

**Membranmodule im Mikrolitermaßstab**  
Anwendungen als Membranreaktor und zur  
Isolierung von Glykoproteinen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte  
DISSERTATION

von  
Dipl.-Chem. Daniela Harkensee  
geboren am 30. September 1977 in Osterholz-Scharmbeck

2007

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Roland Ulber

Tag der Promotion: 14. Dezember 2007

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und die benutzten Hilfsmittel, sowie eventuell zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsleistung verwendet worden ist.

Hannover, Oktober 2007

Daniela Harkensee

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind bereits zum Teil veröffentlicht worden.

## Publikationen

### Artikel in Fachzeitschriften

D. Harkensee, S. Beutel, M. Young, R. Ulber; *Development of a bioanalytical system for the measurement of polyphenols in grapes*; CIT, 77, (2005), S. 1960-1964

D. Harkensee, S. Beutel, M. Young, R. Ulber; *Development of a fast spectroscopic enzyme assay for on-site measurement of total polyphenol content in grapes and wine*; Anal. Bioanal. Chem., 384, (2006), S. 1013-1018

Ö. Kökpinar, D. Harkensee, C. Kasper, T. Scheper, R. Zeidler, O.-W. Reif, R. Ulber; *Innovative modular membrane adsorber system for high-throughput downstream screening for protein purification*; Biotechnol. Prog., 22, (2006), S. 1215-1219

D. Harkensee, Ö. Kökpinar, J. Walter, C. Kasper, S. Beutel, O.-W. Reif, T. Scheper, R. Ulber; *Fast screening for the purification of proteins using membrane adsorber technology*; Eng. Life Sci., 7, (2007), S. 388-394

### Vorträge

D. Harkensee, M. Young, R. Ulber; *Photometric biosensor for the determination of polyphenols in grapes*; BioPerspectives - DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (2004), Wiesbaden, Deutschland

S. Beutel, D. Harkensee, M. Young, R. Ulber; *Entwicklung eines bioanalytischen Feldgerätes zur Messung von Polyphenolen in Weintrauben*; 12. Heiligenstädter Kolloquium (2004), Heiligenstadt, Deutschland

D. Harkensee, Ö. Kökpinar, S. Beutel, T. Scheper, O.-W. Reif, R. Ulber; *Reversible immobilisation of glycoproteins on (biological) activated membranes*; BioPerspectives - DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (2005), Wiesbaden, Deutschland

D. Harkensee, S. Beutel, T. Scheper, O.-W. Reif, R. Ulber; *Screening of enzyme reactions in membrane fixed-bed reactors in  $\mu$ L-scale* DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (2006), Wiesbaden, Deutschland

## Posterpräsentationen

D. Harkensee, T. Scheper, O.-W. Reif, R. Ulber; *(Bio-)Modifizierte Membranmodule im Downstreaming Prozess*; DECHEMA-Tagung: Simultane und integrierte Bioprozeßentwicklung (2004), Eisenach, Deutschland

S. Beutel, D. Harkensee, M. Young, R. Ulber; *Development of a bioanalytical method for quantitative measurement of polyphenols from grapes*; Chile Biotechnology (2004), Santiago, Chile

Ö. Kökpınar, F. Anton, D. Harkensee, C. Kasper, R. Zeidler, O.-W. Reif, R. Ulber, T. Scheper; *Modular membrane adsorber based system for protein purification* ECI - Cell Culture Engineering X (2006), Whistler, Canada

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2003 bis September 2006 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover und an der Technischen Universität Kaiserslautern im Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik unter der Leitung von Prof. Dr. Roland Ulber von der Universität Kaiserslautern durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Prof. Dr. Ulber für die Themenstellung sowie die gebotenen guten Arbeitsmöglichkeiten und die gute Betreuung bedanken.

Prof. Dr. Thomas Scheper möchte ich für die Übernahme des Referates danken und für die Möglichkeit, meine praktischen Arbeiten in Hannover zuende zu führen.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Sascha Beutel, der mir mit vielen guten Anregungen und Tipps, wann immer ich sie brauchte, zur Seite stand. Weiterhin möchte ich ihm für die Mühen des Korrekturlesens danken, nicht nur in Bezug auf diese Arbeit, sondern auch für all die anderen Dinge, die er in den vergangenen Jahren gelesen und korrigiert hat.

Prof. Dr. Bernd Hitzmann möchte ich für die Unterstützung bei der Bewältigung mathematischer Probleme danken und dafür, dass er die Geduld aufgebracht hat, mir Dinge solange zu erklären, bis sie mir verständlich waren.

Darüber hinaus möchte ich Martina Weiß für die vielen guten Ratschläge danken, die mir bei der Umsetzung meiner Versuche sehr geholfen haben, sowie Thorleif Hentrop, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn Fragen einen Stecker hatten. Ein Dankeschön geht auch an die Feinmechanik-Werkstatt.

Die „Bewohner“ des TCI-Altbaus sollen nicht unerwähnt bleiben. Viele verschiedene Gründe rechtfertigen eine Erwähnung und einen Dank, ja machen ihn notwendig. Sei es die gute Stimmung in Büro, Labor und Kaffeepause; die guten Tipps in Bezug auf Geräte und Versuche oder dass sie sich ganz ohne zuckerhaltige Bestechungen zum Korrekturlesen bereit erklärt haben.

Zu guter Letzt möchte ich all Jenen danken, die hier im Verborgenen geblieben sind und die trotzdem aus vielen unterschiedlichen Gründen wichtig für mich waren und sind.



## Zusammenfassung

Daniela Harkensee

### **Membranmodule im Mikrolitermaßstab**

Anwendungen als Membranreaktor und zur Isolierung von Glykoproteinen

In dieser Arbeit werden Anwendungen für neuartige Membranadsorber-Module beschrieben. Durch die Integration in eine Modulform, die in Tischzentrifugen prozessiert werden kann, ist der Anwendungsmaßstab gegenüber bisherigen Adsorber-Modulen stark verkleinert. Es wird gezeigt, wie Membranadsorber, die durch Epoxy- oder metallchelatisierende Iminodiacetat-Gruppen vor-funktionalisiert sind, modifiziert werden, um sie zwei verschiedenen Anwendungen zugänglich zu machen. Eines dieser Gebiete umfasst die Bindung glykosilierter Proteine. Dazu erfolgt die Modifizierung der Membranadsorber durch das Lektin Concanavalin A. Der Einfluss verschiedener Bindungsparameter auf die Bindungskapazitäten der Membranen für Con A wird untersucht. Für die Isolierung von Glykoproteinen ist die Aktivität der Con A-Moleküle von Bedeutung. Am Beispiel des Modellproteins Glukoseoxidase wird das Bindungsvermögen der hergestellten Con A-Membranen bestimmt und die Elutionsbedingungen optimiert. Weiterhin wird die Isolierung von GOD aus Kultivierungsmedien untersucht und die Möglichkeiten betrachtet, die Membranen zur Isolierung glykosilierter Proteine aus Molke einzusetzen.

Die zweite Anwendung nutzt die Module als Membran-Festbettreaktor, einem sogenannten Kontaktor. Es werden ausschließlich IDA-aktivierte Module verwendet. Diese Anwendung setzt die Optimierung der Immobilisierung von Enzymen voraus. Es wird gezeigt, wie in den Modulen im Mikrolitermaßstab Reaktionsbedingungen optimiert werden können. Das Scale up auf kontinuierlich arbeitende Module ermöglicht zusätzlich die Bestimmung kinetischer Parameter und einen Vergleich beider Modulformen.

Die eingesetzten Module können deutliche Zeiteinsparungen bei der Entwicklung von Prozessen bewirken, da sie in einer Tischzentrifuge verwendet werden. Die parallele Behandlung einer Vielzahl von Proben ist in wenigen Minuten möglich, beispielsweise zur Optimierung von Bindungsbedingungen von Proteinen. Durch die Modifizierung mit biologischen Komponenten können sie individuell angepasst werden. Sowohl die Isolierung von Proteinen, als auch der Einsatz als Membranreaktor, bei dem durch immobilisierte Enzyme Reaktionen katalysiert werden, sind möglich.

#### Stichworte:

Membranadsorber, Protein-Immobilisierung, Glykoproteine, Membranreaktor

## Abstract

Daniela Harkensee

### **Membrane modules in micro-liter scale**

Applications as membrane reactor and for isolation of glycoproteins

In this thesis, applications for a new type of membrane adsorber modules are described. By integration of membranes in a module type which can be processed in a microcentrifuge, the process scale was minimized in comparison to the usually used membrane adsorber modules. The membranes used in this work are pre-activated with epoxy-groups or metal chelating iminodiacetic acid groups. They are modified to use them afterwards in two different kinds of application.

One application is the binding of glycosylated proteins. Membranes are modified by the lectin Concanavalin A. The effect of the variation of different binding parameters on the binding capacities for Con A was investigated. The activity of the Con A molecules are important for the isolation of glycoproteins. Glucose oxidase was used as a model protein for determination of the binding capacities of the prepared membranes and for optimization of the elution conditions. The isolation of GOD from fermentation media was studied. Furthermore the potential of the membrane for isolation of glycosylated proteins from whey was investigated.

In the second field of application the modules are used as membrane fixed-bed reactors, precisely as contactors. IDA-activated membranes were used for membrane reactors only. For this application the previous optimization of the enzyme immobilization is essential. It is shown, that reaction conditions can be optimized by using membrane modules in micro-liter scale. In addition, the scale up to continuously working modules enables the determination of kinetic parameters. The results of enzymatic reactions are compared for both types of modules.

The type of membrane modules used in this study can be processed in a microcentrifuge and multiple parameters like binding conditions can be tested in parallel in a few minutes. This can lead to time savings during process development. Due to modification with biological components the modules can be adapted to different applications. The isolation of proteins is also possible as the application as membrane fixed-reactors with immobilized enzymes for catalysis.

#### Keywords:

membrane adsorber, protein immobilization, glycoproteins, membrane reactor

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>10</b>
2.1	Separationsverfahren für biotechnologisch hergestellte Produkte . . .	10
2.1.1	Chromatographische Methoden . . . . .	10
2.1.1.1	Anwendung chromatographischer Trennverfahren in der Biotechnologie . . . . .	10
2.1.1.2	Scale up von chromatographischen Verfahren . . . . .	12
2.1.1.3	Affinitätschromatographie . . . . .	13
2.1.1.4	Metall-Chelat-Chromatographie . . . . .	14
2.1.2	Filtration . . . . .	15
2.2	Einsatz von Enzymen in industriellen Prozessen . . . . .	16
2.3	Membranverfahren in der Biotechnologie . . . . .	17
2.3.1	Aufreinigung von Biomolekülen durch Membranverfahren . . . . .	17
2.3.2	Membranreaktoren . . . . .	18
2.3.3	Vorteile von membranbasierten Verfahren gegenüber konventionellen Partikeln . . . . .	19
<b>3</b>	<b>Modifikation von Membranen durch biologische Komponenten</b>	<b>21</b>
3.1	Aufbau von Membranadsorbern . . . . .	21
3.2	Aktivierungsvarianten . . . . .	22
3.2.1	Aldehydaktivierte Membranen . . . . .	22
3.2.2	Epoxyaktivierte Membranen . . . . .	23
3.2.3	Metallchelatisierende Membranen . . . . .	23
3.3	Verwendete Membranen und Modulformen . . . . .	24
3.4	Concanavalin A . . . . .	27
3.5	Immobilisierung von Concanavalin A . . . . .	27
3.5.1	Immobilisierung von Con A an Epoxymembranen . . . . .	27
3.5.1.1	Vorversuche mit BSA . . . . .	28
3.5.1.2	Untersuchungen zum Einfluss des Bindungspuffers bei der Immobilisierung von Con A . . . . .	29

3.5.1.3	Optimierung der Con A-Immobilisierung in Natriumacetatpuffer . . . . .	31
3.5.2	Immobilisierung von Con A an IDA-Membranen . . . . .	35
3.5.3	Immobilisierung von Con A an Aldehydmembranen . . . . .	38
3.6	Immobilisierung von Enzymen an metallchelatisierenden Membranen . . . . .	39
3.6.1	Modellenzyme zur Immobilisierung an IDA-Membranen . . . . .	40
3.6.2	Bestimmung der optimalen Bindungsbedingungen für Enzyme an IDA-Spinmodule . . . . .	40
3.6.3	Einfluss der aufgegebenen Proteinkonzentration auf die Proteinimmobilisierung . . . . .	44
3.6.4	Lokalisierung der immobilisierten Proteine innerhalb der Spinmodule . . . . .	46
3.6.5	Elutionsverfahren . . . . .	47
3.7	Zusammenfassung . . . . .	49
<b>4</b>	<b>Aufreinigung von Glykoproteinen</b> . . . . .	<b>51</b>
4.1	Bindung von GOD an Con A-beladene Spinmodule . . . . .	51
4.1.1	Con A-Epoxy-Membranen zur Immobilisierung von Glykoproteinen . . . . .	51
4.1.1.1	Einfluss der Con A-Immobilisierungspuffer auf das Bindungsvermögen für Glukoseoxidase . . . . .	51
4.1.1.2	Elution von gebundenen GOD-Molekülen . . . . .	53
4.1.1.3	Mehrfache Immobilisierung von GOD an Con A-Epoxy-Spinmodulen - Wiederverwendbarkeit der modifizierten Module . . . . .	54
4.1.2	Bindung von GOD an Con A-IDA-Membranen . . . . .	56
4.1.2.1	Einfluss der Metallionenbeladung von Con A-IDA-Membranen auf die Bindung von Glukoseoxidase . . . . .	56
4.1.2.2	GOD-Elution von Con A-IDA-Membranen . . . . .	58
4.1.2.3	Wiederholte Immobilisierung von GOD an Con A-IDA-Membranen . . . . .	60
4.1.3	Vergleich der Con A-Membranen auf Epoxy- und IDA-Basis . . . . .	62
4.2	Isolierung von Glykoproteinen aus Kultivierungsmedien . . . . .	63
4.2.1	Con A-Epoxy-Membranen zur Isolierung von GOD aus Kultivierungsmedien . . . . .	64
4.2.2	Con A-IDA-Membranen zur Isolierung von GOD aus Kultivierungsmedien . . . . .	66
4.3	Isolierung von Molkenproteinen . . . . .	67
4.3.1	Bindung von Molkenproteinen an Con A-Membranen auf Epoxybasis . . . . .	68

4.3.2	Bindung von Molkenproteinen an Con A-Membranen auf IDA-Basis . . . . .	69
4.4	Scale up auf $75 \text{ cm}^2$ Sartobind-Module: Isolierung von GOD aus Natriumacetat-Puffer . . . . .	71
4.5	Zusammenfassung . . . . .	73
<b>5</b>	<b>Spinmodule als Enzym-Festbettreaktoren</b>	<b>75</b>
5.1	Fließgeschwindigkeiten in Spinmodulen und ihr Einfluss auf die Substratumsetzung durch gebundene Enzyme . . . . .	76
5.1.1	Fließgeschwindigkeiten und hydrodynamische Verweilzeiten	77
5.1.2	Einfluss der Verweilzeit auf die Umsetzung von Substraten .	79
5.2	Einsatz von Spinmodulen beim Screening enzymatischer Reaktionen	80
5.3	Optimierung enzymatischer Umsetzungen in Spinmodulen am Beispiel der Hydrolyse von Saccharose durch immobilisierte Invertase .	82
5.3.1	Bestimmung des pH-Optimums der Enzymreaktion . . . . .	82
5.3.2	Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur für die enzymatische Hydrolyse von Saccharose in Spinmodulen . . . .	85
5.4	Spinmodulen mit immobilisierter $\beta$ -Galactosidase als Membran-Festbettreaktor . . . . .	87
5.4.1	Anpassung der Reaktionsbedingungen für die Hydrolyse von ONPG an Spinmodule mit gebundener $\beta$ -Galactosidase . . .	87
5.4.2	Einfluss der eingesetzten ONPG-Konzentration auf die Produktkonzentration . . . . .	89
5.5	Zusammenfassung . . . . .	90
<b>6</b>	<b>Scale up der Enzymreaktoren auf <math>75 \text{ cm}^2</math> Membranfläche</b>	<b>92</b>
6.1	Verweilzeitverteilung . . . . .	93
6.1.1	Experimenteller Aufbau zur Bestimmung des Verweilzeitverhaltens in Sartobind-Modulen . . . . .	94
6.1.2	Verweilzeitverhalten von Sartobind-Modulen . . . . .	95
6.2	Immobilisierung von Enzymen an Sartobind-Module . . . . .	98
6.3	Sartobind-Module als Enzym-Festbettreaktor . . . . .	100
6.3.1	Durchflussreaktoren mit immobilisierter $\beta$ -Galactosidase zur Umsetzung von ONPG-Substrat . . . . .	101
6.3.2	Hydrolyse von Saccharoselösung in Sartobind-Durchflussreaktoren . . . . .	104
6.3.3	Vergleich der Ergebnisse für $7,48 \text{ cm}^2$ -Zentrifugen- und $75 \text{ cm}^2$ Durchflussreaktoren . . . . .	106
6.4	Zusammenfassung . . . . .	107
<b>7</b>	<b>Schlussbetrachtung</b>	<b>110</b>

<b>A</b>	<b>Materialien und Abkürzungen</b>	<b>114</b>
A.1	Enzyme und Feinchemikalien . . . . .	114
A.1.1	Enzyme . . . . .	114
A.1.2	Feinchemikalien . . . . .	114
A.2	Geräte . . . . .	115
A.3	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	116
<b>B</b>	<b>Versuchsprotokolle und Lösungen</b>	<b>117</b>
B.1	Bradfordtest (Proteintest) . . . . .	117
B.2	Pufferlösungen . . . . .	117
B.2.1	Natriumacetatpuffer (Aktivierungspuffer für Con A) . . . . .	117
B.2.2	PBS . . . . .	118
B.2.3	Elutionspuffer für IDA-Membranen . . . . .	118
B.3	Medienzusammensetzung . . . . .	118
B.3.1	LB-Medium . . . . .	118
B.3.2	Synthetisches Medium . . . . .	118
B.4	Versuchsprotokolle: Epoxy-Spinmodule . . . . .	119
B.4.1	Immobilisierung von Con A an Epoxy-Spinmodule . . . . .	119
B.4.2	Proteinbindung an Con A-Epoxy-Spinmodule und anschließende Elution . . . . .	119
B.5	Versuchsprotokoll: IDA-Spinmodule . . . . .	120
B.5.1	Immobilisierung von Con A und Enzymen an IDA-Spinmodule . . . . .	120
B.5.2	Proteinbindung an Con A-IDA-Spinmodule und anschließende Elution . . . . .	120
B.5.3	Substratumsetzung in Enzym-IDA-Modulen . . . . .	121
B.6	Immobilisierung von Proteinen an $75^2cm$ -IDA-Sartobind-Module . . . . .	121
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>122</b>

---

# Kapitel 1

## Einleitung

Die Bedeutung membranbasierter Prozesse hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen. Sie werden in zahlreichen Industriezweigen, häufig zur Trennung von Stoffgemischen, eingesetzt. Wichtig ist hierbei u. a. die Lebensmittelindustrie. Aber auch für andere industrielle Bereiche wie z.B. der Chemie- und Pharmaindustrie und der Wasseraufbereitung werden Membranprozesse zunehmend interessant. Der Einsatz von Membranen ermöglicht dabei die Verwirklichung verschiedener Operationen wie die Aufkonzentrierung einer Lösung oder die selektive Bindung bestimmter Inhaltsstoffe eines Fluids an funktionelle Gruppen der Membran. Insbesondere durch die steigende Verfügbarkeit von hochselektiven Membranen ist die Realisierung von Trennprozessen möglich geworden, die mittels konventioneller verfahrenstechnischer Methoden deutlich aufwändiger wären [1].

Bereits in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts waren Membranprozesse zur Entsalzung von Meerwasser oder zur Entfernung von Wasser aus Alkoholen bekannt [2]. Die membranbasierte Aufarbeitung von Meer- und Abwasser wird heute industriell angewandt [3]. Ende des Jahres 2003 waren weltweit mehr als 17.000 Anlagen zur Wasser-Entsalzung in Betrieb, die jeweils über eine Kapazität von mindestens  $100 \text{ m}^3/\text{Tag}$  verfügten. Dies entspricht einer täglichen Menge von insgesamt  $37,75 \text{ Mio m}^3$  Wasser [4] und zeigt das Potential membranbasierter Prozesse.

Die Entwicklung chromatographischer Prozesse, bei denen erstmals Membranen als stationäre Matrix verwendet wurden, folgte in den 80er Jahren. Mittels dieser Prozesse konnte die Trennung von Proteinen verwirklicht werden. Typische Trenneigenschaften der Membranen waren Größenausschluss oder Ionenaustausch. Häufige Anwendungsgebiete für Membranverfahren sind die Steriltechnik oder die Fraktionierung von Milch. Durch Membranfiltrationen ist hier die schonende Anreicherung oder Entfernung verschiedener Inhaltsstoffe (z.B. Proteine, Fette oder Mineralstoffe) möglich [5].

Um mit Hilfe der Größenausschluss- oder Ionenaustauschchromatographie einen zuverlässigen Trennerfolg zu gewährleisten, werden ausreichende Unterschiede im

gewählten Trennmerkmal der zu trennenden Stoffe benötigt. Insbesondere bei der Trennung durch Größenausschluss spielen verschiedene Faktoren wie z. B. Proteinfaltung oder Hydrathüllen eine wichtige Rolle, da sie die tatsächliche Proteingröße entscheidend beeinflussen können. Große Unterschiede in den molekularen Gewichten der Proteine führen somit nicht in jedem Fall zu entsprechenden Unterschieden in der Proteingröße. Ein großes Problem in der Anwendung membranbasierter Aufreinigungsprozesse, wenn nur bestimmte Proteine aus einem Rohprodukt isoliert werden sollen, liegt daher in der eingeschränkten Selektivität. Für viele industrielle Bereiche ist die Selektivität der vorhandenen Membranen nicht ausreichend. Dies gilt vor allem für die pharmazeutische Industrie, wo im Bereich des Downstreamings von biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln hohe Anforderungen gestellt werden. Durch die Entwicklung von Membranen, die die gewünschten Proteine zielgerichtet binden können, ist eine Vereinfachung des Aufarbeitungsprozesses möglich.

Um eine optimale Wirksamkeit von Pharmaproteinen zu gewährleisten, ist in vielen Fällen ein korrektes, dem Menschen angepasstes Glykosilierungsmuster notwendig [6] [7] [8]. Die Isolierung glykosilierter Proteine kann mittels Concanavalin A-Affinitätschromatographie verwirklicht werden. Es zeigt sich üblicherweise eine hohe Selektivität und darüber hinaus ist der Einsatz der Con A-Affinitätschromatographie allgemein für glykosilierte Proteine anwendbar [9] [10] [11]. Soll eine Isolierung von Proteinen über Antikörper o. Ä. erfolgen, kann eventuell eine größere Selektivität erreicht werden. Für jedes Protein muss aber eine neue Aufarbeitungsstrategie entwickelt werden. Dies kann zu steigenden Entwicklungskosten für den Aufarbeitungsprozess führen. Daher ist die Verfügbarkeit von Methoden wünschenswert, die nach einer kurzen Anpassung für verschiedene Proteine einsetzbar ist.

Membranen werden vor allem im Bereich des Downstreamings eingesetzt. Ihre Anwendung ist aber nicht auf die Aufarbeitung von Produkten beschränkt, darüber hinaus ist auch der Einsatz in Membranreaktoren möglich. In Enzym-Membranreaktoren werden Membranen häufig dazu verwendet, Enzyme im Reaktor zurückzuhalten. Membranen zeigen vielfach gute Bindungseigenschaften, die man sich für die Immobilisierung von Enzymen oder anderen Katalysatoren und die anschließende Umsetzung der gewünschten Substrate/Edukte zu Nutzen machen kann. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für Membranreaktoren, in denen anorganische Membranen mit (anorganischen) Katalysatoren kombiniert wurden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Anwendungsmöglichkeiten von Membranen auf Zellulosebasis. Eines der betrachteten Anwendungsgebiete ist die Bindung und Elution von Glykoproteinen, ein Weiteres die Verwendung von Membranen in Festbettreaktoren. An die Membranen werden in diesem Fall Enzyme gebunden. Beide Bereiche wurden oben kurz skizziert. Ein besonderes Augenmerk soll dabei auf die Anwendung der Membranen bei der Prozessierung von sehr kleinen Volumi-

na gelegt werden, die zum Screening von Bindungs- oder Reaktionsbedingungen im Labor genutzt werden können und als erster Schritt in der Prozessentwicklung anzusehen sind. Bei bekannten Parametern ist auch die Anwendung zur Produktaufreinigung im Labor möglich. Bisher ist die Nutzung von membranbasierten Verfahren für Volumina unter 1 *mL* selten, da üblicherweise mit kontinuierlichen Verfahren gearbeitet wird. Diese Verfahren benötigen jedoch Probenvolumen von mehreren *mL*. Durch die Integration von Membranen in eine Modulform, die in einem diskontinuierlichen Verfahren eingesetzt werden kann, sind jetzt Probenvolumina von  $\leq 400 \mu\text{L}$  prozessierbar. Daneben wird die gleichzeitige Durchführung von einer Vielzahl verschiedener, paralleler Versuchsansätze ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit werden für die Anwendung im Bereich des Downstreaming glykosilierter Proteine Con A-Membranen hergestellt. Es stehen zur Umsetzung dieser Membranen drei verschiedene, bereits mit Epoxy-, Aldehyd- bzw. metallchelatisierenden Gruppen derivatisierte Materialien zur Verfügung. Die Bedingungen für die Bindung von Con A an die verschiedenen Membrantypen wird optimiert. Hergestellte Con A-Membranen werden auf ihre Bindungseigenschaften für Glykoproteine getestet. Eine Isolierung von Modellproteinen erfolgt dabei aus Pufferlösungen und Kultivierungsmedien.

Metallchelatisierende Membranen werden weiterhin als Basis für Enzym-Festbettreaktoren getestet. Der Einfluss der Metallionenbeladung auf die Bindungseigenschaften verschiedener Modellenzyme wird untersucht und eine Optimierung der Immobilisierungsbedingungen durchgeführt. Anhand von Modellreaktionen wird die Eignung der enzymbeladenen Membranen für Substratumsetzungen ermittelt. Die praktischen Arbeiten werden mit zwei verschiedenen Modulformen, in denen die Membranen integriert sind, durchgeführt. Einer der Modultypen wird in Zentrifugen eingesetzt und erlaubt das Screening verschiedener Parameter im Mikrolitermaßstab. Der zweite Modultyp kann kontinuierlich betrieben werden und enthält eine größere Membranfläche, entspricht also einem ersten Scale up-Schritt. Die Übertragbarkeit der im kleinen Maßstab im Labor gewonnenen Erkenntnisse nimmt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von z. B. Aufarbeitungstrategien ein, da ein problemloses Scale up zu einer Verkürzung der Entwicklungszeit und einer Verringerung der Kosten führen kann.

# Kapitel 2

## Grundlagen

### 2.1 Separationsverfahren für biotechnologisch hergestellte Produkte

Die Isolierung und Reinigung von z.B. Proteinen oder biotechnologischen Produkten gestaltet sich aufgrund der komplizierten Zusammensetzung ihrer Quelle (z.B. Fermentationsbrühen, Milch, etc.) oft schwierig, da eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen (Mediumsbestandteile, evtl. Nebenprodukte, etc.) vom Zielprodukt abgetrennt werden müssen. Häufig angewandte Verfahren zur Produktisolierung sind chromatographische Verfahren oder die Filtration. Beide Verfahren werden im Folgenden kurz erläutert, um die spätere Einordnung membranbasierter Prozesse zu vereinfachen.

#### 2.1.1 Chromatographische Methoden

Chromatographische oder adsorptive Trennmethode nehmen nicht nur in der Biotechnologie eine wichtige Rolle ein. Sie ermöglichen eine schonende Aufarbeitung von Produkten. Insbesondere für biotechnologisch hergestellte Produkte wie Antikörper oder Pharmaproteine ist dieses interessant, da es sich in der Regel um empfindliche Substanzen handelt. Allerdings sind chromatographische Methoden mit relativ hohen Kosten verbunden.

##### 2.1.1.1 Anwendung chromatographischer Trennverfahren in der Biotechnologie

Die Chromatographie ist bei einer entsprechenden Wahl von stationärer und mobiler Phase ein schonendes Trennverfahren für das Produkt, da meist bei Raumtemperatur in gepufferten Lösungen gearbeitet wird und niedrige Scherkräfte auftreten. Darüber hinaus zeigen chromatographische Trennmethode bei entsprechend angepassten Parametern eine hohe Selektivität [12].

Für alle Chromatographie-Verfahren gilt, dass das Grundmaterial der stationären

Phase verschiedenen Anforderungen genügen muss. Diese Anforderungen können sich abhängig von der jeweiligen Methode unterscheiden. Es gilt aber im Allgemeinen, dass das Grundmaterial der Matrix möglichst nicht oder nur wenig mit dem zu isolierenden Proteinen interagieren sollte, um unspezifische Bindungen an das Trägermaterial zu vermeiden. In den meisten Fällen werden noch Partikel als stationäre Matrix verwendet, zunehmend kommen aber auch monolithische Materialien oder Membranen zum Einsatz.

Chromatographische Verfahren können mit Hilfe verschiedener Parameter charakterisiert werden. Dazu gehören der Kapazitätsfaktor  $K'$ , die Retention  $\alpha$ , die dimensionslose Anzahl der theoretischen Böden  $N$ . Die Auflösung  $R_s$  lässt sich durch die bereits genannten Parameter bestimmen:

$$R_s = \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{K'_2}{1 - K'_1} \right) \quad (2.1)$$

mit:

- $R_s$  : Auflösung
- $N$  : Anzahl der theoretischen Böden
- $\alpha$  : Retention
- $K'_i$  : Kapazitätsfaktor Komponente  $i$

Für die Höhenäquivalenz eines theoretischen Bodens oder die Trennstufenhöhe gilt folgender Zusammenhang zwischen der Säulenlänge und der Anzahl der theoretischen Böden:

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.2)$$

mit:

- $H$  : Höhenäquivalenz
- $L$  : Säulenlänge
- $N$  : Anzahl der theoretischen Böden

Die Höhenäquivalenz eines theoretischen Bodens wird auch durch die *Van Deemter Gleichung* beschrieben:

$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v \quad (2.3)$$

mit

- $A$  : Säulenqualitätsfaktor
- $B$  : Axialdiffusion
- $C$  : Non-Equilibrium-Term
- $v$  : Flussrate

Proteine zeigen nur geringe Diffusionsgeschwindigkeiten. Werden also chromatographische Prozesse mit großen Molekülen, wie z.B. Proteine, betrachtet, kann  $B$

fast vernachlässigt werden. Bei kleinen Molekülen hingegen führt die Axialdiffusion zu einer Verbreiterung der Banden.

Der Term  $C$  beschreibt den diffusen Massentransfer zur Oberfläche der stationären Phase und steigt mit zunehmender Flussrate an. Bei großen Molekülen ist dieser Term bedeutsam, da die Einstellung des Gleichgewichts aufgrund der langsamen Diffusion der Moleküle zu einem für den Trennerfolg wichtigen Parameter wird. Bei hohen Flussraten können Proteine nicht mehr in die Poren der stationären Phasen diffundieren, die Auflösung wird schlecht und  $C$  nimmt einen hohen Wert an. Der Säulenqualitätsfaktor  $A$  hingegen ist unabhängig von der Flussrate. Er umfasst Parameter wie Partikelgröße und Partikelform. Auch dieser Term sollte, damit die Höhenäquivalenz eines theoretischen Bodens niedrig ist, möglichst gering sein. Durch eine kleine Partikelgröße lässt sich diese Anforderung verwirklichen. Da aber mit einer Verkleinerung des Partikeldurchmessers ein Anstieg des Druckabfalls über der Säule einhergeht, sollte dieser auch nicht zu gering werden [13]. Neben der Partikelgröße übt auch die Größenverteilung der Partikel Einfluss auch den Faktor  $A$  aus. Bei einem konstanten mittleren Durchmesser sollte diese Verteilung möglichst eng sein, also nicht sehr große neben kleinen Partikeln in der Säule vorliegen. Für die industrielle Anwendung chromatographischer Verfahren sind darüber hinaus die entstehenden Prozesskosten ein wichtiger Einflussfaktor bei der Umsetzung der Methoden [14].

Wichtige Chromatographie-Verfahren in der Biotechnologie sind [15]:

- Reversed-Phase-Chromatographie (RPC)
- Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)
- Ionen-Austausch-Chromatographie (IEX)
- Größen-Ausschluss-Chromatographie (SEC)
- Affinitätschromatographie
- Metall-Chelat-Chromatographie (MCC) oder Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)

Im Kontext dieser Arbeit sind vor allem die Affinitätschromatographie und die Metall-Chelat-Chromatographie wichtig. Im Folgenden wird auf diese Chromatographietechniken genauer eingegangen.

#### 2.1.1.2 Scale up von chromatographischen Verfahren

Soll ein chromatographischer Prozess, der im Labormaßstab entwickelt wurde, in den Produktionsmaßstab übertragen werden, ist die Beibehaltung der im kleinen Maßstab ermittelten Parameter für ein erfolgreiches Scale up von Bedeutung. Zu

den Faktoren, die möglichst nicht geändert werden sollten, gehören das verwendete Chromatographie-Material, Pufferzusammensetzungen und die Flussraten [12]. Darüber hinaus sollte das Verhältnis der Masse des adsorbierenden Stoffes zur Produktmasse konstant gehalten werden. Bei Verwendung von Beadmaterialien wird in vielen Fällen das Scale up durch eine Verbreiterung des Durchmessers der Chromatographiesäule verwirklicht. Die Säulenwand übt gleichzeitig aber einen stabilisierenden Einfluss aus, eine starke Verbreiterung verringert diesen Effekt. Unter Umständen können Instabilitäten des Bettes und dadurch Inhomogenitäten in der Säule auftreten, was einen negativen Einfluss auf das Trennergebnis ausübt.

### 2.1.1.3 Affinitätschromatographie

Bei der Isolierung von Proteinen mit Hilfe der Affinitätschromatographie werden spezifische Wechselwirkungen zur Bindung der Zielprodukte ausgenutzt. Einige Beispiele sind im Folgenden angegeben [16]:

- Enzym  $\Leftrightarrow$  Cofaktor, Substrat oder Inhibitor
- Antigen  $\Leftrightarrow$  Antikörper
- Lektin  $\Leftrightarrow$  best. Kohlenhydrat-Reste (z.B.  $\alpha$ -D-Glukose,  $\alpha$ -D-Mannose, ...)
- Protein A  $\Leftrightarrow$  Antikörper

Der Ligand, der später das abzutrennende Molekül bindet, wird an ein inertes Trägermaterial gebunden. Vielfach werden Dextrane, Agarose, Sepharose oder Polyacrylamide verwendet. Hierbei handelt es sich um hydrophile Träger. [17]. Der Ligand wird normalerweise über einen Spacer an die Matrix gebunden, durch den Einsatz solcher Spacer wird die Flexibilität des Liganden erhöht. Des Weiteren kann eine mögliche sterische Hinderung bei der Bindung des Zielmoleküls vermieden werden. Damit ein Ligand sinnvoll in der Affinitätschromatographie eingesetzt werden kann, ist seine ‚Bifunktionalität‘ notwendig. Er muss zum Einen unter Erhaltung seiner Aktivität an die Matrix binden, zum Anderen das Zielmolekül. Für die Bindung an die Matrix gilt, dass die Dissoziationskonstante einen Wert  $< 10^{-3}$  aufweisen sollte. Die Gleichgewichtskonstanten für die Adsorption zwischen dem gebundenen Ligand und dem Zielmolekül liegen i. A. im Bereich  $10^{-6} - 10^{-9}$ . Bei Gleichgewichtskonstanten zwischen  $10^{-3} - 10^{-5}$  für die Ligand-Zielmolekül-Wechselwirkung spricht man von *weak affinity chromatography* [18].

Die Elution des Zielmoleküls vom Liganden kann bei der Affinitätschromatographie auf zwei verschiedenen Wegen erreicht werden. Eine Variante ist die Elution mit einer Substanz, die entweder mit dem Zielprotein oder mit dem Liganden um die Bindungsstellen des Partners konkurriert. Andere Verfahren nutzen die Verschiebung der Gleichgewichtskonstanten der Bindung aus. Ein Beispiel für die erste

Variante stellt die Elution von Glykoproteinen von Con A-Liganden durch Mannosid-Lösung dar. Die Mannosid-Moleküle verdrängen dabei kompetitiv die Proteine von den Con A-Molekülen. Auf Con A und die Einsatzmöglichkeiten dieses Lektins wird in Kapitel 3.4 detaillierter eingegangen.

Die Verschiebung der Gleichgewichtskonstanten führt ebenfalls zur Elution der Zielkomponente. Ermöglicht wird sie beispielsweise durch die Erhöhung der Ionenstärke im Elutionspuffer gegenüber dem Equilibrierungs- und Waschpuffer oder auch durch das Absenken des pH-Wertes des Puffers. Die Elution des Zielmoleküls kann durch die relativ starken Wechselwirkungen zwischen Ligand und Zielmolekül erschwert werden. Unter Umständen geht mit der Elution daher eine leichte Denaturierung einer oder beider Komponenten einher, was zu einem Aktivitätsverlust führen kann [19].

In den letzten Jahren ist das Konzept der Trennung von Komponenten auf Basis von Affinitäten weiter entwickelt worden [20]. So werden verstärkt membranbasierte Verfahren eingesetzt, die auch Gegenstand dieser Arbeit sind. In Kapitel 2.3 wird detaillierter auf sie eingegangen.

#### 2.1.1.4 Metall-Chelat-Chromatographie

Ein spezieller Fall der Affinitätschromatographie ist die sogenannte Metall-Chelat-Chromatographie (IMAC). Sie nutzt die Fähigkeit bestimmter in Proteinen enthaltener Aminosäuren oder in Nucleinsäuren enthaltener Purin- und Pyrimidinbasen, Übergangsmetallionen zu chelatisieren [19]. Die Metallionen sind ihrerseits über chelatisierende Gruppen an eine Matrix gebunden. Die IMAC zeigt bei neutralen pH-Werten eine hohe Selektivität, die Adsorption der Zielproteine wird üblicherweise bei hohen Ionenstärken durchgeführt. Die Elution erfolgt ähnlich wie bei der Affinitätschromatographie über einen pH-Gradienten oder durch kompetitive Verdrängung des Zielproteins beispielsweise durch Imidazol-haltige Puffer.

Diese IMAC wird häufig zur Isolierung rekombinanter Proteine eingesetzt, die mit einem Histidinrest produziert werden können. Meist werden dabei sechs Histidindgruppen in Reihe an das eigentliche Protein angefügt, man spricht dann von einem (His)<sub>6</sub>-tag. Histidindgruppen zeigen eine sehr hohe Affinität zu chelatisierten Metallionen, insbesondere zu Nickelionen, wodurch eine sehr effiziente Aufreinigung dieser Proteine möglich ist. Allgemein ist die Stärke der Bindung zwischen Protein und Metallion abhängig von der Zugänglichkeit und der Anzahl der Histidindgruppen sowie vom verwendeten Metallion [21]. Als chelatisierende Gruppen stehen eine Vielzahl von Substanzen zur Verfügung. Am häufigsten werden Imidodiessigsäure (IDA) [22] und Nitrilotriessigsäure (NTA) [23] eingesetzt. Weiterhin konnte auch u.a. für Tris(Carboxymethyl)Ethylendiamin-Gruppen (TED) [24], Tris(2-Aminoethyl)-Amin (TREN) [25] und metallchelatisierende Peptide [26] gezeigt werden, dass ihr Einsatz in der IMAC möglich ist.

Das Anwendungsgebiet der IMAC umfasst inzwischen neben der Isolierung von nativen und gentechnisch veränderten Proteinen [27] [28] und Aminosäuren [29] auch die Bindung ganzer Zellen [30]. Die bereits erwähnten His-tag-Proteine sind aber die häufigsten Zielprodukte. In vielen Fällen reicht hier ein einzelner Aufreinigungsschritt aus. Der Histidinrest kann im Anschluss an die Isolierung chemisch oder enzymatisch vom Zielprotein entfernt werden [31] [32].

### 2.1.2 Filtration

Neben Zentrifugation, Präzipitation und Elektrophorese, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, nimmt die Filtration eine wichtige Rolle in der Separation von Proteinen ein.

In der Filtration sind zwei wesentliche Merkmale für den jeweiligen Prozess von Bedeutung. Zunächst kann die Art des Filtrationsverfahrens in drei unterschiedliche Methoden eingeteilt werden [15] [33]. Bei der Kuchenfiltration wird der abzutrennende Feststoff vom Filter zurückgehalten. Die Partikel bilden eine Schicht, die zusätzlich als Filtermaterial wirkt. Die zweite Methode ist die so genannte Tiefenfiltration, bei der die abzutrennenden Stoffe nicht auf der Filteroberfläche zurückgehalten werden, sondern in die Poren des Filters eindringen und dort zum Teil adsorbiert werden können [34] [35]. Die Querstrom- oder Cross Flow-Filtration unterscheidet sich von den beiden vorher genannten Verfahren dadurch, dass nicht das gesamte zugeführte Fluid die Membran passiert. Vielmehr wird die hier eingesetzte Filtermembran tangential zu ihrer Fläche überströmt. Die Bildung eines Filterkuchens wird vermieden [36], es bildet sich lediglich eine sogenannte *Sekundärmembran*. Dabei lagern sich Partikel aus dem zu filternden Medium auf der Membran ab. Die Dicke dieser Schicht kann durch die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums beeinflusst werden.

Das zweite wesentliche Merkmal von Filtrationsverfahren ist der Porendurchmesser der Filtermaterialien. Von Mikrofiltration wird gesprochen, wenn die Porengröße  $> 50 \text{ nm}$  beträgt. Typische Anwendungen sind Zellernte aus Bioreaktoren, Virusentfernung aus Lösungen oder die Wasseraufreinigung. Sollen kleinere Stoffe abgetrennt werden, kommen Ultrafiltration (Porengröße:  $50 - 5 \text{ nm}$ ) und Nanofiltration (Porengröße:  $5 - 0,5 \text{ nm}$ ) zum Einsatz. Bei der Umkehrosmose liegt der Porendurchmesser bei  $< 0,5 \text{ nm}$  [12]. Die druckgesteuerte Ultrafiltration wird bei Makromolekülen wie Proteinen, synthetischen Polymeren oder Nucleinsäuren beispielsweise zur Aufreinigung oder Fraktionierung angewandt [37]. Die Porengröße dabei ist ein wichtiges Merkmal für Ultrafiltrationsmembranen. Sie ist allerdings nicht das alleinige Kriterium, da durchaus „größere“ Moleküle die Filtrationsmembran durchfließen können, während „kleinere“ von der Membran zurückgehalten werden [38] [39]. Dieses Phänomen wird mit *reversed selectivity* bezeichnet.

## 2.2 Einsatz von Enzymen in industriellen Prozessen

In industriellen Prozessen werden neben „klassischen“ Katalysatoren zunehmend auch Enzyme eingesetzt. Sie zeigen gegenüber beispielsweise anorganischen oder organischen Katalysatoren eine Vielzahl von Unterschieden, die sich positiv auf den Prozess auswirken können. Typisch für enzymatische Prozesse sind die milden Reaktionsbedingungen in Bezug auf die Temperatur, den pH-Wert und den Druck, bei denen die Reaktionen ablaufen. Für industrielle Prozesse ist neben diesen Vorteilen weiterhin von großer Bedeutung, dass Enzyme nur bestimmte Einzelreaktionen katalysieren. Die Reaktionen sind darüber hinaus meist regio- und stereospezifisch und somit u. a. für die Produktion von Feinchemikalien oder von Edukten im Bereich der pharmazeutischen Industrie interessant [40] [41].

Einzelne Anwendungen enzymkatalysierter Reaktionen sind seit dem 19. Jahrhundert bekannt, aber erst in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden die Voraussetzungen für spätere großtechnische Verfahren geschaffen. Es wurden seitdem Verfahren entwickelt, Enzyme in Pflanzen, Bakterien oder tierischen Zellen in entsprechenden Mengen zu produzieren und auf diese Weise ihr industrieller Einsatz ermöglicht. In vielen Prozessen werden Enzyme eingesetzt, die zuvor aus den Zellen, in denen sie produziert worden sind, isoliert wurden. Daneben ist aber auch die direkte Nutzung der Zellen möglich [42]. Die Hauptanwendungsgebiete für Enzyme finden sich in der Nahrungsmittelindustrie. Beispiele sind die Herstellung von Aromastoffen oder Milchprodukten. Ein weiterer wichtiger Bereich ist die Reinigungs- und Waschmittelindustrie [12] [43] [44].

Für den Einsatz von Enzymen in industriellen Prozessen gibt es zwei grundsätzliche Varianten. Das Enzym kann als freies Enzym in den Reaktor gegeben werden oder es wird in einem geeigneten Verfahren zuvor immobilisiert. Mögliche Immobilisierungsverfahren sind die Bindung an einen entsprechenden Träger, Bindung durch Cross-linking oder der Einschluss der Enzyme in geeignete Gelkapseln oder Fasern [45]. Werden native Enzyme verwendet, ist der Einsatz von Batch-Reaktoren, oder kontinuierlich arbeitenden Rührkesselreaktoren (CSTRs) möglich. Das Enzym bleibt dabei im Reaktionsgemisch und wird später inaktiviert oder entfernt. Ein Nachteil dieser Verfahren ist, dass die Wiederverwendung der zugesetzten Enzyme nur schwer möglich ist. Bei teuren Enzymen ist eine Immobilisierung sinnvoll, da auf diesem Weg die Wiederverwertbarkeit der Enzyme ermöglicht wird. Mögliche Immobilisierungsvarianten wurden bereits genannt. Bei einer Immobilisierung in Kapseln oder an Trägermaterialien ist der Einsatz von Festbett- oder Wirbelschicht-Reaktoren möglich. Die Nachteile bei der Verwendung von Enzymen, die an Träger gebunden sind, liegen u. a. in der Limitierung des Stofftransportes (Konvektion und Diffusion) der Edukte zum Enzym und der Produkte von der Bindungsstelle weg [46]. Neben den genannten Verfahren werden zunehmend auch Membranreaktoren mit freien Enzymen eingesetzt, sie werden in Kapitel 2.3.2 näher erläutert.

## 2.3 Membranverfahren in der Biotechnologie

In den voran gegangenen Kapiteln wurden Verfahren zur Separation von Biomolekülen kurz erläutert und die Möglichkeiten, Enzyme in technischen Prozessen einzusetzen, angesprochen. Sowohl in der Affinitätschromatographie als auch bei der Anwendung von immobilisierten Enzymen in Reaktoren werden bei technischen Anwendungen in den meisten Fällen Beadmaterialien verwendet. In den letzten Jahrzehnten entwickelten sich jedoch Membranmaterialien zu einer Alternative. Großtechnisch werden sie allerdings bisher vor allem als Filtermaterialien in der Mikro- und Ultrafiltration eingesetzt. Insbesondere der Bereich der Anwendung als Matrix in Affinitätsprozessen ist aber Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Membranen werden vorrangig in drei verschiedenen Formen eingesetzt, als Flachmembran, als Wickelmodul, bei der die Membran gerollt wird oder als sogenannte Hohlfasermembran [47].

### 2.3.1 Aufreinigung von Biomolekülen durch Membranverfahren

Im Bereich der Aufreinigung von Proteinen wurden Membranen vor allem als Filtermaterialien zur Größentrennung eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, dass sich die Selektivität dieser Membranen erhöhen lässt, wenn zusätzliche aktive Gruppen integriert werden, die in der Lage sind, Proteine zu binden [48] [49]. Die Gruppen finden sich auf der Membranoberfläche und auf den Oberflächen der Poren. Wie bei konventionellen Chromatographiepartikeln können beispielsweise Ionenaustauschergruppen oder Gruppen, die Zielprodukte aufgrund von Affinitäten binden, eingebunden werden [50] [51]. Diese Art Membranen kann also ähnlich wie Chromatographiepartikel im Downstreaming-Prozess eingesetzt werden, da entsprechende Bindungsstellen vorhanden sind. Gleichzeitig handelt es sich um Membranen, die ursprünglich aus dem Filtrationsbereich kommen und neben der Bindung von Proteinen bestimmte Stoffe aus der aufgegebenen Lösung abtrennen können. Sie lassen sich aber weder dem einen noch dem anderen Bereich zuordnen. Für sie hat sich die Bezeichnung *Membranadsorber* durchgesetzt.

Die Anwendung von Membranadsorbern im Downstreaming-Bereich war bisher aufgrund der technischen Umsetzung, die auf kontinuierliche Prozesse ausgelegt war, auf Volumina beschränkt, die mindestens im  $mL$ -Bereich lagen. In vielen Arbeiten mit diesen Modultypen werden Ionenaustauschermembranen verwendet [52] [53]. Hier liegt einer der Vorteile der neu entwickelten Spinmodule, die auch in dieser Arbeit verwendet werden. Es handelt sich um diskontinuierlich arbeitende Module für den Mikroliterbereich mit einem maximalen Probenvolumen von  $400 \mu L$ . Durch sie wird das Screening von Prozessparametern sowie die Entwicklung von Affinitätsmembranen (Bindung von Lektinen, Antikörpern, etc.) im Labormaßstab vereinfacht [54]. Zusätzlich kann eine Vielzahl von Proben oder Parametern gleich-

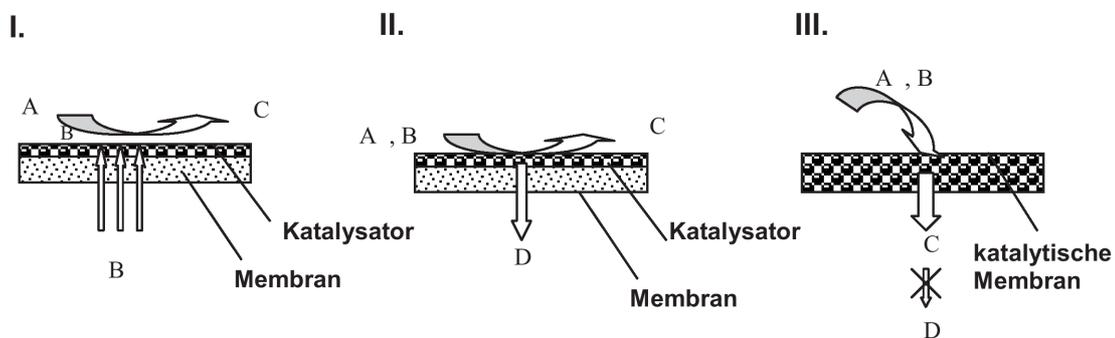
zeitig getestet werden. Die maximale Probenzahl hängt dabei nur von der zur Verfügung stehenden Zentrifuge ab, in der die Module verwendet werden. Auf den Aufbau von Membranadsorbern und die Modifizierungsvarianten wird in Kapiteln 3.1 und 3.2 eingegangen.

### 2.3.2 Membranreaktoren

Membranen können neben der Aufreinigung auch in Reaktoren eingesetzt werden. Häufig werden sie benutzt, wenn nicht modifizierte, lösliche oder durch Cross-linking quervernetzte Enzyme als Katalysator im Reaktor vorhanden sind. Durch die Membranen, die in diesen Fällen eine Filterfunktion ausüben, werden die Enzyme im Reaktor gehalten. Wenn die Trennung über ein nachgeschaltetes Separationsmodul durchgeführt wird, werden die Enzyme in den Reaktor zurückgeleitet [55]. Im Gegensatz zu Reaktoren, die an Partikel gebundene Enzyme einsetzen, ist der Transport des Substrates zum Enzym nicht durch Diffusion limitiert.

Neben den konvektiv betriebenen Reaktoren, bei denen die Substratlösung in den Reaktor geleitet wird, dort reagieren kann und die produktthaltige Lösung durch die Membran abgeführt wird, ist auch ein diffusiver Betrieb von Membranreaktoren möglich, bei dem das Substrat durch die Membran hinein und das Produkt heraus diffundiert. Diffusiv betriebene Reaktoren werden meist für Katalysatoren eingesetzt, die scherempfindlich sind.

Eine andere Möglichkeit, Membranen in Enzymreaktoren einzusetzen, besteht darin, das Bindungsvermögen der Membranen auszunutzen und den gewünschten Katalysator mit der Membran zu kombinieren. Bei diesen Verfahren besteht die Möglichkeit einer Steigerung des Umsatzes und der Selektivität des Prozesse. Die Unterscheidung von drei verschiedenen Reaktorvarianten ist möglich, sie sind in Abbildung 2.1 dargestellt.



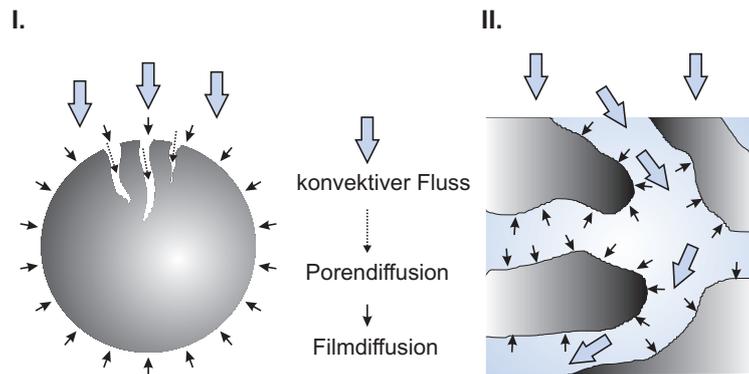
**Abb. 2.1:** Kombination von Membranen mit Katalysatoren - mögliche Reaktorvarianten: I. Distributor, II. Extraktor, III. Kontaktor [56]

Man unterscheidet die sogenannten *Distributoren*, *Extraktoren* und *Kontaktoren*. Der Distributor ist in Abbildung 2.1 auf der linken Seite (I.) abgebildet. Der Katalysator ist auf der Membranoberseite gebunden, durch die Membran wird eines der Edukte zugeführt, während das andere Edukt im Reaktor vorliegt. Diese Reaktorform lässt sich gut für z.B. partielle Oxidationen anwenden [57]. Der Extraktor enthält ebenfalls eine Membran, auf deren Oberseite der Katalysator gebunden ist. Diese Membran ist nur für eines der Reaktionsprodukte durchlässig, Edukte und eventuelle Nebenprodukte verbleiben im Reaktor. Bei Gleichgewichtsreaktionen kann so eine Steigerung des Umsatzes erreicht werden [58]. Die dritte Variante, der Kontaktor, ist in Abbildung 2.1 auf der rechten Seite (III.) dargestellt und wird in dieser Arbeit Anwendung finden. Beim Kontaktor ist der (Bio-)Katalysator in den Poren der Membran lokalisiert, oder die Membran besteht selbst aus einem Katalysatormaterial. Beim Durchleiten der Eduktlösung durch die Membran kommt es zur Reaktion und das Produkt wird durch die Konvektion direkt abgeführt. Über die gewählte Strömungsgeschwindigkeit kann Einfluss auf die Kontaktzeiten zwischen Edukten und Katalysator genommen werden [59]. Durch die Lokalisierung des Katalysators in den Membranporen, durch die der konvektive Edukttransport erfolgt, lassen sich eine Diffusionslimitierung der Umsetzung sowie mögliche Folgereaktionen des Produkts mit dem Katalysator vermeiden.

### 2.3.3 Vorteile von membranbasierten Verfahren gegenüber konventionellen Partikeln

In der Säulenchromatographie von Biomolekülen besteht ein Zusammenhang zwischen der Kapazität des Materials, der erreichbaren Auflösung und der Geschwindigkeit der Trennung. Um eine hohe Kapazität der Säule zu erreichen, ist die Verwendung von porösen Materialien mit kleinen Poren notwendig. Die Proteine müssen durch Diffusion in die Poren zu den Bindungsstellen gelangen. Soll eine schnelle Trennung durchgeführt werden, ergibt sich oft eine schlechtere Auflösung [60] [61]. Ein Diffusionsproblem ergibt sich auch, wenn Partikel mit in den Poren immobilisierten Enzymen als Katalysatoren eingesetzt werden sollen. Die Substratlösung muss in die Poren hinein und die Produkte hinaus diffundieren.

Abbildung 2.2 auf Seite 20 stellt auf der linken Seite (I.) schematisch den Stofftransport durch Konvektion und Diffusion zu den Bindungsstellen in Partikelmaterialien dar. Die Verwendung von Materialien auf Membranbasis bietet die Möglichkeit, lange Diffusionswege in Partikel hinein zu vermeiden. Die Austauscherguppen sind auf der Oberfläche der Membranporen lokalisiert und die Protein- oder Substratlösung fließt direkt durch diese Poren (siehe Abb. 2.2, II.). Das bedeutet, dass der Transport rein konvektiv erfolgt und sich auch bei hohen Fließgeschwindigkeiten eine gute Auflösung erreichen lässt [62]. Für industrielle Prozesse ergeben sich einige Vorteile. Hohe Flussraten führen zu kurzen Zykluszeiten, gleichzeitig lassen sich



**Abb. 2.2:** Konvektiver Fluss und Diffusion: I. bei konventionellen Beadmaterialien und II. bei Membranen

scharfe Elutionspeaks mit hohen Produktkonzentrationen im Eluat verwirklichen. Der Scale up-Prozess von Membranverfahren ist im Gegensatz zum Scale up bei chromatographischen Säulen in der Regel einfach durchzuführen, da die Membranen aufgrund ihrer flexiblen Struktur in unterschiedlichen, dem Prozess angepassten Modulformen eingesetzt werden können.

Im Bereich industrieller Anwendungen sind die Kosten der Prozessschritte von Interesse. Das Downstreaming biotechnologischer Produkte ist in der Regel aufwändig und zu einem hohen Anteil an den Gesamtkosten beteiligt. Während der Anteil des Downstreamings an den Herstellungskosten von Antibiotika bereits  $\sim 60\%$  beträgt, steigt er bei der Herstellung monoklonaler Antikörper auf  $80 - 90\%$ . Die Kosten der Fermentation tragen also nur noch  $10 - 20\%$  zu den Gesamtkosten bei. Die Verwendung von Membranverfahren kann durch die hohen Flussraten, die bei einem geringen Druckabfall verwirklicht werden können und die geringeren Produktionskosten der Module zu einer Verringerung dieser Kosten beitragen.

Außer durch die Verwendung membranbasierter Materialien ist die Vermeidung der Porendiffusion auch bei Verwendung monolithischer Materialien möglich [63] [64]. Bei diesen stationären Phasen handelt es sich um poröse Polymerblöcke, die allerdings nur in kleinen Maßstäben kommerziell verfügbar sind. Die Herstellung in prozessgeeigneten Maßstäben ist im Gegensatz zu Membranmaterialien noch nicht möglich.

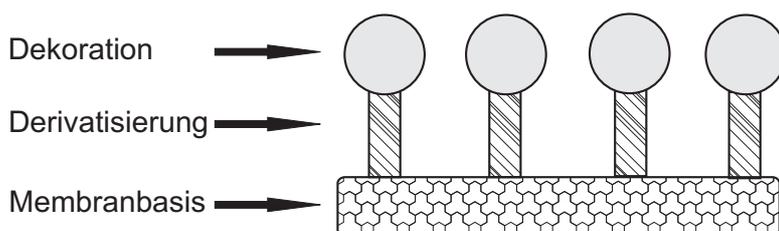
## Kapitel 3

# Modifikation von Membranen durch biologische Komponenten

### 3.1 Aufbau von Membranadsorbern

In Kapitel 2.3 wurden verschiedene Anwendungsmöglichkeiten von Membranverfahren im Bereich der Biotechnologie beschrieben. Aufgrund der weit gefächerten Einsatzbereiche ist es notwendig, dass die eingesetzten Membranen an das jeweilige Aufreinigungs- oder Umsetzungsproblem angepasst werden.

In diesem Kapitel sollen daher verschiedene Möglichkeiten diskutiert werden, die es ermöglichen, Membranmaterialien und ihre Eigenschaften optimal an das Einsatzgebiet anzupassen. Hierzu ist zunächst die Kenntnis des Membranaufbaus notwendig, der in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt ist.



**Abb. 3.1:** Dreiteiliger Aufbau von Membranmaterialien

Grundsätzlich können Membranen in drei verschiedene Bereiche eingeteilt werden, die Membranbasis, die Derivatisierung und die Membrandekoration. Als Membranbasis können eine Vielzahl verschiedener Materialien eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind unter anderen Zellulosematerialien, aber auch synthetische Polymere wie Polyethersulfon (PES) und Polypropylen (PP) wurden als mögliche Membranbasis beschrieben [65] [66] [67] [68]. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von stoffartigen Materialien. Aufgrund der sehr großen Poren ist hier beispielsweise die

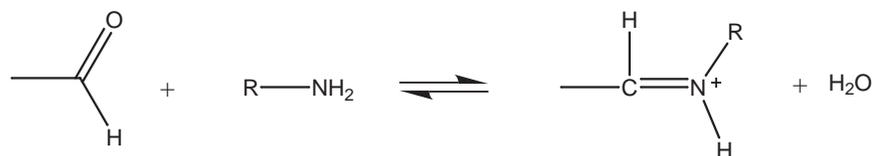
Abtrennung von Zelltrümmern aus Kultivierungsüberständen möglich, ohne dass es zu einer Verblockung der Membran kommt. Auf die Trägermembran wird die so genannte Derivatisierung aufgebracht. Hierdurch wird eine funktionelle Oberfläche geschaffen, die die Dekorationsschicht bindet. Mögliche Variationen der Derivatisierungschemie können beispielsweise Epoxy-, Aldehyd- und Bromcyanaktivierungen sein.

Bei der Dekoration handelt es sich um Liganden, welche als Bindungsstellen für Proteine dienen können und die die eigentliche Funktion der Membran darstellen. In diesem Bereich gibt es ebenfalls eine Vielzahl von Möglichkeiten, die Membran optimal an das jeweilige Aufreinigungs- oder Umsetzungsproblem anzupassen. Häufig verwendete Dekorationen sind Anionen- und Kationenaustauschergruppen oder Metallchelate. Die Dekoration mit Antikörpern ermöglicht die spezifische Bindung von Antigenen an die Membran. Durch Lektine wie Concanavalin A (Con A) können glykosilierte Proteine reversibel gebunden werden. Im Folgenden werden zunächst die Bindungsprinzipien epoxy- und aldehydaktivierter Membranen sowie metallchelatisierende Membranen und das Lektin Con A näher erläutert. Im Anschluss werden die Ergebnisse für die Herstellung von Con A-Membranen mit unterschiedlichen Membrantypen und für die Optimierung für Enzymimmobilisierungen an IDA-Membranen dargestellt und diskutiert.

## 3.2 Aktivierungsvarianten

### 3.2.1 Aldehydaktivierte Membranen

Die Bindung von Proteinen an aldehydaktivierte Materialien läuft nach folgendem Reaktionsmechanismus ab: die Aldehydgruppe der Membran reagiert mit einer Aminogruppe der Proteine unter Wasserabspaltung [69], es bilden sich so genannte *Schiff'sche Basen*. Das Bindungsprinzip ist in Abbildung 3.2 dargestellt.



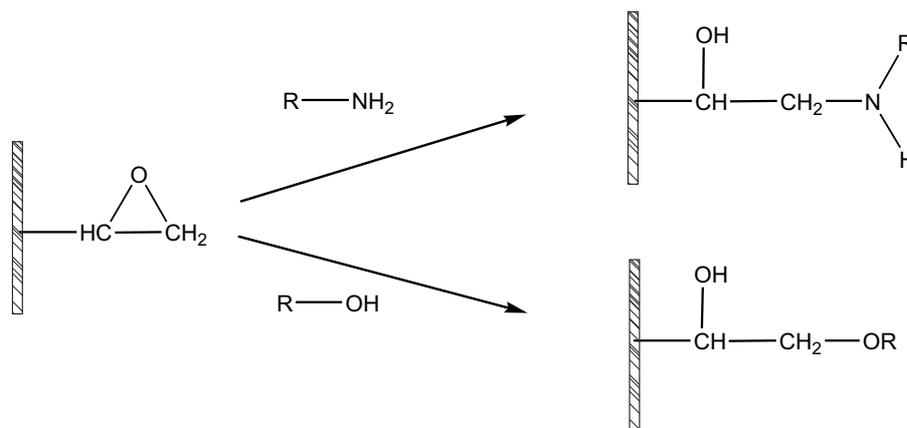
**Abb. 3.2:** Gleichgewichtsreaktion zwischen aldehydaktivierten Membranen und Proteinen

Bei der Bindung von Aminen an Aldehydgruppen bildet sich ein Gleichgewicht zwischen Edukten und Produkten aus. Gleiches gilt auch für die Bindung von Proteinen an Aldehydmembranen. Die Immobilisierung ist reversibel und kann durch

die Änderung des pH-Werts in saure Bereiche auf die Seite der Edukte, also zum freien Protein gedrängt werden [70].

### 3.2.2 Epoxyaktivierte Membranen

Eine wichtige Variante zur chemischen Aktivierung von Beadmaterialien und Membranen ist das Aufbringen von Epoxygruppen. Diese funktionellen Gruppen können mit Hydroxy- oder Aminogruppen in Proteinen kovalente Bindungen eingehen. Abbildung 3.3 stellt das Bindungsprinzip dar [45].



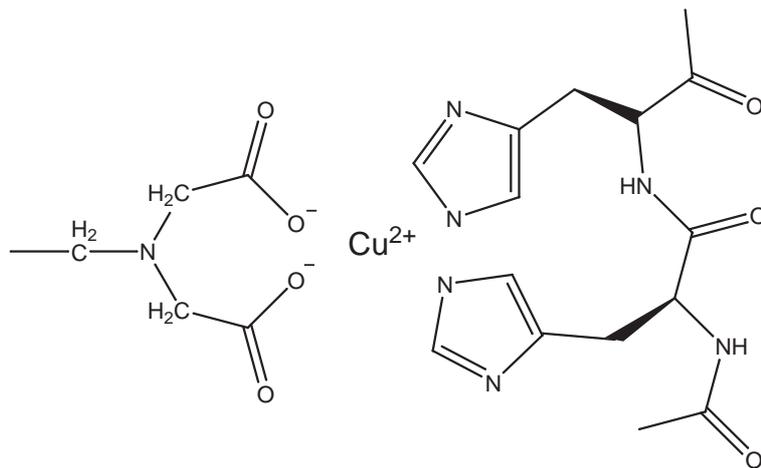
**Abb. 3.3:** Kopplungsprinzip zwischen epoxyaktivierten Membranen und Proteinen

Das Protein wird sehr fest an die Membran gebunden. In der vorliegenden Arbeit sollen unter anderem die Möglichkeiten untersucht werden, Con A an epoxyaktivierte Membranen kovalent zu binden und somit eine stabile Con A-Membran herzustellen. Die genauen Immobilisierungsbedingungen für Con A an den verschiedenen Membrantypen werden in Kapitel 3.5.1 erläutert.

### 3.2.3 Metallchelatisierende Membranen

Metallchelatisierende Membranen arbeiten nach dem bekannten Prinzip der Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC), die bereits in Kapitel 2.1.1.4 kurz erläutert wurde. Nach der Beladung der chelatisierenden Gruppen mit zwei- oder dreiwertigen Metallionen werden im nachfolgenden Schritt Proteine über Histidinzentren gebunden. In Abbildung 3.4 (siehe S. 24) ist das Bindungsprinzip dargestellt.

Vor allem zwei Sorten chelatisierender Gruppen finden in der IMAC Verwendung, Iminodiessigsäure (IDA) und Nitrilotriessigsäure (NTA). In dieser Arbeit werden ausschließlich metallchelatisierende Membranen mit IDA-Gruppen verwendet. Als



**Abb. 3.4:** Bindung von Proteinen über Histidingruppen und Metallionen an chelatisierende Iminodiacetatgruppen

Ionen werden die folgenden Übergangsmetallionen verwendet:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$ . Dabei ist die Menge des gebundenen Proteins sowie die Stabilität des entstehenden Komplexes abhängig von dem verwendeten Metall [71]. Durch Kombination der chelatisierenden Gruppe mit bestimmten Metallionen ist die Selektivität der IMAC steuerbar [72] [73] [74] [75] [76]. In dieser Arbeit liegt ein Schwerpunkt auf der Immobilisierung von Con A an IDA-Membranen. Die entstehenden Con A-Membranen sollen zur Bindung und Aufreinigung von Glykoproteinen eingesetzt werden. Eine weitere Anwendung, für die IDA-Membranen eingesetzt werden, ist die Immobilisierung verschiedener Enzyme zur Herstellung von Enzymreaktoren.

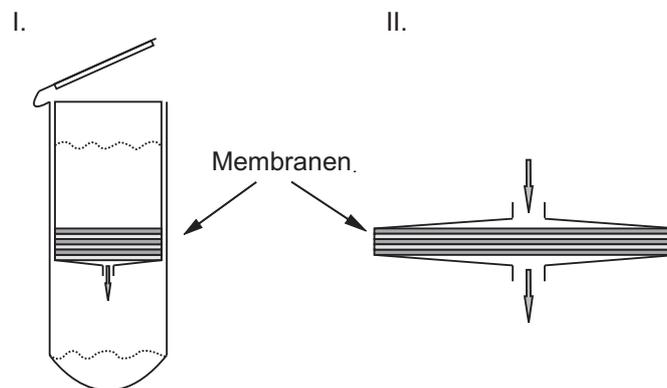
### 3.3 Verwendete Membranen und Modulformen

Neben der Art der Membran ist das sogenannte Modul, in das die Membranen integriert sind und das später im Prozess eingesetzt wird, von Bedeutung. Die optimale Form des Moduls ist dabei abhängig von dem zu prozessierenden Volumen. Der Großteil der in dieser Arbeit verwendeten Membranen wurde von der Firma *Sartorius AG, Göttingen* hergestellt. Die Membranen sind zum Einen als Membranbogen erhältlich, aus dem die benötigten Stücke ausgestanzt werden können, und zum Anderen als fertige Module. Daneben wurden auch aldehydaktivierte Membranen der Firma *Pall* verwendet, diese lagen als Bogen vor. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Membranen und ihren Eigenschaften.

**Tabelle 3.1:** Verwendete Membranen und ihre Eigenschaften

	Aktivierung			
	Imino- diessigsäure	Epoxy	Aldehyd	Aldehyd
Hersteller	Sartorius	Sartorius	Sartorius	Pall
Spacer	keine Angaben durch die Hersteller			
Membrantyp	Metallchelat	Affinität	Affinität	Affinität
Membranbasis	stabilisierte, verstärkte Zellulose		Polyethersulfon	
Porengröße [ $\mu m$ ]	> 3	0,45	0,45	0,45
Betthöhe [ $mm$ ]	0,275	0,275	0,275	0,152
Name/Typ	Sartobind- IDA- Membran	Sartobind- Epoxy- membran	Sartobind- Aldehyd- membran	Ultrabind Affinitäts- membran

Für einen Großteil der praktischen Arbeiten wurden bereits konfektionierte Membranen in entsprechenden Modulen verwendet. Die verschiedenen Module unterscheiden sich grundsätzlich in ihrem Einsatzgebiet und in ihrer Handhabung. Abbildung 3.5 zeigt Skizzen von zwei Modulen der Firma Sartorius, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden.



**Abb. 3.5:** Membranmodule: I. Spinmodul (Vivapure Mini Spin Column), II. Sartobind-Modul

Sollen nur kleine Probenvolumina auf die Membran gegeben werden, um beispielsweise Bindungsbedingungen von Proteinen zu testen, können Module mit geringen Membranflächen verwendet werden. Eine Skizze eines solchen Moduls ist in Abbildung 3.5 links zu sehen (I.). Hierbei handelt es sich um eine sogenannte Zentrifugeneinheit oder auch Spinmodul. Die Membran befindet sich in Schichten übereinander in einem Plastikeinsatz, der wiederum in ein Mikroreaktionsgefäß eingesetzt

werden kann. Die Lösung, in der sich die zu bindenden Proteine befinden, wird in den Einsatz auf die Membran gegeben. Aufgrund der Zentrifugalkräfte läuft die Lösung beim Zentrifugieren durch die Membran und der Durchlauf wird im Mikroreaktionsgefäß aufgefangen. Bei dieser Art von Modulen lassen sich bis zu  $400 \mu\text{L}$  Lösung aufgeben. Weitere Informationen über die verwendeten Zentrifugeneinheiten finden sich in Tabelle 3.2.

Für größere Volumina kann auf sogenannte Sartobind-Module übergegangen werden. Eine Skizze dieser Modulform ist in Abbildung 3.5 auf der rechten Seite (II.) dargestellt. Diese Art der Module wird in einer anderen Weise verwendet als die kleineren Spineinheiten. Die Lösung wird hier kontinuierlich mittels einer Pumpe durch die Membran geleitet. Dadurch ist das Probenvolumen nicht begrenzt. Sartobind-Module sind mit unterschiedlichen Membranflächen erhältlich. Diese Arbeit wurde aber auf Module mit  $75 \text{ cm}^2$  Membranfläche beschränkt, da sie im Vergleich zu den Spinmodulen die zehnfache Membranfläche enthalten. Im Aufbau ähnlich ist eine weitere Art Modul, die üblicherweise als Filtrationsvorsatz Verwendung findet. Wie Sartobind-Einheiten können diese Module kontinuierlich durchflossen werden. Der Unterschied zu Sartobind-Einheiten besteht darin, dass Membranen, die aus Membranbögen ausgestanzt wurden, in die Module eingebracht werden können. Tabelle 3.2 stellt Informationen über die verschiedenen Modulformen zusammen.

**Tabelle 3.2:** Eigenschaften der verwendeten Membranmodule

	Zentrifugen- einheit	Sartobind- Modul	Filtrations- Vorsatz
Membranfläche [ $\text{cm}^2$ ]	7,48	75	bis zu 19,6
Anzahl Membranschichten	20	15	max. 4
Durchmesser Membranen [ $\text{mm}$ ]	6,9	25,2	25
max. Probenvolumen	$400 \mu\text{L}$	entfällt	entfällt
Membranfunktionalisierung	IDA, Epoxy	IDA, Epoxy	IDA, Epoxy Aldehyd

Im Pilot- oder Prozessmaßstab findet eine weitere Modulform Verwendung, das Wickelmodul. Die Membran wird nicht in Schichten übereinander gelegt, sondern aufgewickelt, dadurch ist eine stark gesteigerte Membranfläche möglich. Sie wird von innen nach außen durchströmt. Dieses Verfahren ermöglicht die Konstruktion von Modulen, die mehrere Quadratmeter Membran enthalten können.

## 3.4 Concanavalin A

*Lektin* ist ein Oberbegriff für eine Gruppe von Proteinen und Glykoproteinen, die keine enzymatische Wirkung besitzen, aber in der Lage sind, bestimmte Zuckerreste spezifisch zu binden. Zu ihnen gehört auch das Protein *Concanavalin A* (Con A). Lektine finden sich in vielen Pflanzenarten. Insbesondere sind hierbei Hülsenfrüchte von Bedeutung. Daneben kommen Lektine aber auch in tierischen Organismen bzw. Zellen vor [77]. Bereits 1919 wurde durch James B. Sumner Con A aus der Schwertbohne (*Canavalia ensiformis*) isoliert [78], inzwischen gehört es zu den am besten untersuchten Lektinen. Con A besteht aus bis zu vier Untereinheiten, die genaue Anzahl ist abhängig vom pH-Wert. Bei einem pH-Wert bis 5,5 existiert Con A als Dimer, ist der pH-Wert zwischen 5,5 und 9, liegt Con A als Tetramer vor [79]. Das Molekulargewicht des monomeren Con A liegt bei 25,5 kDa [80].

Die Bedeutung von Con A liegt vor allem in der Fähigkeit, als Tetramer Polysaccharide, Glykoproteine und Glykopeptide mit unterschiedlicher Stärke zu binden, weshalb es im Bereich der Affinitätschromatographie vielfach Anwendung findet [81]. Con A kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen, von denen eine die erwähnte Affinität zum Zucker zeigt. Diese sogenannte *locked*-Form ist in der Lage, pro Monomer zwei Metallionen zu binden. Eine Bindungsstelle bindet  $\text{Ca}^{2+}$ , die andere wird durch ein Übergangsmetallion besetzt, welches eine Affinität zu Stickstoffliganden aufweist. Beispiele hierfür sind  $\text{Zn}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$ . Die so entstandenen Komplexe sind in der Lage, Zuckerreste zu binden [82]. Daneben kann Con A auch in der *unlocked*-Form vorliegen, welche Metallionen und Zuckerreste nur sehr schwach binden kann und die vorherrschende Konformation des *nicht-metallisierten* Con A ist [83] [84]. Über den isoelektrischen Punkt (pI-Wert) von Con A finden sich in der Literatur divergierende Angaben. Entlicher et al. ermittelten 1971 für vier verschiedene Con A Komponenten die pI-Werte 4,5, 4,7, 5,0 – 5,1 und 5,4 – 5,5. Im Mittel geben sie den pI für Con A mit 5,1 an [85]. Bhattacharyya et al. veröffentlichten 1990 eine Studie, in der sie für den pI von Con A deutlich höhere Werte zwischen 6,5 und 8,35 ermittelt haben [86]. Intakten Untereinheiten von metallisiertem Con A wurde ein pI-Wert von 8,35 zugeordnet, daneben zeigten fragmentierte Untereinheiten drei Banden mit den pI-Werten 8,0, 7,8 und 7,7. Für nichtmetallisierte, intakte Con A-Untereinheiten wurde ein Wert von 6,5 als pI bestimmt.

## 3.5 Immobilisierung von Concanavalin A

### 3.5.1 Immobilisierung von Con A an Epoxymembranen

Partikel mit Epoxy-Aktivierung wie beispielsweise VA-Epoxy<sup>®</sup> werden vielfach verwendet und eignen sich gut, um Proteine kovalent zu binden. Im Folgenden soll die Anbindung von Con A an zellulosebasierte Membranen mit Epoxy-Aktivierung

optimiert werden. BSA (Bovine Serum Albumin) wird zuvor in Vorversuchen verwendet. Sofern nicht anderes angegeben, erfolgt die Bestimmung der Proteinmengen in Durchläufen sowie Wasch- und Elutionsfraktionen durch Bestimmung der UV-Absorption nach [87].

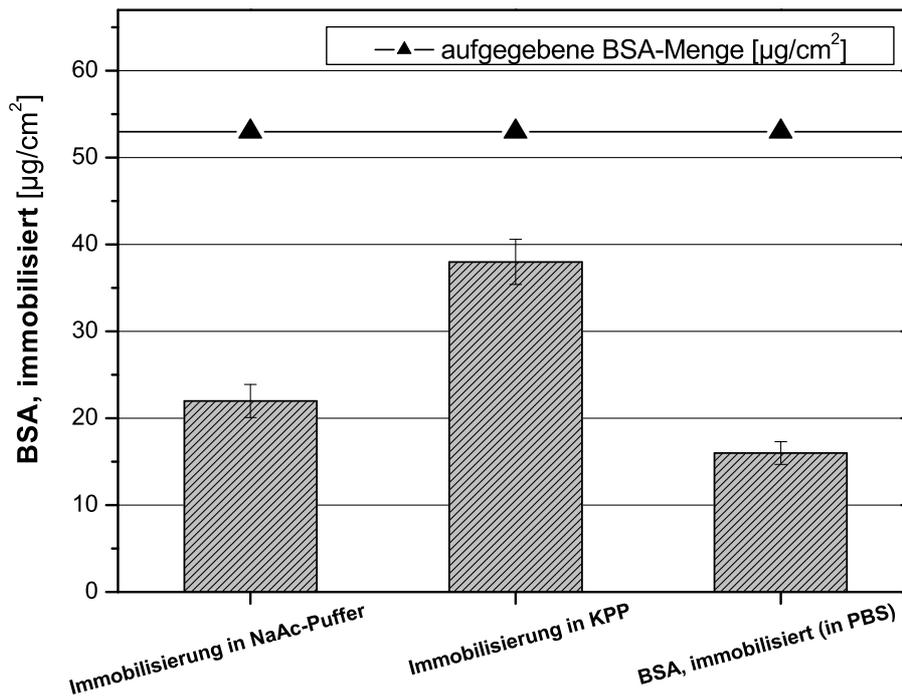
### 3.5.1.1 Vorversuche mit BSA

Zunächst werden einige Vorversuche zur Immobilisierung mit BSA in verschiedenen Bindungspuffern durchgeführt. Diese Versuche werden mit den in Kapitel 3.3 beschriebenen Spinmodulen durchgeführt und dienen dazu, die Bindungskapazitäten der Module und den Einfluss des Bindungspuffers abzuschätzen. Der mögliche Einfluss der aufgegebenen Proteinkonzentration auf die Immobilisierung wird in Kapitel 3.5.1.3 am Beispiel der Con A-Immobilisierung genauer betrachtet.

Es wurden drei verschiedene Puffersysteme zur Immobilisierung von BSA getestet: Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 8,0), PBS (0,01 M, pH 7,4) und Natriumacetatpuffer (0,1 M, pH 6,4, je 1 mmol  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ). Dabei fällt ein besonderes Augenmerk auf den Natriumacetatpuffer, da diesem Puffer Metallionen (Magnesium-, Calcium- und Manganionen) zugesetzt werden können, die Con A zur Ausbildung seiner aktiven Konformation benötigt (siehe Kapitel 3.4).

Nach der Equilibrierung der Module mit dem jeweiligen Bindungspuffer bei 4600 rpm in der Zentrifuge, wurden jeweils 0,4 mL einer 1,0 mg/mL BSA-Lösung im jeweiligen Puffersystem auf die Membran der Spineinheit gegeben. Die Module wurden bei geringer Geschwindigkeit (2.100 rpm) für 2 min zentrifugiert. Dabei lief nur zirka ein Viertel der Proteinlösung durch die Membran, diese wurde erneut zur verbliebenen Proteinlösung auf die Membran gegeben und das gesamte System für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit lief ein Teil der Proteinlösung erneut durch die Membran. Eine Verlängerung der Inkubationszeit über Nacht ist möglich, es sollte dann aber die Temperatur auf 4 °C verringert werden. Die Ergebnisse der Immobilisierung werden dabei nicht beeinflusst. Abbildung 3.6 auf Seite 29 stellt die Ergebnisse der Versuche zur Wahl des Immobilisierungspuffers für das Protein BSA dar.

In allen getesteten Puffersystem ist die kovalente Bindung von BSA an Epoxymembranen möglich. Allerdings existieren Unterschiede bei der Menge des gebundenen Proteins. Die größte Menge BSA (282 µg) wurde bei Verwendung des Phosphatpuffers gebunden, die geringste (119 µg), als PBS zur Immobilisierung eingesetzt wurde. Entsprechend schwankt die gebundene BSA-Menge bezogen auf die Membranfläche, die hier bei 7,48 cm<sup>2</sup> liegt. Wird PBS zur Immobilisierung verwendet, beträgt die gebundene BSA-Menge 16 µg/cm<sup>2</sup>, im Fall von Phosphatpuffer 38 µg/cm<sup>2</sup>. Es wird deutlich, dass die gebundenen BSA-Mengen, bezogen auf die zur Verfügung stehenden Membranfläche, relativ niedrig sind. Der Hersteller gibt Bindungskapazität



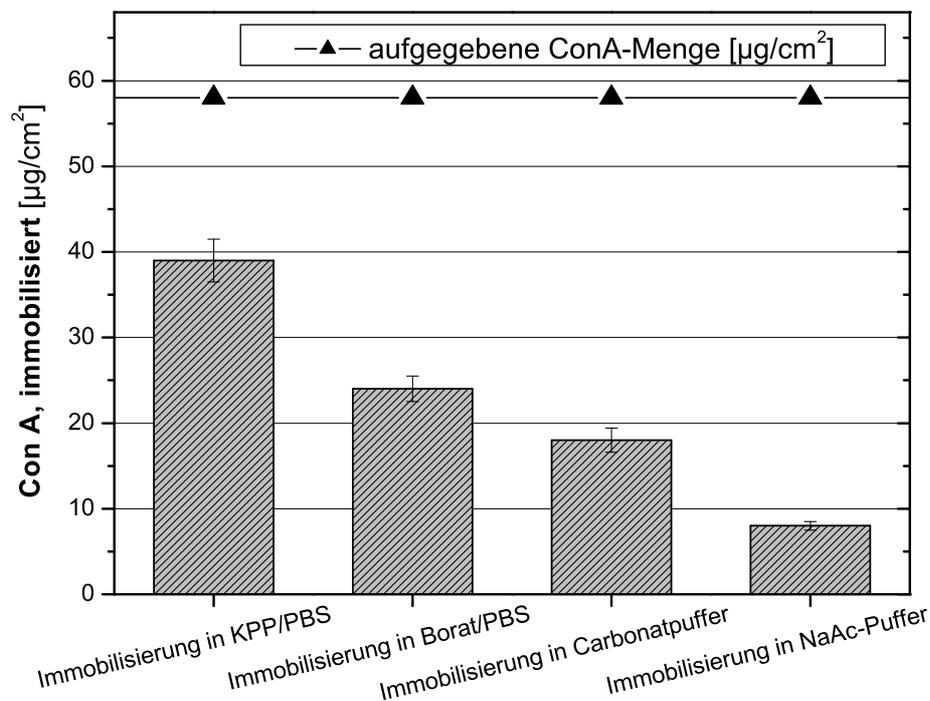
**Abb. 3.6:** Immobilisierung von BSA an Epoxy-Spinmodule - Einfluss des Bindungspuffers. Immobilisierungsbedingungen: Raumtemperatur (RT); NaAc-Puffer: pH 6, 4; KPP: pH 8, 0; PBS: pH 7, 4

zitäten im Bereich von  $30 - 150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  für Epoxymembranen an, dieses Ergebnis wird nur bei Verwendung von KPP als Bindungspuffer erreicht. Ein Einfluss des pH-Wertes des Bindungspuffers ist nicht eindeutig. Zwar zeigt sich, dass der Puffer mit dem höchsten pH-Wert das beste Ergebnis zeigt, jedoch wurde mit PBS-Puffer der den zweithöchsten pH-Wert ausweist die geringste BSA-Menge gebunden. Betrachtet man hingegen die Ionenstärke der Bindungspuffer (KPP > NaAc-Puffer > PBS), wird deutlich, dass mit sinkender Ionenstärke auch die gebundene BSA-Menge sinkt. Für Beadmaterialien finden sich in der Literatur ähnliche Ergebnisse. Hohe Salzkonzentrationen begünstigen die Wechselwirkungen zwischen epoxyaktiviertem Chromatographiematerial und den zu bindenden Proteinen. Eine Immobilisierung ist dann auch bei neutralen und leicht sauren pH-Werten möglich [88].

### 3.5.1.2 Untersuchungen zum Einfluss des Bindungspuffers bei der Immobilisierung von Con A

Auf Basis der Vorversuche mit BSA wird auch für die Immobilisierung von Con A zunächst der optimale Bindungspuffer ermittelt. Es wurden vier verschiedene Puffersysteme getestet, wobei einige Änderungen zu den Puffersystemen der Vorver-

suche vorgenommen wurden. Die Immobilisierung von Con A in KPP zeigte bessere Ergebnisse, wenn KPP 1:1 gemischt mit PBS verwendet wurde. Die getesteten Puffer wurden um zwei zusätzliche Puffersysteme erweitert. Diese Puffer mit den pH-Werten 8,5 und 9,5 sollten das Spektrum der getesteten pH-Werte in den alkalischen Bereich ausdehnen und eventuelle Einflüsse des pH-Wertes der verwendeten Puffer auf das Ergebnis der Con A-Immobilisierung verdeutlichen. Es handelt sich um Boratpuffer (0,4 M, pH 9,5), der zur Immobilisierung von Con A ebenfalls mit PBS verdünnt wurde. Weiterhin wurde der Einfluss von Carbonatpuffer (0,1 M, pH 9,0) und Natriumacetatpuffer untersucht. Das Vorgehen bei der Immobilisierung entspricht dem im Anhang angegebenen Protokoll B.4.1, mit der Ausnahme der abweichenden Puffersysteme. Zur Equilibrierung wurde der jeweils verwendete Bindungspuffer benutzt. Die Ergebnisse der Versuche zeigt Abbildung 3.7.



**Abb. 3.7:** Immobilisierung von Con A an Epoxy-Spinmodule - Optimierung des Bindungspuffers. Bindungsbedingungen: RT; KPP: pH 8,0; PBS: pH 7,4; Boratpuffer: pH 9,5; Carbonatpuffer: pH 9,0; NaAc-Puffer: pH 6,4

Wie schon bei der Immobilisierung von BSA an Epoxymembranen zeigt die Immobilisierung in Phosphatpuffer bezogen auf die gebundene Proteinmenge die besten Ergebnisse. Es konnten  $292 \mu\text{g}$  Con A gebunden werden, was  $39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  entspricht und geringfügig über den Ergebnissen für BSA liegt ( $282 \mu\text{g}$  gebunden). Die weiteren getesteten Immobilisierungspuffer zeigen schlechtere Ergebnisse, abnehmend

in der Reihenfolge:

KPP/PBS > Boratpuffer > Carbonatpuffer > Natriumacetatpuffer

Bei Verwendung des Boratpuffers können 179  $\mu\text{g}$  Con A gebunden werden, wird Carbonatpuffer verwendet, binden noch 133  $\mu\text{g}$  Con A. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Vorversuche ist aber neben der Immobilisierung in KPP nur die in NaAc-Puffer. Hier werden lediglich noch 58  $\mu\text{g}$  des Lektins gebunden, entsprechend 35,2 % der zuvor unter gleichen Bedingungen gebundenen BSA-Mengen (162  $\mu\text{g}$ ). Wie zuvor bei der Immobilisierung von BSA gilt, das mit steigender Ionenstärke des Bindungspuffers, die gebundene Proteinmenge ansteigt.

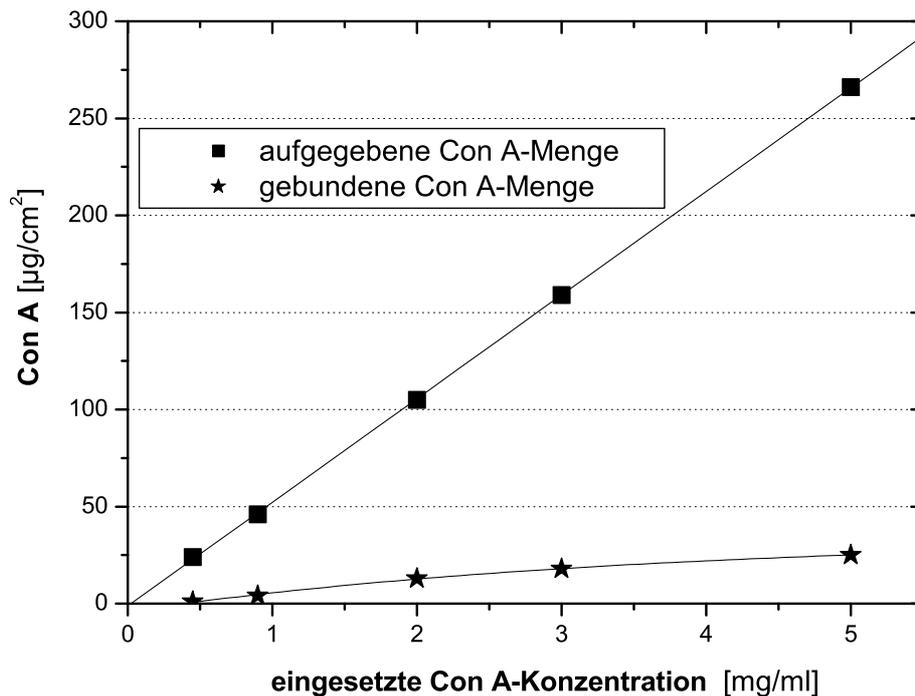
Die unterschiedlichen Ergebnisse können mit den pI-Werten von Con A und BSA erklärt werden, da die kovalente Bindung an Epoxygruppen über positiv polarisierte Kohlenstoffatome erfolgt. BSA hat einen pI-Wert von 4,7, ist also in allen zur Immobilisierung getesteten Puffern negativ geladen, was die Bindung an die gegensätzlich polarisierten Kohlenstoffatome begünstigen sollte. Im Fall von Con A hingegen gibt es, wie in Kapitel 3.4 erläutert, unterschiedliche Angaben in Bezug auf die pI-Werte. Geht man aber davon aus, dass die Ergebnisse von Bhattacharyya et al. [86] die aktuellsten Ergebnisse auf diesem Gebiet sind, ergibt sich folgendes: der pH-Wert des getesteten NaAc-Puffers (pH 6,4) liegt unter den pI-Werten des Proteins, Con A ist also positiv geladen. Die Annäherung an die ebenfalls positiv geladenen Kohlenstoffatome der Epoxygruppen wird erschwert. Trotz dieser Ergebnisse soll die Immobilisierung von Con A in NaAc-Puffer weiter verfolgt werden, da die Ausbildung der zur Bindung von Zuckerresten geeigneten Konformation durch die zugesetzten Metallionen begünstigt wird. Eine Zugabe der entsprechenden Metallionen zu den anderen getesteten Puffern ist nicht möglich. Auf die Ergebnisse zur Bindung von Glykoproteinen an Con A-Membranen wird in Kapitel 4 eingegangen.

### 3.5.1.3 Optimierung der Con A-Immobilisierung in Natriumacetatpuffer

Im vorhergehenden Kapitel wurden verschiedene Bindungspuffer auf ihre Eignung zur Immobilisierung von Con A untersucht. Dabei ergaben sich relativ geringe Beladungskapazitäten bei Verwendung von Natriumacetatpuffer. Ausschließlich diesem Puffer können die Metallionen zugesetzt werden, die für die Ausbildung der aktiven Con A-Konformation notwendig sind. Unter Umständen ist die Anwesenheit der Metallionen schon beim Immobilisierungsvorgang von Con A notwendig, um eine optimale Aktivität zur Bindung glykosilierter Proteine zu erhalten. Um bessere Vergleiche mit den anderen Puffersystemen, die diese Metallionen nicht enthalten, zu ermöglichen, soll zunächst die in Natriumacetatpuffer gebundene Con A-Menge gesteigert werden.

Zur Steigerung der Con A-Beladungsdichten kommen vor allem zwei Möglichkeiten in Betracht. Zum Einen kann die zur Immobilisierung eingesetzte Con A-

Konzentration variiert werden und zum Anderen kann mehrfach frische Proteinlösung aufgegeben werden, wodurch sich natürlich die Immobilisierungsdauer aufgrund der jeweils nötigen Inkubationszeit deutlich verlängert. In Abbildung 3.8 sind die Ergebnisse der Con A-Immobilisierung mit variierender Con A-Konzentration dargestellt. Der Ablauf der Versuche entsprach dabei dem zuvor verwendeten Standardprotokoll (siehe Anhang B.4.1). Es wurden Con A-Konzentrationen zwischen  $0,45 \text{ mg/ml}$  und  $5,0 \text{ mg/ml}$  eingesetzt.



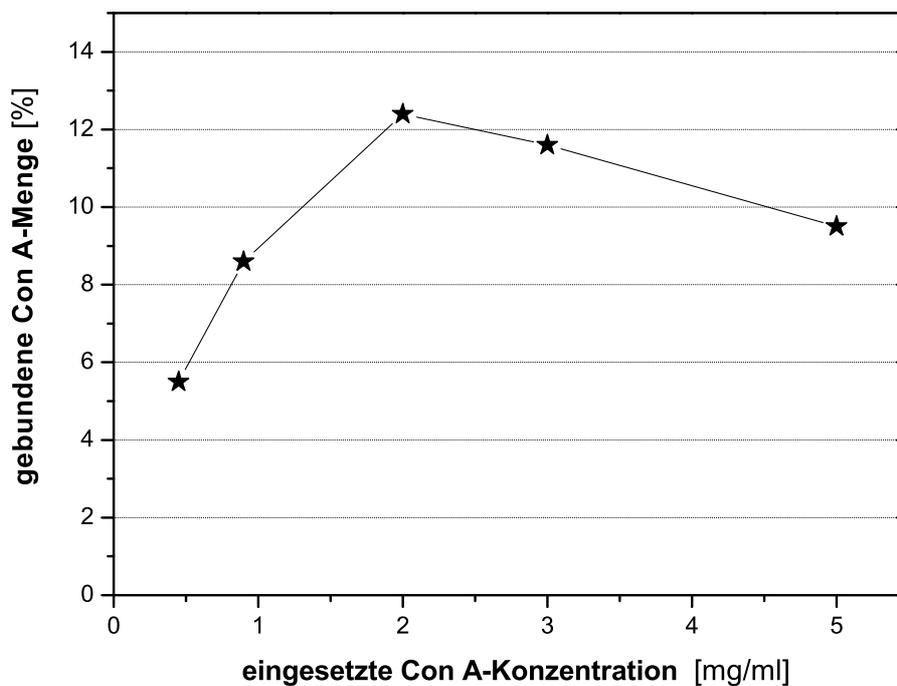
**Abb. 3.8:** Immobilisierung von Con A an Epoxymembranen - Abhängigkeit der gebundenen von der aufgegebenen Proteinmenge. Immobilisierungsbedingungen: RT, NaAc-Puffer(pH 6,4)

Die Fehler der Immobilisierungen schwanken zwischen  $9,3\%$  bei einer Konzentration  $0,45 \text{ mg/ml}$  und  $4,7\%$  bei  $3,0 \text{ mg/ml}$  Con A. In der Abbildung konnten die Fehler aufgrund der geringen Werte nicht dargestellt werden.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass eine Erhöhung der Con A-Konzentration zwar mit einer Erhöhung der immobilisierten Menge Con A einhergeht, diese Mengen aber in keinem sinnvollen Verhältnis zueinander stehen. Die absolut gebundene Menge bleibt mit maximal gebundenen  $190 \mu\text{g}$  bei einer eingesetzten Menge von  $2000 \mu\text{g}$  (Con A-Konzentration  $5,0 \text{ mg/ml}$ ) sehr niedrig.

Bei einer Erhöhung der eingesetzten Con A-Konzentration von  $0,45 \text{ mg/ml}$  auf  $2,0 \text{ mg/ml}$  steigt neben der absolut gebundenen Menge auch der prozentuale An-

teil von 5,5 % über 8,6 % auf 12,4 % an. Wird die Con A-Konzentration weiter erhöht, steigt die absolut gebundene Con A-Menge zwar weiter an, dieser Anstieg ist aber nicht proportional zur aufgegebenen Menge. Der Anteil des immobilisierten Con A sinkt über 11,6 % auf 9,5 % bei einer eingesetzten Konzentration von 5,0 mg/mL. Abbildung 3.9 stellt diese Zusammenhänge grafisch dar.



**Abb. 3.9:** Anteil der gebundenen Con A-Menge in Abhängigkeit von der eingesetzten Con A-Konzentration. Immobilisierungsbedingungen: RT, NaAc-Puffer (pH 6, 4)

Es ist offensichtlich nicht möglich, durch eine Erhöhung der Con A-Konzentration die Beladungsdichte der Epoxymembran sinnvoll zu steigern. Werden hohe Ausgangskonzentrationen eingesetzt, sinkt der prozentuale Anteil des gebundenen Con A wieder. Ursache für die niedrigen Bindungskapazitäten ist wahrscheinlich, dass die Con A-Moleküle durch ihre hohe Konzentration nicht zu den Bindungsstellen in der Membran gelangen können. Im ersten Schritt der Immobilisierung wird die Proteinlösung durch die Membran zentrifugiert. Dabei verbleibt eine bestimmte Menge Con A in den Membranporen und kann dort binden. Der weitaus größere Teil muss hingegen durch Diffusion während der Inkubationszeit zu den Bindungsstellen gelangen, da die Proteinlösung nur in geringen Maße durch die Membran durchläuft.

Ein anderer Ansatz zur Steigerung der Beladungsdichte der Epoxymembran mit Con A ist die mehrfache hintereinander durchgeführte Immobilisierung. Dabei wird

der normale Immobilisierungszyklus, wie er schon vorher angewandt wurde, durchlaufen. Nach der Inkubationszeit der Proteinlösung wird die Membran mit Immobilisierungspuffer gewaschen und im Anschluss erneut Proteinlösung aufgegeben und entsprechend inkubiert. Betrachtet man die Ergebnisse aus den vorhergehenden Versuchen, sollte vor allem bei geringen Con A-Konzentrationen die Beladungsdichte gesteigert werden können. Die Versuche wurden weiterhin mit den zuvor verwendeten Ausgangskonzentrationen zwischen  $\sim 0,5 \text{ mg/mL}$  und  $5,0 \text{ mg/mL}$  durchgeführt. Eine deutliche Verbesserung der gebundenen Con A-Menge konnte jedoch nicht erreicht werden. Wird die Membran ein zweites Mal mit Con A-Lösung beladen, ist nach Beendigung der Inkubationszeit festzustellen, dass die Membranen der Spineinheiten, welche mit Konzentrationen von  $2,0 \text{ mg/mL}$  bis  $5,0 \text{ mg/mL}$  beladen wurden, verblocken. Die Con A-Moleküle binden vermutlich vorrangig in den großen Poren der Membranen oder auf der Oberfläche der obersten Membran (siehe auch Kapitel 3.12). Ein vollständiges Abzentrifugieren der Proteinlösung ist nur bei sehr starker Steigerung der Zentrifugationsgeschwindigkeit ( $10.000$  statt  $2.000 \text{ rpm}$ ) und der Zentrifugationsdauer (insgesamt bis zu  $6 \times 10 \text{ min}$  statt  $5 \text{ min}$ ) möglich, was dazu führt, dass kein Protein gebunden wird und darüber hinaus durch die starken Zentrifugalkräfte Con A, welches im ersten Immobilisierungszyklus (unspezifisch) gebunden wurde, von der Membran gelöst wird. Die Ergebnisse für die Ausgangskonzentrationen  $\sim 0,5$  und  $\sim 1,0 \text{ mg/mL}$  sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

**Tabelle 3.3:** Mehrfache Immobilisierung von Con A an Epoxy-Spineinheiten

Konzentration [ $\text{mg/mL}$ ]	Immobilisierungs- zyklus	Con A, aufgegeben [ $\mu\text{g}$ ]	Con A, gebunden [ $\mu\text{g}$ ]	[%]
$\sim 0,5$	1	178	10	5,5
	2	232	78	33,7
	3	Membran verblockt		
$\sim 1,0$	1	345	30	8,6
	2	451	108	24,0
	3	Membran verblockt		

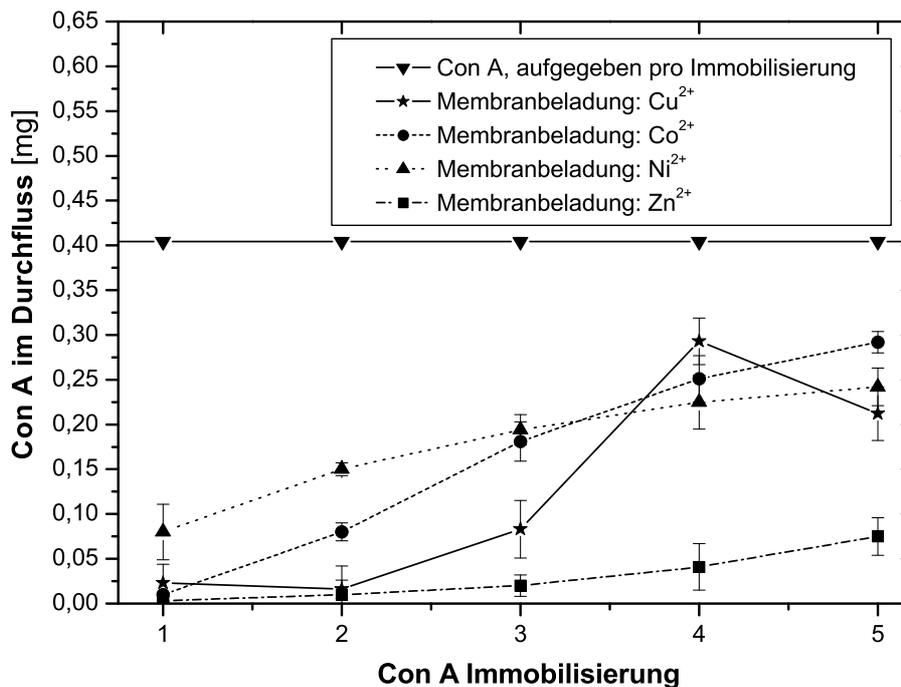
Bei niedrigen Con A-Konzentrationen zeigen sich für die zweite Immobilisierung zunächst deutliche Steigerungen der gebundenen Con A-Menge. So konnten bei einer Ausgangskonzentration von  $\sim 0,5 \text{ mg/mL}$  Con A im zweiten Zyklus  $78 \mu\text{g}$  gebunden werden, was im Vergleich zum ersten Zyklus einer Steigerung um  $780 \%$  entspricht. Ähnliches gilt für eine Ausgangskonzentration von  $\sim 1 \text{ mg/mL}$ . Hier

wurden im ersten Zyklus  $30 \mu\text{g}$ , im zweiten  $108 \mu\text{g}$  Con A gebunden, was einer Steigerung von 360 % entspricht. Zum zweiten Immobilisierungszyklus bleibt anzumerken, dass die Zentrifugationsdauer und -geschwindigkeit im Vergleich zum ersten Zyklus gesteigert werden musste. Allerdings reicht eine Erhöhung der Dauer auf  $10 \text{ min}$  aus, während die Geschwindigkeit auf  $4.600 \text{ rpm}$  gesteigert wurde. Auch bei geringen Con A-Konzentrationen werden nachfolgende Immobilisierungsschritte deutlich erschwert. Eine dritte Immobilisierung wurde im Anschluss durchgeführt, hier kam es allerdings wie zuvor schon bei hohen Con A-Konzentrationen zur Verblockung der Membran, Beladungen konnten daher nicht ermittelt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Erhöhung der zur Immobilisierung eingesetzten Con A-Konzentration zu einer Steigerung der gebundenen Menge führt. Allerdings ist der Anteil des gebundenen Con A immer noch sehr gering (maximal werden  $12,4 \%$  gebunden), so dass diese Herangehensweise nicht sinnvoll erscheint. Durch die mehrfache Immobilisierung von Con A ergibt sich eine Verbesserung der Beladungskapazitäten. Allerdings tritt insbesondere bei hohen Ausgangskonzentrationen eine Verblockung der Membranen auf. Dieser Effekt kann sich später auch negativ auf die eigentliche Trenaufgabe der Membran auswirken. Hier wird erneut proteinhaltige Lösung aufgegeben und die zu reinigenden Proteine werden von den Con A-Moleküle gebunden. Weitere Schritte zur Verbesserung der Con A-Beladungsdichte, insbesondere die Veränderung der Pufferzusammensetzung (Verdünnen des NaAc-Immobilisierungspuffers mit Wasser oder PBS, Verzicht auf Metallionenzugabe), führten ebenso zu keinen positiven Ergebnissen.

### 3.5.2 Immobilisierung von Con A an IDA-Membranen

Neben epoxyaktivierten Membranen stellen metallchelatisierende Membranen, wie sie in Kapitel 3.4 beschrieben wurden, eine Möglichkeit dar, Con A über natürlich vorkommende Histidinzentren zu binden. Die hier verwendeten Membranen tragen Iminodiacetatgruppen als Derivatisierung. Für die Metallbeladung werden verschiedene Metalle getestet. In Frage kommen Nickel-, Zink-, Kupfer- oder Cobaltionen. Im Gegensatz zu den epoxyaktivierten Membranen wird keine Pufferoptimierung durchgeführt. Die Immobilisierung von Con A erfolgt in Natriumacetat-Aktivierungspuffer, der pH-Wert beträgt  $6,4$ , ist also leicht sauer. Gegenüber anderen Puffern (mit höheren pH-Werten) besteht aber der Vorteil, dass die für die Strukturbildung von Con A benötigten Metallionen zugesetzt werden können. Neben dem Einfluss der Metallionen, mit denen die Membranen beladen werden, soll auch die wiederholte Aufgabe einer gleich konzentrierten Con A Lösung betrachtet werden. Auf diese Weise werden die maximal möglichen Beladungskapazitäten bestimmt. Die Versuchsprotokolle zur Immobilisierung von Con A an IDA-Spinmodule sind im Anhang B.5.1 angegeben. Es wurde eine  $\sim 1,0 \text{ mg/mL}$  Con A Lösung verwendet. Die Bestimmung der gebundenen Proteinmenge erfolgt durch

Absorptionsmessung bei 280 nm als Differenzmessung zwischen der eingesetzten Lösung und der Summe von Durchlauf und Waschfraktionen nach [87]. In Abhängigkeit von der Metallionenbeladung ergeben sich die in Abbildung 3.10 dargestellten Ergebnisse. Neben den Proteinkonzentrationen im Durchlauf ist auch die jeweils aufgebene Proteinmenge angegeben.



**Abb. 3.10:** Immobilisierung von Con A an metallchelatisierenden IDA-Membranen - Einfluss der Metallionenbeladung bei mehrfacher Proteinaufgabe. Immobilisierungsbedingungen: RT, NaAc-Puffer (pH 6, 4)

Aus der Abbildung wird deutlich, dass die Mengen des immobilisierten Con A in Abhängigkeit von der Metallionenbeladung differieren. Zwar sind bei der ersten Beladung die Proteinmengen im Durchlauf mit Ausnahme der Membran mit Nickelbeladung annähernd gleich und es werden zwischen 80 % (Nickelbeladung) und 99 % (Zink-, Cobaltbeladung) des aufgegebenen Proteins immobilisiert. Bei weiteren Beladungen zeigen sich aber deutliche Unterschiede. Erwartungsgemäß steigen die Proteinkonzentrationen im Durchlauf unabhängig von der Metallionenbeladung der Membran an. Am geringsten fällt dieser Anstieg für die Zinkmembran aus, es werden auch bei der fünften Beladung noch 81 % des aufgegeben Con A gebunden. Bei den anderen Membranen liegt der Anteil der gebundenen Proteinmengen bei der fünften Immobilisierung zwischen 63 % (Kupfer) und 28 % (Cobalt). Auffällig ist, dass vor allem bei Nickelbeladung die Proteinkonzentration im Durch-

lauf einem Sättigungswert zustrebt, ohne die Ausgangskonzentration zu erreichen. Es wird also weiterhin ein bestimmter Anteil des aufgegebenen Proteins gebunden. Diese Bindung ist wahrscheinlich unspezifisch. Entsprechendes gilt für Membranen mit Cobaltbeladung, hier wurde im weiteren Versuchsablauf ein deutlicher Anteil der gebundenen Proteine durch Waschpuffer eluiert, insgesamt  $460 \mu\text{g}$  von zunächst insgesamt  $1211 \mu\text{g}$  gebundenen Con A.

Bei einer Beladung mit Kupferionen kommt es zu keinem kontinuierlichen Anstieg der Proteinkonzentration im Durchlauf. Die Konzentration im zweiten und fünften Durchlauf ist geringer, als im jeweils vorhergehenden, es wurde also eine größere Menge gebunden. Für den zweiten Messpunkt gilt aber, dass der Wert ( $16 \mu\text{g}$  Con A im Durchlauf) nur geringfügig unter dem des ersten Durchlaufs liegt ( $23 \mu\text{g}$ ). Die Messungenauigkeit ist größer als die Differenz der beiden Werte. Bei den nächsten beiden Messpunkten kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Con A-Konzentration im Durchlauf, es werden im vierten Immobilisierungszyklus nur noch 27 % der aufgegebenen  $404 \mu\text{g}$  gebunden. Man kann davon ausgehen, dass hier die maximale Bindungskapazität der Membran annähernd erreicht wurde. Entgegen der Erwartung sank die Con A-Konzentration im fünften Durchlauf erneut, es wurde also wieder eine größere Anzahl Con A-Moleküle gebunden. Hier handelt es sich allerdings um unspezifische Bindungen, die durch Überladung des Spinmoduls hervorgerufen werden [89]. Bei den nachfolgenden Waschrissen zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurden  $160 \mu\text{g}$  des zuvor gebundenen Con A eluiert. Im Unterschied zu den bereits diskutierten Membranen, steigt die Produktkonzentration für zinkbeladene Membranen im Durchlauf nur langsam an.

Betrachtet man die Gesamtmenge des über fünf Immobilisierungen gebundenen Con A, ergeben sich die in Tabelle 3.4 (siehe S. 38) angegebenen Werte. Zur Bestimmung dieser Menge wurde auch die Proteinkonzentrationen in den Waschfraktionen berücksichtigt. Vor allem bei cobalt- und kupferbeladenen Membranen ergibt sich ein großer Einfluss auf die Gesamtmenge des gebundenen Con A. Ursache sind die bereits angesprochenen unspezifischen Bindungen des Con A, die bei der Zentrifugation der Proteinlösung entstehen und durch anschließende Waschzyklen wieder gelöst werden. In den Waschfraktionen der nickel- und zinkbeladenen Membranen ist im Rahmen der Fehlergrenzen kein Protein nachweisbar. Die angegebenen Fehler wurden entsprechend des Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet.

Es wird deutlich, dass in Abhängigkeit von der Metallionenbeladung deutlich unterschiedliche Proteinmengen gebunden werden. Die schlechtesten Ergebnisse erhält man bei der Beladung mit Cobaltionen, hier werden lediglich 37,2 % der eingesetzten Con A-Mengen gebunden. Bei einer Beladung mit Zinkionen steigt dieser Anteil auf über 92 %. Vergleicht man die erreichten Beladungsdichten der verschiedenen IDA-Membranen mit denen für die Epoxymembranen, erkennt man

**Tabelle 3.4:** Con A-Beladungskapazitäten von IDA-Spinmodulen in Abhängigkeit von der Metallionenbeladung. Gesamtmengen nach fünf hintereinander durchgeführten Beladungen

Metallion	Con A, aufgegeben	Con A, gebunden		
	[mg]	[mg]	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	[%]
Cobalt	2,022	$0,751 \pm 0,072$	$101 \pm 9,6$	37,2
Nickel	2,022	$1,138 \pm 0,106$	$153 \pm 14,2$	55,9
Kupfer	2,022	$1,238 \pm 0,119$	$167 \pm 15,9$	61,2
Zink	2,022	$1,872 \pm 0,092$	$253 \pm 12,3$	92,6

das große Bindungspotenzial der metallchelatisierenden Membranen. Während bei Epoxymembranen in Abhängigkeit vom Immobilisierungspuffer zwischen  $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Immobilisierung in Natriumacetatpuffer) und  $39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Immobilisierung in Phosphatpuffer) Con A gebunden werden können und weitere Immobilisierungszyklen zur Verblockung der Membran führen, beträgt die Beladungsdichte für Con A bei IDA-Membranen zwischen  $101 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Cobaltbeladung) und  $253 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Zinkbeladung). Die erreichten Bindungskapazitäten liegen in dem vom Hersteller angegebenen Bereich. Dieser gibt mögliche Beladungsdichten mit  $> 100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  an. Zu einer Verblockung kommt es auch bei mehrfacher Proteinaufgabe nicht. Ein Grund für die verschiedenen Beladungsdichten liegt in der unterschiedlichen Porengröße der Membranen. Während Epoxymembranen eine Porengröße von  $0,45 \mu\text{m}$  haben, beträgt diese bei metallchelatisierenden IDA-Membranen über  $3 \mu\text{m}$ . Aufgrund dieser größeren Poren können Con A-Moleküle besser in die Poren eindringen und binden. Es ist ausreichend Platz für eine größere Molekülanzahl, ohne dass die Poren zugesetzt werden. Eine weitere mögliche Ursache ist, dass die Spacer über welche die funktionellen Gruppen, in diesem Fall Epoxy- und IDA-Gruppen, an die Membran gebunden sind, ebenfalls Einfluss auf die Bindungskapazitäten der Membranen haben (z.B. Länge der Spacer, Einfluss auf die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen). Bei den vorliegenden Membranen ist über die Art der verwendeten Spacer nichts bekannt, so dass über deren Einfluss nur spekuliert werden kann.

### 3.5.3 Immobilisierung von Con A an Aldehydmembranen

Der Einsatz von Aldehydmembranen stellt ein weitere Möglichkeit dar, Proteine zu binden und auf diese Weise Affinitätsmembranen herzustellen. Zwei verschiedene Membranen wurden getestet, Hersteller sind die *Sartorius AG* und die *PALL Corporation*. Beide Membranen lagen als Bogen vor, die Versuche zur Immobilisierung von BSA und Con A wurden daher mit runden Membranstücken (Membranfläche:  $4,9 \text{ cm}^2$ ) in Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt. Zu den Membranstücken wurden

jeweils 2 mL BSA bzw. Con A-Lösung der Konzentration 1 mg/mL in Immobilisierungspuffer gegeben. Mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) und Natriumacetatpuffer (pH 6,5) wurden zwei verschiedene Puffersysteme getestet, die weiteren Immobilisierungsbedingungen waren Raumtemperatur bzw. 4 °C. Die eine Hälfte der Reaktionsgefäße wurde bei 750 rpm geschüttelt, während die andere Hälfte nicht geschüttelt wurde. Weiterhin wurden Versuche zur Immobilisierung im Kreistrom bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min mit ausgestanzten Membranen in Filtrationsvorsätzen durchgeführt. Keiner dieser verschiedenen Immobilisierungsansätze führte zu einem positiven Ergebnis. Die Ursache liegt vermutlich in der relativ instabilen Bindung der Proteine über Schiff'sche Basen (vgl. Kapitel 3.2). Die Herstellung von Con A-Membranen auf Basis aldehydaktivierter Membranen wurde daher nicht weiter verfolgt.

### 3.6 Immobilisierung von Enzymen an metallchelatisierenden Membranen

Neben der Modifizierung von IDA-Membranen durch Con A, welches die anschließende Bindung glykosilierter Proteine erlaubt, ist die Modifizierung von Membranen durch das Aufbringen von Enzymen von Interesse. Durch diese Modifizierungsvariante kann ein Einsatz der vorliegenden Membranmodule als Festbettreaktor zur Umsetzung entsprechender Substrate getestet werden. Es handelt sich in diesem Fall um einen Kontaktor, der bereits in Kapitel 2.3.2 beschrieben wurde. Auch bei der Verwendung als Festbettreaktor zeigen sich die für Membranen typischen Vorteile, wie beispielsweise der im Vergleich zu herkömmlichen Säulen geringe Druckabfall (vgl. Kapitel 2.3.3).

Durch die Verwendung von Zentrifugeneinheiten ist die Möglichkeit gegeben, im Rahmen eines Screenings verschiedene Parameter innerhalb kurzer Zeit parallel zu bestimmen und somit eine Verkürzung der Entwicklungszeit zu erreichen. Zu diesen Parametern gehören die Bindungsbedingungen für das gewünschte Enzym, aber auch die Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen enzymatischer Reaktionen. In Kapitel 5.2 werden die Möglichkeiten, Spinmodule im Screening einzusetzen detailliert diskutiert.

Die Versuche zur Bindung von Enzymen werden im Gegensatz zur Immobilisierung von Con A ausschließlich mit metallchelatisierenden Membranen durchgeführt. An diese Membranen werden Proteine nicht dauerhaft gebunden, ein weiterer Vorteil ergibt sich durch die Wiederverwendbarkeit der Module.

### 3.6.1 Modellenzyme zur Immobilisierung an IDA-Membranen

Um die metallchelatisierenden Membranen als Matrix für Enzymreaktoren einsetzen zu können, ist es von Bedeutung, dass die Bindung möglichst vieler verschiedener Enzyme aus unterschiedlichen Enzymklassen möglich ist. Aus diesem Grund wird zunächst exemplarisch das Bindungsverhalten von sieben verschiedenen Enzymen aus drei Enzymklassen bestimmt. Eine Zusammenstellung dieser Enzyme findet sich in Tabelle 3.5.

**Tabelle 3.5:** Modellenzyme zur Immobilisierung an metallchelatisierende IDA-Membranen

Enzym- klasse	Enzym	EC- Nummer	Molekular- gewicht [kDa]	pI-Wert	Referenz
Oxido- reduktasen	Alkohol- Dehydrogenase (ADH)	1.1.1.1	141 – 152	5, 4 – 5, 8	[90] [91] [92]
	Glukoseoxidase (GOD)	1.1.3.4	80	4, 2	[93] [94]
Hydrolasen	$\beta$ -Galactosidase	3.2.1.23	135	4, 2	[95] [96]
	Invertase	3.2.1.26	270	3, 4 – 4, 4	[97] [98]
	$\alpha$ -Chymotrypsin	3.4.21.1	25	8, 75	[99] [100]
	Alcalase	3.4.21.62	27 – 36	9, 4	[101] [102]
Lyasen	Glutamat- Decarboxylase (GAD)	4.1.1.15	310	5, 3 – 5, 8	[103] [104]

### 3.6.2 Bestimmung der optimalen Bindungsbedingungen für Enzyme an IDA-Spinmodule

Ähnlich der Bindung von Con A an metallchelatisierende Membranen wurden auch für die Bindung von Enzymen verschiedene Einflussfaktoren untersucht. Neben der Metallionenbeladung spielt vor allem der Bindungspuffer eine wichtige Rolle. Für die Bindung von Enzymen kamen daher neben dem schon zur Immobilisierung von Con A verwendeten NaAc-Puffer (0, 1 M, pH 6, 4), Kaliumphosphatpuffer (0, 1 M, pH 7) und PBS-Puffer (0, 01 M, pH 7, 4) zum Einsatz. Die Vorgehensweise zur Immobilisierung der Enzyme entsprach der Vorgehensweise zur Bindung von Con A (siehe Anhang B.5.1). Die jeweils eingesetzte Enzymkonzentration betrug 1, 0 mg/mL,

es wurde ein Immobilisierungszyklus durchgeführt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in Durchläufen und Waschfraktionen und daraus folgend der gebundenen Enzymmengen wurde der Bradfordtest verwendet (siehe Anhang B.1). Die Ergebnisse der Versuche mit den genannten Modellenzymen sind in Tabelle 3.6 auf Seite 42 angegeben. Die Mengen des jeweils gebundenen Enzyms sind dabei in  $\mu\text{g}/\text{Spinmodul}$  angegeben, die Kombination aus Metallionenbeladung und Bindungspuffer, die das jeweils beste Ergebnis zeigt, ist hervorgehoben.

Die Fehler der Messungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in der Tabelle nicht angegeben, sie liegen zwischen 2 % ( $\beta$ -Galactosidase, NaAc-Puffer, Kupferbeladung) und 8 % (ADH, PBS, Nickelbeladung). Zur Berechnung der Fehler wurde das Gauß'sche Fehlerfortpflanzungsgesetz angewandt.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die jeweils optimalen Immobilisierungsbedingungen für jedes Enzym unterschiedlich sind. Es lässt sich aber feststellen, dass bei allen getesteten Enzymen das beste Immobilisierungsergebnis bei einer Beladung der Membran mit Kupferionen erreicht wurde. Daneben hat erwartungsgemäß der verwendete Immobilisierungspuffer Einfluss auf die Menge des gebundenen Enzyms. Hier zeigt sich, dass für fünf Enzyme die Immobilisierung in NaAc-Puffer zum besten Ergebnis führt, in allen Fällen in Kombination mit Kupferbeladung (ADH, GOD,  $\beta$ -Galactosidase, Invertase und Glutamat-Decarboxylase). Die Kombination aus Kupferbeladung und PBS ergibt bei der Immobilisierung von Alcalase und  $\alpha$ -Chymotrypsin im Vergleich das beste Ergebnis. Für die Bindung von  $\beta$ -Galactosidase werden ebenfalls gute Ergebnisse bei einer Beladung mit Nickel oder Zink und KPP als Bindungspuffer erzielt (265  $\mu\text{g}$  bzw. 263  $\mu\text{g}$  wurden gebunden). Die Beladung mit Kupfer bei gleichzeitiger Verwendung von NaAc-Puffer als Immobilisierungspuffer zeigt ein nur wenig besseres Ergebnis, 267  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Galactosidase wurden gebunden.

In Kapitel 3.4 wurde bereits die Möglichkeit erwähnt, die Selektivität von IDA-Gruppen durch die Metallionenbeladung zu steuern, was auch hier eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Immobilisierungen ist. Während bei einer Kupferbeladung nur eine Histidingruppe zur Bindung benötigt wird, sind bei Nickelbeladung zwei Histidingruppen beliebiger Anordnung und bei Zinkbeladung zwei benachbarte Gruppen notwendig [72] [73]. Der Einfluss des Bindungspuffers muss ebenfalls diskutiert werden. Bei gleicher Metallionenbeladung führen die verschiedenen getesteten Bindungspuffer zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Ein Beispiel hierfür ist die Immobilisierung von GOD. Während bei Kupferbeladung mit NaAc-Puffer das beste Ergebnis erzielt wurde, konnte bei einer Beladung mit Cobalt oder Nickel GOD mit diesem Bindungspuffer nicht gebunden werden. Der Grund hier ist die oben erwähnte Selektivität durch die Metallionenbeladung. Der Einfluss des Bindungspuffers wird vor allem bei der Cobaltbeladung deutlich.

**Tabelle 3.6:** Optimierung der Bindungsbedingungen verschiedener Modellenzyme an metallchelatisierende IDA-Membranen. Die jeweils aufgeführte Proteinmenge betrug 400  $\mu\text{g}$

Enzym	Puffer- system	Metallionenbeladung			
		Cobalt	Nickel	Kupfer	Zink
gebundenes Enzym [ $\mu\text{g}/\text{Spinmodul}$ ]					
ADH	NaAc	106	147	<b>386</b>	223
	KPP	105	80	311	38
	PBS	59	96	323	83
GOD	NaAc	-	-	<b>320</b>	11
	KPP	6	-	18	124
	PBS	93	72	177	76
$\beta$ -Galactosidase	NaAc	111	117	<b>277</b>	107
	KPP	83	265	85	263
	PBS	53	73	251	54
Invertase	NaAc	16	25	<b>322</b>	146
	KPP	8	73	224	28
	PBS	-	34	187	-
Alcalase	NaAc	-	-	298	-
	KPP	8	13	244	8
	PBS	19	57	<b>317</b>	-
$\alpha$ -Chymotrypsin	NaAc	61	-	233	-
	KPP	-	-	81	-
	PBS	29	73	<b>384</b>	52
GAD	NaAc	150	125	<b>368</b>	199
	KPP	82	93	262	61
	PBS	120	126	339	142

Mit steigendem pH-Wert des Bindungspuffers von NaAc-Puffer (pH 6, 4) zu PBS (pH 7, 4) vergrößert sich die negative Ladung der GOD-Moleküle und gleichzeitig steigt die gebundene Enzymmenge, die jedoch gering bleibt. Dieser Anstieg ist daher vorrangig auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen und nicht auf die beabsichtigte Bindung über Histidengruppen. Da sich für jedes Enzym unterschiedliche Ergebnisse bei der Optimierung der Bindungsbedingungen ergeben, ist eine individuelle Diskussion der jeweiligen Ergebnisse notwendig.

Bei der Wahl der Immobilisierungsbedingungen spielen also sowohl die Beladung der Membran mit Metallionen, als auch der Immobilisierungspuffer eine wichtige Rolle. Die Wahl des Puffers sollte darüber hinaus noch die weitere Verwendung der enzymbeladenen Membran berücksichtigen, also in welchem Puffersystem eine Umsetzung von Substraten erfolgen soll. Verdeutlicht wird dieses durch das folgende Beispiel, bei dem  $\beta$ -Galactosidase an eine kupferbeladene Membran gebunden wurde (Aufgabe von  $400 \mu\text{L}$ ,  $c = 2,0 \text{ mg/mL}$ ). Nach der Immobilisierung in NaAc-Bindungspuffer und anschließenden Waschschritten mit dem gleichen Puffer, wurde bei einem folgenden Waschzyklus das Puffersystem gewechselt. Es wurden zwei Mal je  $400 \mu\text{L}$  KPP aufgegeben und bei  $5.700 \text{ rpm}$  für  $5 \text{ min}$  zentrifugiert. Die gebundene Enzymmenge wurde mittels Bradfordtest ebenso bestimmt wie der Proteingehalt der KPP-Fractionen nach dem Zentrifugieren (Durchführung siehe Anhang B.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

**Tabelle 3.7:** Elution von immobilisierter  $\beta$ -Galactosidase durch KPP von IDA-Membranen

	Puffersystem	Proteinmenge [ $\mu\text{g}$ ]	Anteil [%]
$\beta$ -Galactosidase, gebunden	NaAc-Puffer	523 ( $\pm 25$ )	100
Waschzyklus II, $\beta$ -Galactosidase, ausgewaschen	KPP	425 ( $\pm 10$ )	81,3

Aus den in Tabelle 3.7 angegebenen Werten ergibt sich, dass  $\beta$ -Galactosidase zwar erwartungsgemäß mit guten Ergebnissen an die kupferbeladene IDA-Membran gebunden werden kann, die Waschschrritte mit KPP im Anschluss an die erfolgreiche Immobilisierung aber zur Ablösung des Enzyms von der Membran führen. 81,3 % des Enzyms werden ausgewaschen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der  $\beta$ -Galactosidase-Immobilisierung, die in Tabelle 3.6 angegeben sind. Bei einer Beladung mit Kupfer konnten bei gleichzeitiger Verwendung von KPP als Immobilisierungspuffer nur geringe Mengen ( $85 \mu\text{g}$  pro Spinmodul bei Aufgabe von  $400 \mu\text{g}$  Enzym) gebunden werden.

Die Ursache ist auch hier der bereits angesprochene Einfluss des Bindungspuffers auf das Immobilisierungsergebnis. Dabei ist nicht nur der pH-Wert des Puffers ein Einflussfaktor, sondern beispielsweise auch die Ionenstärke. Immobilisierungspuffer wird in vielen Fällen NaCl zur Erhöhung der Ionenstärke zugesetzt. Dadurch können elektrostatische Wechselwirkungen, also Anziehung oder Abstoßung zwischen IDA-Gruppen und Protein vermieden werden. Bei sehr hohen Ionenstärken werden diese Wechselwirkungen allerdings verstärkt [29]. Der in den Waschfraktio-

nen verwendete KPP weist eine im Vergleich zu den anderen getesteten Pufferlösungen eine sehr hohe Ionenstärke auf, was hier zu niedrigen Bindungskapazitäten und der Elution von  $\beta$ -Galactosidase führt.

Sollen also Enzyme an IDA-Membranen gebunden werden, um im Anschluss Substrate umzusetzen, sollte, um eine Elution der gebundenen Enzyme aufgrund von Puffereigenschaften zu vermeiden, die Immobilisierung möglichst im gleichen Puffersystem durchgeführt werden wie die anschließende enzymatische Reaktion.

### 3.6.3 Einfluss der aufgegebenen Proteinkonzentration auf die Proteinimmobilisierung

Für die Con A-Bindung an IDA-Membranen wurden in Kapitel 3.5.2 die Effekte diskutiert, die sich ergeben, wenn Proteinlösung der gleichen Konzentration mehrfach nacheinander auf die Membran gegeben wird. Darüber hinaus übt auch die Konzentration der aufgegebenen Proteinlösung Einfluss auf die gebundene Enzymmenge aus.

Der Hersteller macht keine Angaben über die Menge der in den Membranporen vorliegenden IDA-Bindungsstellen. Jedoch konnten in Kapitel 3.5.2 bis zu  $\sim 1,8 \text{ mg}$  Con A an ein IDA-Spinmodul gebunden werden. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die zur Verfügung stehende Anzahl von Bindungsstellen ziehen.

Werden niedrige Proteinmengen aufgegeben, kann davon ausgegangen werden, dass die Bindungsstellen der Membran im Überschuss vorliegen. Für die Immobilisierung von Proteinen an IDA-Membranen kann in diesen Fällen eine Reaktion erster Ordnung angenommen werden. Da die experimentelle Bestimmung des Verweilzeitverhaltens von Spinmodulen aufgrund der Bauart der Module nicht möglich ist, wird weiterhin davon ausgegangen, dass das Reaktorverhalten der Spinmodule näherungsweise durch ein Strömungsrohr beschrieben werden kann. In diesem Fall gilt für den Umsatz der Reaktion Gleichung 3.1.

$$U = 1 - e^{-k \cdot \tau} \quad (3.1)$$

mit:

$U$  : Umsatz

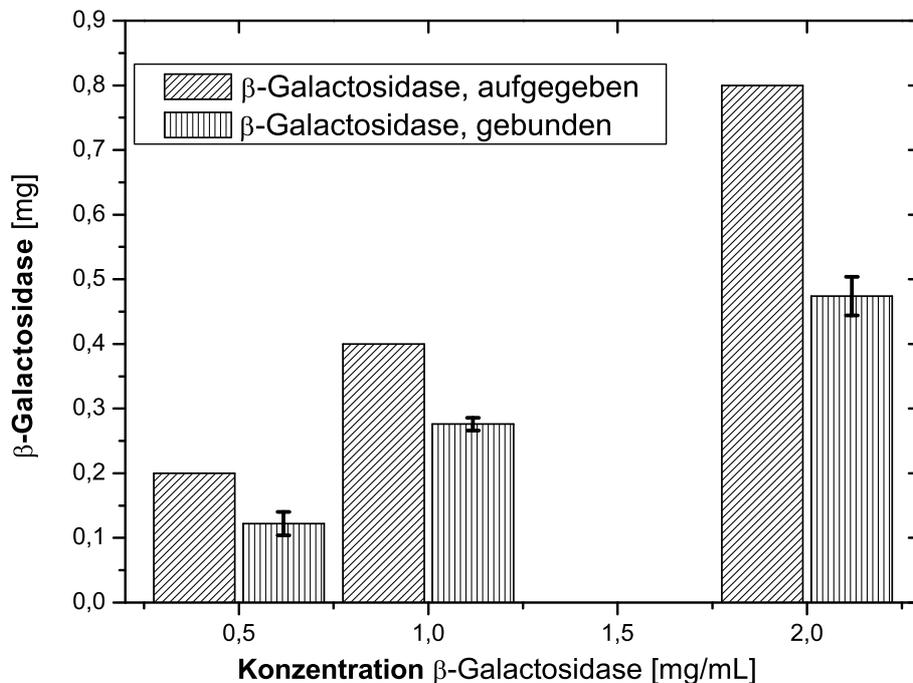
$k$  : Geschwindigkeitskonstante

$\tau$  : hydrodynamische Verweilzeit

Der Umsatz hängt also von der Verweilzeit der Proteinlösung im Reaktor ab, nicht aber von der eingesetzten Konzentration.

Am Beispiel der Immobilisierung von  $\beta$ -Galactosidase wird dieser Zusammenhang im Folgenden kurz diskutiert. Die Immobilisierung wurde in NaAc-Puffer mit kupferbeladenen Spinmodulen durchgeführt. Die Wahl der Immobilisierungsbedingungen wurde an die später benötigten Reaktionsbedingungen angepasst, näher wird

darauf in Kapitel 5.4.1 eingegangen.  $\beta$ -Galactosidase wurde in drei verschiedenen Konzentrationen aufgegeben ( $0,5 \text{ mg/mL}$ ,  $1,0 \text{ mg/mL}$  und  $2,0 \text{ mg/mL}$ ), die Durchführung entsprach dem Standardverfahren für die Proteinimmobilisierung an IDA-Membranen (siehe Anhang B.5.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 dargestellt.



**Abb. 3.11:** Immobilisierung von  $\beta$ -Galactosidase an kupferbeladene IDA-Membranen - Abhängigkeit der gebundenen von der aufgegebenen Proteinmenge. Immobilisierungsbedingungen: RT, NaAc-Puffer (pH 6, 4)

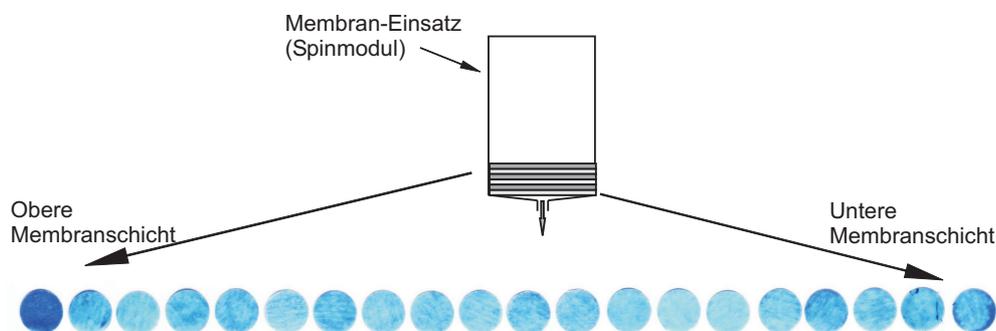
Aus der Abbildung 3.11 wird deutlich, dass mit steigender Konzentration der aufgegebenen  $\beta$ -Galactosidase-Lösung auch die gebundene Enzymmenge steigt. Die prozentualen Umsätze liegen für alle getesteten Proteinkonzentrationen in einem ähnlichen Bereich. Bei einer Konzentration von  $0,5 \text{ mg/mL}$  beträgt der Umsatz 61 %. Wird Proteinlösung der Konzentration  $1,0 \text{ mg/mL}$  eingesetzt, werden 67 % gebunden und bei  $2,0 \text{ mg/mL}$  59 %. Es ergibt sich also das erwartete Ergebnis. Da die prozentualen Umsätze annähernd unabhängig von der eingesetzten Produktkonzentration sind, ist davon auszugehen, dass bei einer weiteren Erniedrigung der eingesetzten Proteinkonzentration der Umsatz ebenfalls bei  $\sim 50 - 60 \%$  liegt. Die für die Immobilisierung optimale Proteinkonzentration ist schwierig zu bestimmen, dieses Problem wurde bereits in Kapitel 3.5.1.3 angesprochen. Zwar führt eine höhere Konzentration dazu, dass größere Proteinmengen gebunden werden, es steigt aber gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit, dass diese Bindungen unspezifisch

sind. Für die weiteren Arbeiten werden daher Enzymkonzentrationen von  $0,5 \text{ mg/mL}$  und  $1,0 \text{ mg/mL}$  eingesetzt. Hier wird eine ausreichende Enzymmenge an die Membran gebunden und gleichzeitig bleibt die Menge des nicht gebundenen Enzyms in einem vertretbaren Rahmen.

### 3.6.4 Lokalisierung der immobilisierten Proteine innerhalb der Spinmodule

Die Optimierung der Bindungsbedingungen stellt einen wichtigen Punkt für die Entwicklung von Enzym-Festbettreaktoren dar, da die Menge des gebundenen Enzyms natürlich Einfluss auf die spätere Umsetzung von Substraten ausübt. Darüber hinaus ist es aber auch von Interesse, wo innerhalb der verschiedenen Membranschichten im Modul die Enzyme gebunden werden.

Zur Visualisierung der an die Membranen gebundenen Enzyme wurde eine Coomassie-Färbung eingesetzt. Dazu wurden die Membranen aus dem Einsatz des Spinmoduls entfernt und einzeln gefärbt. Zum Färben wurde die gleiche Lösung eingesetzt, wie sie üblicherweise zum Anfärben von SDS-Gelen verwendet wird. Abbildung 3.12 zeigt das Ergebnis für die Coomassie-Färbung der einzelnen Membranen eines mit  $300 \mu\text{g}$  Enzym beladenen IDA-Spinmoduls. Das Modul ist im ersten Schritt mit Kupferionen beladen worden.



**Abb. 3.12:** Coomassie-Färbung von enzymladenen IDA-Membranen

Die auf der Membran gebundenen Proteine sind nach der Coomassie-Färbung aufgrund ihrer dunkelblauen Farbe gut zu erkennen. Die hellblaue Farbe, die vor allem bei den mittleren Membranen deutlich ist, wird durch die vorhergehende Beladung mit Kupferionen hervorgerufen.

Durch die Färbung wird deutlich, dass die immobilisierten Enzymmoleküle nicht gleichmäßig über die 20 Membranschichten verteilt gebunden werden. Vielmehr wird der Hauptteil der Enzyme auf der obersten Membran gebunden, schon auf der Membran darunter sind nur noch geringe Mengen Enzym zu finden. Was darüber hinaus auffällt, ist die deutliche Blaufärbung am Rand der unteren Membran.

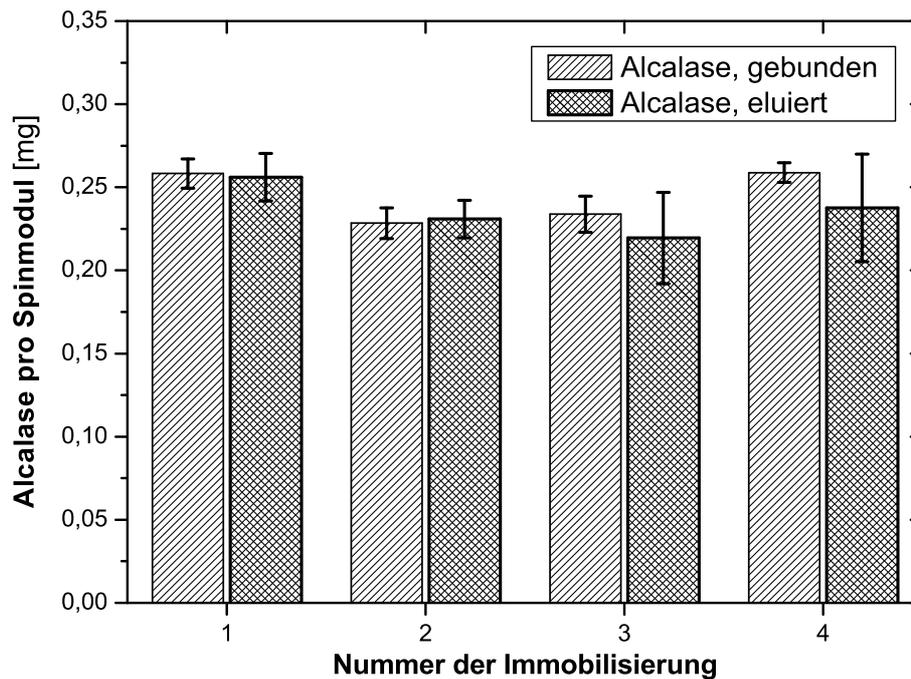
Die Ursache hierfür hängt mit dem Aufbau des Membraneinsatzes des Moduls zusammen. An der Unterseite des Kunststoffeinsatzes in dem die Membranen eingefügt sind, sind zum Flüssigkeitsauslass konzentrisch Löcher angeordnet. Das bedeutet, das insbesondere am Rand der Membranen, wo sich keine Auslässe befinden, der Fluss der Proteinlösung gestört wird und sie in diesem Bereich eine im Vergleich zur Membranzentrum längere Verweilzeit aufweist. Die Bindung der Proteine wird in diesem Bereich also begünstigt. Eine längere Verweilzeit der Proteinlösung ist auch eine Ursache dafür, dass auf der oberen Membran im Vergleich zu allen anderen Membranschichten deutlich mehr Protein gebunden wird. Der Zeitraum zwischen Aufgabe der Proteinlösung und dem Beginn des Zentrifugationsvorgangs, also die Kontaktzeit zwischen Membran und Proteinlösung ist länger im Vergleich zu tiefer liegenden Membranen, die erst während der kurzen Zeit des Zentrifugierens in Kontakt mit der Proteinlösung kommen.

Für die Anwendung als Enzym-Festbettreaktor stellt diese Tatsache natürlich ein gewisses Problem dar, insbesondere wenn die Zentrifugeneinheiten für das Screening der Reaktionsbedingungen enzymatischer Reaktionen verwendet werden sollen. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, muss sichergestellt werden, dass die Reaktionszeit für alle Proben gleich ist. Das Aufgeben der Substratlösung sollte daher in einem möglichst kurzen Zeitraum erfolgen.

### 3.6.5 Elutionsverfahren

Die an die IDA-Membranen gebundenen Enzyme lassen sich auf zwei verschiedenen Wegen eluieren, abhängig davon, ob nur das gebundene Enzym, oder auch die Metallionen entfernt werden sollen. Reicht die Elution der Enzyme, ist die Verwendung von imidazolhaltigem Puffer ausreichend, welches die Enzyme von der Membran verdrängt. Alternativ kann auch EDTA-Lösung aufgegeben werden. Abbildung 3.13 (siehe S. 48) stellt die Ergebnisse für die mehrfache, hintereinander durchgeführte Bindung und Elution von Alcalase an einer kupferbeladenen IDA-Membran dar. Jeweils  $400 \mu\text{L}$  einer  $0,8 \text{ mg/mL}$  Alcalaselösung wurden aufgegeben, die gebundene Enzymmenge mittels Bradfordtest als Differenz zwischen eingesetzter Lösung und der Summe der Proteine in Durchlauf und Waschfraktionen bestimmt. Zur Elution wurde  $50 \text{ mM}$  Natriumphosphatpuffer (pH 8,0) eingesetzt, dem neben  $300 \text{ mM}$  NaCl auch  $250 \text{ mM}$  Imidazol zugesetzt waren. Um eine vollständige Elution der Alcalase sicherzustellen, wurden  $4 \times$  je  $400 \mu\text{L}$  Elutionspuffer aufgegeben ( $5.700 \text{ rpm}$ ,  $3 \text{ min}$ ). Die einzelnen Immobilisierungs- und Elutionszyklen wurden entsprechend Anhang B.5.1 durchgeführt.

Aus der Abbildung 3.13 wird deutlich, dass die gebundene Alcalase-Menge über vier Immobilisierungszyklen nur leicht schwankt. Im ersten und letzten Zyklus wurden  $260 \mu\text{g}$  Alcalase pro Spinmodul gebunden, in den dazwischen liegenden Zyklen



**Abb. 3.13:** Wiederverwendbarkeit von IDA-Modulen. Wiederholte Bindung und Elution von Alcalase. Immobilisierungsbedingungen: RT, NaAc-Puffer (pH 6, 4), Elutionsbedingungen: RT, Natriumphosphatpuffer (50 mM + 300 mM NaCl + 250 mM Imidazol; pH 8, 0)

230  $\mu\text{g}$  bzw. 235  $\mu\text{g}$ . Der Fehler wurde entsprechend der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung bestimmt und ist für alle Messungen gering. Er schwankt zwischen 2,3 % (4. Zyklus) und 4,6 % (3. Zyklus). Die Fehler für die Elutionen steigen vom ersten zum vierten Zyklus von 4,9 % auf 13,6 % an und liegen damit über denen der Immobilisierung. Die eluierte Alcalase-Menge liegt bis auf im zweiten Zyklus leicht unter der zuvor gebundenen Menge und schwankt zwischen 256  $\mu\text{g}$  (1. Zyklus) und 220  $\mu\text{g}$  (3. Zyklus). Im zweiten Immobilisierungszyklus wurde eine etwas größere Menge eluiert als zuvor gebunden wurde. Allerdings liegt die Differenz zwischen eluierter und gebundener Enzymmenge bei nur 25  $\mu\text{g}$ , die Fehler der Mittelwerte sind größer. Es zeigt sich, dass über mindestens vier Immobilisierungszyklen die Bindung und Elution von Proteinen möglich ist, ohne dass die Menge des immobilisierten Proteins abnimmt.

Sollen außer den gebundenen Proteinen auch die Metallionen von der Membran eluiert werden, ist 1 M Schwefelsäure ein geeignetes Elutionsmittel. Die verwendeten Membranen nehmen, obwohl es sich um Membranen auf Zellulosebasis handelt, bei kurzzeitigem Kontakt keinen Schaden. Schwefelsäure der angegebenen Konzentration wird auch vom Hersteller zur Elution der gebundenen Metallionen empfohlen. Nach der Neutralisation ist die erneute Aufgabe von beliebigen Metallionen möglich.

### 3.7 Zusammenfassung

In den vorhergehenden Kapiteln wurden die Möglichkeiten, chemisch funktionalisierte Membranen durch Proteine zu modifizieren und damit verschiedenen Anwendungen zugänglich zu machen, beschrieben und die Ergebnisse dieser Modifizierungen diskutiert. Eines dieser Einsatzgebiete ist die Aufreinigung von Glykoproteinen, welche durch Membranen, die durch das Lektin Con A modifiziert wurden, gebunden werden können. Eine weitere Möglichkeit modifizierte Membranen einzusetzen, ist die Verwendung als Enzym-Festbettreaktor nach vorangegangener Bindung entsprechender Enzyme.

Zur Bindung von Con A wurden sowohl epoxyaktivierte als auch metallchelatisierende IDA-Membranen erfolgreich eingesetzt. Für die Bindung an Epoxymembranen wurden vier verschiedene Bindungspuffer untersucht, das beste Ergebnis wurde beim Einsatz von KPP/PBS erzielt. Mit NaAc-Puffer, der auch zur Aktivierung der gebundenen Con A-Moleküle benötigt wird, zeigten sich die schlechtesten Ergebnisse. Da aber u. U. die Anwesenheit der strukturbildenden Metallionen während des Immobilisierungsprozesses für die spätere Aktivität von Bedeutung ist, wurden verschiedene Ansätze zur Optimierung der Con A-Bindung in diesem Puffersystem unternommen. Weder die Veränderung der Metallionenkonzentrationen, der Inkubationszeit (nicht gezeigt), noch die Erhöhung der Con A-Konzentration in der aufgegebenen Lösung führten zu wesentlichen Verbesserungen. Die mehrfache Aufgabe von Con A-Lösungen in NaAc-Puffer zeigte ebenso keine positiven Resultate, da dieses Verfahren zum Verblocken der Membranen führte. Für die weitere Verwendung der Con A-Membranen ist aber nicht nur die absolute gebundene Menge von Bedeutung, sondern auch das Vermögen des Con A Glykoproteine zu binden, also dessen Aktivität. Das folgende Kapitel wird diesen Aspekt genauer diskutieren.

Metallchelatisierende IDA-Membranen erwiesen sich als gut geeignet, um Con A zu binden. Als Bindungspuffer wurde ausschließlich NaAc-Puffer verwendet, variiert wurde die Metallionenbeladung der IDA-Gruppen. Membranen mit Zinkbeladung zeigten insbesondere bei mehrfacher Beladung das größte Bindungsvermögen für Con A, die schlechtesten Ergebnisse wurden bei Cobaltbeladung erzielt. Die gebundenen Proteinmengen liegen deutlich über denen der Epoxymembranen. Auffällig war indessen, dass auch nach mehrfacher Beladung bedeutende Proteinmengen an die Membranen gebunden wurden, was auf unspezifische Bindungen des Proteins hindeutet. Ein Verblocken der IDA-Membranen wurde bei mehrfacher Beladung nicht festgestellt. In Kapitel 4 werden die Möglichkeiten diskutiert, mit den hergestellten Con A-IDA-Membranen Glykoproteine zu binden.

Eine Möglichkeit, Membransysteme als Festbettreaktoren einzusetzen, besteht u. a. durch das Binden von Enzymen und die anschließende Umsetzung entsprechen-

der Substrate. Es konnte gezeigt werden, dass sieben verschiedene Enzyme aus drei Enzymklassen mit guten Ausbeuten an IDA-Membranen binden. Für die verschiedenen Enzyme wurden jeweils die optimalen Bindungsbedingungen ermittelt, Parameter waren die Metallionenbeladung der Membran und der Immobilisierungspuffer. Des Weiteren wurden Elutionsverfahren für IDA-Module diskutiert und am Beispiel von Alcalase gezeigt, dass eine mehrfache Verwendung der Membranen möglich ist, ohne dass die jeweils gebundene Proteinmenge sinkt. Die Anwendung der durch Enzyme modifizierten IDA-Spinmodule als Membranreaktor wird in Kapitel 5 diskutiert.

## Kapitel 4

# Aufreinigung von Glykoproteinen

### 4.1 Bindung von GOD an Con A-beladene Spinmodule

Im Kapitel 3.5 wurden die verschiedenen Möglichkeiten diskutiert, Con A an Membranen zu binden. In Abhängigkeit von den verschiedenen Membranaktivierungen und den jeweiligen Reaktionsbedingungen ergeben sich Membranen mit unterschiedlichen Con A-Beladungsdichten. In diesem Kapitel soll die Eignung der Spinmodule mit Con A-Membranen zur Aufreinigung von Glykoproteinen zunächst am Beispiel des Modellproteins Glukoseoxidase (GOD) diskutiert werden.

#### 4.1.1 Con A-Epoxy-Membranen zur Immobilisierung von Glykoproteinen

Con A-Membranen auf Basis epoxyaktivierter Membranen konnten in verschiedenen Immobilisierungspuffern hergestellt werden. In Abhängigkeit vom Puffer wurden Beladungsdichten zwischen  $8 \mu\text{g}$  und  $39 \mu\text{g}$  Con A pro Quadratcentimeter Membran realisiert. Für die spätere Anwendung dieser Membranen im Bereich der Isolierung von Glykoproteinen ist es zunächst von Bedeutung, ob der für die Immobilisierung von Con A verwendete Puffer Einfluss auf die Aktivität von Con A und damit auf das Bindungsvermögen für glykosilierte Proteine hat. Weiterhin sind geeignete Elutionsbedingungen zu bestimmen und die Auswirkungen mehrfacher Bindungen und Elutionen von Glykoproteinen auf die Aktivität des Con A zu ermitteln. Ein Einsatz der Con A-Membranen im Bereich der Proteinaufreinigung ist nur sinnvoll, wenn die Membranen mehrfach zur Bindung glykosilierter Proteine verwendet werden können.

##### 4.1.1.1 Einfluss der Con A-Immobilisierungspuffer auf das Bindungsvermögen für Glukoseoxidase

Es wurde gezeigt, dass Con A-Membranen auf Epoxybasis in verschiedenen Bindungspuffern hergestellt werden können (vgl. Kapitel 3.5.1) Das verwendete Puf-

fersystem kann u. U. Einfluss auf die Konformation des Lektins und somit auch auf die spätere Aktivität ausüben. Da nicht alle vorhandenen Epoxygruppen bei der Immobilisierung von Con A reagiert haben, wurden die verbliebenen Gruppen vor der GOD-Bindung in einem ersten Schritt mit Ethanolamin (0,1 % in Phosphatpuffer) abgesättigt. Eine kovalente Bindung der Glykoproteine an die Membran wurde durch diesen Schritt vermieden. Nach dem Equilibrieren der Membranmodule mit NaAc-Puffer zur Aktivierung des Con A, wurden jeweils 0,4 mL einer 1 mg/mL Glukoseoxidase-Lösung (in NaAc-Puffer) auf die Membran gegeben und zentrifugiert (Protokoll siehe Anhang B.4.2). Die Menge der gebundenen GOD wurde aus der Differenz des Proteingehaltes der eingesetzten Lösung und der Summe des Gehaltes in Durchlauf und den Waschfraktionen bestimmt. Dazu wurde die Absorption der Lösungen nach [87] gemessen. Es ergeben sich die in Tabelle 4.1 angegebenen Werte.

**Tabelle 4.1:** Einfluss der Con A-Immobilisierungspuffer auf die Bindung von GOD an Con A-Epoxy-Spinmodulen.

	Puffersystem zur Con A-Immobilisierung			
	Phosphatpuffer	Boratpuffer	Carbonatpuffer	Natriumacetatpuffer
Con A, gebunden [ $\mu\text{g}$ ]	292 $\pm$ 18	179 $\pm$ 11	133 $\pm$ 11	58 $\pm$ 4
GOD, eingesetzt [ $\mu\text{g}$ ]	400	400	400	400
GOD, gebunden [ $\mu\text{g}$ ]	Membran	73 $\pm$ 8	-	27 $\pm$ 5
[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	verblockt	10 $\pm$ 1, 1	-	4 $\pm$ 0, 7
[%]	-	18 $\pm$ 2	-	7 $\pm$ 1
[ $\mu\text{g}$ (GOD)/ $\mu\text{g}$ (Con A)]	-	0,41 $\pm$ 0,07	-	0,47 $\pm$ 0,11

An zwei der getesteten Membranen konnte aus unterschiedlichen Gründen keine GOD gebunden werden. Die Membranen, bei denen die Con A-Immobilisierung in Phosphatpuffer durchgeführt wurde, verblockten bei erneuter Aufgabe von GOD. Probleme mit verblockten Membranen traten bereits bei der mehrfachen Immobilisierung von Con A in NaAc-Puffer auf. In diesem Fall handelt es sich um die Membranmodule an denen im Schritt zuvor die größten Con A-Mengen gebunden werden konnten, was die nachfolgenden Aufreinigungsschritte für Glykoproteine deutlich erschwert bzw. verhindert.

Wurde hingegen Carbonatpuffer zur Con A-Immobilisierung verwendet, konnte

GOD nicht gebunden werden. Die Ursache liegt in den gewählten Immobilisierungsbedingungen. Con A ist nur in der Lage, glykosilierte Proteine zu binden, wenn es als Tetramer vorliegt, das heißt bei pH-Werten zwischen  $\sim 5,5$  und  $\sim 9$  [105]. Bei größeren oder kleineren pH-Werten liegt Con A hingegen als Dimer vor und zeigt keine Affinität, Zucker zu binden [106] [107]. Der verwendete Carbonatpuffer hat einen pH-Wert von 9,0. Con A sollte daher als Tetramer vorliegen, jedoch kommt es in diesem pH-Bereich bereits zu einer Veränderung der Konformation hin zum Dimer. Con A wurde bei Verwendung des Carbonatpuffers offensichtlich vorrangig als Dimer gebunden. Auch durch die Membranequilibration mit NaAc-Puffer, der einen pH-Wert von 6,4 hat, ist eine Veränderung der Konformation zum Tetramer nicht möglich.

Positive Ergebnisse erhält man hingegen für die zwei übrigen Con A-Membransysteme, in beiden Fällen konnten geringe Mengen GOD ( $73 \mu\text{g}$  (Boratpuffer) bzw.  $27 \mu\text{g}$  (NaAc-Puffer)) gebunden werden. Bezieht man diese Mengen auf die bereits immobilisierte Con A-Menge, ergeben sich mit den Quotienten von  $0,41 \mu\text{g}(\text{GOD})/\mu\text{g}(\text{Con A})$  und  $0,47 \mu\text{g}(\text{GOD})/\mu\text{g}(\text{Con A})$  gute Ergebnisse für das Verhältnis von gebundener GOD-Menge zu der zur Verfügung stehenden Con A-Menge. In beiden Fällen konnten pro  $\mu\text{g}$  Con A ähnliche Mengen GOD gebunden werden, wobei sich mit einem Quotienten von  $0,47 \mu\text{g}(\text{GOD})/\mu\text{g}(\text{Con A})$  geringfügig bessere Werte ergeben, wenn die vorangegangene Con A-Bindung an die Membran ebenfalls in NaAc-Puffer erfolgte.

Insgesamt sind diese Ergebnisse positiv zu bewerten. Die lange Inkubationszeit der Con A-Immobilisierung ermöglicht den Molekülen auch an schlechter zugänglichen Stellen der Membran zu binden, während die GOD-Aufreinigung nur in einem Zentrifugationsschritt über  $5 \text{ min}$ , durchgeführt wird. Aus diesem Grund bindet GOD vor allem an leicht zugänglichen Con A-Molekülen. Verschiedene Versuche mit geringeren Zentrifugationsgeschwindigkeiten wurden durchgeführt, um durch eine Verlängerung der Kontaktzeit zwischen GOD und Con A eine Erhöhung der gebundenen GOD-Menge zu erreichen. Sie führten aber zu keiner signifikanten Verbesserung, da die minimal mögliche Zentrifugationsschwindigkeit technisch bedingt bei  $2.000 \text{ rpm}$  lag und daher die Kontaktzeit zwischen Membran und Lösung nur unwesentlich verlängert wird. Sowohl bei der ursprünglich verwendeten Geschwindigkeit von  $4.600 \text{ rpm}$  als auch bei  $2.000 \text{ rpm}$  lief die gesamte aufgegebene Proteinlösung innerhalb von  $5 \text{ min}$  durch die Membran.

#### 4.1.1.2 Elution von gebundenen GOD-Molekülen

Neben den Bindungsbedingungen für Glykoproteine ist für eine optimale Aufreinigung die Bestimmung der geeigneten Elutionsbedingungen von Bedeutung. Um die Bindung zwischen Con A und glykosilierten Proteinen zu trennen, eignen sich vor allem zwei Elutionsmittel. Zunächst wird die Elution durch kompetitive Verdrän-

gung der Glykoproteine mit Mannosidlösung getestet. Sollte diese schonende Methode zur Elution keinen Erfolg zeigen, ist auch die Elution mittels pH-Shift möglich. In diesem Fall ist die Verwendung von Glycin/HCl-Puffer vielversprechend, allerdings ist eine rasche Neutralisation des Elutionspuffers notwendig, um die Aktivität der eluierten Proteine zu erhalten.

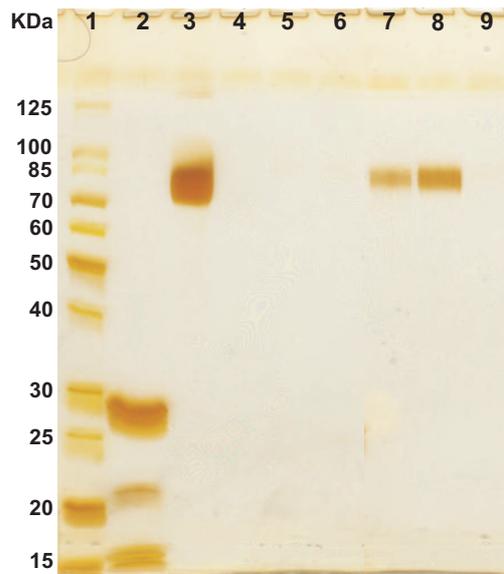
Aufgrund der geringen GOD-Beladungsdichten der Membranen, bei denen die Con A-Immobilisierung in NaAc-Puffer durchgeführt wurde, werden die Ergebnisse zum Elutionsverhalten ausschließlich für die Membranen gezeigt, bei denen die Con A-Immobilisierung in Boratpuffer durchgeführt wurde. Die Elution von GOD erfolgte schrittweise mit beiden Elutionsmitteln. Zunächst wurde mehrfach das mildere Elutionsmittel Mannosid aufgegeben. Anschließend folgt ein zweiter Elutionszyklus mit Glycin/HCl-Puffer (0,1 M, pH 2,8). Die genaue Durchführung ist im Anhang B.4.2 angegeben. Bei den Elutionsschritten mit Glycin/HCl-Puffer werden jeweils 70  $\mu\text{L}$  einer 0,1 M Natriumhydroxidlösung (NaOH) im Mikroreaktionsgefäß vorgelegt, um eine unmittelbare Neutralisation des Durchflusses zu gewährleisten.

Eine Überprüfung des Elutionsergebnisse erfolgte mittels Gelelektrophorese (SDS-Page, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), da aufgrund der geringen GOD-Mengen Proteintests nicht zu einem zuverlässigen Ergebnis führten. Die Gelelektrophorese wird nach [108] mit 12,5 %igen Tris-HCl-Precast-Gelen (BioRad, München) bei einer Stromstärke von 200 V durchgeführt. Die Färbung der Gele erfolgt entsprechend der Silbernitratmethode nach Blum [109]. In Abbildung 4.1 auf Seite 55 ist das Ergebnis der GOD-Elutionen an einem Beispiel dargestellt.

Aus der Grafik wird deutlich, dass die Elution von GOD durch pH-Shift erfolgreich war. In den Spuren 2 und 3 sind zum Vergleich Proben mit Con A beziehungsweise GOD aufgetragen, die die typischen Bandenmuster zeigen. Dieses dient zum Einen dazu, eluierte GOD zu identifizieren, zum Anderen um auszuschließen, dass Con A ebenfalls von der Membran eluiert wird. Die Elution mit Mannosid zeigte keinen Erfolg (Spuren 4-6), während in den ersten beiden Elutionsfraktionen, bei denen Glycin/HCl-Puffer eingesetzt wurde, deutlich erkennbar GOD enthalten ist. Ein entsprechendes Bild ergibt sich auch für die GOD-Elutionen von den Membranen, bei denen NaAc-Puffer zur Con A-Immobilisierung verwendet wurde. Allerdings ist hier aufgrund der geringeren GOD-Mengen nur in der ersten Glycin-HCl-Elution eine sehr schwache Bande erkennbar.

#### 4.1.1.3 Mehrfache Immobilisierung von GOD an Con A-Epoxy-Spinmodulen - Wiederverwendbarkeit der modifizierten Module

Um die erzeugten Con A-Epoxy-Membranen sinnvoll in Aufarbeitungsprozessen einsetzen zu können, ist die Wiederverwendbarkeit der Module von großer Bedeutung. In der Praxis erweist sich das mehrfache Binden und Eluieren von GOD, ins-



**Abb. 4.1:** GOD-Elution von einer Con A-Epoxy membran (Con A-Immobilisierung in Boratpuffer). **Spur 1:** Marker, **Spur 2 und 3:** Con A bzw. GOD als Standard, **Spur 4-6:** Elution mit Mannosidlösung, **Spur 7-9:** Elution mit pH-Shift (Glycin-HCl-Puffer)

besondere bei den Con A-Membranen, bei denen Boratpuffer als Immobilisierungspuffer verwendet wurde, als schwierig. Die GOD-Mengen, die bei weiteren Immobilisierungszyklen gebunden werden können, sinken auf Werte zwischen 20 % und 34 % der im ersten Immobilisierungszyklus gebunden Mengen ( $15 - 25 \mu\text{g}$  GOD pro Spinmodul). Diese Mengen entsprechen in etwa den Ergebnissen für die Membranen, bei denen die Con A-Immobilisierung in NaAc-Puffer durchgeführt wurde. Für diese Con A-Membranen bleiben die gebundenen GOD-Mengen stabil, doch aufgrund der sehr geringen GOD-Mengen die gebunden werden konnten, ist ein sinnvoller Einsatz später kaum möglich.

Es wird daher eine Verbesserung der Bindungsaktivität der Con A-Membranen aus Boratpuffer angestrebt. Eine Erhöhung der Metallionenkonzentration von  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  von je  $1 \text{ mmol}$  auf  $10 \text{ mmol}$  bewirkt zunächst eine Steigerung der gebundenen GOD-Menge auf bis zu  $35 \mu\text{g}$  pro Modul. Allerdings kommt es bei weiteren GOD-Immobilisierungen zu einem erneuten Absinken.

Verglichen mit den ursprünglich erreichten Werten ergibt sich also ein deutlicher Aktivitätsverlust des Con A bei mehrfacher Verwendung der modifizierten Spinmodule. Trotz dieser Ergebnisse sollen aber Con A-Membranen auf Epoxybasis in weiteren Versuchen auf ihre Eignung zur Bindung von Glykoproteinen beispielsweise aus Kultivierungsmedien getestet werden. Durch eine Vergrößerung der Membranoberfläche ist es möglich, die angestrebten Proteinmengen zu binden.

## 4.1.2 Bindung von GOD an Con A-IDA-Membranen

An metallchelatisierende IDA-Membranen konnten in Kapitel 3.5.2 im Vergleich zu Epoxymembranen wesentlich größere Mengen Con A gebunden werden. An Epoxymembranen war es im besten Fall möglich, 292  $\mu\text{g}$  Con A zu immobilisieren. Bei IDA-Membranen wurden im Vergleich, abhängig von der Metallionenbeladung, die 2,6- bzw. 6,4-fache Con A-Menge gebunden. Daher ist davon auszugehen, dass auch bei der Bindung von GOD deutlich höhere Werte erreicht werden. Neben dem Einfluss der Metallionenbeladung auf die Bindungseigenschaften der Con A-Membranen für Glykoproteine werden in den folgenden Kapiteln auch die Möglichkeiten der Wiederverwendbarkeit der Con A-Membranen, sowie die Wirkung der verschiedenen Elutionsmittel für Glykoproteine diskutiert.

### 4.1.2.1 Einfluss der Metallionenbeladung von Con A-IDA-Membranen auf die Bindung von Glukoseoxidase

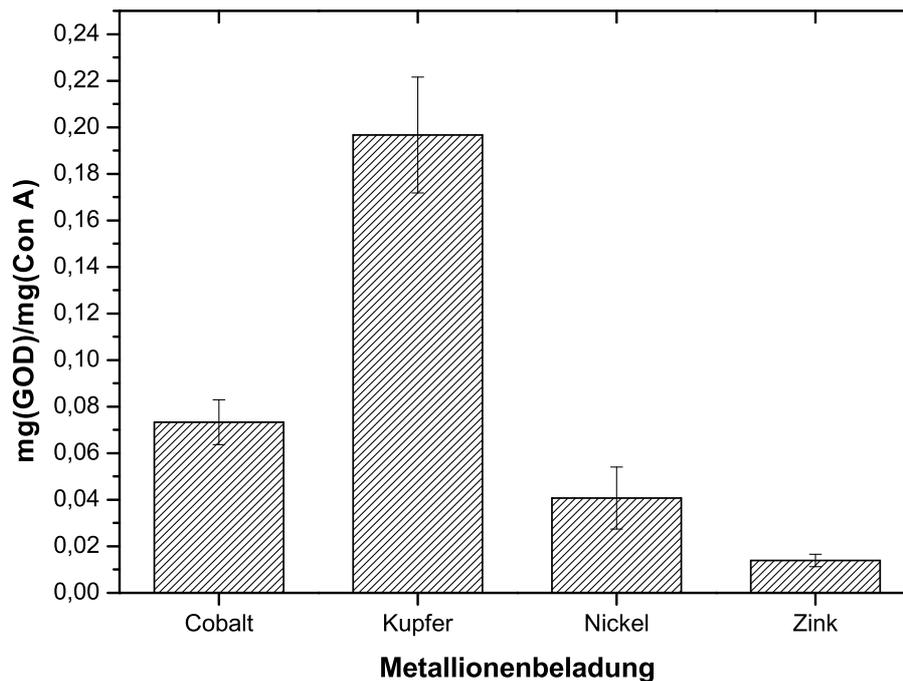
Um den Einfluss der Metallionenbeladung auf die Bindungseigenschaften der entwickelten Con A-Membranen zu bestimmen, wurden ähnlich der Versuche für Con A-Epoxymembranen (Kapitel 4.1.1.1, eine Absättigung der evtl. verbliebenen Bindungsstellen wird bei IDA-Membranen nicht durchgeführt) jeweils einmal eine 1,1  $\text{mg/ml}$  GOD-Lösung in NaAc-Aktivierungspuffer auf die Membranen der Con A-IDA-Spinmodule gegeben und die Lösung im Anschluss zentrifugiert. Nicht gebundene GOD wurde im anschließenden Waschzyklus entfernt. Die genaue Versuchsdurchführung ist im Anhang B.5.1 angegeben. Die gebundenen Proteinmengen wurden durch Absorptionsmessung bei 280  $\text{nm}$  nach [87] und nachfolgender Differenzbildung zwischen aufgebener und nicht gebundener Proteinmenge ermittelt. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 4.2.

**Tabelle 4.2:** Immobilisierung von GOD an Con A-IDA-Spinmodule mit unterschiedlicher Metallionenbeladung

Metallionen- beladung	GOD, eingesetzt [ $\mu\text{g}$ ]	GOD, gebunden		
		[ $\mu\text{g}$ ]	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	[%]
Cobalt	440	$55 \pm 7$	$7,4 \pm 0,9$	12,5
Kupfer	440	$244 \pm 30$	$32,6 \pm 4$	55,5
Nickel	440	$46 \pm 15$	$6,1 \pm 2$	10,5
Zink	440	$26 \pm 5$	$3,5 \pm 0,7$	5,9

Aus den in Tabelle 4.2 angegebenen Werten für die Immobilisierung von GOD ist ersichtlich, dass die erreichten Beladungsdichten für GOD bei Membranen, die mit

Zink-, Cobalt- oder Nickelionen beladen sind, sehr niedrig sind und sich mit  $26 \mu\text{g} - 55 \mu\text{g}$  pro Spinmodul im Bereich der Con A-Epoxymodule bewegen. Deutlich bessere Ergebnisse zeigen die mit Kupferionen beladenen Membranen, hier konnten pro Modul  $244 \pm 30 \mu\text{g}$  GOD gebunden werden. Die Unterschiede in den gebundenen Proteinmengen werden noch deutlicher, wenn man sie auf die zuvor immobilisierten Con A-Mengen bezieht, wie es in Abbildung 4.2 dargestellt ist.



**Abb. 4.2:** Immobilisierung von GOD an Con A-IDA-Membranen. Verhältnis von immobilisierter GOD zur Con A-Menge, Einfluss der Metallionenbeladung

Die größte Menge Con A konnte an Module mit Zinkionenbeladung gebunden werden (im Mittel  $1.872 \mu\text{g}$  pro Spinmodul). Gleichzeitig ist die durchschnittlich immobilisierte GOD-Menge im Vergleich zu den anderen Metallionenbeladungen am geringsten. Es ergibt sich ein Quotient von  $0,014 \pm 0,003 \mu\text{g}(\text{GOD})/\mu\text{g}(\text{Con A})$ . Die Ergebnisse für Nickel ( $0,041 \pm 0,014 \mu\text{g}(\text{GOD})/\mu\text{g}(\text{Con A})$ ) und Cobalt ( $0,073 \pm 0,01 \mu\text{g}(\text{GOD})/\mu\text{g}(\text{Con A})$ ) sind nur geringfügig besser. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Con A-Epoxymembran wird sehr wenig GOD bezogen auf die gebundene Con A-Menge immobilisiert. Das beste Ergebnis erhält man für kupferbeladene Module, hier konnten  $244 \mu\text{g}$  GOD gebunden werden, woraus sich ein Quotient von  $0,198 \pm 0,025 \mu\text{g}(\text{GOD})/\mu\text{g}(\text{Con A})$  ergibt.

Die sehr hohen GOD Mengen bei Kupferbeladung im Vergleich zu den übrigen Metallen hat u. A. die Ursache, dass GOD außer an Con A auch direkt an die Kupferio-

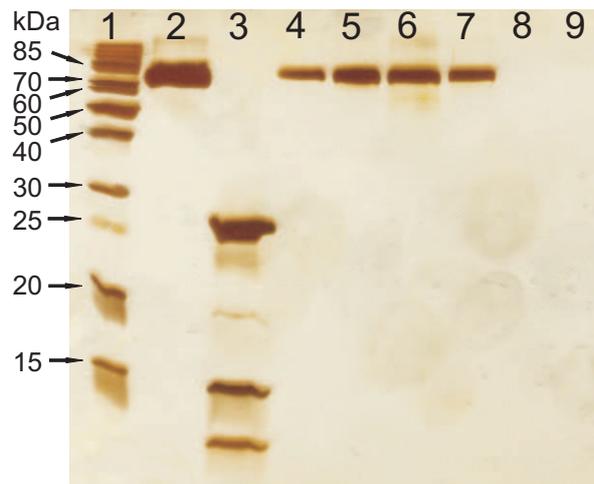
nen gebunden werden kann. Durch das Con A werden die im Überschuss vorhandenen Bindungsstellen nicht vollständig besetzt. Es ist daher davon auszugehen, dass ein Teil der GOD nicht durch Con A-Moleküle sondern über Kupferionen gebunden wurde. Wie später in Kapitel 4.1.2.3 gezeigt wird, ist die Elution von  $\sim 64\%$  der gebundenen GOD durch Mannosidlösung möglich. Hier handelt es sich um den Anteil der GOD-Moleküle, die an Con A und nicht direkt an Kupferionen gebunden waren.  $64\%$  entsprechen in diesem Fall einer gebundenen GOD-Menge von  $156\ \mu\text{g}$ . Die gebundenen GOD-Mengen bei den weiteren Metallionenbeladungen sind im Vergleich zu kupferbeladenen Membranen um  $65\%$  bei Cobaltbeladung, sowie um  $71\%$  und  $83\%$  bei Nickel- und Zinkbeladung niedriger. Diese Unterschiede werden dadurch hervorgerufen, dass die Bindung des Con A je nach verwendetem Metallion über verschiedene Histidindgruppen des Proteins erfolgt [71]. Auch die Menge des gebundenen Proteins und die Bindungsstärken können beeinflusst werden. Möglich ist, dass diese Unterschiede Veränderungen der Con A-Konformation bewirken und somit Einfluss auf die Aktivität gegenüber glykosilierten Proteinen ausüben. Prozentual sind die Fehler für alle Messwerte hoch. Für Module mit Kupferbeladung beträgt er  $12,6\%$ , bei cobalt- bzw. zinkbeladenen Module  $13,1\%$  und  $19,5\%$ , während sich für nickelbeladene Module ein sehr hoher Fehler von  $32,8\%$  ergibt. Diese hohen Fehler sind teilweise in den unterschiedlichen Beladungsdichten der Con A-Module begründet, die für die einzelnen Metallionenbeladungen verwendet wurden. Die immobilisierten GOD-Mengen schwanken ebenfalls, sie werden auf die vorhandenen Con A-Mengen bezogen, was zu einem Anstieg der Fehlerwerte führt.

#### 4.1.2.2 GOD-Elution von Con A-IDA-Membranen

Auch bei Verwendung von Con A-IDA-Membranen zur Isolierung glykosilierter Proteine, müssen die optimalen Elutionsbedingungen bestimmt werden. Bei Con A-Membranen auf Epoxybasis wurden sowohl Mannosidlösung, als auch die Elution über pH-Shift mittels Glycin-HCl-Puffer getestet. Für Con A-IDA-Membranen wurde ein analoges Vorgehen gewählt. Als Testmembranen für die Elution wurden mit Kupfer beladene Membranen verwendet, da hier die größten Mengen GOD immobilisiert werden konnten. Aus den hier beschriebenen Versuchen zur Elution von GOD wurde das im Anhang angegebene Standardprotokoll entwickelt (siehe B.5.2). Die genauen Versuchparameter sind daher im Text angegeben.

Zunächst wurde  $0,1\ \text{M}$  Mannosidlösung auf ihre Eignung als Elutionsmittel getestet. Im ersten Schritt wurden  $400\ \mu\text{L}$  der Lösung auf die Membranen gegeben, im nachfolgenden  $200\ \mu\text{L}$ , in beiden Fällen wurde bei  $4.600\ \text{rpm}$  für  $5\ \text{min}$  zentrifugiert. Mit der geringeren Zentrifugationsgeschwindigkeit wurde die im Vergleich zu Epoxy-membranen größere Porengröße und deren Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit innerhalb der Membran berücksichtigt. Zwei weitere Elutionsschritte mit Man-

nosid wurden mit 200  $\mu\text{L}$  Lösung bei einer weiter verringerten Geschwindigkeit von 3.000 *rpm* durchgeführt. Bei Verwendung des Glycin-HCl-Puffers wurden wie zuvor bei Epoxymembranen 70  $\mu\text{L}$  einer 0,1 M NaOH-Lösung zur Neutralisation des Elutionspuffers im Mikroreaktionsgefäß vorgelegt. Jeweils 200  $\mu\text{L}$  Glycin-HCl-Puffer wurden auf die Membran gegeben und bei 4.600 *rpm* für 5 *min* zentrifugiert. Eine anschließende Gelelektrophorese der verschiedenen Elutionsfraktionen mit einem 15 %igen SDS-Gel ergibt nach einer Silberfärbung das in Abbildung 4.3 dargestellte Ergebnis.



**Abb. 4.3:** Elution eines kupferbeladenen Con A-IDA-Spinmoduls, an dem zuvor GOD gebunden wurde. **Spur 1:** Marker, **Spur 2 und 3:** GOD bzw. Con A als Standard, **Spur 4-7:** Elution mit Mannosidlösung (Spur 4 und 5: 4.600 *rpm*, Spur 6 und 7: 3.000 *rpm*), **Spur 8-9:** Elution mit Glycin-HCl-Puffer (pH-Shift)

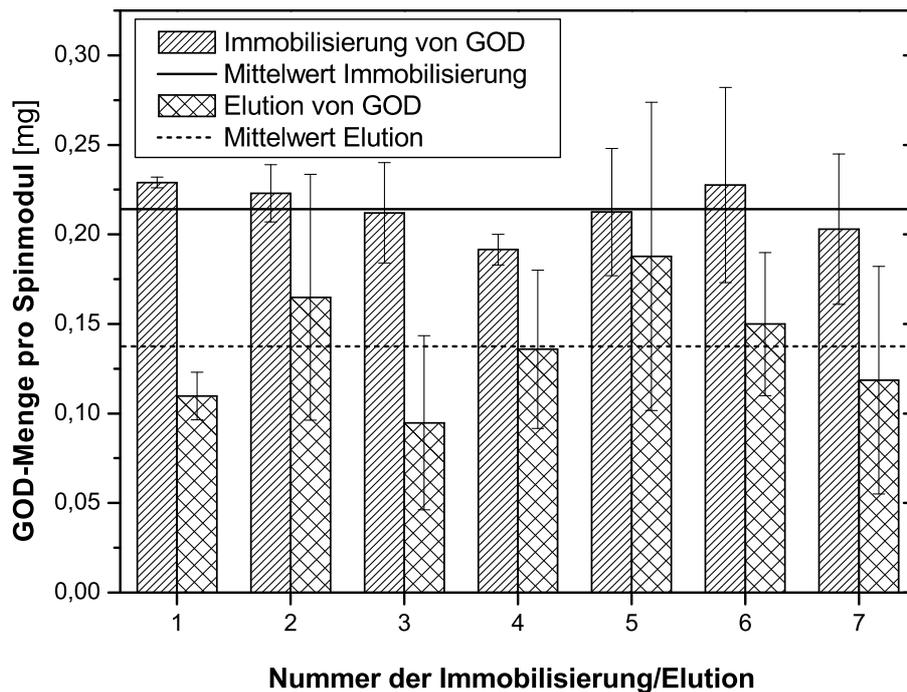
In vier Proben für die Elution von GOD von Con A-IDA-Membranen ist GOD im SDS-Gel (Spur 4-7) zu erkennen. In allen Fällen handelt es sich um Elutionen, die mit Mannosidlösung durchgeführt wurden. Ein qualitativer Unterschied in den Elutionen bei verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten ist nicht erkennbar. In den Spuren 8 und 9 ist keine GOD zu erkennen, hier wurde im Anschluss an die Mannosid-Elutionen die Elution über pH-Shift eingesetzt, um verbliebene GOD zu eluieren. Da kein Protein im SDS-Gel zu erkennen ist, sollte davon auszugehen sein, dass die GOD, die von Con A gebunden wurde, von der Membran durch Mannosidlösung vollständig entfernt wurde. Mannosidlösung ist für Con A-Spinmodule aus IDA-Basis offensichtlich als Elutionsmittel ausreichend und somit ist der Einsatz von Glycin/HCl-Puffer nicht notwendig. Die GOD-Moleküle sind also von Con A-IDA-Membranen durch mildere Mittel zu eluieren als von Con A-Epoxymembranen. Der Unterschied zwischen den Con A-Membranen auf Epoxy-

und IDA-Basis liegt in der Art, wie die Con A-Moleküle gebunden werden. Bei Epoxymembranen liegt eine kovalente Bindung vor, während die Bindung an IDA-Membranen über chelatisierte Metallionen erfolgt. Diese verschiedenen Bindungsarten können Auswirkungen auf die Konformation des Con A ausüben und somit auch auf die Bindungsstärke für GOD. Neben der Elution des Zielproteins ist bei Verwendung von IDA-Membranen weiterhin von Bedeutung, dass eine Elution der nicht kovalent gebundenen Con A-Moleküle vermieden wird. In Abhängigkeit vom Elutionsmittel kann es u.U. zu diesem Effekt kommen. Es zeigt sich jedoch durch die Gelelektrophorese, dass weder Mannosidlösung noch der pH-Shift sich negativ auf die Bindung von Con A an die Membran auswirken.

#### 4.1.2.3 Wiederholte Immobilisierung von GOD an Con A-IDA-Membranen

Auch bei Con A-IDA-Membranen ist die Wiederverwendbarkeit der generierten Membranen von großer Bedeutung für die spätere Nutzbarkeit. Um Aussagen diesbezüglich machen zu können, wurde mehrfach GOD an die mit Con A-beladenen Membranen gebunden und im Anschluss sowohl mit Mannosidlösung und als Absicherung der vollständigen Elution mittels pH-Shift eluiert. Die Elutionsfraktionen mit Glycin/HCl-Puffer zeigten erwartungsgemäß nur geringe Proteinkonzentrationen. Der Versuchsablauf entsprach dem im Anhang angegebenen Protokoll (siehe B.5.2). Insgesamt wurden sieben Zyklen bestehend aus Immobilisierung und anschließender Elution durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen erfolgt auch hier mittels Absorptionsmessung bei 280 nm nach [87]. Abbildung 4.4 stellt die Ergebnisse dar (siehe S. 61).

Aus der Grafik lässt sich zum Einen erkennen, dass die reversible Immobilisierung von GOD an Con A-IDA-Membranen über mindestens sieben Zyklen möglich ist. Die immobilisierte GOD Menge schwankt hierbei allerdings zwischen  $190 \pm 8 \mu\text{g}$  und  $227 \pm 54 \mu\text{g}$  pro Spinmodul. Der Fehler wird mit fortschreitender Anzahl der Immobilisierungen größer. Über alle Immobilisierungszyklen können im Mittel  $214 \mu\text{g}$  GOD gebunden werden, die maximale Abweichung einer Einzelmessung zu diesem Mittelwert beträgt  $+67 \mu\text{g}$ . Das entspricht 31,3 % und ist somit sehr groß. Zum Anderen wird aus der Abbildung deutlich, dass die durch Mannosidlösung und Glycin/HCl-Puffer eluierte GOD bei allen Immobilisierungszyklen deutlich unter der zuvor gebundenen Menge liegt. Sie schwankt zwischen  $95 \pm 48 \mu\text{g}$  (Elution 3) und  $188 \pm 86 \mu\text{g}$  GOD. Im Mittel werden  $137 \mu\text{g}$  GOD eluiert. Vergleicht man diesen Wert mit der im Mittel gebundenen Menge von  $214 \mu\text{g}$ , ist zu erkennen, dass  $\sim 64 \%$  der immobilisierten GOD eluiert werden konnten. Im ersten Immobilisierungszyklus ist der Unterschied zwischen der gebundenen und eluierten Menge mit  $119 \mu\text{g}$  am größten, mit fortschreitender Anzahl der Immobilisierungen nimmt diese Differenz tendenziell ab. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass GOD nicht

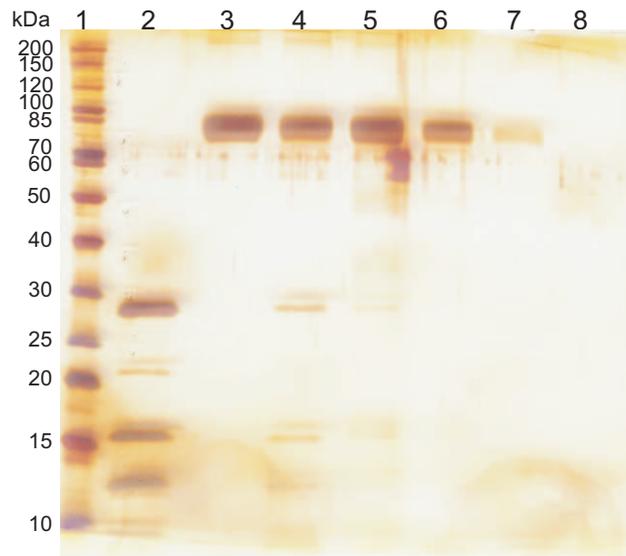


**Abb. 4.4:** Wiederholte Immobilisierung und Elution von GOD an kupferbeladene Con A-IDA-Membranen

ausschließlich an die Con A-Moleküle der Membran gebunden wird, sondern zunächst auch verbliebene freie Kupferbindungsstellen besetzt. Um diese These zu überprüfen, werden im Anschluss an die letzte Elution mit Glycin/HCl-Puffer weitere Elutionen mit 50 mM EDTA-Lösung durchgeführt, im Anhang B.5.2 ist die Vorgehensweise erläutert. EDTA-Moleküle komplexieren die an die IDA-Membran gebundenen Metallionen und verdrängen auf diese Weise alle gebundenen Proteine. Eine Überprüfung der Ergebnisse erfolgt mittels Gelelektrophorese mit 12 %igen SDS-Gelen. Ein exemplarisches Ergebnis ist auf Seite 62 in Abbildung 4.5 wiedergegeben.

Durch das SDS-Gel wird ersichtlich, dass deutliche Mengen GOD erst durch die Verwendung von EDTA als Elutionsmittel von der IDA-Membran eluiert werden können (Spuren 4-7). In den Spuren 4 und 5 ist neben GOD auch erwartungsgemäß Con A im SDS-Gel vorhanden.

Für die Anwendung der Con A-IDA-Membranen im Bereich der Proteinaufreinigung stellt das Ergebnis, dass GOD nicht vollständig durch Mannosidlösung und pH-Shift eluiert werden kann, einen Nachteil dar, da es hierdurch zu einem Produktverlust kommen kann. Ungeachtet dieser Tatsache sollen weitergehende Versuche auch mit Con A-Membranen auf IDA-Basis durchgeführt werden.



**Abb. 4.5:** Elution einer kupferbeladenen Con A-IDA-Membran mit EDTA-Lösung. An die Membran wurde zuvor mehrfach GOD gebunden und eluiert. **Spur 1:** Marker, **Spur 2 und 3:** Con A bzw. GOD als Vergleich, **Spur 4-6:** Elution mit 200  $\mu\text{L}$  EDTA-Lösung, **Spur 7-8:** Elution mit 400  $\mu\text{L}$  EDTA-Lösung

Die Spinmodule, die mit anderen Metallionen (Zink, Nickel, Cobalt) beladen wurden, zeigten auch bei mehrfacher, wiederholter Beladung mit GOD nur geringe, darüber hinaus abnehmende Beladungskapazitäten. Von weiteren Testreihen wird daher abgesehen.

#### 4.1.3 Vergleich der Con A-Membranen auf Epoxy- und IDA-Basis

Con A-Membranen wurden sowohl auf Basis von Epoxy- als auch IDA-Membranen hergestellt und auf ihre Eignung zur Aufreinigung von Glykoproteinen am Beispiel von GOD getestet. An beiden Membranarten konnten grundsätzlich Glykoproteine gebunden werden. In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse kurz einander gegenübergestellt werden.

Grundlegend für die Immobilisierung glykosilierter Proteine ist zunächst die vorhergehende Bindung von Con A. Mit beiden Membransorten konnten gute Ergebnisse erreicht werden. Bei Membranen mit Epoxyaktivierung, konnten je nach verwendetem Immobilisierungspuffer bis zu 292  $\mu\text{g}$  Con A gebunden werden. Für die anschließende Bindung von GOD erwiesen sich aber nur zwei von vier verschiedenen Membranen als geeignet. Hier wurden Beladungsdichten von 179  $\mu\text{g}$  (Boratpuffer) bzw. 58  $\mu\text{g}$  (NaAc-Puffer) erreicht.

IDA-Membranen zeigten bei Verwendung des NaAc-Puffers, der gleichzeitig auch

zur Aktivierung von Con A verwendet wird, gute Ergebnisse für die Con A-Immobilisierung. Hier ist die Menge des gebundenen Proteins abhängig von den Metallionenbeladung der IDA-Membran. Die Beladungskapazitäten sind mit  $751 \mu\text{g}$  ( $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Cobaltbeladung) bis  $1.872 \mu\text{g}$  ( $250 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Zinkbeladung) pro Spinmodul deutlich höher im Vergleich zu Epoxymembranen. Bei anschließender Bindung von GOD an Con A erreicht man aber nur mit kupferbeladenen Membranen zufriedenstellende Ergebnisse. Es konnten bis zu  $244 \mu\text{g}$  GOD immobilisiert werden, was einem Quotienten von  $0,198 \mu\text{g (GOD)}/\mu\text{g (Con A)}$  entspricht. Bei Verwendung der Membranen, die mit Zink-, Nickel- oder Cobaltionen beladen sind, erhält man Quotienten von  $0,014 \mu\text{g (GOD)}/\mu\text{g (Con A)}$ ,  $0,041 \mu\text{g (GOD)}/\mu\text{g (Con A)}$  und  $0,073 \mu\text{g (GOD)}/\mu\text{g (Con A)}$ . Die absoluten Werte der gebundenen GOD-Mengen schwanken hier zwischen  $26 \mu\text{g}$  (Zinkbeladung) und  $244 \mu\text{g}$  (Kupferbeladung).

Die Ergebnisse für die GOD-Immobilisierung an Membranen auf Epoxybasis liegen, wenn man die Gesamtmenge GOD pro Spinmodul betrachtet, mit Werten von  $73 \mu\text{g}$  bzw.  $27 \mu\text{g}$  im Bereich der IDA-Membranen mit Cobalt-, Nickel oder Zinkbeladung. Bezieht man diese Menge jedoch auf die zuvor gebundene Con A-Menge, ergibt sich ein entgegengesetztes Bild. Das Verhältnis von GOD zu Con A beträgt hier  $0,41 \mu\text{g (GOD)}/\mu\text{g (Con A)}$  (Con A-Immobilisierung in Boratpuffer) und  $0,47 \mu\text{g (GOD)}/\mu\text{g (Con A)}$  (NaAc-Puffer). Auch wenn bei wiederholten Immobilisierungszyklen an Modulen auf Epoxybasis die gebundenen GOD-Mengen sinken, liegen die Werte mit  $0,08 \mu\text{g (GOD)}/\mu\text{g (Con A)}$ ,  $0,14 \mu\text{g (GOD)}/\mu\text{g (Con A)}$  und  $0,10 \mu\text{g (GOD)}/\mu\text{g (Con A)}$  bei vorheriger Con A-Bindung in Boratpuffer nur geringfügig unter den der Cu-IDA-Membranen. Wird die Con A-Immobilisierung in NaAc-Puffer durchgeführt, ist diese Abnahme deutlich geringer, man erhält Werte von  $0,28$ ,  $0,34$  und  $0,26 \mu\text{g (GOD)}/\mu\text{g (Con A)}$ . Die gebundenen GOD-Moleküle konnten von allen Membranen eluiert werden, bei Membranen auf IDA-Basis ist die Elution durch Mannosidlösung und über einen pH-Shift allerdings nicht quantitativ.

Es eignen sich grundsätzlich alle getesteten Membransysteme für die Bindung von GOD als Modellprotein. Weitere Versuche umfassen u. A. die Isolierung von GOD aus Kultivierungsmedien. Sie werden aufgrund der Ergebnisse der Versuche, die in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden, mit Con A-Epoxymembranen durchgeführt, bei denen die Con A-Bindung in Boratpuffer durchgeführt wurde und mit kupferbeladenen Con A-IDA-Membranen.

## 4.2 Isolierung von Glykoproteinen aus Kultivierungsmedien

Für die Produktion rekombinanter Proteine stehen verschiedene Expressionssysteme zur Verfügung. Wichtige Beispiele sind das Bakterium *Escherichia coli*, die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* oder Säugerzellen. Da bakterielle Proteine häufig keine oder

nur eine eingeschränkte biologische Aktivität zeigen, instabil sein können und die Gefahr der Verunreinigung mit Endotoxinen besteht, sind sie für die Produktion von Pharmaproteinen nur eingeschränkt geeignet. *Saccharomyces cerevisiae* hingegen produziert keine Endotoxine, jedoch kann das Glykosilierungsmuster von den Proteinen abweichen, die beispielsweise aus Gewebe isoliert wurden [6] [7]. Wichtige Beispiele für Zelllinien aus Säugetieren sind u. A. BHK-Zellen (*baby hamster kidney*), HEK-Zellen (*human embryonic kidney*) oder CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*). Während HEK-Zellen vorrangig im Bereich der Forschung eingesetzt werden, verwendet man BHK-Zellen meist für die Produktion von Impfstoffen, beispielsweise gegen die Maul- und Klauenseuche [12]. Sollen rekombinante Proteine zur Anwendung an Menschen produziert werden, wird häufig auf CHO-Zelllinien zurückgegriffen, da hier das Glykosilierungsmuster in vielen Fällen dem der humanen Proteine entspricht oder diesem sehr ähnlich ist [110] [111].

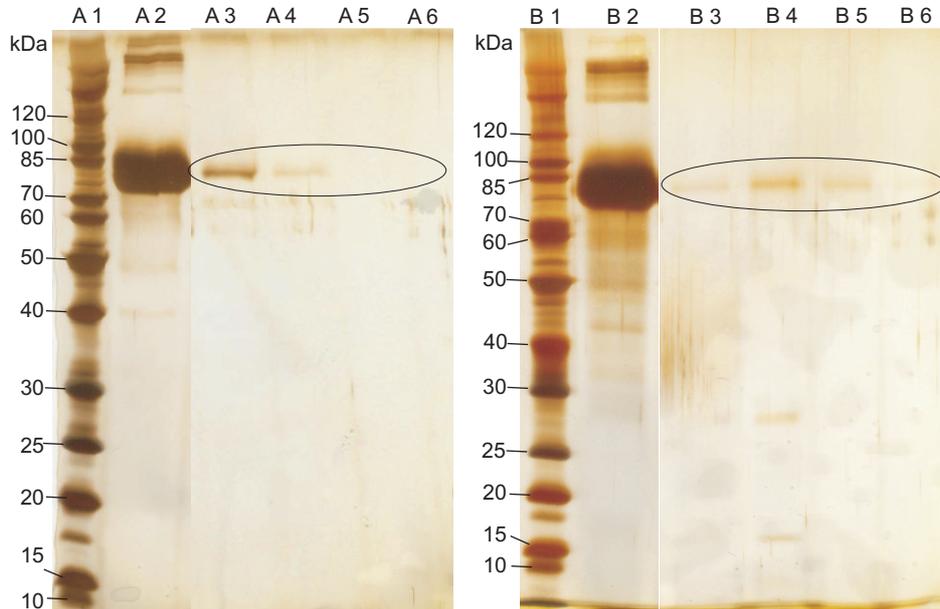
Die Möglichkeiten, glykosilierte Proteine aus Kultivierungsmedien zu isolieren, sind daher im Bereich der Produktaufarbeitung von großer Bedeutung. Zu diesem Zweck soll die in den vorhergehenden Versuchen als Modellprotein verwendete GOD aus einem Kultivierungsmedien isoliert werden, welches zur Kultivierung von CHO-Zellen eingesetzt wird. Es handelt sich um das ProCHO-4-Medium der Firma *Bio Withaker*. Daneben sollen die Versuche zur Isolierung von GOD auf ein weiteres Kultivierungsmedium ausgedehnt werden, um einen eventuellen Einfluss der Medien auf die Bindung der Proteine an die Membran abschätzen zu können. Es handelt sich um LB-Medium, welches üblicherweise bei der Kultivierung von Bakterien verwendet wird. Es wurde hier trotz des abweichenden Anwendungsgebietes gewählt, da die auf ihren Einfluss auf die GOD-Immobilisierung getesteten Medien eine möglichst unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen sollten. Die genaue Zusammensetzung des LB-Mediums ist im Anhang angegeben (siehe B.3).

#### 4.2.1 Con A-Epoxy-Membranen zur Isolierung von GOD aus Kultivierungsmedien

Zur Immobilisierung von Con A wurde der im Anhang (B.4.1) angegebene Versuchsablauf verwendet. Die eingesetzte Protein-Konzentration betrug dabei  $1,1 \text{ mg/mL}$  in Boratpuffer, es wurden  $191 \text{ }\mu\text{g}$  bzw.  $209 \text{ }\mu\text{g}$  Con A gebunden. Nach dem Absättigen der verbliebenen Bindungsstellen mit Ethanolamin und der Membranequilibration mit NaAc-Puffer wurde jeweils zweimal GOD-Lösung ( $1,0 \text{ mg/mL}$  in Medium und NaAc, 1 : 1 gemischt) aufgegeben. Nach dem Waschen mit NaAc-Puffer erfolgte die schrittweise Elution mit  $0,1 \text{ M}$  Mannosidlösung und Glycin/HCl-Puffer (Versuchsprotokoll im Anhang B.4.2).

Wie zuvor schon bei der GOD-Bindung aus NaAc-Puffer werden auch hier nur geringe Mengen Protein gebunden. Durch die anschließende SDS-Gelelektrophorese mit 12 %-igen SDS-Gelen wird überprüft, ob gebundene GOD wieder von der Mem-

bran eluiert wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.6 zusammengestellt. Um die Abbildung übersichtlich zu halten, sind nur die aufgegebene GOD-Probe und die jeweiligen Elutionsfraktionen abgebildet.

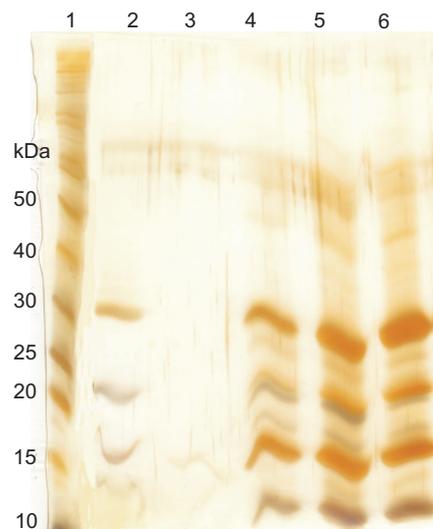


**Abb. 4.6:** Anwendung von Con A-Epoxy-Spinmodulen zur Isolierung von GOD aus Kultivierungsmedien. A: LB-Medium; B: ProCHO-4-Medium; **Spur 1:** aufgegebene GOD-Lösung, **Spur 2:** Durchlauf, **Spur 3-4:** Elution mit Mannosidlösung, **Spur 5-6:** Elution mit Glycin/HCl-Puffer (pH-Shift)

Gel A gibt das Ergebnis für die Isolierung von GOD aus LB-Medium wieder, Gel B für die aus ProCHO-4-Medium. Beide Gele zeigen für die Elution mit Mannosidlösung ein positives Ergebnis, GOD konnte eluiert werden. In Gel B ist darüber hinaus noch eine schwache GOD-Bande in der ersten Glycin/HCl-Elution sichtbar (Spur B5). In Spur B4 sieht man neben der GOD-Bande zwei weitere schwache Banden bei ca. 26 und 15 *kDa*. Ein Vergleich der Bandenmuster ergab, dass es sich um Verunreinigungen der Elutionsfraktionen mit Con A handelt. Die Ursache der Con A-Verunreinigung könnte in unspezifisch gebundenem Con A liegen, welches trotz diverser Waschschrte nicht vollständig entfernt werden konnte. Die genaue Quantifizierung der gebundenen GOD-Menge war, ebenso wie bei vorhergehenden Versuchen mit Membranen auf Epoxybasis, aufgrund der geringen Proteinnengen nicht möglich.

### 4.2.2 Con A-IDA-Membranen zur Isolierung von GOD aus Kultivierungsmedien

Analog zur Isolierung von GOD aus Medien mit Con A-Membranen auf Epoxybasis wurden entsprechende Versuche mit Membranen auf IDA-Basis sowohl mit LB als auch mit ProCHO-4-Medium durchgeführt. Diese Versuche zeigten allerdings keine positiven Ergebnisse. Die Aufgabe von mit NaAc-Puffer verdünnten Medien führt zur Elution des gebundenen Con A. Auch eine durch Kupferionen verursachte Blaufärbung war erkennbar. Um den Effekt der Medien isoliert betrachten zu können, wurden Versuche ohne zugesetztes Protein mit stark verdünnten Medien durchgeführt. Im Anschluss an die Aufgabe der Medien erfolgten Waschschritte mit NaAc-Puffer, danach wurde dreimal Mannosidlösung als Elutionsmittel aufgegeben. Das Ergebnis der Gelelektrophorese für die Aufgabe von 1:4 mit NaAc-Puffer verdünntem ProCHO-4-Medium ist exemplarisch für beide getesteten Medien in Abbildung 4.7 angegeben. Die Färbung wurde entsprechend der Silbernitratmethode [109] durchgeführt.



**Abb. 4.7:** Aufgabe von 1 : 4 verdünntem ProCHO-4-Medium ohne Proteinzusatz auf Con A-IDA-Spinmodule. **Spur 1:** Marker, **Spur 2:** Durchlauf, **Spur 3:** Waschfraktion 2, **Spur 4-6:** Elution mit Mannosidlösung

Durch die Gelelektrophorese wird deutlich, dass die Aufgabe von verdünntem Medium die Elution von Con A-Molekülen bewirkt. Die zweite Waschfraktion weist keine Proteine auf, während die Mannosidfraktionen wieder deutliche Con A-Banden zeigen. Da diese Effekte bei der Bindung von GOD aus Puffer nicht auftreten (vgl. Kapitel 4.1.2) ist die Ursache in den getesteten Medien zu suchen. Aufgrund dieser Ergebnisse sind Con A Membranen auf IDA-Basis für die Isolierung von Glykoproteinen aus verdünnten Medien als nicht geeignet anzusehen.

### 4.3 Isolierung von Molkenproteinen

Die Isolierung von Glykoproteinen ist nicht auf die Bindung aus Kultivierungsmedien beschränkt, es gibt daneben noch „natürliche“ Quellen, in denen wertvolle glykosilierte Proteine enthalten sind. Ein bedeutendes Beispiel hierfür ist Milch bzw. Molke, die eine Vielzahl verschiedener Proteine enthält. Entsprechend ihres Anteils werden sie in *majore* und *minore* Molkenproteine eingeteilt. Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über einige wichtige Proteine und ihre Eigenschaften.

**Tabelle 4.3:** Molkenproteine und ihre Eigenschaften [112]

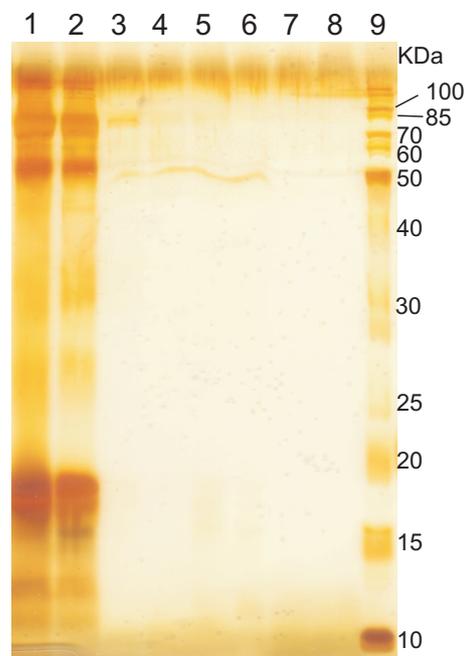
Protein	Molekulargewicht [kDa]	Konzentration [g/L]	Isolelektrischer Punkt
<b>majore Proteine</b>			
$\beta$ -Lactoglobulin	18,4	2,0 – 4,0	5,2
$\alpha$ -Lactalbumin	14,0	0,6 – 1,7	4,2 – 4,5
BSA	66,0	0,4	4,7 – 4,9
Immunoglobuline	> 146,0	0,4 – 1,0	5,5 – 8,3
<b>minore Proteine</b>			
Lactoferrin	82,8	0,1	8,8
Transferrin	76,0	0,1	6,7

Von den in Tabelle 4.3 aufgeführten Proteinen ist insbesondere Lactoferrin und dessen Isolierung von Interesse. Die Bedeutung von Lactoferrin liegt u. A. in der Beteiligung an der Regulation der Eisenaufnahme und am Metalltransport. Auf gramnegative Bakterien hat Lactoferrin eine antimikrobielle Wirkung, Ursache ist die Eisenkomplexierung bzw. die Wechselwirkung mit Membrankomponenten. In Humanmilch ist Lactoferrin zu  $\sim 2 \text{ g/L}$  enthalten, Kuhmilch enthält nur zwischen  $\sim 0,1 \text{ g/L}$ .

Zur Isolierung von Lactoferrin aus Molke mit Hilfe von Membranadsorbentien wurden bereits Kationenaustauschermembranen der Firma Sartorius erfolgreich eingesetzt [53]. Jedoch sind die erhaltenen Lactoferrinfraktionen noch deutlich mit anderen Proteinen, beispielweise Lactoglobulin und Lactalbumin, verunreinigt. Da es sich bei Lactoglobulin um ein bedeutendes Allergen handelt sind weitere Aufreinigungsschritte zur sauberen Isolierung von Lactoferrin sinnvoll. Con A-Membranen bieten die Möglichkeit, die verschiedenen Proteine auf der Basis ihrer unterschiedlichen Glykosilierungsmuster zu trennen. Sie werden daher im Folgenden zur Isolierung von Molkenproteinen eingesetzt. Es kommen Con A-Membranen sowohl auf Epoxy- als auch auf IDA-Basis zum Einsatz, für alle Versuchsreihen wurden Spinmodule verwendet.

### 4.3.1 Bindung von Molkenproteinen an Con A-Membranen auf Epoxybasis

Die Con A-Epoxy-Module wurden entsprechend B.4.1 hergestellt. Nach der Absättigung der freien Bindungsstellen und der Aktivierung mit NaAc-Puffer wurden 0,4 mL einer 1,2 mg/mL Lactoferrinlösung (isoliert aus Molke mittels Kationenaustauschermembranen) in NaAc-Puffer auf die Membran gegeben. Nach zwei Waschschritten wurde Mannosidlösung zur Elution eingesetzt. Als weiteres Elutionsmittel wurde im Anschluss Glycin/HCl-Puffer aufgegeben, 0,1 M NaOH wurde zur Neutralisation vorgelegt (siehe Anhang B.4.2). Die aufgegebene Probe, der Durchlauf, die 2. Waschfraktion sowie alle Elutionsfraktionen wurden auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Zur Färbung wurde die Silbernitratmethode [109] verwendet. Abbildung 4.8 stellt das Ergebnis dar.



**Abb. 4.8:** Bindung von Molkenproteinen an Con A-Membranen auf Epoxybasis.

**Spur 1:** aufgegebene Lactoferrinlösung, **Spur 2:** Durchlauf, **Spur 3:** Waschfraktion 2, **Spur 4-6:** Elution mit Mannosidlösung, **Spur 7-8:** Elution mit Glycin/HCl-Puffer (pH-Shift), **Spur 9:** Marker

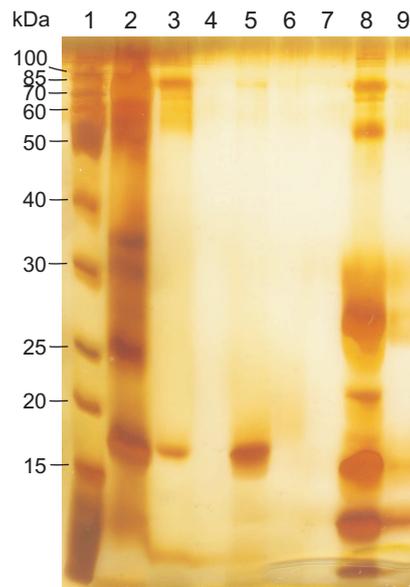
Es wird deutlich, dass es bei Verwendung von Con A-Membranen aus Epoxybasis nicht möglich war, Molkenproteine zu Binden. In der Spur des SDS-Gels in der der Durchlauf aufgetragen ist (Spur 2), finden sich die gleichen Proteinbanden in etwa der gleichen Intensität wie die ursprünglich aufgegebene Probe (Spur 1). Daneben ist eine sehr schwache Bande in der Waschfraktion zu erkennen (Spur 3). In keiner der Elutionsfraktionen (Spuren 4 – 8) hingegen sind Proteinbanden erkennbar.

Es ist daher davon auszugehen, dass keine Bindung von Molkenproteinen an die Con A-Moleküle der Membran erfolgte. Weitere Optimierungsversuche zur Verbesserung der Bindung dieser Proteine zeigten keine positiven Ergebnisse. Die mögliche Isolierung von Proteinen, insbesondere von Lactoferrin, direkt aus Molke durch Con A-Epoxyembranen wurde daher nicht weiter verfolgt.

### 4.3.2 Bindung von Molkenproteinen an Con A-Membranen auf IDA-Basis

In Kapitel 4.1.2 wurde gezeigt, dass an metallchelatisierende Membranen mit Con A-Beladung im Vergleich zu epoxyaktivierten Con A-Membranen, GOD in deutlich größeren Mengen gebunden werden konnte. Nachdem sich Membranen auf Epoxybasis für die Bindung von Molkenproteinen als nicht geeignet erwiesen haben, soll hier das Potenzial von Membranen auf IDA-Basis diskutiert werden. Hierzu wurden auf Con A-beladende  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA-Membranen jeweils 0,4 mL einer 1,2 mg/mL Lactoferrinlösung (isoliert aus Molke mittels Ionenaustauschermembran) in NaAc-Puffer gegeben. Im Anschluss an drei Waschschriffe erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Mannosidlösung steigender Konzentration (0,1, 0,5 und 1,0 M), Glycin/HCl-Puffer, sowie einem weiteren Puffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8), der alle gebundenen Proteine aufgrund der hohen Imidazolkonzentration eluiert. Zur Kontrolle des Elutionserfolges wurde eine SDS-Gel-elektrophorese mit einem 15 %igen SDS-Gel durchgeführt. Zur Färbung wurde die Silbernitratmethode verwendet. In Abbildung 4.9 (S. 70) sind die relevanten Spuren des SDS-Gels zusammengestellt.

Die deutlich verunreinigte Lactoferrinlösung, die auf das Spinmodul aufgegeben wurde, ist in Spur 2 des SDS-Gels aufgetragen. Ein großer Teil dieser Probe wird durch die Con A-Membran gebunden. Im Durchlauf (Spur 3) sind nur noch 2 Banden vorhanden, bei 80 – 85 kDa und bei  $\sim 18$  kDa, es handelt sich um die Banden von Lactoferrin, welches aus der verunreinigten Probe isoliert werden sollte, und um Lactoglobulin. Der überwiegende Anteil des ursprünglich in der Probe vorhandenen Lactoglobulins sowie die weiteren enthaltenen Proteine wurden durch die Con A-Membran gebunden. Durch Elution mit 0,1 M Mannosidlösung (Spuren 5 – 7) wird das gebundene Lactoglobulin anteilig sehr sauber eluiert. Ein Elutionsschritt ist ausreichend (Spur 5), in den Spuren 6 – 7 sind keine Proteinbanden vorhanden. Die Proben der Elutionen mit Mannosidlösungen der Konzentrationen 0,5 und 1,0 mol/L sowie der Glycin/HCl-Puffer zeigten keine Proteinbanden und werden daher aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. In den Spuren 8 und 9 sind die ersten beiden Elutionsfraktionen des imidazolhaltigen Elutionspuffers aufgetragen. Es wird deutlich, dass der überwiegende Teil der zuvor gebundenen Proteine erst durch diesen Puffer eluiert wurde. Er wurde als letztes Elutionsmit-



**Abb. 4.9:** Bindung von Molkenproteinen an Con A-Membranen auf IDA-Basis. **Spur 1:** Marker, **Spur 2:** aufgegebene Lactoferrinlösung, **Spur 3:** Durchlauf, **Spur 4:** Waschfraktion 3, **Spur 5-7:** Elution mit 0,1 M Mannosidlösung, **Spur 8-9:** Elution mit imidazolhaltigem Natriumphosphatpuffer

tel eingesetzt und alle gebundenen Proteine einschließlich des Con A wurden von der Membran verdrängt. In Spur 8 ist u. A. eine Lactoferrinbande erkennbar, Spur 9 zeigt nur noch schwache Proteinbanden. In den folgenden Elutionsfraktionen sind keine weiteren Proteinbanden zu erkennen. Es ist daher davon auszugehen, dass die gebundenen Proteine vollständig von der Membran eluiert wurden.

Ziel der Versuchsreihen war, vorhandene Verunreinigungen aus Lactoferrinproben, die mittels Ionenaustauschermembranen aus Molke isoliert wurden, abzutrennen. Dabei sind grundsätzlich zwei unterschiedliche Wege möglich. Zum Einen kann das Lactoferrin an die Con A-Membran gebunden werden, während andere Proteine aufgrund unterschiedlicher Glykosilierungsmuster nicht binden oder, sofern eine Bindung erfolgt, die Elution der gebundenen Proteine durch verschiedene Elutionsmittel getrennt möglich ist. Zum Anderen kann eine Isolierung des Lactoferrins erreicht werden, indem alle Verunreinigungen an die Membran gebunden werden, während das Zielprotein diese passiert. Es zeigt sich, dass durch Con A-Membranen auf IDA-Basis beide Aufreinigungswege möglich sind. Ein Teil des Lactoferrins und der überwiegende Teil der weiteren vorhandenen Proteine wurden durch die Membran gebunden. Der Durchlauf enthält nur noch Lactoferrin und einen geringen Teil des vorher vorhandenen Lactoglobulins. Die erhaltene Lactoferrinfraktion ist deutlich sauberer als die aufgegebene Probe. Gleichzeitig ist dieser Weg sehr schonend für das Zielprotein, es muss nicht durch entsprechende Elutionsmittel, die sich negativ auf das Protein auswirken können, von der Membran eluiert werden.

Durch Mannosidlösung oder mittels pH-Shifts war eine Elution des an die Membran gebundenen Lactoferrins nicht möglich. Das Allergen Lactoglobulin hingegen konnte durch Mannosidlösung eluiert werden, so dass die Elutionsfraktion mit imidazolhaltigem Puffer deutlich geringere Mengen des Allergens Lactoglobulin enthält.

Entsprechende Versuche mit IDA-Membranen, die vor der Con A-Immobilisierung mit den Metallionen Nickel, Zink und Cobalt beladen wurden, zeigten ähnliche Ergebnisse. Ebenfalls analoge Ergebnisse erhält man, wenn statt Lactoferrinlösung direkt mit Bindungspuffer verdünnte Molke eingesetzt wird.

Lactoglobulin ist, wie bereits oben erwähnt, neben Lactalbumin und Casein ein bedeutendes Allergen. Con A-beladene IDA-Membranen bieten eine Möglichkeit zur Abtrennung dieses Allergens aus Nahrungsmitteln. Der Einsatz entsprechender Membranverfahren könnte daher im Bereich der industriellen Produktion von Allergikernahrung interessant sein.

#### 4.4 Scale up auf $75 \text{ cm}^2$ Sartobind-Module: Isolierung von GOD aus Natriumacetat-Puffer

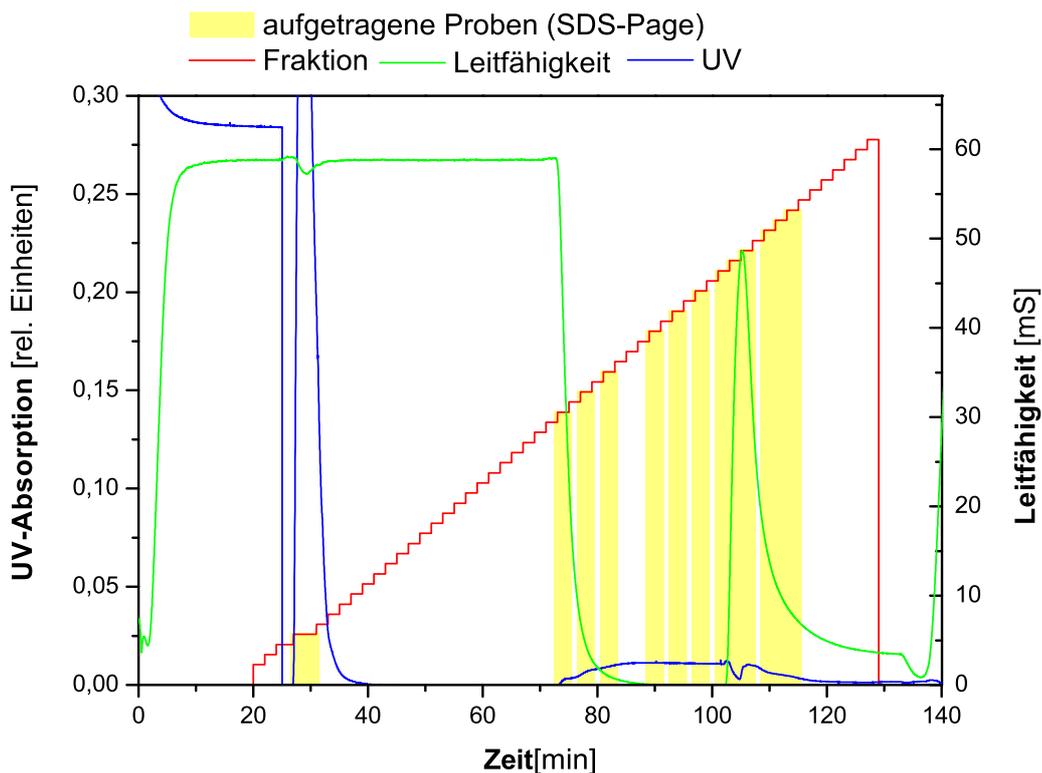
Spinmodule eignen sich aufgrund der geringen benötigten Probenmenge sowie den kurzen Prozesszeiten sehr gut, um beispielsweise Bindungs- oder Elutionsbedingungen zu testen. Zur Bindung des Glykoproteins GOD konnten Spinmodule mit Con A-Membranen erfolgreich eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.2), soll jedoch das optimierte Verfahren in einem industriellen Prozess eingesetzt werden, werden größere Membranflächen benötigt. Innerhalb von Spinmodulen lässt sich diese Membranfläche nicht verwirklichen und darüber hinaus ist ein Verfahren wünschenswert, bei dem Lösungen etc. nicht manuell auf die Membran aufgegeben werden müssen. Somit kommen vor allem kontinuierlich durchflossene Membransysteme, wie die verwendeten Sartobind-Module in Betracht. Anhand dieser Einheiten soll ein mögliches Scale up auf die im Vergleich zu den Spineinheiten 10fache Membranfläche diskutiert werden. Es wurden Module mit epoxy- und IDA-aktivierten Membranen eingesetzt. Im Folgenden werden exemplarisch die Ergebnisse für epoxyaktivierte Membranen diskutiert.

Die Immobilisierung des Con A ( $2,3 \text{ mg/mL}$  in Boratpuffer) erfolgt entsprechend der Empfehlung des Herstellers im Kreisstrom. Es wurde eine Schlauchpumpe eingesetzt, die Fließgeschwindigkeit betrug  $1 \text{ mL/min}$ . Nach  $3 \text{ h}$  Immobilisierungsdauer wurde das Modul mit Boratpuffer gespült und verbliebene Bindungsstellen mit Ethanolamin abgesättigt. Die Bindung und Elution von GOD erfolgte mit einer BioLogic-FPLC-Anlage der Firma BioRad (FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography). Tabelle 4.4 gibt den Versuchsablauf wieder.

**Tabelle 4.4:** Versuchsablauf zur GOD-Isolierung durch Con A-Sartobind-Module auf Epoxybasis

	Prozessschritt	Lösung	Volumen	Flussrate
1	Equilibrierung	NaAc-Puffer	25 mL	1 mL/min
2	Probenaufgabe	GOD (1,7 mg/mL in NaAc-Puffer)	1 mL	3 mL/min
3	Waschen	NaAc-Puffer	42 mL	1 mL/min
4	Elution	Mannosidlösung (0,1 mol/L)	30 mL	1 mL/min
5	Elution	Glycin/HCl-Puffer (0,1 M, pH 2,8)	30 mL	1 mL/min
6	Equilibrierung	NaAc-Puffer	15 mL	1 mL/min

An dieser Anlage können die UV-Absorption bei 280 nm sowie die Leitfähigkeit verfolgt werden. Proben werden in Fraktionen à 2 mL gesammelt. Ein typischer Lauf ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

**Abb. 4.10:** FPLC-Ergebnisse der GOD-Bindung durch Sartobindmodule

In der Grafik lässt sich gut der Peak der UV-Absorption für die aufgegebenen GOD-Probe nach ca. 28 *min* Versuchsdauer erkennen. Hierbei handelt es sich um den Teil der aufgegebenen Probe, der nicht gebunden wurde. Weiterhin ist zu erkennen, dass es nach ungefähr 72 *min* zu einem erneuten Anstieg der UV-Absorption

kommt. Nach einem kurzzeitigen Absinken (105 *min*), steigt die Absorption erneut an (108 *min*). Zwar ist dieser Anstieg gering, beide Zeiträume stimmen aber mit dem Einsatz der beiden Elutionsmittel überein. Der Anstieg der Absorption könnte also durch eluierte GOD hervorgerufen werden. Aus diesem Grund werden die entsprechenden Fraktionen, in Abbildung 4.4 durch gelbe Balken gekennzeichnet, auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dabei ergab sich, dass in den aufgetragenen Fraktionen der Elutionsschritte keine Proteinbanden nachweisbar waren. Wiederholte Versuche haben dieses Ergebnis bestätigt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine Bindung von Glukoseoxidase an Con A-beladene Sartobind-Einheiten nicht möglich ist und eine Übertragung der Ergebnisse von Zentrifugeneinheiten bei diesem Teilaspekt nicht erfolgreich war. Die Immobilisierung von Con A zeigte hingegen gute Ergebnisse, die denen der Zentrifugeneinheiten entsprachen. Ähnliche Ergebnisse ergeben sich für Con A-Membranen auf IDA-Basis, der Nachweis von GOD in den Elutionsmitteln war nicht möglich.

Die Ursache für die von Spinmodulen abweichenden Ergebnisse liegt in den unterschiedlichen Immobilisierungsverfahren des Con A. Die Immobilisierung wird im Kreisstrom durchgeführt, Con A muss für mehrere Stunden bei Raumtemperatur mittels einer Schlauchpumpe durch das Modul gepumpt werden. Diese notwendige Vorgehensweise hat offensichtlich negative Auswirkungen auf die Aktivität des Lektins.

## 4.5 Zusammenfassung

Die Isolierung von Glykoproteinen stellt einen wichtigen Bereich des Downstreamings dar. In diesem Kapitel wurden die Möglichkeiten diskutiert, mit Hilfe von Con A-Membranen auf der Basis von epoxy- oder IDA-aktivierten Membranen, Glykoproteine zu binden. Als Modellprotein wurde GOD verwendet.

Con A-Membranen auf Epoxybasis wurden in vier verschiedenen Bindungspuffern hergestellt (vgl. Kapitel 3.5). Zwei der Membranen erwiesen sich als geeignet zur Bindung von GOD. Es handelt sich um die Membranen, bei denen die Con A-Immobilisierung im Borat- bzw. NaAc-Puffer durchgeführt wurde. Bezogen auf die Con A-Menge ergeben sich annähernd gleiche Quotienten für das Verhältnis von GOD zu Con A. Es kann daher von einer ähnlichen Aktivität ausgegangen werden; diese wird durch den Bindungspuffer nicht beeinflusst. Für weitere Arbeiten ist die Immobilisierung von Con A in Boratpuffer sinnvoller, da bei gleicher Aktivität größere Con A-Mengen gebunden werden können. Die gebundene GOD konnte durch einen pH-Shift eluiert werden. Bei mehrfacher Beladung sinkt allerdings die gebundene GOD Menge pro Spinmodul.

Für IDA-Membranen ergab sich eine Abhängigkeit der GOD-Beladung vom Metallion, mit dem die IDA-Gruppen zuvor beladen wurden (Kapitel 4.1.2.1). Die größte

GOD-Menge wurde nicht an die Membran mit der größten Con A-Beladung gebunden. Das beste Ergebnis ergaben Membranen mit Kupferbeladung. Es konnten hier im Vergleich zu Membranen auf Epoxybasis deutlich größere Mengen GOD immobilisiert werden. Der Quotient von GOD-Menge zur Con A-Menge liegt aber deutlich unter dem, der mit Epoxymembranen erreicht wurde. Für die Elution der GOD erwies sich bei Con A-IDA-Membranen der Einsatz von Mannosidlösung als geeignet. Im Gegensatz zu Epoxymembranen ist die wiederholte Bindung von GOD möglich, über sieben Immobilisierungszyklen ist für die immobilisierte Menge eine deutliche Streuung um einen Mittelwert erkennbar. Die Bindungskapazitäten sinken dabei im Mittel nur geringfügig ab. Die gebundene GOD konnte jedoch nicht quantitativ eluiert werden.

Die Isolierung von GOD aus Kultivierungsmedien wurde mit Con A-Epoxymembranen getestet. Dabei konnte GOD aus LB-Medium und einem speziellen Medium zur Kultivierung von CHO-Zellen isoliert und durch Mannosidlösung von der Membran eluiert werden. Analoge Versuche mit Membranen auf IDA-Basis ergaben, dass die Aufgabe von verdünntem Medium zu einer Elution des nicht kovalent gebundenen Con A, sowie von Kupferionen, führt.

Neben der Isolierung von Glykoproteinen aus Kultivierungsmedien sind auch natürliche Flüssigkeiten, wie beispielsweise Molke, von Interesse. Aus Molke kann das Glykoprotein Lactoferrin isoliert werden. Daher wurden die Con A-Membranen auch zur Aufreinigung von Lactoferrin getestet, welches zuvor mittels Ionenaustauscher aus Molke isoliert wurde und noch deutliche Verunreinigungen aufwies. Con A-Membranen auf Epoxybasis zeigten kein Bindungsvermögen für Molkenproteine, weder für Lactoferrin, noch für enthaltene Verunreinigungen. Con A-IDA-Membranen waren hingegen in der Lage, Molkenproteine zu binden. Die weitere Reinigung von Lactoferrin war möglich. Gleichzeitig konnte das Allergen Lactoglobulin durch Mannosidlösung sehr sauber von der Con A-Membran eluiert werden. An der Isolierung einzelner Molkenproteine besteht seit einiger Zeit ein kommerzielles Interesse, so ist Lactoglobulin beispielsweise ein guter Schaumstabilisator und wird, trotzdem es sich um ein Allergen handelt, in der Süßwarenindustrie eingesetzt. Die gezielte Isolierung ist Gegenstand der aktuellen Forschung [54].

---

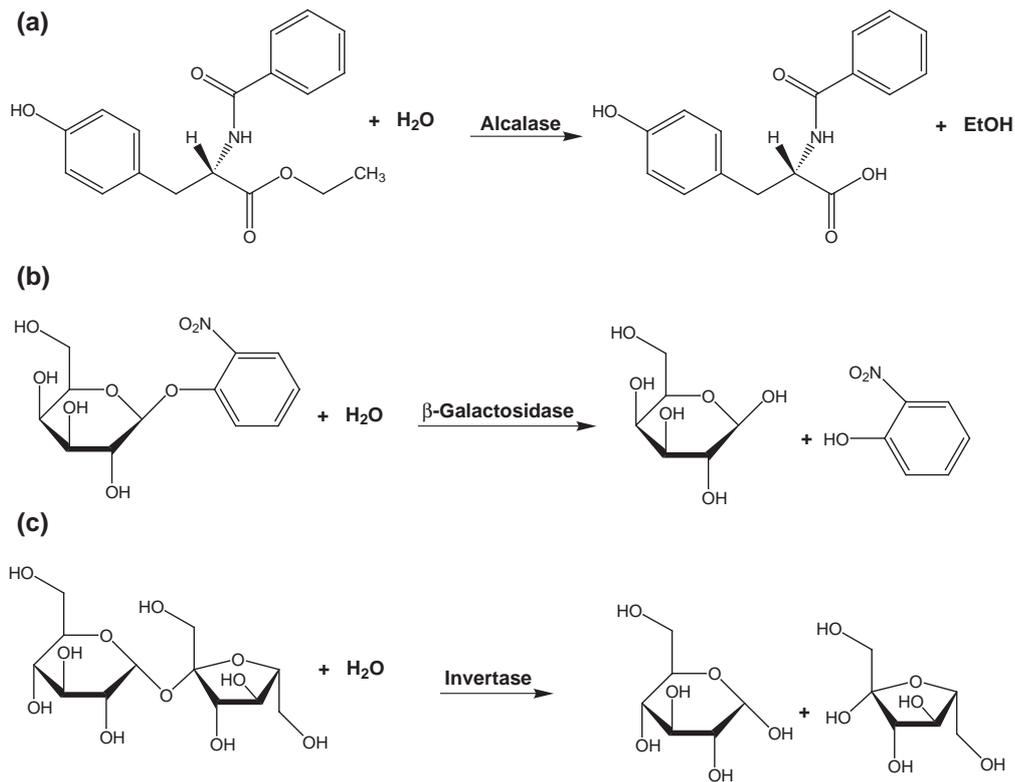
## Kapitel 5

# Spinmodule als Enzym-Festbettreaktoren

In Kapitel 2.3.2 wurden Membranreaktoren im Allgemeinen erläutert und darüber hinaus die Möglichkeiten angesprochen, solche Reaktoren für (bio-)katalysierte Reaktionen einzusetzen. In Kapitel 3.6 wurde gezeigt, dass die Immobilisierung von Enzymen aus unterschiedlichen Enzymklassen an metallchelatisierende Membranen bei guten Bindungskapazitäten möglich ist. Aufbauend auf diesen Ergebnissen soll in diesem Kapitel die Anwendung durch Enzyme modifizierter Membranen zur Umsetzung von Substraten diskutiert werden. Die folgenden Versuche wurden mit drei der in Kapitel 3.6 verwendeten Modellenzyme durchgeführt, mit Alcalase,  $\beta$ -Galactosidase und Invertase.

Bei Alcalase wird N-Benzoyl-L-Tyrosin-Ethylester (BTEE) als Substrat eingesetzt [113] [114] [115]. Für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase ist o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG) geeignet [116] [117] [118]. Bei beiden Reaktionen kann die Produktbildung photometrisch verfolgt werden. Ein geeignetes Substrat für Invertase ist Saccharose [119] [120] [121] [122]. Auch hier wird die Bildung eines Produkts verfolgt, über einen kommerziellen Test lässt sich die Glukosekonzentration im Durchlauf bestimmen. Auf Seite 76 sind in Abbildung 5.1 die Reaktionsgleichungen für die oben genannten Reaktionen angegeben.

Die Möglichkeiten, Membranen mit immobilisierten Enzymen als Festbettreaktor zu nutzen, werden zunächst am Beispiel von Spinmodulen erörtert. Diese Module arbeiten mit kleinen Probenvolumen und können genutzt werden, um die jeweils optimalen Reaktionsbedingungen zu ermitteln. In Kapitel 5.2 wird auf diese Anwendung genauer eingegangen, bevor in den anschließenden Kapiteln die Einsatzmöglichkeiten der Spinmodule an Beispielen diskutiert werden.



**Abb. 5.1:** Modellreaktionen für Enzym-Festbettreaktoren: (a) Alcalase und BTEE-Substrat, (b)  $\beta$ -Galactosidase und ONPG, (c) Invertase und Saccharose

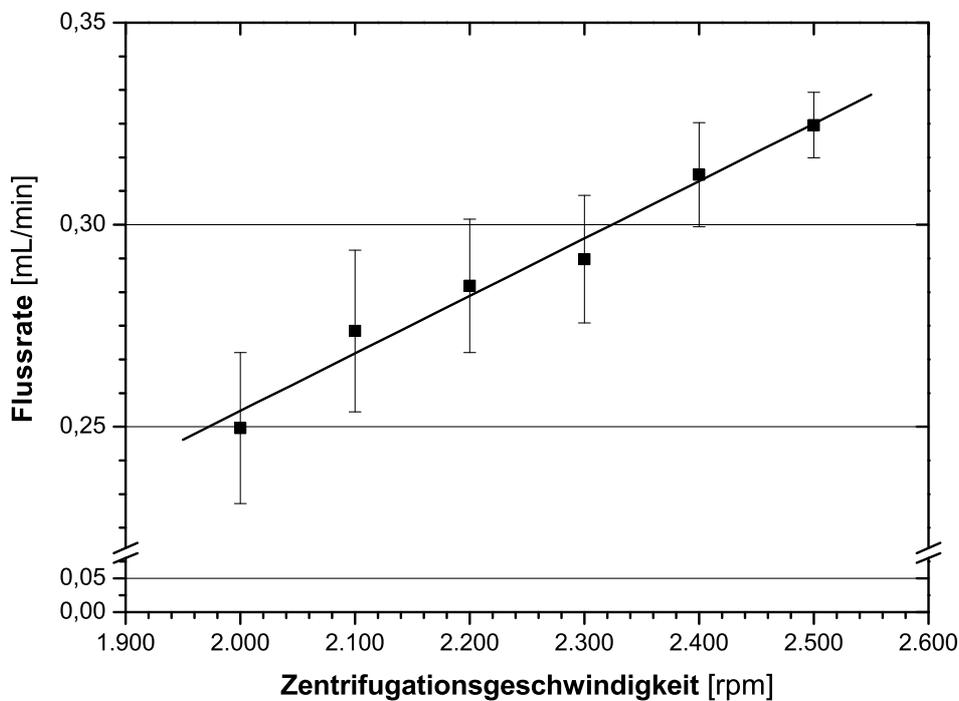
## 5.1 Fließgeschwindigkeiten in Spinmodulen und ihr Einfluss auf die Substratumsetzung durch gebundene Enzyme

Spinmodule mit immobilisierten Enzymen sollen als Festbettreaktor für die Umsetzung von Substraten getestet werden. Üblicherweise werden Reaktoren mit Hilfe ihres Verweilzeitverhaltens charakterisiert. Die Bestimmung des Verweilzeitverhaltens bei Spinmodulen ist aufgrund ihrer Bauart nicht möglich. Die Module können nicht kontinuierlich eingesetzt werden, da nur die Aufgabe einer auf maximal 400 mL begrenzten Flüssigkeitsmenge auf die Membranen möglich ist, nicht aber eine fortwährende Zuführung entsprechender Lösungen. Nach der Flüssigkeitsaufgabe werden die Module in einer Zentrifuge prozessiert, während des Zentrifugationsvorganges ist keine Probenahme möglich. Aus diesem Grund werden nur die Fließgeschwindigkeiten der Lösungen in Abhängigkeit von der Zentrifugationsgeschwindigkeit ermittelt und, darauf aufbauend, mögliche Einflüsse auf die Umsetzung von Substraten betrachtet.

### 5.1.1 Fließgeschwindigkeiten und hydrodynamische Verweilzeiten

Die Umsetzung von Substraten an enzymbeladenen IDA-Membranen wird zunächst in Spinmodulen durchgeführt. Dabei ist es von Bedeutung, den Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf die Flussrate des Substrates durch die Membran zu bestimmen. Ist diese nicht bekannt, können die Ergebnisse solcher Umsetzungen nicht oder nur schwer auf andere Modulformen übertragen werden.

Auf die Membranen von Spineinheiten, welche zuvor mit  $\sim 300 \mu\text{g}$  Alcalase beladen wurden, wurden je  $400 \mu\text{L}$  einer  $0,1 \text{ M}$  NaCl-Lösung gegeben und für jeweils  $1 \text{ min}$  zentrifugiert. Das Volumen der Substratlösung wurde bestimmt und in Relation zur Zentrifugationsgeschwindigkeit gesetzt. Abbildung 5.2 gibt die Ergebnisse der Versuche wieder.



**Abb. 5.2:** Abhängigkeit der Fließgeschwindigkeit von Substratlösung von der Zentrifugationsgeschwindigkeit

Die Steigerung der Zentrifugationsgeschwindigkeit von  $2.000$  bis auf  $2.500 \text{ rpm}$  bewirkt eine Steigerung der Fließgeschwindigkeit von  $0,25 \text{ mL/min}$  auf  $0,32 \text{ mL/min}$ . Geringere Geschwindigkeiten ließen sich aufgrund technischer Gegebenheiten nicht verwirklichen. Bei Geschwindigkeiten, die über  $2.500 \text{ rpm}$  hinausgingen, ist eine korrekte Bestimmung der Durchflussrate nicht mehr möglich. In diesen Fällen ist die Zeit, die die aufgegebene Substratlösung benötigt, um durch die Membran in das Mikroreaktionsgefäß zu laufen, geringer als die kleinste einstellbare Zentrifuga-

tionsdauer ( $1\text{min}$ ). Aus den in Abbildung 5.2 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass die Fehler bei der Bestimmung der Fließgeschwindigkeiten bei niedrigen Umdrehungszahlen mit bis zu 7,5 % bei 2.000 *rpm* recht hoch sind. Die Abweichung beträgt hier, bezogen auf den Mittelwert, 0,018 *mL/min*. Mit steigender Umdrehungszahl sinkt der Fehler auf 2,5%. Die lineare Regression ergibt ein gutes Ergebnis. Der Korrelationskoeffizient der Ausgleichsgerade beträgt 0,988. Die Gerade geht durch den Ursprung und weist eine Steigung von  $1,287 \cdot 10^{-4} \text{ ml/Umdrehung}$  auf.

Ein Problem bei der Bestimmung der Fließgeschwindigkeit liegt darin, dass während der Anlaufzeit der Zentrifuge bereits Flüssigkeit durch die Membran läuft, während die eigentliche Zentrifugationsgeschwindigkeit noch nicht erreicht ist. Die tatsächliche Fließgeschwindigkeit bei erreichter Zentrifugationsgeschwindigkeit ist also geringfügig höher, eine exakte Bestimmung ist aber nicht möglich. Für die Bewertung des Einsatzes der Module als Membranreaktor, reicht die hier bestimmte mittlere Fließgeschwindigkeit aus, da beim Zentrifugieren von Substratlösungen die gleichen Effekte auftreten.

Mit Kenntnis der Fließgeschwindigkeiten ist die Berechnung der hydrodynamischen Verweilzeiten in Abhängigkeit von den Zentrifugationsgeschwindigkeiten möglich. Neben den Fließgeschwindigkeiten wird dazu das Reaktorvolumen benötigt. Nach Herstellerangaben beträgt es 240  $\mu\text{L}$ . Tabelle 5.1 stellt die Ergebnisse zusammen.

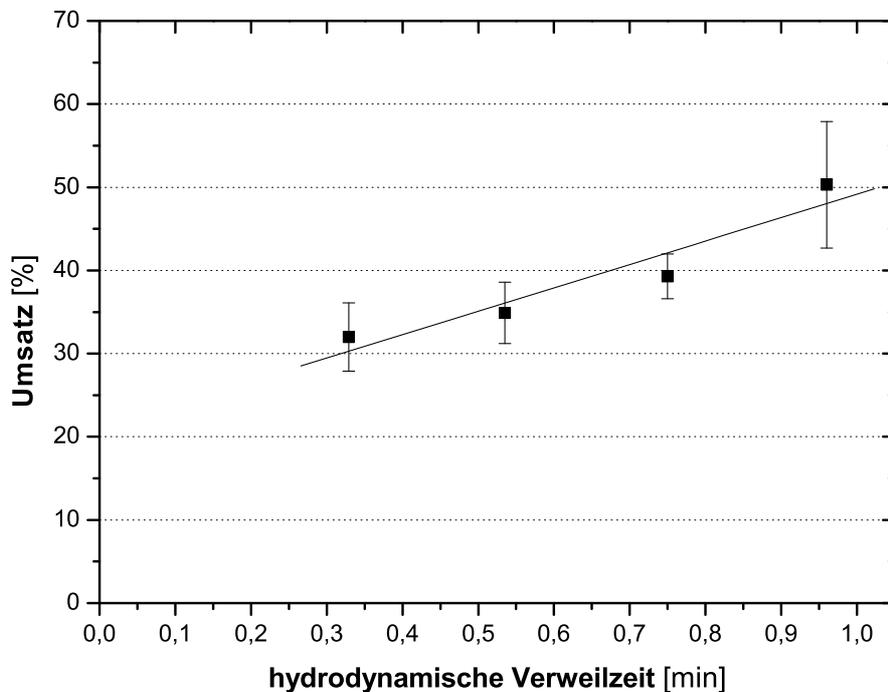
**Tabelle 5.1:** Fließgeschwindigkeiten und hydrodynamische Verweilzeiten für Spinmodule in Abhängigkeit von der Zentrifugationsgeschwindigkeit

Zentrifugations- geschwindigkeit [ <i>rpm</i> ]	Fließ- geschwindigkeit [ <i>mL/min</i> ]	hydrodynamische Verweilzeit [ <i>min</i> ]
2000	$0,25 \pm 0,019$	$0,96 \pm 0,072$
2100	$0,27 \pm 0,002$	$0,89 \pm 0,006$
2200	$0,28 \pm 0,017$	$0,86 \pm 0,050$
2300	$0,29 \pm 0,016$	$0,83 \pm 0,045$
2400	$0,31 \pm 0,013$	$0,77 \pm 0,032$
2500	$0,32 \pm 0,008$	$0,75 \pm 0,019$

Erwartungsgemäß sinkt mit steigender Zentrifugationsgeschwindigkeit die hydrodynamische Verweilzeit. Bei einer Geschwindigkeit von 2000 *rpm* beträgt sie 0,96 *min* (57 *s*) und sinkt bis 2500 *rpm* auf 0,75 *min* (45 *s*).

### 5.1.2 Einfluss der Verweilzeit auf die Umsetzung von Substraten

Die aus der Zentrifugationsgeschwindigkeit resultierende Fließgeschwindigkeit von Substratlösungen übt einen Einfluss auf das Ergebnis der Umsetzung der aufgegebenen Substrate aus. Ebenfalls am Beispiel von immobilisierter Alcalase sollen die Ergebnisse für die Spaltung des BTEE-Substrates bei steigender Zentrifugationsgeschwindigkeit und somit sinkender hydrodynamischer Verweilzeit diskutiert werden. Hierzu wurden jeweils  $400 \mu\text{L}$  einer  $5,26 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/mL}$  BTEE-Substratlösung auf Spinmodule mit immobilisierter Alcalase gegeben. Die gebundene Enzymmenge betrug hierbei  $305 \pm 4 \mu\text{g}$  pro Modul. Die Produktkonzentration der Reaktion, bei der Ethanol aus dem BTEE-Molekül abgespalten wird, lässt sich photometrisch bei  $256 \text{ nm}$  messen. Abbildung 5.3 stellt den Zusammenhang zwischen dem Umsatz und der hydrodynamischen Verweilzeit für die betrachtete Modellreaktion dar.



**Abb. 5.3:** Abhängigkeit des Umsatzes in enzymbeladenen Spinmodulen von der hydrodynamischen Verweilzeit  $\tau$  am Beispiel der Spaltung von BTEE-Substrat durch immobilisierte Alcalase

Bei einer Steigerung der Zentrifugationsgeschwindigkeit von  $2000 \text{ rpm}$  auf  $3500 \text{ rpm}$  sinkt die hydrodynamische Verweilzeit von  $0,96 \text{ min}$  auf  $0,33 \text{ min}$ , also um  $65,6 \%$ . Die für diese Verweilzeiten realisierten Umsätze hingegen sinken nur um  $36,4 \%$  von  $50,3 \%$  auf  $32,0 \%$ . Gleiches gilt für die Reaktionsgeschwindigkeit, sie sinkt von  $0,157 \text{ mmol/mL} \cdot \text{min}$  auf  $0,100 \text{ mmol/mL} \cdot \text{min}$ . Wenn die Verweilzeit durch die deutliche Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit weiter verringert würde

und  $\tau \rightarrow 0$  gelte, wäre also trotzdem noch eine Umsetzung des Substrats messbar. Der Grund hierfür liegt in der Lokalisierung des überwiegenden Anteils der Enzyme auf der oberen Membranschicht. Bereits mit dem Zeitpunkt der Substrataufgabe, vor dem Beginn der Zentrifugation, kann eine Umsetzung der Substratmoleküle erfolgen, die unabhängig von der hydrodynamischen Verweilzeit ist. Für die Fehler der Messungen gilt, dass sie in einem noch akzeptablen Bereich liegen. Sie schwanken zwischen 6,8 % und 15,2 % und haben ihre Ursache vorrangig in den unterschiedlichen Beladungsdichten der einzelnen Module.

Am Beispiel der Spaltung von BTEE durch immobilisierte Alcalase konnte gezeigt werden, dass Spinmodule für die enzymatische Umsetzung von Substraten geeignet sind. Bis zu 50 % der aufgegebenen Substratlösung konnten umgesetzt werden. Diese Umsatzraten können abhängig vom gewählten Enzym und den jeweiligen Reaktionsbedingungen variieren, jedoch sind die erreichten Umsätze und Reaktionsgeschwindigkeiten zufriedenstellend und zeigen das Potential der Spinmodule als Festbettreaktor. Die Fehler, die eventuell durch die vorzeitige Umsetzung der Substrate durch Enzyme auf der oberen Membranschicht verursacht werden, sollten durch einen zügigen Versuchablauf vermeidbar sein, bzw. stark verringert werden können.

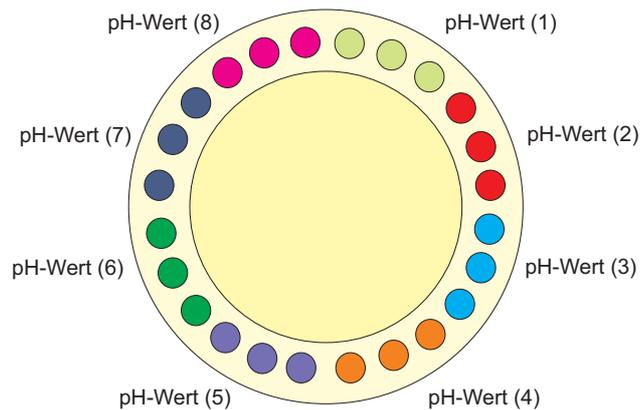
## 5.2 Einsatz von Spinmodulen beim Screening enzymatischer Reaktionen

Spinmodule eignen sich aufgrund ihrer Bauart und des Einsatzes in der Zentrifuge zum Screening der optimalen Reaktionsbedingungen enzymatischer Reaktionen im Mikrolitermaßstab. Häufig werden diese Parameter in Batchansätzen mit nativen Enzymen bestimmt. Die Vorteile, die sich im Vergleich durch die Verwendung von Spinmodulen ergeben, werden im folgenden diskutiert.

Durch die Immobilisierung an Membranen können gebundene Enzyme mehrfach in Reaktionen eingesetzt werden. Eine eventuell aufwändige Wiedergewinnung von (teuren) Enzymen aus Reaktionslösungen ist nicht mehr notwendig. Auch die Module können mehrfach mit verschiedenen Metallionen und Enzymen beladen werden. Hierdurch ergeben sich Einsparmöglichkeiten bei der Prozessentwicklung. Nach dem Durchlauf der Substratlösung durch die Membran besteht kein Kontakt zwischen Enzym und Substrat. Die Reaktion muss nicht gestoppt werden, was zu einer Inaktivierung des Enzyms führe.

Ein sehr bedeutender Vorteil ist weiterhin, dass eine Vielzahl verschiedener Versuchsansätze parallel getestet werden kann. In Tischzentrifugen ist die gleichzeitige Zentrifugation von bis zu 24 Mikroreaktionsgefäßen möglich. Die genaue Anzahl ist abhängig vom verwendeten Zentrifugenmodell. An dieser Stelle wird aber von einer Zentrifuge für 24 Proben ausgegangen und es ergibt sich hieraus auch die

maximal mögliche Anzahl an Spinmodulen, die parallel eingesetzt werden können. In der Praxis bedeutet dies, dass beispielsweise Parameter wie der pH-Wert der Enzymreaktion in einem Zentrifugendurchlauf bestimmt werden können. Bei einer dreifach-Bestimmung wäre das parallele Screening von bis zu 8 verschiedenen pH-Werten möglich. Abbildung 5.4 skizziert eine mögliche Probenanordnung während eines Versuchsdurchlaufs.



**Abb. 5.4:** Mögliche Probenanordnung zum Screening von pH-Werten mittels Spinmodulen in einer Tischzentrifuge. 8 pH-Werte werden in einem Versuchsdurchlauf parallel getestet

Die für einen Durchlauf benötigte Versuchsdauer setzt sich aus den folgenden Einzelschritten zusammen:

Equilibrierung mit Reaktionspuffer	1 min
Zentrifugieren der Substratlösung	max. 5 min
Waschschritte	2 x 1 min

Werden weiterhin 4 min für das Pipettieren der Lösungen und das Wechseln der Module hinzu gerechnet, ist ein kompletter Durchlauf in  $\sim 12$  min möglich. Innerhalb einer Stunde können also bis zu fünf Durchläufe durchgeführt werden, das entspricht bis zu 120 Proben. Auf einen Arbeitstag mit acht Stunden hochgerechnet ergibt sich eine mögliche Probenzahl von 960, wodurch das Potential der Spinmodule im Screening-Bereich enzymatischer Reaktionen deutlich wird.

## 5.3 Optimierung enzymatischer Umsetzungen in Spinmodulen am Beispiel der Hydrolyse von Saccharose durch immobilisierte Invertase

Bei der Hydrolyse von Saccharose zu Glukose und Fruktose durch das Enzym Invertase handelt es sich um eine enzymatische Reaktion, die in der Industrie seit langer Zeit angewandt wird. Die optimalen Reaktionsbedingungen für Invertase in Bezug auf die Reaktionstemperatur und den pH-Wert der Lösung sind daher bekannt. Im Folgenden sollen anhand dieser Beispielreaktion die Möglichkeiten gezeigt und diskutiert werden, mit Spinmodulen, an denen ein entsprechendes Enzym immobilisiert wurde, für verschiedene Reaktionsparameter ein Screening und somit eine Optimierung der Reaktionsbedingungen durchzuführen. Die Tatsache, dass es sich bei der Hydrolyse von Saccharose um eine gut untersuchte Reaktion handelt, ermöglicht, falls unerwartete Resultate auftreten, eine bessere Einordnung dieser Ergebnisse.

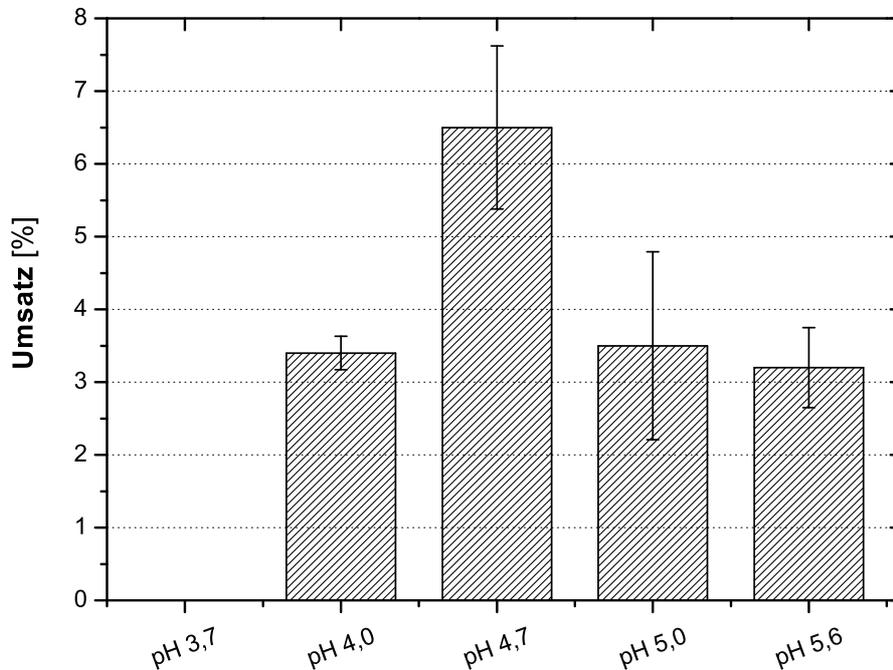
### 5.3.1 Bestimmung des pH-Optimums der Enzymreaktion

Das pH-Optimum von Invertase liegt nach Herstellerangaben bei einem pH-Wert von  $\sim 4,6$ , in diesem Bereich ist daher eine Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes mittels Zentrifugeneinheiten sinnvoll. Invertase wurde aufbauend auf den Ergebnissen aus Kapitel 3.6.2 an kupferbeladene IDA-Spineinheiten gebunden, als Bindungspuffer wurde  $0,1\text{ M}$  NaAc-Puffer benutzt. Die immobilisierte Enzymmenge lag im Mittel bei  $213 (\pm 90)\ \mu\text{g}$  pro Spinmodul. Als Reaktionspuffer für die Spaltung von Saccharose wurde ebenfalls NaAc-Puffer verwendet. Das lag darin begründet, dass NaAc-Puffer im gewünschten pH-Bereich eine gute Pufferkapazität hat. Ein weiterer Grund ist, wie in Kapitel 3.6.2 gezeigt wurde, dass die Bindungseigenschaften der Enzyme an die Membran stark vom verwendeten Puffersystem abhängen. Diese Abhängigkeit geht über den Immobilisierungsvorgang hinaus, sie erstreckt sich also auch auf später aufgegebene Puffersysteme (Bsp. Reaktionspuffer). Die folgenden pH-Werte wurde zur Optimierung der enzymatischen Reaktion getestet:

- pH 3,7
- pH 4,0
- pH 4,7
- pH 5,0
- pH 5,7

Jeweils  $400\ \mu\text{L}$  einer  $1,0\ \text{mg/mL}$  ( $2,92 \cdot 10^{-3}\ \text{mmol/mL}$ ) Saccharoselösung in NaAc-Puffer wurden bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben und zentrifugiert; im Anhang finden sich die exakten Zentrifugationsbedingungen (siehe B.5.3). Die Glukosekonzentration im Durchlauf wurde mittels eines kommerziellen Glukose-

Assays der Firma Sigma (Produktnummer G3293) photometrisch bei 340 nm bestimmt. Abbildung 5.5 stellt die prozentualen Umsätze in Abhängigkeit vom pH-Wert der Substratlösung dar.



**Abb. 5.5:** Hydrolyse von Saccharose durch Invertase. Abhängigkeit des Reaktionsumsatzes vom pH-Wert der Reaktionslösung. Zentrifugationsgeschwindigkeit 2000 rpm

Es wird deutlich, dass sich abhängig von pH-Wert der Substratlösung, teilweise deutliche Unterschiede für die Umsätze ergeben. Die Umsätze sind für alle Versuchsreihen sehr niedrig. Auffällig ist das Ergebnis bei pH 3,7. Bei diesem pH-Wert kam es zur Elution der gebundenen Invertase.

Aus den erhaltenen Daten ist die Berechnung weiterer Parameter möglich. Mit der Annahme, dass sich Spinmodule näherungsweise wie Strömungsrohre verhalten, gilt eine vereinfachte Stoffbilanzgleichung [123]:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -\frac{\partial c_i u}{\partial z} + \sum_j v_{j,i} r_j \quad (5.1)$$

mit:

- $c_i$  : Konzentration des Stoffes i
- $t$  : Zeit
- $u$  : Geschwindigkeit
- $v_{j,i}$  : Stöchiometrische Koeffizienten
- $r_j$  : Reaktionsgeschwindigkeit

Die für die betrachtete enzymatische Reaktion eingesetzte Substratkonzentration  $[S]$  ist sehr viel niedriger als der Wert für  $K_M$  (siehe Kapitel 6.3.2). Näherungsweise kann die Reaktion als eine Reaktion erster Ordnung behandelt werden.

$$\sum_j v_{j,i} r_j = -k \cdot c = -\frac{v_{max}}{K_M} \cdot [S] \quad (5.2)$$

mit:

$[S]$  : Substratkonzentration  
 $K_M$  : Michaelis-Konstante

Nach Integration und Umformung ergibt sich aus Gleichung 5.1 für den Umsatz der Reaktion:

$$U = 1 - e^{-k\tau} = 1 - e^{-\frac{v_{max}}{K_M} \cdot \tau} \quad (5.3)$$

mit:

$U$  : Umsatz  
 $\tau$  : hydrodynamische Verweilzeit

Mit Hilfe der oben genannten Formel ist die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten  $k = \frac{v_{max}}{K_M}$  möglich. Tabelle 5.2 stellt diese Werte zusammen, weiterhin sind auch die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten angegeben.

**Tabelle 5.2:** Hydrolyse von Saccharose durch Invertase in Spinmodulen - Abhängigkeit von Umsatz und Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert der Substratlösung

pH-Wert	Produkt- konzentration $[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}]$	Umsatz [%]	Reaktions- geschwindigkeit $[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} \cdot \text{min}}]$	$k = \frac{v_{max}}{K_M}$ $[\frac{1}{\text{min}}]$
4,0	$0,099 \pm 0,007$	$3,4 \pm 0,23$	$0,062 \pm 0,004$	0,038
4,7	$0,178 \pm 0,033$	$6,1 \pm 1,12$	$0,111 \pm 0,021$	0,066
5,0	$0,104 \pm 0,038$	$3,5 \pm 1,29$	$0,065 \pm 0,023$	0,037
5,6	$0,093 \pm 0,017$	$3,2 \pm 0,55$	$0,058 \pm 0,010$	0,034

Aus den Messdaten lässt sich neben den Umsätzen auch die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmen. Für einen pH-Wert von 4,7 ergeben sich mit 6,1 % bzw. 0,111  $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$  die höchsten Werte für Umsatz und Reaktionsgeschwindigkeit. Sie sind im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen pH-Werte zwischen  $\sim 75$  % und  $\sim 90$  % höher. Für die pH-Werte 4,7, 5,0 und 5,7 ergeben sich mit 18,4 %, 36,9 % und 17,2 % große Fehler. Die Ursache hierfür liegt in der teilweise sehr

unterschiedlichen Enzymbeladung der einzelnen verwendeten Spineinheiten. Trotz dieser großen Fehlerbreiten konnte das pH-Optimum für die enzymatische Hydrolyse von Saccharoselösung ermittelt werden. Es liegt bei einem pH-Wert von 4,7. Am diesem Beispiel konnte also gezeigt werden, dass die Bestimmung des pH-Optimums enzymatischer Reaktionen in einer kurzen Versuchszeit möglich ist.

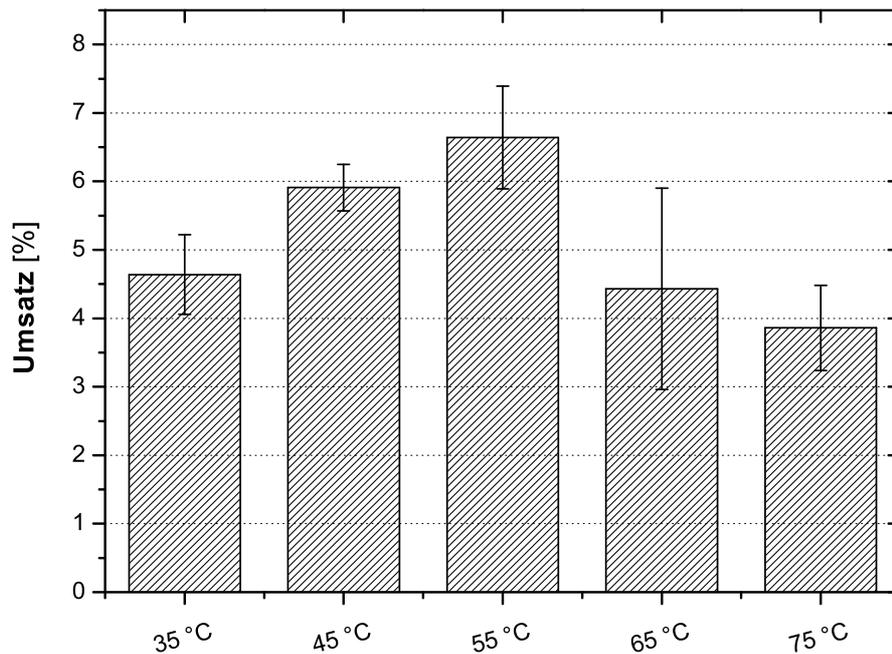
### 5.3.2 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur für die enzymatische Hydrolyse von Saccharose in Spinmodulen

Neben dem pH-Wert ist auch die Reaktionstemperatur für enzymatische Reaktionen von Bedeutung. Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass mittels Zentrifugeneinheiten der optimale pH-Wert einer enzymatischen Reaktion bestimmt werden kann. Im Anschluss soll ein entsprechender Versuch zur Abhängigkeit des Umsatzes von der Reaktionstemperatur diskutiert werden. Nachfolgend sind die getesteten Temperaturen angegeben.

- 35°C
- 45°C
- 55°C
- 65°C
- 75°C

Wie in den Versuchsreihen zur Optimierung des pH-Wertes, betrug die jeweils eingesetzte Substratkonzentration 1 mg/mL Saccharose in NaAc-Puffer ( $2,92 \cdot 10^{-3}$  mmol/mL). Pro Messung wurden 400 µL aufgegeben, siehe auch Anhang B.5.3. Die Glukosekonzentration im Durchlauf wurde analog zu Kapitel 5.3 bestimmt. Alle Lösungen wurden auf die benötigte Temperatur vortemperiert. Gleiches galt für die Spinmodule. Ein rasches Abkühlen der aufgegebenen Lösung während des Zentrifugationsvorganges konnte auf diesem Weg vermieden werden. Auch für diese Messreihen wurde die kleinstmögliche Zentrifugationsgeschwindigkeit von 2.000 rpm gewählt. Weiterhin wurden die Reaktionsgeschwindigkeit und entsprechend Formel 5.3 aus Kapitel 5.3.1 die Konstante  $k = \frac{v_{max}}{K_M}$  abhängig von der jeweiligen Reaktionstemperatur bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.6 und Tabelle 5.3 zusammengestellt (siehe S. 86).

Für die Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse von Saccharose durch Invertase zeigt sich beim Reaktionsumsatz ein eindeutiges Maximum. Als optimale Reaktionstemperatur wurden 55 °C ermittelt. Bei dieser Reaktionstemperatur sind Umsatz und Reaktionsgeschwindigkeit am höchsten, der Umsatz beträgt 6,6 %. Das Ergebnis stimmt mit den Angaben des Herstellers überein. Der Umsatz ist im Vergleich zum Umsatz bei 75 °C, der im betrachteten Temperaturspektrum mit 3,8 % am niedrigsten ist, um ~ 73 % höher. Die Fehler der Messungen schwanken zwischen 5,8 % bei 45 °C und 33,2 % bei 65 °C. Sie sind also auch bei diesen Messreihen hoch. Die Ursache sind, wie zuvor bei der pH-Wert-Optimierung, die unterschiedlichen Bela-



**Abb. 5.6:** Hydrolyse von Saccharose durch Invertase. Abhängigkeit des Umsatzes von der Temperatur der Reaktionslösung

dungsdichten der Spinmodule mit Invertase.

Es bleibt allerdings zu berücksichtigen, dass bei dem hier gewählten Versuchsablauf die Temperatur der Reaktionslösung während des Zentrifugationsvorganges wahrscheinlich geringfügig sinkt, da eine nicht temperierbare Tischzentrifuge verwendet wurde. Die Verwendung einer temperierbaren Zentrifuge würde u. U. zu genaueren Ergebnissen führen. Die ermittelte optimale Reaktionstemperatur stimmt aber mit den vom Hersteller angegebenen Werten über ein. Die Genauigkeit der Messrei-

**Tabelle 5.3:** Temperaturabhängigkeit des Umsatzes und der Reaktionsgeschwindigkeit bei der Hydrolyse von Saccharose durch Invertase in Spinmodulen

Temperatur [°C]	Produkt- konzentration [ $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$ ]	Umsatz [%]	Reaktions- geschwindigkeit [ $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}}$ ]	$k = \frac{v_{\text{max}}}{K_M}$ [ $\frac{1}{\text{min}}$ ]
35	0,135 ± 0,017	4,6 ± 0,58	0,085 ± 0,011	0,050
45	0,172 ± 0,010	5,9 ± 0,34	0,108 ± 0,006	0,063
55	0,194 ± 0,022	6,6 ± 0,75	0,121 ± 0,014	0,072
65	0,129 ± 0,043	4,4 ± 1,47	0,081 ± 0,027	0,047
75	0,112 ± 0,018	3,8 ± 0,62	0,071 ± 0,011	0,041

hen ist also ausreichend. Neben der pH-Optimierung ist auch die Bestimmung der für die jeweilige Enzymreaktion optimalen Reaktionstemperatur in Spinmodulen möglich.

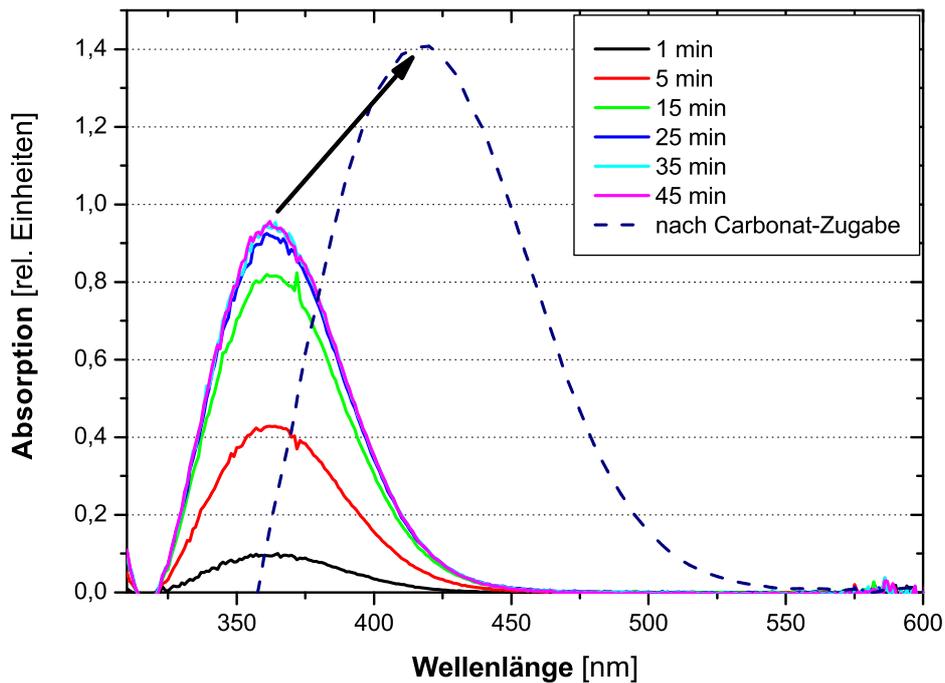
## 5.4 Spinmodulen mit immobilisierter $\beta$ -Galactosidase als Membran-Festbettreaktor

### 5.4.1 Anpassung der Reaktionsbedingungen für die Hydrolyse von ONPG an Spinmodule mit gebundener $\beta$ -Galactosidase

$\beta$ -Galactosidase ist in der Lage, o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG) zu hydrolysieren. Bei dieser Reaktion wird aus dem Molekül o-Nitrophenol abgespalten. Die Reaktionsbedingungen, unter denen diese Reaktion abläuft, sind bekannt [124]. Üblicherweise wird die Reaktion in Phosphatpuffer bei einem neutralen pH-Wert und bei  $28^{\circ}\text{C}$  durchgeführt, sie kann durch Zugabe von  $1\text{ M Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung gestoppt werden. Die Reaktion wird durch photometrische Messung des gebildeten o-Nitrophenol bei  $420\text{ nm}$  verfolgt.

In der Übertragung der Reaktion auf Zentrifugeneinheiten mit immobilisierter  $\beta$ -Galactosidase ergibt sich das Problem, dass die Verwendung von Phosphatpuffer zur Elution des Enzyms führt (vgl. Kapitel 3.6.2). Es zeigt sich jedoch, dass die Reaktion auch in NaAc-Puffer bei einem pH-Wert von 4,7 durchgeführt werden kann, ohne dass es zu einem signifikanten Rückgang der Aktivität kommt. Ein wichtiger Unterschied zur Reaktion bei pH 7 liegt vor allem in dem im UV-Vis-Bereich entstehenden Absorptionsmaximum. Bei einem neutralen pH-Wert liegt dieses bei  $420\text{ nm}$ , während es bei pH 4,7 bei  $360\text{ nm}$  zu einem Absorptionsanstieg kommt. Es handelt sich in beiden Fällen um das Absorptionsmaximum des entstehenden o-Nitrophenols. Bei pH 4,7 bewirkt die Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung zur Reaktionslösung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums auf  $420\text{ nm}$  (vgl. Abbildung 5.7 auf S. 88).

Aus der Abbildung 5.7 wird deutlich, dass die Absorption mit fortschreitender Reaktionsdauer bei  $360\text{ nm}$  ansteigt. Nach  $45\text{ min}$  Dauer befindet sich die Reaktion im Sättigungsbereich. Anschließend wurde  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung im Verhältnis 1 : 2 zur Reaktionslösung gegeben. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich daraufhin in einen höheren Wellenlängenbereich. Die Ursache ist die Veränderung des pH-Wertes und die daraus resultierende Ausweitung des mesomeren Elektronensystems des o-Nitrophenols [125] [126]. Weiterhin ist zu erkennen, dass mit der Verschiebung des Absorptionsmaximums eine Erhöhung der Absorption um 47 % einhergeht. Bei einem Vergleich der Absorptionsspektren der enzymatischen Umsetzung vor und nach der  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Zugabe mit den Spektren von entsprechend



**Abb. 5.7:** Absorptionsanstieg bei der Reaktion von ONPG-Substratlösung mit  $\beta$ -Galactosidase bei pH 4,7. Verschiebung des Absorptionsmaximums bei Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung

konzentrierten und behandelten o-Nitrophenol-Standardlösung fällt auf, dass die Absorptionsmaxima und die Intensitäten vor der  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Zugabe in beiden Fällen übereinstimmen, sich für die Spektren nach der  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Zugabe hingegen Unterschiede ergeben. Für die Absorption der o-Nitrophenol-Standardlösung wurde vor und nach der Zugabe von Carbonatlösung ein konstanter Wert gemessen. Bei der enzymatischen Reaktion hingegen kommt es durch die Carbonatzugabe zu einem Anstieg der Absorption. In beiden Lösungen ändern sich also nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Extinktionskoeffizienten. Die Ursache hierfür liegt in der Veränderung der Matrix, beispielsweise kann die Änderung der Ionenstärke Einfluss ausüben. Das Absorptionsspektrum der Enzymreaktion könnte darüber hinaus durch die ebenfalls vorhandenen D-Galactopyranosid-Moleküle beeinflusst werden. deren Absorptionsmaximum liegt bei niedrigen pH-Werten im UV-Bereich.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen erfolgt die Beobachtung der Reaktion bei  $360 \text{ nm}$ , ohne dass  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung zugegeben wird. Ein Stoppen der Reaktion ist nicht notwendig, da die  $\beta$ -Galactosidase an die Membran gebunden ist und folglich nicht im Durchlauf vorliegt. Bei Spinmodulen bestünde die Möglichkeit,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung in den Mikroreaktionsgefäßen vorzulegen und die Messung bei  $420 \text{ nm}$  durchzuführen. Bei kontinuierlich durchflossenen Modulen muss die Beobachtung der Reaktion bei  $360 \text{ nm}$  erfolgen, da eine Vermischung mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung nicht möglich

ist. Die Produktbildung wird daher in beiden Fällen durch Absorptionsmessung bei 360 nm verfolgt.

#### 5.4.2 Einfluss der eingesetzten ONPG-Konzentration auf die Produktkonzentration

In Kapitel 3.6.3 wurde der Einfluss der zur Immobilisierung aufgegebenen Proteinkonzentration auf die gebundene Proteinmenge untersucht. Am Beispiel von immobilisierter  $\beta$ -Galactosidase soll hier kurz ein möglicher Einfluss der aufgegebenen Substratkonzentration auf die enzymatische Umsetzung diskutiert werden. Dazu wurde zunächst  $\beta$ -Galactosidase an Spinmodule immobilisiert. Die eingesetzte Enzymkonzentration betrug 0,5 mg/mL in NaAc-Puffer (0,1 M, pH 4,7). Im Mittel wurden  $0,122 \pm 0,018$  mg  $\beta$ -Galactosidase pro Spineinheit gebunden.

Jeweils 400  $\mu$ L ONPG-Substratlösung in NaAc-Puffer (0,1 M, pH 4,7) wurden im Anschluss auf die Module gegeben. Drei verschiedene Konzentrationen wurden eingesetzt. Zur genauen Durchführung siehe im Anhang B.5.3. Die Absorption im Durchlauf wurde bei 360 nm gemessen. Tabelle 5.4 gibt die Ergebnisse wieder.

**Tabelle 5.4:** Einfluss der eingesetzten Substratkonzentration auf die Produktkonzentration bei Spinmodulen als Membran-Festbettreaktoren.

Substrat- konzentration [ $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$ ]	Absorption <sub>360nm</sub> im Durchlauf [rel. Einheiten]	Konzentration (o-Nitrophenol) [ $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$ ]	Reaktions- geschwindigkeit [ $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}}$ ]	Umsatz [%]
0,531	$0,534 \pm 0,174$	$0,284 \pm 0,093$	$0,178 \pm 0,058$	53,4
0,383	$0,433 \pm 0,109$	$0,232 \pm 0,058$	$0,145 \pm 0,036$	60,5
0,266	$0,268 \pm 0,069$	$0,143 \pm 0,037$	$0,089 \pm 0,023$	53,9

Die Daten aus Tabelle 5.4 spiegeln die erwarteten Ergebnisse wider. Sinkende Substratkonzentrationen gehen mit einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit einher. Die Reaktionsgeschwindigkeiten sinken von  $0,178 \mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$  bei einer Substratkonzentration von  $0,531 \mu\text{mol}/\text{mL}$  auf  $0,089 \mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$  ( $0,266 \mu\text{mol}/\text{mL}$ ). Der Umsatz der Hydrolyse von ONPG-Substrat durch  $\beta$ -Galactosidase ist im betrachteten Konzentrationsbereich annähernd konstant. Zwischen 53 % und 60 % der aufgegebenen Substratmoleküle werden gespalten. Die Fehler der Messungen sind groß, sie schwanken zwischen 25 % und 32 %. Diese hohen Fehlerbreiten haben zwei Ursachen, zum Einen die unterschiedliche Beladung der einzelnen Module, zum Anderen können durch die Lokalisierung der Enzyme auf der oberen Membranschicht leicht unterschiedliche Reaktionszeiten auftreten, die Einfluss auf die Produktkonzentration ausüben.

Die Substratkonzentrationen sind deutlich niedriger als der  $K_M$ -Wert für die Reaktion (vgl. Kapitel 6.3.1), daher gilt näherungsweise, dass es sich hier um eine Reaktion erster Ordnung handelt. Mit der schon zuvor getroffenen Annahme, das Spinmodule annähernd als Strömungsrohre behandelt werden können, gilt Gleichung 5.3. Der Umsatz ist nur von der hydrodynamischen Verweilzeit und der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion abhängig. Da sich beide Parameter nicht ändern, muss auch der Umsatz einen konstanten Wert aufweisen. Im Rahmen der Messgenauigkeit können die erreichten Umsätze als konstant betrachtet werden.

## 5.5 Zusammenfassung

Dieses Kapitel diskutiert die Möglichkeiten, Spinmodule mit zuvor immobilisierten Enzymen als Festbettreaktoren einzusetzen. Dabei haben diese Module die Funktion von Screening-Einheiten, mit deren Hilfe die Reaktionsbedingungen enzymatischer Umsetzungen optimiert werden können. Um die Zentrifugenreaktoren effektiv einzusetzen und die erhaltenen Ergebnisse später auf kontinuierlich arbeitende Module übertragen zu können, wurde die Abhängigkeit der Fließgeschwindigkeit der Substratlösung von der Zentrifugationsgeschwindigkeit bestimmt. Ferner wurde der Einfluss der sich ergebenden Fließgeschwindigkeiten auf die Umsetzung der aufgegebenen Substrate ermittelt. Beispiel war das Enzym *Alcalase*, das die Spaltung des Substrates *BTEE* bewirkt. Erwartungsgemäß sinkt der Umsatz bei steigender Geschwindigkeit und dadurch sinkender hydrodynamischer Verweilzeit.

Die Eignung der Spinmodule zum Screening von Reaktionsbedingungen enzymatischer Reaktionen wurde am Modellenzym *Invertase* untersucht. Es war möglich, die optimale Reaktionstemperatur für die Hydrolyse von Saccharose durch Invertase zu bestimmen. Die ermittelte optimale Temperatur stimmte mit der vom Hersteller angegebenen Temperatur von 55 °C überein, die Messfehler waren aber relativ groß. Dabei ist zu beachten, dass eine bedeutende Fehlerquelle mit der Zeitspanne zwischen der Lösungsaufgabe auf die Membran und dem Beginn des Zentrifugationsvorganges zusammenhängt. Durch die meist auf der Oberfläche gebundenen Enzyme kann schon vor Beginn des Zentrifugierens eine Reaktion eintreten. Neben der Optimierung der Reaktionstemperatur ist auch ein Screening des optimalen pH-Wertes möglich. Es konnte gezeigt werden, dass abhängig vom pH-Wert der Substratlösung Unterschiede bei den Reaktionsumsätzen gemessen werden können. Die Fehler liegen allerdings deutlich über denen der Temperaturoptimierung.

Neben Membranen mit gebundener Invertase, konnten auch Membranen mit  $\beta$ -*Galactosidase* erfolgreich in Spinmodulen eingesetzt werden. Die Reaktionsbedingungen, insbesondere der Reaktionspuffer wurde entsprechend angepasst, um die

Reaktion mit an IDA-Membranen immobilisierter  $\beta$ -Galactosidase durchführen zu können. Der Einfluss der aufgegebenen Substratkonzentration wurde am Beispiel von  $\beta$ -Galactosidase betrachtet. Es ergaben sich die erwarteten Ergebnisse. Mit steigender Substratkonzentration kommt es zu einem Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit und der Produktkonzentration, während der Umsatz der Reaktion annähernd konstant bleibt.

Sowohl Invertase als auch  $\beta$ -Galactosidase werden als Modellenzyme für das Scale up von Enzymreaktionen auf kontinuierliche Reaktoren mit  $75 \text{ cm}^2$ -Membranfläche verwendet. Durch die kontinuierlich arbeitenden Reaktoren können u. a. genauere Aussagen über kinetische Parameter getroffen werden.

## Kapitel 6

# Scale up der Enzymreaktoren auf $75 \text{ cm}^2$ Membranfläche

In den Kapiteln 5.2 und 5.3 wurden die Anwendungsmöglichkeiten von Spinmodulen mit immobilisierten Enzymen im Bereich des Screenings von Reaktionsbedingungen diskutiert. Ein Screening mit Spinmodulen, wie es in oben genannten Kapiteln beschrieben wird, ist aber in der Prozessentwicklung nur sinnvoll, wenn eine Übertragung der ermittelten Parameter auf größere, kontinuierlich durchflossene Module bzw. Reaktoren möglich ist. Sartobind-75-Module erfüllen die Voraussetzungen, um das Scale up ausgehend von den Ergebnissen mit Zentrifugeneinheiten zu testen. Tabelle 6.1 stellt die Eigenschaften der Sartobind-Module denen der Spinmodule gegenüber.

**Tabelle 6.1:** Vergleich von Sartobind-Modulen mit Spinmodulen

	Spinmodul (Zentrifugenreaktor)	Sartobind-75-Modul (Durchflussreaktor)
Membranfunktionalisierung	Iminodiacetat	
Membranfläche, gesamt	$7,48 \text{ cm}^2$	$75 \text{ cm}^2$
Anzahl der Membranschichten	20	15
Anströmfläche	$0,374 \text{ cm}^2$	$5,0 \text{ cm}^2$
Membrandurchmesser	$0,69 \text{ cm}$	$2,52 \text{ cm}$
Betthöhe	$5,3 \text{ mm}$	$4 \text{ mm}$

Die Membranfläche wird vom Zentrifugenreaktor zum Durchflussreaktor um den Faktor 10 von  $7,48$  auf  $75 \text{ cm}^2$  gesteigert. Andere Parameter steigen allerdings nicht analog um den gleichen Faktor. Im Verhältnis werden die einzelnen Membranen um den Faktor 13 größer und dafür nimmt die Anzahl der Membranschichten von 20 Schichten beim Zentrifugenreaktor auf 15 Schichten beim Durchflussreaktor ab. Beim Scale up müssen verschiedene Punkte beachtet werden. Der Immobilisierungs-

prozess von Enzymen an Sartobind-Module unterscheidet sich in Durchführung und Immobilisierungsdauer deutlich von Spinmodulen. Es ist daher davon auszugehen, dass es sowohl bei den gebundenen Enzymmengen als auch bei der Lokalisierung der Enzyme im Modul zu Unterschieden kommt. Die Ergebnisse für die Immobilisierung von Enzymen an Sartobind-Module werden in Kapitel 6.2 diskutiert.

Ein weiterer Unterschied zu Spinmodulen besteht in der Art der Zuführung der Substratlösungen zum Modul. Bei Spinmodulen wird die Lösung mittels Pipetten direkt auf die Membran mit dem gebundenen Enzym gegeben. Bei Durchflussreaktoren wird sie hingegen durch Schläuche zugeführt. Die Lösung muss gleichmäßig aus den dünnen Schläuchen auf die gesamte zur Verfügung stehende Membranfläche verteilt und am Auslass wieder gesammelt werden. Dazu sind in das Modul auf beide Seiten der Membranschicht entsprechende Verteilungs- bzw. Sammeleinheiten aus Kunststoff eingefügt. Im Gegensatz zu Spinmodulen kommt es nicht dazu, dass die Substratlösung vor Beginn des Fließvorganges Kontakt zur Membran hat und Substratmoleküle bereits durch die an der Oberfläche gebundene Enzyme umgesetzt werden können.

Für den Einsatz der Reaktoren ist ihre Charakterisierung von Bedeutung, insbesondere die Verweilzeit der Substratmoleküle im Reaktor ist von Interesse. Im Gegensatz zu Spinmodulen, bei denen die Bestimmung der Verweilzeitverteilung aus bereits genannten Gründen nicht möglich ist, kann bei Sartobind-Modulen, das Verweilzeitverhalten ermittelt werden. Dieses wird im nachfolgenden Kapitel diskutiert. Im Anschluss wird kurz die Vorgehensweise bei der Immobilisierung von Enzymen an Durchflussreaktoren und die Ergebnisse der Immobilisierungen diskutiert. Danach werden die Möglichkeiten des Scale up enzymatischer Reaktionen von Spin- zu Sartobind-Modulen anhand der Modellenzyme *Invertase* und  $\beta$ -*Galactosidase* erläutert und bewertet.

## 6.1 Verweilzeitverteilung

Für die Charakterisierung von kontinuierlich betriebenen Reaktoren ist die Verweilzeit von Stoffen im Reaktor von großer Bedeutung. Mit ihrer Hilfe können Kenntnisse über das reale hydrodynamische Verhalten von Reaktoren erlangt und somit bestimmt werden, welchem Typ (z.B. einem laminaren Strömungsrohr oder einer Reaktorkaskade) der jeweils betrachtete Reaktor ähnelt [127] [123]. Die Bestimmung der Verweilzeitverteilung wird mit nicht-reagierenden Tracer-Stoffen durchgeführt. Dabei können zwei verschiedene Markierungsverfahren angewendet werden. Ein Verfahren ist die so genannte *Stoßmarkierung* oder auch  $\delta$ -*Funktion*. Bei dieser Markierungsvariante wird zur Zeit  $t = 0$  ein gegenüber dem Reaktorvolumen kleines Volumen der Markierungssubstanz in den Reaktorzulauf gegeben und am Reaktor-

ausgang wird der zeitliche Verlauf der Tracerkonzentration gemessen. Mit Hilfe der Stoßmarkierung erhält man das Verweilzeitspektrum:

$$E(t) = \frac{dc}{c_0 dt} \quad (6.1)$$

mit:

- $E(t)$  : Verweilzeitspektrum
- $t$  : Zeit
- $c$  : Spurstoffkonzentration
- $c_0$  : Eingangskonzentration des Spurstoffs im Reaktor

Üblicherweise wird die Stoßmarkierung immer dann zur Bestimmung der Verweilzeit eingesetzt, wenn der Produktionsfluss des Reaktors nicht unterbrochen werden soll.

Die zweite Möglichkeit zur Markierung ist die *Verdrängungsmarkierung*, die auch häufig als *Sprungfunktion* bezeichnet wird. Am Zeitpunkt  $t = 0$  erfolgt die Umstellung des Reaktoreingangstroms auf die Markierungssubstanz. Das zuvor im Reaktor vorhandene Fluid wird mit der Zeit durch den Tracer verdrängt. Am Reaktorausgang wird wie bei der Stoßmarkierung ein Konzentrations-Zeit-Verlauf für den Tracerstoff aufgenommen, es ergibt sich die sogenannte Verweilzeitsummenkurve:

$$F(t) = \frac{c(t)}{c_0} = \int_0^t E(t) dt \quad (6.2)$$

mit:

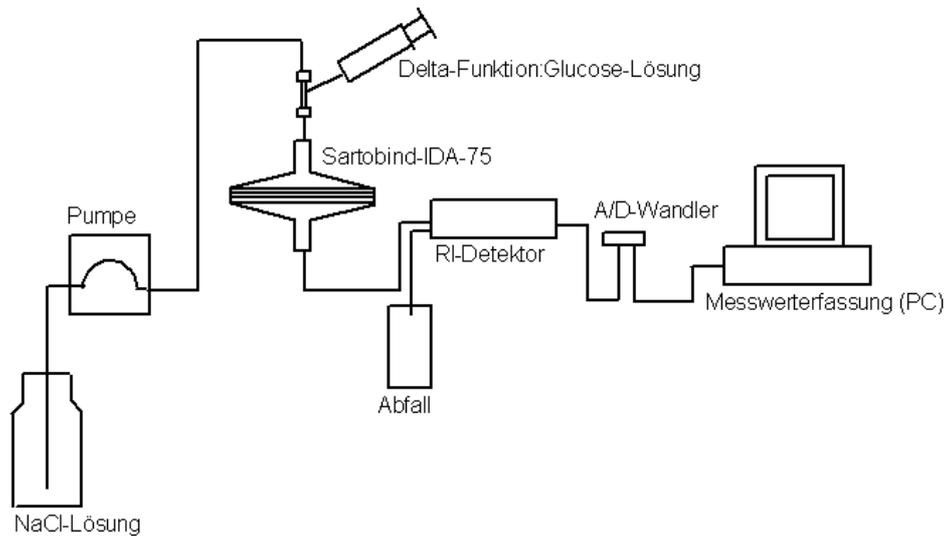
- $F(t)$  : Verweilzeitsummenkurve
- $t$  : Zeit
- $c(t)$  : zeitabhängige Spurstoffkonzentration
- $c_0$  : Eingangskonzentration des Spurstoffs

Zur Bestimmung des Verweilzeitverhaltens durch die Sprungfunktion muss allerdings der Produktionsfluss unterbrochen werden.

### 6.1.1 Experimenteller Aufbau zur Bestimmung des Verweilzeitverhaltens in Sartobind-Modulen

Zur Bestimmung des Verweilzeitverhaltens von Sartobind-Modulen wird als Tracersignal die  $\delta$ -Funktion gewählt. Bei dieser Markierungsmethode kann der Tracer mit Hilfe einer Spritze direkt in den Einlaufschlauch des Moduls gespritzt werden. Bei der Sprungfunktion hingegen müsste über einen Drei-Wegehahn der Zulauf des Tracers geregelt werden. Die Lösung durchliefe in diesem Fall erst die Pumpe. Aufgrund der geringen Flussraten (0,03 mL/min – 0,33 mL/min) die getestet werden,

käme es zu großen Zeitverzögerungen, bevor am Rektorausgang ein Signal gemessen werden kann. Abbildung 6.1 zeigt schematisch den gewählten Versuchsaufbau zur Bestimmung der Verweilzeit.



**Abb. 6.1:** Experimenteller Aufbau zur Bestimmung des Verweilzeitverhaltens von Sartobind-75-Durchflussreaktoren

Über eine Schlauchpumpe wird NaCl-Lösung durch das Modul gepumpt. Als Tracer wird eine Glukoselösung verwendet. Dieses Vorgehen wird gewählt, da die Detektion über einen RI-Detektor erfolgen kann. Bei diesem beträgt das Volumen der Messzelle nur  $8 \mu\text{L}$ . Die Messwerterfassung erfolgt über eine A/D-Wandlerkarte mit angeschlossenem PC.

### 6.1.2 Verweilzeitverhalten von Sartobind-Modulen

Zur Messung wurde ein Sartobind-Modul verwendet, das bereits mit dem Enzym Alcalase beladen war. Die gebundene Masse betrug  $m = 2,56 \text{ mg}$ . Auf diese Weise konnte ein möglicher Einfluss gebundener Enzyme in Bezug auf die Porengröße mit erfasst werden. Während der Verweilzeitmessung wurde das Modul mit  $0,1 \text{ M}$  NaCl-Lösung gespült, als Tracer wurde Glukoselösung verwendet, die nicht mit dem Enzym reagiert. Die Konzentration der Lösung betrug  $30 \text{ mg/mL}$  in NaCl-Lösung, jeweils  $50 \mu\text{L}$  wurden eingespritzt.

Der verwendete RI-Detektor bewirkt eine Verminderung der Fließgeschwindigkeit. Ursache ist die kleine Messzelle des Detektors, die einen Druckaufbau bewirkt. Die Verringerung steht allerdings in einem linearen Zusammenhang zu der an der Pumpe eingestellten Fließgeschwindigkeit. Tabelle 6.2 stellt die eingestellten den tatsächlich erreichten Fließgeschwindigkeiten gegenüber.

**Tabelle 6.2:** Verminderung der an der Schlauchpumpe eingestellten Fließgeschwindigkeiten durch den verwendeten RI-Detektor

Fließgeschwindigkeit ohne RI-Detektor [mL/min]	Fließgeschwindigkeit mit RI-Detektor [mL/min]
0,06	0,03
0,14	0,08
0,28	0,17
0,43	0,24

Trägt man die verminderten Fließgeschwindigkeiten gegen die eingestellten Fließgeschwindigkeiten auf, ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Dieser Zusammenhang lässt sich durch eine Gerade, die durch den Ursprung geht und die Steigung von 0,572 aufweist, beschreiben. Weiterhin ist für die Berechnung des Verweilzeitverhaltens die Kenntnis des Reaktorvolumens Voraussetzung. Der Hersteller macht hierzu keine Angaben, daher wurde das Reaktorvolumen der Sartobind-Module experimentell mit 1,08 mL bestimmt.

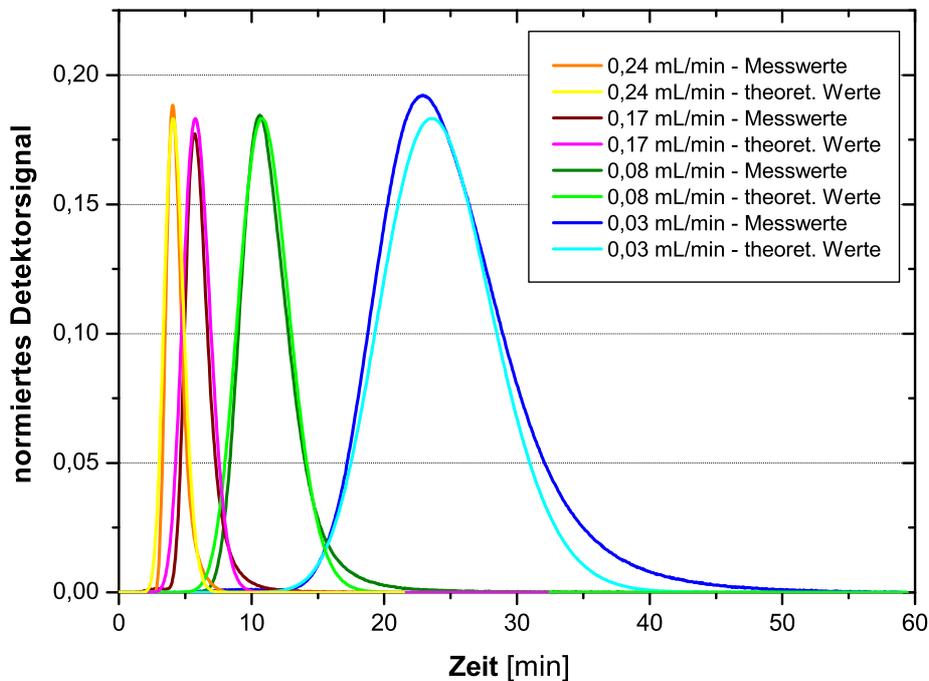
Für die Nutzung eines realen Reaktors, wie dem in diesem Fall vorliegenden Membranmodul, ist es von Bedeutung, ob dieser einem einzelnen Rührkesselreaktor, einer Reaktorkaskade oder einem Strömungsrohr ähnelt. Zur mathematischen Beschreibung der Hydrodynamik des verwendeten Reaktormoduls wurde folgendermaßen vorgegangen: im ersten Schritt wurden die durch den RI-Detektor erhaltenen Messwerte normiert. Im Anschluss erfolgte eine Anpassung der theoretischen Kurven für den Konzentrationsverlauf in Abhängigkeit von der Zeit an die gemessenen Kurven. Zur Beschreibung des Konzentrationsverlaufs einer Reaktorkaskade, als Antwortsignal eines  $\delta$ -förmigen Eingangssignal, wurde die unten angegebene Formel 6.3 verwendet.

$$c(t) = \frac{c_0}{(n-1)!} \cdot \left( \frac{t \cdot n \cdot \dot{V}}{V} \right)^{n-1} \cdot e^{-\frac{t \cdot n \cdot \dot{V}}{V}} \quad (6.3)$$

mit:

- $c(t)$  : zeitabhängige Spurstoffkonzentration
- $c_0$  : Eingangskonzentration des Spurstoffs
- $n$  : Anzahl der Reaktorkessel
- $t$  : Zeit
- $\dot{V}$  : Volumenstrom
- $V$  : Reaktorvolumen

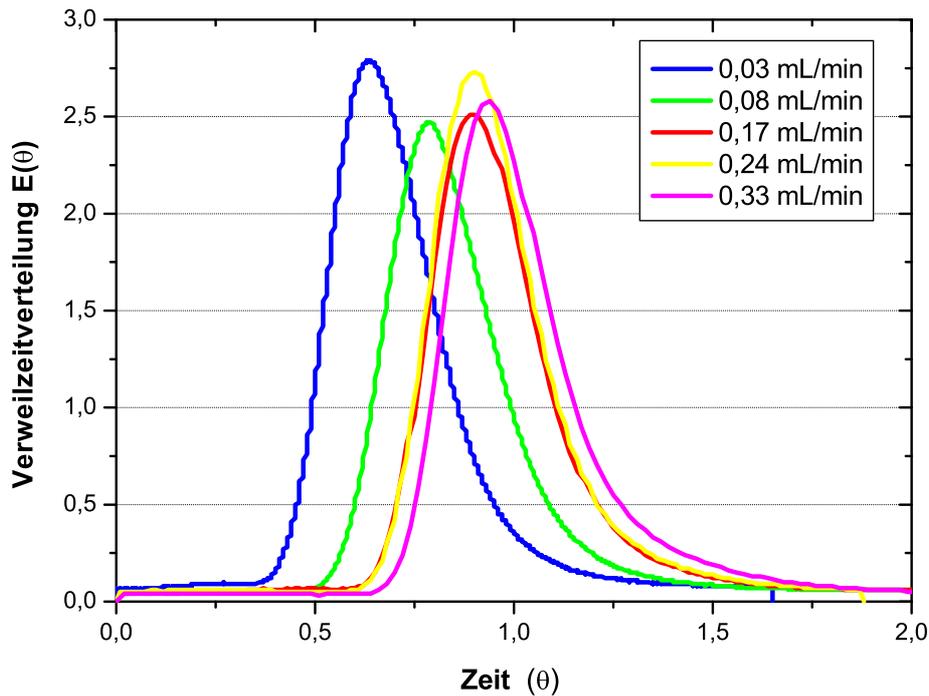
Zur Anpassung der theoretischen Kurven an die Messsignale wurde im ersten Schritt, bei allen Kurven gleichzeitig, ein genetischer Algorithmus verwendet und im Anschluss das Newton-Verfahren genutzt. Abbildung 6.2 stellt die normierten Messwerte und die angepassten theoretischen Werte dar.



**Abb. 6.2:** Verweilzeitmessung für Sartobind-Module: normierte Messwerte und optimierte theoretische Werte

Aus der Abbildung wird deutlich, dass die erhaltenen Messwerte sehr gut durch die Formel 6.3 beschrieben werden. Lediglich für die niedrigste Fließgeschwindigkeit von  $0,03 \text{ mL/min}$  sind Abweichungen zwischen der gemessenen und der theoretischen Kurve zu erkennen. Als Ursache ist der geringe Volumenstrom zu benennen. Der Fehler bei der Bestimmung des Volumenstroms ist im Vergleich zu den höheren Volumenströmen groß und wirkt sich auf die Anpassung der theoretischen Werte aus. Aus den theoretisch berechneten Werten ergibt sich, dass die Messwerte durch eine Reaktorkaskade mit 33 Kesseln beschrieben werden können.

Zusätzlich kann aus den Messwerten das Verweilzeitspektrum für Sartobind-Module bestimmt werden. Hieraus können sich weitere wichtige Informationen beispielsweise über Kurzschlussströmungen oder Totzonen ergeben. Die Verweilzeitverteilungen für das Sartobind-Modul in Abhängigkeit von der dimensionslosen Zeit  $\Theta = t/\tau$  bei verschiedenen Flussraten sind in Abbildung 6.3 dargestellt.



**Abb. 6.3:** Verweilzeitspektren für Sartobind-75-Module

Mit steigender Fließgeschwindigkeit verschieben sich die Maxima der Verweilzeitspektren zu größeren  $\theta$ -Werten. Bei einer Flussrate von  $0,03 \text{ mL/min}$  liegt das Maximum bei  $\theta = 0,63$ , für die größte getestete Fließgeschwindigkeit bei  $\theta = 0,94$ . Für ideale CSTR- und PFR-Reaktoren liegt das Maximum der Verweilzeitspektren bei  $\theta = 1$ . Die für Sartobind-Module ermittelten Werte liegen darunter, der Erwartungswert kommt also zu früh. Zusätzlich ist ein verlangsamtes Auslaufen zu erkennen. Diese Ergebnisse deuten normalerweise auf Totwasserzonen hin. In den verwendeten Sartobind-Modulen können diese Zonen durch die Membranen, die wie Schikanen wirken können, hervorgerufen werden. Die Erwartungswerte für die drei größten getesteten Fließgeschwindigkeiten liegen im Vergleich zu den niedrigen Geschwindigkeiten dicht zusammen. Die Totzonen werden mit steigender Fließgeschwindigkeit also geringer, nähern sich einem konstanten Wert an.

## 6.2 Immobilisierung von Enzymen an Sartobind-Module

Die Immobilisierung von Enzymen an Sartobind-Module kann bauartbedingt nicht auf die gleiche Weise wie zuvor bei Spinmodulen erfolgen. Für die Immobilisierung an IDA-Membranen werden keine langen Immobilisierungszeiten benötigt, daher ist das kontinuierliche Pumpen der Enzymlösung im Kreisstrom für mehrere Stunden nicht notwendig (vgl. Con A-Immobilisierung an Epoxy-Sartobind-Module in

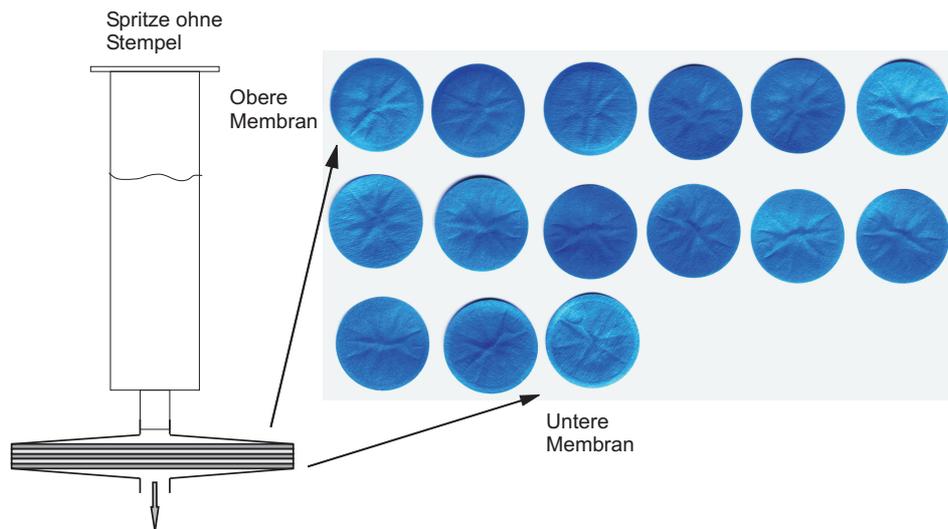
Kapitel 4.4). Zur Immobilisierung wurde daher auf die Sartobind-Module eine Spritze, bei der zuvor der Stempel entfernt worden war, aufgesetzt. Die Enzymlösung wurde eingefüllt und lief langsam durch die Membranen hindurch. Entsprechend wurde bei den folgenden Waschschrritten verfahren, das genaue Versuchsprotokoll findet sich im Anhang (siehe B.6). Die Immobilisierung von Invertase und  $\beta$ -Galactosidase erfolgte entsprechend der in Kapitel 3.6.2 ermittelten Bindungsbedingungen. Die erreichten Beladungsdichten sind nachfolgend in Tabelle 6.3 zusammengestellt. Als Vergleich sind zusätzlich die Ergebnisse für Spinmodule angegeben.

**Tabelle 6.3:** Immobilisierung von Invertase und  $\beta$ -Galactosidase an Sartobind-Module. Beladung der Membranen mit Kupferionen; vergleichend sind entsprechende Ergebnisse für Spinmodule aufgeführt

	Invertase		$\beta$ -Galactosidase	
	Sartobind-Modul	Spin-modul	Sartobind-Modul	Spin-modul
Enzym, einges.				
[mg/mL]	1,0	1,0	0,52	0,5
[mg]	10,0	0,4	5,42	0,2
[mg/cm <sup>2</sup> ]	0,133	0,054	0,072	0,027
Enzym, geb.				
[mg]	5,52 ± 0,89	0,213 ± 0,09	2,97 ± 0,28	0,120 ± 0,02
[mg/cm <sup>2</sup> ]	0,074 ± 0,012	0,028 ± 0,012	0,039 ± 0,004	0,016 ± 0,003

Wie in der Einleitung zu Kapitel 6 bereits angedeutet, unterscheiden sich die an Sartobind-Module gebundenen Enzymmengen von den Enzymmengen, die an Spinmodulen immobilisiert werden konnten. Zur besseren Bewertung der Ergebnisse werden die Membranen, wie zuvor bei Spinmodulen, aus dem Modul entfernt und die gebundenen Proteine mit Coomassie-Lösung angefärbt (vgl. Kapitel 3.6.4). Abbildung 6.4 stellt das Ergebnis der Färbung dar. Weiterhin ist als Skizze der Versuchsaufbau zur Proteinimmobilisierung angegeben.

Zwischen den Lokalisierungen der gebundenen Proteine im Spinmodul und im Sartobind-Modul lassen sich deutliche Unterschiede erkennen. Während bei Spinmodulen der überwiegende Anteil der Proteine auf der oberen Membran gebunden ist, erfolgt die Bindung bei Sartobind-Modulen sehr viel gleichmäßiger über alle Membranschichten verteilt. Zwischen einzelnen Membranen sind Unterschiede zu erkennen, jedoch handelt es sich hier um zufällige Verteilungsunterschiede. Als Grund für diese bessere Verteilung kann die geringere Fließgeschwindigkeit bei der



**Abb. 6.4:** Sartobind-Modul: Coomassie-Färbung enzymbeladener IDA-Membranen

Immobilisierung und die längere Immobilisierungsdauer im Vergleich zu Spinmodulen angeführt werden.

Die gleichmäßige Verteilung der gebundenen Proteine über die zur Verfügung stehende Membranfläche erklärt den starken Anstieg der pro cm<sup>2</sup> Membran gebundenen Enzymmengen auf das 2,64-fache bei Invertase bzw. 2,44-fache bei  $\beta$ -Galactosidase. Bei Sartobind-Modulen wird die zur Verfügung stehende Membranfläche sehr viel besser ausgenutzt als bei Spinmodulen, bei denen der überwiegende Anteil der gebundenen Enzyme auf der oberen Membran lokalisiert ist.

Beim Scale up der Enzymimmobilisierung wurde deutlich, dass die an Sartobind-Modulen gebundene Enzymmenge über denen für Spinmodulen liegt. Die absoluten Mengen unterscheiden sich abhängig vom Enzym. Wichtig ist jedoch, dass der Faktor, um den die gebundene Enzymmenge beim Scale up steigt, für beide Enzyme annähernd gleich ist. Hierdurch sollte eine Abschätzung der immobilisierbaren Enzymmenge im Vorfeld von Scale up-Prozessen auch für andere Enzyme möglich sein.

### 6.3 Sartobind-Module als Enzym-Festbettreaktor

Im vorangegangenen Kapitel 6.2 wurde die Immobilisierung von Enzymen an Sartobind-Module diskutiert. Mit Hilfe dieser beladenen Module wurden Substratumsetzungen im Durchfluss durchgeführt und bewertet. Dabei wurde im Vergleich zu Spinmodulen nicht nur kontinuierlich gearbeitet, sondern es erfolgte auch ein Scale up der Membranfläche von 7,48 auf 75 cm<sup>2</sup>. Die Substratlösung wurde, wie zuvor zur Messung der Verweilzeitverteilung, mit einer Schlauchpumpe durch die Module gepumpt. Bei der Wahl der Fließgeschwindigkeit wurden die Ergebnisse, die mit

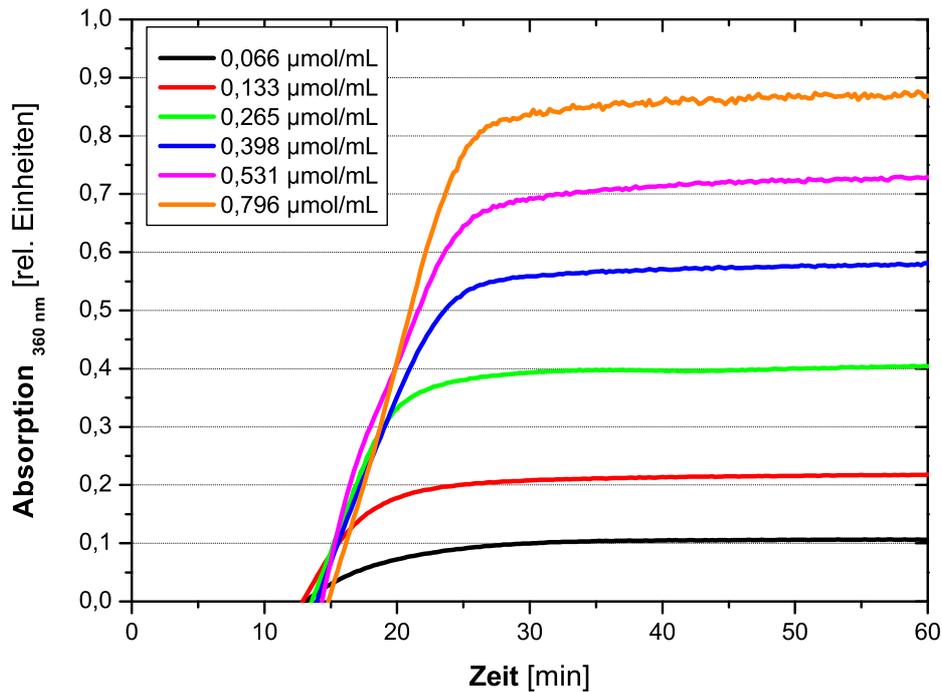
Spinmodulen erhalten wurden berücksichtigt. Bei Spinmodulen betrug die maximal mögliche hydrodynamische Verweilzeit  $0,96 \text{ min}$ , geringere Fließgeschwindigkeiten ließen sich aus technischen Gründen nicht verwirklichen. Es zeigte sich jedoch, dass die, unter diesen Bedingungen, in Spinmodulen verwirklichten Umsätze niedrig waren. Für die Versuchsreihen mit Sartobind-Modulen wurden höhere Umsätze angestrebt. Indem die Fließgeschwindigkeit im Vergleich zu den Spinmodulen annähernd konstant gehalten wurde, konnte eine deutliche Vergrößerung der hydrodynamischen Verweilzeit auf  $\sim 3,8 \text{ min}$  erreicht werden. Die zwischen Enzym und Substrat möglichen Kontaktzeiten sollten daher ausreichend lang sein, um einen maximalen Umsatz in den Sartobind-Modulen zu ermöglichen.

### 6.3.1 Durchflussreaktoren mit immobilisierter $\beta$ - Galactosidase zur Umsetzung von ONPG-Substrat

Bei einer konstanten Flussrate von  $0,28 \text{ mL/min}$  wurde ONPG-Substratlösung unterschiedlicher Konzentration durch ein mit  $2,97 \text{ mg}$   $\beta$ -Galactosidase beladenes Sartobind-Modul gepumpt. Die Substratkonzentrationen wurden dabei so gewählt, dass die zur Verfügung stehende Substratmenge auch bei niedrigen Konzentrationen nicht vollständig (aber annähernd) umgesetzt wurde. Auf diese Weise wurde die jeweils maximal mögliche Substratmenge umgesetzt. Die Messung erfolgte bei  $360 \text{ nm}$ . Es ergaben sich die auf Seite 102 in Abbildung 6.5 dargestellten Kurven. Die Zeitverzögerung bis zum Absorptionsanstieg ergibt sich einerseits aus der relativ geringen Flussrate. Ein weiterer Grund ist die Verwendung von Durchflussküvetten, die ein deutlich größeres Volumen als die Messzelle des RI-Detektors (vgl. Kapitel 6.1.1) umfassen. Ohne Durchflussmodul kann nach  $5 \text{ min}$  ein Absorptionsanstieg gemessen werden, mit Modul dauert es  $10 \text{ min}$ .

Zur Bewertung der Versuche wurde der Teil der Kurven, die einen konstanten Absorptionswert aufweisen, herangezogen. Einlauf- und Vermischungseffekte spielten keine Rolle und es wurde die maximal mögliche Substratmenge umgesetzt. Aus den erhaltenen Daten lassen sich Rückschlüsse auf die Reaktionsgeschwindigkeiten und den Anteil des hydrolysierten Substrates ziehen. In Tabelle 6.4 (S. 102) sind diese Daten zusammengestellt.

Es ist ersichtlich, dass es mit steigender Substratkonzentration zu einer Steigerung der o-Nitrophenol-Konzentration im Durchlauf kommt. Analog gilt dieses auch für die Reaktionsgeschwindigkeit. Sie steigt von  $0,0171 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  auf  $0,1396 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ . Der prozentuale Umsatz hingegen sank bei einer Steigerung der Substratkonzentration von  $92,5 \%$  bei  $0,133 \mu\text{mol/mL}$  auf  $62,0 \%$  bei  $0,796 \mu\text{mol/mL}$ . Bei Spinmodulen wurden für verschiedene Substratkonzentrationen annähernd konstante Umsätze ermittelt. Das es für Sartobind-Module zu abweichenden Ergebnissen kommt, hat mehrere Ursachen. Die hydrodynamische Verweilzeit in Sartobind-



**Abb. 6.5:** Umsetzung von ONPG-Substratlösung in Sartobind-Modulen mit immobilisierter  $\beta$ -Galactosidase. Reaktionsbedingungen:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , NaAc-Puffer (pH 4, 7),  $2,97 \text{ mg}$  immobilisierte  $\beta$ -Galactosidase

Modulen ist bedeutend größer als in Spinmodulen, sie hat direkten Einfluss auf die Reaktionsumsätze. Weiterhin ist der betrachtete Konzentrationsbereich größer, die

**Tabelle 6.4:** Reaktionsgeschwindigkeiten und Umsatz bei der enzymatischen Hydrolyse von ONPG-Lösung im Durchflussreaktor. Gebundene  $\beta$ -Galactosidase-Menge:  $2,97 \text{ mg}$

Substrat- konzentration $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}\right]$	Absorption (stationärer Bereich) $[\text{rel. Einheiten}]$	Produkt- konzentration $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}\right]$	Reaktions- geschwin- digkeit $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}}\right]$	Umsatz- rate $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}(\text{Enzym})}\right]$	Umsatz [%]
0,066	0,1062	0,060	0,0171	0,0057	91,4
0,133	0,2168	0,1230	0,0348	0,0117	92,5
0,265	0,4023	0,2284	0,0646	0,0217	86,2
0,398	0,5777	0,3279	0,0928	0,0312	82,4
0,531	0,7257	0,4119	0,1166	0,0392	77,6
0,796	0,8690	0,4933	0,1396	0,0469	62,0

Substratkonzentrationen nähern sich  $K_M$  an. Die Annahme, das es sich um eine Reaktion erster Ordnung handelt, auf deren Basis für Spinmodule der Umsatz nach Gleichung 5.3 berechnet werden konnte, gilt nicht mehr. Darüber hinaus wurde für Spinmodule die Annahme getroffen, dass sie sich wie Strömungsrohre verhalten. Das Verweilzeitverhalten von Sartobind-Modulen wird aber durch eine Reaktorkaskade beschrieben.

Zur besseren Einordnung der Ergebnisse werden Messungen mit nativem Enzym in Küvetten durchgeführt. Jeweils 50  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Galactosidase wurden in einen  $\text{mL}$  Substratlösung gegeben und die Absorptionsänderung photometrisch bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen stellt Tabelle 6.5 zusammen.

**Tabelle 6.5:** Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten für die Umsetzung von 1  $\text{mL}$  ONPG-Substratlösung in NaAc-Puffer durch 50  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Galactosidase

Substrat- konzentration $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}\right]$	Sättigungs- absorption $[\text{rel. Einheiten}]$	Anfangsreaktions- geschwindigkeit $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}}\right]$	Umsatz- rate $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}(\text{Enzym})}\right]$
0,066	0,1316	0,0051	0,1024
0,133	0,2439	0,0104	0,2088
0,265	0,4852	0,0205	0,4099
0,398	0,7045	0,0301	0,6024
0,531	0,9168	0,0386	0,7718

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit für die ONPG-Hydrolyse steigt im betrachteten Konzentrationsbereich linear mit der eingesetzten Substratkonzentration. Bei einem Vergleich der Werte für das native Enzym mit denen des Durchflussreaktors wird deutlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit im Durchflussreaktor größer ist, wenn man ausschließlich die umgesetzte Substratmenge pro Minute betrachtet. Wird allerdings zusätzlich die eingesetzte Enzymmenge berücksichtigt, ergeben die Reaktionsansätze mit nativem Enzym deutlich größere Geschwindigkeiten.

Zur Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten sowohl für das native als auch für das immobilisierte Enzym wird die doppelt-reziproke Lineweaver-Burk Darstellung herangezogen. Es ergeben sich dabei folgende Werte:

$$\text{natives Enzym} \quad v_{max} = 0,78 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}}$$

$$K_M = 10,04 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$$

$$\text{immobilisiertes Enzym} \quad v_{max} = 0,62 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}}$$

$$K_M = 2,30 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$$

Darüber hinaus ist die Bestimmung der Enzymaktivität möglich. 1 *unit*  $\beta$ -Galactosidase hydrolisiert  $1 \mu\text{mol}$  des Substrates ONPG innerhalb  $1 \text{ min}$  bei pH 4,7 und  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Für das native Enzym ergibt sich daraus eine Aktivität von  $15,6 \text{ units pro mg}$  Enzym. Die Aktivität des immobilisierten Enzyms ist deutlich geringer, sie beträgt  $0,058 \text{ units pro mg}$  eingesetztes Enzym. Nach der Immobilisierung verbleibt für  $\beta$ -Galactosidase eine Restaktivität von  $0,4 \%$ .

Der Aktivitätsrückgang der gebundenen  $\beta$ -Galactosidase lässt sich durch die Immobilisierung des Enzyms und einer daraus resultierenden Veränderung der Konformation erklären. Das Enzym ist an Membranen gebunden, daher sollte es normalerweise nicht zu Diffusionsproblemen und damit einhergehend zu einer verringerten Reaktionsgeschwindigkeit kommen.

### 6.3.2 Hydrolyse von Saccharoselösung in Sartobind-Durchflussreaktoren

In Kapitel 5.3 wurde die Optimierung der Hydrolyse von Saccharose durch an Spinmodulen immobilisierte Invertase diskutiert. Mit den ermittelten optimalen Reaktionsparametern erfolgte ein Scale up auf  $75 \text{ cm}^2$ -Reaktoren. Die Hydrolyse von Saccharoselösung kann nicht wie die Reaktion von ONPG-Lösung mit  $\beta$ -Galactosidase photometrisch verfolgt werden, daher wurden diskrete Messwerte zur Bestimmung des Glukosegehaltes im Durchlauf genommen.

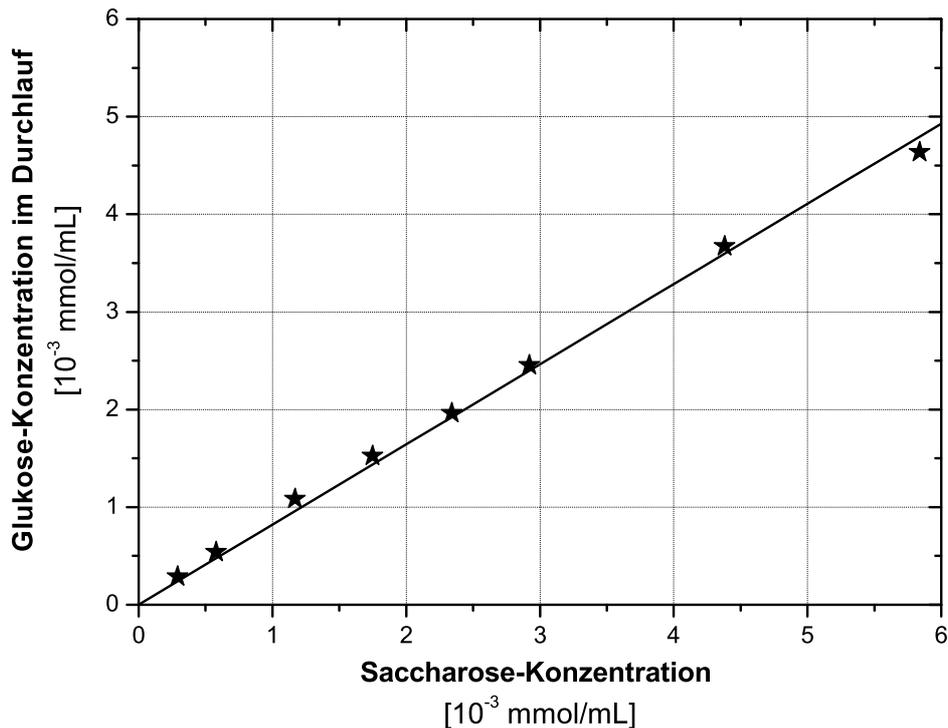
Die Versuche wurden an einer FPLC-Anlage durchgeführt. Bei einer Fließgeschwindigkeit von  $0,30 \text{ mL/min}$  wurde Substratlösung verschiedener Konzentration durch das Modul gepumpt. Mit einem Probensammler wurden Fraktionen zu je  $0,5 \text{ mL}$  gesammelt. Abbildung 6.6 auf Seite 105 stellt die Glukosekonzentration im Durchlauf der eingesetzten Substratkonzentration gegenüber. Die dargestellten Ergebnisse wurden mit einem mit  $5,52 \text{ mg}$  Enzym beladenen Modul erzielt.

Wie zuvor schon bei der Hydrolyse von ONPG durch  $\beta$ -Galactosidase sinkt der Umsatz mit steigender Substratkonzentration. Bei der kleinsten eingesetzten Konzentration von  $0,29 \mu\text{mol/mL}$  ( $0,1 \text{ g/L}$ ) wird die eingesetzte Saccharoselösung vollständig hydrolisiert. Die höchste getestete Konzentration beträgt  $5,84 \mu\text{mol/mL}$  ( $1,9 \text{ g/L}$ ). Der Umsatz sinkt linear mit der Substratkonzentration auf  $78,8 \%$ .

Entsprechend der Vorgehensweise bei  $\beta$ -Galactosidase lassen sich aus den Glukosekonzentrationen im stationären Zustand die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten ermitteln. Sie sind in Tabelle 6.6 zusammengestellt (siehe S. 105). Aus den erhaltenen Daten lassen sich mit Hilfe der Lineweaver-Burk Darstellung die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und  $K_M$  ermitteln. Es ergeben sich folgende Werte:

$$v_{max} = 0,71 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}}$$

$$K_M = 12,90 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$$



**Abb. 6.6:** Hydrolyse von Saccharoselösung: Glukosekonzentration im Durchlauf in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Reaktionsbedingungen: 55 °C, NaAc-Puffer (pH 4, 7), gebundene Invertase-Menge: 5,52 mg

Die Aktivität der zur Immobilisierung verwendeten Invertase wird vom Hersteller mit 300 *units/mg* angegeben. Für die gebundene Invertase ergibt sich eine Restaktivität von 0,039 *units/mg*. Das entspricht 0,013 % der Aktivität des nativen Enzyms.

**Tabelle 6.6:** Reaktionsgeschwindigkeiten und Umsatz bei der enzymatischen Hydrolyse von Saccharoselösung im Sartobind-Durchflussreaktor. Gebundene Invertase-Menge: 5,52 mg

Substrat- konzentration	Produkt- konzentration	Reaktions- geschwindigkeit	Umsatz- rate	Umsatz
$\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}\right]$	$\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}\right]$	$\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}}\right]$	$\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}(\text{Enzym})}\right]$	[%]
0,29	0,29	0,088	0,016	100
0,58	0,54	0,162	0,029	92,5
1,17	1,09	0,326	0,059	92,8
1,75	1,53	0,458	0,083	87,1
2,34	1,97	0,590	0,107	84,1
2,92	2,45	0,736	0,133	84,0
4,38	3,67	1,101	0,200	83,8
5,84	4,61	1,382	0,250	78,8

Vergleicht man die Ergebnisse für Invertase mit denen für  $\beta$ -Galactosidase, erkennt man, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  bei  $\beta$ -Galactosidase mit  $0,62 \mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$  im Vergleich zur Invertase um rund  $0,1 \mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$  geringer ist. Die Aktivität hingegen ist für die immobilisierte  $\beta$ -Galactosidase größer als für Invertase. Sie beträgt  $0,058 \text{ units pro mg}$  Enzym gegenüber  $0,039 \text{ units pro mg}$  bei Invertase. Für beide Enzyme wurde ein sehr starker Rückgang der Enzymaktivität festgestellt.

### 6.3.3 Vergleich der Ergebnisse für $7,48 \text{ cm}^2$ -Zentrifugen- und $75 \text{ cm}^2$ Durchflussreaktoren

Ein wichtiger Punkt für das Scale up auf kontinuierlich betriebene Durchflussreaktoren ist die Übertragbarkeit der mit den Zentrifugenreaktoren entwickelten Reaktionsbedingungen. Das gilt für die Immobilisierung der gewünschten Enzyme und auch für die enzymatische Reaktion. Da in Kapitel 6.2 die Ergebnisse der Immobilisierung bereits verglichen (siehe Tabelle 6.3 auf Seite 99) und bewertet wurden, soll in diesem Kapitel nur eine Gegenüberstellung der Ergebnisse für die Anwendung als Enzymreaktor für beide Reaktorformen erfolgen. Die mit Spinmodulen ermittelten Reaktionsbedingungen der Modellreaktionen lassen sich problemlos übertragen. Es ergeben sich jedoch Unterschiede in den Ergebnissen der Substratumsetzung für beide Modulformen. Tabelle 6.7 auf Seite 107 stellt diese gegenüber.

Es werden die Ergebnisse für Versuchsreihen mit den annähernd gleichen Flussraten,  $0,28 \text{ mL}/\text{min}$  bzw.  $0,3 \text{ mL}/\text{min}$  für Durchflussreaktoren und  $0,25 \text{ mL}/\text{min}$  bei Zentrifugenreaktoren verglichen. Vergleicht man die daraus resultierenden hydrodynamischen Verweilzeiten, ergibt sich für Spinmodule  $\tau = 0,96 \text{ min}$ , während diese bei Sartobind-Modulen etwa um den Faktor 3,8 bzw. 4,0 größer ist.

Abhängig vom Enzym wurde für beide Reaktortypen jeweils die gleiche Substratkonzentration verwendet (Invertase:  $2,92 \mu\text{mol}/\text{mL}$ ,  $\beta$ -Galactosidase:  $0,531 \mu\text{mol}/\text{mL}$ ). Betrachtet man die erreichten Produktkonzentrationen zeigt sich, dass diese im Durchlauf der Sartobind-Module für beide Modellreaktionen höher als bei Spinmodulen ist. Auch der Umsatz ist mit  $83,0 \%$  gegenüber  $27,7 \%$  bei Invertase und  $77,6 \%$  gegenüber  $53,4 \%$  für  $\beta$ -Galactosidase größer. Diese Unterschiede erklären sich einerseits dadurch, dass die Verweilzeit der Substratmoleküle in den Sartobind-Modulen größer ist und dadurch, dass an diese Module größere Enzymmengen gebunden sind. Es ist also die Umsetzung größerer *absoluter* Substratmengen möglich. Bezieht man in diese Betrachtung die Menge des jeweils gebundenen Enzyms mit ein und ermittelt die pro  $\text{mg}$  Enzym umgesetzte Substratmenge, erhält man für die Spineinheiten deutlich größere Werte. Durch den sehr langsamen Immobilisierungsprozess bei Sartobind-Modulen, binden die Enzyme sehr gleichmäßig über die Membranschichten verteilt und können auch in kleinen Poren binden. Die in kleinen

**Tabelle 6.7:** Scale up von Zentrifugen- zu Durchflussreaktoren: Vergleich der Ergebnisse für enzymatische Umsetzungen

	Invertase		$\beta$ -Galactosidase	
	Sartobind-Modul	Spin-modul	Sartobind-Modul	Spin-modul
Membranfläche [cm <sup>2</sup> ]	75	7,48	75	7,48
geb. Enzym [mg]	5,52	0,213	2,69	0,120
Flussrate [mL/min]	0,30	0,25	0,28	0,25
hydrodyn. Verweilzeit [min]	3,60	0,96	3,86	0,96
Substratkonzentration [ $\mu$ Mol/mL]	2,92	2,92	0,531	0,531
[ $\mu$ Mol/(mL · mg Enzym)]	0,53	13,71	0,20	4,43
Produktkonzentration [ $\mu$ Mol/mL]	2,45	0,81	0,412	0,284
[ $\mu$ Mol/(mL · mg Enzym)]	0,44	3,80	0,15	2,37
Umsatz [%]	83,0	27,7	77,6	53,4

Poren gebundenen Enzyme sind vermutlich für die wesentlich schneller fließende Substratlösung nur schwer erreichbar. Bei Spinmodulen tritt dieses Problem nicht auf, da der Hauptteil der Proteine auf der oberen Membran gebunden ist.

## 6.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die Möglichkeiten diskutiert, enzymatische Umsetzungen, deren optimale Reaktionsbedingungen zuvor mittels Zentrifugeneinheiten an Membranreaktoren angepasst wurden, auf größere, kontinuierlich arbeitende Reaktoren zu übertragen. Dieser Scale up-Prozess umfasste zwei Bereiche. Zum Einen die Übertragung der Enzymimmobilisierung, zum Anderen die anschließende enzymatische Umsetzung von geeigneten Substraten.

Der Ablauf der Enzymimmobilisierung unterscheidet sich aus technischen Gründen von dem bei Spinmodulen. Die mittels Spinmodulen bestimmten Bedingungen, wie beispielsweise das Puffersystem, erwiesen sich als problemlos auf Durch-

flussreaktoren übertragbar. Bezogen auf die Enzymmenge zeigt sich, dass nicht nur die größere Membranfläche eine Steigerung der gebundenen Menge bewirkt, es erfolgt außerdem auch ein Anstieg der Menge bezogen auf die zur Verfügung stehenden Membranfläche. Ursache hierfür ist der langsamere Immobilisierungsprozess, durch den die gleichmäßige Immobilisierung der Proteine an allen Membranschichten möglich wird.

Die gebundene Enzymmenge hängt bei beiden Modulformen von der eingesetzten Enzymkonzentration ab (vgl. Kapitel 3.6.3 und 6.2). Beim Scale up auf Durchflussreaktoren steigen, bezogen auf die Membranfläche, die gebundenen Enzymmengen. Für  $\beta$ -Galactosidase und Invertase ergaben sich Unterschiede bei den absoluten Werten, die Größenordnung, um die die Enzymmenge beim Scale up ansteigt, ist jedoch für beide Enzyme gleich. Daher kann auch bei anderen Enzymen von einer entsprechenden Steigerung beim Scale up der Immobilisierung ausgegangen werden.

Die Möglichkeiten, Spinmodule zum Screening der optimalen Reaktionsbedingungen von enzymatischen Reaktionen einzusetzen, wurden bereits in den Kapiteln 5.2 und 5.3 diskutiert. Bis zu 24 verschiedene Proben können gleichzeitig in einer Zentrifuge prozessiert werden. Mit dieser Modulform konnten allerdings keine Aussagen über beispielsweise kinetische Parameter getroffen werden. Durchflussreaktoren sind daher nicht nur für die Bewertung des Scale up-Prozesses interessant, sondern ermöglichen darüber hinaus die kontinuierliche Beobachtung der Reaktion.

Das Scale up der Enzymreaktion wurde sowohl mit Invertase als auch mit  $\beta$ -Galactosidase durchgeführt, aus messtechnischen Gründen mussten dabei unterschiedliche Konzentrationsbereiche betrachtet werden. Bei  $\beta$ -Galactosidase wurden Substratkonzentrationen zwischen 0,066  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  und 0,796  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  eingesetzt, bei Invertase ist der Konzentrationsbereich, bei dem die Reaktion beobachtet werden kann, größer, er liegt im Bereich von 0,29  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  und 5,84  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ .

Für die verschiedenen Substratkonzentrationen wurden für beide Modellenzyme die dazu gehörenden Reaktionsgeschwindigkeiten ermittelt. Dabei konnte nicht auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Reaktionen aufgrund von Einlaufeffekten etc. zurückgegriffen werden und auch kontinuierliches Pumpen der Substratlösung im Kreisstrom ergab keine bewertbaren Ergebnisse. Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten wurden daher die Zeiträume herangezogen, bei denen sich die Substratumsetzung in einem stationären Bereich befand; die am Reaktorausgang gemessenen Produktkonzentrationen sind hier annähernd konstant.

Sowohl Invertase als auch  $\beta$ -Galactosidase zeigen für steigende Substratkonzentrationen linear dazu ansteigende Reaktionsgeschwindigkeiten im betrachteten Konzentrationsbereich. Bei  $\beta$ -Galactosidase ist für hohe Substratkonzentrationen ein beginnender Übergang in den Sättigungsbereich erkennbar. Bezieht man die Reak-

tionsgeschwindigkeiten ausschließlich auf die hydrolisierte Substratmenge, liegen die Werte für Invertase leicht über denen für  $\beta$ -Galactosidase. Berücksichtigt man allerdings zusätzlich die Menge des gebundenen Enzyms, ergibt sich ein entgegengesetztes Ergebnis. Mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Auftragung wurde aus den ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten für beide Enzyme  $v_{max}$  und  $K_M$  bestimmt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für immobilisierte  $\beta$ -Galactosidase ist 12,7 % niedriger als die für immobilisierte Invertase.

Für die Aktivität der gebundenen Enzyme ergab sich im Vergleich zu den nativen Enzymen eine starke Abnahme. Für Invertase betrug die Restaktivität nach dem Immobilisierungsprozess 0,013 %, bei  $\beta$ -Galactosidase 0,4 %. Mit steigender Substratkonzentration kommt es bei beiden Modellenzymen zu einer Abnahme des Umsatzes. Der Umsatz bei Invertase ist bei gleicher Substratkonzentration höher als bei  $\beta$ -Galactosidase, zusätzlich fällt die Abnahme des Umsatzes weniger stark aus.

Der Einfluss der Fließgeschwindigkeiten und die daraus für verschiedenen Modulformen resultierenden Schwierigkeiten auf die Scale up-Prozesse der Substratumsatzung wurde diskutiert. Es lässt sich aber zusammenfassen, dass die mit Spinmodulen ermittelten Reaktionsbedingungen auf Sartobind-Module übertragbar sind. Der Umsatz liegt bei Durchflussreaktoren über dem bei Spinmodulen; die Ursachen sind die größeren gebundenen Enzymmengen und die höhere hydrodynamische Verweilzeit in Sartobind-Modulen.

## Kapitel 7

# Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurden Membranadsorbermodule in Bezug auf ihre Eignung zur Isolierung von Glykoproteinen und als Membran-Festbettreaktor untersucht. Es wurden Module im so genannten Mikrolitermaßstab verwendet. Die maximale Flüssigkeitsmenge, die pro Prozessschritt aufgegeben werden kann, beträgt daher 400  $\mu\text{L}$ . Die Form der Module, die in einer Tischzentrifuge verwendet werden, sowie der Maßstab, vereinfachen das Screening verschiedener Parameter während der Prozessentwicklung im Labor.

Die Voraussetzung für beide untersuchten Anwendungen war die Immobilisierung von aktiven biologischen Komponenten. Soll die Membran zur Bindung von Glykoproteinen verwendet werden, ist die vorhergehende Immobilisierung von Con A Voraussetzung. Für die Anwendung als Membran-Festbettreaktor werden entsprechende Enzyme gebunden.

In den Kapiteln 3.5 und 3.6 wurde die Optimierung entsprechender Bindungsparameter für die Immobilisierung von Con A an Epoxy- und IDA-Membranen und von sieben verschiedenen Enzymen an IDA-Membranen diskutiert. Die Ergebnisse der Immobilisierung von Con A unterschieden sich in Abhängigkeit vom verwendeten Membrantyp deutlich. IDA-Membranen zeigten für alle getesteten Metallionenbeladungen größere Bindungskapazitäten als epoxyaktivierte Membranen. In der Reihe der untersuchten IDA-Membranen zeigten sich abhängig vom verwendeten Metallion ebenfalls größere Unterschiede. Verschiedene Ansätze zur Steigerung der kovalent gebundenen Con A-Mengen an Epoxymembranen zeigten keinen Erfolg, da diese Membranen schnell verblockten. Im Anschluss an den Immobilisierungsprozess wurde das Bindungsvermögen der hergestellten Membranen für Glykoproteine am Beispiel des Modellproteins GOD untersucht. Dabei wurden alle Membranen betrachtet, auch die, die nur geringe Con A-Beladungsdichten aufwiesen.

Die Bindung von Enzymen wurde unter ausschließlicher Verwendung von IDA-Membranen optimiert. Im Gegensatz zu Epoxymembranen erfolgt die Bindung nicht kovalent, so dass eine Wiederverwendung der Membranmodule möglich ist. Neben

der Metallionenbeladung ist der Immobilisierungspuffer ein Parameter, der Einfluss auf die erreichten Bindungskapazitäten ausübt. Für alle eingesetzten Enzyme wurden die Bindungsbedingungen erfolgreich optimiert. Auffällig ist, dass in der Mehrheit die Kombination aus Kupferbeladung und Natriumacetatpuffer ein optimales Ergebnis ergaben. Für die Immobilisierung von Enzymen an Membranen ist jedoch nicht nur entscheidend, dass die maximal mögliche Menge gebunden wird, sondern darüber hinaus müssen die späteren Reaktionsbedingungen beachtet werden. Ein nicht geeignetes Puffersystem kann zur Elution der Enzyme führen. Die Visualisierung der gebundenen Enzyme an die Membranen der Spinmodule zeigte, dass der überwiegende Anteil an der oberen Membran gebunden ist. Beim Einsatz der Module zur Umsetzung von Substraten musste auf diesen Umstand Rücksicht genommen werden.

Zur Bindung von Glykoproteinen eigneten sich nicht alle hergestellten Con A-Membranen. Einige Membranen auf Epoxybasis verblockten oder es konnten keine GOD-Moleküle gebunden werden. Als geeignet erwiesen sich Membranen, bei denen die Con A-Bindung in Boratpuffer oder in Natriumacetatpuffer durchgeführt wurden. Für beide Membranen wurden unterschiedliche Beladungskapazitäten erreicht. Bezogen auf die zuvor immobilisierten Con A-Mengen wurden aber annähernd gleiche GOD-Mengen gebunden.

An alle Membranen auf IDA-Basis konnten zumindest geringe GOD-Mengen gebunden werden. Die erreichten GOD-Mengen sind jedoch stark unterschiedlich. Bei Verwendung von kupferbeladenen Membranen konnten die größten Mengen gebunden werden, sie sind größer als bei Epoxymembranen. Bei anderen Metallionenbeladungen wurden nur geringe Mengen GOD gebunden. Im Vergleich zu Epoxymembranen wurde, bezogen auf die Con A-Menge, an IDA-Membranen deutlich weniger GOD gebunden. Die wiederholte Bindung von GOD an Membranen auf IDA-Basis konnte erfolgreich durchgeführt werden, ohne dass es zu einer deutlichen Verringerung der gebundenen GOD-Menge kam. Bei Epoxymembranen hingegen kam es zu einer Verringerung der gebundenen GOD-Menge, aber auch hier war eine mehrfache Bindung von GOD an Con A möglich.

Con A-Membranen sowohl auf Epoxy- als auch auf IDA-Basis wurden zur Bindung von GOD aus Kultivierungsmedien eingesetzt. Membranen auf IDA-Basis erwiesen sich für dieses Anwendungsgebiet als ungeeignet, da es zur Elution der Con A-Moleküle und von Kupferionen kommt. Bei epoxybasierten Membranen konnte hingegen nachgewiesen werden, dass eine Bindung möglich ist. GOD als Modellprotein konnte aus zwei verschiedenen Medien isoliert werden.

Als weitere Anwendung von Con A-Membranen wurde die Bindung und Elution von Molkenproteinen untersucht. IDA-Membranen zeigten hier sehr positive Ergebnisse. Sowohl die weitere Aufreinigung von verunreinigtem Lactoferrin war ebenso möglich, wie die saubere Isolierung des Allergens Lactoglobulin. Die Isolierung

nung von Glykoproteinen aus natürlichen Flüssigkeiten ist also möglich. Die spezielle Bedeutung von Lactoglobulin in Lebensmitteln wurde bereits in Kapitel 4.3.2 angesprochen. Bei diesem Protein handelt es sich um ein Allergen, dessen effektive Abtrennung wichtig bei der industriellen Herstellung von Allergikernahrung ist. Con A-beladene Membranen bieten hier eine produktschonende Möglichkeit.

Spinmodule mit immobilisierten Enzymen konnten in Kapitel 5 erfolgreich als Membran-Festbettreaktor eingesetzt werden. Grundsätzliche Untersuchungen des Systems wurden vorgenommen, dazu gehörten der Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die hydrodynamische Verweilzeit und den erreichten Umsatz. Es wurden die Möglichkeiten diskutiert, Spinmodule zum Screening einzusetzen. Am Beispiel von Invertase wurde eine Optimierung zweier Reaktionsparameter (Temperatur und pH-Wert) erfolgreich durchgeführt. Weiterhin wurden Module mit immobilisierter  $\beta$ -Galactosidase zur Umsetzung von ONPG-Substratlösung eingesetzt. Kapitel 6 beschäftigte sich mit den Möglichkeiten, ein Scale up von Spinmodulen auf kontinuierlich durchflossene Sartobind-Module durchzuführen. Neben der Charakterisierung der Module durch die Bestimmung ihres Verweilzeitverhaltens, wurde eine Übertragung der in Spinmodulen durchgeführten Reaktionen vorgenommen. Auf die verwendeten Sartobind-Module konnten sowohl der Immobilisierungsprozess für Enzyme, als auch die enzymatischen Reaktionen erfolgreich übertragen werden. Daneben war die Ermittlung kinetischer Parameter möglich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die verwendeten Membranmodule für die meisten der betrachteten Anwendungen gut geeignet sind. Die Bindung von Glykoproteinen konnte am Beispiel des Modellproteins GOD untersucht werden. Die Bestimmung optimaler Bindungsparameter in den Spinmodulen war möglich. Dies zeigt, dass die Module zukünftig auch zum Screening von Aufarbeitungsbedingungen genutzt werden können. Dazu sollte jedoch zunächst die Bindung glykosilierter Proteine durch weitere Optimierungen der Con A-Membranen verbessert werden. Insbesondere bei epoxybasierten Membranen sind die Con A-Beladungsdichten gering. Werden Lösungen mit geringen Konzentrationen an Glykoproteinen aufgegeben, ist eine Bindung häufig nicht nachweisbar. Durch eine Vergrößerung der eingesetzten Membran- und evtl. der Membranquerschnittsfläche ist eventuell eine Steigerung der Con A-Beladung möglich. Bei Membranen auf Epoxybasis ist die Isolierung glykosilierter Proteine aus Kultivierungsüberständen zukünftig von Interesse. Die Versuche mit LB- und ProCHO-4-Medium zeigten, dass GOD gebunden werden konnte. IDA-Membranen hingegen zeigten für die Bindung aus Kultivierungsmedien keine positiven Ergebnisse. Das Anwendungsgebiet dieser Membranen könnte eher in Bereichen liegen, bei denen mit natürlichen Flüssigkeiten wie Molke gearbeitet wird. Hier zeigte sich, dass u. a. die saubere Isolierung von Lactoglobulin möglich ist. Dieses Ergebnis sollte auf weitere Systeme übertragbar sein.

Die Ergebnisse für den Einsatz als Membran-Festbettreaktor zeigen die grundsätzliche Eignung der verwendeten Module. Eine genauere Untersuchung der Übertragbarkeit der Ergebnisse in Scale up-Prozessen steht noch aus. Die untersuchten enzymatischen Reaktionen wurden erfolgreich von Spinmodulen auf kontinuierlich arbeitende Sartobind-Module mit der 10-fachen Membranfläche übertragen. Hierbei handelt es sich allerdings nur um eine relativ kleine Vergrößerung der Membranfläche. Aus technischen Gründen konnte ein Scale up auf so genannte Wickelmodule nicht durchgeführt werden. Für die Übertragbarkeit auf industrielle Prozesse wäre dieser Schritt von Interesse, da diese Module mehrere Quadratmeter Membranfläche enthalten können; eine Größenordnung, die bei industriellen Anwendungen benötigt wird.

# Anhang A

## Materialien und Abkürzungen

### A.1 Enzyme und Feinchemikalien

#### A.1.1 Enzyme

Alkohol-Dehydrogenase	Sigma A-3263
Glucoseoxidase	Sigma G-2133
$\beta$ -Galactosidase	Sigma G-7138
Alcalase 2.5L	Novozymes
$\alpha$ -Chymotrypsin	Sigma C-4129
Glutamat-Decarboxylase	Sigma
Invertase	Sigma I-4504

#### A.1.2 Feinchemikalien

BTEE	Sigma B-6125
CHO-Medium	Bio Whitaker
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma A-9056
Cobaltchlorid	Riedel-de Haën Nr. 31277
Concanavalin (Con A)	Sigma C-2010
CoomassieBlue G250	Serva
di-Kaliumhydrogenphosphat	Fluka Nr. 60356
EDTA-Natriumsalz	Fluka Nr. 03685
Essigsäure	Riedel-de Haën Nr. 27221
Ethanolamin	Sigma E-9508
Glukose	Sigma G-8270
Glukose-Assay	Sigma, G 3293
Glycin	Fluka Nr. 50052
Imidazol	Sigma I-0250

Kalium-di-hydrogenphosphat	Merck Nr. 818760
Kalziumchlorid-Dihydrat	Fluka Nr. 21100
Kupfersulfat-Pentahydrat	Fluka Nr. 61240
Lactoferrin	Sigma L-4765
$\alpha$ -D-Mannopyranosid	Sigma M-6882
Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat	Fluka Nr. 63543
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Fluka Nr. 63065
Natriumacetat-Trihydrat	Fluka Nr. 71193
Natriumcarbonat	Fluka Nr. 71350
Natriumchlorid	Fluka Nr. 71381
Natriumhydroxid	Sigma S-5881
Nickelsulfat	Riedel-de Haën Nr. 31483
o-Nitrophenol	Fluka Nr. 73542
ONPG	Sigma N-1127
Phosphorsäure	Fluka Nr. 79623
Saccharose	Sigma S-9378
Salzsäure	Fluka Nr. 84426
Silbernitrat	Riedel-de Haën Nr. 31630
Zinkchlorid	Fluka Nr. 96469

## A.2 Geräte

A/D-Wandler	ME-RedLab <sup>©</sup> , Meilhaus Elektronik
FPLC	BioLogic DuoFlow, Bio-Rad, München
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Gelelektrophorese-System	Criterion System, Bio-Rad, München
pH-Elektrode	InLab422, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
pH-Meter	Metrohm, Filderstadt
Pipetten	Research <sup>®</sup> , Eppendorf AG, Hamburg
Probensammler, FPLC	BioFrac, Bio-Rad, München
RI-Detektor	Model L7490, Merck
Thermoschüttler	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	BioFuge Pico, Kendro
UV-Vis-Spektrometer	Cary 50, Varian, Darmstadt
Mixer	MS3 basic, IKA, Staufen

### A.3 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
BSA	bovine Serum Albumin
BTEE	N-Benzoyl-L-Tyrosin-Ethylester
<i>cm</i>	Zentimeter
CHO	Chinese Hamster Ovary
Con A	Concanavalin A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GOD	Glukoseoxidase
IDA	Iminodiessigsäure
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
<i>kDa</i>	Kilodalton
KPP	Kaliumphosphatpuffer
<i>mg</i>	Miligramm
<i>min</i>	Minuten
<i>mm</i>	Millimeter
<i>mM</i>	Millimol
NaAc	Natriumacetat
<i>nm</i>	Nanometer
NTA	Nitriloessigsäure
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
PBS	Phosphate buffered Saline
PES	Polyethersulfon
pI	Isolelektrischer Punkt
PP	Polypropylen
<i>rpm</i>	rounds per minute
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<i>v<sub>max</sub></i>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

# Anhang B

## Versuchsprotokolle und Lösungen

### B.1 Bradfordtest (Proteintest)

Zur Proteinbestimmung wird ein modifizierter Bradfordtest nach [128] und [129] eingesetzt. Abhängig vom zu messenden Protein werden zwischen 10 und 50  $\mu\text{L}$  mit 1  $\text{mL}$  Bradfordreagenz vermischt. Nach 10  $\text{min}$  Inkubationszeit erfolgt die Messung der Absorption bei  $\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$ .

Zusammensetzung des Bradfordreagenz je 100  $\text{mL}$ :

- 10  $\text{mg}$  CoomassieBlue G250
- 5  $\text{mL}$  Ethanol (95 %)
- 10  $\text{mL}$  Phosphorsäure (85 %)
- + bidest. Wasser

### B.2 Pufferlösungen

#### B.2.1 Natriumacetatpuffer (Aktivierungspuffer für Con A)

0,1  $\text{M/L}$  NaAc $\cdot$ 3H<sub>2</sub>O

0,4  $\text{M/L}$  NaCl

1  $\text{mM/L}$  MnCl<sub>2</sub> $\cdot$ 4H<sub>2</sub>O

1  $\text{mM/L}$  MgCl<sub>2</sub> $\cdot$ 6H<sub>2</sub>O

1  $\text{mM/L}$  CaCl<sub>2</sub> $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O

pH-Wert 6,4

## B.2.2 PBS

10 mM/L  $K_2HPO_4$   
1,8 mM/L  $NaH_2PO_4$   
150 mM/L  $NaCl$   
pH-Wert 7,4

## B.2.3 Elutionspuffer für IDA-Membranen

50 mM/L  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$   
300 mM/L  $NaCl$   
250 mM/L Imidazol  
pH-Wert 8,0

## B.3 Medienzusammensetzung

### B.3.1 LB-Medium

Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
Glukose	1 g/L

### B.3.2 Synthetisches Medium

$NaCl$	1,2 g/L
$K_2SO_4$	1,1 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,15 g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001 g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,001 g/L
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	0,0147 g/L
L-Proline	17,7 g/L
$K_2HPO_4$	13,33 g/L
$KH_2PO_4$	0,5 g/L
Xylose	14,0 g/L
+ bidest. Wasser	

## B.4 Versuchsprotokolle: Epoxy-Spinmodule

### B.4.1 Immobilisierung von Con A an Epoxy-Spinmodule

Schritt	Lösung	Volumen [ $\mu L$ ]	Zentrifugations- geschwindigkeit [ <i>rpm</i> ]	dauer [ <i>min</i> ]
Membran- equilibrierung:	Boratpuffer	1 x 400	4.600	5
Con A- Immobilisierung:	Con A-Lösung in Borat/PBS Durchlauf auf die Membran geben, Inkubation: 3 Std bei Raumtemperatur Abzentrifugieren	1 x 400	2.100 4.600	2 5
Waschschrift:	Borat/PBS-Puffer	2 x 400	4.600	5
Absättigung:	Ethanolamin (0,1 %)	2 x 400	2.100	10
Waschschrift:	Borat/PBS-Puffer	2 x 400	4.600	5

### B.4.2 Proteinbindung an Con A-Epoxy-Spinmodule und anschließende Elution

Schritt	Lösung	Volumen [ $\mu L$ ]	Zentrifugations- geschwindigkeit [ <i>rpm</i> ]	dauer [ <i>min</i> ]
Con A- Aktivierung:	NaAc- Aktivierungspuffer	2 x 400	4.600	5
Protein- bindung:	Protein in Aktivierungspuffer oder Medium : Puffer 1 : 1	1 – 2 x 400 2 x 400	4.600 4.600	5 5
Waschschrift:	Aktivierungspuffer	2 x 400	4.600	5
Elution:	0,1 M Mannosidlösung	1 x 200	4.600	5
	0,1 M Mannosidlösung und/oder	2 x 400	4.600	5
	Glycin/HCl-Puffer	3 x 200	4.600	5

## B.5 Versuchsprotokoll: IDA-Spinmodule

### B.5.1 Immobilisierung von Con A und Enzymen an IDA-Spinmodule

Schritt	Lösung	Volumen [ $\mu L$ ]	Zentrifugations- geschwindigkeit [ <i>rpm</i> ]	dauer [ <i>min</i> ]
Membran- vorbereitung:	0,1 M NaCl	1 x 400	7.300	1
	0,5 M Metallsalzlösung	2 x 400	7.300	1
	0,1 M NaCl	2 x 400	7.300	1
	Bindungspuffer	2 x 400	5.700	1
Protein- bindung:	Protein in Bindungspuffer	1 – 5 x 400	5.700	3
Waschschrift:	Bindungspuffer	2 x 400	5.700	3

### B.5.2 Proteinbindung an Con A-IDA-Spinmodule und anschließende Elution

Schritt	Lösung	Volumen [ $\mu L$ ]	Zentrifugations- geschwindigkeit [ <i>rpm</i> ]	dauer [ <i>min</i> ]
Con A- Aktivierung:	NaAc- Aktivierungspuffer	2 x 400	5.700	3
Protein- bindung:	Protein in Aktivierungspuffer oder	2 x 400	5.700	3
	Medium : Puffer (1 : 1) oder	2 x 400	5.700	3
	Molke : Puffer (1 : 1)	2 x 400	5.700	3
	Waschschrift:	Aktivierungspuffer	2 x 400	5.700
Elution:	Mannosidlösung	1 x 200	5.700	3
	Mannosidlösung	2 x 400	4.600	5
und/oder	Glycin/HCl-Puffer	3 x 300	4.600	5
und/oder	IDA-Elutionspuffer	2 x 400	5.700	3

### B.5.3 Substratumsetzung in Enzym-IDA-Modulen

Schritt	Lösung	Volumen [ $\mu L$ ]	Zentrifugations- geschwindigkeit [ $rpm$ ]	dauer [ $min$ ]
Membran-				
vorbereitung:	Reaktionspuffer	1 x 400	5.700	3
Substrataufgabe:	Substrat in Reaktionspuffer	1 x 400	2.000	8
Waschschritt:	Reaktionspuffer	3 x 400	5.700	3

im Anschluss erneute Substrataufgabe möglich

### B.6 Immobilisierung von Proteinen an $75^2cm$ -IDA-Sarto- bind-Module

Zur Aufgabe von Puffern und Proteinlösungen wird eine 10 mL Spritze ohne Stempel verwendet. Sie wird auf das Modul aufgesetzt, die Lösung läuft bedingt durch die Schwerkraft durch das Membranmodul.

Schritt	Lösung	Volumen [mL]
Membranvorbereitung:	0,1 M NaCl-Lösung	1 x 10
	0,5 M Metallsalzlösung	1 x 10
	0,1 M NaCl-Lösung	1 x 10
	Bindungspuffer	2 x 10
Proteinbindung	Protein in Bindungspuffer	1 x 10
Waschschritt	Bindungspuffer	2 x 10

## Literaturverzeichnis

- [1] RÖSLER, H.-W.: Membrantechnologie in der Prozessindustrie - Polymere Membranwerkstoffe. *Chem. Ing. Tech.* 77 (2005), Nr. 5, S. 487–503
- [2] LI, N.N. ; LONG, R.B. ; HENLEY, E.J.: Membrane Separation Processes. *Ind. Eng. Chem.* 57 (1965), Nr. 3, S. 18–29
- [3] ROSENWINKEL, K.-H. ; WAGNER, J. ; NAGY, J.: Membranverfahren in der industriellen Abwasserbehandlung. *Chem. Ing. Tech.* 72 (2000), Nr. 5, S. 433–440
- [4] PETERS, T. ; KRAUME, M.: Entwicklungen und Perspektiven druckgetriebener Membranverfahren. *Chem. Ing. Tech.* 77 (2005), Nr. 5, S. 473–485
- [5] BÖHLER, G.: Die Milch mittels Membranen zerlegen. *Lebensmittel-Industrie* 9/10 (2003), S. 10–12
- [6] ELLIOT, S. ; LORENZINI, T. ; ASHER, S. ; AOKI, K. ; BRANKOW, D. ; BUCK, L.: Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat. Biotechnol.* 21 (2003), S. 414–421
- [7] SINCLAIR, A.M. ; ELLIOTT, S.: Glycoengineering: The Effect of Glycosylation on the Properties of Therapeutic Proteins. *J. Pharm. Sci.* 94 (2005), Nr. 8, S. 1626–1635
- [8] MISHRA, B. ; PRIYADARSINI, K.I. ; KUMAR, M.S. ; UNNIKRISHNAN, M.K. ; MOHAN, H.: effects of O-Glycosilation on the Antioxidant Activity and Free Radical Reactions of a Plant Flavonoid, Chrysoeriol. *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003), Nr. 13, S. 2677–2685
- [9] BERELI, N. ; AKGÖL, S. ; YAVUZ, H. ; DENIZLI, A.: Antibody Purification by Concanavalin A affinity Chromatography. *J. Appl. Polymer Sci.* 97 (2005), S. 1202–1208
- [10] FUJIHARA, J. ; HIEDA, Y. ; XUE, Y. ; OKUI, I. ; KATAOKA, K. ; TAKESHITA, H.: Single-step purification by lectin affinity and deglycosylation analysis of recombinant human and porcine deoxyribonucleases I. *Biotechnol. Lett.* 28 (2006), S. 215–221

- [11] SHARMA, S. ; BHAT, T.K. ; GUPTA, M.N.: Bioaffinity immobilization of tannase from *Aspergillus niger* on concanavalin A-Sepharose CL-4B. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35 (2002), S. 165–169
- [12] CHMIEL, H. (Hrsg.): *Bioprozesstechnik*. Elsevier, München, 2006
- [13] A., Felinger ; GUIOCHON, G.: Optimization of the experimental conditions and the column design parameters in overloaded elution chromatography. *J. Chromatogr.* 591 (1992), S. 31–45
- [14] KATTI, A.M. ; JAGLAND, P.: Development and optimization of industrial scale chromatography for use in manufacturing. *Analisis* 26 (1998), Nr. 7, S. M38–M46
- [15] GOSH, R.: *Principles of Bioseparations Engineering*. World Scientific Publishing co. Pte. Ltd., 2006
- [16] BAILON, P. (Hrsg.) ; EHRLICH, G.K. (Hrsg.) ; FUNG, W.J. (Hrsg.) ; BERTHOLD, W. (Hrsg.): *Affinity Chromatography - Methods and Protocols*. Humana Press Inc., 2000
- [17] HERMANSON, G.T. ; MALLIA, A.K. ; SMITH, P.K.: *Immobilized Affinity Ligand Technology*. Academic Press, Inc., San Diego, 1992
- [18] THAT, T. (Hrsg.): *Molecular Interactions in Bioseparations*. Plenum Press, New York, 1993
- [19] HAGE, D.S. (Hrsg.): *Handbook of Affinity Chromatography*. 2. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006
- [20] MONDAL, K. ; GUPTA, M.N.: The affinity concept in bioseparation: Evolving paradigms and expanding range of applications. *Biomol. Eng.* 23 (2006), S. 59–76
- [21] SULKOWSKI, E.: The Saga of IMAC and MIT. *BioEssays* 10 (1989), Nr. 5, S. 170–175
- [22] PORATH, J. ; CARLSSON, J. ; OLSSON, I. ; BELFRAGE, B.: Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fraction. *Nature* 258 (1975), S. 598–599
- [23] HOCHSCHULI, E. ; BANNWARTH, W. ; DOEBLI, H. ; GENTZ, R. ; STUBER, D.: Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology* 6 (1988), Nr. 11, S. 1321–1325

- [24] PORATH, J. ; OLIN, B.: Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials: Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* 22 (1983), S. 1621–1630
- [25] WINZERLING, J.J. ; BERNA, P. ; PORATH, J.: How to use immobilized metal ion affinity chromatography. *Methods* 4 (1992), Nr. 1, S. 4–13
- [26] YIP, T.T. ; HUTCHENS, T.W.: Immobilized metal ion affinity chromatography. *Mol. Biotechnol.* 1 (1994), S. 151–164
- [27] HEMDAN, E.S. ; ZHAO, Y.J. ; SULKOWSKI, E. ; PORATH, J.: Surface topography of histidine residues: A facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1989), S. 1811–1815
- [28] MRABET, N.T.: One-Step Purification of *Actinoplanes missouriensis* D-Xylose Isomerase by High-Performance Immobilized Copper-Affinity Chromatography: Functional Analysis of Surface Histidine Residues by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* 31 (1992), S. 2690–2702
- [29] YIP, T.T. ; NAKAGAWA, Y. ; PORATH, J.: Evaluation of the Interaction of Peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by High-Performance Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Anal. Biochem.* 183 (1989), S. 159–171
- [30] LABOUREAU, E. ; M.A., Vijayalakshmi.: Concerning the Separation of Mammalian Cells in Immobilized Metal Ion Affinity Partitioning Systems: a Matter of Selectivity. *J. Mol. Recogn.* 10 (1997), Nr. 6, S. 262–268
- [31] XU, F. ; JIA, J. ; JIN, Y. ; WANG, D.T.: High-Level Expression and Single-Step Purification of Human Tryptophanyl-tRNA Synthetase. *Protein Expr. Purif.* 23 (2001), Nr. 2, S. 296–300
- [32] PIATIBRATOV, M. ; HOU, S. ; BROOUN, A. ; J., Yang ; H., Chen ; M., Alam: Expression and fast-flow purification of a polyhistidine-tagged myoglobin-like aerotaxis transducer. *Biochim. Biophys. Acta* 1524 (2000), S. 149–154
- [33] MÜLLER, E.: *Mechanische Trennverfahren - Bd. 2: Zentrifugieren, Filtrieren*. Salle-Sauerländer, Frankfurt, 1983
- [34] BOTT, R.: Mikroporöse Filtermedien für die Kuchenfiltration. *Chem. Ing. Tech.* 62 (1990), S. 718–724
- [35] WHEELWRIGHT, S.M.: *Protein Purification*. Carl Hanser, München, 1991
- [36] MURKES, J. ; CARLSSON, C.-G.: *Crossflow filtration: theory and practice*. Wiley, New York, 1988

- [37] GOSH, R.: *Protein Bioseparation using Ultrafiltration*. Imperial College Press, London, 2003
- [38] BOWEN, W.R. ; HILDAL, N. ; LOVITT, R.W. ; WILLIAMS, P.M.: Atomic Force Microscope Studies of Membranes: Surface Pore Structures of Diaflo Ultrafiltration Membranes. *J. Colloid Interface Sci.* 180 (1996), S. 350–359
- [39] KIM, K.J. ; CHEN, V. ; FANE, A.G.: Some Factors Determining Protein Aggregation during Ultrafiltration. *Biotechnol. Bioeng.* 42 (1993), S. 260–265
- [40] BHATTACHARYA, S.K.: The use of enzyme mixtures for komplex biosyntheses. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (2004), S. 449–455
- [41] TAO, J. ; ZHAO, L. ; RAN, N.: Recent Advances in Developing Chemoenzymatic Processes for Active Pharmaceutical Ingredients. *Org. Process Res. Dev.* 11 (2007), S. 259–267
- [42] GRÖGER, H. ; ROLLMANN, C. ; CHAMOULEAU, F. ; SEBASTIEN, I. ; MAY, O. ; WIENAND, W. ; DRAUZ, K.: Enantioselective reduction of 4-fluoroacetophenone at high substrate concentration using a tailor-made recombinant whole-cell catalyst. *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007), Nr. 4-5, S. 709–712
- [43] LONGO, M.A. ; SANROMAN, M.A.: Production of Food Aroma Compounds: Microbiological and Enzymatic Methodologies. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2006), Nr. 3, S. 335–353
- [44] CHOCT, M.: Enzymes in the feed industry: past, present and future. *Worlds Poult. Sci. J.* 62 (2006), S. 5–15
- [45] GEMEINER, P. (Hrsg.): *Enzyme Engineering, Immobilized Systems*. Ellis Horwood, 1992
- [46] TISCHER, W. ; WEDEKIND, F.: Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Top. Curr. Chem.* 2000 (1999), S. 95–126
- [47] ROPER, D.K. ; LIGHTFOOT, E.N.: Separation of biomolecules using adsorptive membranes. *J. Chromatogr. A* 702 (1995), Nr. 1-2, S. 3–26
- [48] BRANDT, S. ; GOFFE, R.A. ; KESSLER, S.B. ; O'CONNOR, J.L. ; ZALE, S.E.: Membrane-based affinity technology for commercial scale purifications. *Bio-Technology* 6 (1988), Nr. 7, S. 779–782
- [49] AVRAMESCU, M.-E. ; GIRONES, M. ; BORNEMAN, Z. ; WESSLING, M.: Preparation of mixed matrix adsorber membranes for protein recovery. *J. Memb. Sci.* 218 (2003), S. 219–233

- [50] KRAUSE, S. ; KRONER, K.H. ; DECKWER, W.-D.: Comparison of affinity membranes and conventional affinity matrices with regard to protein purification. *Biotechnol. Tech.* 5 (1991), Nr. 3, S. 199–204
- [51] REIF, O.-W. ; FREITAG, R.: Characterization and application of strong ion-exchange membrane adsorbers as stationary phases in high-performance liquid chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A* 654 (1993), S. 29–41
- [52] ENDRES, H.N. ; JOHNSON, J.A.C. ; ROSS, C.A. ; WELP, J.K. ; ETZEL, M.R.: Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA. *Biotechn. Appl. Biochem.* 37 (2003), S. 259–266
- [53] ULBER, R. ; PLATE, K. ; DEMMER, T. ; BUCHHOLZ, W. ; SCHEPER, T.: Downstream processing of bovine lactoferrin from sweet whey. *Acta Biotechnol.* 21 (2001), S. 27–34
- [54] BHATTACHARJEE, S. ; BHATTACHARJEE, C. ; DATTA, S.: Studies on the fractionation of  $\beta$ -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography. *J. Memb. Sci.* 275 (2006), S. 141–150
- [55] LÜTZ, S. ; RAO, N.N. ; WANDREY, C.: Membranes in biotechnology. *Chem. Eng. Technol.* 29 (2006), Nr. 12, S. 1404–1415
- [56] SCHOMÄCKER, R. ; SCHMIDT, A. ; FRANK, B. ; HAIDAR, R. ; SEIDEL-MORGENSTERN, A.: Membranen als Katalysatorträger. *Chem. Ing. Tech.* 77 (2005), Nr. 5, S. 549–558
- [57] SUNDMACHER, K. (Hrsg.) ; KIENLE, A. (Hrsg.) ; SEIDEL-MORGENSTERN, A. (Hrsg.): *Integrated chemical processes: synthesis, operation, analysis and control.* Wiley-VCH, 2005
- [58] SANCHEZ MARCANO, J.G. ; TSOTSIS, T.T.: *Catalytic membranes and membrane reactors.* Wiley-VCH, Weinheim, 2002
- [59] MIACHON, S. ; PEREZ, V. ; CREHAN, G. ; TORP, E.: Comparison of a contactor catalytic membrane reactor with a conventional reactor: example of wet air oxidation. *Catal. Today* 82 (2003), S. 75–81
- [60] LANGFORD, J.F. ; SCHURE, M.R. ; YAO, Y. ; MALONEY, S.F. ; LENHOFF, A.M.: Effects of pore structure and molecular size on diffusion in chromatographic adsorbents. *J. Chromatogr. A* 1126 (2006), S. 95–106
- [61] YAO, Y. ; LENHOFF, A.M.: Pore size distributions of ion exchangers and relation to protein binding capacity. *J. Chromatogr. A* 1126 (2006), S. 107–119

- [62] ROPER, D.K. ; LIGHTFOOT, E.N.: Estimating plate heights in stacked-membrane chromatography by flow reversal. *J. Chromatogr. A* 702 (1995), Nr. 1-2, S. 69–80
- [63] TENNIKOVA, T. ; FREITAG, R.: An Introduction to Monolithic Disks as Stationary Phases for High Performance Biochromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* 23 (2000), Nr. 1, S. 27–38
- [64] PETERKA, M. ; JARK, M. ; BANJAC, M. ; FRANKOVIČ, V. ; BENČINA, K. ; MERHAR ; M. GABERC-POREKAR, V. ; MENART, V. ; ŠTRANCAR, A. ; PODGORNIK, A.: Characterisation of metal-chemalte methacrylate monoliths. *J. Chromatogr. A* 1109 (2005), S. 80–85
- [65] BORCHERDING, H. ; HICKE, H.-G. ; JORCKE, M. D. U. D. Ulbricht: Affinity Membranes as a Tool for Life Science Applications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 984 (2003), S. 470–479
- [66] CHARCOSSET, C.: Purification of proteins by membrane chromatography. *J. Technol. Biotechnol.* 71 (1998), S. 95–110
- [67] MORAIS, S. ; MAQUIEIRA, A. ; PUCHADES, R.: Selection and characterisation of, munofiltration assay. Applications to rapid and sensitive determination of the insecticide carbaryl. *J. Immunol. Meth.* 224 (1999), S. 101–109
- [68] AKGÖL, S. ; BAYRAMOĞLU, G. ; KACAR, Y. ; DENIZLI, A. ; ARICA, M.Y.: Poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) reactive membrane utilised for cholesterol oxidase immobilisation. *Polym. Int.* 51 (2002), S. 1316–1322
- [69] VOLLHARDT, K.P.C. ; SCHORE, N.E. ; BUTENSCHÖN, H. (Hrsg.): *Organische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1995
- [70] KRAUCH, H. ; KUNZ, W.: *Reaktionen der organischen Chemie*. Hüthing, Heidelberg, 1997
- [71] ARNOLD, F.H.: Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Biotechnology* 9 (1991), S. 151–156
- [72] BURGESS, R. (Hrsg.): *Protein Purification: Micro to Makro*. Alan Liss, New York, 1987
- [73] ZHAO, Y.J. ; SULKOWSKI, E. ; PORATH, J.: Surface topography of histidine residues in lysozymes. *eur. J. Biochem.* 202 (1991), S. 1115–1119
- [74] HOLMES, L. D. ; SCHILLER, M.R.: Immobilized iron(III) metal affinity chromatography for the separation of phosphorylated macromolecules: Ligands and applications. *J. Liq. Chromatogr.* 20 (1997), Nr. 1, S. 123–142

- [75] HOCHULI, E. ; DÖBELI, H. ; SCHACHER, A.: New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* 411 (1987), S. 177–184
- [76] MUSZYŃSKA, G. ; DOBROWOLSKA, G. ; MEDIN, A. ; EKMAN, P. ; PORATH, J.O.: Model studies on iron(III) ion affinity chromatography II. Interaction of immobilized iron(III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins. *J. Chromatogr.* 604 (1992), S. 19–28
- [77] LINER, I.E. (Hrsg.) ; SHARIN, N. (Hrsg.) ; GOLDSTEIN, I.J. (Hrsg.): *The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine.* Academic Presse Inc. Orlando, Florida, USA, 1986
- [78] SUMNER, J.B.: The globulins of the Jack Bean, *canavalia ensiformis*. *J. biol. chem.* 37 (1919), S. 137–142
- [79] SENEAR, D.F. ; TELLER, D.C.: Thermodynamics of concanavalin A-dimer-tetramer self-association - sedimentation equilibrium studies. *Biochemistry* 20 (1981), Nr. 11, S. 3076–3083
- [80] WANG, J.L. ; CUNNINGHAM, B.A. ; WAXDAL, M.J. ; EDELMAN, G.M.: Covalent and 3-dimensional structure of concanavalin-A.2. Amino-acid sequence of cyanogen-bromide fragment F3. *J. Biol. Chem.* 250 (1975), Nr. 4, S. 1503–1512
- [81] In: LLOYD, K.: *Concanavalin A as a Tool.* Wiley New York, 1976, S. 323
- [82] BITTIGER, H. (Hrsg.) ; SCHENBLI, H.P. (Hrsg.): *Concanavalin A as a Tool.* Wiley New York, 1976
- [83] BROWN, R.D. ; BREWER, C.F. ; S.H., Koenig: Conformation States of Concanavalin A: Kinetics of Transitions Induced by Interaction with  $Mn^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  Ions. *Biochemistry* 16 (1977), Nr. 17, S. 3883–3896
- [84] BREWER, C.F. ; BROWN, R.D. ; KOENIG, S.H.: Metal Ion Binding and Conformational Transitions in Concanavalin A: A Structure-Function Study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1 (1983), S. 961–997
- [85] ENTLICHER, G. ; KOŠTÍŘ, J.V. ; KOCOUREK, J.: Studies on phytohemagglutinins. VIII. Isoelectric point and multiplicity of purified concanavalin A. *Biochim. Biophys. Acta* 236 (1971), S. 795–797
- [86] BHATTACHARYYA, L. ; BREWER, C.F.: Isoelectric focusing studies of concanavalin A and the lentil lectin. *Journal of Chromatography* 502 (1990), S. 131–142

- [87] WITAKER, J. R. ; GRANUM, P.E.: An Absolute Method for Protein Determination Based on Difference in Absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* 109 (1980), S. 156–159
- [88] WHEATLY, J.B. ; SCHMIDT, D.E.: Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxyde-activated supports. *J. Chromatogr. A* 849 (1999), S. 1–12
- [89] REIF, O.W.: *Päparative und analytische Methoden in der Hochleistungs-Membran Chromatographie und Kapillarelektrophorese*, Universität Hannover, Diss., 1994
- [90] JORNVALL, H: The primary structure of yeast alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 72 (1977), Nr. 3, S. 425–442
- [91] HAYES, H.E. ; VELVICK, S.F.: Yeast alcohol dehydrogenase: molecular weight, coenzyme binding, and equilibria. *J. Biol. Chem.* 207 (1954), S. 225–244
- [92] In: SUND, H ; THEORELL, H.: *The Enzymes*. 2. Auflage. Academic Press, New York, 1963, S. 57–83
- [93] TSUGE, H.J. et a.: Purification , properties, and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biochem.* 78 (1975), S. 835–843
- [94] PAZAR, J.H. ; KLEPPE, K.: The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* 3 (1964), S. 578–583
- [95] GONZALEZ, R.R. ; MONSAN, P.: Purification and some characteristics of beta-galactosidase from *Aspergillus fonscaeus*. *Enzyme Microb. Technol.* 13 (1991), S. 349–352
- [96] CRAVEN, G.R. ; STEERS, E. ; ANFINSEN, C.B.: Purification, Composition, and Molecular Weight of the beta-Galactosidase of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 240 (1965), Nr. 6, S. 2468–2477
- [97] In: LAMPEN, J.O.: *The Enzymes*. 3. Auflage. Academic Press, New York, 1971, S. 291–303
- [98] RIGHETTI, P.G. ; CARAVAGGIO, T.: Isoelectric points and molecular weights of proteins. *J. Chromatogr.* 127 (1976), S. 1–28
- [99] UI, N.: Isoelectric points and conformation of proteins. II. Isoelectric focusing of alpha-chymotrypsin and its inactive derivative. *Biochim. Biophys. Acta* 229 (1971), Nr. 3, S. 582–589
- [100] In: BURELL, M.M. (Hrsg.): *Enzymes of Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, 1993, S. 277–281

- [101] In: MARKLAND, F.S. ; SMITH, E.L.: *The Enzymes*. 3. Auflage. Academic Press, New York, 1972, S. 561–608
- [102] TOOGOOD, H.S. ; SMITH, C.A. ; BAKER, E.N. ; DANIEL, R.M.: Purification and characterization of Ak.1 protease, a thermostable subtilisin with a disulphide bond in the substrate-binding cleft. *Biochem. J.* 350 (2000), S. 321–328
- [103] M.L., Fonda: L-Glutamate Decarboxylase from Bacteria. *Methods in Enzymology* 113 (1985), S. 11–16
- [104] STRAUSBAUCH, P. ; FISCHER, E.: Chemical and Physical Properties of Escherichia coli Glutamate Decarboxylase. *Biochem* 9 (1970), S. 226–233
- [105] SALEEMUDDIN, M. ; HUSAIN, Q.: Concanavalin A: A useful ligand for glycoenzyme immobilization - a review. *Enzyme Microb. Technol.* 13 (1991), Nr. 4, S. 290–295
- [106] REEKE, G.N. ; BECKER, J.W. ; CUNNINGHAM, B.A. ; GUNTHER, G.R. ; EDELMANN, G.M.: Relationships between structure and activities of Concanavalin A. *Ann. New York Acad. Sci.* 234 (1974), S. 369–382
- [107] MANDAL, D.K. ; BREWER, C.F.: Differences in the Binding Affinities of Dimeric Concanavalin A (Including Acetyl and Succinyl Derivatives) and Tetrameric Concanavalin A with Large Oligomannose-Type Glycopeptides. *Biochemistry* 32 (1993), Nr. 19, S. 5116–5120
- [108] LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970), S. 680–685
- [109] BLUM, H. ; HILDBURG, B. ; GROSS, H.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (1987), S. 93–99
- [110] WERNER, R.G. ; KOPP, K. ; SCHLÜTER, M.: Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatr.* 96 (2007), S. 17–22
- [111] SETHURAMAN, N. ; STADHEIM, T.A.: Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* (2006), S. 341–346
- [112] SCHLIMME, E. ; BUCHHEIM, W.: *Milch und ihre Inhaltsstoffe, Chemische und physikalische Grundlagen*. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, 1995
- [113] ZAKS, A. ; KLIBANOV, A.M.: Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents. *J. Biol. Chem.* 263 (1988), S. 3194–3201
- [114] OTTESEN, M. ; SVENDSEN, I.: The Subtilisins. *Methods in Enzymology* 19 (1970), S. 199–215

- [115] PRABHU, K.S. ; RAMADOSS, C.S.: Subtilisin catalysis of substrate anchored in cyclodextrin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 69 (1998), Nr. 1, S. 69–77
- [116] In: WALLENFELS, K. ; WEIL, R.: *The Enzymes*. 3. Auflage. Academic Press, New York, 1972, S. 619–660
- [117] LADERO, M. ; SANTOS, A. ; GARCIA, J.L. ; GARCIA-OCHOA, F.: Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered - galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modelling. *Enzyme Microb. Technol.* 29 (2001), S. 181–193
- [118] J., Oakes ; CASTRO, Ch. ; BRITT, B.M: Galactosylation thermodynamics of *e. Coli*  $\beta$ -Galactosidase by ONPG and PNPG. *Protein Pept. Lett.* 8 (2001), Nr. 4, S. 303–306
- [119] U.C., Filho ; HORI, C.E. ; RIBEIRO, E.J.: Influence of the reaction products in the inversion of sucrose by invertase. *Braz. J. Chem. Eng* 16 (1999), Nr. 2, S. 149–153
- [120] LÓPEZ SANTÍN, J. ; SOLA, C. ; LEMA, J.M.: Substrate and Product Inhibition Significance in the Kinetics of Sucrose Hydrolysis by Invertase. *Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982), S. 2721–2724
- [121] WHITE, J.W.: The Action of Invertase Preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 39 (1952), Nr. 1, S. 238–240
- [122] YAKUP ARICA, M. ; BAYRAMOĞLU, G.: Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimin-grafted poly(GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 38 (2006), Nr. 3-6, S. 131–138
- [123] BAERNS, M. ; BEHR, A. ; BREHM, A. ; GMEHLING, J. ; HOFMANN, H. ; ONKEN, U. ; RENKEN, A.: *Technische Chemie*. Wiley-VCH, Weinheim, 2006
- [124] In: MILLER, J.H.: *Experiments in molecular genetic*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1972, S. 403–404
- [125] HESSE, M. ; MEIER, H. ; ZEEH, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995
- [126] KORTÜM, G.: Über die Mesomerie nitrogruppenhaltiger Anionen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 74 (1941), S. 409–416
- [127] JAKUBITH, M.: *Grundoperationen und chemische Reaktionstechnik*. Wiley-VCH, Weinheim, 1998

- [128] BRADFORD, M.M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976), Nr. 1-2, S. 248–254
- [129] SEDMAK, J.J. ; GROSSBERG, S.E: A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 79 (1977), Nr. 1-2, S. 544–552

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Daniela Harkensee  
Geburtsdatum 30.09.1977  
Geburtsort Osterholz-Scharmbeck  
Familienstand ledig

## Schulische Ausbildung

1984 - 1988 Menkeschule Osterholz-Scharmbeck  
1988 - 1990 Orientierungsstufe Osterholz-Scharmbeck  
1990 - 1997 Gymnasium Osterholz-Scharmbeck  
06/1997 Abitur

## Hochschulbildung

1997 - 2000 Grundstudium Chemie an den Universitäten Hamburg und Bremen  
06/2000 Diplomvorprüfung  
2000 - 2003 Hauptstudium Chemie an der Universität Hannover  
04/2003 - 10/2003 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover. Thema: *Entwicklung eines photometrischen Biosensorsystems zur Anwendung in der Qualitätssicherung bei der Produktion von Weinen*  
seit 11/2003 Promotionsstudium an der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. R. Ulber, Universität Kaiserslautern

## Beruflicher Werdegang

12/1999 - 11/2000 Studentische Hilfskraft am Institut für Werkstofftechnik, Bremen  
11/2003 - 05/2005 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für technische Chemie der Leibniz Universität Hannover  
06/2005 - 09/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für technische Chemie der Leibniz Universität Hannover