmt mit HPLC; Fehlertoleranz der Messungen 5%

Versuch	V (Molke) [l]	t [min]	Trübung (Molke) [NTU]	Lactoferrin - Gehalt		
				Molke		Membran
				[g]	[%]	[%]
1	18	0	605,5	1,86	100,0	0,0
	18	5	nb	0,36	19,3	80,7
	18	10	460,3	0,08	4,3	95,7
	18	15	nb	0,01	0,6	99,4
	18	20	425	0,00	0,0	100,0
2	18	0	604,5	1,91	100,0	0,0
	18	5	nb	0,33	17,4	82,6
	18	10	457,8	0,04	2,2	97,8
	18	15	nb	0,00	0,0	100,0
	18	20	423,6	0,00	0,0	100,0
3	18	0	605,1	2,18	100,0	0,0
	18	5	nb	0,31	14,2	85,8
	18	10	465	0,05	2,1	97,9
	18	15	nb	0,00	0,0	100,0
	18	20	425	0,00	0,0	100,0
4	18	0	606	1,71	100,0	0,0
	18	5	nb	0,34	19,9	80,1
	18	10	459,7	0,08	4,4	95,6
	18	15	nb	0,02	1,1	98,9
	18	20	426	0,00	0,0	100,0
5	18	0	606	2,16	100,0	0,0
	18	5	nb	0,71	33,0	67,0
	18	10	nb	0,26	12,0	88,0
	18	15	nb	0,06	3,0	97,0
	18	20	430	0,02	1,0	99,0
6	18	0	605,6	1,97	100,0	0,0
	18	5	nb	0,59	29,9	70,1
	18	10	nb	0,18	9,3	90,7
	18	15	nb	0,15	8,7	91,3
	18	20	433	0,04	2,0	98

Aus Tabelle 9.3 ist zu erkennen, dass das Lactoferrin im Laufe der ersten vier Versuche vollständig an der Membran gebunden werden konnte. In Versuchen 5 und 6 wurde in Molke nach einer Rezirkulationszeit von 20 min nur ein sehr geringer Lactoferrin-Gehalt gemessen. Die Trübung der Molke sank über die

Versuchszeit hinweg von anfangs 605 NTU auf 425 NTU. Bei einem Trübungswert von 425 NTU konnte in Molke kein Lactoferrin mittels HPLC nachgewiesen werden. Von allen gesammelten salzhaltigen Eluaten wurde die Trübung und die Lactoferrinkonzentration bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 9.4 dargestellt.

Tabelle 9.4: Bestimmung von Trübung und bLF-Konzentration; Bilanz des Elutionsprozesses

Versuch	bLF gebunden [%]	bLF - Gehalt		Trübung	
		1 M NaCl Fraktion [%]	0,15 M NaCl Fraktion [%]	1 M NaCl Fraktion (bLF) [NTU]	0,15 M NaCl Fraktion (LP) [NTU]
1	100	69	25	168,3	65,6
2	100	71	23	168,8	70
3	100	70	24	169	70
4	100	69	25	161,8	78,8
5	99	68	26	165,5	76,5
6	98	68	24	170	77

Es ist zu erkennen, dass die Trübung der Lactoferrin-Lösung im Laufe der Versuche nicht zunimmt. Der Mittelwert beträgt 167 NTU. Die Trübung der Lactoperoxidase-Lösung nimmt über die Versuchszeit hinweg leicht zu. Die Trübungswerte steigen von 65,6 auf 77 NTU. Nach dem Beladen mit Molke wurde wahrscheinlich nicht ausreichend genug mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7) gespült. Auf diese Weise gelangen nicht ausgewaschene Molkenbestandteile in die Lactoperoxidase-Fraktion und verursachen eine leichte Zunahme der Trübungswerte. Es konnten 6 Rezirkulationszyklen mit Molke ohne Reinigungsstufe hintereinander durchgeführt werden. Die Regeneration der Austauschermembran durch die Elution von Lactoferrin im Salzgradienten scheint vollständig zu sein, da die Lactoferrin-Ausbeute nach allen Zyklen konstant blieb und betrug 70 %. In der Lactoperoxidase-Fraktion wurde im Durchschnitt ca. 24 % Lactoferrin gemessen. Die restlichen 6 % liegen im Rahmen der Fehlertoleranz der HPLC-Analytik (5 %). Es könnte möglich sein, dass ein Teil des aufgetragenen Lactoferrins auf der Membran verbleibt. Dieser Verlust kann eventuell durch nicht optimale Überströmung von Eluenten und existierenden Toträume in der Anlage verursacht werden. Die erhaltenen salzhaltigen Eluate wurden, wie im Kapitel 8.2

beschrieben, mittels Ultra-/Diafiltration entsalzt und aufkonzentriert (Proteinverlust 7 %). Die nach der Ultra-/Diafiltration erhaltenen salzfreien Eluate wurden gefriergetrocknet und auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. Anhang 14.10). Die folgende Abbildung 9.03 stellt den Trennungsverlauf dar.

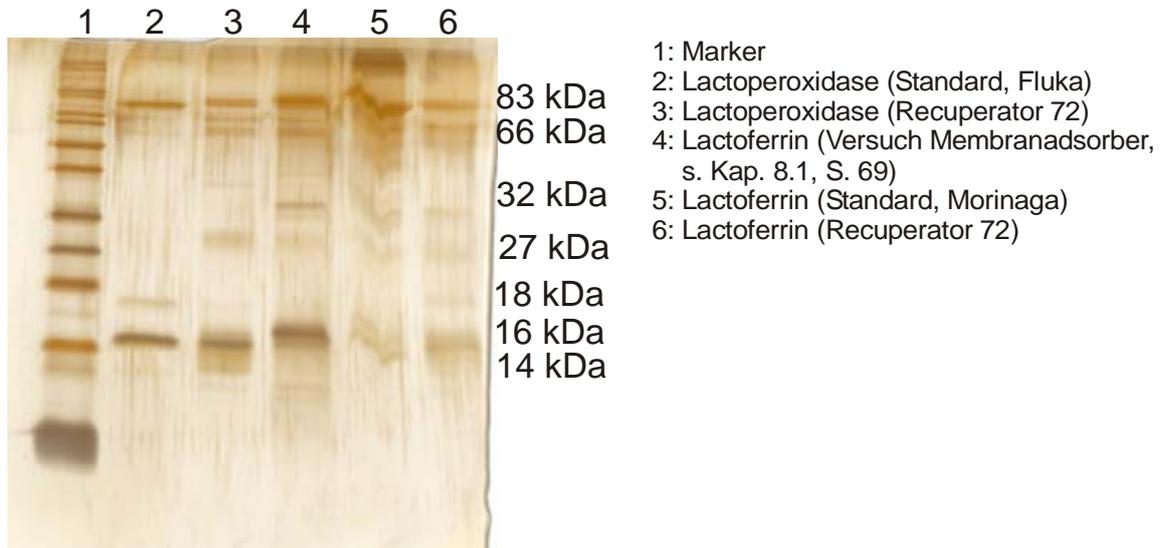


Abbildung 9.03: SDS-PAGE der Proteinproben; Silberfärbung

Es scheint, dass das Lactoferrin bzw. andere Molkenbestandteile ausgeprägte unspezifische Wechselwirkungen mit der Recuperatormembran bzw. Spacermaterial (Polypropylen) eingehen und nach dem Eluieren in die Proteinfractionen gelangen. In Spur 2 wurde Lactoperoxidase (Standard) und in Spur 3 selbst gewonnene Lactoperoxidase aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die selbst gewonnene Lactoperoxidase im Vergleich zum Standard verunreinigt ist. Man erkennt die Bande von Serumalbumin (66 kDa), sowie die Banden der majoren Molkenproteine Lactalbumin (14 kDa) und Lactoglobulin (18 kDa). Diese Verunreinigung ist vermutlich durch den Waschvorgang im Isolierungsschritt entstanden. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Lactoperoxidase auch mit Lactoferrin verunreinigt ist. Die Banden der minoren Molkenproteine Lactoferrin und Lactoperoxidase (83 kDa bzw. 81 kDa) zeigen aufgrund des ähnlichen Molekulargewichtes eine ausgeprägte Bande. Die Spuren 5 und 6 stellen Lactoferrin dar. Man erkennt, dass die starken Banden gut übereinstimmen. Beim selbst isolierten Lactoferrin ist eine leichte Verunreinigung zu erkennen, welche

vermutlich auf Lactoglobulin und Lactalbumin zurückzuführen ist. Darüber hinaus sind im Gesamtbild sehr schwache Banden zu erkennen, die vermutlich durch die Immunglobuline entstanden.

9.2 Verwendung von Recuperator 68

Um zu untersuchen ob die Spacerart einen Einfluss auf die Isolierung von Lactoferrin aus Molke hat, wurde der im Kapitel 9.1 verwendete Recuperator 72 durch den Recuperator 68 ausgetauscht. Dieser Recuperator ist mit einem Vlies-Spacer ausgestattet (s. Tabelle 9.1). Die Isolierung von Lactoferrin aus Molke wurde im Kapitel 9.1 beschrieben durchgeführt. In der folgenden Tabelle 9.5 sind die wichtigsten Versuchsparameter zusammengefasst.

Tabelle 9.5: Molkenrezirkulation; Versuchsdaten

	t [min]	pH (Molke)	P (ein) [bar]	P (aus) [bar]	DF [l/min]
Versuch 1	0	6,65	2,3	0,75	7,5
	20	6,5	2,3	0,75	7,5
Versuch 2	0	6,55	2,3	0,75	7,5
	20	6,5	2,3	0,75	7,5
Versuch 3	0	6,6	2,3	0,75	7,5
	20	6,5	2,3	0,75	7,5
Versuch 4	0	6,65	2,3	0,75	7,5
	20	6,55	2,3	0,75	7,5
Versuch 5	0	6,55	2,3	0,75	7,5
	20	6,5	2,3	0,75	7,5
Versuch 6	0	6,6	2,3	0,75	7,5
	20	6,55	2,3	0,75	7,5

Die Durchflussrate hat sich im Verlaufe der Rezirkulation nicht verändert. Der Eingangs- und Ausgangsdruck blieb dabei konstant. Es wurde wie im Kapitel 9.1 keine Verblockung der Module festgestellt. Der pH-Wert der Molke blieb im Mittel konstant und betrug ca. 6,5.

Im Laufe der Versuche wurde in regelmäßigen Abständen die Trübung der Molke gemessen. Die während des Versuches entnommenen Molke-Proben wurden mittels HPLC auf Lactoferrin-Gehalt untersucht (s. Anhang 14.8).

Tabelle 9.6: Prozessbilanz; Lactoferrin (bLF)*-Konzentrationen in Molke und auf der Membran
 * = bestimmt mit HPLC; Fehlertoleranz der Messungen 5%

Versuch	V (Molke) [l]	t [min]	Trübung (Molke) [NTU]	Lactoferrin - Gehalt		
				Molke		Membran
				[g]	[%]	[%]
1	18	0	603,5	1,65	100,0	0,0
	18	20	423,1	0,00	0,0	100,0
2	18	0	605,1	1,66	100,0	0,0
	18	20	425,5	0,00	0,0	100,0
3	18	0	600,1	1,67	100,0	0,0
	18	20	425	0,00	0,0	100,0
4	18	0	606	1,50	100,0	0,0
	18	20	426	0,00	0,0	100,0
5	18	0	606	1,75	100,0	0,0
	18	20	499	0,81	46,3	53,7
6	18	0	605,6	1,61	100,0	0,0
	18	20	500	0,88	54,6	45,4

Es lässt sich erkennen, dass das Lactoferrin (bLF) im Laufe der ersten vier Versuche vollständig an die Membran gebunden werden konnte. In den Versuchen 5 und 6 wurde nach einer Rezirkulationszeit von 20 min nur die Hälfte des in Molke enthaltenen Lactoferrins an der Membran gebunden, weshalb nach maximal 4 Versuchsschritten eine Reinigung des Recuperators durchgeführt werden soll. Berücksichtigt man die geringe Wertigkeit der Molke, so erscheint es sinnvoll, den Prozess nach dieser Zeit abubrechen. Auf diese Weise kann dann die maximale Ausbeute erreicht werden. Insgesamt konnte 83 % des in Molke vorhandenen Lactoferrins an die Membran gebunden werden. Wie erwartet nahm die Trübung der Molke über die Versuchszeit hinweg ab. Bei der Lactoferrinfreien Molke wurde, wie im Kapitel 9.1, die Trübung von 425 NTU gemessen. Abbildung 9.04 zeigt einen Vergleich der beiden Recuperator-Versuche.

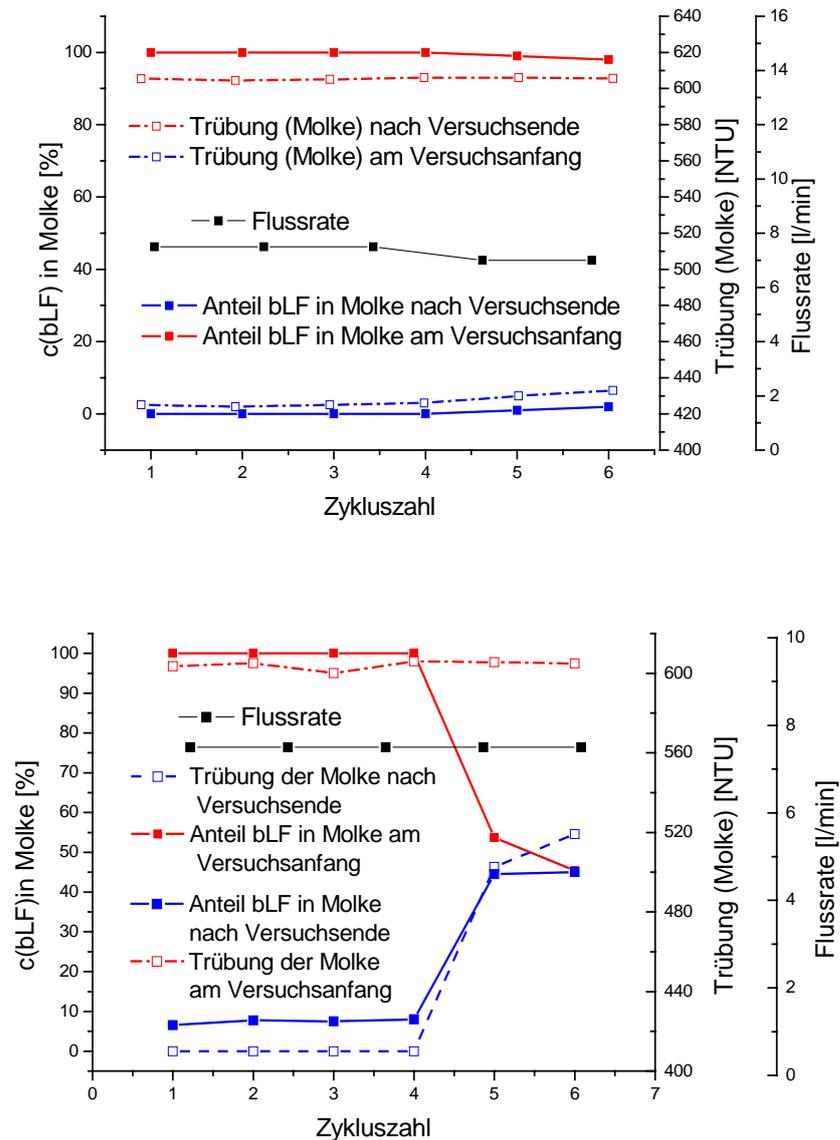


Abbildung 9.04: Auftragsverlauf mit Molke beim Recuperator 72 und 68;
 Oben: Verhalten der Flussrate und Trübung beim Recuperator 72
 Unten: Verhalten der Flussrate und Trübung beim Recuperator 68

Es zeigen sich keine Verblockungseffekte während der Auftragsungen. Die Auftragsflussraten und der Betriebsdruck bleiben konstant. Es scheint, dass die Membranporen beim Recuperator 68 nach 4 Versuchsschritten durch die zunehmende Fettadsorption für das Lactoferrin nicht zugänglich sind. Der gebildete Fettfilm führt aber nicht zu geringeren Flussraten, da beim Recuperator die Feedlösung entlang der Membranoberfläche geführt wird. Der Recuperator 68 ist zu diesem Zeitpunkt so stark belegt, dass das Lactoferrin nicht mehr optimal

mit den Bindungsplätzen der Membran wechselwirken kann; der Prozess nimmt an Effizienz ab. Mit dem Recuperator 72 können dagegen 6 Auftragungen ohne Abnahme der Effizienz durchgeführt werden. Von allen gesammelten salzhaltigen Eluaten wurde die Trübung und die Lactoferrinkonzentration gemessen.

Tabelle 9.7: Bestimmung von Trübung und bLF-Konzentration; Bilanz des Elutionsprozesses

Versuch	bLF gebunden [%]	bLF - Gehalt		Trübung	
		1 M NaCl Fraktion [%]	0,15 M NaCl Fraktion [%]	1 M NaCl Fraktion (bLF) [NTU]	0,15 M NaCl Fraktion (LP) [NTU]
1	100	60	25	192,3	46,6
2	100	62	25	190,0	46,1
3	100	61	26	190,9	45,6
4	100	60	25	195,8	45,8
5	53,7	59	26	125,5	45,7
6	45,4	60	24	126,1	47,0

Die Trübung der Lactoperoxidase-Lösung bleibt über die gesamte Versuchszeit hinweg konstant. Die Trübungswerte der Lactoferrin-Lösungen korrelieren mit den Ergebnissen der Konzentrationsmessung mittels HPLC (s. Tabelle 9.8). Geringe Konzentrationen der Lactoferrin-Lösungen entsprechen niedrigen Trübungswerten. Die Resultate der HPLC-Untersuchung zeigen, dass das Lactoferrin nur zu 60 % wiedergewonnen werden konnte. Verglichen mit den Ergebnissen aus dem Versuch „Recuperator 72“, ist die Gesamt-Proteinanreicherung mit dem Recuperator 68 um 10 % schlechter. Mittels HPLC-Messung wurde die prozentuelle Menge an Lactoferrin in der Lactoperoxidase-Fraktion zu ca. 25 % bestimmt. Zirka 5 % liegen im Rahmen der Fehlertoleranz der HPLC-Analytik. Die restlichen 10 % des Lactoferrins sind wahrscheinlich auf der Membran bzw. Vlies-Spacer verblieben. Die Verluste können eventuell auf die unspezifische Wechselwirkungen des verwendeten Spacermaterials mit dem Zielprotein zurückgeführt werden. Die mit Protein besetzten Membranporen sind für das Elutionsmedium auf Grund der großen und glatten Spacer-Oberfläche schwer zugänglich. Diese nicht ausreichend genug umspülten Membranporen führen so zum Proteinverlust. Durch eine frühzeitige Reinigung der eingesetzten Austauschermembran könnten die Proteinverluste minimiert werden. Auch hier wurden die

erhaltenen salzhaltigen Eluate, wie im Kapitel 8.2 beschrieben, mittels Ultra-/Diafiltration entsalzt und aufkonzentriert. Danach wurden salzfreien Konzentrate gefriergetrocknet und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

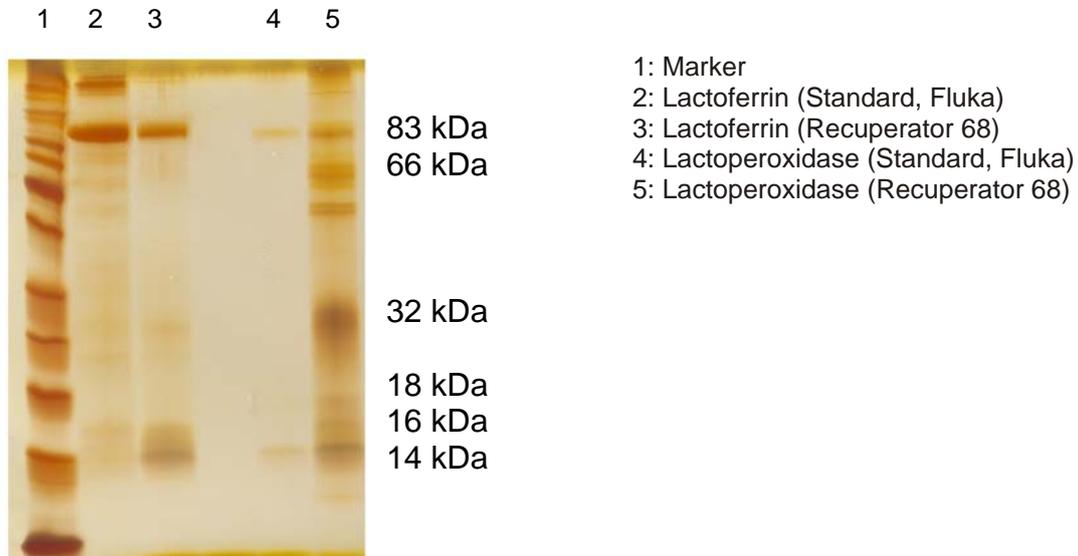


Abbildung 9.05: SDS-Page der Proteinproben; Silberfärbung

Abbildung 9.05 zeigt, dass die selbst gewonnene Lactoperoxidase im Vergleich zum Standard Verunreinigungen aufweist. Bei den Verunreinigungen handelt es sich um Lactalbumin (14 kDa), Lactoglobulin (18 kDa) und Serumalbumin (66 kDa). Die Verunreinigungen in der Lactoperoxidase-Fraktion sind vermutlich, wie im Versuch mit dem Recuperator 72, durch den Waschvorgang im Isolierungsschritt entstanden. Das Lactoferrin (Standard, Fluka) auf Spur 2 zeigt eine durch Immunglobuline (> 146 kDa) entstandene Verunreinigung, die aber bei dem selbst hergestellten Lactoferrin nicht auftritt. Das Verunreinigungsbild ist dem in Abbildung 9.03 (s. Kapitel 9.1) sehr ähnlich.

9.3 Reinigung der Module

Nachdem das Lactoferrin und die Lactoperoxidase isoliert wurden, musste eine Reinigung der verwendeten Recuperatoren 72 und 68 durchgeführt werden. Für die Reinigung wurde Natronlauge (0,5 M) eingesetzt. Das Spülen zwischen Reinigungsschritten und die Bestimmung des charakteristischen Wasserwertes

erfolgte mit Natriumphosphat-Puffer (20 mM; pH 7). Die Reinigung wurde mit Natronlauge bei 23°C und 40°C durchgeführt. Die Reinigungsmethode und das Gesamtvolumen an Reinigungsmittel blieben unverändert.

Reinigungsmethode: $\sum V_{\text{Reinigungsmittel}} = 22 \text{ l}$

- 1) spülen mit Natriumphosphat-Puffer ($V_{\text{NaPP}} = 7 \text{ l}$)
- 2) spülen mit NaOH (5 l verwerfen)
- 3) NaOH im Kreis pumpen ($V_{\text{NaOH}} = 5 \text{ l}$)
- 4) spülen mit Natriumphosphat-Puffer ($V_{\text{NaPP}} = 5 \text{ l}$)

Eine Übersicht über die Effizienz dieser Reinigungsmethode gibt die folgende Abbildung 9.06.

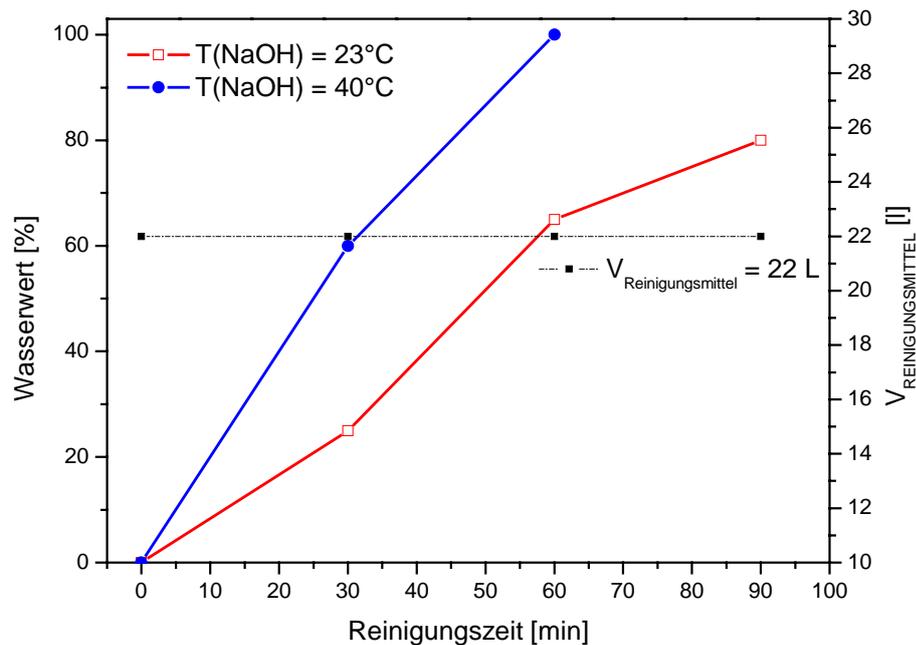


Abbildung 9.06: Zunahme der Wasserwerte bei $T = 23^\circ\text{C}$ und 40°C während einer Reinigung

Je länger die Natronlauge bei jeweiligen Temperaturen im Kreis gepumpt wurde, desto höher war der Reinigungseffekt. Zunächst wurde die Reinigung bei einer Temperatur der Reinigungslösung von 23°C durchgeführt. Der zuvor ermittelte Wasserwert konnte nach einer Reinigungszeit von 90 min nur zu 80 % wieder-

hergestellt werden. Nach Erhöhung der Reinigungstemperatur auf 40°C wurde der Wasserwert nach einem Zeitaufwand von 60 min zu 100 % wiederhergestellt. Hier wurde noch mal deutlich gezeigt, dass allein die Temperatur der Reinigungslösung und nicht die Menge an verwendeten Chemikalien einen großen und positiven Einfluss auf die Reinigungsdauer hat.

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 9.1 – 9.3 lassen sich wie folgt zusammenfassen: Es wurde gezeigt, dass die Isolierung von Lactoferrin und Lactoperoxidase als Nebenprodukt mit Hilfe der Recuperatoren 72 und 68 möglich ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Spacerart einen entscheidenden Einfluss auf die Lactoferrin-Gewinnung hat. Unter Verwendung eines extrudierten Spacers (Recuperator 72) wurden bessere Ausbeuten erzielt als mit einem Vlies-Spacer (Recuperator 68). Die Selektivität des Prozesses wurde anhand eines Elektrophoresegels untersucht. Die gewonnenen Eluate zeigen eine dominante Bande, welche auf Lactoferrin und Lactoperoxidase zurückgeht. Verunreinigungen waren in Spuren zu erkennen und wurden auf Albumin und Immunglobuline zurückgeführt. Es wurde eine Reinigungsmethode entwickelt, die den Wasserfluss innerhalb von nur 60 min zu 100 % wieder herstellt.

10 Isolierung von Lactoferrin aus Molkenkonzentrat im Rezirkulationsverfahren

Im Kapitel 9 wurde festgestellt, dass die Isolierung von Lactoferrin aus Molke unter Verwendung von Recuperator 72 (Spacerart: extrudiert) am besten verläuft. Aus diesem Grund wurde für die Versuche mit Molkenkonzentrat auch ein Recuperator mit dem extrudierten Spacer eingesetzt. Dieser Recuperator trägt die Nummer 73. Die Recuperatoren 72 und 73 unterscheiden sich nur in Hinblick auf die Membranfläche und die Membranlänge bestehen aber aus dem gleichen Membrantyp.

10.1 Verwendung von Recuperator 73

Das Molkenkonzentrat als Rohstoff wurde von der Firma Biolac GmbH & Co. KG, Harnbarnsen, zur Verfügung gestellt. Beim Molkenkonzentrat handelt es sich um die fünffach aufkonzentrierte Molke. Es wurden 8 l Molkenkonzentrat (MK) 60 min über Recuperator 73 (s. Tabelle 9.1) im Kreis gepumpt. Anschließend ist mit 30 l 20 mM Natriumphosphat-Puffer gespült worden, um nicht gebundene Molkenbestandteile aus dem Membranadsorber auszutragen. Alle 10 min wurde eine Probe genommen und der Lactoferrin-Gehalt mittels HPLC-Messung bestimmt. Wie im Kapitel 9 beschrieben, wurde dann eluiert und die einzelnen Fraktionen gesammelt. Der Versuch wurde dreimal unter jeweils gleichen Bedingungen wiederholt. Dabei erfolgte zwischen den einzelnen Versuchen keine Reinigung des Recuperators. In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Versuchsparameter zusammengefasst.

Tabelle 10.1: Molkenkonzentratrezirkulation; Versuchsdaten; Messwerte; MK = Molkenkonzentrat

	t [min]	pH (MK)	P (ein) [bar]	P (aus) [bar]	DF [l/min]
Versuch 1	0	6,4	1,5	0,5	6
	60	6,36	1,7	0,4	5,3
Versuch 2	0	6,4	1,55	0,6	6
	60	6,4	1,65	0,45	5,2
Versuch 3	0	6,4	1,8	0,55	6
	60	6,3	1,85	0,5	5,1

Die Durchflussrate nimmt im Verlauf der Rezirkulation leicht ab. Dies beruht auf einer ständigen Zunahme des Gegendrucks des Recuperators. Die während des Rezirkulations- und Elutionsprozesses entnommenen Proben wurden mittels HPLC untersucht. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

Tabelle 10.2: Prozessbilanz; Verarbeitung von 24 l Molkenkonzentrat mittels Recuperator 73
* Verdünnung: (MK : H₂O / 1 : 5); Turbiquant 1.100 IR, Merck KGaA

Versuch	V (MK) [l]	t [min]	Trübung (Molke) [NTU]*	bLF - Gehalt			bLF - Gehalt	
				MK		Membran	1 M NaCl	0,15 M NaCl
				[g]	[%]	[%]	Fraktion [%]	Fraktion [%]
1	8	0	999	1,25	100	0		
	8	10	nb	0,86	75	25		
	8	20	nb	0,82	71,3	28,7		
	8	30	860	0,82	71,3	28,7		
	8	40	nb	0,77	67	33		
	8	50	nb	0,77	67	33		
	8	60	800	0,77	67	33	81	16,6
2	8	0	990	1,25	100	0		
	8	10	nb	1	80	20		
	8	20	nb	0,96	77	23		
	8	30	856	0,9	72	28		
	8	40	nb	0,9	72	28		
	8	50	nb	0,9	72	28		
	8	60	850	0,9	72	28	72	20
3	8	0	995	1,24	100	0		
	8	10	nb	1,2	97	3		
	8	20	nb	1,2	97	3		
	8	30	880	1,1	88,8	11,2		
	8	40	nb	1,08	87,8	12,2		
	8	50	nb	1,08	87,8	12,2		
	8	60	880	1,1	88,9	11,1	53	21

Schon im ersten Beladungsschritt konnte nur 33 % Lactoferrin an die Membran gebunden werden. Im Versuch 3 wurde nach einer Rezirkulationszeit von 60 min ein noch geringerer Lactoferrin-Gehalt gemessen. Es wurde durchschnittlich nur ca. 24 % des im Molkenkonzentrat vorhandenen Lactoferrins an die Membran gebunden. Es lässt sich auch nur eine leichte Abnahme der Trübung des Konzentrats erkennen. Der Vergleich der Ergebnisse der HPLC-Analytik zeigt deutlich, dass der Großteil an Protein in den ersten 20 min an der Membran bindet. Danach erfolgt keine Abnahme an Protein in Molkenkonzentrat. Aus diesem Grund wurden die Beladungen nach 60 min abgebrochen. Die Ergebnisse

des ersten Versuches können zur Abschätzung der statischen Bindekapazität des Recuperators (Membranfläche 13.734 cm²) herangezogen werden. Der Recuperator wurde mit Molkenkonzentrat beladen, bis die Lactoferrinmenge im Vorlagebehälter einen konstanten Wert annahm. Unter der Annahme, dass Lactoferrin und Lactoperoxidase (LP) in gleichem Mengenverhältnis binden, kann man aufgrund der 4fachen Lactoferrinmenge in Molke (100 mg/l bLF und 25 mg/l LP) darauf schließen, dass pro 4 mg bLF 1 mg LP gebunden werden. Demnach würden in erster Näherung 360 mg Lactoferrin aus Molkenkonzentrat vom Recuperator gebunden, was einer statischen Bindekapazität von 0,026 mg/cm² entspräche.

Im ersten Versuch bzw. Zyklus können 16,6 % des aufgetragenen Lactoferrins in der 0,15 M NaCl-Fraktion detektiert werden. Die Wiederfindungsrate an Lactoferrin beträgt hier noch ca. 98 %. Nach dem 2. Versuch finden sich 20 % an Lactoferrin in der 0,15 M NaCl-Fraktion und nur noch 72 % in der 1 M NaCl-Fraktion. Im 3. Versuch beträgt die Wiederfindungsrate nur noch 74 %. Es muss demnach fest gebundenes Lactoferrin auf der Recuperator-Membran verblieben sein. Dies könnte auch den Druckanstieg in der Anlage erklären. Eine andere mögliche Ursache dieser Proteinverluste könnte ein zunehmendes Ausmaß an Membranfouling sein (z.B. Adsorption von Fetten an der Membran). Die Membranporen sind durch die Fettadsorption für das Zielprotein nicht mehr zugänglich. Das Protein wird dann vom Spacer zurückgehalten. Unter der Annahme, dass tatsächlich eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Lactoferrin und Spacermaterial besteht, lassen sich die Proteinverluste und der Druckanstieg in der Anlage erklären. Durch das Herabsetzen der Beladungsdauer oder durch das Zwischenschalten eines Reinigungsschrittes könnte die Abnahme der Trennleistung des Recuperators reduziert werden. Eine zweite Möglichkeit diesen Prozess zu optimieren, wäre die Durchführung der Mikrofiltration von Molkenkonzentrat. Dadurch werden alle Partikel, die größer sind als 0,2 µm zurückgehalten. Das partikelfreie Permeat ließe sich dann besser aufarbeiten. Die Reinigung der Recuperator-Membran wurde wie im Kapitel 9.3 beschrieben durchgeführt. Es wurde eine optimierte Reinigungsmethode angewandt. Die Temperatur der Natronlauge (0,5 M) betrug 40°C.

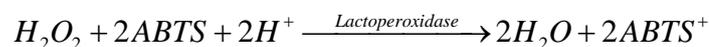
Reinigungsmethode: Zeitaufwand: ca. 70 min; $\sum V_{\text{Reinigungsmittel}} = 22 \text{ l}$

- 1) spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7; 7 l)
- 2) spülen mit NaOH (5 L verwerfen)
- 3) NaOH im Kreis pumpen (5 l)
- 4) spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7; 5 l)

Die Reinigung verlief problemlos. Durch Anwendung dieser Reinigungsmethode konnte die Ausgangsflussrate des Recuperators 73 zu 100 % wiederhergestellt werden.

11 Lactoperoxidase-Assay

Lactoperoxidase fällt bei der Isolierung von Lactoferrin als Nebenprodukt an. Um die enzymatische Aktivität der isolierten Lactoperoxidase zu bestimmen, wurde die Reaktion von H_2O_2 mit 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-sulfonsäure-(6)) (ABTS), die von Lactoperoxidase (LPO) katalysiert wird, photometrisch bei 405 nm verfolgt [93]. ABTS ist ein heterocyclisches Azin, welches als Redoxsystem drei Oxidationsstufen aufweist. In einem ersten Schritt wird das farblose Azin zu einem stark gefärbten, stabilen Radikalkation oxidiert und bei einem weiteren Elektronenentzug in ein Azodikation überführt. In einem zweiten Schritt wird das grün gefärbte Radikalkation zum roten Dikation oxidiert. Dies ist nur bei großem Überschuss an Oxidationsmittel und in stark saurem Reaktionsmedium möglich. Unter der katalytischen Einwirkung von Lactoperoxidase oxidiert 1 Mol H_2O_2 2 Mol reduziertes ABTS zum stabilen, grünen ABTS-Radikalkation:



Für die Durchführung des Assays wurden folgende Lösungen benötigt:

- 20 mM/l ABTS-Lösung : 1,1 g ABTS in 100 ml Phosphat-Puffer lösen
- 67 mM/l Phosphat-Puffer: 7,57 g NaH_2PO_4 + 0,55 g NaHPO_4 in 1.000 ml bidest. H_2O (pH 6)

- 10 mM/l H₂O₂-Lösung: 0,85 ml 35%ige H₂O₂-Lösung in 1.000 ml bidest. H₂O
- Lactoperoxidaselösungen: Stammlösungen von 0,5 mg/ml ansetzen

In einer Küvette wurden 200 µl ABTS und 200 µl H₂O₂-Lösung vorgelegt. Danach wurden 10 µl der Lactoperoxidase-Lösung mit 1.990 µl Puffer verdünnt, in die Küvette gegeben und die Messung gleichzeitig gestartet. Zur Berechnung der Lactoperoxidase-Aktivität wurden die Absorptionswerte 1 min und 6 min nach der Verdünnung verwendet. Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$b = \frac{\Delta A \cdot Vdf}{\varepsilon \cdot d \cdot \Delta t \cdot v} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \right]$$

- ΔA = Änderung der Absorption zwischen der 1. und 6. Minute
- Δt = beobachteter Zeitraum (5 min)
- V = Gesamtvolumen der Probe in L ($2,4 \cdot 10^{-3}$)
- v = Volumen der Lactoperoxidaselösung in L ($1 \cdot 10^{-5}$)
- ε = Absorptionskoeffizient von ABTS bei 405 nm ($1,86 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$)
- d = Schichtdicke der Küvette
- df = Verdünnungsfaktor der Lactoperoxidaselösung

Die Aktivität wird in Units/mg angegeben. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Lactoperoxidase-Aktivität der folgenden Proben untersucht:

- Lactoperoxidase (selbst hergestellt)
- Peroxidase-Standard aus Meerrettich (Fluka)
- Lactoperoxidase-Standard aus Kuhmilch (Sigma)

Es musste allerdings berücksichtigt werden, dass die im Rezirkulationsverfahren isolierten Lactoperoxidasen (Recuperator 68 und 72) zu 25 % mit Lactoferrin verunreinigt sind (s. Kapitel 9). Die im Durchlaufverfahren (Wickelmodul) isolierte Lactoperoxidase enthält nur 5 % Lactoferrin (s. Kapitel 8). Deswegen wurden die gemessenen Aktivitäten der selbst hergestellten Proben um den Verunreinigungs-

anteil korrigiert und maximal mögliche Enzymaktivität berechnet. In der folgenden Abbildung 11.1 sind die Ergebnisse des Lactoperoxidase-Assays im Vergleich dargestellt.

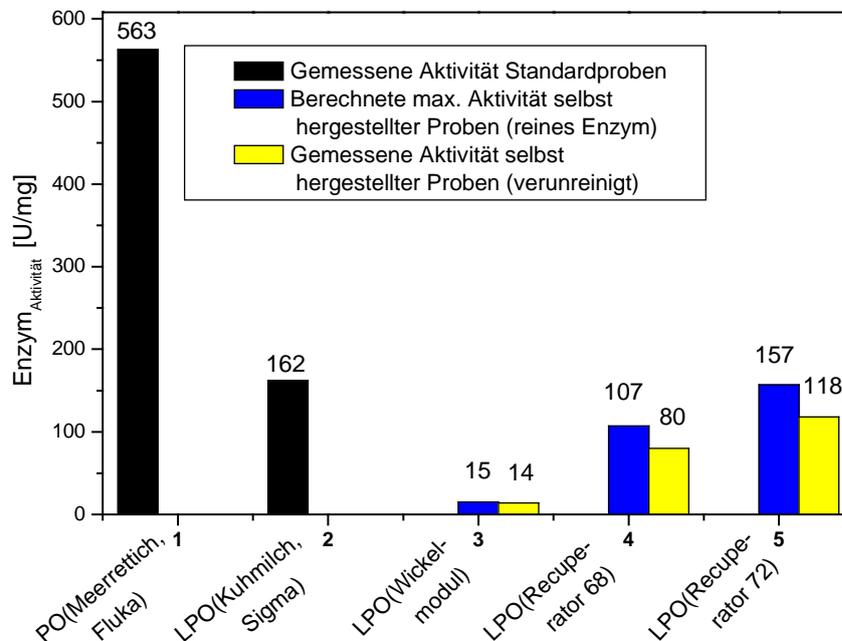


Abbildung 11.1: Vergleich der enzymatischen Aktivität verschiedener Lactoperoxidaseproben

Die aus Meerrettich und Kuhmilch gewonnene Enzymen zeigen hohe Aktivitäten. Beide Werte liegen im Bereich der vom Hersteller (Fluka; Sigma) angegebenen Aktivitäten. Bei den Proben 3, 4 und 5 handelt es sich um die selbst hergestellten Lactoperoxidaseproben. Die Lactoperoxidase, die im Durchlaufverfahren gewonnen wurde (s. Kapitel 8), zeigt eine geringere Aktivität im Vergleich zu den Lactoperoxidaseproben 4 und 5, die im Rezirkulationsverfahren hergestellt wurden (Recuperator 68 und 72; s. Kapitel 9). Dieser deutliche Aktivitätsunterschied kann verschiedene Ursachen haben. Der erste Schritt bei der Isolierung von Lactoperoxidase im Durchlaufverfahren ist die Mikrofiltration. Lactoperoxidase ist relativ temperaturempfindlich, so dass das Enzym eventuell durch die Erwärmung auf ca. 50°C durch die Mikrofiltration teilweise denaturiert worden sein könnte. Die Mikrofiltration wurde bei einem Eingangsdruck von 2 bar durchgeführt. Die dabei

auftretende Scherkräfte können sich auf die Aktivität des Enzyms auswirken. Die gewonnene Lactoperoxidase wurde gefriergetrocknet. Die Gefriertrocknung erfolgte bei Raumtemperatur über 24 h. Das ist eventuell ein weiterer negativer Einfluss auf die Enzymaktivität. Die enzymatische Aktivität von Lactoperoxidase, die unter Verwendung von Recuperator 72 isoliert wurde, zeigt eine achtmal höhere Aktivität im Vergleich zu der Lactoperoxidaseprobe 3, die im Durchlaufverfahren gewonnen wurde. Beim Rezirkulationsverfahren verzichtet man auf die Mikrofiltration und beginnt direkt mit der Beladung der Recuperatormembran (s. Kapitel 9). Die so erhaltenen Lactoperoxidaseproben wurden auch gefriergetrocknet. Es liegt daher nahe, die Ursache des Aktivitätsverlustes der im Durchlaufverfahren gewonnenen Lactoperoxidase bei der Mikrofiltration zu suchen, da die anderen Prozessschritte sehr ähnlich sind. Die wirtschaftliche Aufarbeitung erscheint mit der auf Lactoferrin optimierten Methode nicht sinnvoll, da die gewonnene Lactoperoxidase sehr kleine Aktivität aufweist. Die Aktivität der durch Rezirkulationsverfahren isolierten Lactoperoxidase ist relativ hoch und unter Berücksichtigung des Verunreinigungsgrades entspricht sogar der kommerziell erhältlichen Lactoperoxidase. Durch eine zusätzliche auf Lactoperoxidase optimierte Isolierungsstufe, könnten größere Mengen an Enzym mit höherer Reinheit hergestellt werden und somit die Ausbeute an Lactoferrin als Hauptprodukt erhöht.

12 Herstellung und Isolierung von Lactoferricin

Lactoferricin kann durch Pepsin-Verdau von bovinem Lactoferrin hergestellt werden [69 – 72].

Dazu ist folgender Versuchsablauf einzuhalten:

- 5 % (w/v) Lactoferrinlösung mit bidest. Wasser ansetzen
- pH-Wert der Lösung mit 0,1 M HCl auf 2,5 einstellen
- 3 % Pepsin (w/w) zugeben
- Hydrolyse: T = 37°C, t = 5 – 6 h
- Reaktionsabbruch: Hydrolyselösung für 15 min auf 80°C erhitzen
- pH-Wert der Lösung mit 0,1 M NaOH auf 7 einstellen
- Präzipitate abzentrifugieren und schließlich lyophilisieren

Diese Standard-Methode hat allerdings folgende Nachteile:

- a) Der pH-Wert der Reaktionslösung steigt während der Reaktion auf 4,6. Das Wirkungsoptimum des Enzyms liegt aber im sehr sauren Bereich zwischen pH 1,5 – 2,5.
- b) Lange Reaktionszeiten (Produktbildungszeiten)
- c) Keine Verwendung des Enzyms nach dem Abbruch der Reaktion (Denaturierung).

Aus diesem Grund wurden Optimierungen des Standard-Verfahrens durchgeführt. Zuerst wurden Untersuchungen zur diskontinuierlichen Herstellung von Lactoferricin durchgeführt (s. Abbildung 12.01). Aufbauend auf den Entwicklungen zur diskontinuierlichen Herstellung sollte eine Methode entwickelt werden, durch die Lactoferricin kontinuierlich hergestellt werden kann. Dieses Ziel beinhaltet viele Teilziele die zur Ermöglichung der Herstellung von Lactoferricin führen.

Teilziele:

- Bestimmung des optimalen pH-Wertes der Reaktionslösung (pH-Kontrollierter Pepsinverdau)
- Trennung des Pepsins von der Reaktionslösung (Wiederverwendung des Enzyms)

- Isolierung von Lactoferricin aus dem Hydrolysat (FPLC)
- Optimierung der Entsalzung der Lactoferricin-Fractionen
- Produktkontrolle mit MALDI-MS
- Produktanalytik mit HPLC

Die Arbeiten wurden an einer pH-Stat-Anlage mit integrierter pH-Elektrode durchgeführt, wie sie in Abbildung 12.01 dargestellt ist.

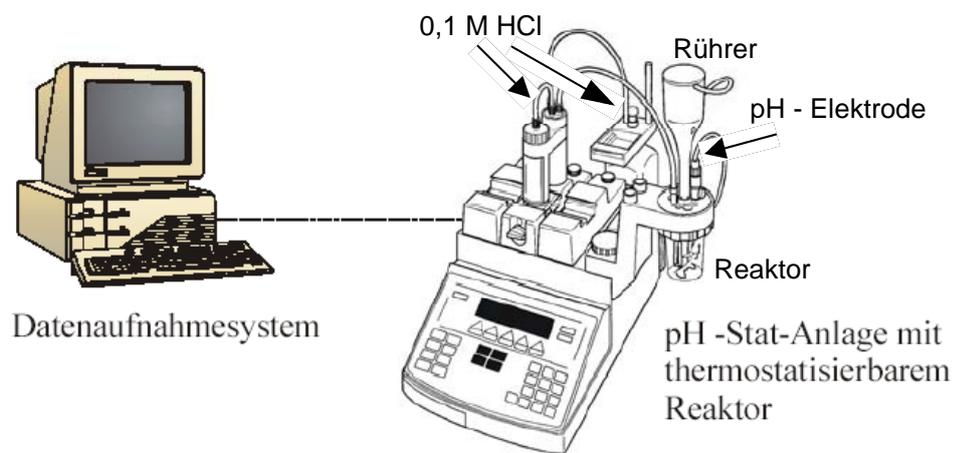


Abbildung 12.01: pH-Stat-Anlage zur Gewinnung von Lactoferricin

12.1 Bestimmung des optimalen pH-Wertes der Reaktionslösung

Der enzymatische Abbau von bovinem Lactoferrin wurde mit Pepsin (Sigma) bei pH-Werten von 1,5, 2,0 und 2,5 durchgeführt. Die Temperatur der Reaktionslösungen betrug jeweils 37°C. Mit Hilfe der pH-Stat-Anlage konnten der pH-Wert und die Reaktionstemperatur während des Herstellungsprozesses konstant gehalten werden (s. Abbildung 12.01).

Der Fortgang der Versuche wurde durch die Messung des Verbrauches an 0,1 M HCl verfolgt. Die folgende Abbildung 12.02 zeigt diese Reaktionsverläufe.

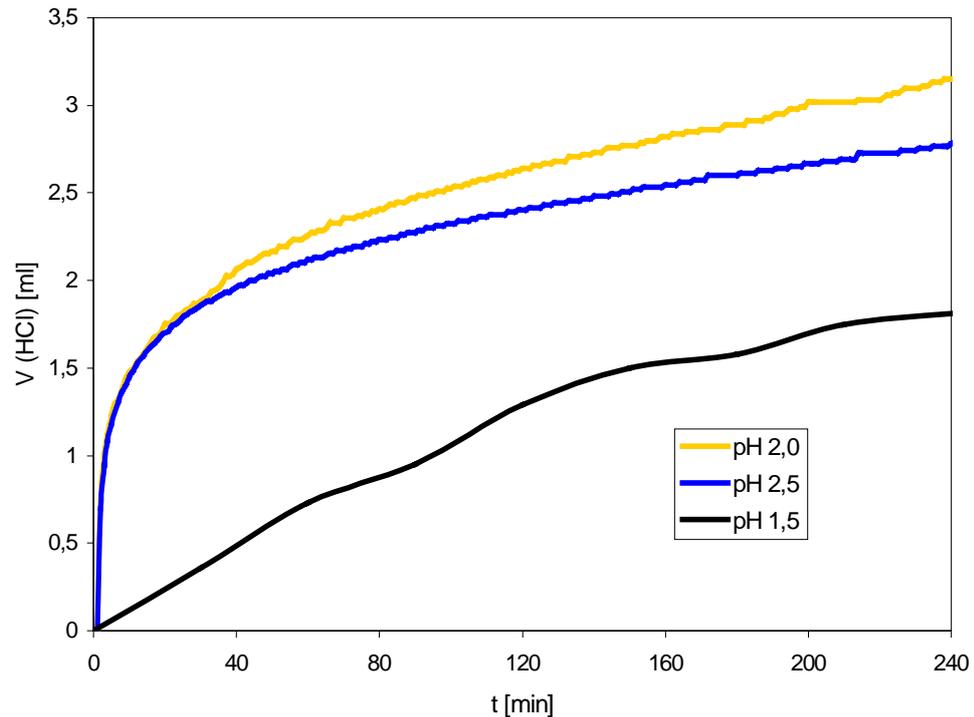


Abbildung 12.02: Verbrauch an HCl (0,1 M) in 4 h; $T = 37^{\circ}\text{C}$; $V_R = 40 \text{ ml}$; $v (\text{Rührer}) = 300 \text{ min}^{-1}$

Es lässt sich erkennen, dass in der ersten Stunde die Zugabe von 0,1 M HCl bei den Reaktionen, die bei pH-Werten von 2,0 und 2,5 durchgeführt wurden, steigt. Im weiterem Verlauf der Reaktion wurde nur sehr wenig HCl zugegeben. Der Verlauf der Reaktion bei pH 1,5 unterscheidet sich von den Reaktionsverläufen bei pH-Werten von 2,0 und 2,5. Hier ist zu erkennen, dass der Verbrauch an HCl während einer Reaktionszeit von 4 h ansteigt. Dieser Pepsinverdau wurde mehrmals unter gleichen Bedingungen wiederholt. Die Wiederholungsversuche führten zu den gleichen Ergebnissen. Um den Verlauf dieser Reaktionen deutlicher zu machen, wurde der Verbrauch an HCl pro Reaktionsstunde berechnet. Die Ergebnisse stellt folgende Abbildung 12.03 dar.

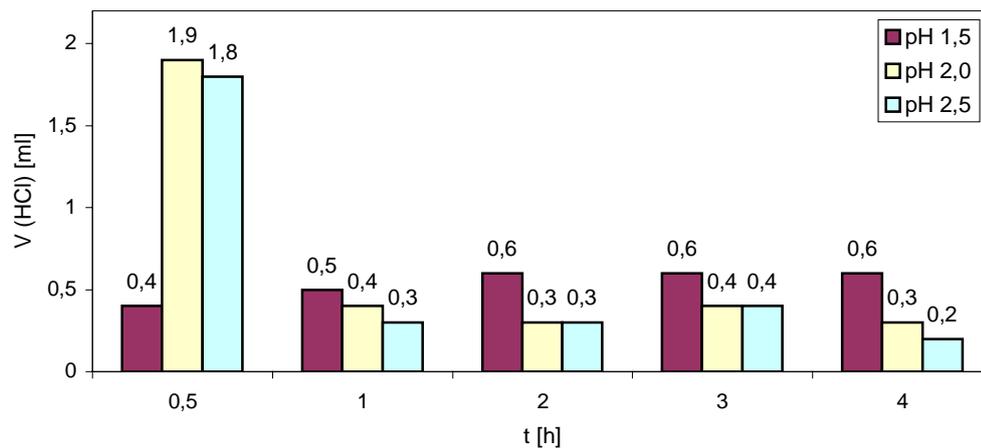


Abbildung 12.03: Verbrauch an HCl (0,1 M); $T = 37^{\circ}\text{C}$; $v(\text{Rührer}) = 300 \text{ min}^{-1}$

Die Graphik zeigt deutlich, dass der Verbrauch an HCl bei pH-Werten von 2,0 und 2,5 nach 0,5 h maximal ist und im weiteren Reaktionsverlauf im Mittel konstant bleibt. Beim pH-Wert von 2 wurde schon nach einer Reaktionszeit von 0,5 h ca. 58 % des Gesamtverbrauchs an HCl zutitriert. Im Vergleich dazu wurde bei dem pH-Wert von 1,5 nur 15 % an HCl verbraucht. Das alles deutet darauf hin, dass die eigentliche Biotransformation von Lactoferrin zu Lactoferricin bei dem pH-Wert von 2,0 schon nach 0,5 h abgeschlossen ist. Die Reaktion beim pH-Wert von 1,5 stellte keine optimale Bedingungen für den Pepsinverdau dar. Das verwendete Enzym ist in diesem pH-Bereich offensichtlich wenig aktiv. Dieser Aktivitätsverlust kam wahrscheinlich durch den Effekt der Säuredenaturierung zustande.

Das Wirkungsoptimum des Pepsins liegt also im sauren Bereich bei pH 2,0 und entspricht dem Aktivitätsoptimum des kommerziell erhältlichen Enzyms (Sigma). Deswegen wurden alle weiteren Untersuchungen zur Biotransformation von Lactoferrin bei diesem pH-Wert durchgeführt. Nachdem der optimale pH-Wert der Reaktionslösung bestimmt wurde, musste untersucht werden, nach welcher Reaktionszeit die maximale Lactoferricin-Menge entsteht. Dazu wurden alle 30 min Proben entnommen und mittels HPLC (Nucleosil Säule C8 5 μm , Fa. Suppelco) untersucht (s. Anhang 14.8). Abbildung 12.04 stellt die Ergebnisse der HPLC-Analytik dar.

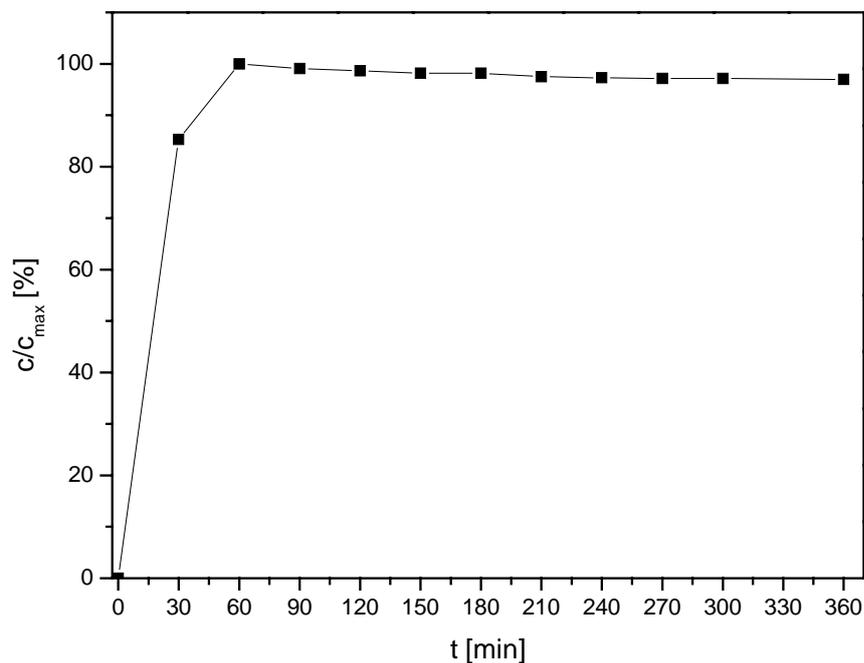


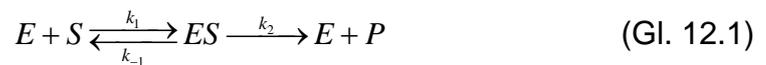
Abbildung 12.04: Bestimmung von Lactoferricin (LFcinB) mittels HPLC (Nucleosil Säule C8 5 µm, Fa. Suppelco) UV = 280 nm; Hydrolysat pH 2,0;

Abbildung 12.04 zeigt, dass nach einer Reaktionszeit von 30 min ca. 85 % und nach 60 min sogar der maximale Lactoferricingehalt detektiert wurde. Es scheint, dass das Pepsin eine recht hohe Affinität zum Lactoferrin hat. Es lässt sich aber auch erkennen, dass nach einer Reaktionszeit von 1 h mehr Lactoferricin nachzuweisen ist, als nach 6 h.

Mit zunehmender Reaktionszeit nimmt die Lactoferricin-Konzentration also wieder ab. Diese Abnahme ist wahrscheinlich auf eine fortlaufende enzymatische Fragmentierung des Pepsins zurückzuführen, so dass hier, um möglichst hohe Lactoferricinausbeuten zu erreichen, die Einwirkdauer des Pepsins möglichst kurz gehalten werden muss. Bei konstant gehaltenem pH-Wert lässt sich somit die Reaktionszeit von 6 h auf ca. 30 min reduzieren.

12.1.1 Enzymkinetik

Für eine nähere Betrachtung des Pepsinverdau muss die Kinetik dieser Reaktion bestimmt werden. Die Bestimmung der Reaktionskinetik erfolgte mit Hilfe von Michaelis-Menten-Model. Voraussetzung ist, dass das Enzym mit dem Substrat einen Enzym-Substrat-Komplex bildet, der dann in das Produkt und das Enzym abreagiert. Die Reaktionsgleichung hierfür lautet:



E = Enzym (Pepsin); S = Substrat (Lactoferrin)

ES = Enzym-Substrat-Komplex; P = Produkt (Lactoferricin)

Unter der Annahme eines stationären Zustandes $\left(\frac{d[ES]}{dt}\right) = 0$ erhält man folgende

Beziehung:
$$v = \frac{d[P]}{dt} = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (\text{Gl. 12.2})$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit; v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

K_M = Michaelis-Menten-Konstante

Die Michaelis-Menten-Konstante ist ein Maß für eine Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat und damit ein Charakteristikum für Pepsin im Bezug auf Lactoferrin [94]. Es lassen sich drei Grenzfälle betrachten:

- $[S] \leq 0,01 K_M \Rightarrow$ Reaktion 1. Ordnung ($v = \frac{v_{\max}}{K_M} \cdot [S]$)
- $[S] = 0,01 \dots K_M \Rightarrow$ Reaktion gemischter Ordnung
- $[S] \geq 100 K_M \Rightarrow$ Reaktion 0. Ordnung ($v = v_{\max}$)

Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante erfolgt zweckmäßigerweise durch Umformung der Gleichung 12.2:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (\text{Gl. 12.3})$$

Diese doppelt reziproke Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration, deren graphische Darstellung auch Lineweaver-Burk-Auftragung genannt wird, erlaubt eine einfache Ablesung der Konstanten K_M bzw. v_{\max} .

Im Rahmen dieses Versuches wurde Geschwindigkeit und K_M des Pepsinverdaus bestimmt. Für die Bestimmung der Geschwindigkeit wurde das Volumen an zutitrierter 0,1 M HCl verwendet. Dazu wurden Lösungen verschiedener Lactoferrinkonzentrationen mit einer konstanten Pepsinmenge (3% (w/w)) versetzt (s. Tabelle 12.1). Der Pepsinverdau wurde bei pH = 2 und 37°C durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug jeweils 30 min.

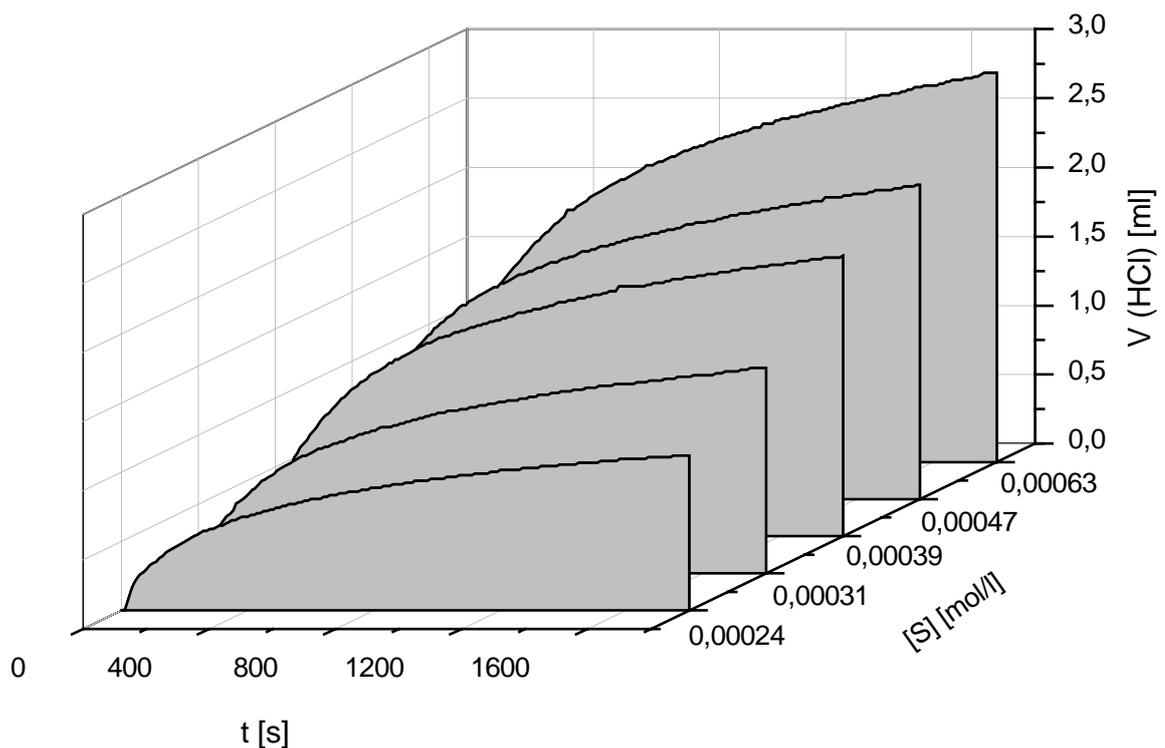


Abbildung 12.05: Vergleich der Reaktionsverläufe; pH 2; T = 37°C; pH-Stat-Anlage; [95]

Die Resultate dieser Untersuchungen entsprechen den Erwartungen. Je höher die Substratkonzentration ist, desto mehr 0,1 M HCl wird verbraucht. Aus den Reaktionsverläufen wurden dann die Anfangsgeschwindigkeiten der einzelnen Reaktionen ermittelt.

Tabelle 12.1: Ermittelte Anfangsgeschwindigkeiten und berechnete Daten für Lineweaver-Burk-Auftragung

[S] [mol/l]	1/[S] [l/mol]	V_0 [ml/s]	V_0 [mol/(l·s)]	1/ V_0 [(l·s)/mol]
$2,4 \cdot 10^{-4}$	4167	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$0,069 \cdot 10^{-4}$	144927,5
$3,1 \cdot 10^{-4}$	3226	$2,8 \cdot 10^{-3}$	$0,092 \cdot 10^{-4}$	108695,7
$3,9 \cdot 10^{-4}$	2564	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$0,12 \cdot 10^{-4}$	83333,3
$4,7 \cdot 10^{-4}$	2128	$4,3 \cdot 10^{-3}$	$0,14 \cdot 10^{-4}$	71428,6
$6,3 \cdot 10^{-4}$	1587	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$0,16 \cdot 10^{-4}$	62500,0

Bei einer Verdopplung der Substratkonzentration wurde auch doppelt so viel 0,1 M HCl zugegeben. Diese Abhängigkeit wurde auch bei der Bestimmung von Anfangsgeschwindigkeiten festgestellt. Für eine Reaktion mit der Substratkonzentration von $2,4 \cdot 10^{-4}$ mol/l wurde eine Anfangsgeschwindigkeit von $0,069 \cdot 10^{-4}$ mol/(l·s) bestimmt. Die Anfangsgeschwindigkeit von $0,14 \cdot 10^{-4}$ mol/(l·s) wurde bei einer Reaktion mit der Substratkonzentration von $4,7 \cdot 10^{-4}$ mol/l ermittelt. Die Geschwindigkeit steigt mit der zunehmenden Konzentration linear an (Reaktion 1. Ordnung). Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte mit Hilfe der Gleichung 12.3. Dafür wurden die in der Tabelle 12.1 berechnete Werte verwendet. Abbildung 12.06 stellt den Bestimmungsvorgang dar.

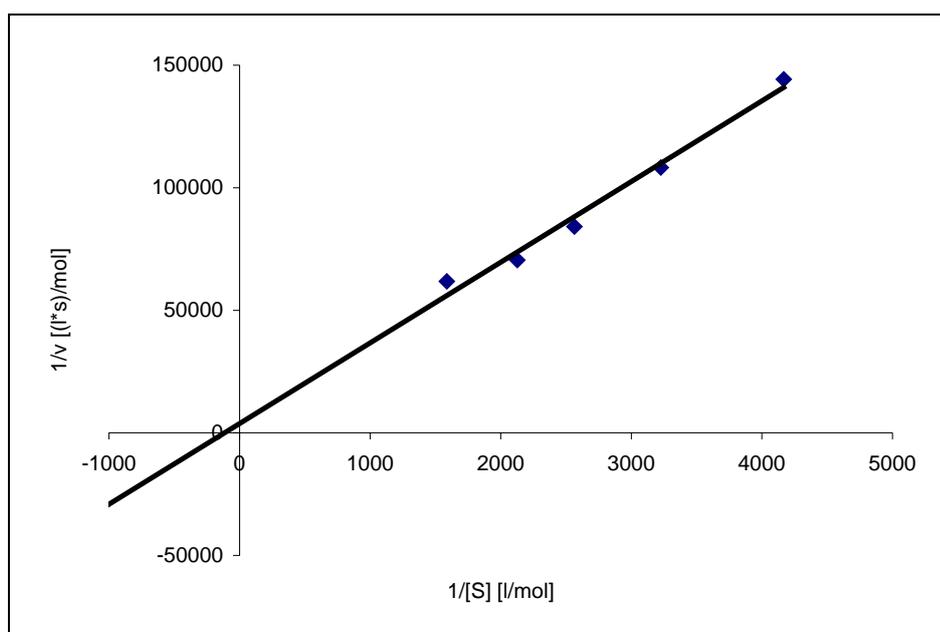


Abbildung 12.06: Lineweaver-Burk-Plot; Bestimmung von K_M und V_{max} ; [95]

Die Lineweaver-Burk-Auftragung lieferte folgende Werte:

$$1/V_{\max} = 3824,2 \text{ (l}\cdot\text{s)/mol}$$

$$-1/K_M = -116,2 \text{ l/mol}$$

Daraus wurden für den Pepsinverdau bei 37°C und pH 2 eine maximale Geschwindigkeit von $2,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/(l}\cdot\text{s)}$ und die Michaelis-Menten-Konstante von $8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ berechnet. Der K_M -Wert ist relativ niedrig. Daraus folgt, dass Pepsin, wie auch im Kapitel 12.1 festgestellt wurde, eine hohe Affinität zum Substrat (Lactoferrin) hat. Um weitere Aussagen bezüglich des ermittelten K_M -Wertes zu treffen, wurden die in der Tabelle 12.2 aufgeführten K_M -Werte für andere Pepsinsubstrate (Reaktionsbedingungen: pH 2 und $T = 37^\circ\text{C}$) herangezogen. In der Enzymdatenbank (Brenda) konnte leider kein zu Lactoferrin vergleichbares Pepsinsubstrat gefunden werden.

Tabelle 12.2: Vergleich des ermittelten K_M -Wertes für Lactoferrin mit K_M -Werten anderer Pepsinsubstrate [95; 102]

Substrat	K_M [mol/l]
Lactoferrin	0,0086
Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(p-NO ₂)-Ala-Leu	0,000098
Leu-Ser-Phe(p-NO ₂)-Nle-Ala-Leu	0,000041

Die Literaturwerte sind um zwei Zehnerpotenzen geringer als der ermittelte K_M -Wert für Lactoferrin. Diese hohe Affinität des Pepsins zu diesen beiden Substraten (Aminosäuresequenzen) ist auf die Substratgröße bzw. Substratstruktur zurückzuführen. Die zu spaltenden Bindungen der relativ kurzen Sequenzen (6 und 8 Aminosäuren) sind für das Enzym leicht zugänglich. Lactoferrin besteht aus einer 708 Aminosäuren beinhaltenden gefalteten Aminosäurekette, die zweilappig ist (s. Kapitel 4.1.1). Diese gefaltete Struktur des Lactoferrins erschwert die Annäherung des Enzyms an die zu spaltende Stelle, wodurch die Affinität des Pepsins zum Lactoferrin negativ beeinträchtigt wird.

12.2 Abtrennung des Pepsins vom Lactoferricin

Nachdem die optimalen Parameter für den Pepsinverdau festgelegt wurden und die Enzymkinetik untersucht wurde, musste ein Weg gefunden werden, um das Pepsin von dem Produkt abzutrennen, ohne dass es denaturiert. Nur so könnte später ein kontinuierlicher Betrieb gewährleistet werden. Die Reaktionslösung setzte sich aus Pepsin (ca. 36 kDa), Lactoferrin (ca. 82 kDa), Lactoferricin (ca. 3,2 kDa) und anderen Spaltprodukten der enzymatischen Hydrolyse zusammen. Aufgrund der unterschiedlichen molaren Massen der Moleküle, bot sich für die Abtrennung ein Crossflow-Filtrationsprozess an. Nach einer Reaktionszeit des Pepsinverdaus von 60 min wurde mit der Abtrennung begonnen. Die Abtrennungsversuche wurden mittels einer anschlussfertigen Filtrationseinheit für Crossflow Filtration, Sartoccon-Micro der Firma Sartorius, durchgeführt. Es wurde eine Filtrationseinheit mit MWCO von 10 kDa getestet. Um die Trennwirkung dieser Filtrationseinheit zu analysieren, wurden die erhaltenen Permeate auf ein Gel aufgetragen (s. Abbildung 12.07). Zusätzlich wurde noch Pepsin (Standard, Sigma) als Vergleichsstandard aufgetragen.

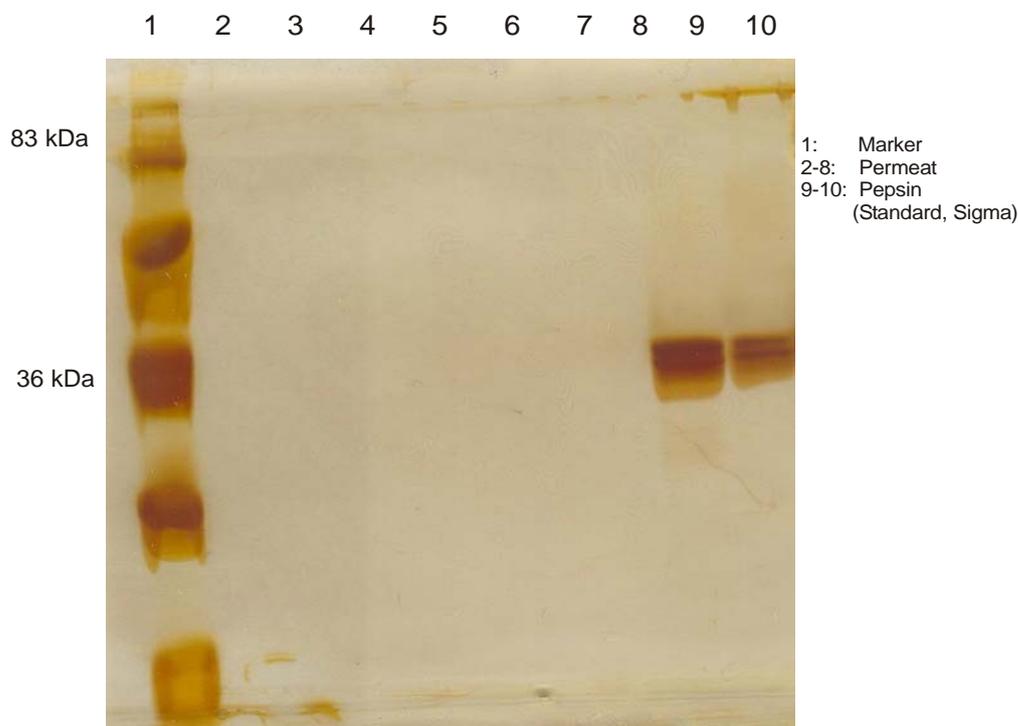


Abbildung 12.07: SDS-PAGE 12% der Permeate (Sartoccon-Micro 10 kDa); Ag-Färbung

Vergleicht man die Banden miteinander, so stellt man fest, dass die Abtrennung erfolgreich durchgeführt wurde. In den erhaltenen Permeaten konnte kein Pepsin und kein Lactoferrin nachgewiesen werden.

Um einen kontinuierlichen Prozess betreiben zu können, ist es wichtig zu wissen, wie schnell das Produkt aus dem Reaktionsmedium die Filtrationsmembran passieren kann, ohne dass sie verblockt. Es ist bekannt, dass es auch im Crossflow-Verfahren zum Membranfouling kommen kann. Um zu untersuchen, ab wann Membranfouling einsetzte, wurde während einer Filtration der Reaktionslösung alle 15 min der Permeatfluss und der Transmembrandruck (TMP) bestimmt. Die Berechnung des Transmembrandruckes erfolgte nach:

$$\text{TMP} = P_R - P_P \quad (\text{Gl. 12.4})$$

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

Die folgende Abbildung 12.08 zeigt den Einfluss des Membranfoulings auf den Permeatfluss.

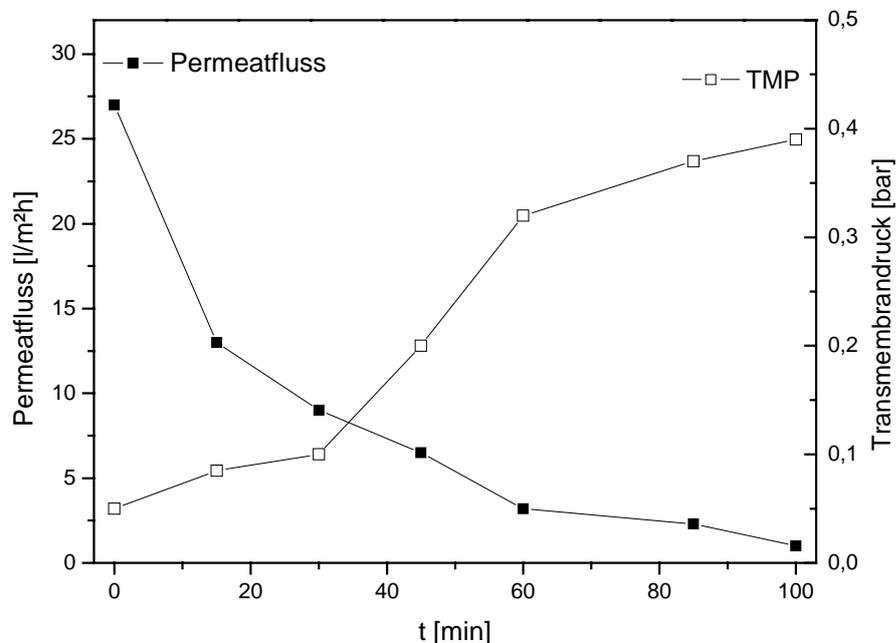


Abbildung 12.08: Abnahme des Permeatflusses durch Membranfouling (Sartocon-Micro, 10 kDa)
Membranfläche 50 cm²; Überströmung 150 ml/min; T = 37°C; pH 2

Es lässt sich erkennen, dass der Permeatfluss in den ersten Minuten der Filtration sehr schnell abnimmt und nach 20 min nur die Hälfte des Anfangswertes beträgt, bis nach 100 min nur noch ein Permeatfluss von 1,0 l/m²h vorliegt. Es zeigt sich ein annähernd kontinuierlicher Anstieg des Transmembrandruckes. Dieser Anstieg ist mit dem Aufbau einer Deckschicht verbunden. Die Filtration erfolgte bei 37°C. Es scheint, dass bei dieser Temperatur die Wechselwirkung der Peptidreste untereinander groß ist und der Aufbau der Deckschicht dadurch beschleunigt wird. Dieser negative Temperatureinfluss wurde auch bei Molkenfiltration beobachtet [88]. Desweiteren sollte die Überströmung der Membran möglichst hoch gewählt werden, um die Deckschichtbildung zu verlangsamen. Bei zu geringen Werten wird nicht das gesamte Modul zu Filtration genutzt. Der Transmembrandruck sollte während der Crossflow-Filtration möglichst niedrig (< 0,2 bar) gewählt werden. Es sollte spätestens nach einer Filtrationszeit von ca. 100 min eine Reinigung der Membran durchgeführt werden, um in weiteren Versuchen einen kontinuierlichen Gewinnungsprozess zu ermöglichen.

12.2.1 Reinigung der Sartoccon-Micro Filtrationseinheit

Zur Regenerierung der Filtrationseinheit wurden verschiedene Reinigungsmethoden getestet und miteinander verglichen. Wichtig war hier eine effiziente und kostengünstige Methode zu finden. Die Reinigungszeit muss möglichst kurz sein, weil der Vorgang in den kontinuierlichen Prozess integriert werden sollte. Vor jedem Reinigungsschritt wurde die Reaktionslösung bis zum Verblocken der Membran filtriert. Jede Reinigungsmethode wurde viermal nacheinander angewendet und nach jeder Reinigung wurde der Wasserwert der Membran bestimmt. Es wurden Reinigungschemikalien eingesetzt, die schon erfolgreich bei den Reinigungsversuchen nach der Molkenaufarbeitung verwendet wurden. In der folgenden Tabelle 12.3 sind die Reinigungsmethoden vergleichend dargestellt.

Tabelle 12.3: Vergleich der Reinigungsmethoden

Reinigungs- schritt	Reinigungsmethode			
	1	2	3	4
Spülen mit Wasser [min]	5	5	5	5
Reinigen mit 1 M NaOH (T = 40°C) [min]	40			
Reinigen mit 20 %iger Zitronensäure [min]		15		
Reinigen mit 3 %iger Ultrasil P3-53-Lösung (T = 37°C) [min]			40	
Spülen mit Wasser [min]	5	5	10	
Reinigen mit EDTA, NaOH, Na-D-gluconat und SDS [min]				30
Reinigen mit 1 M NaOH (T = 40°C) [min]		35	30	
Spülen mit Wasser [min]		5	10	5
Gesamtzeit [min]	50	65	95	40

In der Reinigungsmethode 1 wurde die Membran nur mit 1 M NaOH bei 40°C behandelt. Reinigungsmethode 2 entspricht Methode 1, mit einem zusätzlichen Schritt unter Einsatz von 20 %iger Zitronensäure, um Teile der Proteine zu denaturieren. Anschließend wurde mit 1 M NaOH behandelt, um die Proteine zu hydrolysieren und die restliche Verunreinigungen zu entfernen. Bei der Reinigungsmethode 3 wurde im ersten Schritt das Reinigungsmittel, Ultrasil P3-53, eingesetzt, um die Foulingsubstanzen auf enzymatischer Basis abzubauen. In der Reinigungsmethode 4 wurde eine Mischung (EDTA, NaOH, Na-D-gluconat und SDS) eingesetzt, die bei der Reinigung der Membran nach der Molkenfiltration gute Ergebnisse erzielte [87]. Dabei sollte das SDS die Proteine in Micellen einschließen und für eine schnelle Entfernung von der Membranoberfläche sorgen. Tabelle 12.4 zeigt die Effizienz der Reinigungsmethoden auf.

Tabelle 12.4: Vergleich der Effizienz der Reinigungsmethoden

Reinigungs- methode	Wasserwert [%]				Reinigungszeit [min/Zyklus]
	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	
1	97,7	93,3	81,1	50	50
2	99,2	98,5	98,2	95,2	65
3	98,9	90	88,9	77,8	95
4	94,1	84,7	76,5	71,8	40

Es ist zu erkennen, dass mit der Reinigungsmethode 2 die besten Ergebnisse erzielt wurden. Mit Hilfe dieser Methode konnte die Ausgangsflussrate im Mittel zu 98,5 % wiederhergestellt werden. Der Reinigungserfolg dieser Methode kann wahrscheinlich auf den Einsatz von Zitronensäure zurückgeführt werden (s. o). Die

Reinigungszeit pro Filtrationsdurchgang betrug 65 min. Die anderen Reinigungsmethoden zeigten weniger zufriedenstellende Ergebnisse. Sie waren zum Teil sehr zeitaufwendig und unwirtschaftlich. Eine unzureichende Reinigung zeigte sich bei Ultrasil P3-53 (Reinigungsmethode 3) bei Filtration im optimalen Temperaturbereich (37°C). Hier konnten die Wasserwerte im Mittel zu 89 % wiederhergestellt werden. Bei den Reinigungsmethoden 1 und 4 konnten die Flüsse im Mittel nur zu ca. 81 % regeneriert werden. Diesen Ergebnissen zu Folge wurden alle weiteren Reinigungsversuche nach der Methode 2 durchgeführt.

12.3 Isolierung von Lactoferricin aus dem Hydrolysat mittels einer Kationenaustauscher-Membran

Nachdem das Lactoferricin bestimmt war und die Abtrennung aus dem Reaktionsmedium erfolgreich durchgeführt wurde, musste ein Weg zur Isolierung von Lactoferricin aus dem Hydrolysat gefunden werden. Da Lactoferricin, wie auch das Lactoferrin, ein basisches Protein ist, wurde für die Isolierung eine stark saure Kationenaustauscher-Membran gewählt. Die Versuche wurden unter Verwendung eines S-15 Moduls der Firma Sartorius an der FPLC-Anlage durchgeführt. Der Fortgang des Versuches wurde durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit sowie UV-Adsorption (280 nm) verfolgt. Zur Isolierung von Lactoferricin wurden folgende Arbeitsschritte durchlaufen:

- Beladen (Permeat)
- Spülen (20 mM Natriumphosphat-Puffer, NaPP, (pH 7))
- Eluieren (0,4 M NaCl-Lösung)
- Eluieren (2 M NH₄Cl-Lösung)
- Spülen (20 mM Natriumphosphat-Puffer, NaPP, (pH 7))

Abbildung 12.09 zeigt den Aufreinigungsverlauf. Die Peak-Zuordnung erfolgte über MALDI-MS.

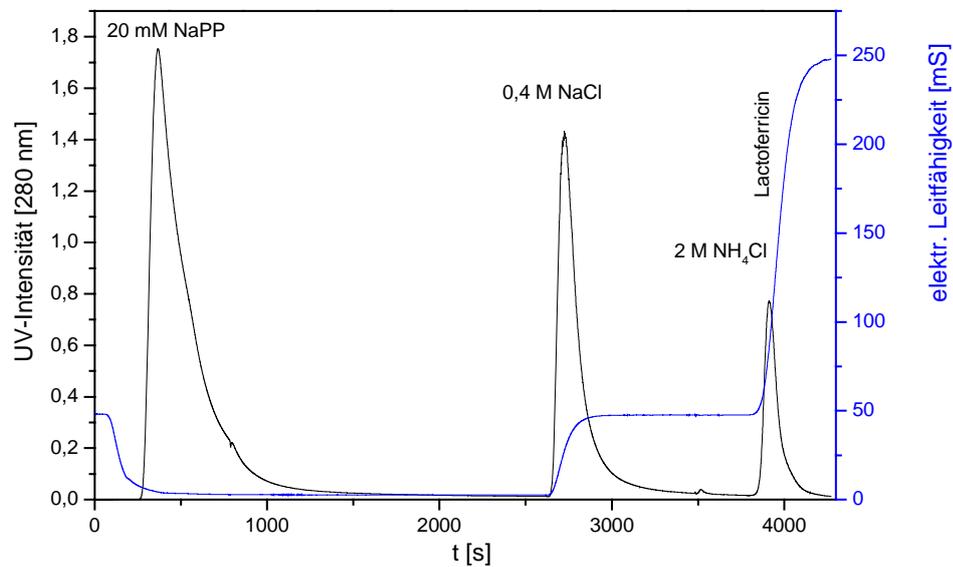


Abbildung 12.09: Auftrennung des Hydrolysates über Kationenaustauschermembran (S-15, Fa. Sartorius) mittels FPLC (s. Anhang 14.9)

Mit Hilfe der Kationenaustauschermembran konnte ein Großteil der Peptide des Hydrolysates abgetrennt werden. In der NaPP-Fraktion befanden sich Fragmente mit einer molaren Masse größer 4.000 Da, bei der 0,4 M NaCl-Fraktion handelte es sich um eine Reihe von Peptiden mit Massen von unter 3.000 Da. Das Lactoferricin konnte schließlich nur in der 2 M NH₄Cl-Fraktion nachgewiesen werden. Zum Nachweis des Peptids wurde die Fraktion zuerst getrocknet. Zur Trocknung wurde eine Liophylle verwendet. Die Lactoferricinlösungen wurden tiefgefroren und das enthaltene Wasser im Gerät unter Vakuum abgezogen. Anschließend erfolgte die Untersuchung mittels HPLC (s. Abbildung 12.10).

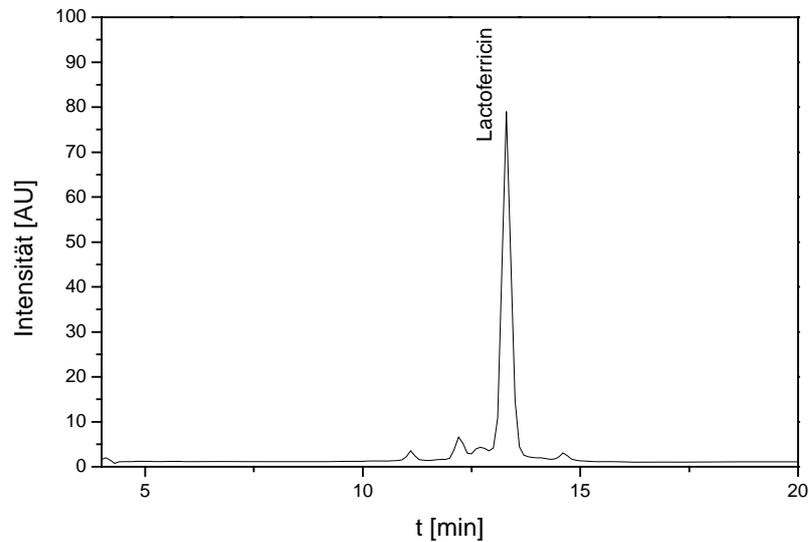


Abbildung 12.10: Bestimmung von Lactoferricin in 2 M NH_4Cl -Fraktion mittels HPLC (Nucleosil Säule C-8 5 μm , Fa. Suppelco, UV = 280 nm) (s. Anhang 14.8)

Das HPLC-Diagramm beweist noch mal, dass das Lactoferrin aus dem Hydrolysat mit Hilfe der Kationenaustauscher-Membran isoliert werden kann. Die Charakterisierung erfolgte dann mittels MALDI-MS (s. Anhang 14.11). Das erhaltene MALDI-Spektrum ist in Abbildung 12.11 dargestellt.

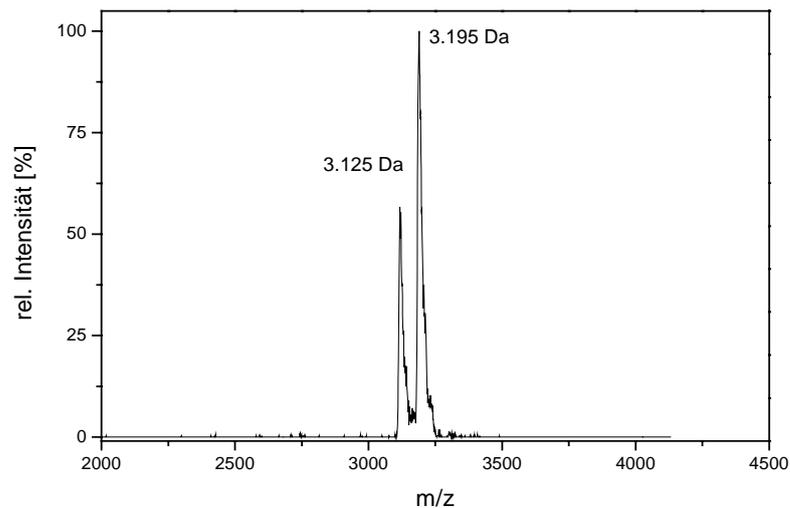


Abbildung 12.11: MALDI-MS der gefriergetrockneten 2 M NH_4Cl -Fraktion aus der Membran-Aufreinigung, Power 140; Intensität (%) 100 % = 181 mV

Das Signal zeigt deutlich eine Duplett-Struktur, deren Peaks sich bei etwa 3.125 Da und 3.195 Da befinden. Der Abstand der Peaks voneinander beträgt 70 Da. Es handelt sich hierbei um die in Kapitel 4.1.2 erwähnten zwei Varianten des Lactoferricins, die sich durch die An- bzw. Abwesenheit einer Aminosäure am Ende des Peptidstranges unterscheiden. Der Peak bei 3.125 Da ist dem Lactoferricin B₁ zuzuschreiben. Das Lactoferricin B₂ bildet den Peak bei 3.195 Da. Um später einen kontinuierlichen Prozess betreiben zu können, ist es wichtig zu wissen, wie hoch die dynamische Kapazität der verwendeten S-15 Membran ist. Im Kapitel 7.1 wurde festgestellt, dass die dynamische Kapazität des Kationenaustauschers (S-15 Modul, planare Bauform) von der Auftragungsgeschwindigkeit abhängt. Mit zunehmender Geschwindigkeit nahm die dynamische Kapazität ab. Deswegen wurde das Permeat mit einer Geschwindigkeit von 0,3 cm/min aufgetragen, um die Proteinverluste zu minimieren. Die dynamische Kapazität wurde bei einem Durchbruch von 10 % des Lactoferricins im Filtrat bestimmt. Alle entnommenen Proben wurden mittels HPLC analysiert (s. Anhang 14.8).

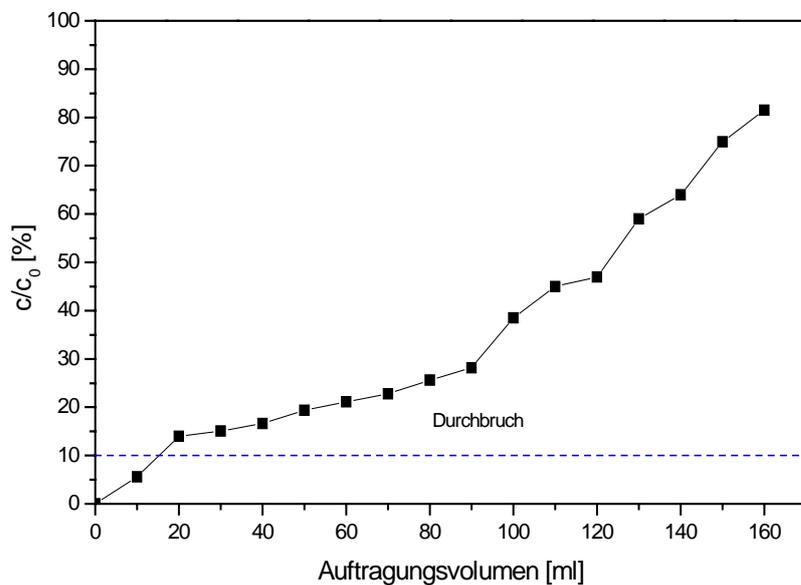


Abbildung 12.12: Ermittlung der dynamischen Kapazität mit Lactoferricin-Hydrolysat bei Sartobind® S-15 Modul; Durchbruchkurve bei 0,3 cm/min

Schon nach der Auftragung von 15 ml erfolgte der erste Durchbruch von Lactoferricin. Zur dieser Zeit waren 7 mg Lactoferricin an der Membran gebunden. Daraus resultierte eine dynamische Kapazität von 0,47 mg/cm². Hier muss aber

berücksichtigt werden, dass die Ermittlung der dynamischen Kapazität nicht mit reiner Lactoferricin-Lösung, sondern mit dem Lactoferricin-Permeat durchgeführt wurde. Das Permeat enthält außer Lactoferricin noch andere Fragmente, die auch an die Membran binden und somit die Kapazität negativ beeinflussen. Um die Protein-Verluste zu reduzieren wird vorgeschlagen für kontinuierliche Prozesse die S-Module mit größeren Membranflächen zu benutzen.

12.4 Entsalzung der Lactoferricin-Fraktion

Die nach der Aufreinigung des Permeates unter Verwendung eines S-15 Moduls der Firma Sartorius erhaltene salzhaltige Lactoferricin-Fraktion muss entsalzt werden. Zur Entsalzung wurde auf ein säulenchromatographisches Verfahren nach dem Größenausschluss-Prinzip zurückgegriffen und eine Säule (Econo-Pac P 6, Fa. Bio-Rad Laboratories, München) an der FPLC-Anlage verwendet. Die Salzionen diffundieren in die Poren des Gels in der Säule und besitzen eine größere Verweilzeit, während die großen Moleküle, ohne gebunden zu werden, durchlaufen. Für die Entsalzung wurden die jeweiligen Lactoferricin-Salz-Gemische in bidest. H₂O gelöst, auf die Säule aufgetragen und mit bidest. H₂O eluiert.

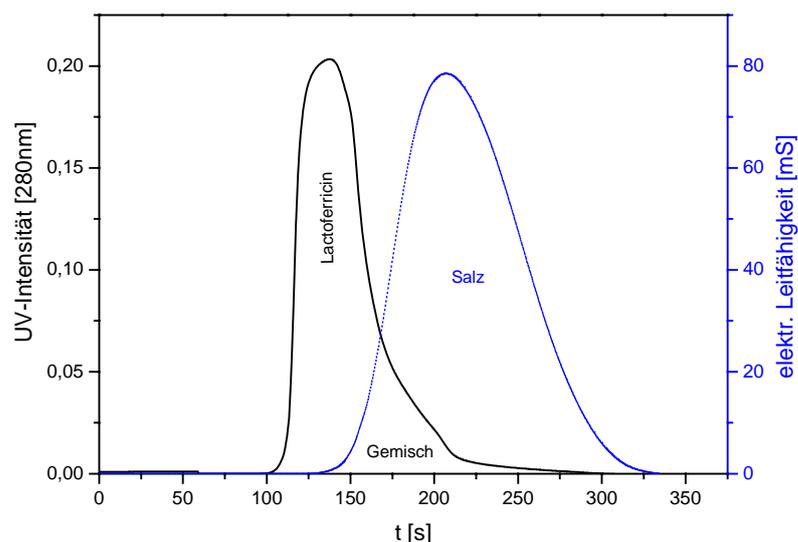


Abbildung 12.13: Typischer Entsalzungsverlauf des Lactoferricin/NH₄Cl-Gemisches (1,2 mg Gemisch/3 ml H₂O) mit Econo-Pac P 6-Säule

Es ist zu erkennen, dass eine Entsalzung nach diesem Trennprinzip möglich ist, auch wenn die Auftrennung nicht quantitativ ist. Das UV-Signal weist keine Schulter auf. Das bestätigt noch mal die Reinheit der Lactoferricin-Fraktion. Die Überlappung der Kurven zeigt, dass sich ein Teil des Proteins immer noch in der salzhaltigen Phase befindet. Um eine salzfreie Fraktion zu bekommen, müsste ein Schnittfenster zwischen 100 und 135 s gesetzt werden. Diese Optimierung des Arbeitsganges würde wiederum zum Proteinverlust führen. Aus diesem Grund wurde ein anderes Verfahren getestet. Dabei wurde keine andere Säule getestet, sondern Veränderungen im Isolierungsschritt durchgeführt. Aus einer Patentschrift [96] wurde die Idee entnommen, das Lactoferricin mit Ammoniumcarbonat-Puffer von der Kationenaustauschermembran zu eluieren. Der Vorteil dieses Puffers gegenüber dem Ammoniumchlorid besteht darin, dass er sich während der Gefriertrocknung im Vakuum in NH_3 , CO_2 und H_2O zersetzt und verflüchtigt. Dadurch kann der Entsalzungsschritt entfallen. Für die Isolierung des Lactoferricins wurden drei verschiedene Elutionslösungen angesetzt.

- 1 M Ammoniumcarbonat-Lösung
- 1 M Ammoniumcarbonat-Puffer
- 2 M Ammoniumcarbonat-Puffer

Die Isolierung erfolgte wieder unter Verwendung eines S-15 Moduls (Sartorius AG, Göttingen) an der FPLC-Anlage. Wie schon bei dem Entsalzungsversuch (s. Abbildung 12.13) wurde der Versuchsverlauf über Messungen der elektrischen Leitfähigkeit und UV-Absorption verfolgt. Die aufgefangene Lactoferricin-Eluate wurden mittels HPLC untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der folgenden Abbildung 12.14 dargestellt.

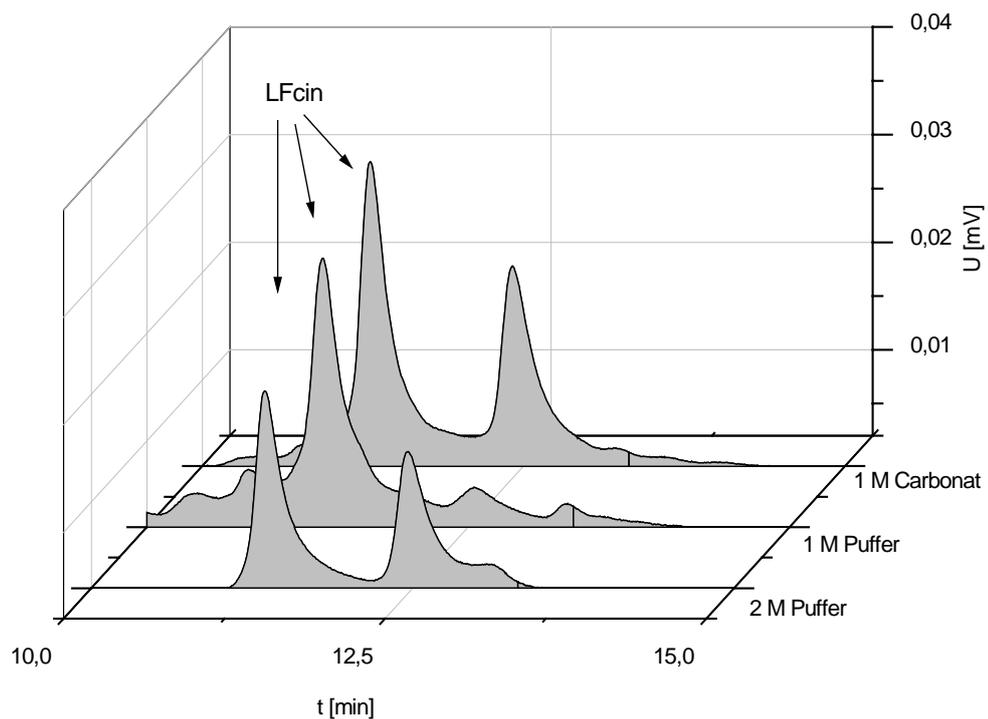


Abbildung 12.14: Ergebnisse der HPLC-Analytik, LFcinB: Lactoferricin; [95]

Die erhaltene Ammoniumcarbonat-Fractionen wurden gefriergetrocknet und mittels Reflektquant-Schnelltests (Merck KGaA, Darmstadt) auf NH_4^+ -Ionen untersucht. Der Messbereich des verwendeten Tests liegt zwischen 5 und 20 mg/l (s. Anhang 14.12).

Tabelle 12.5: Ammoniumtest der gefriergetrockneten Fractionen; Elutionslösungen: pH 7,8

Elutionslösung	NH_4 -Ionen [mg/l]
1 M Ammoniumcarbonatpuffer	low
2 M Ammoniumcarbonatpuffer	8,8
1 M Ammoniumcarbonatlösung	low

Bei dem 2 M Ammoniumcarbonatpuffer wurde die Anwesenheit von NH_4^+ -Ionen nachgewiesen. Es scheint, dass 2 M Puffer während der Gefrierdrying im Vakuum nicht vollständig zersetzt und verflüchtigt wird. Bei den beiden 1 M Ammoniumcarbonatlösungen lag der Wert der NH_4^+ -Konzentration unter 5 mg/l. Die Elution mit 1 M Ammoniumcarbonat-Puffer hat auch den reinsten Lactoferricin-Peak ergeben (s. Abbildung 12.14). Deshalb wurde das Ammoniumchlorid aus

dem herkömmlichen Verfahren gegen den 1 M Ammoniumcarbonatpuffer (pH 7,8) ausgetauscht. Dadurch war es möglich im Isolierungsprozess die Entsalzungsstufe einzusparen.

12.5 Kontinuierliche Gewinnung von Lactoferricin

Alle bisherigen Untersuchungen zur Gewinnung von Lactoferricin durch Pepsinverdau von Lactoferrin wurden diskontinuierlich durchgeführt. Zur Bildung von Lactoferricin während des Pepsinsverdaus (pH 2, 37°C) waren mindestens 30 min erforderlich. Die Abtrennung des Pepsins vom Lactoferricin mittels Crossflow-Filtration (Sartocon-Micro 10 kDa), wurde erfolgreich durchgeführt. Für die Reinigung der Filtrationseinheit waren 65 min notwendig. Die Isolierung von Lactoferricin aus dem Permeat erfolgte mittels Kationenaustauscher-Membran. Die erhaltenen Lactoferricin-Fractionen wurden gefriergetrocknet. Durch die Verwendung von 1 M Ammoniumcarbonatpuffer als Elutionsmittel konnte der Entsalzungsschritt eingespart werden. Auf Grund dieser Erkenntnisse konnte mit dem Versuchsaufbau für die kontinuierliche Lactoferricin-Gewinnung begonnen werden. Um zu untersuchen, ob die kontinuierliche Gewinnung von Lactoferricin durch Pepsin über einen längeren Zeitraum möglich ist, wurden mehrere Versuche in einer dafür konstruierten Anlage durchgeführt. In Abbildung 12.15 ist der Aufbau dieser Anlage schematisch dargestellt.

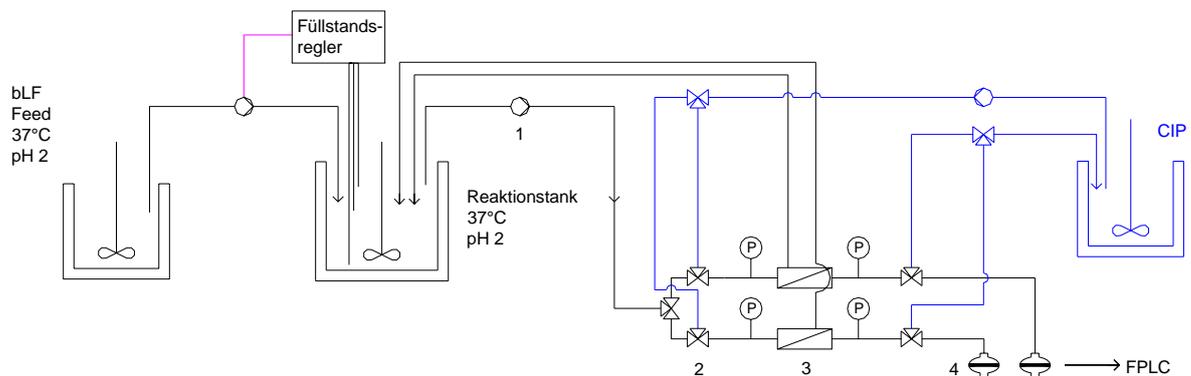


Abbildung 12.15: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (CIP: Cleaning In Place)

1 = Pumpe; 2 = Drei-Wege-Ventil; 3 = Filtrationseinheit; 4 = S-15 Modul; [95]

Zuerst musste untersucht werden, nach welcher Zeit das Gesamtvolumen an Lactoferrinlösung ausgetauscht wird. Dazu wurden technische Parameter der Anlage wie Verweilzeitverhalten und Umsatz bestimmt. Außerdem musste untersucht werden, wie lange das Pepsin in der Reaktionslösung aktiv bleibt. Die Bestimmung der Parameter wurde zuerst mit Wasser und anschließend zur Simulation der realen Bedingungen mit Lactoferrinlösung durchgeführt (s. Anhang 14.13). Als Tracer wurde NaCl-Lösung verwendet. In der folgenden Tabelle 12.6 sind die ermittelte Parameter gegenübergestellt.

Tabelle 12.6: Ermittelte Parameter; [95]

Parameter	Wasser	Lactoferrinlösung
Permeatfluss [ml/min]	9,5	1
Reaktorvolumen [ml]	250	250
Mittlere hydrodynamische Verweilzeit t [min]	26,3	250
Mittlere Verweilzeit \bar{t} [min]	20	36,6
Mittlere reduzierte Verweilzeit $\bar{\theta}$	0,76	0,15
Bodensteinzahl	5,9	183,8
N (Anzahl Zellen idealer CSTR)	2,9	91,9
Idealer Umsatz [%]	95	99,4
Realer Umsatz [%]	93,5	96,3
Mittlerer Umsatz [%]	97,8	97,9

Es wurde festgestellt, dass das Gesamtvolumen an Lactoferrinlösung nach ca. 3 h einmal ausgetauscht wird. Der mittlere Umsatz lag bei 98 %. Der Vergleich des realen mit dem idealen Umsatz zeigt beim Versuch mit der Lactoferrinlösung eine Abweichung von ca. 3%. Für einen kontinuierlichen Prozess spielt diese Abweichung keine große Rolle, da eventuell zu Fröh aus dem Reaktor ausgetretene Lactoferrin über die Retentatseite zurück in den Reaktor geleitet wird. Um über die Stabilität des verwendeten Enzyms beurteilen zu können, wurde während des kontinuierlichen Versuches der HCl-Verbrauch gemessen. Es wurde angenommen, dass die Bildung des Produktes mit der Enzymaktivität und dem HCl-Verbrauch zusammenhängt. In der folgenden Abbildung 12.16 ist der HCl-Verbrauch dargestellt.

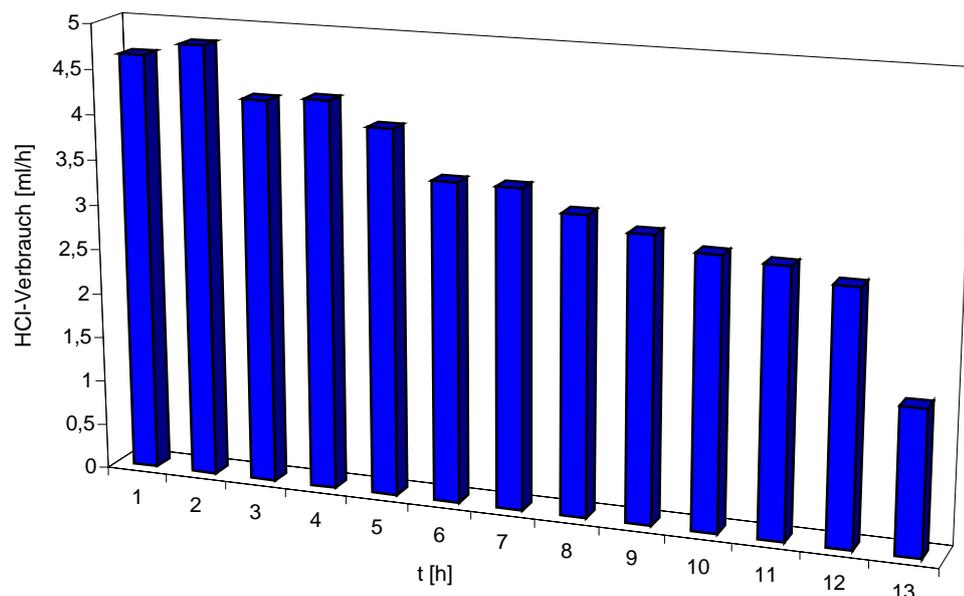


Abbildung 12.16: HCl-Verbrauch; pH 2,0; T = 37°C; t = 13 h; [95]

Die Stabilität des Enzyms wurde durch das Rühren im Reaktor und die auftretenden Scherkräfte bei der Crossflow-Filtration negativ beeinflusst. Der Verbrauch an HCl nahm im betrachteten Zeitraum kontinuierlich ab. Einerseits wurden kontinuierlich immer nur geringe Mengen an frischer Lactoferrinlösung zugegeben, so dass dem Pepsin mit der Zeit weniger Substrat zur Verfügung stand als zu Beginn der Reaktion. Andererseits könnten bei der Deckschichtbildung auf der Filtrationsmembran Pepsinmoleküle beteiligt gewesen sein, die deshalb nicht in den Reaktor zurückgeführt wurden und bei der Reinigung verloren gingen. Nach einer Betriebszeit von 12 h war der steilste Abfall des HCl-Verbrauches zu beobachten. Spätestens nach dieser Zeit ist es notwendig weitere Enzyme zugeben, um die Effizienz des kontinuierlichen Verfahrens aufrecht zu erhalten. Nach dem die technischen Parameter der Anlage bestimmt waren und die Stabilität des Pepsins untersucht wurde, wurden mehrere Versuche zur kontinuierlichen Gewinnung von Lactoferricin durchgeführt. Es wurden jeweils 350 ml einer 2,5 %igen Lactoferrinlösung mit einem pH-Wert von 2,0 verwendet. Davon wurden 250 ml in den Reaktor und 100 ml in den Vorlagebehälter gegeben. Beide Behälter wurden auf 37°C temperiert (s. Abbildung 12.15). Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 3 % (w/w) Pepsin gestartet. Alle 5 min wurde eine Probe entnommen, um die Anwesenheit von Lactoferricin zu bestimmen. Nach einer

Reaktionszeit von 30 min wurde mit dem kontinuierlichen Betrieb begonnen. Nach ca. 100 min erfolgte die CIP-Reinigung (Cleaning In Place) des Crossflow-Filtrationsmoduls, während parallel dazu ein zweites Crossflow-Modul zur Filtration der Reaktionslösung eingesetzt wurde (s. Abbildung 12.15). Dadurch wurde der kontinuierliche Betrieb aufrechterhalten. Um eine reibungslose kontinuierliche Arbeitsweise der Anlage sicherzustellen, wurden Versuche mit Betriebsdauern von 13 h durchgeführt. Alle Untersuchungen lieferten gleiche Ergebnisse. Die voll beladenen Membranadsorber wurden an der FPLC eluiert. Als Elutionslösung wurde 1 M Ammoniumcarbonat-Puffer (pH 7,8) verwendet. Die erhaltenen Fraktionen wurden gefriergetrocknet, ausgewogen und anschließend mittels HPLC und MALDI-MS untersucht. Die folgende Abbildung 12.17 stellt den Auftrennungs- und Charakterisierungsverlauf von Lactoferricin dar.

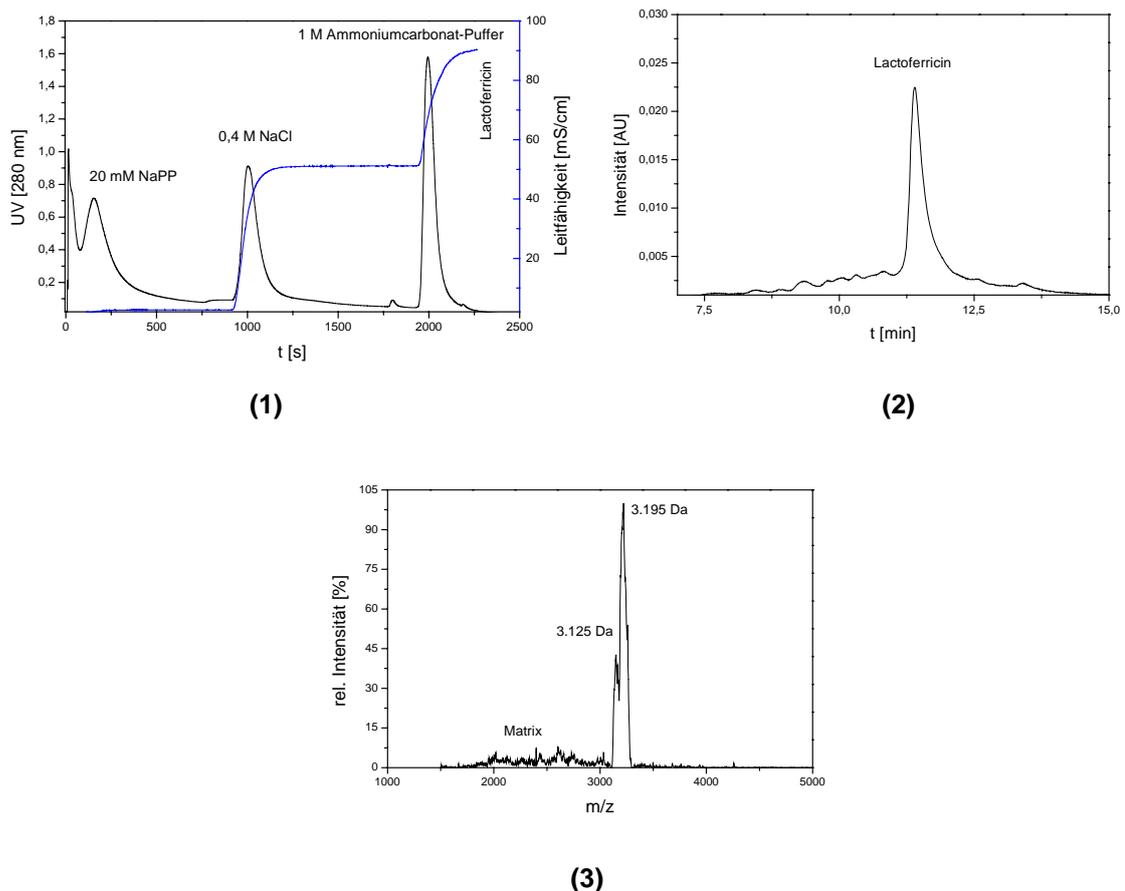


Abbildung 12.17: (1): Auftrennung des Permeats über Kationenaustauschermembran mittels FPLC; (2): HPLC-Analytik der gefriergetrockneten Lactoferricin-Fraktion; (3): MALDI-Spektrum des isolierten Lactoferricins; Power 140; Intensität 193 mV = 100 %; [95]

Es ist zu erkennen, dass die Aufreinigung des Lactoferricin-Permeats erfolgreich durchgeführt wurde. Das Lactoferricin konnte in der 1 M Ammoniumcarbonat-Fraktion mittels HPLC nachgewiesen werden. Es sind leichte Schultern zu beiden Seiten des Signals zu erkennen. Leider ist diese Verunreinigung des Produktes nicht im FPLC-Spektrum und nicht im MALDI-Spektrum eindeutig zu identifizieren. Das MALDI-Spektrum zeigt eine für das Lactoferricin typische Duplett-Struktur. Die sichtbaren Peaks im Bereich von 2.000 bis 3.000 Da sind der Matrixkomponente zuzuschreiben. Nachdem nun das Produkt isoliert wurde, war auch eine Bilanzierung der Ausbeute möglich. Eine Übersicht gibt die folgende Tabelle 12.7:

Tabelle 12.7: Ausbeute an Lactoferricin; [95]

Menge eingesetztes Lactoferrin	Theoretische Ausbeute an Lactoferricin	Tatsächliche Ausbeute an Lactoferricin	Tatsächliche Ausbeute an Lactoferricin	Maximal mögliche Ausbeute an Lactoferricin
[mg]	[mg]	[mg]	[%]	[%]
8.750	209	87,2	41,7	98

Bei der Bestimmung der Ausbeute von Lactoferricin musste berücksichtigt werden, dass die Reinheit des eingesetzten Lactoferrins ca. 60 % betrug. Hinzu kommen die Verluste, die bei der Beladung des Kationenaustauscher-Moduls entstanden. Demnach wurde aus 8,75 g Lactoferrin 87,2 mg Lactoferricin erhalten. Bei der Berechnung der maximal möglichen Ausbeute an Lactoferricin wurden die Verluste, die nach dem 10 %igen Durchbruch des Membranadsorbers pro Beladung entstehen, berücksichtigt. So wurde eine maximal mögliche Ausbeute an Lactoferricin (Reinheit: 95 %) von 98 % (205,5 mg) ermittelt. Dieser Wert könnte bei optimalen Versuchsbedingungen sowie durch eine Optimierung der Anlageparameter (z.B. Vergrößerung der Adsorberfläche, s. Kapitel 12.3) mit diesem Herstellungsverfahren erreicht werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die kontinuierliche Gewinnung von Lactoferricin mit Hilfe der konstruierten Anlage möglich ist. Die oben genannten Verbesserungen des Verfahrens wären in weiterführenden Arbeiten durchzuführen.

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 12.1 – 12.5 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Es wurde gezeigt, dass das Wirkungsoptimum des Pepsins im sauren Bereich bei pH 2,0 liegt. Es konnte in guter Nährung von einer Reaktion 1. Ordnung ausgegangen werden. Die Trennung des Pepsins von der Reaktionslösung wurde erfolgreich mittels Sartoccon-Micro (MWCO: 10 kDa) durchgeführt. Es wurde eine Reinigungsmethode entwickelt, die den Wasserwert innerhalb von nur 65 min zu ca. 100 % wieder herstellt.

Die Isolierungsversuche von Lactoferricin aus Permeat wurden mittels S-15 Moduls durchgeführt. Die besten Resultate wurden mit 1 M Ammoniumcarbonatpuffer als Elutionsmittel erzielt, da dadurch auch der Entsalzungsschritt entfiel.

Es wurde gezeigt, dass die Durchführung des Pepsinverdaus mittels der konstruierten Anlage kontinuierlich über einen längeren Zeitraum möglich ist. Nach einer Reaktionszeit von ca. 12 h müssen dem Prozess weitere Enzyme zugefügt werden, um das Verhältnis zwischen Enzym und Substrat konstant zu halten.

12.6 Gesamtprozess: Von Molke zu Lactoferricin

Molke stellt ein komplexes Medium dar. Sie enthält außer flüssigen Rückständen aus der Casein- und Käseherstellung wertvolle Proteine. Eines der ernährungsphysiologisch bedeutsamsten Proteine darin ist das Lactoferrin (s. Kapitel 4). Für die Lactoferrin-Gewinnung stehen zwei Methoden zur Verfügung:

- Die Gewinnung von Lactoferrin aus Molke in drei Prozessschritten: Mikrofiltration, Isolierung und Entsalzung. Dieser Prozess ist etabliert und kann in technischen Maßstäben gefahren werden (s. Kapitel 6 – 8).
- Bei der zweiten Methode wird ein neuentwickelter Recuperator eingesetzt. Die besondere Konstruktion des Recuperator erlaubt die unfiltrierte Molke direkt zur Isolierung des Lactoferrins einzusetzen (s. Kapitel 9). Dadurch entfällt der Mikrofiltrationsschritt. Diese Methode befindet sich noch in der Testphase, kann aber trotzdem zum Vergleich miteinbezogen werden.

Eine weitere Wertschöpfung lässt sich durch die Biotransformation des Lactoferrins zu Lactoferricin erzielen (s. Kapitel 12). Die Aufarbeitung der Lactoferricin-Hydrolysate basiert auch auf der beschriebenen Membrantechnik.

Die Mikrofiltration von Molke erfolgt mittels einer Technikumsanlage (Adsorberfläche 4 m²) in einem Crossflow-Verfahren. Durch den Einsatz von zwei Wärmetauscher wird die optimale Filtrationstemperatur von 50°C innerhalb von 20 min erreicht und über die gesamte Filtrationszeit konstant gehalten. Die Filtration mit 0,2 µm Porengröße hält die groben Verunreinigungen zurück und liefert ein konstantes Permeat mit Transmissionswerten von ca. 80 %. Der Permeatfluss liegt bei 220 l/(m²h). So werden 1.000 l Molke innerhalb von 70 min um den Faktor 5 aufkonzentriert. Die Permeation von Lactoferrin liegt bei insgesamt 70 – 80 %. Weitere Scale-Ups der Mikrofiltrationsanlage sind am Institut für Technische Chemie nicht möglich, weil die erforderlichen Molkenmengen nicht mehr zu handhaben sind. Nach der Mikrofiltration von 1.000 l Molke stehen durchschnittlich 700 – 800 l Permeat mit der Lactoferrinkonzentration von ca. 75 mg/l für die Weiteraufarbeitung zur Verfügung. Die Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat erfolgt mit Hilfe einer 4 m² - Technikumsanlage. Die Anlage ist mit Membranadsorbermodulen (Sartobind Factor two Family, Sartorius) ausgestattet. Die Charakterisierung der Membranadsorber ist abgeschlossen. Die dynamische Kapazität der Membranadsorber (Wickelmodul) beträgt 0,2 mg (bLF)/cm². Sie ist unabhängig von der Auftragungsgeschwindigkeit und der Temperatur des Molkenpermeats (s. Kapitel 7). Der Recuperator ist genauso wie die Wickelmodule mit einer Sartobind-Kationenaustauschermembran ausgestattet. Die statische Kapazität der Sartobind-Membran beträgt 0,7 mg (bLF)/cm². Der Unterschied besteht in der Prozessführung. Bei einem Beladungsprozess unter Verwendung eines Wickelmoduls wird das Molkenpermeat am Ende des Moduls nach außen geführt, also verworfen. Die Beladung mittels eines Recuperators erfolgt im Rezirkulationsverfahren, wobei die aufgetragene Molke in den Ausgangsbehälter zurückgeleitet, also im Kreis gepumpt, und nicht sofort verworfen wird. Es wird so lange im Kreis gepumpt, bis die Membran kein Lactoferrin mehr adsorbiert. Auf diese Weise kann pro Beladungsschritt die maximal mögliche Kapazität (statische) ausgenutzt werden.

Bei diesem Verfahren wird auch unfiltrierte Molke eingesetzt. Dadurch entstehen keine Lactoferrin-Verluste im Edukt, die sonst bei der Mikrofiltration im Bereich von 20 – 30 % liegen. Die ersten Versuchsreihen mit dem Recuperator sind mit den geringen Molkenmengen durchgeführt worden. Um einen Vergleich mit den Ergebnissen aus den Membranadsorberversuchen durchführen zu können, werden die erzielten Ergebnisse aus dem Recuperator-Versuch auf 700 l (Beladungsvolumen) berechnet. In der Tabelle 13.1 wird der etablierte Isolierungsprozess (Membranadsorber) mit der Rezirkulationsmethode am Beispiel der Ergebnisse des Versuches mit dem Recuperator 72 verglichen.

Tabelle 13.1: Vergleich der Ausbeuten an Lactoferrin bei Einsatz von Membranadsorber und Recuperator 72*; * = berechnet auf 700 l Molke; ** = Ausbeute bezogen auf 700 l Ausgangsvolumen;

Parameter	Membranadsorber	Recuperator 72*
	Wickelmodul	
Membranfläche [cm ²]	40.000	14.105
Statische Kapazität [mg/cm ²]	0,7	0,7
Dynamische Kapazität [mg/cm ²]	0,2	-
V (Molke) [l]	1.000	700
V (Molkenpermeat) [l]	700	-
c (bLF) [mg/l]	75	100
m (bLF) [g]	52,5	70
Reinigungsdauer [min]	94	360
Beladungsdauer [min]	136	770
Mikrofiltrationsdauer [min]	70	-
Gesamtzyklusdauer [min]	300	1.130
Ausbeute _{bLF} [%] **	80	63
Ausbeute _{bLF} [g] **	42	44

Die wichtigsten Parameter sind die erzielten Ausbeuten und die Gesamtzyklusdauer. Für den Membranadsorber liegt die Gesamtzyklusdauer bei 300 min bei einer Gesamtausbeute an Lactoferrin von 80 %. Beim Recuperator-Versuch ergibt sich eine Ausbeute von 63 % bei einer Gesamtzyklusdauer von ca. 1.130 min. Dies erscheint zunächst sehr nachteilig für den Recuperator. Es wird aber mit beiden Methoden etwa die gleiche Lactoferrin-Menge gewonnen. Hier muss berücksichtigt werden, dass die Startkonzentrationen von Lactoferrin verschieden sind. Die Lactoferrinkonzentration von Molkenpermeat ist mit 75 mg/l um 25 %

geringer als bei der Molke (100 mg/l). Die Membranfläche des verwendeten Membranadsorbers (40.000 cm²) ist um Faktor 2,84 größer, als die von eingesetzten Recuperator (14.105 cm²). Es sind also etwa 39 Zyklen (1130 min; 18 l/Zyklus) notwendig, um die gleiche Lactoferrinmenge aufzutragen. Bei einer Vergrößerung der Adsorberfläche des Recuperators auf 40.000 cm², würde sich die Gesamtzyklusdauer auf 380 min (13 Zyklen; 54 l/Zyklus) reduzieren. In zusätzlichen Versuchsreihen sollten weitere Scale Ups näher untersucht werden. Der Vorteil des Recuperators gegenüber dem Membranadsorber zeichnet sich durch die Einsparung des Mikrofiltrationsschrittes aus. Dadurch können Anlagen-, Chemikalien- und Energiekosten eingespart werden, was auch einen ökologischen Vorteil mit sich bringt.

Die Veredelung von Lactoferrin zu Lactoferricin wird mittels Pepsinverdau durchgeführt. Dazu wird eine Lactoferrinlösung mit bedest. H₂O angesetzt und mit 0,1 M HCl auf pH 2,5 eingestellt. Die Biotransformation bei 37°C wird durch Zugabe von 3 % Pepsin (w/w) gestartet. Die Produktbildungsdauer beträgt bei diesen Reaktionsbedingungen 5 – 6 h. Der pH-Wert der Reaktionslösung steigt während der Biotransformation auf 4,6. Um die Reaktion zu stoppen, wird die Reaktionslösung für 15 min auf 80°C erhitzt und mit 0,1 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Nachteile dieser Methode sind die lange Produktbildungszeiten und die Denaturierung des Pepsins nach dem Reaktionsabbruch. Nach diversen Untersuchungen zur Optimierung des Pepsinverdaus im Bezug auf die Minimierung der Produktbildungszeiten wird die Reaktion bei pH-Wert von 2,0 bevorzugt. Mit Hilfe der pH-Stat-Anlage werden der pH-Wert und die Reaktionstemperatur während des Herstellungsprozesses konstant gehalten (s. Kapitel 12). Bei konstant gehaltenem pH-Wert (pH 2) lässt sich somit die Produktbildungszeit von 6 h auf 30 – 60 min reduzieren. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wird ca. 85 % und nach 60 min sogar der maximale Lactoferricingehalt erreicht. Das Pepsin muss von dem Reaktionsmedium bzw. Lactoferricin (3,2 kDa) getrennt werden, ohne das es denaturiert. Dafür wird eine anschlussfertige Filtrationseinheit (MWCO: 10 kDa) für Crossflow Filtration, Sartocoon-Micro der Firma Sartorius, eingesetzt. Die Filtration mit MWCO von 10 kDa hält das Pepsin (36 kDa) und das nicht umgesetzte Lactoferrin (82 kDa) zurück und liefert das

Lactoferricin-haltige Permeat. Die Retention von Pepsin und Lactoferrin liegt bei 100 % (s. Kapitel 12.2). Der Permeatfluss sinkt über die Filtrationszeit hinweg von 28 l/(m²h) auf 1,0 l/(m²h). Der Transmembrandruck sollte während der Filtration möglichst niedrig (< 0,2 bar) gewählt werden, um einen hohen Permeatfluss zu ermöglichen. Die Membran wird nach einer Filtrationszeit von ca. 100 min gereinigt (Natronlauge, Zitronensäure). Nach einer Reinigungszeit von 65 min ist die Membran wieder einsatzbereit. Die Isolierung von Lactoferricin aus dem Permeat erfolgt mittels eines S-15 Moduls (Sartorius AG, Göttingen). Die dynamische Kapazität des Moduls wird bei einer Auftragungsgeschwindigkeit von 0,3 cm/min zu 0,47 mg LFCinB/cm² bestimmt. Zur Isolierung von Lactoferricin stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

1. Die Isolierung von Lactoferricin erfolgt mit drei Elutionslösungen:
 - 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7)
 - 0,4 M NaCl-Lösung
 - 2 M NH₄Cl-Lösung

Das Lactoferricin wird in der 2 M NH₄Cl-Fraktion nachgewiesen. Die Entsalzung der Protein-Fraktion erfolgt mittels Ionenausschluß-Chromatographie. Nachteilig an dieser Methode ist, dass sie zum Proteinverlust führt, da sich das Protein-Salzgemisch nicht 100 %ig trennen lässt. Hier ist eine mehrfache Entsalzung notwendig, um hohe Ausbeuten zu erzielen. Ein Nachteil der mehrfachen Entsalzung sind die entstehenden Kosten (Energie-, Chemikalien-, Gerätekosten).

2. Bei der zweiten Möglichkeit handelt es sich um den Ersatz der 2 M NH₄Cl-Lösung durch 1 M Ammoniumcarbonatpuffer (pH 7,8) (s. Kapitel 12.4). Der Vorteil dieses Puffers gegenüber dem Ammoniumchlorid besteht darin, dass er sich während der Gefriertrocknung im Vakuum in NH₃, CO₂ und H₂O zersetzt und verflüchtigt. Dadurch werden im Isolierungsschritt zusätzliche Kosten eingespart.

Die Untersuchungen zur kontinuierlichen Herstellung von Lactoferricin werden mit dem in Abbildung 12.16 (Kapitel 12.5) skizzierten Aufbau durchgeführt. Es werden

Untersuchungen mit Betriebsdauern von bis zu 13 h durchgeführt. Die Effizienz des Pepsinverdaus nimmt nach einer Versuchszeit von 12 h von 100 % auf 70 % ab. Spätestens nach dieser Zeit sollten neue Enzyme zugeführt werden, um die Effizienz des Prozesses aufrecht zu erhalten. Auf diese Weise werden aus 8,75 g Lactoferrin (Reinheit: 60 %) 87,2 mg Lactoferricin erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von ca. 42 %. Bei der Verwendung des zu 95 % reinen Lactoferrins, würde sich die Gesamtausbeute an Lactoferricin auf 67 % (140 mg) erhöhen. Unter Berücksichtigung der Lactoferricin-Verluste, die nach dem 10 %igen Durchbruch des Membranadsorbers pro Beladung entstehen, wird eine maximal mögliche Ausbeute von 98 % (205,5 mg) berechnet.

Mit Hilfe der 4 m²-Technikumsanlage können innerhalb von ca. 300 min 700 l Molkenpermeat mit einer Lactoferrinkonzentration von 75 mg/l verarbeitet werden. Die Gesamtausbeute an Lactoferrin beträgt 80 % (42 g; Reinheit: 95 %) (s. o.). Diese Menge an Lactoferrin kann mittels eines Pepsinverdaus (kontinuierlicher Prozess; Abbildung 12.15) innerhalb von 56 h zu Lactoferricin umgesetzt und isoliert werden. Für den Gesamtprozess (Molkenpermeat – Isolierung – Lactoferrin – Pepsinverdau – Lactoferricin) ergibt sich eine Lactoferricin-Ausbeute von 67 % (s. Abbildung 12.18). Um die anfallende Menge an Lactoferrin innerhalb kürzester Zeit zu Lactoferricin umsetzen zu können, müssen Scale Ups des kontinuierlichen Prozesses zur Herstellung von Lactoferricin durchgeführt werden. Dazu gehört der Einsatz von größeren Crossflow-Filtrationsmodulen (z.B. Vivaflow 200; Membranfläche 200 cm²; MWCO 10 kDa; Sartorius AG, Göttingen) und Membranadsorber-Modulen (z.B. S-100 Modul; Membranfläche 100 cm²; Sartorius AG, Göttingen). Für die Isolierung von Lactoferricin im technischen Maßstab müssen Wickelmodule (S-Membran) eingesetzt werden, da das S-100 Modul der größte Membranadsorber in der planaren Bauform ist. Die Verluste an Zielprotein sind auch in weiteren Scale Ups zu erwarten, da eine ausreichende Trennung von Lactoferrin bzw. Lactoferricin und Rest-Komponenten bei der Elution gewährleistet sein muss.

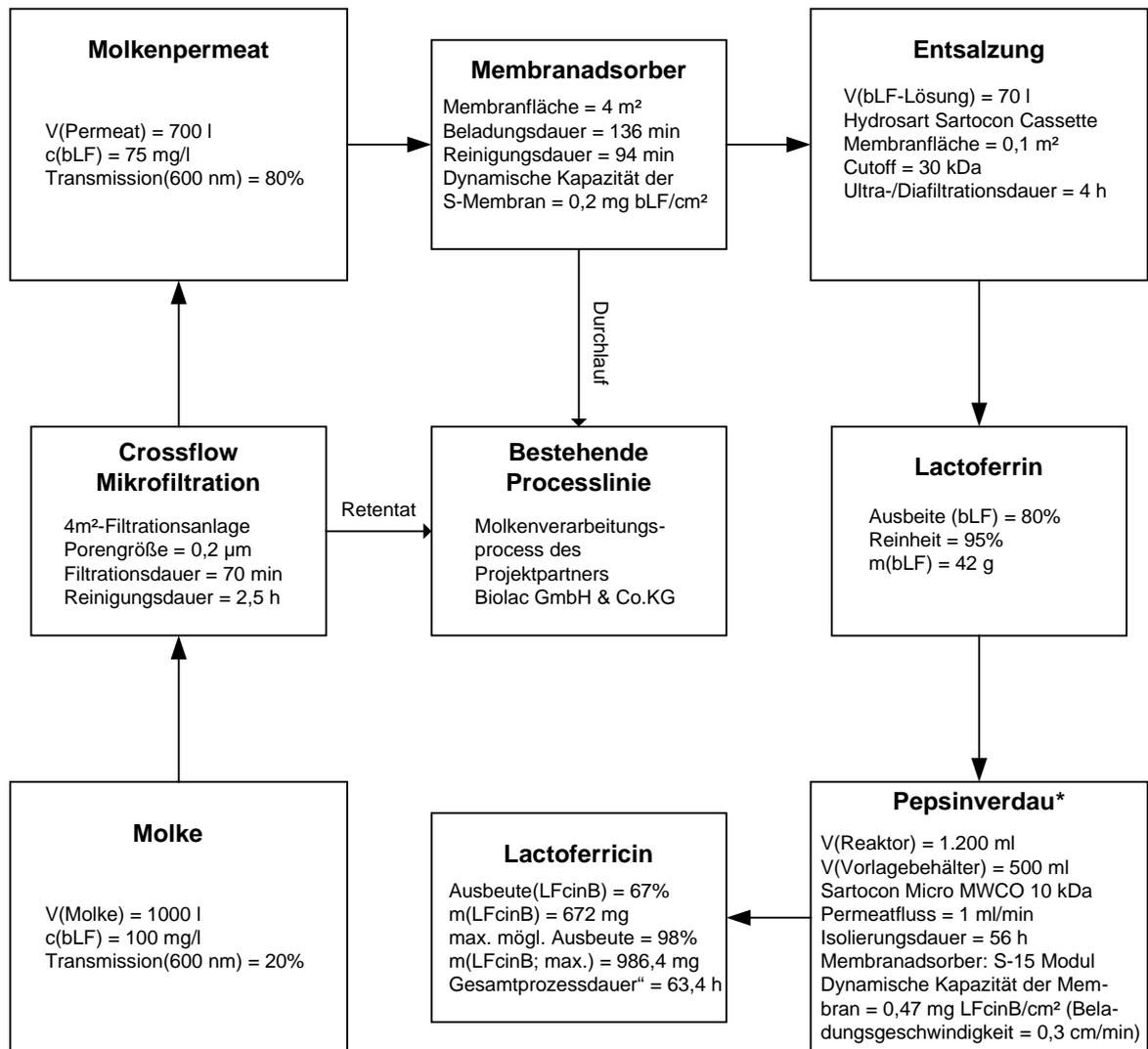


Abbildung 12.18: Schematische Darstellung des Gesamtprozesses zur Herstellung von Lactoferricin (inkl. Prozessparameter); * Berechnet für die Umsetzung von 42 g (bLF); † ohne Berücksichtigung der Reinigungszeiten

13 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte verdeutlicht werden, dass sich aus nachwachsenden Rohstoffen bzw. landwirtschaftlichen Reststoffen wichtige Bestandteile isolieren lassen, die mit einer hohen Wertschöpfung im Bereich des Functional Foods oder der pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden können. Die Isolierung und Biotransformation von Bestandteilen erfolgte durch den Einsatz innovativer Downstream-Techniken und Enzymen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die gezielte Gewinnung eines Acetolyseproduktes aus *Chlorella*-Algen durchgeführt. Die harte Zellwand der Algen erschwerte die Acetolyse. Deswegen wurden zunächst verschiedene Methoden zur Zellwandzerkleinerung getestet. Dabei wurde durch den Einsatz einer Schwingmühle die besten Aufschlussresultate erzielt.

Des Weiteren wurden Versuche zur Extraktion von Chlorophyll aus *Chlorella* durchgeführt, wobei der Einfluss des Lösungsmittels auf die Geschwindigkeit der Extraktion untersucht wurde. Es wurde festgestellt, dass DMSO für die Chlorophyllabtrennung am besten geeignet ist.

Es wurde auch der Einfluss der Temperatur auf die Geschwindigkeit der Extraktion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Temperatur von 40°C auf 60°C einen positiven Einfluss auf die Chlorophyllextraktion hat. Insgesamt wurden für die Extraktion von 1 g Algen bei 60°C 300 ml DMSO verbraucht.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Acetolyse von zerkleinerten und chlorophyllfreien Algen bei 60°C und einer Reaktionszeit von 2 h am effektivsten verläuft. Als weiteres Alternativverfahren wurde eine Hydrolyse mit Hilfe von technischen Enzymen sowie Enzymgemischen durchgeführt. Durch den Einsatz eines Enzymgemisches aus Alcalase und Flavourzym konnte die Effizienz des Verfahrens deutlich erhöht werden.

Die Ausbeuten von 8 % in Bezug auf das eingesetzte Ausgangsmaterial entsprachen den Erwartungen. Um die Eigenschaften der Enzyme optimal nutzen zu können, sind noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Der Vergleich der zwei Herstellungsmethoden zur Gewinnung von Sporopollenin zeigte, dass die Anlagen- und Chemikalienkosten der Acetolyse deutlich höher sind als die von enzymatischen Hydrolyse. Eine vollständige Bewertung zu Gunsten einer der beiden Herstellungsmethoden konnte hier aufgrund fehlender Daten (Manpower, Energiekosten) nicht durchgeführt werden.

Durch die Kombination chemischer und enzymatischer Verfahren können möglicherweise bessere Ergebnisse erzielt werden (hochwertigere Koppelprodukte). Denkbar wäre die Gewinnung von Chlorophyll in einer ersten Extraktionsstufe und von Peptiden und Aminosäuren in einer ersten enzymatischen Stufe. Mit einer abschließenden Acetolyse könnte dann ein hochreines Produkt gewonnen werden. Derartige Verbesserungen des Aufarbeitungsvorgangs wären in weiterführenden Arbeiten durchzuführen. Um das Produkt genauer charakterisieren zu können, wird vorgeschlagen, eine H^1 -NMR-Analyse durchzuführen.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Schwermetallabreicherung durch das Acetolyseprodukt ebenso wie durch die Algen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Acetolyseprodukt zur Metallabreicherung geeignet ist. Nach der Abreicherung konnten in der verwendeten Schwermetalllösung (Cd, Pb, As) keine oder nur noch sehr geringe Metallkonzentrationen nachgewiesen werden. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Wie oben angemerkt sollten hierzu aber noch detailliertere Untersuchungen bei Variation von Temperatur und pH-Wert durchgeführt werden. Wichtig wären auch Untersuchungen über den Anteil der Schwermetalle im Acetolyseprodukt (Kapazitätsberechnungen) und das Desorptionsverhalten.

Im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation wurde die Isolierung von Lactoferrin aus Molke und Molkenkonzentrat durchgeführt. Die Isolierung von Lactoferrin erfolgte im Durchlauf- und Rezirkulationsverfahren. Als Nebenprodukt wurde Lactoperoxidase erhalten. Es wurde gezeigt, dass das Lactoferrin im Durchlaufverfahren in zwei Prozessschritten, bestehend aus einer Crossflow-Mikrofiltration und einem Membranadsorber mit Vorfilter aus Molke isoliert werden kann. Mit Hilfe einer 4 m²-Crossflow-Mikrofiltrationsanlage konnten innerhalb von ca. 1 h

800 l Molkenpermeat (Gehalt an Lactoferrin ca. 80 %) erhalten werden. Nach der Mikrofiltration wurde die verwendete Anlage mit Ultrasil P-53 und Natronlauge gereinigt. Mit diesen Reinigungsmitteln konnten die zuvor ermittelten Flussraten innerhalb von 2,5 h zu 100 % wiederhergestellt werden.

Die Isolierung von Lactoferrin aus Molkenpermeat erfolgte mit Hilfe einer automatisierten 4 m²-Membrananlage. Das erhaltene partikelfreie Molkenpermeat konnte problemlos über einen zusätzlichen Vorfilter auf den Membranadsorber gegeben werden. Es wurde gezeigt, dass der Vorfilter mit der Abscheiderate von 10 µm am besten geeignet ist. Das auf der Membran gebundene Lactoferrin wurde mit 1 M NaCl-Lösung eluiert. Die schwächer gebundene Lactoperoxidase konnte mit 0,15 M NaCl-Lösung eluiert werden. Die Ausbeute an Lactoferrin unter Berücksichtigung der Verluste betrug durchschnittlich 80 %.

Für die Reinigung der verwendeten Membran wurde eine Methode entwickelt, durch die die vor der Isolierung gemessenen Flussraten zu 100 % wieder hergestellt werden konnten. Durch den Einsatz von Natronlauge und Salzsäure kann ein Reinigungszyklus innerhalb von 1,5 h durchgeführt werden.

Des Weiteren wurde die Isolierung von Lactoferrin aus Molke und Molkenpermeat im Rezirkulationsverfahren durchgeführt. Es wurden drei Recuperatoren (72, 68, 73) getestet. Die besondere Konstruktion des Recuperators erlaubte die unfiltrierte Molke bzw. Molkenkonzentrat direkt zur Isolierung des Proteins einzusetzen, wodurch der Crossflow-Mikrofiltrationsschritt entfiel.

Die ersten zwei Recuperatoren wurden mit Molke beladen. Es konnte gezeigt werden, dass die wiederholte Beladung der verwendeten Recuperatoren mit Molke und anschließende Elution mit Natriumchlorid möglich ist. Die Isolierungsversuche unter Verwendung des Recuperators 72 lieferten die besten Ergebnisse. Die Bindekapazität und die Wiedergewinnungsrate des Recuperators 72 (Spacer: extrudiert) ist höher als die des Recuperators 68 (Spacer: Vlies). Hier spielt wahrscheinlich die Spacerart der verwendeten Recuperatoren eine große Rolle. Durch die Reinigung mit Natronlauge (40°C) wurde der Wasserwert der Anlage innerhalb von max. 2 h zu 100 % wiederhergestellt.

Die Selektivität des Prozesses wurde mittels Gelelektrophorese untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Banden des gewonnenen Lactoferrins gut mit den Banden

des Standards übereinstimmen. Die Lactoperoxidase hingegen zeigte leichte Verunreinigungen, die auf Albumin, Lactoferrin und Immunglobuline zurückgeführt werden konnten.

Die wiederholte Beladung des Recuperators 73 mit Molkenkonzentrat lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Es wurden sehr niedrige Bindekapazitäten und Wiedergewinnungsraten gemessen, obwohl nur 13 % der statischen Kapazität ausgenutzt wurde. Als mögliche Ursache wurde die Fettadsorption (Membranfouling) diskutiert. Durch den Verbrauch an Waschpuffer wird diese Vermutung gestützt, da er im Vergleich zum Versuch mit Molke dreimal höher war.

Im Rahmen dieses Prozesses bietet sich noch eine Vielzahl weiterer Untersuchungen an. Es könnte eine Optimierung des Isolierungsprozesses durchgeführt werden, durch die die Reinheit der Protein-Fractionen erhöht werden kann. Eine Möglichkeit die Verluste zu minimieren, wäre die Durchführung der Elution im Rezirkulationsverfahren. Um die Isolierung von Lactoferrin aus Molkenkonzentrat zu erleichtern, wird vorgeschlagen, das Molkenkonzentrat nicht pur sondern mikrofiltriert zu verwenden.

Auch zur Gewinnung des Lactoferrins und der Lactoperoxidase aus den salzhaltigen Eluaten wurde Membrantechnik angewandt. Die Ultra-/Diafiltration wurde mittels Hydrosart Sartocoon Cassette (0,6 m²; cutoff 30 kDa) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Entsalzung von 70 l Lactoferrin-Eluat innerhalb von 240 min erfolgen kann. Die Verluste an Zielproteinen lagen bei ca. 7 %.

Die Aufarbeitung des salzhaltigen Ultra-/Diafiltrations-Permeats ist aus ökonomischer und ökologischer Sicht von großen Interesse. Für die Entsalzung von 70 l Eluat wurden ca. 150 l Wasser verbraucht. Die Rückgewinnung dieses Prozesswassers und somit auch des Natriumchlorids würde die Kosten erheblich reduzieren.

Die Untersuchungen zur Langzeitstabilität und Bindekapazität der verwendeten Sartobind S-15 Membran bei 50 °C wurden im Labormaßstab durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die dynamische Kapazität der S-15 Membran bei 50 °C und bei einer Beladungsgeschwindigkeit von 3 cm/min nur um ca. 3,6 % niedriger ist als die Kapazität, die bei Raumtemperatur gemessen wurde. Als Ursache

dieser Kapazitätsunterschiede wurde die Zunahme der Teilchenbewegung aufgrund von hoher Temperatur des Mediums diskutiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die wiederholte Beladung der verwendeten S-15 Membran mit Lactoferrin und die anschließende Regeneration der Membran mit Natriumchlorid im betrachteten Zeitraum von 50 Zyklen auch bei höheren Temperaturen möglich ist. Ein weiterer Schritt wäre die Durchführung eines Langzeitstabilitätstests mit Modulen anderer Größe und Geometrie, z.B. Wickelmodulen.

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von isolierter Lactoperoxidase wurde nach der Methode von Pütter & Becker durchgeführt [93]. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, mit der Membrantechnik ein aktives Enzym aus der Molke bzw. Molkenpermeat zu isolieren. Dabei wurde ein deutlicher Aktivitätsunterschied zwischen den einzelnen Lactoperoxidase-Proben festgestellt. Die enzymatische Aktivität der im Rezirkulationsverfahren gewonnenen Lactoperoxidase-Proben ist deutlich höher als die von im Durchlaufverfahren isolierten Proben. Als Ursache wurde das Auftreten von Scherkräften durch die Crossflow-Mikrofiltration diskutiert.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Herstellung und Isolierung von Lactoferricin durchgeführt. Zuerst wurde untersucht bei welchem pH-Wert die Reaktion am besten verläuft. Dabei wurde ein optimaler pH-Wert der Reaktionslösung von 2,0 festgestellt. Die Reaktionszeit bzw. Produktbildungszeit konnte durch das Konstanthalten des pH-Wertes der Reaktionslösung von 6 h auf 1 h reduziert werden. Es konnte in guter Näherung von einer Reaktion 1. Ordnung ausgegangen werden.

Um das Enzym vom Produkt zu trennen, wurde eine Crossflow-Filtrationseinheit mit einem MWCO von 10 kDa eingesetzt. Erst nach einer Filtrationszeit von 50 min wurde das langsame Verblocken der Membran beobachtet. Für die Reinigung der Membran wurden Natronlauge und Zitronensäure verwendet. Damit konnte die Ausgangsflussrate zu ca. 99 % wieder hergestellt werden. Mittels SDS-Page konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym vollständig vom Produkt abgetrennt wurde.

Die Isolierung von Lactoferricin aus dem Hydrolysat wurde unter Verwendung einer stark sauren Kationenaustauscher-Membran an der FPLC-Anlage durchgeführt. Das Lactoferricin konnte schließlich nur mit 2 M NH_4Cl -Lösung eluiert werden.

Nach einer Entsalzung des Lactoferricins durch Größenausschluss-Chromatographie wurden HPLC und MALDI-MS-Messungen durchgeführt. Diese Untersuchungen haben bestätigt, dass das Lactoferricin Hauptprodukt dieses Downstream-Prozesses ist.

Als nächstes wurden Optimierungen des Entsalzungsschrittes durchgeführt, da die Effizienz der Größenausschluss-Chromatographie nicht zu 100 % ausgenutzt werden konnte. Die Optimierung basierte darauf, dass das Lactoferricin mit Ammoniumcarbonat anstatt mit Ammoniumchlorid eluiert wurde. Der Vorteil dieses Puffers gegenüber dem Ammoniumchlorid bestand darin, dass er sich während der Gefriertrocknung im Vakuum in NH_3 , CO_2 und H_2O zersetzte. Dadurch war es möglich, den Entsalzungsschritt einzusparen.

Aufbauend auf den bisherigen Entwicklungen zur diskontinuierlichen Herstellung von Lactoferricin, konnte ein Verfahren zur kontinuierlichen Gewinnung des Zielproteins entwickelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Gewinnung von Lactoferricin über einen längeren Zeitraum, in einer dafür konstruierten Anlage, möglich ist. Mittels dieser Anlage konnte eine Ausbeute an Lactoferricin von 42 % erreicht werden. Dieser relativ niedrige Wert ist auf die zu geringe Beladungskapazität bzw. zu geringe Anzahl der verwendeten S-15 Module zurückzuführen. Eine Berechnung der Menge an nicht gebundenem Lactoferricin im Permeat des Adsorbermoduls brachte eine mögliche Ausbeute von 98 %.

Die Optimierung dieses Lactoferricin-Downstreamprozesses wäre Aufgabe weiterer Arbeiten. So müsste gegebenenfalls ein größerer Membranadsorber eingesetzt werden, um die hohen Lactoferricin-Verluste zu minimieren. Mit Hilfe von SDS-Page, FPLC, HPLC und MALDI-MS konnten die Zielproteine sowohl im festen als auch im flüssigen Zustand mit hoher Genauigkeit bestimmt, identifiziert und Verunreinigungen detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es durch die Fortschritte im Downstreaming- und Biotransformationsbereich eine erfolgsversprechende Ausgangsbasis zur Gewinnung industriell relevanter Stoffen gibt.

In Hinblick auf weitere Aufarbeitungsaufgaben ist absehbar, dass sich mit den Downstream-Techniken weitere ähnliche Aufgaben lösen lassen werden, wie hier am Beispiel der Molkenaufarbeitung gezeigt, beispielsweise bei der Isolierung von Wertstoffen aus Kartoffelfruchtwasser mit hoher Ausbeute ohne Veränderung der nativen Moleküleigenschaften.

14 Anhang

14.1 Acetolyse

Die Versuchsparameter der durchgeführten Acetolyseversuche sind in nachfolgenden Tabellen wiedergegeben.

		Versuchsnummer								
		1	2	3	4	5	6	7		
								1 Stufe	2 Stufe	
m (Algen, Cell Wall Broken)	g									
m (Algen, OPZ)	g	100	10	2	2,4	2,8	2,8	3		
m (Algen, CHHU)	g									
V (HCl, 6M)	ml									
V (H ₂ SO ₄)	ml	110	11	4,4	4,4	4,4	4,4	3,3	3,3	
V (Essigsäureanhydrid)	ml	1000	100	40	40	40	20	30	30	
V (Isopropanol) [°]	ml		50							
V (EDTA) [°]	ml									
V (Aceton,70%) [°]	ml									
V (Wasser) ¹	ml	800	300	150	150	150	150		600	
V (Wasser/Eis) ²	ml/g	/4000	500/	100/	100/	100/	100/		400/	
t (Alge/Produkt)*	min	45/	15/	10/	10/	10/	10/	5/		
t (Reaktion)	min	600	720	840	840	840	840	3000	720	
t (Auftauen)	min									
t (Einfrieren)	min									
t (Z) ³	min	20	10	5	5	5	5		10	
t (M) ⁴	min									
t (Ultraschall)	min									
t (Ultraturrax)	min									
T (Reaktion)	°C	20	20	20	20	20	20	20	20	
T (Einfrieren)	°C									
T (Auftauen)	°C									
T (Zugabe) ⁵	°C	40	30	40	40	40	40	40		
Ausbeute	%	20	30	30	30	30	30		17	
Produktfarbe		grün	grün	grün	grün	grün	grün		grün	
IR-Spektren									5	
Abkürzungen:		*Zugabezeit der Algen/Produkt aus 1 Stufe				°Waschmenge an Lösungsmitteln				
V = Volumen		¹ Waschmenge Wasser			⁵ Temperatur der Reaktionslösung bei der Zugabe der Algen					
T = Temperatur		² Menge an Wasser/Eis zum Quentchen								
t = Zeit		³ Zugabezeit Acetolysemischung zum Wasser								
m = Masse; IR = Infrarot		⁴ Zerkleinerungszeit von Algen (Schwingmühle)								

		Versuchsnummer							
		8		9	10	11	12	13	14
		1 Stufe	2 Stufe						
m (Algen, Cell Wall Broken)	g								
m (Algen, OPZ)	g								
m (Algen, CHHU)	g	100		5	5	2,5	2,5	2,5	2,5
V (HCl, 6M)	ml								
V (H ₂ SO ₄)	ml	110	16,5	5,5	5,5	5	2,25	2,25	2,25
V (Essigsäureanhydrid)	ml	1000	150	50	50	25	25	25	25
V (Isopropanol) ^o	ml								50
V (EDTA) ^o	ml								
V (Aceton,70%) ^o	ml							50	
V (Wasser) ¹	ml	600	300	300	300	300	300	300	300
V (Wasser/Eis) ²	ml/g	/4000	1000/	300/	300/	/75	/75	/75	/75
t (Alge/Produkt)*	min	45/	/15	20/	20/	10/	10/	10/	10/
t (Reaktion)	min	720	720	7000	1440	720	720	720	720
t (Auftauen)	min								
t (Einfrieren)	min								
t (Z) ³	min	20	5	10	10	5	5	5	5
t (M) ⁴	min								
t (Ultraschall)	min								
t (Ultraturrax)	min								
T (Reaktion)	°C	20	20	20	20	20	20	20	20
T (Einfrieren)	°C								
T (Auftauen)	°C								
T (Zugabe) ⁵	°C	40	40	20 - 30	20 - 30	20 - 30	20 - 30	20 - 30	20 - 30
Ausbeute	%	15	8	8	8	6	8	8	8
Produktfarbe		grün	hellgrün	grün	grün	grün	grün	grün	hellgrün
IR-Spektren						1			
Abkürzungen:		*Zugabezeit der Algen/Produkt aus 1 Stufe				°Waschmenge an Lösungsmitteln			
V = Volumen		¹ Waschmenge Wasser			⁵ Temperatur der Reaktionslösung bei der Zugabe der Algen				
T = Temperatur		² Menge an Wasser/Eis zum Quentchen							
t = Zeit		³ Zugabezeit Acetolysemischung zum Wasser							
m = Masse; IR = Infrarot		⁴ Zerkleinerungszeit von Algen (Schwingmühle)							

		Versuchsnummer								
		15	16	17	18	19	20	21		
								Vorstufe	Acetolyse	
m (Algen, Cell Wall Broken)	g									
m (Algen, OPZ)	g						1		1	
m (Algen, CHHU)	g	100	10	10	10	1				
V (HCl, 6M)	ml					100	100			
V (H ₂ SO ₄)	ml	110	11	11	11				1,1	
V (Essigsäureanhydrid)	ml	1000	100	100	100				10	
V (Isopropanol, 70%/90%)°	ml	/200	200/	200/	200/	30/	30/	100/		
V (EDTA)°	ml									
V (Aceton,70%)°	ml									
V (Wasser) ¹	ml	300	300	300	300	50	50		300	
V (Wasser/Eis) ²	ml/g	/4000	/400	/400	/400				100/	
t (Alge/Produkt)*	min	45/	10/	10/	10/				5/	
t (Reaktion)	min	720	840	840	840	1440	1440		840	
t (Auftauen)	min									
t (Einfrieren)	min									
t (Z) ³	min	15	15	15	15					
t (M) ⁴	min									
t (Ultraschall)	min									
t (Ultraturrax)	min									
T (Reaktion)	°C	20	20	20	20	110 - 115	110 - 115		20	
T (Einfrieren)	°C									
T (Auftauen)	°C									
T (Zugabe) ⁵	°C	20 - 30	30	40	50	20	20		40	
Ausbeute	%	7	10	11	5	5	10		30	
Produktfarbe		grün	dunkelgrün	grün	hellgrün	schwarz	schwarz		grün	
IR-Spektren					5					
Abkürzungen:		*Zugabezeit der Algen/Produkt aus 1 Stufe			°Waschmenge an Lösungsmitteln					
V = Volumen		¹ Waschmenge Wasser			⁵ Temperatur der Reaktionslösung bei der Zugabe der Algen					
T = Temperatur		² Menge an Wasser/Eis zum Quentchen								
t = Zeit		³ Zugabezeit Acetolysemischung zum Wasser								
m = Masse; IR = Infrarot		⁴ Zerkleinerungszeit von Algen (Schwingmühle)								

		Versuchsnummer							
		22		23		24		25	
		Vorstufe	Acetolyse	Vorstufe	Acetolyse	Vorstufe	Acetolyse	Vorstufe	Acetolyse
m (Algen, Cell Wall Broken)	g								
m (Algen, OPZ)	g		1		0,5		1,5		1,1
m (Algen, CHHU)	g								
V (HCl, 6M)	ml								
V (H ₂ SO ₄)	ml		1,1		0,5		1,7		1,2
V (Essigsäureanhydrid)	ml		10		5		15		11
V (Isopropanol, 70%/90%)°	ml								
V (EDTA,0,1 M)°	ml			100					
V (Aceton,70%)°	ml	100							
V (Wasser) ¹	ml		300		300		300		300
V (Wasser/Eis) ²	ml/g		100/		100/		100/		100/
t (Alge/Produkt)*	min		5/		3/		5		5/
t (Reaktion)	min		840		840		840		840
t (Auftauen)	min								
t (Einfrieren)	min								
t (Z) ³	min		5		5		5		5
t (Mühle) ⁴	min					25		25	
t (Ultraschall)	min					10			
t (Ultraturrax)	min							20	
T (Reaktion)	°C		20		20		20		20
T (Einfrieren)	°C								
T (Auftauen)	°C								
T (Zugabe) ⁵	°C		40		40		40		40
Ausbeute	%		14		12		18,6		18,2
Produktfarbe			hellgrün		hellgrün		grün		hellgrün
IR-Spektren					5				
Abkürzungen:		*Zugabezeit der Algen/Produkt aus 1 Stufe			°Waschmenge an Lösungsmitteln				
V = Volumen		¹ Waschmenge Wasser			⁵ Temperatur der Reaktionslösung bei der Zugabe der Algen				
T = Temperatur		² Menge an Wasser/Eis zum Quentchen							
t = Zeit		³ Zugabezeit Acetolysemischung zum Wasser							
m = Masse; IR = Infrarot		⁴ Zerkleinerungszeit von Algen (Schwingmühle)							

		Versuchsnummer							
		26		27		28		29	30
		Vorstufe	Acetolyse	Vorstufe	Acetolyse	Vorstufe	Acetolyse		
m (Algen, Cell Wall Broken)	g								
m (Algen, OPZ)	g		3,45		2		1	0,5	0,5
m (Algen, CHHU)	g								
V (HCl, 6M)	ml								
V (H ₂ SO ₄)	ml		6		2,2		1,1	0,55	0,55
V (Essigsäureanhydrid)	ml		54,5		20		10	5	5
V (Isopropanol, 70%/90%)°	ml								
V (EDTA, 0,1 M)°	ml								
V (Aceton, 70%)°	ml								
V (Wasser) ¹	ml		300		300		300	300	300
V (Wasser/Eis) ²	ml/g		150/		100/		100/	50/	50/
t (Alge/Produkt)*	min		10/		5/		5/	5/	5/
t (Reaktion)	min		840		840		840	150	300
t (Auftauen)	min			300		300			
t (Einfrieren)	min			720		720			
t (Z) ³	min		5		5		5	3	3
t (Mühle) ⁴	min	180		25		25		240	240
t (Ultraschall)	min								
t (Ultraturrax)	min					20			
T (Reaktion)	°C		20		20		20	70	60
T (Einfrieren)	°C			-17		-17			
T (Auftauen)	°C			20		20			
T (Zugabe) ⁵	°C		40		40		40	40	40
Ausbeute	%		35		37,5		23	12	12
Produktfarbe			dunkelgelb		gelbgrün		gelbgrün	braun	braun
IR-Spektren					5				
Abkürzungen:		*Zugabezeit der Algen/Produkt aus 1 Stufe			° Waschmenge an Lösungsmitteln				
V = Volumen		¹ Waschmenge Wasser			⁵ Temperatur der Reaktionslösung bei der Zugabe der Algen				
T = Temperatur		² Menge an Wasser/Eis zum Quentchen							
t = Zeit		³ Zugabezeit Acetolysemischung zum Wasser							
m = Masse; IR = Infrarot		⁴ Zerkleinerungszeit von Algen (Schwingmühle)							

		Versuchsnummer							
		31	32	33	34	35	36	37	
								Vorstufe	Acetolyse
m (Algen, Cell Wall Broken)	g								
m (Algen, OPZ)	g	0,5	2,8	0,5	0,5	0,5	0,5		0,21
m (Algen, CHHU)	g								
V (HCl, 6M)	ml								
V (H ₂ SO ₄)	ml	0,55	3,1	0,55	0,55	0,55	0,55		0,23
V (Essigsäureanhydrid)	ml	5	28	5	5	5	5		2,1
V (Isopropanol, 70%/90%)°	ml								
V (EDTA,0,1 M)°	ml								
V (Aceton,70%)°	ml								
V (Wasser) ¹	ml	300	900	300	300	300	300		250
V (Wasser/Eis) ²	ml/g	50/	250/	30/	30/	30/	30/		25/
t (Alge/Produkt)*	min	5/	10/	5/	5/	5/	5/		5/
t (Reaktion)	min	180	120	15	30	60	120		60
t (Auftauen)	min								
t (Einfrieren)	min								
t (Z) ³	min	3	5	3	3	3	3		5
t (Mühle) ⁴	min	240	240	240	240	240	240	240	
t (Ultraschall)	min								
t (Ultraturrax)	min								
T (Reaktion)	°C	60	60	60	60	60	60		60
T (Einfrieren)	°C								
T (Auftauen)	°C								
T (Zugabe) ⁵	°C	40	40	40	40	40	40		40
Ausbeute	%	11	11	14	8	8	4		10
Produktfarbe		braun	grünbraun	braun	gelbbraun	gelbbraun	hellbraun		gelbbraun
t (Extraktion)	min							180	
T (Extraktion)	°C							60	
V (DMSO)	ml							150	
IR-Spektren					2	3			8

¹Waschmenge Wasser³Zugabezeit Acetolysemischung zum Wasser

*Zugabezeit der Algen/Produkt aus 1 Stufe

²Menge an Wasser/Eis zum Quentchen⁴Zerkleinerungszeit von Algen (Schwingmühle)⁵Temperatur der Reaktionslösung bei der Zugabe der Algen

		Versuchsnummer							
		38 (Optimum)		39	40		41	42	43
		Vorstufe	Acetolyse		Vorstufe	Acetolyse			
m (Algen, Cell Wall Broken)	g								
m (Algen, OPZ)	g		0,21	1		1	1	1	1
m (Algen, CHHU)	g								
V (HCl, 6M)	ml								
V (H ₂ SO ₄)	ml		0,23	1,1		1,1	1,1	1,1	1,1
V (Essigsäureanhydrid)	ml		2,1	10		10	10	10	10
V (Isopropanol, 70%/90%)°	ml								
V (EDTA,0,1 M)°	ml								
V (Aceton,70%)°	ml								
V (Wasser) ¹	ml		250	400		500	500	500	500
V (Wasser/Eis) ²	ml/g		25/	50/		50/	50/	50/	50/
t (Alge/Produkt)*	min		5/	10/		10/	10/	10/	10/
t (Reaktion)	min		120	1200		1200	15	1	15
t (Auftauen)	min								
t (Einfrieren)	min								
t (Z) ³	min		5	10		10	10	10	10
t (Mühle) ⁴	min	240			240				
t (Ultraschall)	min								
t (Ultraturrax)	min								
T (Reaktion)	°C		60	40		40	100	100	80
T (Einfrieren)	°C								
T (Auftauen)	°C								
T (Zugabe) ⁵	°C		40	40		40	40	40	40
Ausbeute	%		8	20		10	28	18	24
Produktfarbe			gelb	dunkelgrün		gelbbraun	schwarz	dunkelbraun	dunkelbraun
t (Extraktion)	min	180							
T (Extraktion)	°C	60							
V (DMSO)	ml	150							
IR-Spektren			7	1				9	

¹Waschmenge Wasser

³Zugabezeit Acetolysemischung zum Wasser *Zugabezeit der Algen/Produkt aus 1 Stufe

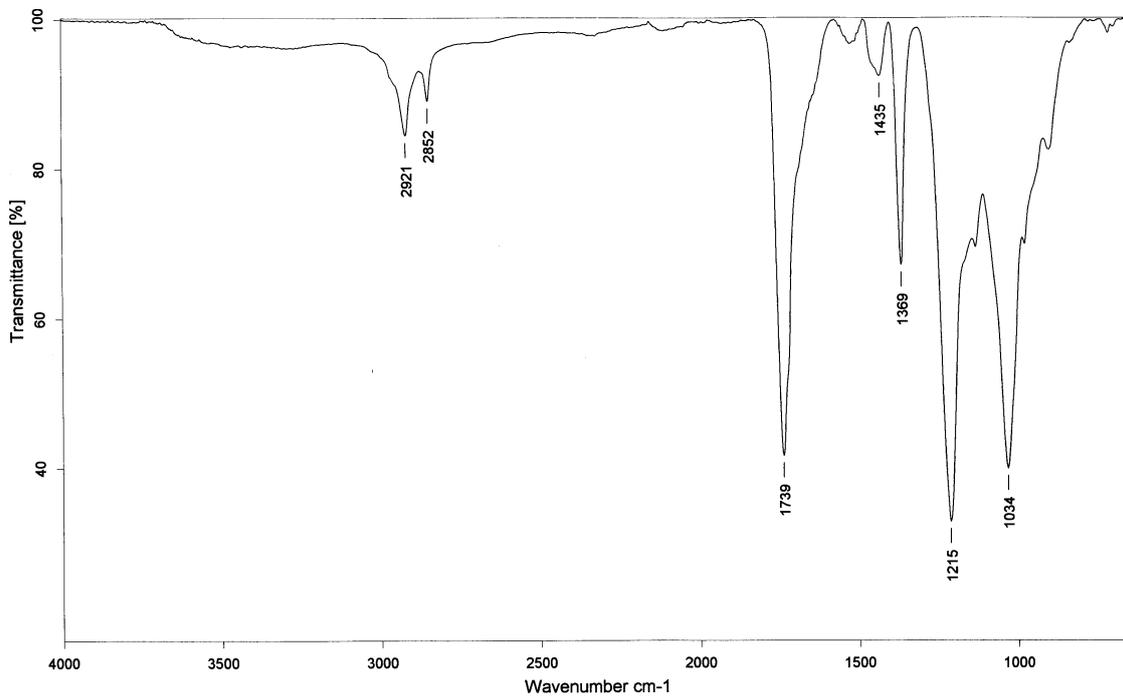
²Menge an Wasser/Eis zum Quentchen

⁴Zerkleinerungszeit von Algen (Schwingmühle) ⁵Temperatur der Reaktionslösung bei der Zugabe der Algen

		Versuchsnummer							
		44	45	46	47	48	49	50	51
m (Algen, Cell Wall Broken)	g				0,24	0,5	0,5	0,5	0,5
m (Algen, OPZ)	g	1	1	1					
m (Algen, CHHU)	g								
V (HCl, 6M)	ml								
V (H ₂ SO ₄)	ml	1,1	1,1	1,1	0,27	0,55	0,55	0,55	0,55
V (Essigsäureanhydrid)	ml	10	10	10	2,4	5	5	5	5
V (Isopropanol, 70%/90%)°	ml								
V (EDTA,0,1 M)°	ml								
V (Aceton,70%)°	ml								
V (Wasser) ¹	ml	500	500	500	200	200	200	200	200
V (Wasser/Eis) ²	ml/g	50/	50/	50/	50/	50/	50/	50/	50/
t (Alge/Produkt)*	min	10/	10/	10/	5/	5/	5/	5/	5/
t (Reaktion)	min	80	15	40	1200	180	120	860	920
t (Auftauen)	min								
t (Einfrieren)	min								
t (Z) ³	min	5	5	5	5	5	5	5	5
t (Mühle) ⁴	min								
t (Ultraschall)	min								
t (Ultraturrax)	min								
T (Reaktion)	°C	60	60	60	40	40	60	20	40
T (Einfrieren)	°C								
T (Auftauen)	°C								
T (Zugabe) ⁵	°C	40	40	40	40	40	40	40	40
Ausbeute	%	14	19	15	16	10	12,4	1,6	10
Produktfarbe		gelbgrün	gelbgrün	gelbgrün	gelb	dunkelgrün	schwarz	dunkelgrün	dunkelgrün
t (Extraktion)	min				300				
T (Extraktion)	°C				60				
V (DMSO)	ml				250				
IR-Spektren				4	1		6		

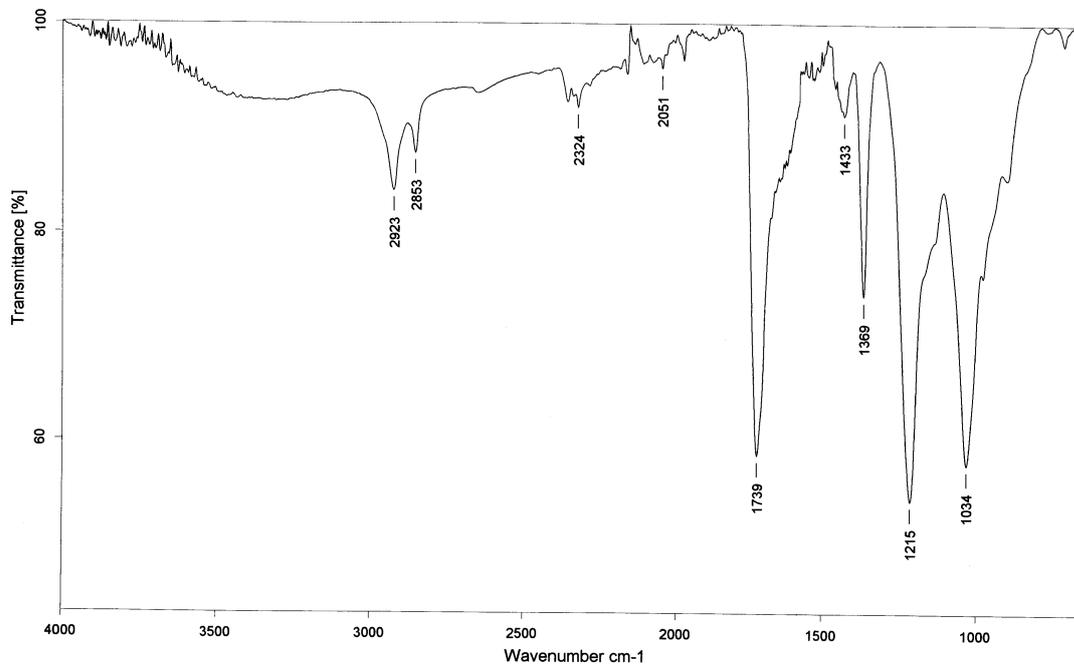
¹Waschmenge Wasser ³Zugabezeit Acetolysemischung zum Wasser *Zugabezeit der Algen/Produkt aus 1 Stufe
²Menge an Wasser/Eis zum Quentchen ⁴Zerkleinerungszeit von Algen (Schwingmühle) ⁵Temperatur der Reaktionslösung bei der Zugabe der Algen

14.2 IR-Spektren



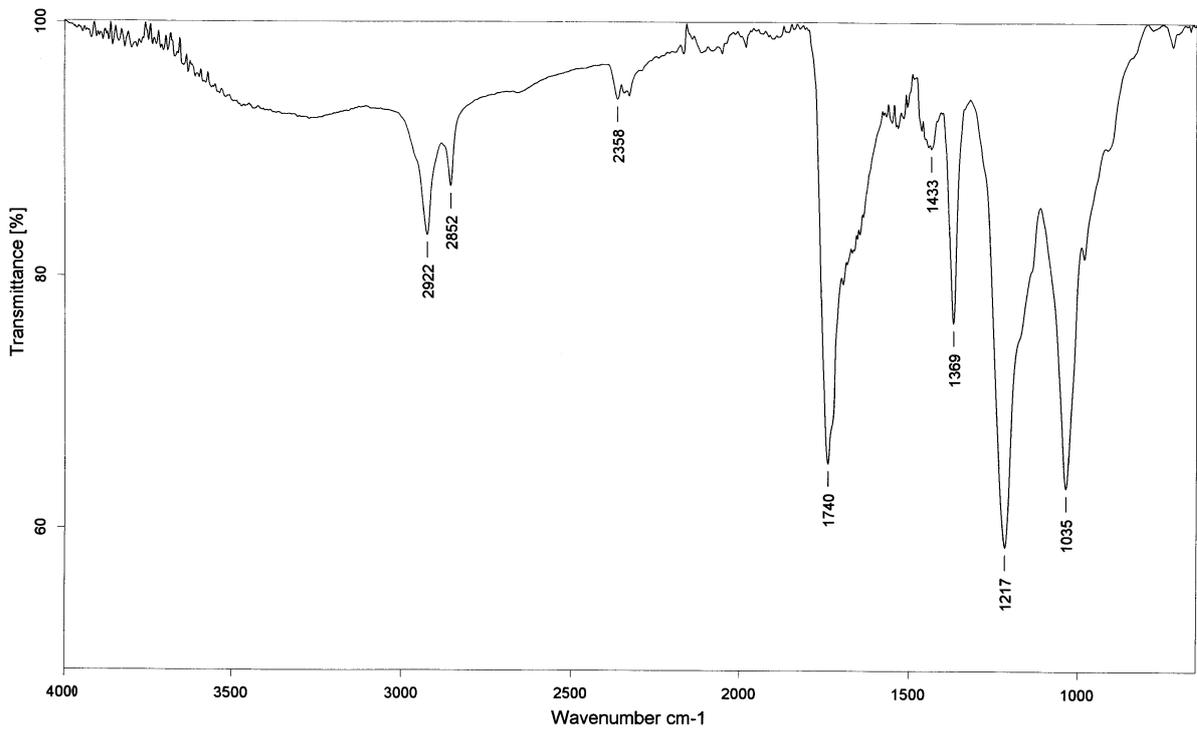
Sample Name: OPZ/20h/40°C

Sample Form: Golden Gate/ATR



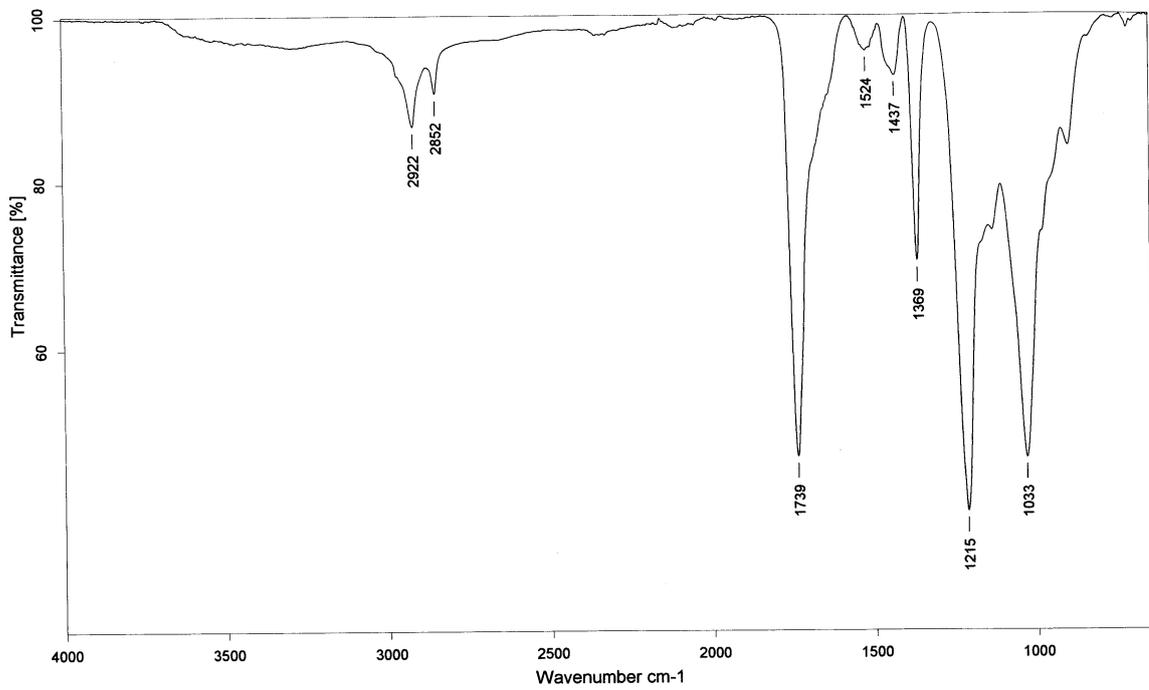
Sample Name: OPZ/Mühle/60°C/30min

Sample Form: Golden Gate/ITR



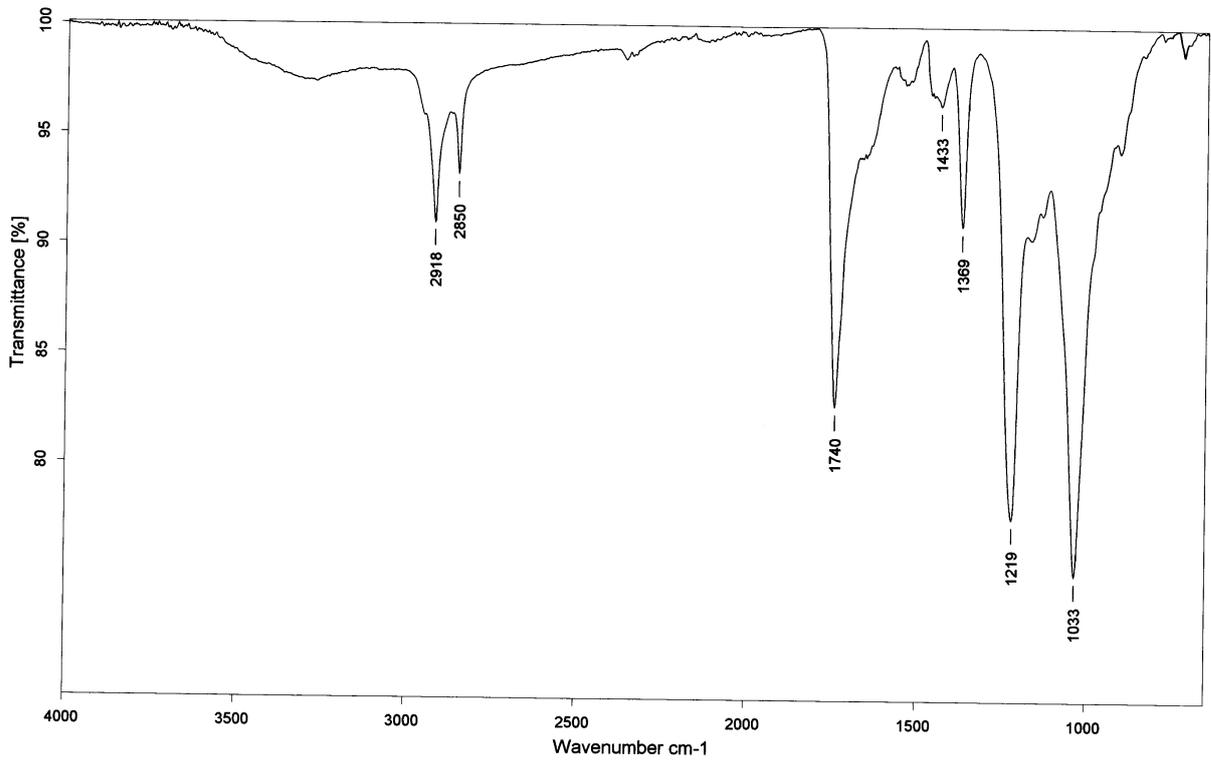
Sample Name: OPZ/Mühle/60°C/1h

Sample Form: Golden Gate/ATR



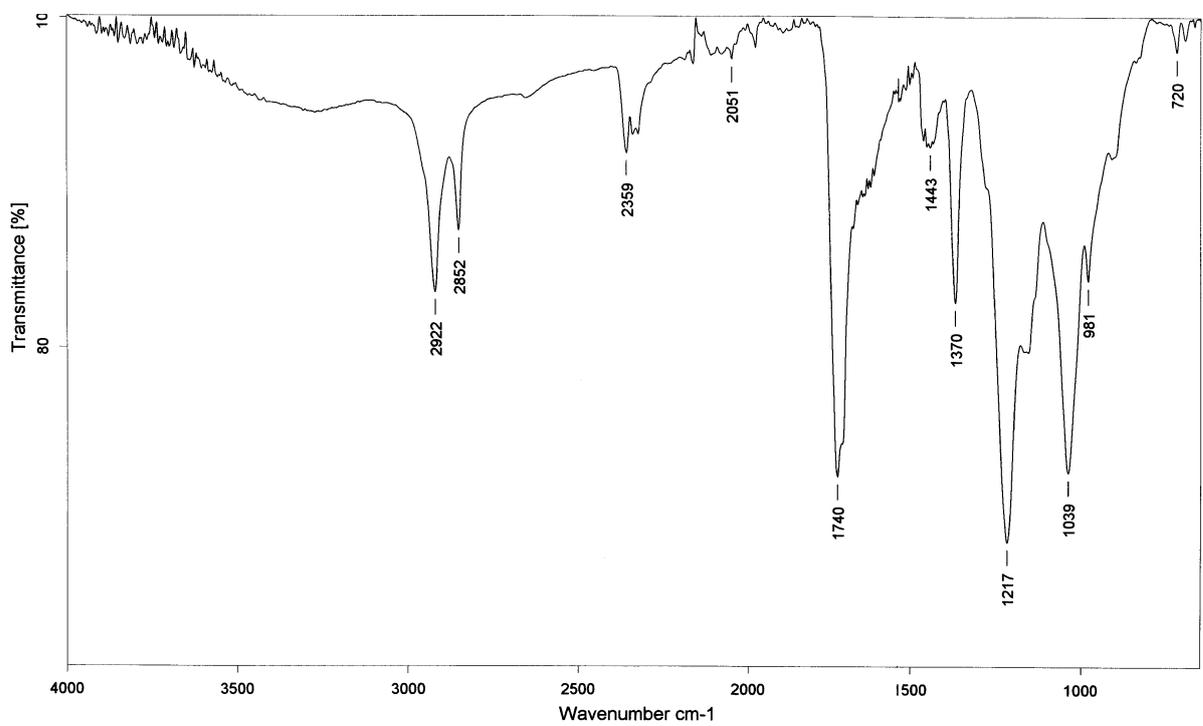
Sample Name: OPZ/60°C/40min

Sample Form: Golden Gate/ATR



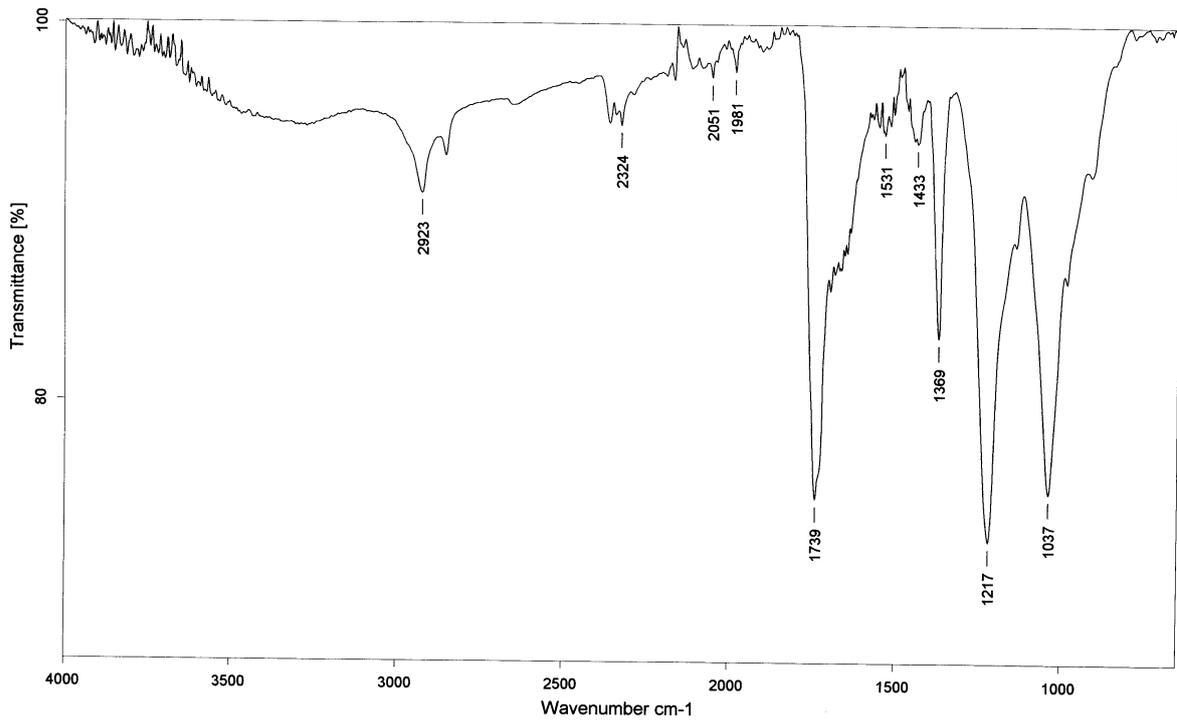
Sample Name: OPZ/2Stufe(17,5g)

Sample Form: Golden-Gate/ATR



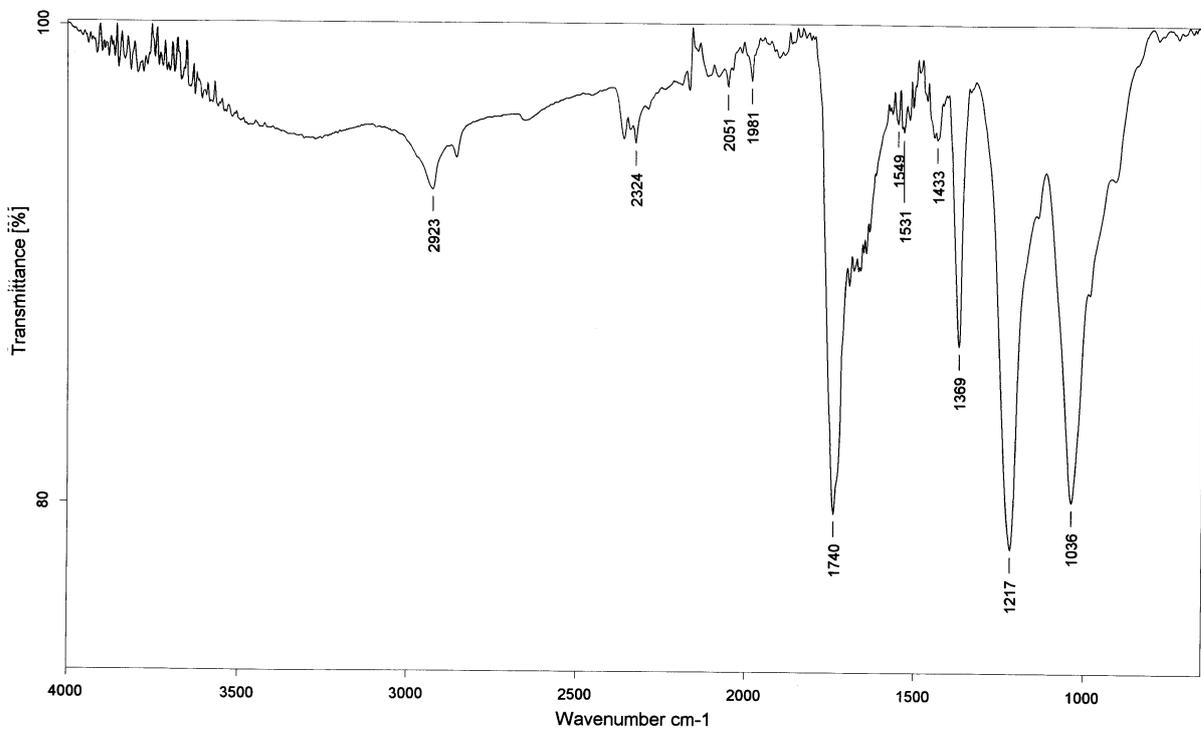
Sample Name: OPZ/Mühle/60°C/2h

Sample Form: Golden Gate/AR



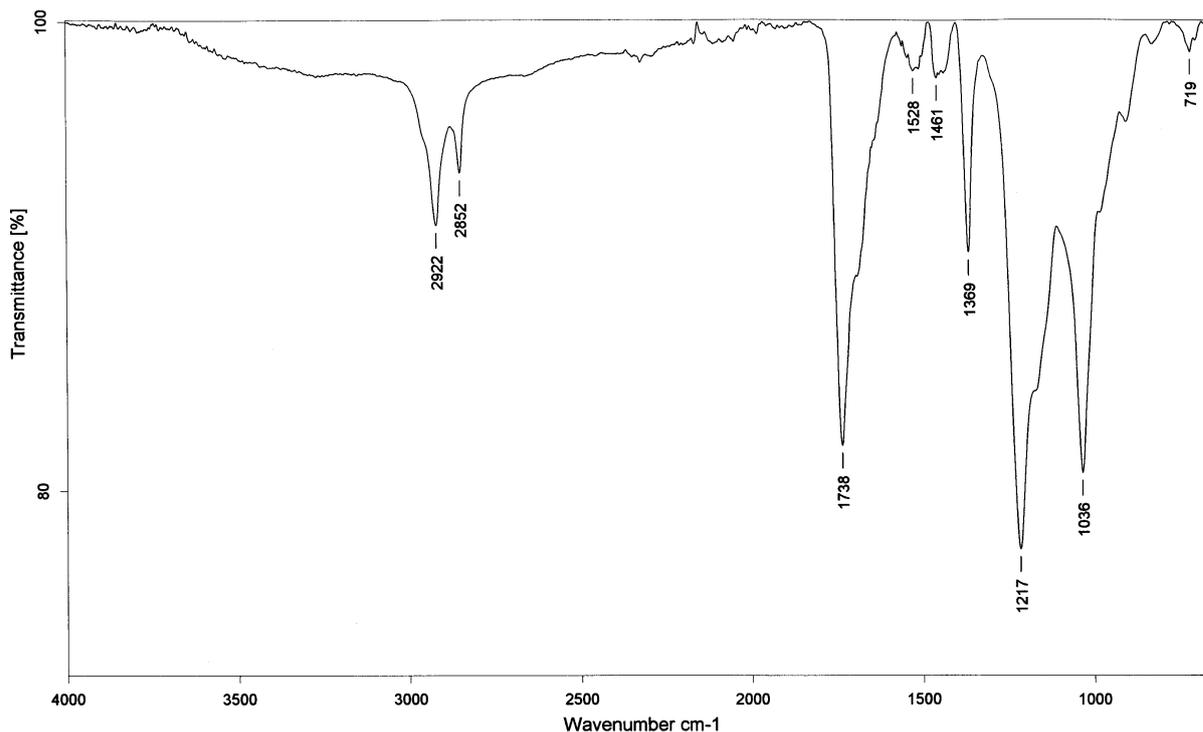
Sample Name: OPZ/DMSO/Mühle/1Stufe/60°C/2h

Sample Form: Golden Gate/ATR



Sample Name: OPZ/DMSO/Mühle/1Stufe/60°C/1h

Sample Form: Golden Gate/ATR



Sample Name: OPZ/100°C/1 min

Sample Form: Golden Gate/ATR

14.3 2D-Fluoreszenzspektroskop

Geräteparameter und Voreinstellungen des 2D-Fluoreszenzspektrometers Hitachi F 4500:

Grundeinstellungen:

Exzitations- / Emissionsintervall	5 nm
Exzitations- / Emissionsslit	5 nm
Scan speed	1200 nm / min
PTM-Voltage	automatic

Variable Einstellungen:

Exzitation	300 – 800 nm
Emission	300 – 800 nm
Intervall	10 nm

14.4 Messprinzip (ICP-OES)

Für die Analyse von Spurenelementen in Lösungen in den Konzentrationsbereichen mg/l bis µg/l wird die Optische Emissionsspektrometrie mit dem induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) eingesetzt. Das Verfahren ermöglicht prinzipiell die gleichzeitige Bestimmung aller Metalle und einiger Nichtmetalle (bis zu 60 Elemente) aus angesäuerten, wässrigen Lösungen bis zu einem Gesamthalt an gelöster Substanz von ca. 10 g/l. Die Geräte werden hauptsächlich im Umweltbereich bei der Analyse von Wasser und Säureaufschlüssen eingesetzt.

Bei der ICP-OES Analytik wird die Probenlösung über ein pneumatisches Zerstäubersystem in ein induktiv gekoppeltes Argonplasma eingebracht. Bei einer Temperatur von 5.000 – 7.000 K im Plasma werden die in der Lösung enthaltenen Elemente atomisiert und zu Lichtemission angeregt. Das emittierte Licht wird bei der simultanen Analyse über einen Polychromator in elementspezifische Wellenlängen aufgespalten und die Lichtintensität mittels einer Reihe von fest installierten Photomultipliern detektiert. Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit einzelne Wellenlängen im Emissionsspektrum mit einem sequentiell arbeitenden Monochromator hoher Auflösung zu erfassen. Die Lichtintensität ist proportional der Menge der im Plasma angeregten Atome eines Elements. Zur quantitativen Bestimmung des Elementsgehalts einer Lösung wird das Gerät mit synthetischen Lösungen bekannten Gehalts kalibriert. Zur Kontrolle der Ergebnisse werden kommerziell erhältliche Referenzlösungen eingesetzt.

14.5 Untersuchungen zur Bindekapazität und Langzeitstabilität

Tabelle 14.5.1: Laufprogramm FPLC zur Kapazitätsbestimmung

[NaPP]: 20 mM pH 7; [bLF]: 1 g/l; [NaCl]: 1 M; Beladungsgeschwindigkeit: 1 cm/min

Dauer [s]	Aktion	Flussrate [ml/min]	Medium	Menge [ml]
120	Spülen	3	NaPP	6
600	Beladen	3	bLF + NaPP	30
240	Spülen	3	NaPP	12
240	Eluieren	3	NaCl + NaPP	12
120	Spülen	3	NaPP	6

Tabelle 14.5.2: Laufprogramm FPLC zur Kapazitätsbestimmung

[NaPP]: 20 mM pH 7; [bLF]: 1 g/l; [NaCl]: 1 M; Auftragungsgeschwindigkeit: 2 cm/min

Dauer [s]	Aktion	Flussrate [ml/min]	Medium	Menge [ml]
120	Spülen	3	NaPP	6
300	Beladen	6	bLF + NaPP	30
240	Spülen	3	NaPP	12
240	Eluieren	3	NaCl + NaPP	12
120	Spülen	3	NaPP	6

Tabelle 14.5.3: Laufprogramm FPLC zur Kapazitätsbestimmung

[NaPP]: 20 mM pH 7; [bLF]: 1 g/l; [NaCl]: 1 M; Auftragungsgeschwindigkeit: 3 cm/min

Dauer [s]	Aktion	Flussrate [ml/min]	Medium	Menge [ml]
120	Spülen	3	NaPP	6
200	Beladen	9	bLF + NaPP	30
240	Spülen	3	NaPP	12
240	Eluieren	3	NaCl + NaPP	12
120	Spülen	3	NaPP	6

Tabelle 14.5.4: Laufprogramm zur Untersuchung der Langzeitstabilität mit Molkenpermeat

[NaPP]: 20 mM pH 7; [NaCl]: 1 M;

Dauer [s]	Aktion	Flussrate [ml/min]	Medium	Menge [ml]
90	Spülen	4	NaPP	6
Manuelle Beladung der Membran mit Molkenpermeat				
150	Spülen	4	NaPP	10
300	Eluieren	4	NaCl + NaPP	10
90	Spülen	4	NaPP	6

14.6 Berechnung des Konzentrierungsfaktors

Der Konzentrierungsfaktor F ist ein Maß für den Grad der Aufkonzentrierung des Filtrationsmediums, das auf der Retentatseite zirkuliert wird, während das

gewonnene Permeat dem Filtrationskreislauf entzogen wird. Der Faktor kann wie folgt berechnet werden:

$$F = \frac{V_{t=0}}{V_{Ende}}$$

Für $V_{t=0} = 1.000 \text{ l}$ und $V_{Ende} = 200 \text{ l}$ gilt $F = \frac{1.000 \text{ l}}{200 \text{ l}} = 5$.

14.7 Mahltechnik

Die Zerkleinerung in der Schwingmühle erfolgt durch die Schlagwirkung der Kugeln auf das Mahlgut, die Homogenisierung durch die Schüttelbewegung und den räumlichen Bewegungsablauf der Kugeln. Die Becher führen in horizontaler Lage radiale Schwingungen aus, die dazu führen, dass die Kugeln wechselseitig auf das Probegut aufschlagen. Die Schwingungszahl ist stufenlos von 150 bis ca.1.800 Schwingungen pro Minute regelbar. Der Antrieb erfolgt durch einen leistungsstarken 100 Watt Motor. Dieser ist mit einer Bremse ausgestattet, die beim Öffnen der Plexiglas-Schutzhaube das Gerät in weniger als 1 s zum Stillstand bringt. Der Gegenlauf der Becher sorgt für ruhigen Stand auch bei max. Schwingungsintensität.

14.8 HPLC-Analytik

Der quantitative Lactoferringehalt in Lösung wurde mittels HPLC-Messung (Mono S H/R 5/5, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bestimmt. In der Tabelle 14.8.1 ist das zeitgesteuerte Laufprogramm dargestellt.

Tabelle 14.8.1: Laufprogramm der HPLC-Analytik; Puffer A: 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7; Puffer B: 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 + 2 NaCl-Lösung

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

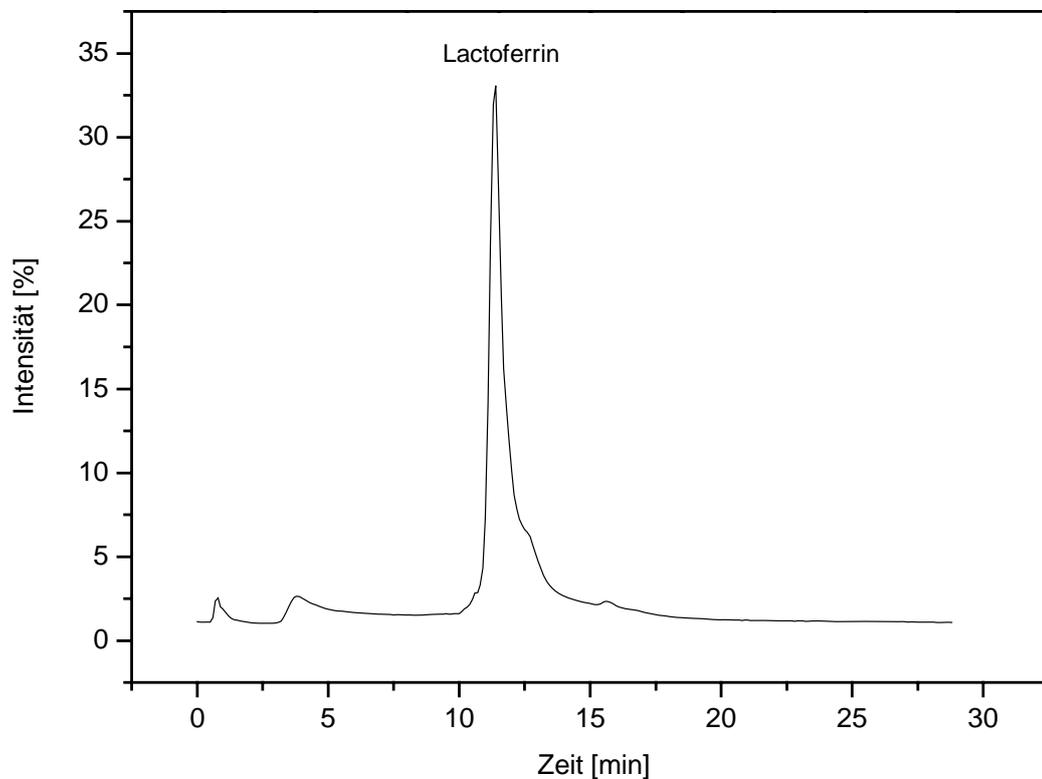


Abbildung 14.8: Ein typisches Laufdiagramm der HPLC-Analytik; Laufprogramm (s. Tabelle 14.8.1)

Der quantitative Lactoferricingehalt in Lösung wurde mittels HPLC-Messung (Reversed-Phase-Säule, C 8, Suppelco) bestimmt. Tabelle 14.8.2 zeigt das zeitgesteuerte Laufprogramm.

Tabelle 14.8.2: Laufprogramm der HPLC-Analytik; Eluent A: 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7; Eluent B: 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 + 2 M NaCl-Lösung; T = 30°C; UV-Bereich = 280 nm

Eluent		Flussrate [ml/min]	Laufzeit [min]
A [%]	B [%]		
80	20	1	0
50	50	1	18
95	5	1	20
95	5	1	25
80	20	1	27
80	20	1	37

14.8.1 Durchbruchskurve für Lactoferrin

Es wurden während der Auftragung alle 10 l Proben im Durchlauf genommen und mittels HPLC der Lactoferringehalt bestimmt. In Abbildung 14.8.1 ist die Durchbruchskurve für Lactoferrin während der Auftragung von Molkenpermeat auf die Kationenaustauschermembran dargestellt.

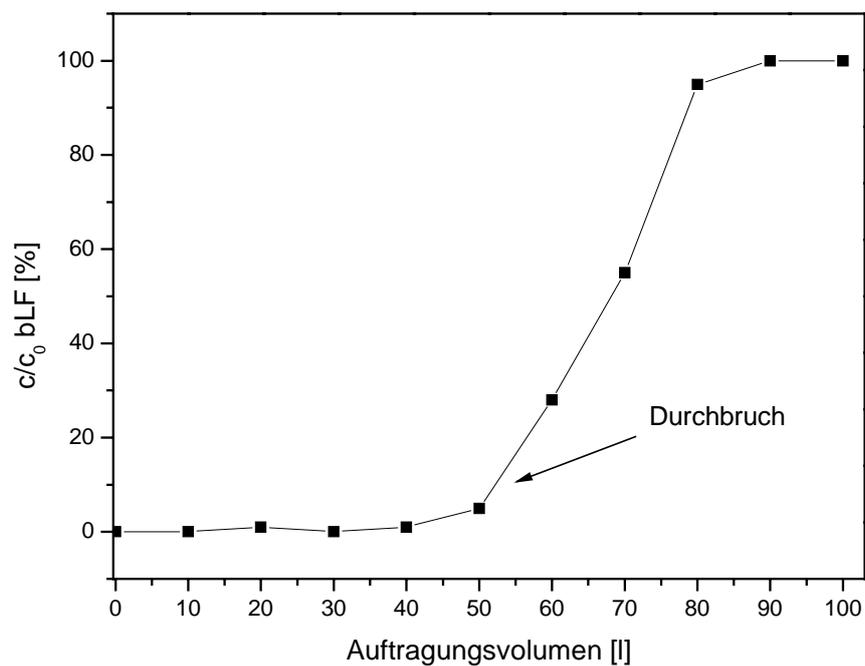


Abbildung 14.8.1: Durchbruchskurve für Lactoferrin; 4 m²- Adsorberanlage; Bestimmt mit HPLC

14.9 FPLC-Analytik

Die Abbildung 14.9.1 zeigt ein typisches Beladungs- und Elutionsprofil bei der Aufarbeitung von Lactoferrin und Lactoperoxidase aus Molkenpermeat mittels Membranadsorbertechnologie.

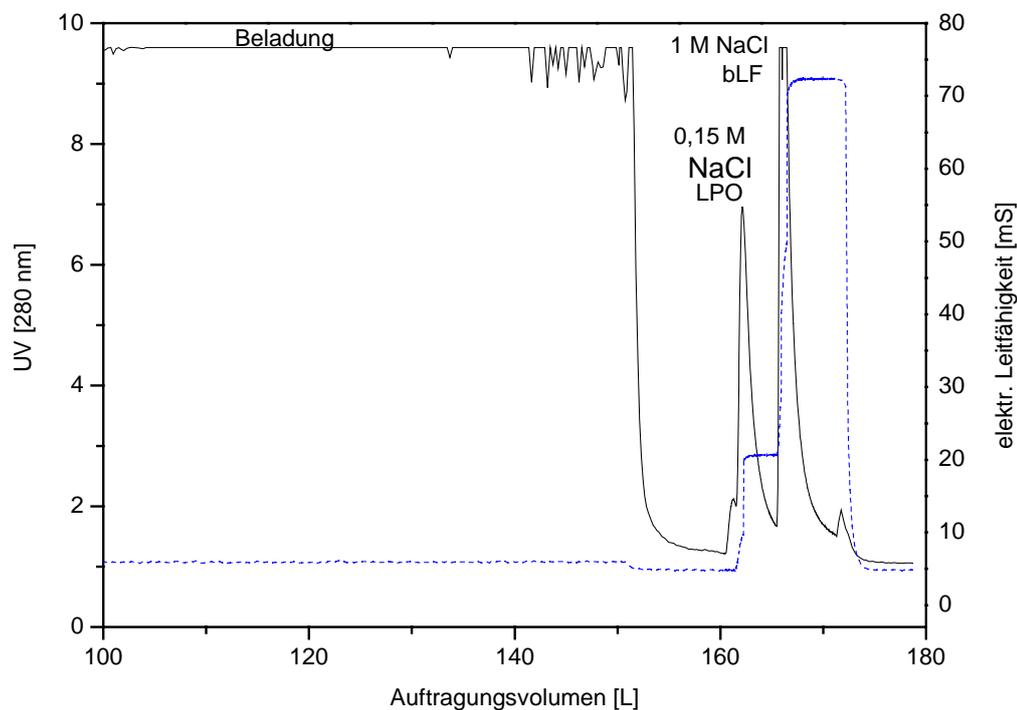


Abbildung 14.9: Beladungs- und Elutionszyklus an der automatisierten 4 m² Anlage

Die Auftrennung der Lactoferricin-Fraktion über Kationenaustauschermembran S-15 erfolgte mittels FPLC-Anlage. In der Tabelle 14.9.1 ist das Laufprogramm dargestellt.

Tabelle 14.9.1: Laufprogramm der FPLC-Analytik; A: 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7;
B: 0,4 M NaCl-Lösung; C: 2 M NH₄Cl-Lösung (1 M Ammoniumcarbonatpuffer)

Laufmittel	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]	Programmschritt
A	5	0,5	Probeninjektion
A	10	1	Elutoin
B	15	1	Elutoin
C	10	1	Elutoin

Die Entsalzung der Lactoferricin-Fraktion wurde mittels FPLC-Anlage (S-15 Membran) durchgeführt. Tabelle 14.9.2 zeigt das Laufprogramm.

Tabelle 14.9.2: Laufprogramm der FPLC-Analytik.

Laufmittel	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]	Programmschritt
Wasser (bidest.)	5	2,6	Probeninjektion
Wasser (bidest.)	6	2,3	Elution

14.10 Gelelektrophorese

Probenvorbereitung für SDS-PAGE:

Die Proteinproben wurden mit dem Probenpuffer (900 µl SDS-Puffer + 100 µl Mercaptoethanol) im Verhältnis 1:1 vermischt und im Heizblock auf 95°C für 5 min erhitzt. Nach kurzzeitigem Zentrifugieren waren die Proben einsatzfähig. Der optimale Proteingehalt pro Bande beträgt für eine Silberfärbung 0,01 µg Protein.

Chemikalien:

- Entfärber/Fixierer: 5 Teile H₂O, 5 Teile Ethanol, 1 Teil AcOH
- Farnes Reducer: 1 Spatelspitze Kaliumhexacyanoferrat (III), 1 Spatelspitze Natriumthiosulfat
- Formaldehyd
- 5 %ige Essigsäure
- Na₂CO₃-Lösung
- 0,1 %ige Silbernitratlösung

Durchführung:

- Gel 30 min in Entfärber/Fixierer legen
- Mit dest. H₂O 2 mal waschen
- 2,5 min in Farnes Reducer legen und die Lösung verwerfen
- Mit dest. H₂O 5 min waschen
- Waschschrte wiederholen bis das Gel völlig entfärbt ist
- 30 min in Silbernitrat-Lösung legen und die Lösung verwerfen
- 2 mal 30 s mit dest. H₂O waschen
- Mit Na₂CO₃-Lösung spülen und die Lösung verwerfen

- In Na₂CO₃-Lösung, 300 µl -500 µl Formaldehyd am Rand der Färbekammer zusetzen und warten bis braune Banden zu sehen sind, Lösung verwerfen
- 10 min in Essigsäure legen (Stoppen der Färbung)
- Lagerung in dest. H₂O

Verwendete Apparatur:

- Phast-SystemTM der Firma Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden

14.11 MALDI-MS

Gerät:

Es stand ein MALDI 3 Kompaktgerät der Firma Kratos Analytical, Manchester, zur Verfügung.

Probenpräparation für MALDI-MS:

Die Probenpräparation erfolgte nach der „Dried-droplet-Methode“. Dazu wurde auf die Probenplätze des MALDI-Slides 1 µL Matrixlösung aufgetragen. Nach dem Trocknen der Matrix wurde auf jeden Platz 1 µL der zu untersuchenden Proben-substanz aufgebracht. Die Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben sollte im Bereich von 1 mg/mL liegen. Abschließend wurde noch einmal 1 µL Matrixlösung aufgetragen. Nach dem Trocknen waren die präparierten Slides fertig und konnten in das MALDI-MS zur Messung eingeführt werden.

Kalibration für die MALDI-Messungen:

Es wurde eine externe Kalibration durchgeführt, d.h. eine Substanz mit bekanntem Spektrum wurde vor den Proben vermessen und mit Hilfe eines im MALDI-MS gespeicherten Referenz-Spektrums korreliert. Die Referenzsubstanz sollte zweckmäßigerweise eine ähnliche Molmasse haben wie die Probe (LFcin ~ 3.200 Da); in dieser Arbeit ist Insulin (5.800 Da) verwendet worden.

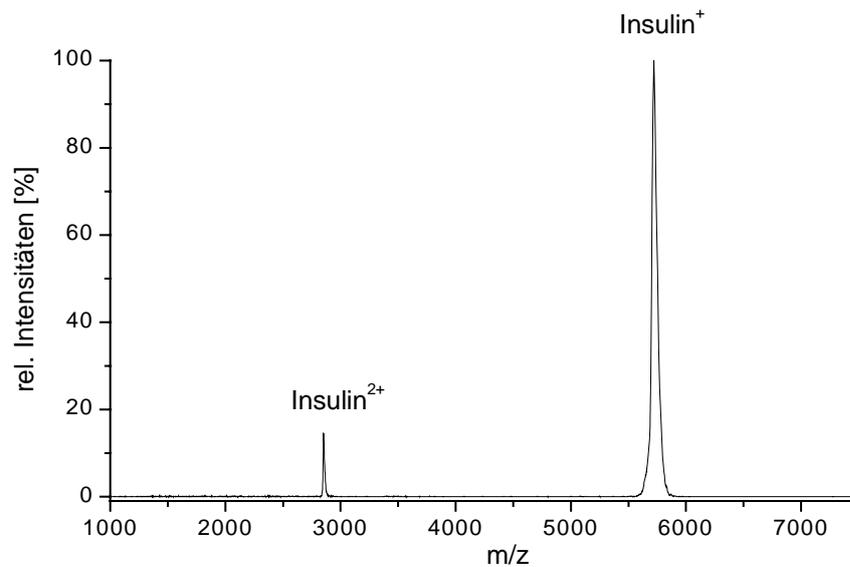


Abbildung 14.11.1: Kalibrationssubstanz Isulin (Fluka); MLDI-MS

Matrix:

α -Cyanozimtsäure 15 g/L gelöst in Acetonitril (ACN) mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) im Verhältnis 2:1 (v/v)

14.12 Ammonium-Test

Bei diesem Test werden 5 ml Probensubstanz mit NH_4 -1 Reagenz und einem gestrichenen Mikrolöffel NH_4 -2 Reagenz versetzt. Die NH_4^+ -Ionen reagieren mit einem Chlorierungsmittel zu Monochloramin. Dies bildet mit einer Phenolverbindung ein blaues Indophenolderivat, dessen Konzentration reflektrometrisch bestimmt wird. Die Proben werden mit Teststäbchen „Reflectoquant 5 – 20 mg/l“ vermessen. Dazu wird das Teststäbchen bei gleichzeitigem Druck des Startknopfes des Reflektometers der Fa. Merck KgaA in die zu untersuchende Probe für 4 min eingetaucht. 10 s vor Ende der Reaktionszeit wird das Teststäbchen bis zum Anschlag in die Meßkammer des Reflektometers eingeführt. Am Display wird der Messwert in mg/l NH_4^+ abgelesen und das Stäbchen aus der Meßkammer entfernt [73].

14.13 Verweilzeit – und Umsatzverhalten

Ermittlung der Verweilzeitverteilung und der Verweilzeitsummenkurve:

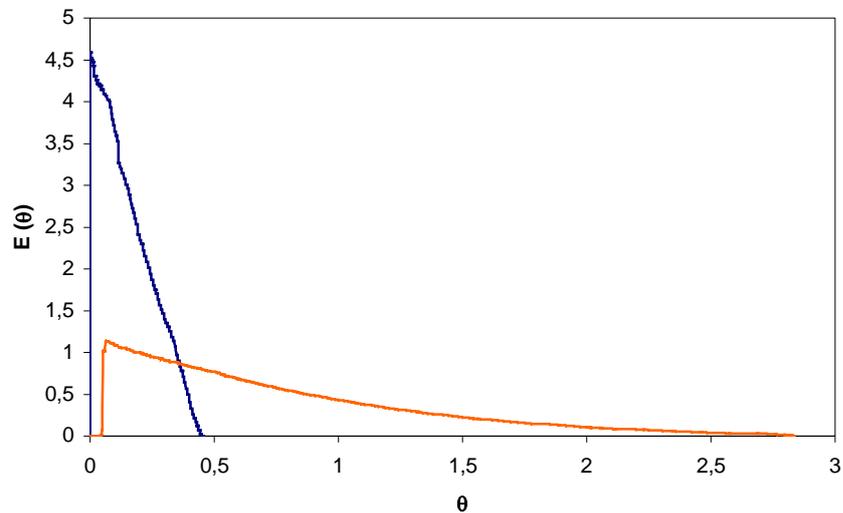


Abbildung 14.13.1: Vergleich der Verweilzeitverteilungen für Lactoferrin (blau) und Wasser (rot); [95]

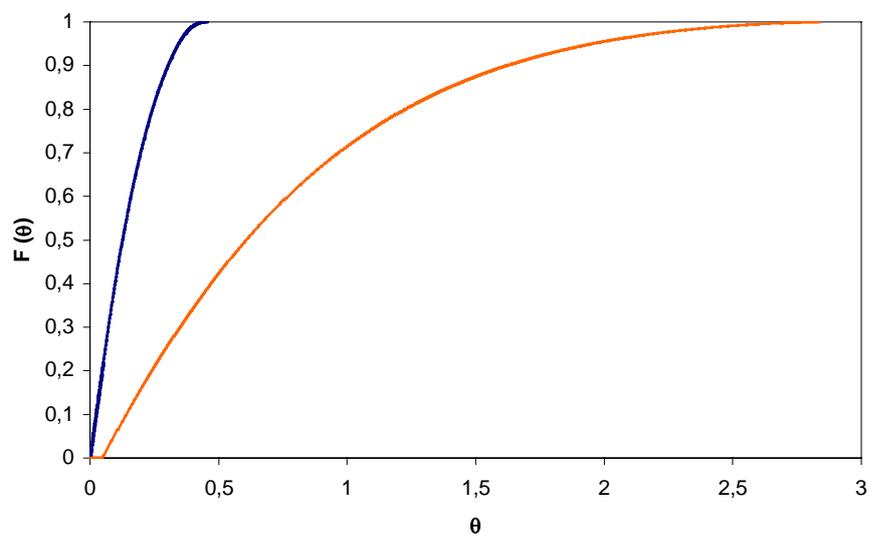


Abbildung 14.13.2: Vergleich der Verweilzeitsummenfunktionen für Lactoferrin (blau) und Wasser (rot); [95]

Der Umsatz wurde mit Hilfe der Formel $U = k^*t/(1 + k^*t)$ berechnet (Reaktion 1. Ordnung).

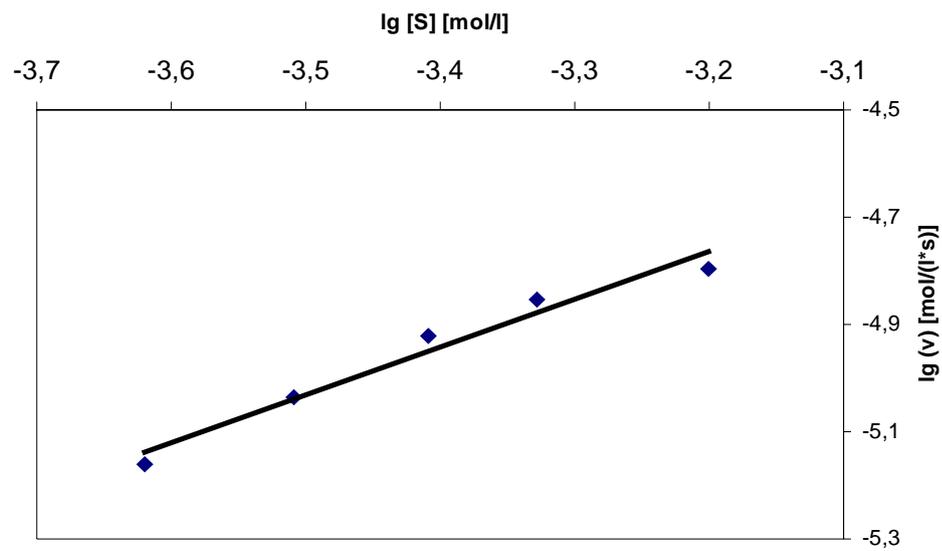


Abbildung 14.13.3: Grafische Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante (k); [95]

$$\log(k) = -1,913; k = 0,012 \text{ s}^{-1};$$

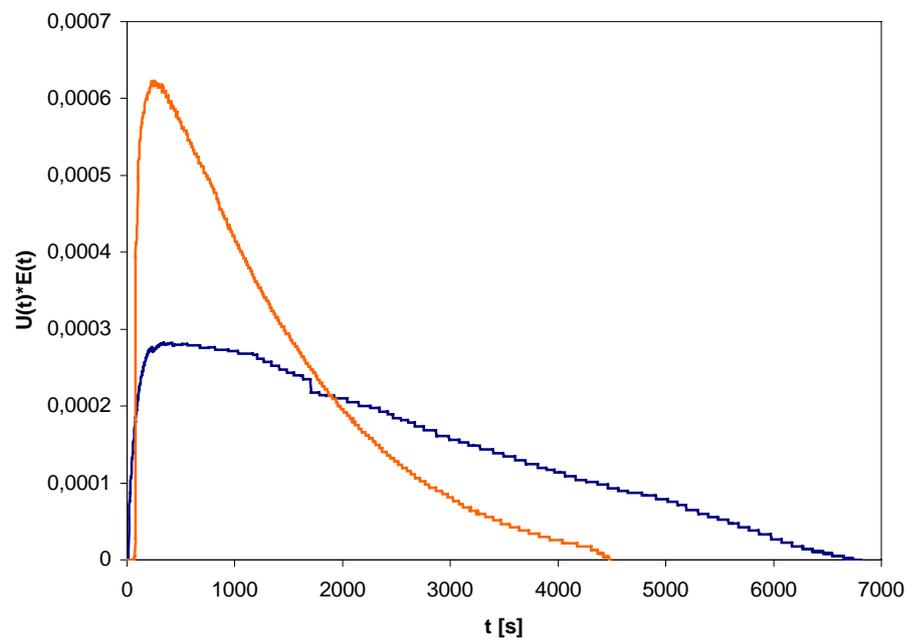


Abbildung 14.13.4: Vergleich des Umsatzverhaltens des CSTR für bLF (blau) und H₂O (rot); [95]

14.14 Kontinuierliche Gewinnung von Lactoferricin

Verwendete Geräte:

- pH-Stat-Anlage (Fa. Metrohm, Hiresau, Schweiz)
- 3 Schlauchpumpen 501 U (Fa. Watson Marlow, Rommerskirchen)
- 2 Sartoccon-Micro-Moduls (Fa. Sartorius, Göttingen)
- 2 Membranadsorber S 15 (Fa. Sartorius, Göttingen)
- Temperierbad Julabo UC (Fa. Jürgens, Schalksmühle)
- Temperierbad Thermomix ME (Fa. B.Braun, Melsungen)
- 2 Magnetrührer (Fa. Omnilab, Bremen)
- FPLC-Anlage (Fa. Bio Rad, München)

14.15 Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6))
BSA	Bovine Serum Albumin
bLF	Bovine Lactoferrin
c	Konzentration
ca.	Zirka
(CH ₃ CO) ₂ O	Essigsäureanhydrid
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DF	Durchflussrate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrarot
LFcin	Lactoferricin
LFcinH	Human Lactoferricin
LFcinB	Bovine Lactoferricin
LPO	Lactoperoxidase
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
MK	Molkenkonzentrat
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
m	Masse
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Mass Spectrometry

NaPP	Natriumphosphatpuffer
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
NaOH	Natronlauge
NaCl	Natriumchlorid
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
T	Temperatur
t	Zeit
UV/Vis	Ultraviolet/Visible
V	Volumen
WPC	Whey Proteine Concentrate

15 Literaturverzeichnis

- [1] BMVEL; Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft in Deutschland; Referat 425 (2005)
- [2] K. Bindseil; Weißbiotechnologie in der Region Berlin-Brandenburg; Journal der Biotechnologie in Berlin-Brandenburg, BioTOPics 28 (2006)
- [3] A. Stelling; Entwicklung und Bewertung einer Mikroalgen-Biokonversionsanlage zur Prozesswasseraufbereitung aus Biogasanlagen bei gleichzeitiger Produktion von Biomassen hoher Wertschöpfung; W&T Verlag (1999)
- [4] T. Happe, A. Hemschemeier; Grünalgen geben Gas-Photobiologische Wasserstoffproduktion durch Mikroorganismen; H₂-Tec 10 (2002) 12 – 16
- [5] F. Jakob, E. J. Jäger, E. Obermann; Botanik; Gustav Fischer Verlag Jena, 4. neu bearbeitete Auflage (1994)
- [6] H. Komaki, M. Yamashita, Y. Niwa, Y. Tanaka, N. Kamiya, Y. Ando, M. Furuse; The effect of processing of *Chlorella vulgaris*: K-5 on in vitro and in vivo digestibility in rats; Animal Feed Science and Technology 70 (4) (1998) 363
- [7] Zusatzstoffverordnung; Verordnung des EDI über die in Lebensmitteln zulässigen Zusatzstoffe, Fassung vom 27.03.02; Eidgenössische Departement des Innern (2002)
- [8] N. Hagino, S. Ichimura; Effect of chlorella on fecal and urinary cadmium excretion in "Itai – Itai" disease; Nippon Eiseigaku Zasshi 30 (1975) 77
- [9] K. Plate; Großtechnische Gewinnung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke unter Verwendung von Membrantechnologie; Dissertation, Hannover (2003)
- [10] C. Hoek, H.M. Jahns, D. G. Mann; Algae; University Press: Cambridge (1995)
- [11] E. Kessler, V. A. R. Huss; Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* strains of the culture collection of the university of texas at austin; J. Phycol. 28 (1992) 550
- [12] E. Kessler; Comparative Physiology, Biochemistry and the taxonomy of *Chlorella*; Plant. Syst. Evol. (1976) 129
- [13] M. Gabel; Gutachten über den Proteinwert der Mikroalgen – Biomasse der Firma Ökologische Produkte Altmark GmbH Universität Rostok, Agar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät; Fachbereich Agrarökologie (2000)

- [14] K. Yasukawa, T. Akihisa, H. Kanno, T. Kaminaga, M. Izumida, T. Sakoh, T. Tamura, M. Takido; Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate – induced inflammation and tumor promotion in mouse skin; *Biol. Pharm. Bull.* 19(4) (1996) 573
- [15] T. Morimoto, A. Nagatsu, N. Muratami, J. Sakakibara, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima; Anti-tumor-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*; *Phytochemistry* 40(5) (1995) 1433
- [16] K. Tanaka, F. Konishi, K. Hemeno, K. Taniguchi, K. Nomoto; Augmentation of antitumor resistance by strain of unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*; *Cancer Immunol. Immunother.* 17 (1984) 90
- [17] K. Okamoto, Y. Lizuka, T. Murakami, H. Miyake, T. Suzuki; Effects of chlorella alkali extract on blood pressure in SHR; *Jpn. Heart J.* 19(4) (1978) 662
- [18] T. Murakami; Effekt of heterotrophy *Chlorella* on blood pressure and development of appoplexy in hypertensive rats; Agricultural-Chemical Convention in Sendai, Japan March 30 (1983)
- [19] L. Travieso, R. Canizares, R. Borja, A. Dominguez, R. Dupeyron, R. Valient; Heavy metal removal by microalgae; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62(2) (1999) 144
- [20] A.M. Chong, Y. Wong, N. Tam; Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater; *Chmosphere* 41(1-2) (2000) 251
- [21] S. Krihnamurthy, R. Frederick; Using biopolymers to remove heavy metals from soil and water; *Govt. Reports Announcements & Index (GRA&I)* 13 (1994)
- [22] R.H. Christ et al.; Nature of Bonding of Metallic Ions and Algal Cell Walls; *Environ. Sci. & Technol.* 20 (1981) 206
- [23] F.J. Sloan, A.R. Abernathy, J.C. Jennet, G.V. Goodman; Removal of Metal Ions from Waste Water; *Proc. 38th Purdue Ind. Waste Conf.* (1993) 423 – 428
- [24] P.R. Zimnik, J. Sneddon; Binding and Removal of Aluminium Ions in Waters by an Algal Biomass; *J. Anal. Lett.* 21(8) (1988) 1383
- [25] J.M. Hasset, J.C. Jennet, J.E. Smith; Heavy Metal Accumulation by Algae; In *Contaminants and Sediments*, R.A. Baker, Ann Arbor, MI: An Arbor Science Publishers (1980)
- [26] S. Herminghaus et al.; The Occurrence of Phenols as Degradation Products of Natural Sporopollenin – a Comparison with “Synthetic Sporopollenin”; *Z. Natur-*

forsch. 43 (1988) 491 – 500

- [27] A.W. Atkinson et al. ; Sporopollenin in the Cell Wall of *Chlorella* and Other Algae: Ultrastructure, Chemistry, and Incorporation of ^{14}C -Acetate, Studied in Synchronous Cultures ; *Planta Berl.* 107 (1972) 1 – 32
- [28] F. Ahlers, J. Thom, R. Lambert, R. Kuckuk, R. Wiermann; ^1H – NMR analysis of sporopollenin from *Typha angustifolia*; *Phytochemistry* 50 (1999) 1095 – 1098
- [29] S. Gubatz, H. Luftmann, R. Wiermann; Hydrocarbons associated with the developing microspores in the anther locus of *Tulipa*; *Bot. Acta* 111 (1998) 291 – 296
- [30] C. Jungfermann, F. Ahlers, M. Grote, S. Gubanz, S. Steuernagel, R. Wierman; Solution of sporopollenin and reaggregation of a sporopolleninlike material: A new approach in the sporopollenin research; *Plant Physiol.* 151 (1997) 513 – 519
- [31] I. Thom, M. Grote, J. Abraham-Peskir, R. Wiermann; Electron and X-ray microscopic analyses of reaggregated materials obtained after fractionation of dissolved sporopollenin; *Protoplasma* 204 (1998) 13 – 21
- [32] F. Ahlers et al.; The nature of oxygen in sporopollenin from the pollen of *Typha angustifolia*; *Z. Naturforsch.* 55c (2000) 129 – 136
- [33] F. Ahlers et al.; Structural elements of sporopollenin from the pollen of *Typha californica* Torr. (Gymnospermae): using the ^1H -NMR technique; *Z. Naturforsch.* 54c (1999) 492 – 495
- [34] A.R. Hemsley, P.J. Barrie, W.G. Chaloner, A.C. Scott; The composition of Sporopollenin and its use in living and fossil plant systematics; *Grana, Suppl.* 1 (1993) 2-11
- [35] S. Wilmesmeier, S. Steuernagel, R. Wiermann; Comparative Ft-IR and ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopic investigations on sporopollenin of different systematic origins; *Z. Naturforsch.* 48c (1993) 697-701
- [36] W.J. Guilford, D.M. Schneider, J. Labowitz, S.J. Opella; High resolution solid state ^{13}C -NMR of sporopollenin from different plant taxa; *Plant Physiol.* 86 (1988) 134-136
- [37] G. Erdman; The Acetolysis method; *Svensk. Bot. Tidskr.* 54 (1960) 561 – 564
- [38] MIV Milch und Markt Informationsbüro der deutschen Milchindustrie; Die deutsche Milchindustrie – Zahlen und Fakten, Informationsbroschüre (2005)
- [39] E. Schlimme, W. Buchheim; Milch und ihre Inhaltsstoffe, Chemische und physikalische Grundlagen; Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen (1995)

- [40] B. Reiter; The biological significance and exploitation of the non-immunoglobulin protective proteins in milk: Lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase, Xanthinoxidase; IDF Bull., 191 (1985) 2
- [41] M.L. Groves; Preparation of some iron-binding proteins and lactalbumin from bovine milk; Biochim. Biophys. Acta 100 (1965) 154
- [42] B. Johansson; Isolation of an iron-containing red protein from human milk; Act Chem Scan 14 (1960) 510 – 512
- [43] J. H. Brock; The physiology of lactoferrin; Biochem. Cell Biol. 80 (2002) 1 – 6
- [44] A.S. Naidu; Lactoferrin : Natural, Multifunctional, Antimicrobial; CRC Press, Boca Raton, Florida, USA (2002)
- [45] H.J. Vogel, D.J. Schibli, W. Jing, E. Lohmeier-Vogel, R. Epand; Towards a structure–function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides; Biochem. Cell Biol. 80 (2002) 49–63
- [46] J.M Steijns, A.C.M. van Hooijdonk; Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin; Br. J. Nutr. 84 (2000) 11 – 17
- [47] P.L. Masson, J.F. Heremans; Lactoferrin in Milk from different species; Comp. Biochem. Physiol. 39 (1971) 119
- [48] M. Tomita; Biological functions of Lactoferrin, Basic research and application; Informationsblatt Morinaga Milk Industry Co. Japan (1997)
- [49] C. Muri, T. Schottstedt, H. M. Hammon, E. Meyer, J. W. Blum; Hematological, Metabolic, and Endocrine Effects of Feeding Vitamin A and Lactoferrin in Neonatal Calves; J. Dairy Sci. 88 (2005) 1062-1077
- [50] R.H. Yu, A.B. Schryvers; Bacterial lactoferrin receptors: insight from characterizing the *Moraxella bovis* receptors; Biochem. Cell Biol. 80 (2002) 81-90
- [51] F.A. Fonteh, A. Grandison, M. Lewis; Variation of Lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cows' and goats' milk throughout lactation; J. of Dairy Research 69 (2002) 401-409
- [52] S.M.E. Gorissen; Der Einsatz von Lactoferrin und Epigallocatechingallat in der Prophylaxe parodontaler Erkrankungen der Katze; Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München (2004)
- [53] J. Schwarzer; Einfluss probiotischer Substanzen auf den antioxidativen Status von neugeborenen Hundewelpen; Vet. Med. Dissertation, München (2004)

- [54] A.A. Al-Nabulsi, R.A. Holley; Enhancing the antimicrobial effects of bovine lactoferrin against *Escherichia coli* O157:H7 by cation chelation, NaCl and temperature; *J. of Applied Microbiology* 100(2) (2006) 244-255
- [55] Larkins, N., Potential implications of lactoferrin as a therapeutic agent, *J. of Veterenary Research*, Vol. 66, (4), 739-742, 2005
- [56] P. Valenti, G. Antonini; Lactoferrin: a important host defence against microbial and viral attack; *CMLS* 62(22) (2005) 2576-2587
- [57] P.F. Laur; Wirkung von Lactoferrin auf den Organismus neonataler Hundewelpen; Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilian Universität München (2003)
- [58] L. Beljaars et al.; Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo; *Antiviral Research* 63 (2004) 197-208
- [59] E. N. Baker; Lactoferrin: A multi-tasking protein par excellence; *CMLS* 62(22) (2005) 2529-2530
- [60] T. Takeuchi, H. Shimizu, K. Ando, E. Harada; Bovine lactoferrin reduces plasma triacylglycerol and NEFA accompanied by decreased hepatic cholesterol and triacylglycerol contents in rodents; *J. Nutrition* 91(4) (2004) 533-538
- [61] M.T. Andres, M. Viejo-Diaz, F. Perez, J.F. Fierro; Antibiotic Tolerance Induced by Lactoferrin in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients; *AAC* 49(4) (2005) 1613-1616
- [62] P.F.E. Monsan, P. Thilbault, C. Brossard, C.S.J. Bruvier; Extraction of milk proteins and manufacture of pharmaceuticals products; German Patent DE 3,623,474, (1987)
- [63] M.L. Groves; Preparation of some iron-binding proteins and α -lactalbumin from bovine milk; *Biochem. Biophys. Acta* 100 (1965) 154
- [64] G.L. Francis, G.O. Regester, H.A. Webb, F.J. Ballard; Extraction from Cheese Whey by Cation-Exchange Chromatography of Factors that Stimulate the Growth of Mammalian Cells; *J. Dairy Sci.* 78 (1995) 1209
- [65] K. Plate, T. Weis, D. Steuber, H. Buchholz, W. Demmer, R. Ulber, T. Scheper; Wertschöpfende Aufarbeitung von Molke – Isolierung von Lactoferrin und Lactoferricin über Membranadsorber; *Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe* „Biokonversion nachwachsender Rohstoffe; 15 (2000) 203

- [66] R. Ulber, K. Plate, T. Weiss, H. Buchholz, W. Demmer, T. Scheper; Downstream Processing of Bovine Lactoferrin from Sweet Whey; *Acta Biotechnol.* 21 (2001) 27
- [67] K. Plate, H. Buchholz, W. Demmer, R. Ulber, T. Scheper; Gewinnung von bovinem Lactoferrin aus Molke über Membranadsorber; *CIT* 73(7) (2001) 898
- [68] K. Plate, R. Ulber, T. Scheper, W. Demmer, H. Buchholz; Wertschöpfende Aufarbeitung von Molke – Gewinnung von Lactoferrin über Membranadsorber; in: W. Naundorf, U. Straßburger, H.-W. Schröder (Eds.); *Stoffliche Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen*; Technische Universität Bergakademie Freiberg (2002)
- [69] K. Plate, W. Demmer, H. Buchholz, R. Ulber, T. Scheper; Recovery of bovine lactoferrin by ion exchange membran adsorption; in: *The Importance of Whey and Whey Components in Food and Nutrition*; B. Behr's Verlag GmbH Hamburg (2002) 103-108
- [70] R. Ulber, K. Plate O.-W. Reif, D. Melzner; Membranes for Protein Isolation and Purification; in: R. Hatti-Kaul, B. Mattiason; *Isolation and Purification of Proteins*; Marcel Decker, New York (2003) 191-224
- [71] W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, M. Tomita; Identification of the bactericidal domain of lactoferrin; *Biochim. Biophys. Acta* 1121 (1992) 130
- [72] I. Recio, S. Visser; Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin; *J. Chromatogr. A.* 831 (1999) 191
- [73] H. Roginski, J. Fuquay, P. Fox; *Encyclopedia of dairy sciences*; H-M1.Auflage (1) Cornwall: MPG Books (2003)
- [74] J.L. Gifford, H.N. Hunter, H.J. Vogel; Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties; *CMLS* 62(22) (2005) 2588-2598
- [75] H. Jenssen, J.H. Adersen, L. Uhlin-Hansen, T.J. Gutteberg, Ö. Rekdal; Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulphate; *Antiviral Research* 61 (2004) 101-109
- [76] Ch. Prgomet, S. Peters, M.-W. Pfaffl; Influence of bovine lactoferrin and lactoferricin on cytokine expression in LPS-treated cultivated bovine blood cells; *J. of the Science of Food and Agriculture* 86(4) (2006) 640-647
- [77] H. Kuwata, T. Yip, M. Tomita, T.W. Hutchens; Direct evidence of the generation

- in human stomache of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin; *Biochim. Biophys. Acta* 1429 (1998) 129
- [78] O. Aguilera, H. Ostolazac, L.M. Quiro, J.F. Fierroa; Permeabilizing action of an antimicrobial lactoferricin-derived peptide on bacterial and artificial membranes, *FEBS Letters* 462 (1999) 273-277
- [79] H.H. Haukland, H. Ulvatne, K. Sandvik, L.H. Vorland; The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm; *FEBS Letters* 508 (2001) 389-393
- [80] K. Shin, K. Yamauchi, S. Teraguchi, H. Hayasawa, M. Tomita et al.; Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7; *Letters in Applied Microbiology* 26 (1998) 407 – 411
- [81] M. Tomita; A process for large-scale production of antimicrobial peptide in high, European Patent Application EP 0 519 726 A2 (1992)
- [82] L. Stryer; *Biochemie*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1991)
- [83] U. Ruffer; Einflussfaktoren auf die IGF-1-Konzentrationen in Viertelanfängsgemelksproben von Kühen mit unterschiedlicher Eutergesundheit – eine Feldstudie, Dissertation, Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (2003)
- [84] R. Ulber; *Biologische Methoden zur effizienteren Rohstoffnutzung*; Habilitationsschrift, Universität Hannover (2002)
- [85] K. Bake et al.; *Tetra Pak-Handbuch der Milch- und Molkereitechnik*, 1. Auflage, Th. Mann GmbH & Co. KG, Gelsenkirchen (2003)
- [86] S. Fischer-Frühholz; *Membranadsorber*, GIT Labor – Fachzeitschrift, GIT Verlag GmbH & Co. KG, Darmstadt (2004) 603 – 605
- [87] T. Weiss; *Neue Membrantechnologien zur Isolierung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke – Methodenentwicklung für den industriellen Einsatz*, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover (1999)
- [88] M. Cheryan; *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*; Technomic Publishing Company, Basel (1998)
- [89] A.S. Gradison, M.J. Lewis; *Separation processes in the food and biotechnology industries*; Woodhead Publishing Limited, Cambridge (1996)

- [90] M. Jakubith; Chemische Verfahrenstechnik; VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim (1991)
- [91] Angaben der Biolac GmbH & Co.KG, Harnbarnsen (2006)
- [92] J.N. De Wit, A.C.M. Van Hooydonk; Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems; Netherlands Milk Dairy 50 (1996) 227
- [93] J. Pütter, R. Becker; Peroxidases, in: Methods of Enzymatic Analysis; Verlag Chemie, 3. Edition, (1983) 286 – 293
- [94] T. Scheper; Bioprozesstechnik; Vorlesungsskript, Institut für Technische Chemie (2000)
- [95] J. Aschemann; Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens zur Herstellung von Lactoferricin aus bovinem Lactoferrin; Diplomarbeit, Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Kaiserslautern (2005)
- [96] Patent Cooperation Treaty, PCT; WO 03/003835 A1; Method for controlling the yield and purity of proteinaseinhibitor II during extraction; 16.01.2003
- [97] Solutions in Milling & Sieving; Retsch GmbH, <http://www.retsch.de>, 15.01.2006
- [98] M. Walden; Aufbau einer Qualitätskontrolle für die isolierten Molkenproteine Lactoferrin und Lactoperoxidase, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover (1999)
- [99] M. Tomita; Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications, Nutritionals Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Japan (2001)
- [100] B. Benecke; Einfluss der Temperatur auf die Langzeitstabilität von Sartobind S-Membranen bei der Gewinnung von hochwertigen Minorkomponenten aus Dünnmolke; Schwerpunktarbeit, Universität Hannover (2005)
- [101] E.L. Brained; Caught in the crossflow; J. Nature 412 (2001) 397 – 398
- [102] Enzymdatenbank der Universität Köln; <http://www.brenda.uni-koeln.de>, 25.11.2005
- [102] M. Baerns, H. Hoffmann, A. Renken; Chemische Reaktionstechnik; 3. Auflage, Stuttgart (1999)
- [103] P.W. Atkins; Physikalische Chemie; 2. Auflage, Weinheim (1997)