

**Aufbau eines Downstream-Prozesses zur
Proteingewinnung mittels Membrantechnologie am
Beispiel von Kartoffelfruchtwasser**

**Von der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. Nat. -**

**genehmigte
Dissertation**

von

**Dipl.-Chem.
Rafael Th. Steinhof
Geboren am 18.06.1977 in Rosenberg (Polen)**

2007

Referent: Prof. Dr. Roland Ulber

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2007

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Roland Ulber durchgeführt, bei dem ich mich für die hervorragende Betreuung und große Unterstützung sowie zahlreiche Anregungen bedanke.

Die Durchführung erfolgte am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Scheper, dem ich für die Übernahme des Co-Referates und die hervorragenden Arbeitsbedingungen ganz herzlich danke.

Außerdem möchte ich Dr. Sascha Beutel meinen Dank aussprechen für die anregenden Besprechungen und die vorgenommenen Korrekturen dieser Arbeit.

Herzlichen Dank an die Emslandstärke, die dieses Projekt erst ermöglichte und mir dabei die Möglichkeit gab meine Versuche teilweise in ihrem Werk durchzuführen. Ganz besonderer Dank gilt dabei Dr. Martin Lotz und den Mitarbeitern des Technikums in Emlichheim, die mich in dieser Zeit überaus freundlich aufgenommen und unterstützt haben.

Mein Dank gilt auch der Sartorius AG und TAMI Industries für die umfangreiche Versorgung mit Material und Know-how.

Weiterhin danke ich den Betreuern des Biochemie-Grundpraktikums der MHH, die mir gestattet haben, dort einige Versuch durchzuführen.

Meinen Schwerpunktpraktikanten Christoph Rehbock, Christian Endres und Matthias Lückmann danke ich dafür, dass sie mit ihrem Engagement zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein dickes Dankeschön an meine Laborkollegen Johann Schwarz und Heiko Rackel für ihre Hilfsbereitschaft und großartige Unterstützung während der letzten Jahre. Allen Mitgliedern des Arbeitskreises des Instituts für Technische Chemie in Hannover, sowie denen des Arbeitskreises Bioverfahrenstechnik der TU Kaiserslautern, herzlichen Dank für den vielen Spaß und das gute Arbeitsklima.

Ganz besonderer Dank an meine Familie, die mich immer in jeder erdenklichen Weise unterstützt hat.

„Wissen ist nicht genug, man muss es auch anwenden können.“

Bruce Lee (1940-1973)

Abstract (D)

Steinhof, Rafael

Bei der Stärkeproduktion anfallendes Kartoffelfruchtwasser (KFW) besitzt einen hohen Proteinanteil von 2-3 %, der bisher nicht genutzt wurde. Hauptproteinbestandteile sind das Speicherprotein Patatin (40 kDa) und die Gruppe der Protease-Inhibitoren (3-23 kDa). Ihre Verwendung ist für verschiedenste Applikationen in der pharmazeutischen, kosmetischen und Nahrungsmittelindustrie interessant (z.B. Appetitzügler und muskelaufbauende Proteinpräparate). Für die Gewinnung der Proteine in nativer Form aus dem Kartoffelfruchtwasser der Emslandstärke GmbH wird ein Scaleup-Prozess vorgestellt, der auf der Verwendung von Polymermembranen basiert.

Das KFW besitzt zu Beginn einen für die Isolierung der Proteine ungeeignet hohen Feststoffanteil. Die daher erforderliche Mikrofiltration im Crossflow-Modus erfolgt mit einem Hydrosart-Plattenmodul (Sartorius AG) mit der Porengröße von 0,2 µm. Die so gewonnene Proteinfracht wird anschließend durch den Einsatz einer Kombination von Membranadsorbermodulen (Sartobind, Sartorius AG), an denen unterschiedliche Proteinfraktionen binden und anschließend durch eine Salzlösung eluiert werden, fraktioniert. Die Q-Typ-Membranen (starker Anionenaustauscher) binden dabei Patatin, während die Protease-Inhibitoren in den Eluaten der S-Typ-Membranen (starker Kationenaustauscher) nachzuweisen sind. Die Bestimmung der Proteingehalte erfolgt mit einem Proteinassay nach Lowry. Weiterhin wird ein Membranadsorbermodul vorgestellt mit einer neuartigen Bauart (Sartobind direct, Sartorius AG), die die Mikrofiltration des KFW unnötig macht. Stattdessen wird das KFW in einem Rezirkulationsverfahren gewonnen. Die aufgefangenen Proteineluate werden anschließend aufkonzentriert und entsalzt. Hierzu werden die Techniken der Ultra-, bzw. Diafiltration im Crossflowbetrieb angewendet. Die Porengröße beträgt bei beiden Fraktionen 10 kDa. Für die Trocknung der Proteinfraktionen werden Gefrier- und Sprühtrocknung verwendet. Die Reinheit der Proben wird durch Gelelektrophorese und spektrometrische Enzym-Assays nachgewiesen.

Stichworte: Crossflow-Mikrofiltration, Enzym-Assay, Kartoffelfruchtwasser, Membranadsorber, Scaleup, Trocknung, Ultrafiltration

Abstract (E)

Steinhof, Rafael

Potato fruit juice produced during starch production contains a remarkable protein percentage of about 2-3 %. Of these proteins the storage protein patatin (40 kDa) and the group of protease inhibitors (3-23 kDa) are the most important components. These proteins could be interesting in many different applications for the use in pharmacy, cosmetic and food industry (for example in appetizers and protein preparations for fitness aspects). A method will be introduced to isolate native potato proteins from potato fruit juice using polymer membranes. The process is carried out in technical scale.

To realise the first step of the protein isolation process, it is necessary to separate all big particles from the fruit juice disturbing the further preparation. Crossflow microfiltration is used to achieve this goal. The pore size of the used Hydrosart-plate module (Sartorius) is 0,2 μm . The resulting clarified fruit juice is separated by a combination of membrane adsorbers (Sartobind, Sartorius). The fractions of Patatin are isolated with the help of a Q-type-membrane adsorber (strong anionic exchanger), the Protease inhibitors bind at a S-type membrane adsorber (strong cationic exchanger). Furthermore another membrane adsorber module will be introduced with a new kind of process mode (Sartobind direct, Sartorius) avoiding microfiltration before membrane adsorption. The fruit juice is isolated in a recirculation process.

Using high salt concentrations the proteins can be eluted from the modules. Then the fractions are concentrated and purified by dia- and ultrafiltration using a Hydrosart-plate module (Sartorius) with a pore size of 10 kDa. Finally they are dried by freeze and spray drying. The purity of the protein products is controlled by electrophoresis and spectrometric enzyme assays.

Keywords: crossflow microfiltration, enzyme assay, potato fruit juice, membrane adsorber, scaleup, drying, ultrafiltration

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Die Kartoffel und ihre Inhaltsstoffe	4
2.1	Allgemeine Fakten zur Kartoffel	4
2.2	Stärke und Gewinnungsverfahren der Emslandstärke GmbH.....	5
2.3	Kartoffelfruchtwasser (KFW) – Abfallprodukt des Stärkeprozesses	7
2.4	Patatin	9
2.5	Protease-Inhibitoren.....	10
2.6	Polyphenoxidasen	12
2.6.1	Tyrosinase	12
2.6.2	Laccase.....	14
2.6.3	Polyphenole	14
2.7	Glykoalkaloide.....	16
3	Stand der Technik - Gewinnung von Kartoffelproteinen aus Kartoffelfruchtwasser (KFW)	18
4	Membranfiltration	23
4.1	Grundlagen der Filtration	23
4.2	Filtrationsleistung	27
4.3	Deckschichtbildungsmodelle	28
4.3.1	Diffusionsmodelle.....	29
4.3.2	Hydrodynamische Modelle.....	29
4.4	Reinigung von Filtermodulen	30
5	Prozessschritt 1: Mikrofiltration	32
5.1	Vorklärung von Kartoffelfruchtwasser	32
5.2	Mikrofiltration des Kartoffelfruchtwassers.....	33
5.3	Bestimmung der geeigneten Porengröße	34
5.4	Optimierung des Materials und Modultyps	38
5.5	Druckverhalten.....	41
5.6	Probleme durch Verbräunung und temperatur- und pH-bedingte Koagulation	43
6	Prozessschritt 2: Isolierung durch Membranadsorption.....	44
6.1	Ionenaustausch-Chromatographie mittels Membranen.....	44
6.2	Bestimmung der Bindungskapazität bei unterschiedlichen pH-Werten über FPLC.....	47
6.3	Membranadsorption von Kartoffelfruchtwasser an 6.600 cm ² Sartobind- Singlesep-Modulen (Q- und S-Typ).....	49
6.4	Kombination von Q- und S-Membranadsorber-Modulen – MultiSep.....	54
6.5	Langzeitstabilitätstest von Sartobind 6.600 cm ² -Modulen (SingleSep) ..	59
6.6	Zusammenfassung.....	61
7	Prozessschritt 2b: Alternative Isolierung von Kartoffelfruchtwasser mittels neuartiger Q- und S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodule	62
7.1	Einleitung	62

7.2	Membranadsorption von Kartoffelfruchtwasser an einem Sartobind Direct-Wickelmodul	63
7.3	Beurteilung der Druckverläufe während der Prozesse	65
7.4	Beurteilung des Trübungsverhaltens während der Prozesse	66
7.5	Langzeitstabilitätstests der Sartobind Direct-Wickelmodule	67
7.6	Variation der Elutionsgeschwindigkeit	71
7.7	Variation der Beladungsdauer des Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls	73
7.8	Reinigung der Sartobind Direct-Wickelmodule	74
7.9	Zusammenfassung	76
8	Prozessschritt 3: Aufreinigung durch Ultra- und Diafiltration	78
8.1	Variation der Porengröße	79
8.2	Variation des Membranmaterials	80
8.3	Variation des Diafiltrationspuffers	81
9	Prozessschritt 4: Trocknung der kartoffelprotein-haltigen Lösungen	82
9.1	Gefriertrocknung (Lyophilisierung)	82
9.1.1	Natives Gel	83
9.2	Sprühtrocknung	84
9.2.1	Untersuchung eines Q- und S-Typ-Membranadsorber-Gesamtprozesses	86
9.2.2	Untersuchung eines Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul-Gesamtprozesses	87
9.2.3	Variation der Ausgangstemperatur bei Q-Dia-Retentaten	89
10	Prozessbegleitende Analytik	91
10.1	Biologische Aktivität des Mikrofiltrates	91
10.2	Biologische Aktivität der S-Fraktion hergestellt mit Sartobind-Membranadsorber	92
10.3	Biologische Aktivität der S-Fraktion hergestellt mit Sartobind Direct-Wickelmodul	93
10.4	Biologische Aktivität der Ultra- und Dia-Retentate aus S-Eluaten 1	94
10.5	Biologische Aktivität der Trocknungsprodukte der Dia-Retentate aus S-Eluaten 1	95
10.6	Biologische Aktivität der Q-Fraktion hergestellt mit Sartobind-Membranadsorber	96
10.7	Biologische Aktivität der Q-Fraktion hergestellt mit Sartobind Direct-Wickelmodulen	97
10.8	Biologische Aktivität der Ultra- und Dia-Retentate aus Q-Eluaten 1	97
10.9	Biologische Aktivität der Trocknungsprodukte der Dia-Retentate aus Q-Eluaten 1	98
10.10	Bestimmung der PPO-Aktivität	99
10.11	Bestimmung des Polyphenolgehalts	103
10.11.1	Prozessbilanz für Polyphenole bei Membranadsorber-Modulen	104
10.12	Zusammenfassung	106

11 Bilanzvergleich der Isolationsverfahren	108
11.1 Zyklendauer der beiden alternativen Isolierungsschritte	108
11.2 Vergleich der Bindungskapazitäten der Membranadsorber- und Sartobind Direct-Wickelmodule	110
11.3 Chemikalien-Verbrauch der beiden alternativen Isolierungsschritte ...	111
11.4 Beurteilung der beiden Isolierungsprozesse	114
12 Zusammenfassung und Ausblick	116
13 Anhang	121

1 Einleitung und Zielsetzung

Im heutigen Zeitalter der Globalisierung befindet sich die Bundesrepublik Deutschland in einer wirtschaftlich kritischen Lage. Seit je her hat die deutsche Exportindustrie eine starke Position auf den Weltmärkten für Güter hochwertiger Technologie. Dies liegt unter anderem an der überdurchschnittlich hohen Aktivität der Wirtschaft in Forschung und Entwicklung. Durch die EU-Erweiterung und dem sich sehr schnell entwickelnden asiatischen Markt wächst zunehmend der Innovationsdruck und die Notwendigkeit zum Strukturwandel. Die größten Wachstumsperspektiven bei Produktivität und Wertschöpfung versprechen Spitzentechnologien wie die Pharmaforschung und die Biotechnologie [1].

Speziell die weiße Biotechnologie hat in Deutschland eine lange Tradition und besetzt international eine Spitzenposition. Mit ihrer Hilfe können notwendige Verbesserungen der Nachhaltigkeit der industriellen Produktion ermöglicht werden. Langfristig soll außerdem die Erschließung nachwachsender Rohstoffe als erdölunabhängige Energielieferanten gewährleistet werden.

Für die biotechnologische Industrie, insbesondere im landwirtschaftlich geprägten Niedersachsen, besteht daher ein großes Potential in der Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen für die Produktion von Wertstoffen wie Proteinen und anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Insbesondere in der Reintegration von Reststoffen der landwirtschaftlichen Produktion und auch der Integration innovativer Produktions- oder Verfahrensmodule in bestehende Produktionslinien liegen Wachstumspotentiale.

Mit einer jährlichen Ernte von weltweit mehr als 300 Millionen Tonnen gehört die Kartoffel zu den wichtigsten Agrarprodukten und Grundnahrungsmitteln. Im Jahre 2006 betrug die Ernte der Bundesrepublik Deutschland 9,83 Millionen Tonnen [2]. Davon gelangen weniger als ein Viertel der gesamten Ernte in den Verzehr. Die übrigen Anteile werden als Futtermittel, Saatgut und zur Alkohol- sowie Stärkeproduktion eingesetzt [3]. Bereits die Kartoffelstärke bietet vielfältige Einsatzmöglichkeiten – Stoffveredelung, Papierherstellung und Medikamentenproduktion sind nur einige von vielen Beispielen [4].

Stärke lässt sich durch Auspressen der Kartoffelknollen gewinnen. Bei der industriellen Stärkeproduktion fällt in großen Mengen Kartoffelfruchtwasser als Nebenprodukt an. Eine traditionelle Anwendung des Fruchtwassers ist der Einsatz als Düngemittel. Auf Grund einer verminderten biologischen Aktivität des Bodens in den Wintermonaten kann das Fruchtwasser in diesem Zeitraum jedoch nicht dafür genutzt werden. Weiterhin waren bisher durch Umweltrichtlinien in der Europäischen Union, wie z.B. Abwasserentsorgungsvorschriften, der Aufarbeitung und Verwendung von Kartoffelfruchtwasser Grenzen gesetzt [5].

Kartoffelfruchtwasser besteht größtenteils aus Wasser, enthält aber darüber hinaus auch wertvolle minore Bestandteile, wie z.B. Proteine, die bislang überwiegend in denaturierter Form als Futtermittel eingesetzt werden. Gelänge es, die im Kartoffelfruchtwasser enthaltenen Proteine in nativer Form zu isolieren, so würden sich zahlreiche interessante Applikationen in der Pharmazie und Lebensmittelindustrie bieten. Als Beispiel sei hier die Anwendung von Protease-Inhibitoren als Appetitzügler genannt [6].

Die Emslandstärke GmbH arbeitet daher in Kooperation mit dem Institut für Technische Chemie der Universität Hannover und der Technischen Universität Kaiserslautern an einem membranbasierten Downstreaming-Prozess zur Gewinnung solcher nativen Proteine.

Ein großes Problem bei der Isolierung und anschließenden Wertschöpfung der Proteine ergibt sich zum Einen durch die im Kartoffelfruchtwasser enthaltenen giftigen Glykoalkaloide Solanin und Chaconin, zum anderen durch die stattfindende Bräunung durch enzymatische Umsetzung der enthaltenen Polyphenole. Während dieses Vorgangs werden sie durch die katalytische Wirkung der Polyphenoloxidasen in *ortho*-Chinone umgewandelt und bilden in einem anschließenden Polymerisationsprozess rotbraunes Melanin. Dieses besitzt nicht nur eine destruktive Wirkung auf zahlreiche Nährstoffe, sondern auch einen unangenehmen Geruch und Geschmack.

In der Dissertation von Frauke Menzel [7] wurde bereits gezeigt, dass es möglich ist, mit Hilfe von kationischen und anionischen Ionenaustauschermembranen die Kartoffelproteinklassen Patatin und Protease-Inhibitoren in hoher Reinheit zu

isolieren. Eine weitere Dissertation befasste sich mit der qualitativen und quantitativen Analyse dieser Kartoffelproteine [8]. Ziel dieser Dissertation ist es nun ein mehrstufiges Verfahren im Technikumsmaßstab zu etablieren, welches für die industrielle Produktion geeignet ist. Dazu gehört zunächst die mechanische Entfernung von groben Partikeln aus dem Kartoffelfruchtwasser durch Filtration, die zu einer Verblockung der Membranadsorber führen würden. Daraufhin soll ein effizientes Beladungs-Elutions-Programm für die Membranadsorber entwickelt werden, gefolgt von einer Aufkonzentrierung und Aufreinigung der Produkte. Als abschließende Stufe erfolgt eine Trocknung. Die Aufgaben lassen sich in folgende Prozessschritte aufteilen:

- 1. Prozessstufe: Vorklärung des Kartoffelfruchtwassers mittels Vor- und Mikrofiltration
- 2. Prozessstufe: Isolierung der Kartoffelproteine Patatin und Protease-Inhibitoren mittels Membranadsorber
- 3. Prozessstufe: Aufreinigung der Proteineluate mittels Ultra- bzw. Diafiltration
- 4. Prozessstufe: Trocknung der Fraktionen durch Sprüh- bzw. Gefrier-trocknung

Des Weiteren soll ein neues Isolierungs-Verfahren getestet werden, welches den 1. Prozessschritt überflüssig machen und den 2. ersetzen soll:

- Alternativer Prozessschritt 2b: Isolierung der Kartoffelproteine Patatin und Protease-Inhibitoren mittels einer neuartigen Bauform des Membran-adsorbers im Rezirkulations-Verfahren (Sartobind Direct-Wickelmodul) direkt aus dem Kartoffelfruchtwasser

Für die Beurteilung der Prozessführungsarten soll eine Bilanzierung des Prozesses durchgeführt werden. Dazu sollen die Aktivitäten der drei wichtigsten Proteingruppen Patatin, Protease-Inhibitoren und Polyphenoloxidasen sowie der Polyphenolgehalt in den Proben gemessen werden. Dies erfordert die Etablierung quantitativer Messverfahren für Polyphenole und Polyphenoloxidasen.

2 Die Kartoffel und ihre Inhaltsstoffe

Die vorliegende Arbeit behandelt die Gewinnung von nativen Proteinen aus Kartoffeln. In diesem Kapitel wird daher zunächst ein Überblick über die verschiedenen Inhaltsstoffe der Kartoffel gegeben. Am Beispiel des Stärkeaufarbeitungsprozesses der Emslandstärke GmbH werden die damit verbundenen Problematiken bei der Aufarbeitung im industriellen Maßstab erläutert. Ferner werden Membranfiltrationsmethoden in der Bioverfahrenstechnik vorgestellt, mit deren Hilfe es möglich ist, Inhaltsstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen zu gewinnen.

2.1 Allgemeine Fakten zur Kartoffel

Die Kartoffel (*solanum tuberosum*) wird der Familie der Nachtschattengewächse zugeordnet. Sie stammt ursprünglich aus den Hochlanden der Anden in Südamerika, wo sie bereits seit Jahrtausenden als Nutzpflanze Verwendung findet. Während die oberirdischen grünen Pflanzenteile giftig für den Menschen sind, kann die Knolle gefahrlos verzehrt werden. Sie ist es, die der Pflanze zur Vermehrung und Überwinterung verhilft [9].

Der Hauptbestandteil der Kartoffelknolle besteht, wie in Abbildung 2.1 zu sehen ist, neben Wasser aus Stärke, die der Pflanze als Energiespeicher dient. Sie wird heute in hunderten verschiedenartiger Produkte wie Verpackungsmaterial, Klebstoffen und Lebensmitteln eingesetzt [4].

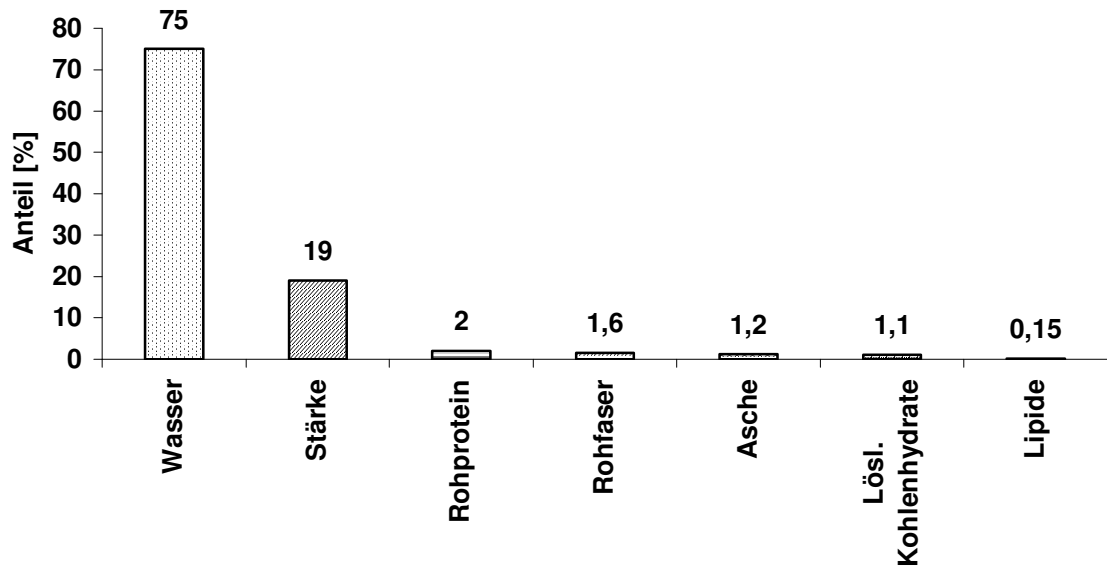


Abbildung 2.1: Inhaltsstoffe der Kartoffel [10]

Darüber hinaus enthält die Kartoffelknolle einen Proteinanteil von ca. 2 % [10]. Verbunden mit der hohen biologischen Wertigkeit von 68 % eignet dieser sich für eine industrielle Nutzung als Nahrungsergänzungsmittel, aber auch im Pharmabereich [7].

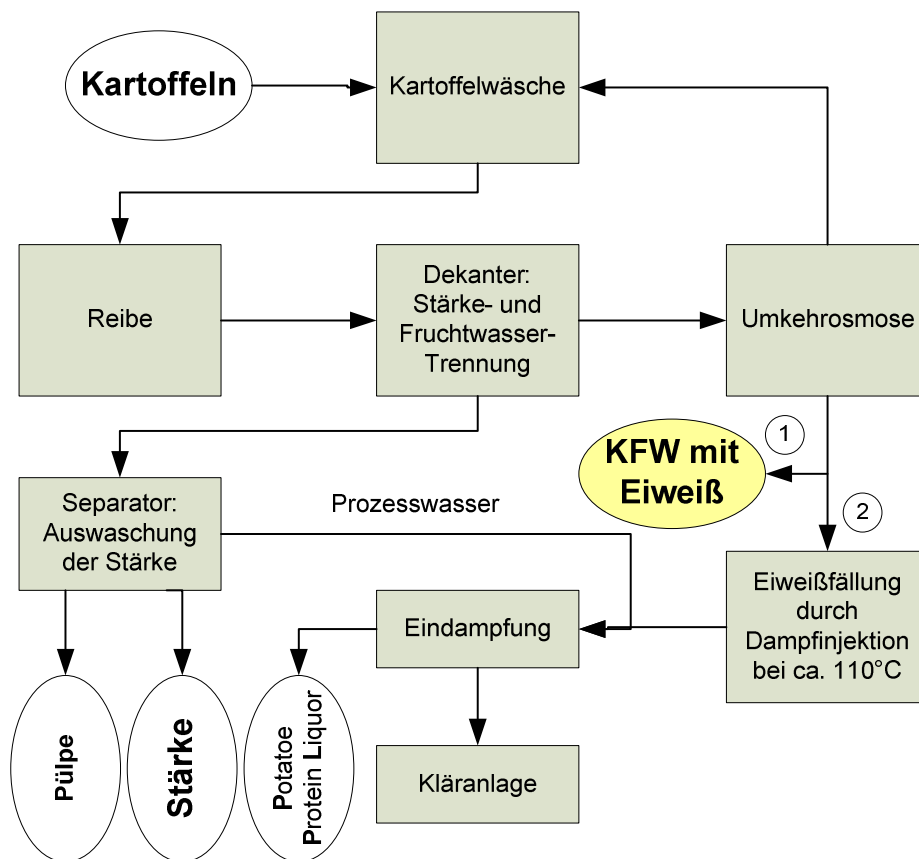
2.2 Stärke und Gewinnungsverfahren der Emslandstärke GmbH

Stärke findet Verwendung in einer Vielfalt von unterschiedlichen Produkten. So wird sie in der Lebensmittelindustrie unter anderem als Verdickungs-, Stabilisierungs- und Bindemittel eingesetzt. Aber auch in der Textil-, Papier- und Klebstoffindustrie hat sie wichtige Aufgabengebiete [4].

Die Kartoffel ist mit Weizen und Mais die wichtigste Quelle für die industrielle Stärkeproduktion. Obwohl der Stärkegehalt im Durchschnitt deutlich niedriger liegt als der von Weizen und Mais, werden in Deutschland auf Grund der hohen Erträge pro Hektar Anbaufläche mehr Kartoffeln als Getreide zur Stärkegewinnung angebaut [7].

Einer der wichtigsten Produzenten für Stärke aus Kartoffeln ist die Emslandstärke GmbH. Jährlich werden vom Unternehmen etwa 1,6 Millionen Tonnen Kartoffeln zu Stärke verarbeitet [4]. Anhand des Stärkegewinnungs-Prozesses soll der Ort der Entnahme des eiweißhaltigen Kartoffelfruchtwassers beschrieben werden, welches für die Entwicklung des Kartoffelprotein-Gewinnungsprozesses verwendet werden soll.

Wegen des hohen Wassergehaltes der Kartoffel kann die Stärke einfach durch Zerstörung der Zellwände isoliert werden. Dieser Prozess ist erheblich einfacher als die Stärkegewinnung aus Getreide. Er ist in Abbildung 2.2 dargestellt [7].



1. geplanter Proteingewinnungsprozess
2. Stand der Technik

Abbildung 2.2: Schema der industriellen Kartoffelfruchtwasser (KFW)-Gewinnung der Emslandstärke

Die Kartoffeln werden zunächst gewaschen, wobei das Waschwasser durch Sedimentation von grobem Dreck befreit wird und im Kreislauf geführt wird. Als nächstes erfolgt eine Zerkleinerung mit Sägeblatttreiben, wobei möglichst viele Zellen aufgebrochen und die Stärkekörner hinausgeschwemmt werden sollen. In einem Dekanter erfolgt nun die Abtrennung des Kartoffelfruchtwassers. Zur Verhinderung der auftretenden enzymatischen Bräunung wird es mit Natriumbisulfit versetzt, welches den Sauerstoff durch chemische Reaktion zu Sulfat bindet. Die zurückbleibende Stärke wird in einem Strahlauswäscher von den Fasern (Pülpe) getrennt, die im Anschluss zu Viehfutter verarbeitet werden. Die Stärke selbst wird gewaschen, getrocknet und veredelt [11]. Das im Dekanter abgetrennte Kartoffelfruchtwasser wird einer Umkehrosmose unterzogen, wobei das Abwasser zum Waschen der Kartoffeln benutzt wird. Danach wird das Kartoffelfruchtwasser mittels Dampfstrahlerhitzer auf ca. 110-120 °C gebracht, wobei ein großer Teil der Kartoffelproteine denaturiert und ausfällt. Das Kartoffeleiweiß wird als Viehfutter verwendet und die verbleibende Flüssigkeit mit dem Prozesswasser aus der Stärkefabrik eingedampft. Das Konzentrat wird weiterverarbeitet, während das Brüdenkondensat entsorgt wird.

2.3 Kartoffelfruchtwasser (KFW) – Abfallprodukt des Stärkeprozesses

Das beim Separieren der Stärke im Dekanter entstehende Kartoffelfruchtwasser (KFW) fällt aufgrund des verhältnismäßig geringen Anteils an Stärke gegenüber Wasser in großen Mengen bei der Stärkeherstellung an. Bis zu 80 Masseprozent der Kartoffeln werden so zu KFW [12]. Dieses enthält bedeutende Mengen von nicht erschlossenen Komponenten, wie z.B. Proteine, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Vitamine, Polyphenole und mineralische Komponenten. Eine Auflistung der Inhaltsstoffe ist in Tabelle 2.1 zu sehen.

Tabelle 2.1: Inhaltsstoffe des Kartoffelfruchtwassers [13]

Komponente	Konzentration in KFW (min-max) [g/L]	Trockenmasse [%]
Proteine	13,4 (8,5-22,2)	26,8
Peptide	2,2 (1,5-3,1)	4,4
Aminosäuren und Amide	4,8 (3,3-7,8)	9,6
andere N-haltige Komponenten	0,9	1,8
Kohlehydrate	7,9 (3,0-24,9)	15,8
Lipide	1,1	2,2
Zitronensäure	5,0 (2,0-12,0)	10,0
Ascorbinsäure	0,3 (0,1-0,6)	0,6
andere organische Säuren	1,3 (0,7-5,4)	2,6
Chlorogensäure	0,2 (0,1-0,5)	0,4
Kaffeensäure	0,07 (0,03-0,3)	0,1
Kalium	5,6 (3,9-7,3)	11,2
Phosphor	0,5 (0,2-0,9)	1,0
andere	5,0	10,1

Den Großteil der Trockenmasse des KFW bilden die Proteine mit einem Anteil von bis zu 22,2 g/L.

Mit Blick auf die Gesamtmenge des industriell anfallenden KFW ergeben sich für die Proteine z.B. in der Nahrungsmittel- oder Pharmaindustrie interessante wirtschaftliche Anwendungen. Trotz des wirtschaftlichen Potentials stellt die im KFW auftretende enzymatische Bräunung durch Polyphenoloxidasen ein entscheidendes Problem für die Nutzung in der Nahrungsmittelindustrie dar. Denn die Verbräunung wird von den Konsumenten als Indikator schlechter Qualität angesehen [14]. Ein erhebliches Problem erzeugen auch die Glycoalkaloide Chaconin und Solanin aufgrund ihrer Toxizität und ihres bitteren Geschmackes. Die im KFW enthaltenen Proteine lassen sich in mehrere Gruppen aufteilen: Patatin, Protease-Inhibitoren, Polyphenoloxidasen, Enzyme zur Stärkesynthese

und Phosphorylase-Isozyme [13]. Da die drei erstgenannten Gruppen große Bedeutung für die vorliegende Arbeit haben, werden sie in den folgenden Abschnitten näher charakterisiert.

2.4 Patatin

Eine der im KFW am stärksten vertretenen Gruppe an Proteinen ist das Patatin und seine Isoformen. Patatin ist die Bezeichnung für eine Familie von Glykoproteinen und liegt als Dimer von 80-88 kDa vor. Es zählt zu den wichtigsten Speicherproteinen in der Kartoffelknolle, ist aber auch auf Grund seiner katalytischen Wirkung bei der Bildung und Deacylierung von Lipiden von Bedeutung [7, 15]. Etwa 40 % der gelösten Kartoffelproteine sind Patatin-Isoformen [16]. Bereits in den 70er Jahren wurde das Protein isoliert und charakterisiert [17, 18]. Doch erst die Arbeitsgruppe um Racusen gab dem Protein den Namen Patatin [19]. Der Name ist abgeleitet vom spanischen Wort „patata“, welches Kartoffel bedeutet. Gewöhnlich liegt es in dimersierter Form vor, bei Behandlung mit Natriumdodekylsulfat (SDS) dissoziiert es jedoch in die Monomere [20].

Die molekulare Masse variiert bei den verschiedenen Isoformen zwischen 40-45 kDa [20-22]. Der isoelektrische Punkt liegt zwischen pH 4,5 und 5,2 [19, 21, 23, 24]. Patatin-Isoformen bestehen aus einer Sequenz von etwa 360 Aminosäuren [25].

Patatin ist ein Speicherprotein. Als solches ist es seine Hauptaufgabe als Speicher für Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff zu dienen. Dadurch ermöglicht es der Pflanze die Zeitperioden zwischen den Wachstumsphasen zu überstehen [26].

Obwohl der größte Anteil an Speicherproteinen wie Prolaminen, Albuminen oder Globulinen keine biologische Aktivität zeigt, besitzt Patatin eine Reihe davon [26]. Die ersten Studien darüber wurden von Galliard durchgeführt, der bei aus Kartoffeln aufgereinigten Proteinen eine katalytische Wirkung bei der Deacylierung verschiedener Lipidsubstrate feststellte [17]. Racusen führte diese Acyl-Hydrolase-Aktivität später auf Patatin zurück [27]. Weitere Untersuchungen zur Spezifität

wurden seitdem durchgeführt [26]. Auch eine Esterase-Aktivität gegen beispielsweise Naphthyl-Acetat- und Phenyl-Acetat-Substrate wurde festgestellt [28]. Andere Untersuchungen haben noch eine weitere hydrolytische Aktivität des Patatins als β -1,3-Glucanase aufgedeckt. Diese soll durch den Verdau von β -1,3-Glycanen in hyphalen Zellwänden eine Rolle im Verteidigungsmechanismus der Pflanze spielen [29]. Außerdem gibt es noch weitere Hinweise auf eine Rolle des Patatins im Verteidigungsmechanismus von Pflanzen [30-32].

Das native Protein hat für die Industrie vor allem gute ernährungsphysiologische Eigenschaften wegen seiner hohen biologischen Wertigkeit [33]. Aber auch im Bereich der Schaumstabilisierung wurden einige viel versprechende Versuche durchgeführt [34-37]. Als negative Eigenschaft des Patatins sollte allerdings der Verdacht auf Auslösung von allergischen Reaktionen bei Einnahme oder Berührung von rohen Kartoffeln erwähnt werden [38-41].

2.5 Protease-Inhibitoren

Protease-Inhibitoren machen einen weiteren Hauptbestandteil der in den Kartoffeln enthaltenen Proteine aus. Sie sind eine sehr vielfältige Proteinklasse, die sich in sieben Familien gliedert. Diese sind im Einzelnen in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Protease-Inhibitoren im Kartoffelfruchtwasser [13]

Gruppe	Molmasse [kDa]	pI-Wert	Anteil am löslichen Protein [%]	Inhibierende Aktivität auf Chymotrypsin/ Trypsin [%]
Protease-Inhibitor I (PI 1)	7,8	5,1-7,8	4,5	19/2
Protease-Inhibitor II (PI 2)	10,2 (Dimer 20,4)	5,5-6,9	22	82/50
Potatoe-Cystein-Protease-Inhibitor (PCPI)	20,1- 22,8	5,8- 9	12	16/10 (auch gegen Papain)
Kunitz-Protease-Inhibitor (PKPI)	20,2	8-9	4	2/3
Carboxypeptidasen (PCI)	4,3	k.D.	1	---
Serin-Protease-Inhibitoren (OSPI)	21,0 und 21,8; 12,3	7,5- 8,8	1,5	2/3
Potatoe-Aspartyl-Protease-Inhibitoren (PAPI)	19,9- 22	6,2- 8,7	6	9/2 (auch gegen Cathepsin D)
Protease-Inhibitoren gesamt	3-23	5-9	50	k.D.

k.D. – keine Daten

Da die Gruppe der Inhibitoren sehr vielfältig ist, können wenig allgemeine Aussagen zur Funktionsweise getroffen werden. Ihr Molekulargewicht liegt je nach Klasse bei 3 – 23 kDa und ihr isoelektrischer Punkt (pI) kann zwischen 5 und 9 variieren. Protease-Inhibitoren sind im Allgemeinen reich an Cystein und sehr hitzebeständig. Ihre Funktion besteht darin, Proteasen (Peptidhydrolasen *E.C. 3.4*) zu inhibieren. Proteasen sind Enzyme, deren Aufgabe es ist, die Hydrolyse einer Peptidbindung zu katalysieren [42]. Typische Vertreter sind Trypsin und Chymotrypsin. Einige Protease-Inhibitoren sind in der Lage spezifisch entweder Serin- oder Cystein-Proteasen zu inhibieren, andere wirken auf beide ein. Basisch pankreatische Trypsin-Inhibitoren wie der Kunitz-Inhibitor binden beispielsweise an die Substratbindungsstelle des Proteins und blockieren es so reversibel [42-49].

Protease-Inhibitoren sind am Verteidigungsmechanismus der Pflanze beteiligt, indem sie den Stoffwechsel von Schädlingen stören [50, 51]. Da Protease-Inhibitoren bei Menschen antikarzinogene Wirkung zeigen, werden sie bereits medizinisch bei der Bekämpfung von Hautkrebs eingesetzt [5]. Ebenso gibt es Anwendungen bei der Behandlung von Diabetes II [52]. Aber auch in der Nahrungsmittelindustrie werden sie bereits erfolgreich als Appetitzügler vermarktet [53].

2.6 Polyphenoloxidasen

Polyphenoloxidase ist ein Oberbegriff für Enzyme, die in der Lage sind, die Oxidation von Polyphenolen zu ortho-Chinonen zu katalysieren. Polyphenoloxidasen sind dadurch ein entscheidender Faktor für Bräunungsreaktionen in Früchten und Gemüse. Zwei der wichtigsten Polyphenoloxidasen sind Tyrosinase und Laccase.

2.6.1 Tyrosinase

Tyrosinase (PPO, *E.C. 1.14.18.1*) ist ein kupferhaltiges Enzym, welches bei Mikroorganismen, Pflanzen und Gemüse weit verbreitet ist. Das aktive Zentrum von Tyrosinase besteht aus zwei Kupfer-Atomen. Es kann in drei verschiedenen Übergangszuständen auftreten. Bei der deoxy-Tyrosinase handelt es sich um die reduzierte Form des Enzyms mit zwei Cu^+ -Ionen im aktiven Zentrum. met-Tyrosinase beschreibt den oxidierten, über eine Hydroxy-Gruppe gebundenen Zustand mit zwei Cu^{2+} -Ionen und bei der oxy-Tyrosinase sind beide Cu^{2+} -Ionen über eine Peroxidgruppe verbunden.

Alle drei Stadien sind Teil des in Abbildung 2.3 illustrierten, katalytischen Zyklus, in dem sowohl Monophenole als ortho-Diphenole umgesetzt werden [54, 55].

Diphenolischer Zyklus:

Der Zyklus wird durch Reaktion der oxy-PPO-Form mit einem Dinophenol initiiert. Durch einen axialen nucleophilen Angriff der diphenolischen Hydroxy-Gruppen auf beide Kupferkerne des aktiven Zentrums bildet sich das oxy-D Intermediat, welches nach Freisetzung eines ortho-Chinons in die met-Form übergeht. Durch Rekombination mit einem Diphenol entsteht met-D-PPO, das analog dem monophenolischen Zyklus weiterreagiert.

2.6.2 Laccase

Das Enzym Laccase (*E.C. 1.10.3.2*) unterscheidet sich von der Tyrosinase hauptsächlich durch einige molekulare Eigenschaften, eine andere Reaktion auf Inhibitoren und durch die Möglichkeit, sowohl ortho-, als auch para-Diphenole zu oxidieren. Laccase konnte bisher nur in höheren Pflanzenarten, wie z.B. Trauben, Pfirsichen, Pilzen und Mangos nachgewiesen werden [55]. Im Gegensatz zu Tyrosinase wirkt Laccase weniger substratspezifisch und katalysiert neben der Oxidation von Polyphenolen auch die Oxidation von substituierten Polyphenolen und aromatischen Aminen. Monophenole werden durch Laccase nicht umgesetzt.

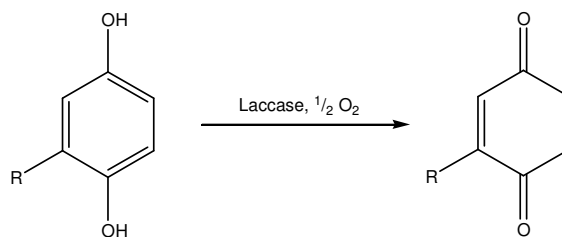


Abbildung 2.4: Wirkungsweise der Laccase

2.6.3 Polyphenole

Bei Polyphenolen handelt es sich um eine große Gruppe strukturverwandter und in der Natur weit verbreiteter Verbindungen. Sie sind Bestandteile vieler natürlicher Produkte wie z.B. Früchte und Gemüse und sind dabei von Bedeutung

für deren Geruch und Farbgebung. Polyphenole wirken vornehmlich als Antioxidationsmittel. Die grundlegende Gemeinsamkeit aller Polyphenole ist das Vorhandensein von einer oder mehr Hydroxy-Gruppen an einem aromatischen Ring. Polyphenole lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: Flavonoide und Phenolsäuren.

Bei den Flavonoiden handelt es sich um Derivate der Benzo- γ -Pyrone und sie bestehen aus mehreren Hydroxygruppen, die an eine Ringstruktur der Form $C_6-C_3-C_6$ gebunden sind. Sie lassen sich in weitere Subklassen unterteilen: Flavonole, Flavone, Isoflavone und Flavanole (z.B. Catechin).

Die Phenolsäuren bestehen aus zwei weiteren Untergruppen: den Hydroxybenzoesäure-Derivaten (z.B. Gallussäure) und den Derivaten der Hydroxyzimtsäure (z.B. Kaffeesäure und Chlorogensäure) [57]. Einige Beispiele sind in Abbildung 2.5 wiedergegeben.

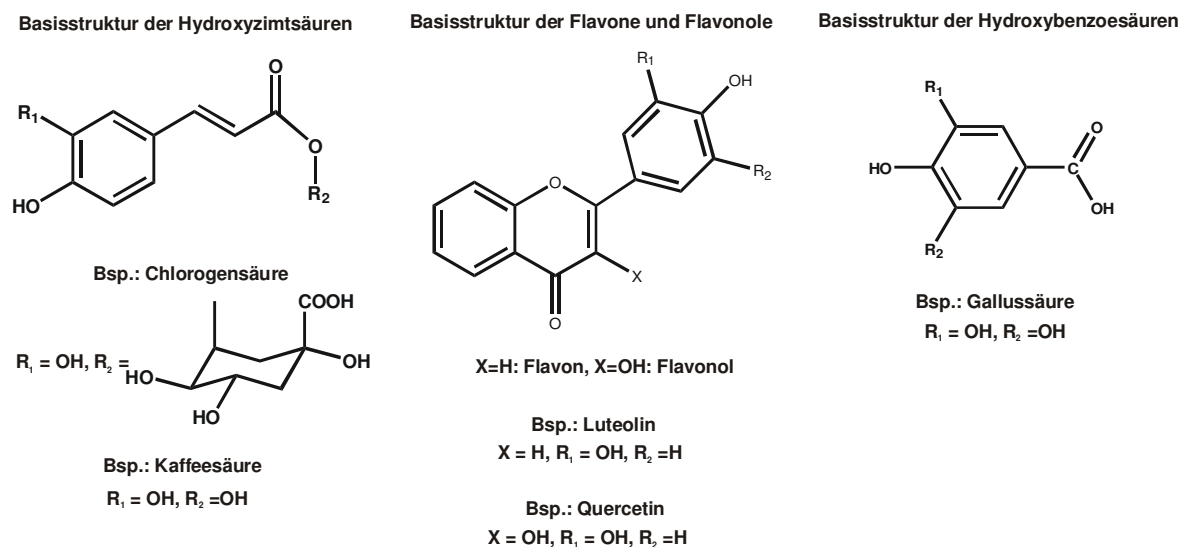


Abbildung 2.5: Basisstrukturen der Polyphenole

In der Kartoffel lassen sich die meisten Polyphenole im Stamm und der Schale finden. Matheis und Belitz untersuchten 1977 zehn verschiedene Kartoffelsorten hinsichtlich ihres Polyphenolgehalts [58] und konnten in allen Sorten das Vorhandensein von Tyrosin, Chlorogensäure, Kaffeesäure, Scopoletin und Äsculin nachweisen.

Die Aminosäure Tyrosin hat mit 0,1-0,3 % des Trockengewichts einer Kartoffel den größten Anteil an phenolischen Verbindungen. Die zweithöchste Konzentration weist Chlorogensäure mit 0,025–0,15 % des Trockengewichts einer Kartoffel auf [59].

2.7 Glykoalkaloide

Eine große Problematik bei der Verwertung des KFWs stellen die Glykoalkaloide dar. Sie bestehen aus einem Steroid-Alkaloid-Gerüst, an dem an der β -ständigen Hydroxy-Funktion in 3-Stellung Tri- oder Tetrasaccharide glycolisiert sind. Daher auch die Bezeichnung Steroid-Alkaloid-Glycoside [60]. In der Kartoffel gibt es etwa 90 verschiedene Alkaloide. α -Solanin und α -Chaconin sind die wichtigsten Vertreter. Sie sind in Abbildung 2.6 dargestellt.

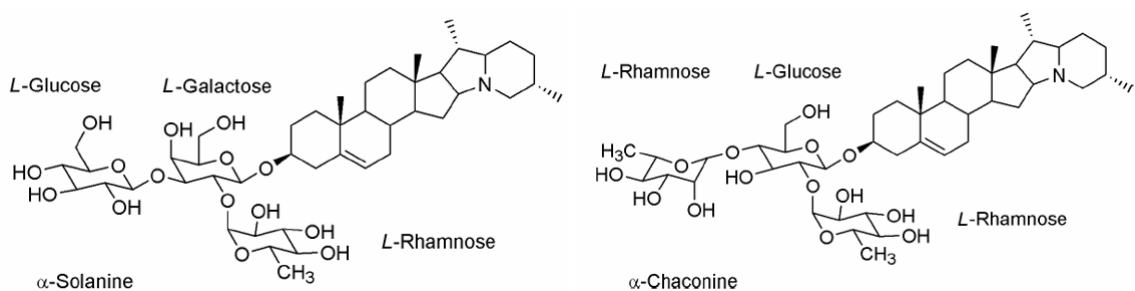


Abbildung 2.6: Strukturformeln der Glykoalkaloide α -Solanin und α -Chaconin [61]

Sie machen etwa 95 % des gesamten Glykoalkaloid-Gehaltes der Kartoffel aus. Glykoalkaloide dienen in den Früchten der Nachtschattengewächse zum Schutz vor Fressfeinden und Schädlingen wie z.B. Insekten, Bakterien und Pilzen [62]. Dies geschieht durch ihre hohe toxische Wirkung. Bei Menschen führt eine orale Dosis von 1-5 mg/kg Körpergewicht zu geringfügigen bis schweren Toxizitätserscheinungen, 3-6 mg/kg Körpergewicht können bereits letal wirken [63]. Die höchsten Glykoalkaloid-Konzentrationen sind in den Teilen der Pflanze mit starkem Stoffwechsel enthalten wie Blüten, Blättern und Keimen [63-65]. Im Fleisch, also der geschälten Kartoffel, befinden sich etwa 12-110 ppm, in der Haut,

der Schale der Kartoffel dagegen 13-1068 ppm. Der Gehalt wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zu ihnen gehören Vererbung, Reifegrad, Witterung, Licht, Temperatur, Feuchtigkeit, sowie mechanische Verletzungen [66-68]. Bei der Einführung der Kartoffel in Europa kam es häufig vor, dass die Menschen nicht die Knollen, die in der Erde wuchsen, verzehrten, sondern versehentlich die Beeren aßen und sich dabei schwere Vergiftungen zuzogen. Dadurch dauerte es bis ins 18. Jahrhundert bis sich die Kartoffel durch den „Kartoffelbefehl“ Friedrich des Großen in Deutschland etablierte [69].

3 Stand der Technik - Gewinnung von Kartoffelproteinen aus Kartoffelfruchtwasser (KFW)

Die Aufreinigung von Kartoffelproteinen aus Kartoffelfruchtwasser (KFW) stellte in den letzten Jahrzehnten eine große Herausforderung an die Technik dar. Die Verbräunung durch enthaltene Polyphenoloxidasen und ein hoher Gehalt an gesundheitsschädlichen Glycoalkaloiden machten die Aufarbeitung sehr aufwändig. Obwohl es im Labormaßstab durchaus möglich ist, Kartoffelproteine z.B. chromatographisch zu isolieren, stellte der wirtschaftliche Scaleup dieser Methoden bisher ein großes Hindernis für die Industrie dar. Aus diesem Grunde wurde auch versucht, für das KFW selbst Anwendungsbereiche zu finden, z.B. als Dünger [70].

Eine der ersten Methoden zur Gewinnung von Proteinen aus KFW war die von Strolle vorgestellte Dampfinjektions-Koagulation [71]. Mit ihrer Hilfe ist es mit nur einem Schritt möglich, nahezu alle Proteine aus dem Fruchtwasser zu entfernen. Weitere Versuche die Proteine durch thermische oder pH-Änderungen zu gewinnen, wurden in den letzten Jahrzehnten durchgeführt [72, 73]. Der große Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Proteine dadurch ihre biologischen Aktivitäten und Eigenschaften verlieren, so dass sie kommerziell nur von geringem Wert sind. Eine Ausnahme bildet hier ein schonendes thermisches Verfahren, welches die hitzestabilen Protease-Inhibitoren nicht denaturiert. Diese können anschließend über Filtration aus dem KFW gewonnen werden [74-79].

Eine andere Forschungsgruppe versuchte mit Hilfe filtrativer Techniken wie Ultrafiltration und Umkehrosmose eine Proteinabtrennung zu erreichen [80]. Die Beschaffenheit des KFWs mit einem sehr hohen Feststoffanteil verursacht dabei jedoch einen sehr hohen Kostenaufwand.

Die adsorptive Blasentrennmethode ist eine weitere interessante Technik zur Proteingewinnung. Dabei werden polare und unpolare Substanzen wie Proteine aus wässrigen Lösungen durch Zerschäumung abgetrennt [81, 82]. Dieses

Verfahren hat sich jedoch aufgrund geringer Selektivität bisher nicht durchsetzen können.

Eine ebenso interessante neue Methode ist die Verwendung magnetischer Partikel zur Proteinabtrennung. Sie wurde bisher aber bei Kartoffeln nur für die untergeordnete Proteingruppe der Lectine angewandt [83].

Die vielversprechendste Proteingewinnungsmethode ist vermutlich die Chromatographie. Deshalb werden auf diesem Gebiet viele unterschiedliche Verfahren und Materialien getestet, darunter Bed adsorption oder auch Bentonite [84-86].

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung von Membranverfahren, die bei der Aufarbeitung von proteinhaltigen Rohstoffen immer häufiger Verwendung finden. So werden sie bei der Aufreinigung von Rohrzucker, sowie Molke und Molkeprodukten eingesetzt [85]. Vor allem bei der Aufarbeitung von Fermentationsbrühen haben sie eine große Bandbreite von Einsatzmöglichkeiten beginnend bei der Zellabtrennung, über die Aufkonzentrierung des Produktes bis hin zur abschließenden Feinreinigung.

Folgende Vorteile ergeben sich durch die Nutzung von Membranen [86]:

- Leichtes Upscaling
- Milde Reaktionsbedingungen
- Einfache Handhabung
- Geringer Energieaufwand
-

Dagegen bestehen folgende Nachteile:

- Geringe Selektivität
- Geringe Lebensdauer der Membran
- Membranfouling (Partikelablagerungen an oder in den Poren der Membran)

Die verschiedenen Einsatzmöglichkeiten der Membranverfahren sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Die einzelnen Filtrationssysteme und -methoden werden im nächsten Kapitel erläutert.

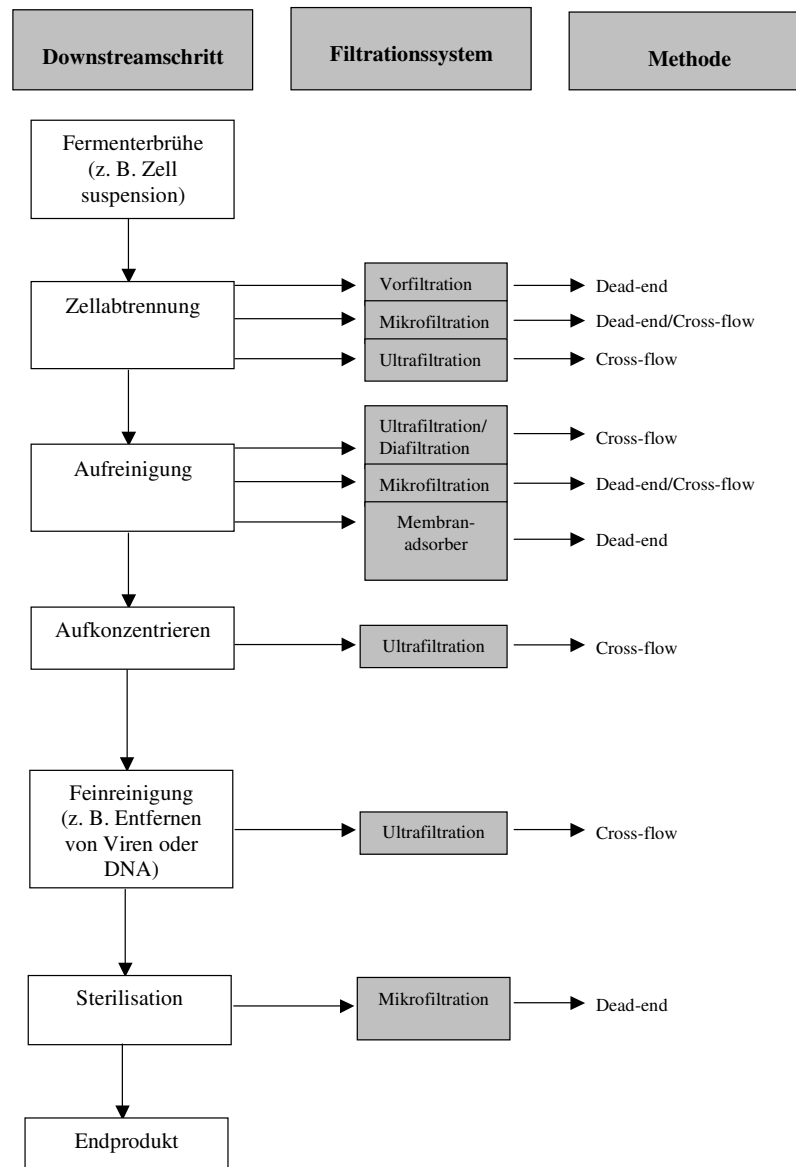


Abbildung 3.1: Anwendungsgebiete von Membranverfahren [87]

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten KFW ist das angestrebte Ziel die Gewinnung von möglichst reinen Proteinfractionen. Der Prozess soll im Technikumsmaßstab laufen und für die großtechnische Produktion upscalebar sein. Um ein wirtschaftliches Verfahren zu konzipieren, ist es notwendig die erforderliche Anzahl an Prozessschritten zu minimieren als auch die einzelnen Schritte zu optimieren.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Aufreinigung des KFW über Ionenaustausch-Chromatographie mittels Membranadsorbentien. Dieser Prozessschritt wurde bereits

erfolgreich im Labor-Maßstab eingesetzt und soll nun in den Technikumsmaßstab übertragen werden. Dazu muss vor dem Isolierungsschritt (capture step) das proteinhaltige Medium einer Mikrofiltration unterzogen werden, so dass es beim Durchlaufen der Membranadsorber nicht zu Verblockungen kommt. Das KFW enthält einen hohen Feststoffanteil an Stärke und Zellabfällen, sowie denaturierten Proteinen. Deshalb muss zunächst eine grobe Vorklärung vor der Mikrofiltration durchgeführt werden. Da das Medium wie zuvor erwähnt zwei große Proteinfractionen enthält, werden Membranadsorber mit unterschiedlichen Eigenschaften eingesetzt (Q-Typ und S-Typ), um die Fraktionen zu trennen. Die jeweiligen Q- und S-Fractionen werden anschließend getrennt, durch Ultrafiltration aufkonzentriert und dabei von unerwünschten kleinen Proteinbestandteilen befreit. Die Feinreinigung erfolgt zuletzt durch Diafiltration, bei der die große Salzfracht entfernt wird. Die aufgereinigten Protein-Produkte Patatin und Protease-Inhibitoren werden abschließend durch Trocknung konfektioniert. Das Prozess-Schema ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Neben den herkömmlichen Ionenaustausch-Membranadsorbern im Dead-end-Modus stellt die Sartorius AG auch Membranmodule her, die im Crossflow-Betrieb arbeiten, sogenannte Sartobind Direct-Wickelmodule. Diese haben den Vorteil, dass das Medium gar nicht oder nur minimal vorbehandelt werden muss, um aufgegeben werden zu können. Die Vorklärung und Mikrofiltration entfallen im Prozessschema. Der Membranadsorber wird durch das Sartobind Direct-Wickelmodul ersetzt (Abbildung 3.3).

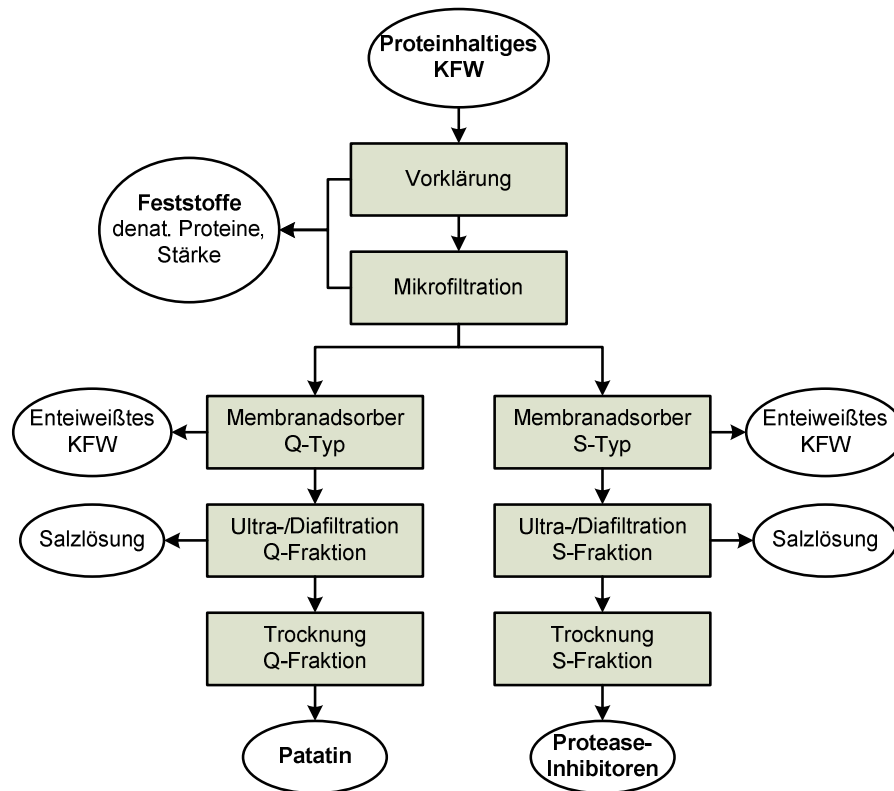


Abbildung 3.2: Prozessschema für die Gewinnung von Proteinfractionen aus KFW mit Hilfe von Membranadsorbern

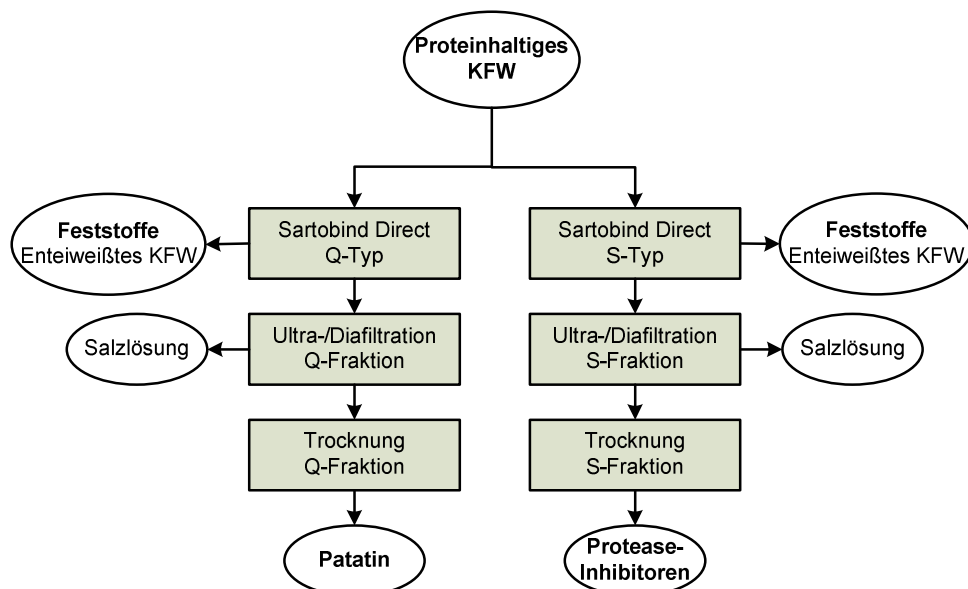


Abbildung 3.3: Alternatives Prozessschema für die Gewinnung von Proteinfractionen aus KFW mit Hilfe von Sartobind Direct-Wickelmodulen

4 Membranfiltration

Neben den klassischen Trennverfahren wie Destillation, Extraktion und Adsorption hat sich die Membranfiltration in den letzten Jahrzehnten zu einem etablierten Trennverfahren entwickelt. Besonders in der Bioverfahrenstechnik wurde sie zu einer bewährten Trennmethode, da sie im Prinzip in allen fluiden Medien einsetzbar ist. In diesem Kapitel werden die Eigenschaften der Membranen näher beschrieben, insbesondere hinsichtlich der filtrationshemmenden Deckschichtbildung. Außerdem werden die Grundlagen der Filtration sowie Verfahren und Betriebsarten von Membranfiltrationen erläutert.

4.1 Grundlagen der Filtration

Eine Filtration ist eine druckgetriebene Methode, die gelöste oder suspendierte Teilchen nach ihrer Größe trennt. Dabei wird ein spezielles Material verwendet, welches die Eigenschaft hat, selektiv Teilchen beim Passieren zurückzuhalten. Für die Filtration von biotechnologischen Komponenten, wie z.B. Zellen und Proteinlösungen, werden abhängig vom vorgegebenen Ziel unterschiedliche Materialien verwendet. Zu den wichtigsten Materialien gehören Metalle, Keramiken und Polymere [88]. Hauptkriterien für geeignete Filtermaterialien sind, neben hoher Filtrationsraten, das Foulingpotential und die Langlebigkeit. In dieser Arbeit wurde das Anwendungspotential von Polymer-Membranen am Beispiel der Aufarbeitung von KFW untersucht. Die Trennung von Teilchen mittels Polymer-Membranen wird Membranfiltration genannt.

Die Membranfilter werden entsprechend ihrer Porengröße in vier Gruppen eingeteilt. Bei Verwendung von Membranen mit einer Porengröße von $10-0,02 \mu\text{m}$ spricht man von Mikro-, zwischen $0,02 \mu\text{m}-1 \text{ nm}$ von Ultra- und zwischen $1-0,1 \text{ nm}$ von Nanofiltration. Werden noch kleinere Porengrößen verwendet, handelt es sich um Umkehrosmose. Sie wird vornehmlich in der Wasseraufbereitung eingesetzt

[89]. In Abbildung 4.1 sind die unterschiedlichen Porengrößen mit den herausgefilterten Materialien abgebildet.

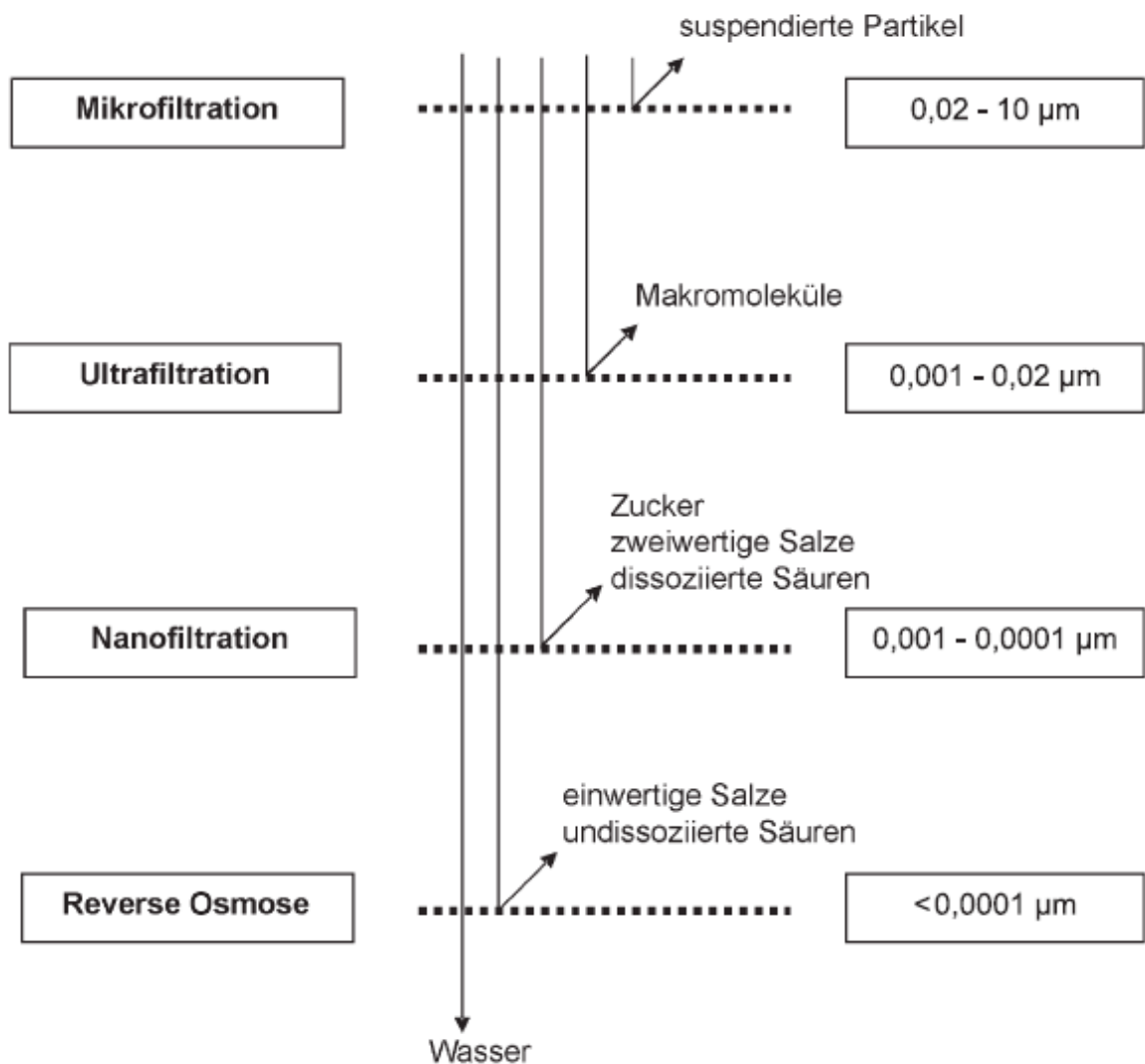


Abbildung 4.1: Porengröße und herausgefilterte Materialien bei der Crossflow-Filtration [89]

Ein für die Filtration von biologischen Lösungen wichtiger Grenzwert sind 0,2 µm, unterhalb dessen steril filtriert wird.

Membranenfilter werden in den unterschiedlichsten Bauweisen gefertigt. Die vier wichtigsten Filtermodultypen sind Hohlfaser-, Wickel-, Platten- und Rohrmodule (Abbildung 4.2)

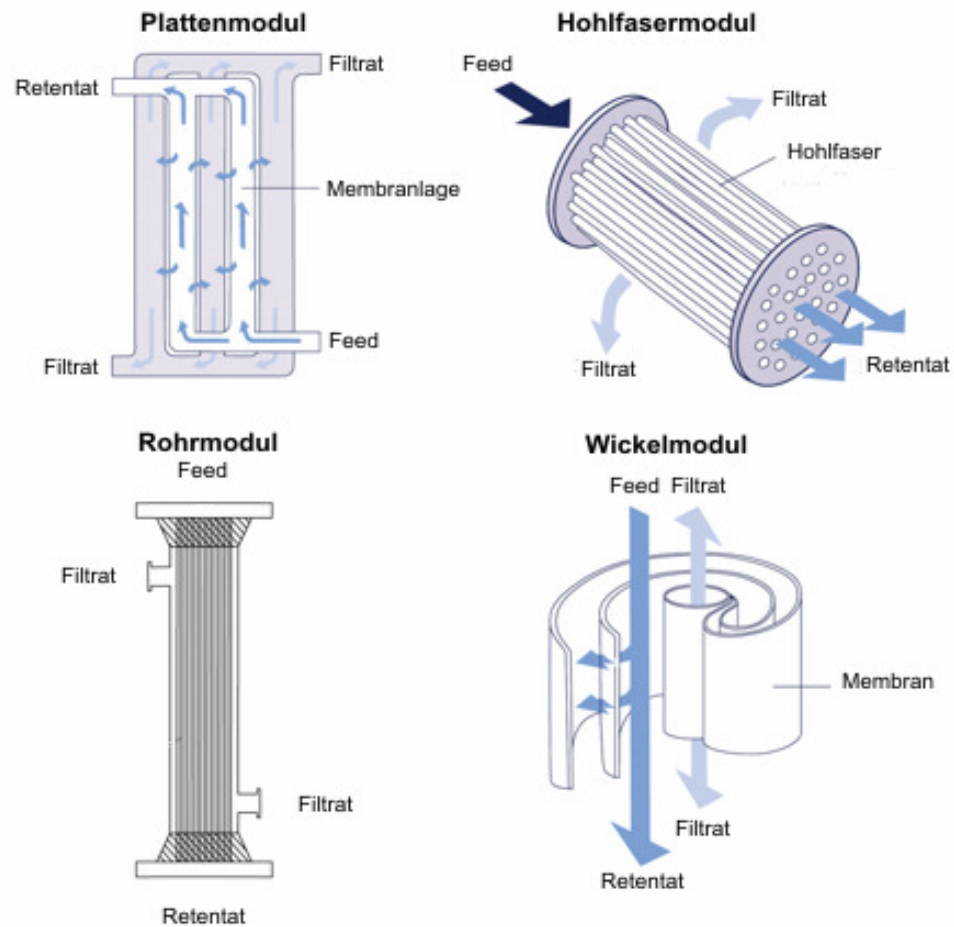


Abbildung 4.2: Die wichtigsten Filtermodultypen - Hohlfaser-, Wickel-, Platten- und Rohrmodul [90, 91]

Vorteile von Plattenmodulen sind eine höhere Packungsdichte gegenüber dem Rohrmodul, geringerer Volumenbedarf und die Möglichkeit, unkompliziert einzelne Membranen (nicht bei Kassetten) oder Module (bei Mehrfachschaltung) ersetzen zu können. Außerdem sind die Reinigung und Vergrößerung des Prozessmaßstabes sehr leicht möglich. Nachteilig sind die Neigung zu verschmutzen und der relativ hohe interne Druckverlust. Plattenmodule werden gewöhnlich in der Umkehrosmose, Ultrafiltration, Pervaporation und in Elektrodialysezellen eingesetzt [92]. Aber auch für die Mikrofiltration werden sie unter anderem von der Sartorius AG vertrieben [93].

Neben der Bauart hat auch das Baumaterial großen Einfluss auf die Filtration. Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Materialien für Membranen wie Polypropylen,

Polysulfon, Polyethersulfon sowie Cellulosederivate [94]. Jedes Material hat unterschiedliche Vor- und Nachteile und wird dem Verwendungszweck entsprechend ausgewählt. Darüber hinaus werden die Membranen auf unterschiedliche Weise hergestellt und besitzen dadurch verschiedene symmetrische und asymmetrische Strukturen wie Abbildung 4.3 in zu sehen ist.

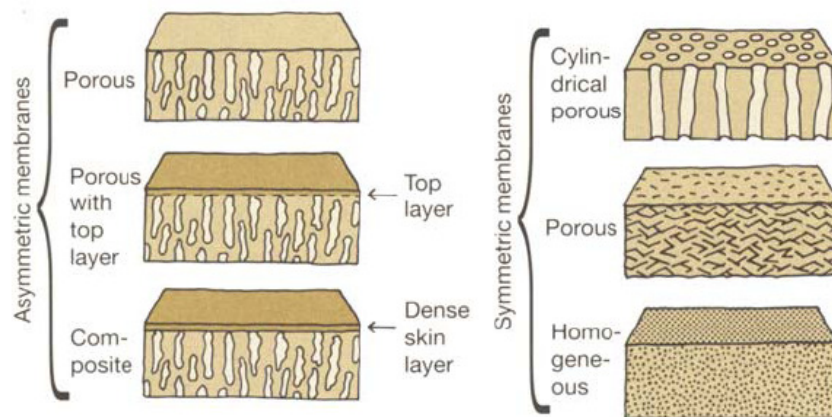


Abbildung 4.3: Symmetrische und asymmetrische Membranen [95]

Es gibt grundsätzlich zwei Flussrichtungen, in denen die zu trennenden Stoffe auf den Filter aufgegeben werden können, axial und tangential. Bei einem axialen Auftrag der Lösung (feed) bildet sich ein Filterkuchen aus nichtlöslichen Stoffen auf der Membran, der mit der Zeit zu einer Verringerung der Filtrationsleistung und zur Verblockung des Filters führen kann. Die Lösung, die den Filter passiert, wird Filtrat (Permeat) genannt, die am Schluss der Filtration auf der Auftrags-Seite zurückgebliebene Lösung Konzentrat (Retentat). Da bei dieser Methode der gesamte Flüssigkeitsstrom einmal durch den Filter fließt, spricht man auch von Dead-end-Modus. Beim tangentialen Fluss dagegen strömt der Feed an der Membran vorbei. Dadurch trägt er dazu bei, dass ein großer Teil der sich permanent bildenden Deckschicht immer wieder abgetragen wird [85]. Nach einer gewissen Einlaufphase, während der die Filtrationsleistung fällt, stellt sich durch diese reversible Deckschichtbildung ein Gleichgewicht zwischen Abtragung und Ablagerung der Teilchen ein (stationäre Phase). Die Filtrationsleistung bleibt nun

konstant. In Abbildung 4.4 ist der Unterschied zwischen den beiden Modellen dargestellt.

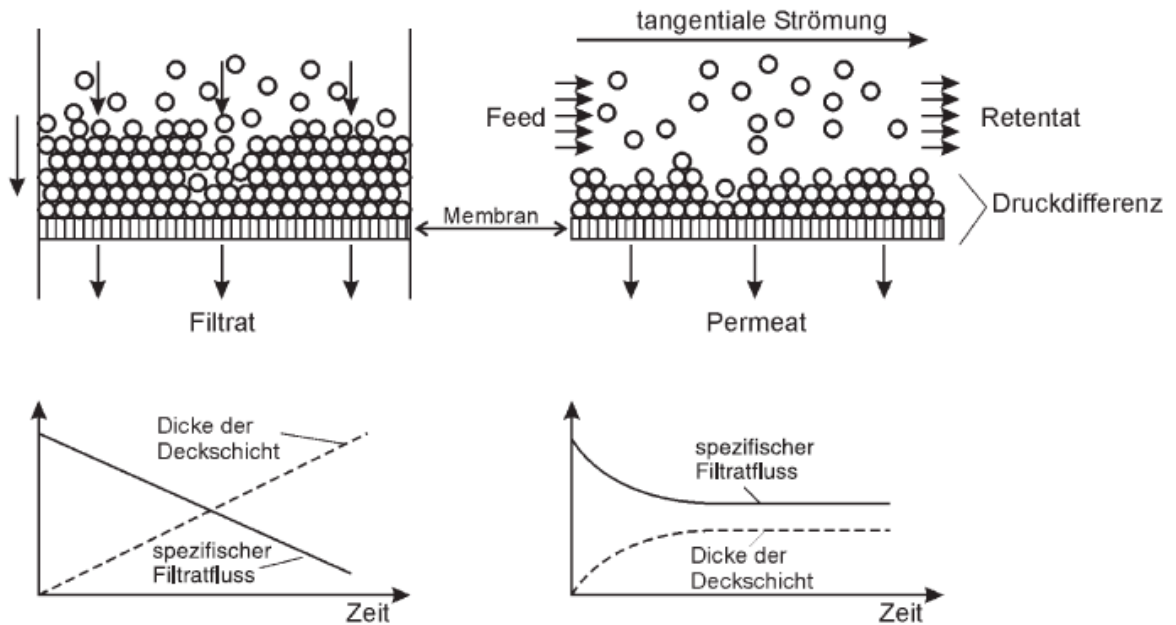


Abbildung 4.4: Deckschichtbildungsmodelle - Dead-end und Crossflow [87]

In der Biotechnologie wird gewöhnlich der Crossflow-Betrieb gewählt. Für den hier beschriebenen Prozess wurde er ebenfalls verwendet.

4.2 Filtrationsleistung

Der Filtratvolumenstrom, d.h. die Geschwindigkeit mit der das Filtrat die Membran passiert, ist ein Maß für die Filtrationsleistung. Er wird gewöhnlich auf die verwendete Filterfläche F bezogen. So ergibt sich die Filtratflussrate \dot{V}_{Per} , auch Flächenbelastung genannt [96].

$$\text{Filtratflussrate} \quad \dot{V}_{Per} = (V_{Per} / t) / F \quad (4-1)$$

t = Zeit, V_{Per} = Permeatvolumen

Das Rückhaltevermögen R ist das prozentuale Verhältnis der Konzentrationen des Filtrates $c_{Filtrat}$ und des Zulaufs (Retentats) c_{Zulauf} und beschreibt damit den Anteil der Wasserinhaltsstoffe, die auf der Zulaufseite verbleiben.

$$\text{Rückhaltevermögen} \quad R = \left(1 - \frac{c_{Filtrat}}{c_{Zulauf}}\right) \cdot 100 \% \quad (4-2)$$

Zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit einer Membran wird außerdem die Permeabilität A benötigt. Sie ist das Verhältnis von Filtratflussrate \dot{V}_{Per} und der Druckdifferenz vor und hinter der Membran Δp .

$$\text{Permeabilität} \quad A = \dot{V}_{Per} / \Delta p \quad (4-3)$$

Die Vorhersage der Filtrationsleistung eines Membranmoduls im Crossflow-Betrieb ist aufgrund vieler zu berücksichtigender Parameter äußerst schwierig. Dies liegt vor allem an den komplexen Wechselwirkungen von Filtrationsmedium und Membran. Es gibt zahlreiche Modellansätze zu diesem Thema, die immer nur eingeschränkte Wirksamkeit besitzen. Allgemein beruhen die Modelle auf diffusen und hydrodynamischen Effekten. Je nach Partikel- bzw. Molekülgröße tritt einer der beiden Effekte mehr ins Gewicht.

4.3 Deckschichtbildungsmodelle

Die Verringerung der Filtrationsleistung im Crossflow-Betrieb durch Deckschichtbildung ist ein seit langem bestehendes Problem der Industrie. In der Regel wird die Bildung der Deckschicht von Zellrückständen verursacht, die die Poren verstopfen, oder von Proteinen, die an der Oberfläche von vollständig retentiven Membranen adsorbieren. Ein dadurch entstehendes Problem ist neben der verringerten Filtrationsleistung auch die veränderte Ausschlussgrenze (Cut-Off)

der sich bildenden Sekundärmembran. Es gibt zahlreiche Abhandlungen über das Thema Deckschichtbildung [97-100].

4.3.1 Diffusionsmodelle

Einige Feed-Komponenten, die konvektiv an der Membran entlang transportiert werden, können, aufgrund des Rückhaltevermögens der Membran, diese nicht passieren. An der Membran kommt es deshalb zu einer Erhöhung der Konzentration dieser Stoffe. Man spricht auch von Konzentrationspolarisation. Ein Anstieg der Konzentration über die Löslichkeitsgrenze führt zur Bildung einer dünnen Deckschicht auf der Membran [92, 100]. Das sich aufbauende Konzentrationsprofil an der Membran ist die Triebkraft für den diffusiven Rücktransport der Stoffe von der Membran in die Kernströmung und kann durch die Diffusionsgesetze beschrieben werden.

4.3.2 Hydrodynamische Modelle

Ein anderer Ansatz zur Beschreibung des Deckschichtphänomens wird bei den hydrodynamischen Modellen gewählt. Bei gelösten Teilchen, die eine Größe von etwa $0,1 \mu\text{m}$ überschreiten, also bei Mikrofiltrationen, treten die Diffusionseffekte mehr und mehr in den Hintergrund. Stattdessen spielen nun aus der Überströmung resultierende Kräfte eine Rolle, die parallel zur Membran verlaufen. Diese sind verantwortlich für den Rücktransport der von der Membran zurückgehaltenen Stoffe in die Hauptfeedströmung [92]. Nach dem Ablagerungsmodell lagert sich ein Teilchen nur dann an der Membran an, wenn die aus der Strömung resultierende Kraft auf das Teilchen kleiner ist als die ihr entgegenwirkende Reibungskraft F_R . Dieses Modell setzt parallel zur Membranwandung herrschende Kräfte voraus, das heißt eine laminare Strömung. Je mehr der Teilchenschwerpunkt von der Wand entfernt ist, desto mehr wirken turbulente Kräfte auf das Teilchen ein. Die in der Realität beobachteten Werte zeigen, dass

das Modell am besten unter der Annahme sowohl laminarer als auch turbulenter Strömungen funktioniert.

In Abbildung 4.5 sind die Auswirkungen der beiden Modelle in Abhängigkeit von der Porengröße dargestellt.

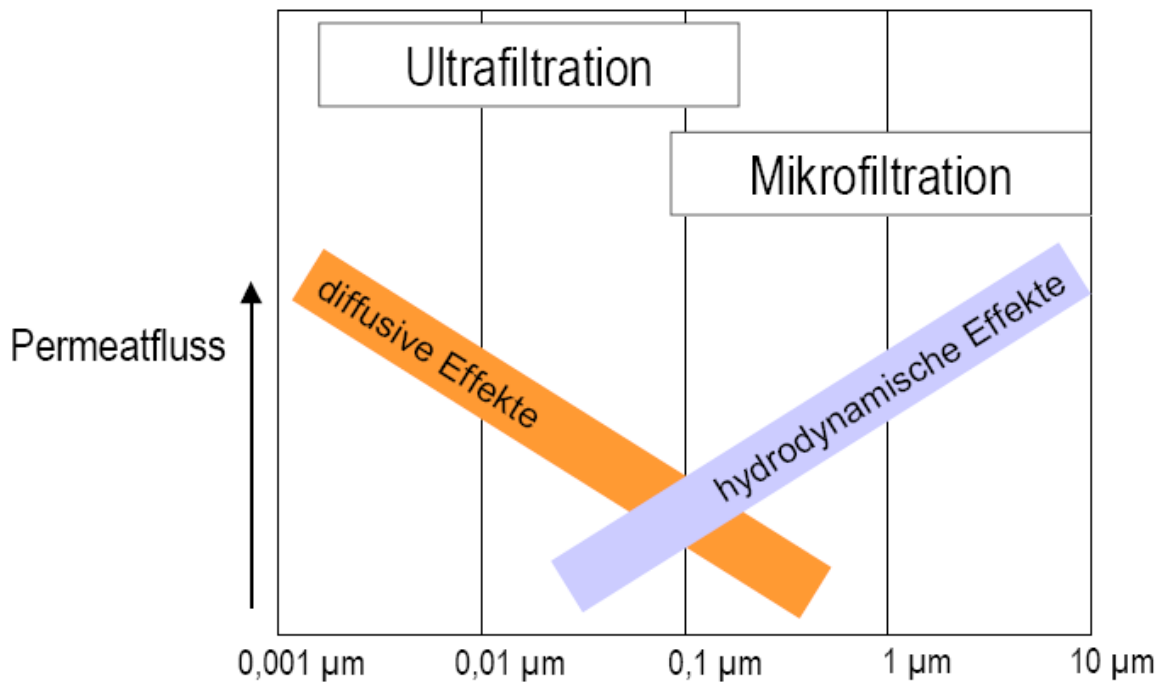


Abbildung 4.5: Auswirkung diffuser und hydrodynamischer Effekte auf den Permeatfluss in Abhängigkeit von der Porengröße [92]

4.4 Reinigung von Filtermodulen

Durch die, während der Crossflow-Betriebes entstehende, Deckschichtbildung wird eine anschließende Reinigung der Module notwendig. Die verschiedenen Modultypen und ihre Membranmaterialien zeichnen sich durch die unterschiedlich gute Fähigkeit aus, sich reinigen zu lassen. Zu den gut zu reinigenden Modultypen gehören Platten- und Rohrmodule. Hohe Temperaturen, Flussraten und Reinigungsmittelkonzentrationen begünstigen in der Regel die Reinigung. Allerdings werden diese durch das Material und verwendete Enzyme limitiert [86].

Es gibt eine Reihe von Verfahren, die zur Reinigung angewendet werden, wie beispielsweise die der Rückspülung (backflush). Dabei handelt es sich um die effektive Umkehr des Flusses. Dadurch wird die sich auf der Membran befindende Deckschicht von der Membran abgelöst und eine Reinigung des Moduls erreicht [101].

Ein Maß für die Beurteilung der Reinigung von Modulen ist die Bestimmung des Wasserwertes. Dabei wird vor und nach der Reinigung der Filtratstrom bei vorgegebenen Bedingungen (Druck, Temperatur) mit Wasser oder Pufferlösung bestimmt und verglichen.

5 Prozessschritt 1: Mikrofiltration

Der erste Schritt der Proteinaufreinigung besteht darin, grobe Feststoffpartikel vom proteinhaltigen Medium abzutrennen. In diesem Kapitel wird die dafür verwendete Mikrofiltration beschrieben. Außerdem wird auf die durchgeführte Optimierung der Porengröße und des Materials näher eingegangen.

5.1 Vorklärung von Kartoffelfruchtwasser

Es gibt verschiedene Verfahren, um eine Abtrennung unerwünschter fester Bestandteile zu erzielen. Zu ihnen gehören die Filtration und die Zentrifugation mit niedrigen Umdrehungszahlen [102]. Während das Prinzip der Filtration die Separation nach Größenausschluss ist, trennt eine Zentrifuge die Partikel anhand von Dichtegradienten. Bei einer Beutelzentrifuge wie sie von der Firma Emslandstärke verwendet wird, beruht das Prinzip auf Größenausschluss, da das Medium in einem Beutel zentrifugiert wird, der nur Teilchen bestimmter Größe permeieren lässt.

Das Kartoffelfruchtwasser (KFW) der Firma Emslandstärke, welches für die Technikumsversuche im Institut für Technische Chemie verwendet wurde und im Folgenden als Prozesswasser bezeichnet werden soll, wurde aus dem Oberlauf des Dekanters entnommen und sofort mit Bisulfit vermischt. Das Bisulfit verhindert die Verbräunung durch Reaktion mit dem enthaltenen Sauerstoff. Aufgrund von befristeten Kampagnenzeiten wurde auch selbst hergestelltes KFW für die Versuche verwendet, welches im Folgenden als Laborwasser bezeichnet wird (s. Anhang). Obwohl das Prozesswasser nach dem Dekanter entnommen wurde, wurden Labor- und Prozesswasser für den weiteren Prozess vorgeklärt, um bei beiden die gleiche Konsistenz gewährleisten zu können. So sollten eventuelle beim Transport auftretende leichte Alterungserscheinungen des Prozesswassers in Form von Sedimentationen beseitigt werden. Für die Vorklärung des KFW wurden sowohl Filter als auch Zentrifugen getestet und verglichen. Dabei wurde

als Maßstab eine deutliche Verringerung des Feststoffgehaltes an denaturierten Proteinen, Stärke und anderen Partikeln angesetzt. Eine effektive filtrative Abtrennung von Stärke beginnt bei einer Porengröße von 10 μm [102]. Daher wurden Vorfilter-Module mit einer Porengröße von 5 μm und 10 μm verwendet (Sartopure, Sartorius AG). Dies entsprach einer Zentrifugeneinstellung von etwa 3000 g. Als Analysemethode diente die Messung der Trübung des KFW. Aufgrund des hohen Trübungsgehaltes überstiegen die Trübungswerte des KFW aus Zentrifuge und Filterkerzen auch nach der Vorklärung den Messbereich von 1100 NTU. Diese Filtrationswirkung war nicht ausreichend, um das KFW vollständig für den nächsten Prozessschritt vorzubereiten, hatte aber sichtbaren Erfolg bei der Abtrennung der Stärke und anderer grober Partikel. Die Kapazitäten der Vorklärungsmethoden reichten allerdings nur für wenige Liter. Danach verblockten die Module, bzw. musste die Zentrifuge geleert werden. Dieser Schritt hat durch den auf Dauer hohen Material- bzw. Kostenaufwand noch Optimierungsbedarf.

5.2 Mikrofiltration des Kartoffelruchtwassers

Nachdem das KFW grob vorgeklärt wurde, war es notwendig, eine gründlichere Mikrofiltration durchzuführen. Diese sorgte dafür, dass außer den groben auch die feineren festen Bestandteile aus dem KFW beseitigt wurden. Dafür wurden unterschiedliche Systeme getestet. Wichtig bei dieser Prozessstufe war, dass die Partikelgröße im gewonnenen Filtrat 1 μm nicht überstieg. Größere Partikel führen in den Membranadsorbern der darauf folgenden Prozessstufe zur Verblockung der Module. In Abbildung 5.1 ist eine Skizze der Crossflow-Anlage für die Mikrofiltration abgebildet.

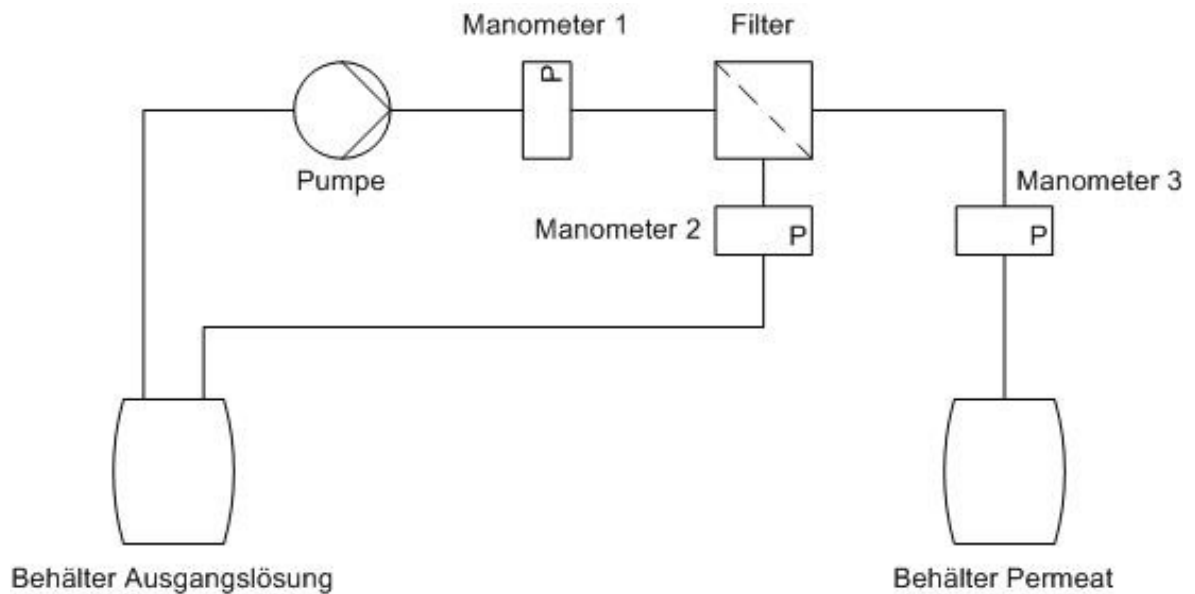


Abbildung 5.1: Skizze der Crossflow-Filteranlage

5.3 Bestimmung der geeigneten Porengröße

Die Wahl der Porengröße hat einen großen Einfluss auf die Filtration. So kann eine schlecht Wahl, einen deutlichen Unterschied in der Filtrationsleistung ausmachen. Die Filtrationsleistung verhält sich aber nicht immer vorhersagbar. Größere Poren bedeuten nicht zwangsläufig, dass mehr Flüssigkeit hindurch treten kann. Die zum Teil komplexen Mechanismen der Deckschichtbildung spielen dabei eine eben so große Rolle wie die Porengröße selber. Deshalb muss durch empirische Versuche die geeignete Porengröße ermittelt werden. Diese Versuche wurden mit Hilfe des Ceram-Revolvermoduls durchgeführt, dass in Abbildung 5.2 dargestellt ist.



Abbildung 5.2: Revolvermodul von Ceram

Dieses erlaubte es, gleichzeitig vier unterschiedliche Rohrmembranen mit derselben Lösung bei identischen Bedingungen zu testen. Die vier Membranen hatten Porengrößen von $0,14\ \mu\text{m}$, $0,2\ \mu\text{m}$, $0,45\ \mu\text{m}$ und $0,8\ \mu\text{m}$. Die Filtration wurde im Crossflow-Betrieb mit unterschiedlichen Anströmgeschwindigkeiten durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Die einzelnen Verläufe der Mikrofiltrationen sind im Anhang aufgeführt.

Tabelle 5.1: Ergebnisse der Mikrofiltrationsversuche mit dem Ceram-Revolvermodul

Porengröße μm	Anström- Geschwindigkeit m/s	Flux nach 0,5 h L/(m ² h)	Permeat- Proteingehalt g/L	Mittelwert g/L
0,14	0,6	32	3,2	3,7
	1,4	25	2,9	
	3,4	59	5,0	
	5,2	104	k.D.	
0,2	0,6	21	8,2	6,4
	1,4	25	3,2	
	3,4	64	7,7	
	5,2	93	k.D.	
0,45	0,6	27	6,1	7,4
	1,4	17	6,5	
	3,4	59	9,5	
	5,2	59	k.D.	
0,8	0,6	11	14,5	13,2
	1,4	9	11,7	
	3,4	69	13,5	
	5,2	51	k.D.	

Es ist zu erkennen, dass der Fluxwert mit zunehmender Anströmgeschwindigkeit bei allen Porengrößen anstieg. Dabei kam es zu einem deutlichen Sprung zwischen 1,4 m/s und 3,4 m/s. Die Reynoldszahlen lagen mit 4032 und 9792 beide im Bereich turbulenter Strömungen, die die Filtrationsleistung stark begünstigen (s. Anhang Q). Jedoch ist bei 1,4 m/s noch von einem Übergangsbereich von der laminaren zur turbulenten Strömung auszugehen, der den Sprung der Fluxwerte erklärt. Die Porengröße hatte ebenfalls einen großen Einfluss auf den Flux. Mit abnehmender Porengröße stieg dieser an. Bei der höchsten Anströmgeschwindigkeit von 5,2 m/s lag der Flux bei einer Porengröße von 0,8 μm beispielsweise bei 51 L/(m²·h). Dagegen lag er bei einer Porengröße von 0,14 μm bei 104 L/(m²·h). Dies könnte daran liegen, dass sich kleine Feststoffpartikel in den größeren Poren abgesetzt haben und damit den Strömungswiderstand in diesen erhöhten. Wohingegen sie bei den engeren Poren eine Deckschicht auf der Oberfläche gebildet haben und die Porenkanäle deshalb offen hielten.

Während der Einfluss der Porengröße auf den Flux sich nur bei hohen Anströmgeschwindigkeiten zeigte, hatte sie jedoch einen starken Einfluss auf den Proteingehalt des Permeates. So nahm der mittlere Proteingehalt mit kleiner werdender Porengröße stetig ab. Dies spricht dafür, dass die Deckschicht auf Membranen mit kleineren Poren eine wesentlich stärker ausgeprägte Filtrationswirkung hatte. Der Einfluss der Porengröße ist auf dem SDS-Gel in Abbildung 5.3 noch einmal zu erkennen.

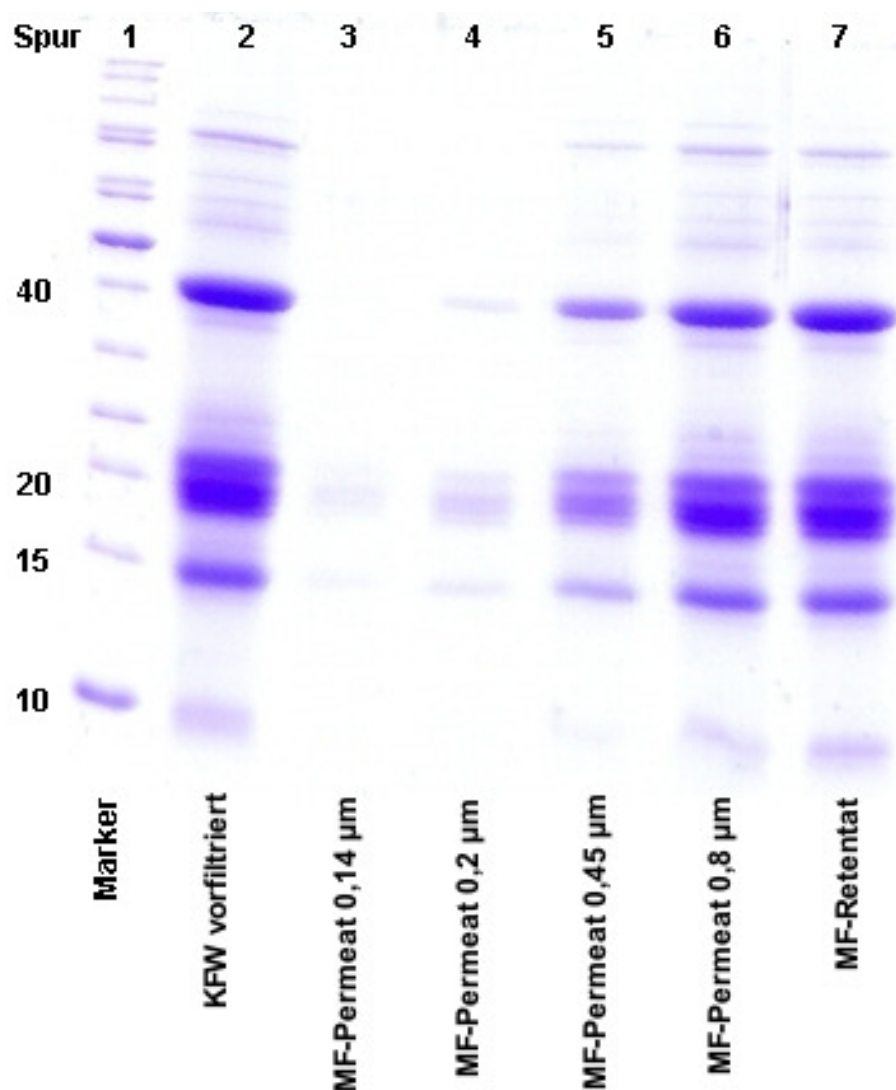


Abbildung 5.3: SDS-Gel der Mikrofiltration mit dem Revolvermodul (15 % Tris-HCl, Coomassiefärbung)

Auf Spur 2 befindet sich das bereits vorfiltrierte KFW. Die Banden bei 20 kDa und 40 kDa belegen den hohen Gehalt von Protease-Inhibitoren und Patatin. Dieser ließ sich im Permeat bei der Membran mit der Porengröße 0,8 µm ebenfalls nachweisen. Durch die Verringerung der Porengröße verblassten diese Banden zunehmend, bis sie bei 0,14 µm völlig verschwanden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass geringe Porengrößen mit einem Revolvermodul zwar höhere Fluxwerte aufwiesen, dafür aber auch einen deutlich niedrigeren Proteingehalt im Permeat. Die optimale Verbindung von hohen Fluxwerten und hohen Proteingehalten wurde mit diesem Modul nicht erreicht. Im Hinblick auf industrielle Prozesse ist eine Porengröße von 0,2 µm oder niedriger erwünscht. Durch diese Porengröße wird gewährleistet, dass sämtliche Keime und Bakterien bei der Filtration abgetrennt werden. Für die weiteren Versuche wurde deshalb 0,2 µm als Porengröße verwendet.

5.4 Optimierung des Materials und Modultyps

Die verwendete Modulart sowie das verwendete Membranmaterial haben einen bedeutenden Einfluss auf die Deckschichtbildung und die damit verbundene Filtrationsleistung. In diesem Abschnitt wurden verschiedene Membranmaterialien und Module ausprobiert. In Rohrmodulen kamen Membranen aus Polypropylen (Microdyn) und Titan/Zinkoxid (Ceram) zum Einsatz. Auf Cellulose basierende Membranen von der Sartorius AG, auch Hydrosart genannt, wurden in Plattenmodulen getestet. Dabei wurde jeweils eine Porengröße von 0,2 µm verwendet. In Abbildung 5.4 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen abgebildet.

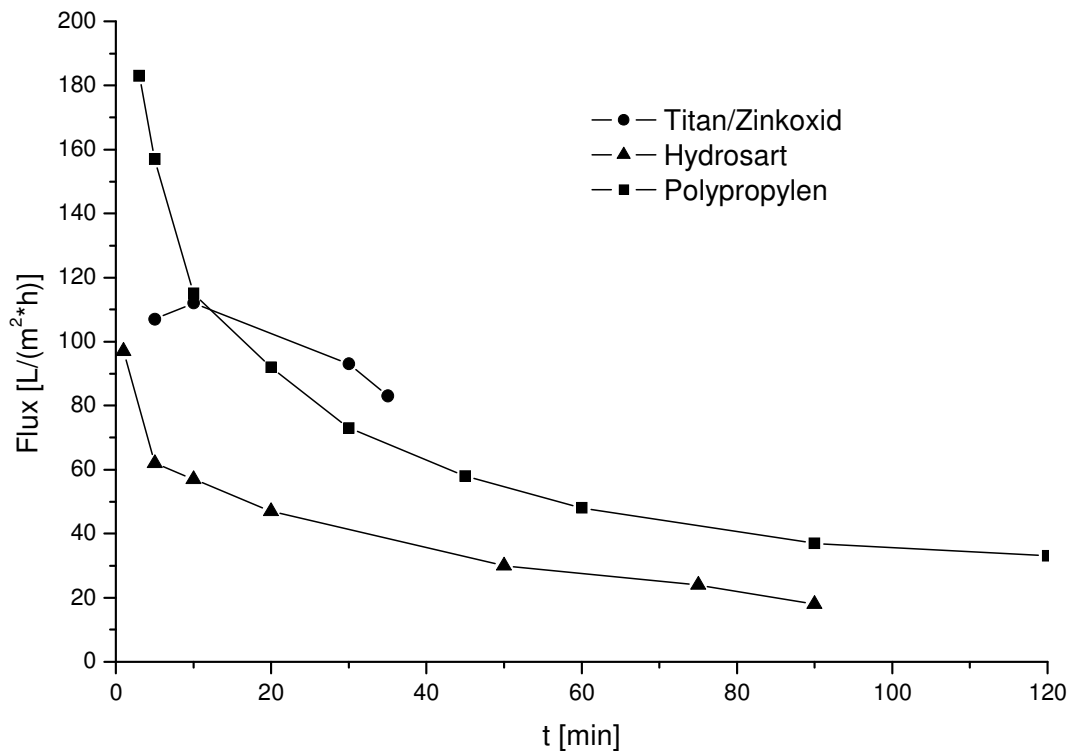


Abbildung 5.4: Fluxwerte der Mikrofiltration mit verschiedenen Membranmaterialien bei einer Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$ ($p_{\text{ein}}=3 \text{ bar}$)

Es ist zu erkennen, dass die Rohrmodule mit den Titan/Zinkoxid- und Propylen-Membranen deutlich höhere Flussraten als die Hydrosart-Kassette erzielten. Diese Bauart scheint demnach für hohe Flussraten bei den Mikrofiltrationen besser geeignet zu sein. Da die Filtrationszeit der Titan/Zinkoxid-Membran zu kurz war, konnte anhand dieser Versuche nicht klar gezeigt werden, welches Membranmaterial, das in den Rohrmodulen verwendet wurde, effizienter war. Die Filtrationszeit war limitiert durch das zur Verfügung stehende KFW-Volumen. Für die Wahl des Membranmaterials war ebenfalls der durch allmähliche Deckschichtbildung zurückgehende Proteingehalt des Mikrofiltrations-Permeates entscheidend. Die gewöhnliche Proteinkonzentration des KFW betrug 20 g/L . Mit einer Proteinkonzentration von 16 g/L nach 30 min Filtration beim Hydrosart-Kassettenmodul hielt dieses 25 % weniger Proteine zurück als die Rohrmodule mit etwa

12 g/L. Die aufgetretene Deckschichtbildung war demzufolge bei der Hydrosart-Membran geringer. Dies ist in Abbildung 5.5 dargestellt.

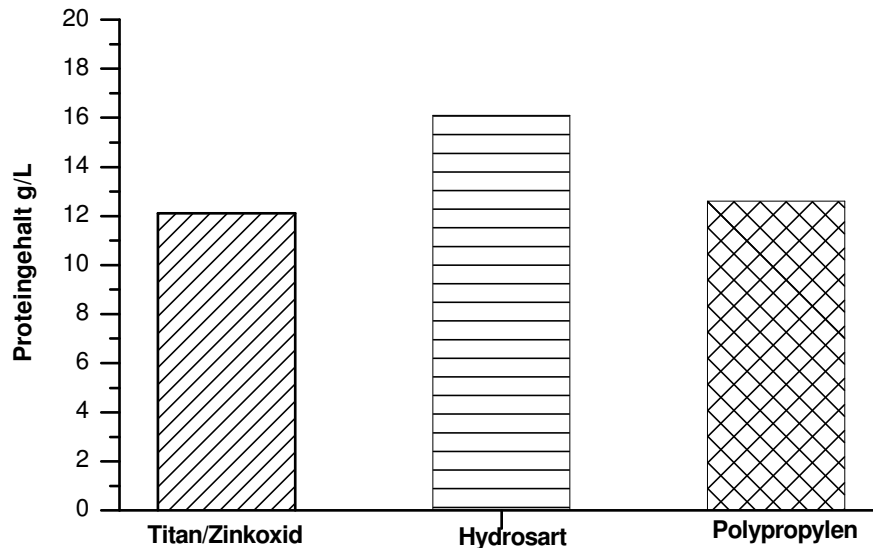


Abbildung 5.5: Proteingehalte der Mikrofiltrations-Permeate verschiedener Membranmaterialien nach 30 min

Eine zunehmende Deckschichtbildung bewirkt auf Dauer einen unerwünschten Rückhalt der Proteine im Retentat. Ein Vergleich der Proteinfracht die innerhalb von einer halben Stunde einen Quadratmeter Membranfläche passieren kann, stellt dagegen die Vorteile der Rohrmodule heraus (Anhang R). Mit Proteinfrachten von 1005 g/m², bzw. 742 g/m² waren das Titan/Zinkoxid- und das Polypropylen-Rohrmodul der Hydrosart-Kassette überlegen. Dieses besaß nur eine Proteinfracht von 449 g/m².

Durch die hohen Fluxwerte ist für die industrielle Produktion die Rohrmodulfiltration lukrativer. Für den weiteren Aufarbeitungsprozess bei den Technikumsversuchen wurde jedoch das Kassettensystem aufgrund der geringeren Auswirkung der Filtration auf die Zusammensetzung der Proteine gewählt.

5.5 Druckverhalten

Bei Crossflow-Filtrationen steigt der Flux mit dem Druck an bis zu einem maximalen Punkt, an dem er druckunabhängig wird. Ab diesem Punkt arbeitet ein großer Teil des Druckes gegen den osmotischen Druck an der Membran an, der durch hohe Proteinkonzentrationen an der Deckschicht entsteht. Um den maximalen Flux zu ermitteln und damit den Beginn des druckunabhängigen Bereiches zu finden, wurden Mikrofiltrationsversuche bei unterschiedlichen Transmembrandrücken (TMP) durchgeführt. Das Fruchtwasser wurde außerdem unterschiedlich verdünnt. In Abbildung 5.6 sind die End-Fluxraten der Versuche bei den verschiedenen Transmembrandrücken dargestellt.

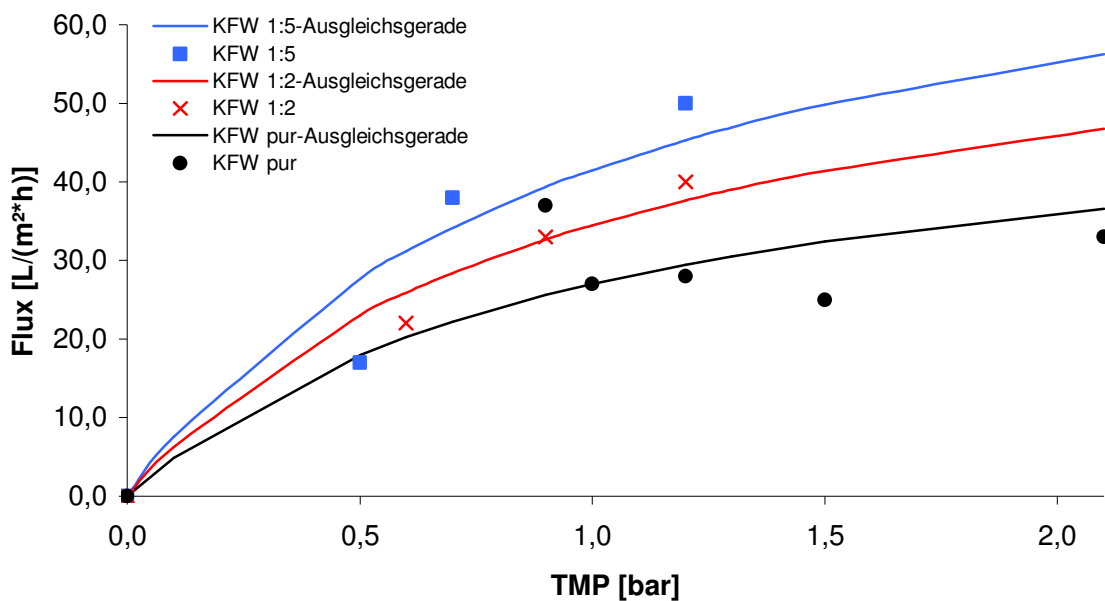


Abbildung 5.6: Flux-TMP-Diagramm für Mikrofiltrationsversuche mit dem Microdyn-Rohrmodul (Porengröße: 0,2 μm) mit KFW pur, 1:2 und 1:5 verdünnt

Die Verläufe der Graphen mit 1:2 und 1:5 verdünntem KFW steigen steil an und nähern sich auch bei hohem Druck keinem klaren Flux-Grenzwert an. Somit liegen diese Versuche ausschließlich im druckabhängigen Bereich. Der Flux der Versuche mit purem KFW dagegen nähert sich ab einem Transmembrandruck von

1 bar einem Fluxwert von etwa $30 \text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ an. Dies scheint der Beginn des druckunabhängigen Bereiches zu sein. Diese Versuche gaben Anlass zu vermuten, dass ein Transmembrandruck von 1 bar ausreicht, um die höchste Fluxrate zu erzielen. Aus diesem Grund wurden beim Plattenmodul, neben dem in Abbildung 5.4 bereits gezeigten Versuch mit einem Eingangsdruck von 3 bar (Transmembrandruck = $1,5 \text{ bar}$), ein Versuch mit 2 bar (Transmembrandruck = 1 bar) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.7 zu sehen.

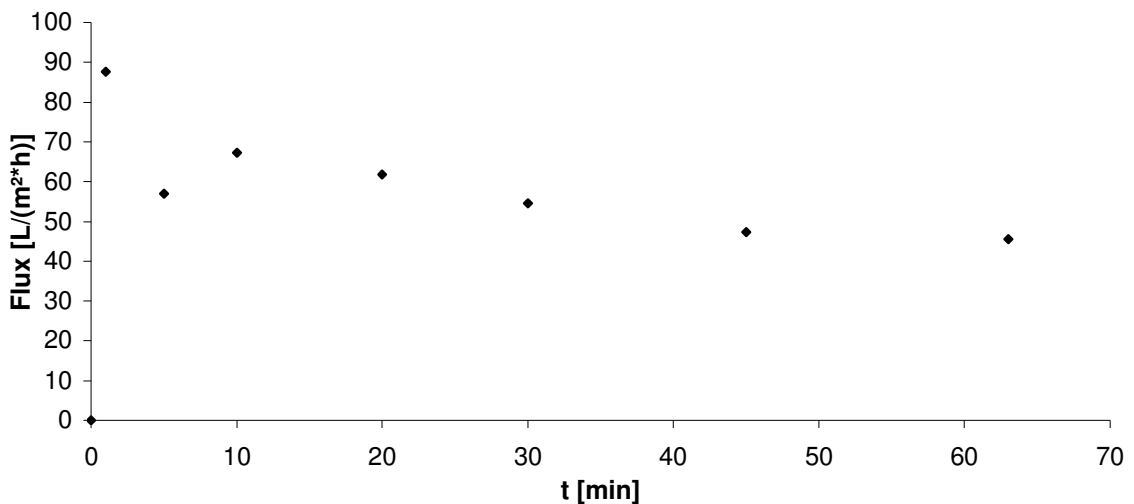


Abbildung 5.7: Fluxwerte der Mikrofiltration mit Hydrosart-Plattenmodul bei einer Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$ ($p_{\text{ein}}=2 \text{ bar}$)

Nach 0,5 h befand sich der Flux bei dieser Filtration bei $55 \text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$, nach 1 h immerhin noch bei $46 \text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$. Damit wurde mit dem Hydrosart-Plattenmodul bei diesen Bedingungen eine höhere Fluxrate erzielt als bei einem Eingangsdruck von 3 bar. Dieser Versuch belegte, dass einzelne Filtrationsergebnisse durch die immer unterschiedliche KFW-Qualität voneinander abweichen können. Die Annahme, dass ein Eingangsdruck 2 bar ausreicht, um eine ähnliche hohe Fluxrate wie bei 3 bar zu erreichen, wurde dadurch jedoch bestätigt. Auf diese Weise wurden knapp 11 L Permeat hergestellt. Der Proteinverlust im Verhältnis zum Ausgangs-KFW betrug 15 %. Da dieser Werte sehr gut war, wurde die weitere Mikrofiltration infolgedessen unter diesen Bedingungen und mit diesem Modul durchgeführt. Die Reinigung des Hydrosart-Moduls wurde bei einem

Eingangsdruck von 2 bar mit 5 L 0,1 M Natronlauge durchgeführt. Davon wurden 1,3 L nach dem Durchleiten verworfen, die übrige Lösung wurde 20 min rezirkuliert.

5.6 Probleme durch Verbräunung und temperatur- und pH- bedingte Koagulation

Bei den Mikrofiltrations-Versuchen kam es gelegentlich zu unerwünschten Effekten. Zum einen lief bei langen Filtrationen die Pumpe heiß. Die gemessene Temperatur in den Vorlagebehältern betrug bis zu 35°C. Es ist davon auszugehen, dass die Temperatur direkt am Pumpenkopf um einige Grad höher lag. Dies führte dazu, dass ein Teil der Proteine in Folge von Denaturierung koagulierte. Dieser Effekt wurde durch die Begrenzung der Flussrate und der Filtrationszeiten auf 2 h vermieden. Ein anderer Effekt trat bei ebenfalls langen Filtrationszeiten auf. Das zur Verhinderung der Verbräunung beigefügte Bisulfit wurde im Laufe der Zeit durch die Reaktion mit Sauerstoff zu Sulfat aufgebraucht. Es kam deshalb zur unerwünschten Verbräunung des KFW. Dieser Effekt wurde ebenfalls durch geringere Filtrationszeiten und erneute Zugabe von geringen Mengen Bisulfit vermieden. Wie in vorangegangenen Arbeiten bereits getestet wurde, kommt es außerhalb des pH-Bereiches von 4 bis 8 ebenfalls zu einer starkem Denaturierung der Proteine. Dieser Bereich wurde jedoch in dieser Arbeit nur während der Membran-Reinigung erreicht.

6 Prozessschritt 2: Isolierung durch Membranadsorption

6.1 Ionenaustausch-Chromatographie mittels Membranen

Ionenaustausch-Chromatographie ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, welches auf der Verteilung eines Stoffes zwischen einer flüssigen mobilen Phase und einer festen stationären Phase beruht [103]. Die stationäre Phase besteht gewöhnlich aus einer makromolekularen unlöslichen Verbindung (Gele oder Harze), an deren Oberfläche geladene funktionelle Gruppen angebracht wurden. Die Ladungen sind durch bewegliche Gegenionen neutralisiert. Die ionischen Bestandteile der mobilen Phase konkurrieren um diese Plätze auf der Oberfläche der stationären Phase. In der Dissertation von Frauke Menzel wurde bereits beschrieben, dass es möglich ist, Kartoffelproteine aus KFW mit Hilfe von Ionenaustausch-Chromatographie zu isolieren und zu fraktionieren [7]. Dabei wurden statt herkömmlicher Chromatographie-Säulen Membranadsorber-Module der Firma Sartorius AG, Göttingen, Deutschland verwendet. Diese sind mit modifizierten makroporösen Celluloseacetat-Membranen versehen. Diese Membranen zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Poreninnenoberflächen mit funktionellen kationischen oder anionischen Austauschergruppen versehen wurden [86]. So können sie als stationäre Phase selektiv geladene Moleküle binden und damit bei der Aufreinigung von Proteinen, Endotoxinen und Viren aus Lösungen eingesetzt werden [104, 105]. In Tabelle 6.1 sind Beispiele für funktionelle Gruppen dargestellt.

Tabelle 6.1: Beispiele für funktionelle Gruppen [86]

Sulfonsäure (S-Typ)	Quarternäres Ammonium (Q-Typ)	Carboxyl (C-Typ)	Diethylamin (D-Typ)
$R-CH_2-SO_3^-$ stark saurer Kationentauscher	$R-CH_2-N^+(CH_3)_3$ stark basischer Anionenaustauscher	$R-COO^-$ schwach saurer Kationentauscher	$R-CH_2-N(C_2H_5)_2$ schwach basischer Anionenaustauscher

Die Vorteile der Membranadsorber liegen in ihren hohen Durchflussraten und ihrer einfachen Handhabung. Sie eignen sich besonders gut zum Scaleup, vor allem wegen ihrer geringen Herstellungskosten. Im Labormaßstab werden die Membranmodule frontal angeströmt. Sie besitzen je nach Membranlagenanzahl Flächen von 5-75 cm². Für den technischen Maßstab existieren SingleSep- und MultiSep-Module mit Flächen von 0,1-8 m², die als Wickelmodule tangential betrieben werden. In Abbildung 6.1 ist das Prinzip der Membranadsorber-Module im Labor- und Technikumsmaßstab dargestellt.

**Abbildung 6.1:** Prinzip des Membranadsorbermoduls im Labormaßstab (links, Sartobind) und im Technikumsmaßstab (rechts, SingleSep)

Mit Hilfe der Membranadsorber konnten im Labormaßstab die Haupt-Proteinfraktionen Patatin und Protease-Inhibitoren aus dem KFW isoliert werden. Die besten Ergebnisse wurden für das Patatin mit einem Anionenaustauscher-Modul (Q-Typ), bei der Gruppe der Protease-Inhibitoren mit einem Kationenaustauscher-Modul (S-Typ) erzielt [7]. Im Hinblick auf eine industrielle Nutzung wurden beide Ionenaustauscher-Module bei der Beladung in einigen Versuchen in Reihe geschaltet. Dadurch konnten beide Fraktionen gleichzeitig aus dem KFW abgetrennt werden. Allerdings machte dies auch eine identische Equilibrierung mit demselben Puffer notwendig. Nach Versuchen mit unterschiedlichen Puffern, wurde Natriumphosphatpuffer (NaPP) ausgewählt. Da der Puffer sich im Hinblick auf eine gute Bindungsfähigkeit im pH-Wert um wenigstens 1-1,5 Einheiten von den pI-Werten des Patatins und der Protease-Inhibitoren unterscheiden sollte, wurde ein pH von 7 gewählt. Die Konzentration wurde mit 20 mM gering gewählt, um die Leitfähigkeit bei der Equilibrierung der des KFW anzunähern und die Prozesskosten gering zu halten. Unter diesen Bedingungen konnte die Proteinisolierung für beide Fraktionen erfolgreich durchgeführt werden. Die Versuche erfolgten im Labormaßstab mit Sartobind-Plattenmodulen mit einer Membranfläche von 15 cm², bzw. 75 cm². Für den zweiten Prozessschritt wurden diese Versuche auf einen Maßstab von bis 1 m² übertragen.

Neben der Sicherstellung der Reinheit der Produkte, ist für die industrielle Produktion die Ausbeute von grundlegender Bedeutung. Im Falle der Membranadsorber wurde dafür die nach der Beladung eluierte Proteinmasse bezogen auf die Membranfläche verwendet, die so genannte Bindungskapazität. Für die weitere Aufarbeitung im Prozess waren nur die mit 0,5 M Natronlauge eluierten Lösungen relevant, da nur sie die mit Proteinen angereicherten Fraktionen enthielten.

Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurden Proben aus dem laufenden Prozess entnommen und bei -20° C eingefroren. Mit Hilfe des Proteintests nach Lowry wurde später ihr Gesamt-Proteingehalt bestimmt (Anhang F). Diese Analytikmethode war jedoch nicht geeignet, einzelne Proteine wie Patatin und Protease-Inhibitoren quantitativ nachzuweisen. Daher wurden die Membran-

module im Überschuss mit proteinhaltigem KFW beladen, um so die maximale Bindungskapazität für die Proteine auszuschöpfen.

6.2 Bestimmung der Bindungskapazität bei unterschiedlichen pH-Werten über FPLC

Vor dem Upscaling wurden noch einige Optimierungsversuche mit der in Abbildung 6.2 dargestellten FPLC-Anlage im Labormaßstab durchgeführt.

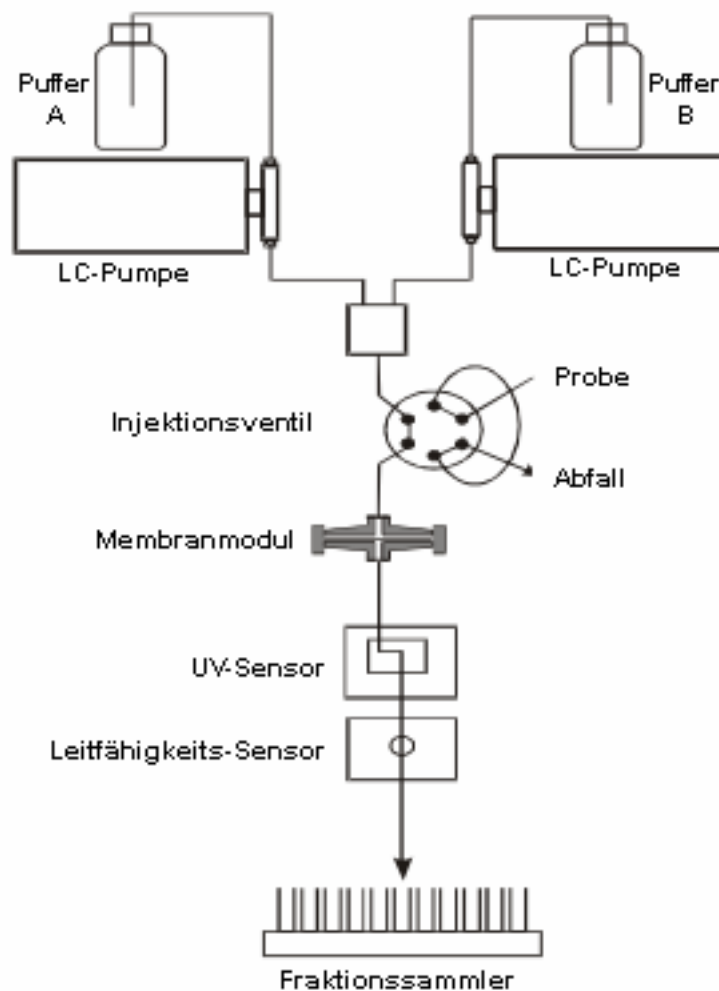


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der FPLC-Anlage [7]

Es wurden Versuche mit KFW bei drei unterschiedlichen pH-Werten (pH 4,5; 6,5 und 8,5) durchgeführt. Diese dienen dazu, den pH-Bereich mit den höchsten

Bindungskapazitäten der Membranmodule zu finden (und die Aktivitäten der Verunreinigungen zu minimieren). Dafür wurden 15 cm²-Membran-Module mit 50 mL 1:5 verdünntem KFW-Mikrofiltrat beladen. Dieses wurde zuvor im Labor aus festkochenden Speisekartoffeln hergestellt, zwei mal bei 4.000 g zentrifugiert und anschließend mit Sterilfiltern (0,2 µm, Sartorius AG) gefiltert. Die Bestimmung der Bindungskapazitäten wurde dynamisch unter annähernd stationären Bedingungen durchgeführt. Die Isolierungssequenz erfolgte in folgenden Schritten:

- Equilibrierung des Membranmoduls mit NaPP (50 mM, pH 7)
- Beladung mit Mikrofiltrat (1:5 verdünnt)
- Spülen mit NaPP (50 mM, pH 7)
- Elution mit NaCl-Lösung

Der erste Schritt der Isolierung war die Equilibrierung des Moduls mit NaPP (50 mM, pH 7), um eine optimale Umgebung für die Probe auf der Membran zu schaffen. Danach erfolgte die Beladung mit KFW-Mikrofiltrat. Dieses wurde 1:5 verdünnt, um die Leitfähigkeit in einem für die Adsorption günstigen Bereich von etwa 5mS zu bringen. Im Anschluss wurde das Modul mit NaPP (50 mM, pH 7) gespült, um nicht gebundenes KFW aus dem Modul zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 1 M NaCl. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 6.3 aufgeführt.

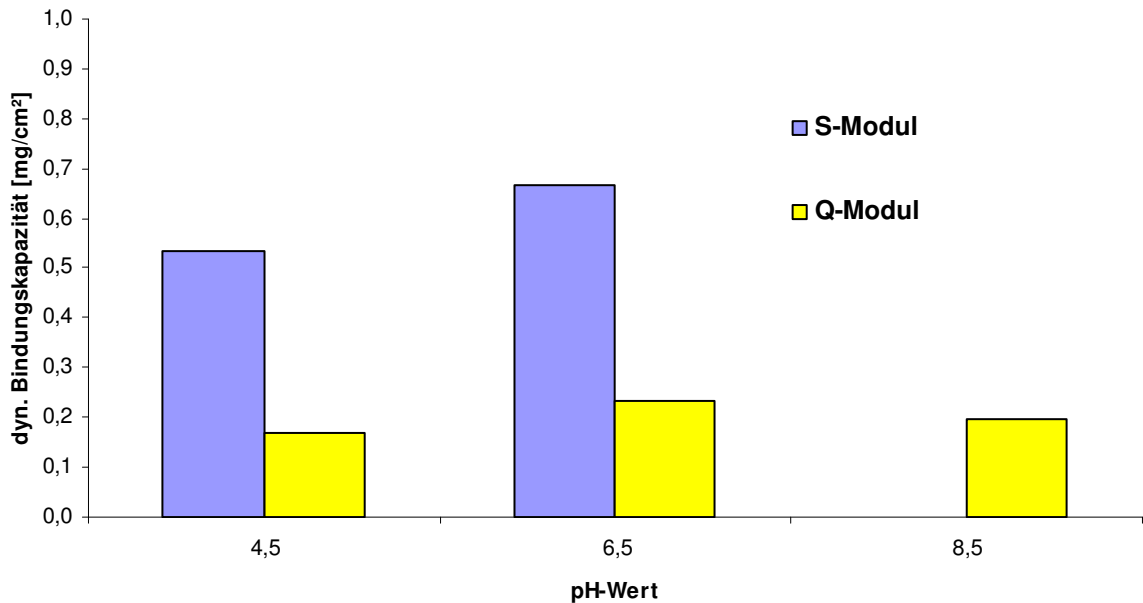


Abbildung 6.3: Bindungskapazitäten von 15 cm²-Membranmodulen bei pH-Werten von 4,5-8,5

Die Bindungskapazitäten des S-Membranmoduls waren mit 0,53 mg/cm² bei pH 4,5 und 0,67 mg/cm² bei pH 6,5 sehr hoch. Dagegen kam es zu keiner Adsorption bei pH 8,5. Dies spricht dafür, dass sich der isoelektrische Punkt, der auf den S-Membranen bindenden Proteine, nahe dieses pH-Wertes befindet.

Beim Q-Membranmodul kam es bei allen drei pH-Werten zu einer Adsorption. Wenn auch die Bindungskapazität bei pH 6,5 mit 0,23 mg/cm² am höchsten war, lagen die Werte bei pH 4,5 und pH 8,5 mit 0,17 mg/cm², bzw. 0,20 mg/cm² nur unwesentlich niedriger. Für eine Kombination beider Module sollte der pH-Wert um 6,5 liegen, da er dort bei beiden Membrantypen die höchsten Bindungskapazitäten erreichte.

6.3 Membranadsorption von Kartoffelfruchtwasser an 6.600 cm² Sartobind-Singlesep-Modulen (Q- und S-Typ)

Für das Scaleup des Isolationsschrittes der Proteine aus zuvor mikrofiltriertem KFW wurden ein S- und ein Q-Typ-Modul (Sartobind Singlesep, Sartorius AG) mit einer Adsorptionsfläche von je 6.600 cm² verwendet. Die Module wurden in Reihe

geschaltet, wobei die Reihenfolge keinen Einfluss auf die Adsorption hatte, da S- und Q-Module unterschiedliche Zielproteine hatten. Abbildung 6.4 stellt den Versuchsaufbau dar.

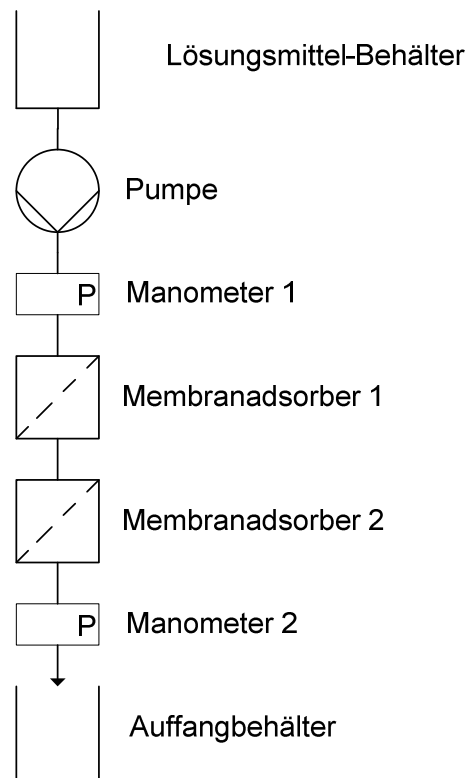


Abbildung 6.4: Skizze der Technikumsversuche mit Sartobind-SingleSep-Adsorbermodulen

Die Isolierungssequenz erfolgte in folgenden Schritten:

- Equilibrierung des Membranmoduls mit NaPP (20 mM, pH 7)
- Beladung mit Mikrofiltrat (1:5 verdünnt)
- Spülen mit NaPP (20 mM, pH 7)
- Elution mit NaCl-Lösung

Es wurden 10 L Mikrofiltrat (1:5 verdünnt) aufgegeben. Die durchgelaufene Lösung, der Durchbruch, wurde in Behältern aufgefangen. Eines der Module wurde im Anschluss an das Spülen ausgekoppelt. Daraufhin erfolgte die zweistufige Elution der Proteinfractionen bei dem eingebauten Modul. Die erste

Stufe wurde mit 0,5 M Natriumchlorid-Lösung durchgeführt und enthielt die isolierte Proteinfraction. Für die zweite Stufe wurde 1 M Natriumchlorid-Lösung verwendet, um etwaige Proteinreste von der Membran zu spülen. Anschließend wurde der Elutions-Vorgang mit dem anderen Modul wiederholt. Zur Beurteilung des Prozessverlaufes wurden die wichtigsten Daten (pH, Leitfähigkeit, Temperatur und Trübung) gemessen. Der Volumenstrom wurde über das verbrauchte Volumen pro Zeit ermittelt. In Tabelle 6.2 sind der Verlauf und die gemessenen Parameter des Versuches aufgelistet.

Tabelle 6.2: Verlauf des Isolierungsschrittes mit SingleSep Q- und S-Typ-Membranadsorbern

Probe	V [L]	t [min]	\dot{V}_{Ret} [L/min]	P_{Ein} [bar]	P_{Aus} [bar]	T [°C]	pH	λ [mS/cm]	Trübung [NTU]
Equilibrierung NaPP 20mM, pH 7	5,0	3,2	1,6	2,0	0	18,6	6,97	3,78	0,37
Beladung MF-Permeat 1:5	10,0	5,6	1,8	2,2	0	18,2	6,16	2,92	47,71
Durchbruch gesamt	10,0	0	0	0,0	0	17,1	6,47	2,91	1,77
Spülen NaPP 20mM, pH 7	10,0	4,3	2,3	2,2	0	16,6	6,74	2,38	1,01
Elution Q-Modul 0,5M NaCl	7,5	3,0	2,5	0,8	0	17,1	6,32	42,90	2,83
1M NaCl	6,0	2,2	2,7	1,0	0	16,4	6,17	73,30	2,53
Elution S-Modul 0,5M NaCl	6,0	2,3	2,6	1,0	0	17,0	6,36	43,40	0,79
1M NaCl	5,0	2,0	2,5	0,8	0	16,1	6,22	74,50	0,51

Die Durchführung der einzelnen Schritte verlief problemlos. Auffällig waren die Druckabfälle während der Elutionsschritte in Folge der Lösungsmitteländerung. Das mit 0,5 M Natriumchlorid-Lösung eluierte Q-Eluat 1 war bräunlich und trübe, während das mit 1 M Natriumchlorid-Lösung eluierte Q-Eluat 2 eine schwächere

Färbung hatte. Das mit 0,5 M eluierte S-Eluat 1 war eine klare gelbliche Lösung. Das ebenfalls klare S-Eluat 2 zeigte keinerlei Verfärbung. Anhand der Trübungswerte ließen sich diese Beobachtungen bestätigen. Aufgrund der intensiveren Farbe der Q-Eluate wurde ein höheres Elutionsvolumen für die Fraktionen verwendet, um eine vollständige Elution zu gewährleisten. Die Trübungswerte zeigten außerdem eine erhebliche Diskrepanz zwischen der Beladungs- und der Durchbruchlösung. Der Rückgang von 47,71 NTU auf 1,77 NTU ließe sich durch eine filtrierende Wirkung des Moduls erklären. Die Tatsache, dass diese hohen Trübungswerte nicht mehr beim anschließenden Eluieren gemessen werden konnten, wies auf zurückgebliebene Verunreinigungen im Modul hin. Dies können Ablagerungen von Partikeln wie adsorbierte Proteine oder Polyphenol-Verbindungen auf der Membran gewesen sein.

Die Leitfähigkeit der KFW-Probe von 2,92 mS/cm veränderte sich bei der Beladung der Module nicht. Sie wird nicht durch die Proteinkonzentration beeinflusst, sondern ist nur abhängig vom Salzgehalt.

Die mittleren Bindungskapazitäten für das S-Modul lagen bei 1,0 mg/cm², die für das Q-Modul bei 0,37 mg/cm². Genauere Untersuchungen hierzu finden sich in Kapitel 6.5. Beide Bindungskapazitäten lagen hoch im Verhältnis zum Labormaßstab, der 0,1 mg/cm² für das S-Modul und 0,31 mg/cm² für das Q-Modul erbrachte [7]. Die Reinheit der Proben konnte durch SDS-Gele bestätigt werden (s. Kapitel 9.2). Ein Grund für die Abweichungen ist sicher die schwankende Zusammensetzung der KFW-Inhaltsstoffe. So kann der Gehalt von Patatin und Protease-Inhibitoren abhängig von der Kartoffelsorte, Reife und anderen Gründen stark variieren.

Bei der Beladung der Module wurde in regelmäßigen Abständen eine Probe am Modulausgang entnommen und eingefroren, um anhand des gemessenen Proteingehaltes erkennen zu können, wann kein Protein des KFW mehr gebunden wird. Die nichtbindenden Proteine passieren dabei das Modul und können am Ausgang aufgefangen und gemessen werden. Durch die Auftragung der so genannten Durchbruchkurve, lässt sich der Verlauf der Proteinkonzentration im Verhältnis zur Aufgabekonzentration gegen das aufgegebenes Volumen deuten. In

Abbildung 6.5 ist die Durchbruchskurve für die Reihenschaltung von Q- und S-Modul abgebildet.

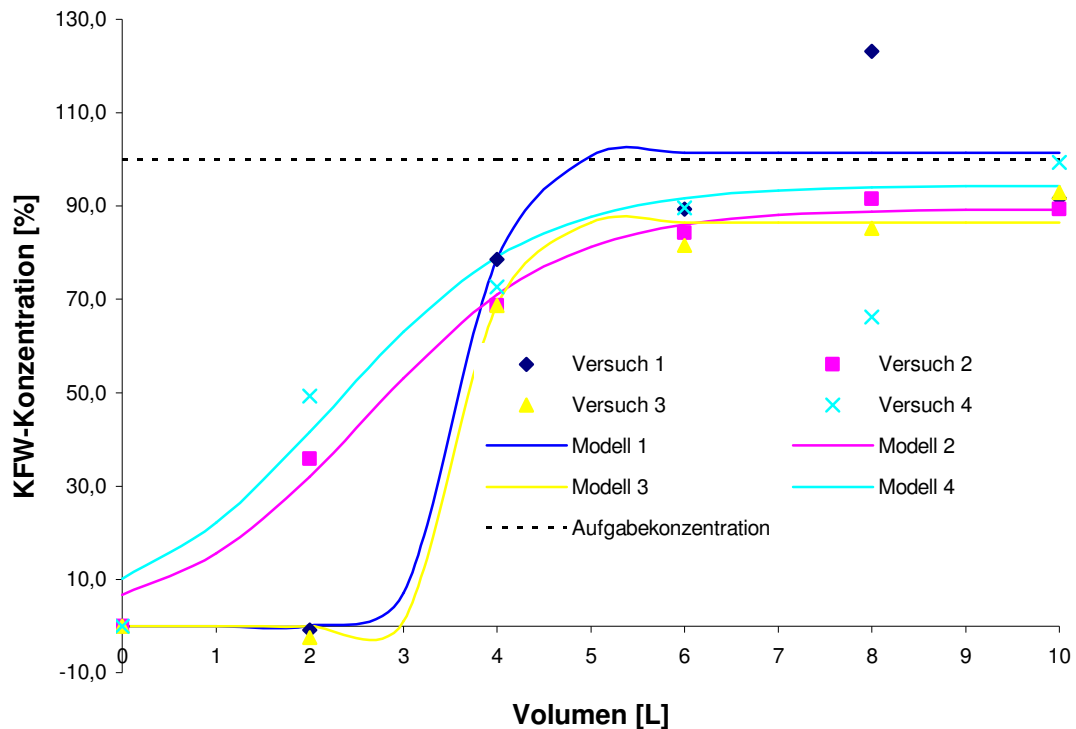


Abbildung 6.5: Durchbruchskurve der Reihenschaltung von Q- und S-Typ-Membranadsorbern mit 1:5 verdünntem KFW

Die Proteinkonzentrationen am Ausgang des Moduls stiegen rasch und stetig an und überschritten bereits bei 2 der 4 Beladungen nach 2 L Probenvolumen die Bindungskapazität der Module. Die Module waren nicht mehr vollständig in der Lage sämtliche Proteine zu binden. Zum Ende der Beladungen näherte sich die Proteinkonzentration im Durchbruch asymptotisch der aufgegebenen Probenkonzentration. Trotz des frühen Durchbruchs war das Ziel die maximal mögliche Menge an Kartoffelproteinen an die Membranen zu binden. Da die quantitative Proteinanalytik jedoch nicht selektiv war, wurde das Ausbleiben der Adsorption von Proteinen durch das Erreichen der Ausgangskonzentration am Modulausgang sichergestellt. Abweichungen der unterschiedlichen Beladungen sind auf

Inhomogenitäten der Proben und Ungenauigkeiten der Proteinbestimmungsmethode zurückzuführen.

6.4 Kombination von Q- und S-Membranadsorber-Modulen – MultiSep

Nachdem die Isolation der Q- und S-Fraktion mit Membranmodulen im Technikummaßstab erfolgreich getestet wurde, wurde die automatisierte 1 m²-Anlage im Technikum der Technischen Chemie der Leibniz Universität Hannover verwendet. Dadurch konnte nicht nur der Prozess leichter gesteuert, sondern auch die Messdaten wie Druck, Leitfähigkeit, UV-Absorption und Durchflussgeschwindigkeit online aufgezeichnet werden. In Abbildung 6.6 ist eine Skizze der Anlage zu sehen.

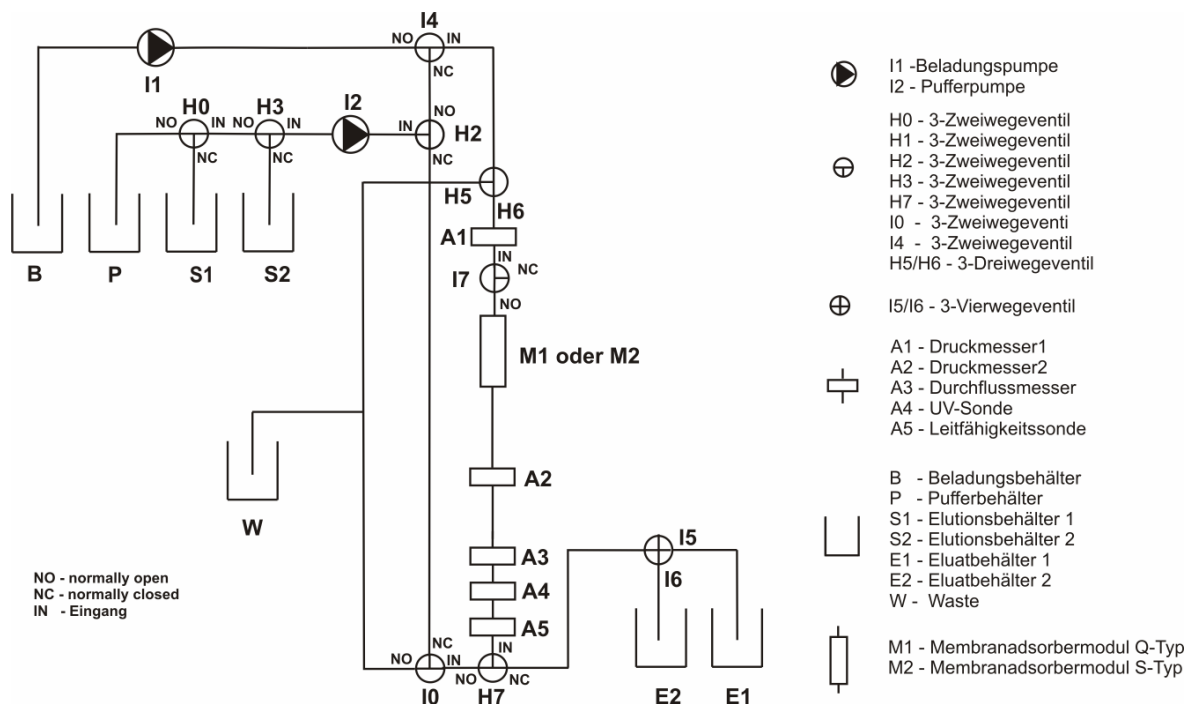


Abbildung 6.6: Schematische Darstellung der 1 m²-Technikumsanlage zur Isolierung von Kartoffelproteinen aus Kartoffelbruchwasser mit Membranadsorbern

Für die Versuche wurde zuvor hergestelltes Mikrofiltrat des KFW 1:5 mit VE-Wasser verdünnt. Aufgrund von begrenzten Schaltungsmöglichkeiten der Anlage

wurden nicht beide Module simultan beladen. Zunächst wurde nur das S-Modul verwendet. Der Durchlauf der Beladung des S-Moduls wurde aufbewahrt. Nach dem letzten Sequenzschritt wurde das S-Modul durch das Q-Modul ersetzt und in 0,1 M Natronlauge aufbewahrt. Der Durchlauf der Beladung des S-Moduls wurde nun zur Beladung des Q-Moduls verwendet. Die Reihenfolge der Prozessschritte beim Q-Modul war identisch mit der des S-Moduls.

Reihenfolge der Prozessschritte einer Beladungs-Sequenz:

- Equilibrierung (NaPP – 20 mM, pH 7)
- Beladen (Mikrofiltrat 1:5)
- Spülen (NaPP – 20 mM, pH 7)
- Elution 1 (NaCl - 0,5 M)
- Elution 2 (NaCl - 1M)
- Reinigung (NaOH - 0,1M)

Die durchgelaufenen Lösungen jeder Sequenz wurden separat in Kanistern aufgefangen und etwa 10 mL Probe entnommen. In Abbildung 6.7 sind die Leitfähigkeits- und UV-Messwerte der Sequenzen von Q- und S-Modul gegen die Zeit aufgetragen.

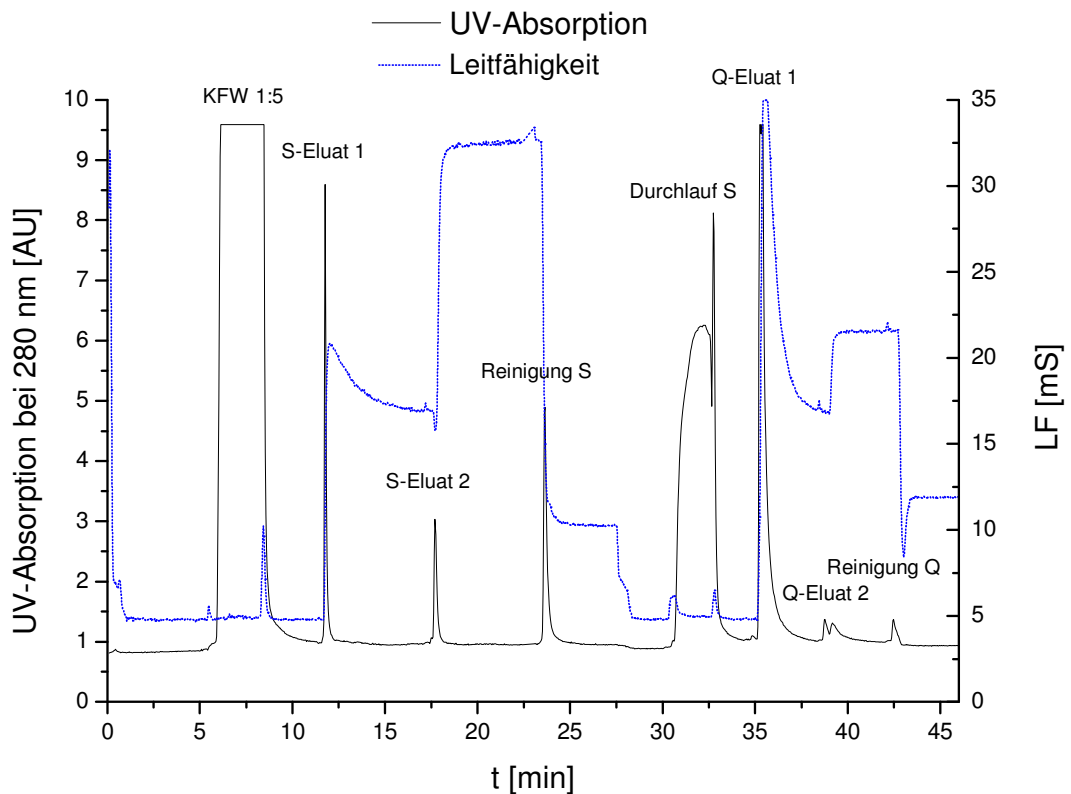


Abbildung 6.7: Gesamtverlauf der Proteintrennung von KFW mit Q- und S-Typ-Membranen

Allgemein waren die Elutions-Peaks sehr scharf. Die Protein-Separierung in S- und Q-Fractionen wurde erfolgreich durchgeführt. Das S-Eluat 1, in dem sich die Protease-Inhibitoren befinden sollten, hatte das Absorptionsmaximum von 8,59 AU. Das S-Eluat 2, in dem sich die gebundenen Restproteine befinden, hatte dagegen lediglich ein Absorptionsmaximum von 3,03 AU. Die Reinigung mit Natronlauge (0,1 M) erbrachte ein Absorptionsmaximum von 4,89 AU. Es wurde also eine beträchtliche Menge Verunreinigungen nicht mit der Natriumchlorid-Lösung eluiert, sondern blieb auf dem S-Modul zurück. Nach der Reinigung mit Natronlauge erreichten die UV-Werte wieder ihren ursprünglichen Wert. Dies war eine Bestätigung dafür, dass die Reinigung des Moduls erfolgreich durchgeführt wurde. Nach dem Austausch des S- gegen das Q-Modul wurde das Q-Modul mit dem Durchbruch des S-Moduls beladen. Das Absorptionsmaximum des Durchlaufs lag bei 6,25 AU und damit deutlich unter dem Absorptionsmaximums des

Durchlaufs des S-Moduls. Der Ausreißer-Peak mit 8,12 AU entstand vermutlich durch eine Luftblase. Das Q-Eluat 1 hatte ein starkes Absorptions-Maximum von 9,59 AU nach 35 min. Der Peak zeigte eine deutliche Verbreiterung am Ende. Der Peak des Q-Eluates 2 erschien nach 39 min bei 1,37 AU. Das Maximum bei der Natronlauge-Reinigung erfolgte nach 42 min mit einem Wert von 1,37 AU. Das Q-Modul zeigte demnach nur geringe Verunreinigungen.

In Abbildung 6.8 des vom Prozess gemachten SDS-Gels ist die Reinheit des Q- und S-Eluates deutlich zu erkennen. Aufgrund der strukturverändernden Vorbereitungsmethoden für die Aufgabe auf das SDS-Gel wurden die Patatin-Dimere in die Monomere gespalten.

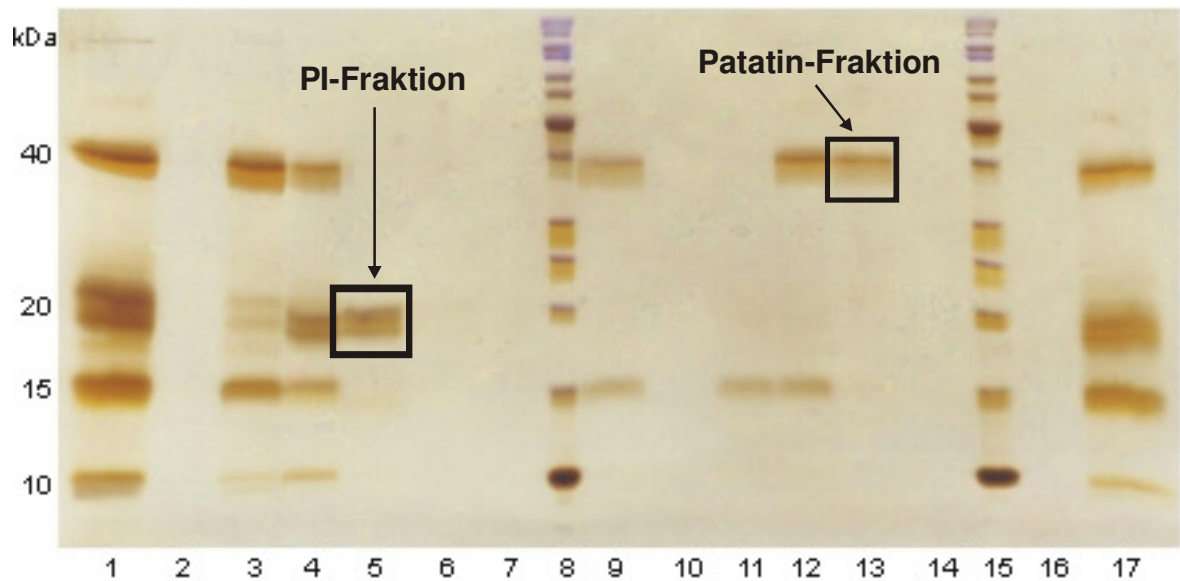


Abbildung 6.8: SDS-Gel der einzelnen Schritte der Membranadsorption zur Proteingewinnung (15 % Tris-HCl, Silberfärbung auf Coomassie, BioRad) (Verdünnung aller Proben: 1:20)

- Spur 1: Mikrofiltrations-Permeat aus Labor-KFW (1:5 verdünnt)
- Spur 2: Equilibrierungs-Lsg. 1 vor Beladung auf S-Modul (NaPP 20 mM, pH 7)
- Spur 3: Durchlauf S des verdünnten L-KFW durch S-Modul
- Spur 4: Wasch-Lsg. nach Beladung des S-Moduls (NaPP 20 mM, pH 7)
- Spur 5: S-Eluat 1 mit minoren Proteinen in NaCl (0,5 M)
- Spur 6: S-Eluat 2 der Restproteine in NaCl (1 M)
- Spur 7: Reinigungs-Lsg. nach beiden Elutionen des S-Modul (0,1 M NaOH)
- Spur 8: Marker, Fermentas
- Spur 9: Durchlauf von S vor Beladung des Q-Moduls
- Spur 10: Wasch-Lsg. 1 vor Beladung des Q-Moduls (NaPP 20 mM, pH 7)
- Spur 11: Durchlauf von Q des Durchlauf S durch Q-Modul
- Spur 12: Wasch-Lsg. 2 nach Beladung des Q-Moduls (NaPP 20 mM, pH 7)
- Spur 13: Q-Eluat 1 mit Patatin in NaCl (0,5 M)
- Spur 14: Q-Eluat 2 mit Restproteinen in NaCl (1 M)
- Spur 15: Marker, Fermentas
- Spur 16: Reinigungs-Lsg. nach beiden Elutionen des Q-Moduls (0,1 M NaOH)
- Spur 17: Mikrofiltrations-Permeat von purem Labor-Kartoffelfruchtwasser

Während das Permeat der Mikrofiltration noch starke Banden bei 20 kDa und 40 kDa zeigt (Spur 1), fehlt dem Durchlauf nach der Aufgabe auf das S-Modul die Bande bei etwa 20 kDa. Diese Bande erschien nach dem Waschen mit Pufferlösung (Spur 4) in der Probe des S-Eluates 1 auf Spur 5, wo einzig diese Bande zu sehen ist. Das S-Eluat 2 auf Spur 6 enthielt keine Proteinbanden; ebenso wenig wie die zur Reinigung verwendete 0,1 M Natronlauge auf Spur 7. Der an der 20 kDa-Bande verarmte Durchlauf S (Spur 9) wurde auf die Q-Membran gegeben. Der entstandene Durchlauf Q ist wiederum um die 40 kDa-Bande reduziert (Spur 11), die im Q-Eluat 1 (Spur 13) wiederzufinden ist. Die Erhöhung der Salzkonzentration im Q-Eluat 2 (Spur 14) brachte keine weiteren Banden.

Qualitativ ist die Abtrennung der Zielproteingruppen Patatin und Protease-Inhibitoren mit einer Masse von 40 kDa bzw. 20 kDa sehr gut gelungen. Dies ist sowohl bei den UV-Peaks wie auch bei dem SDS-Gel klar zu sehen. Wie auf dem SDS-Gel zu erkennen ist, wurde die 40 kDa-Bande vollständig entfernt, die 20 kDa-Bande ist kaum zu sehen. Die einzig verbliebene Bande liegt bei 15 kDa. Es handelte sich dabei vermutlich um Protease-Inhibitoren, die aufgrund ihrer abweichenden pI-Werte nicht gebunden wurden.

6.5 Langzeitstabilitätstest von Sartobind 6.600 cm²-Modulen (SingleSep)

Im Labormaßstab wurde bereits festgestellt, dass eine große Anzahl von Zyklen die Aufnahmekapazität der Membranmodule senkte [7]. So kam es bei Aufgabe von KFW nach 35 Zyklen zu einer deutlichen Abnahme des UV-Signals. In diesen Versuchen sollte nun untersucht werden, in wieweit mehrfaches Beladen und Eluieren sich negativ auf die Bindungskapazität der Sartobind 6600 cm²-Module auswirkt. Dazu wurden vier Zyklen in Folge ohne Reinigung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Zyklen sind in Abbildung 6.9 dargestellt.

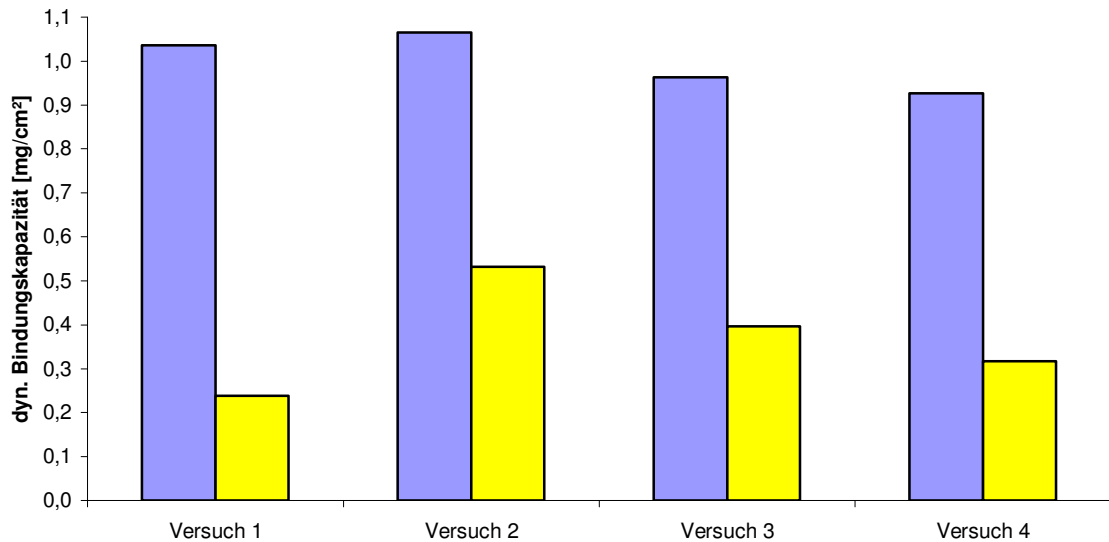


Abbildung 6.9: Bindungskapazitäten bei Langzeittests von Sartobind SingleSep-Modulen Q-Typ (gelb) und S-Typ (blau)

Es ist zu sehen, dass das Maximum der Bindungskapazitäten erst beim zweiten Zyklus erreicht wurde. Beim S-Adsorber wurde eine maximale Bindungskapazität von $1,07 \text{ mg/cm}^2$ erreicht. Beim Q-Adsorber wurde $0,53 \text{ mg/cm}^2$ erzielt. Danach sanken die Bindungskapazitäten bei beiden Modulen wieder leicht ab. Der Mittelwert des S-Adsorbers lag bei $1,00 \text{ mg/cm}^2$ bei einer mittleren Abweichung von $5,3 \%$. Die Werte belegten recht konstante Bindungskapazitäten während der vier Zyklen. Dagegen zeigte die mittlere Abweichung von $25,2 \%$ vom Mittelwert $0,37 \text{ mg/cm}^2$ beim Q-Adsorber beträchtliche Differenzen bei den Zyklen. Dem leichten Absinken der Bindungskapazitäten braucht keine große Bedeutung beigemessen zu werden, da es bereits bei den in einer vorherigen Arbeit durchgeführten Versuchen zu Schwankungen bei den 15 cm^2 -Membranadsorber-Modulen des Q-Typs während des Langzeitstabilitätstests kam. Diese Unregelmäßigkeiten zogen sich durch alle 35 Zyklen jenes Tests [7]. Durch die im Vergleich geringe Anzahl von Zyklen, war es nicht möglich, die Anzahl an durchführbaren Zyklen bis zur Verblockung zu bestimmen. Eine höhere Zykluszahl hätte eine Versuchszeit von mehreren Tagen ergeben. Dies hätte ohne Reinigung unweigerlich zu Membranfouling durch die auf den Membranen verbliebenen KFW-Rückstände geführt. Zudem war eine Lagerung des benötigten Mikrofiltrates

über diesen Zeitraum aufgrund der raschen Alterung nicht möglich. Mit $15,2 \text{ L/m}^2$ Beladungsvolumen gegenüber $0,7 \text{ L/m}^2$, war die Belastung der 6600 cm^2 -Module allerdings 23mal höher als bei den 15 cm^2 -Modulen des Langzeittests. Diese Feststellung gibt Anlass zu der Annahme, dass unter ähnlichen Beladungsbedingungen wie bei den 15 cm^2 -Modul-Langzeitversuchen die bislang durchgeführte Anzahl von vier Zyklen bei den 6600 cm^2 -Modulen noch weit übertroffen werden kann.

Auffällig an diesen Versuchen waren die hohen Bindungskapazitäten, die im Vergleich zu den Laborversuchen erzielt wurden. Die 15 cm^2 -Membran-Module erreichten mit S-Typ-Membranen eine Bindungskapazität von $0,67 \text{ mg/cm}^2$ und bei Q-Typ-Membranen $0,23 \text{ mg/cm}^2$. Da die Ergebnisse der Technikumsversuche bei beiden Modulen und je vier Zyklen gemessen wurden, handelte es sich um eine systematische Abweichung. Ein Zusammenhang mit der Reihenfolge der Schaltung der Q- und S-Typ-Module wurde nicht gefunden. Eben sowenig fand sich eine eindeutige Verbindung zwischen Beladungsmenge und Bindungskapazität. Da auch dieselbe Art von Membranen verwendet wurde, könnte der Unterschied durch die Modulbauart hervorgerufen worden sein.

6.6 Zusammenfassung

Die Isolation der Kartoffelproteine im Technikumsmaßstab war erfolgreich. Anhand der UV-Peaks und der SDS-Gele war klar zu erkennen, dass die Aufarbeitung mit sehr hoher Reinheit erfolgte. Die Bindungskapazitäten der 6600 cm^2 -Module überstiegen mit $0,37 \text{ g/cm}^2$ für Q-Module und $1,00 \text{ g/cm}^2$ für S-Module die der Laborversuche. Langzeitstudien mit den Adsorbentien bezüglich des Verhaltens der Bindungskapazität wären für eine weitere Optimierung sinnvoll. Vorerst sollte die Reinigung der Module nach spätestens 5 Zyklen durchgeführt werden, so dass gewährleistet ist, dass die Bindungskapazität möglichst unverändert bleibt.

7 Prozessschritt 2b: Alternative Isolierung von Kartoffel- fruchtwasser mittels neuartiger Q- und S-Typ- Sartobind Direct-Wickelmodule

7.1 Einleitung

Aufgrund des hohen Filtrations-Aufwandes bei der Herstellung eines für Membranadsorber geeigneten Mediums, wurden in diesen Versuchen neuartige Membranadsorber-Wickelmodule (Sartobind Direct-Wickelmodule) verwendet, die von der Sartorius AG entwickelt wurden, um vorherige Filtrationen unnötig zu machen. Die Skizze eines Sartobind Direct-Wickelmoduls ist in Abbildung 7.1 abgebildet.

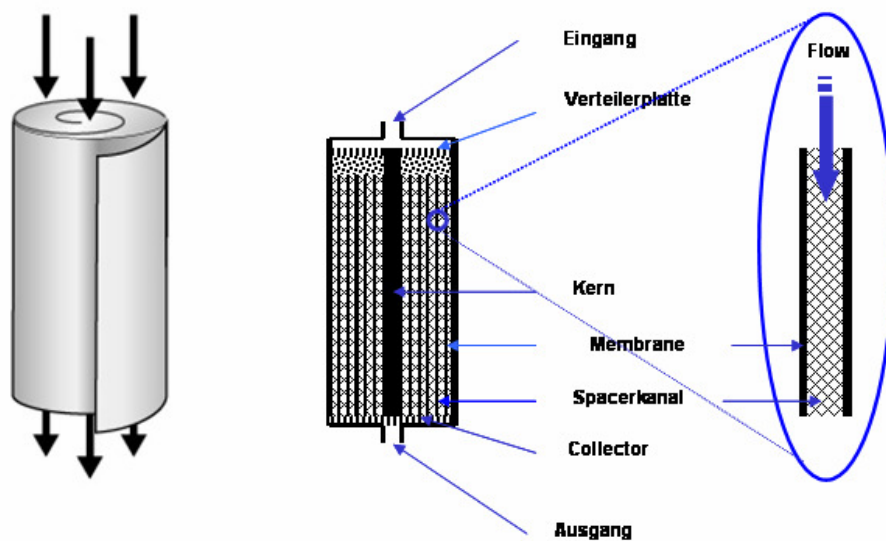


Abbildung 7.1: Skizze des Sartobind Direct-Wickelmoduls der Firma Sartorius AG

Die Module sind äußerlich den Membranadsorber-Wickelmodulen (MultiSep, SingleSep) sehr ähnlich. Auch ihre Membranen sind mit denselben funktionellen Gruppen belegt. Allerdings unterscheiden sie sich wesentlich durch die Betriebsart von ihnen. In den herkömmlichen Membranadsorber-Modulen (MultiSep,

SingleSep) durchströmt das Medium die gewickelten Membran-Lagen frontal im Dead-end-Modus, wohin gegen bei den Sartobind Direct-Wickelmodulen der Mediumstrom mehrfach tangential an den Membranen vorbeigeleitet wird. Dies wird möglich durch Polymer-Spacer, die Freiräume zwischen den Membranlagen schaffen. Durch diese kann das Medium das Modul ungehindert passieren. Dabei werden die zu adsorbierenden Wertstoffe wie Proteine an der Oberfläche der Membran gebunden und diffundieren ins Innere der Membranen. Ebenso können sie danach eluiert werden. Der Vorteil dieser Bauart ist die Vermeidung von Verblockungen und die damit verbundene Möglichkeit der Rezirkulierung des Mediums. Durch die Spacer verringert sich allerdings die Flächendichte der Membranmodule.

7.2 Membranadsorption von Kartoffelfruchtwasser an einem Sartobind Direct-Wickelmodul

Die Versuche wurden mit der in Kapitel 6.4 bereits beschriebenen Technikumsanlage durchgeführt. Für das Waschen und Eluieren mit den Pufferlösungen wurde eine externe Pumpe (Sartocon-Jet) verwendet, die eine niedrigere Pumpgeschwindigkeit unterhalb von 2 L/min gewährleistete. Für spätere Versuche wurde dann die zur Anlage gehörende Beladungspumpe genutzt. Es wurden S- oder Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodule verwendet (Gewebedicke: 0,24 mm, extrudiert, Membranfläche: 13568 cm² bzw. 13145 cm²). In Abbildung 7.2 ist die Technikumsanlage zu sehen, die für die Versuche mit den Sartobind Direct-Wickelmodulen leicht verändert wurde, so dass die erforderliche Rezirkulation in den Beladungsbehälter erfolgen konnte.

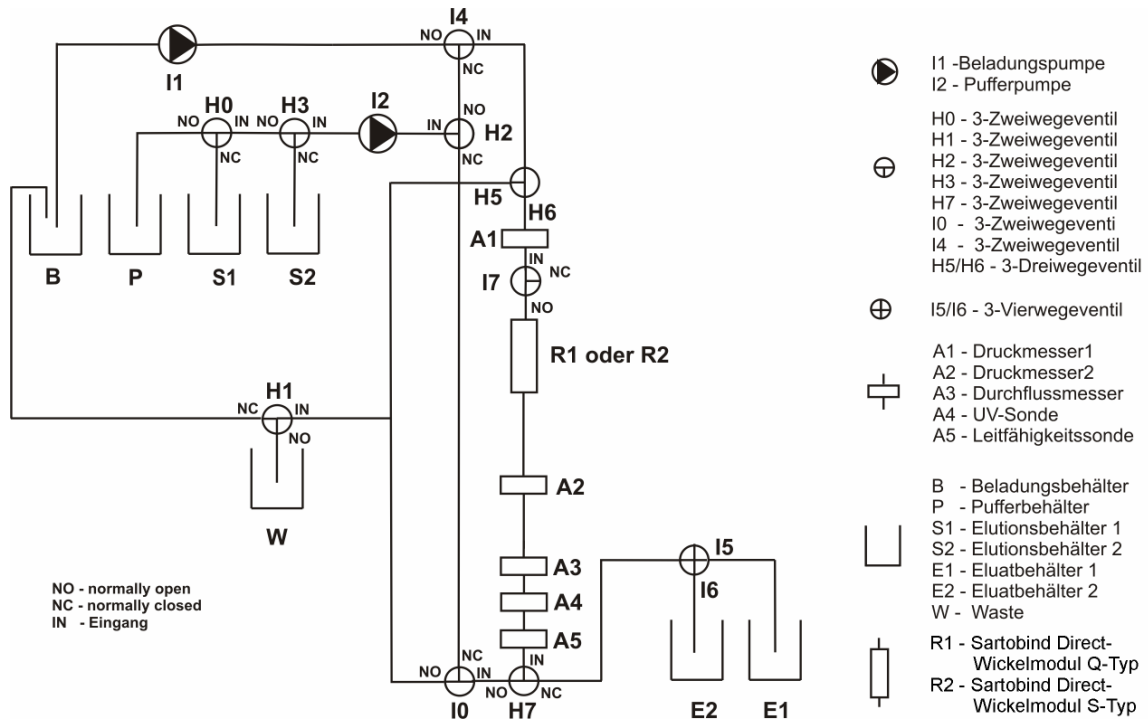


Abbildung 7.2: Schematische Darstellung der 1 m²-Technikumsanlage zur Isolierung von Kartoffelproteinen aus Kartoffelfruchtwasser mit Sartobind Direct-Wickelmodulen

Zunächst wurde das Sartobind Direct-Wickelmodul mit 4 L/min NaPP (20 mM, pH 7) equilibriert. Dabei wurden die Wasserwerte bei unterschiedlichen Drücken des Moduls bestimmt.

7 L mit VE-Wasser 1:5 verdünntes KFW wurden nun im Kreis mit 8 L/min durch das Sartobind Direct-Wickelmodul gefahren, wobei zuvor 8 L verworfen wurden, die dazu dienten den Puffer aus den Schläuchen zu verdrängen. Während der Versuche wurde in 5 min-Abständen eine 15 mL-Probe aus dem KFW-Behälter entnommen und eingefroren. Nach einer Beladungszeit von 20 min wurde erneut NaPP (20 mM, pH 7) durch das Modul geleitet (Pumpgeschwindigkeit: 4 L/min). Anschließend wurden die Proteine erst mit 0,5 M NaCl, dann mit 1 M NaCl eluiert. Am Ende wurde wieder mit NaPP equilibriert (Pumpgeschwindigkeit: 4 L/min). Die Reinigung der Wickelmodule erfolgte mit 0,1 M-0,5 M Natronlauge.

7.3 Beurteilung der Druckverläufe während der Prozesse

Um das Sartobind Direct-Wickelmodul mehrfach einsetzen zu können, ist es wichtig, dass es bei seiner Verwendung nicht zu einem Anstieg des Druckes kommt. Dies würde auf eine Verblockung des Moduls hindeuten, die weitere Beladungszyklen be- oder sogar verhindern würde.

In Tabelle 7.1 und Tabelle 7.2 sind drei Druckverläufe eines Q- und S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls während der Beladung mit 1:5 verdünntem Labor-KFW dargestellt.

Tabelle 7.1: Druckverläufe am Ein- und Ausgang des Q-Typ Sartobind Direct-Wickelmoduls während der Beladung mit Labor-KFW

t [min]	Volumenstrom [L/min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
		p _{ein} [bar]	p _{aus} [bar]	p _{ein} [bar]	p _{aus} [bar]	p _{ein} [bar]	p _{aus} [bar]
0	7,8	1,8	0,8	1,6	0,7	1,6	0,7
5	7,8	1,7	0,8	1,6	0,7	1,6	0,7
10	7,8	1,6	0,8	1,6	0,7	1,6	0,7
15	7,8	1,6	0,8	1,6	0,7	1,6	0,7
20	7,8	1,6	0,8	1,6	0,7	1,6	0,7

Tabelle 7.2: Druckverläufe am Ein- und Ausgang des S-Typ Sartobind Direct-Wickelmoduls während der Beladung mit Labor-KFW

t [min]	Volumenstrom [L/min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
		p _{ein} [bar]	p _{aus} [bar]	p _{ein} [bar]	p _{aus} [bar]	p _{ein} [bar]	p _{aus} [bar]
0	8,0	1,9	0,8	2,0	0,8	2,0	0,8
5	8,0	1,9	0,8	2,0	0,8	2,0	0,8
10	8,0	1,9	0,8	2,0	0,8	2,0	0,8
15	8,0	1,9	0,8	1,9	0,8	2,0	0,8
20	8,0	1,9	0,8	1,9	0,8	2,0	0,8

Es konnte festgestellt werden, dass der Druck der verschiedenen Zyklen während der 20 minütigen Beladungen der Q- und S-Typ-Wickelmodule konstant blieb. Die Messgenauigkeit betrug dabei $\pm 0,1$ bar. Das KFW in der Verdünnung 1:5 bereitete den Sartobind Direct-Wickelmodulen innerhalb der drei nacheinander durchgeführten Zyklen keinerlei Verblockungsprobleme. Bei den Equilibrierungen

mit NaPP betrug der Eingangsdruck der Versuche in der Regel $0,6 \text{ bar} \pm 0,1$. Der Ausgangsdruck betrug $0,2 \text{ bar} \pm 0,1$. Bei den Elutionen lagen die Ein- und Ausgangsdrücke bei Elutionsgeschwindigkeiten zwischen $0,4$ und 2 L/min unterhalb von $0,3 \text{ bar} \pm 0,1$.

7.4 Beurteilung des Trübungsverhaltens während der Prozesse

Obwohl die Spacer dafür sorgen sollen, dass das Medium möglichst ungehindert durch das Modul fließen kann, kommt es bei Membranprozessen in der Regel zu Fouling-Effekten auf den Membranen. Inwieweit dies auch bei den Sartobind Direct-Wickelmodulen der Fall war, wurde in diesem Kapitel beschrieben. Während der Durchführung der Versuche wurde in unterschiedlichen Zeitabständen die Trübung des Fruchtwassers gemessen. In Abbildung 7.3 sind die Ergebnisse einiger Versuche dargestellt.

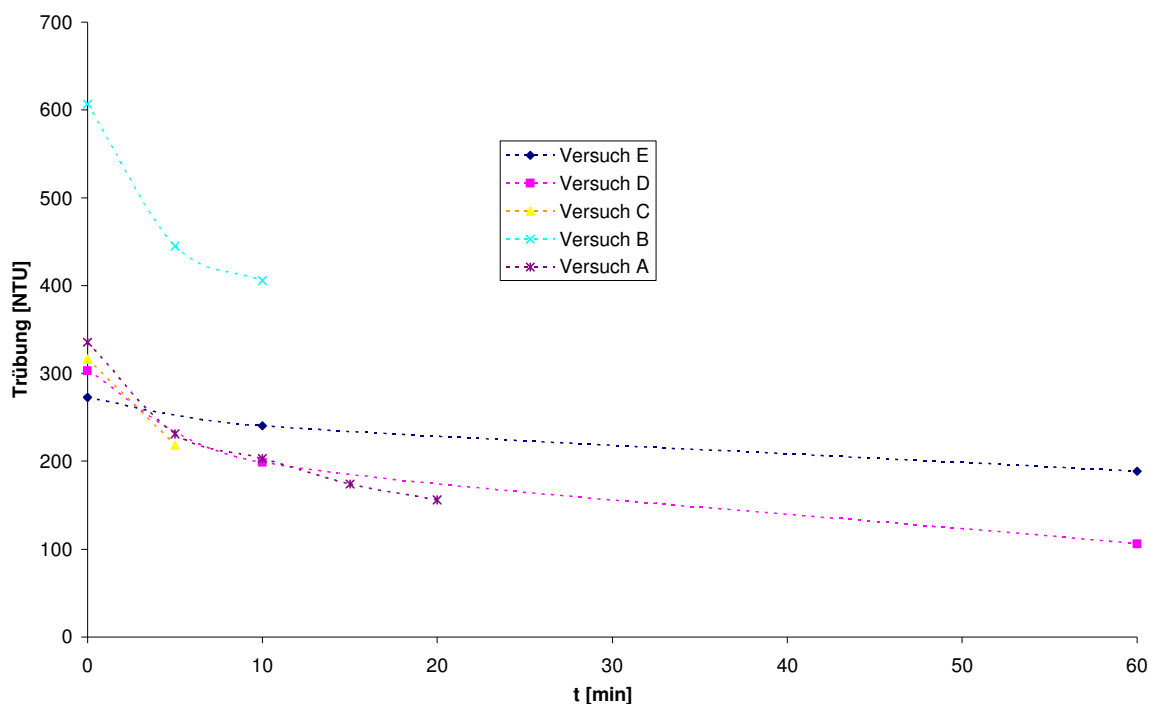


Abbildung 7.3: Trübungsverhalten verschiedener KFW-Versuche (1:5 verdünnt mit VE-Wasser) während der Beladung des Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls über die Zeit

Die Anfangstrübung des 1:5 verdünnten KFWs war teilweise sehr unterschiedlich und lag im Bereich zwischen 200 und 600 NTU. Es wurde in allen Sartobind Direct-Wickelmodul-Versuchen eine exponentielle Abnahme der Trübung über die Zeit ermittelt, die bei einer Beladungszeit von 60 min eine Sättigung im Bereich von 100-200 NTU erreichte. Dies lässt darauf schließen, dass es zu Feststoffablagerungen im Modul kam. Die abschließende Reinigungslösung des Moduls (Natronlauge) färbte sich im Laufe der Zeit leicht gelb. Dies belegte die Vermutung, dass es zu Ablagerungen auf dem Modul kam. Eine Korrelation zwischen der Anfangstrübung und der Bindungskapazität konnte nicht ermittelt werden. Ebenso wenig ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Trübungsrückgang, als der Differenz von Anfangs- und Endtrübung, und der Bindungskapazität.

7.5 Langzeitstabilitätstests der Sartobind Direct-Wickelmodule

Für die Prüfung auf eine Einsetzbarkeit der Sartobind Direct-Wickelmodule anstelle der konventionellen Membranadsorber-Module sollte, neben einer hohen Bindungskapazität, auch die Wiederverwendbarkeit der Module getestet werden. Zudem wurde untersucht, ob es dabei einen Unterschied zwischen Labor- und Prozess-KFW gab. Dazu wurden in einem Versuch drei Zyklen mit Labor-KFW hintereinander durchgeführt, ohne zwischenzeitliche Reinigung mit Natronlauge. Mit dem Prozess-KFW wurden 5 Zyklen auf diese Weise durchgeführt. In Abbildung 7.4 sind die Ergebnisse für den Q-Typ aufgelistet.

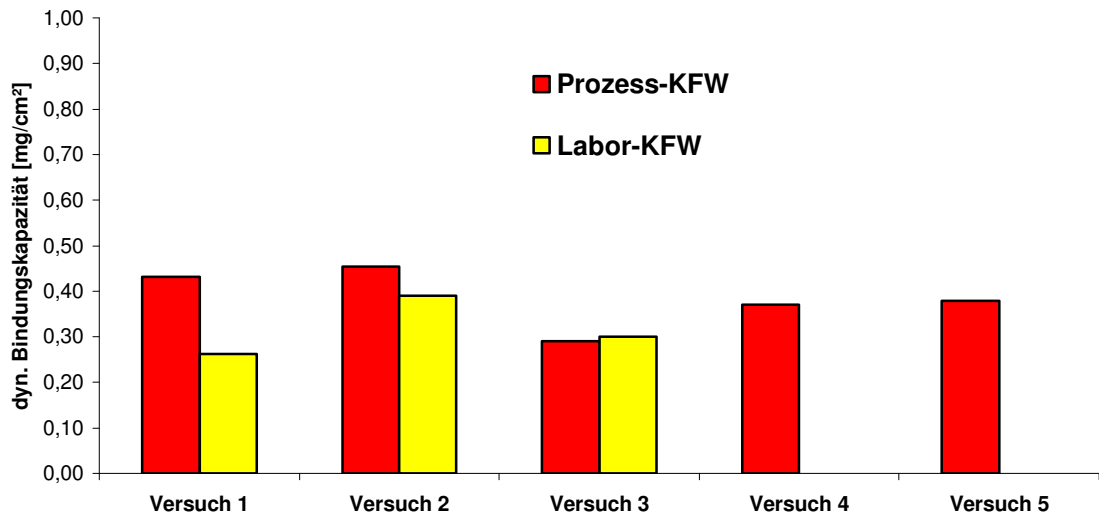


Abbildung 7.4: Bindungskapazitäten der Langzeittests von Prozess- und Labor-KFW mit Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul

Die mittleren Bindungskapazitäten von Prozess- und Labor-KFW für Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodule erreichten $0,39 \text{ mg/cm}^2$ und $0,32 \text{ mg/cm}^2$. Innerhalb der drei Zyklen des Labor-KFW kam es zu Schwankungen von 15,3 %. Bei denen mit Prozess-KFW lagen sie bei durchschnittlich 12,1 %. Die Bindungskapazitäten befanden sich im Bereich des Wertes, der mit gewöhnlichen Membranadsorber-SingleSep-Modulen (6600 cm^2) erzielt wurde ($0,37 \text{ mg/cm}^2$). Die Versuche mit 15 cm^2 -Modulen zeigten jedoch geringere Bindungskapazitäten ($0,23 \text{ g/cm}^2$). Es konnte keine eindeutige Tendenz einer Verringerung der Bindungskapazitäten im Laufe der fünf Versuche festgestellt werden. In Abbildung 7.5 sind die Elutionsvolumina der Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul-Versuche zu sehen. Während die Volumina beim Labor-KFW um einen Mittelwert von 7,8 L schwankten, lag das durchschnittliche Volumen beim Prozess-KFW mit 14,2 L, bedingt durch stärkeres Tailing, deutlich höher. Dies lässt sich durch die Alterung des Prozess-Fruchtwassers erklären, welches im Gegensatz zum Labor-KFW über Nacht bei 5° C gelagert wurde.

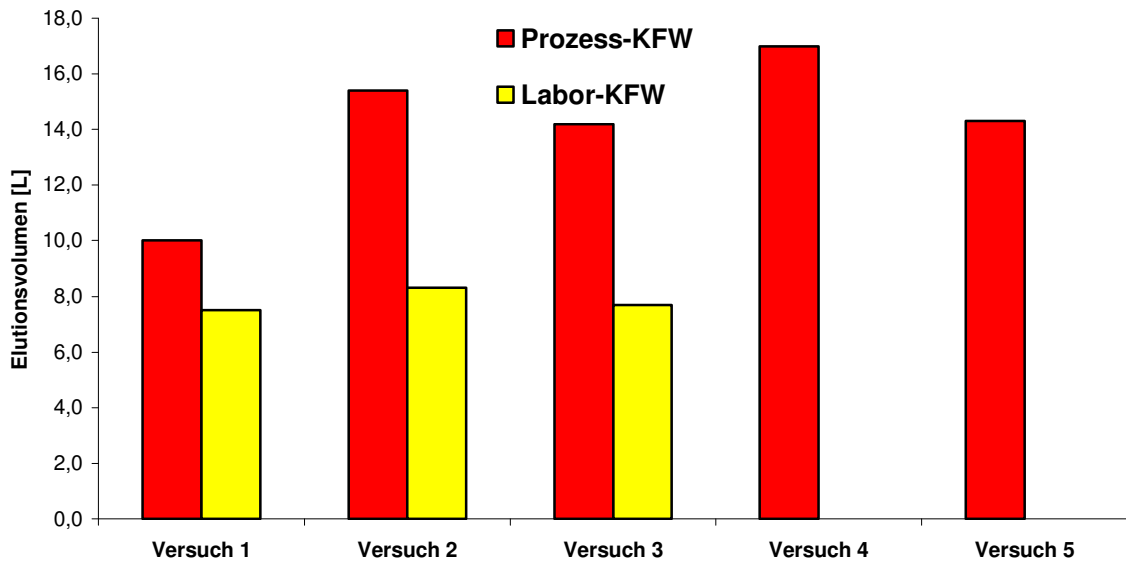


Abbildung 7.5: Elutionsvolumina der Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul-Versuche mit Prozess- und Labor-KFW

Die gleichen Untersuchungen wurden auch mit den S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodulen durchgeführt. In Abbildung 7.6 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt.

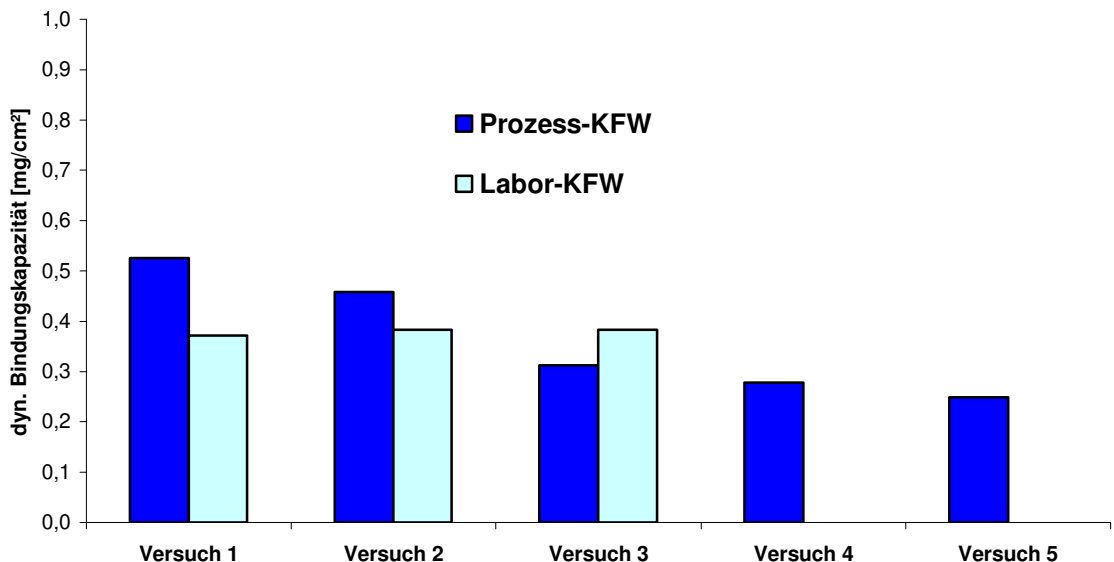


Abbildung 7.6: Bindungskapazitäten der Langzeittests von Prozess- und Labor-KFW mit S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul

Beim S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul waren die mittleren Bindungskapazitäten von Prozess- und Laborfruchtwasser mit $0,36 \text{ mg/cm}^2$, bzw. $0,38 \text{ mg/cm}^2$ nahezu identisch. Es kam jedoch bei den Versuchen mit Prozess-KFW zu einer stetigen Verringerung, bis hin zur Halbierung der Bindungskapazitäten.

In Abbildung 7.7 sind die Elutionsvolumina der S-Sartobind Direct-Wickelmodul-Versuche zu sehen.

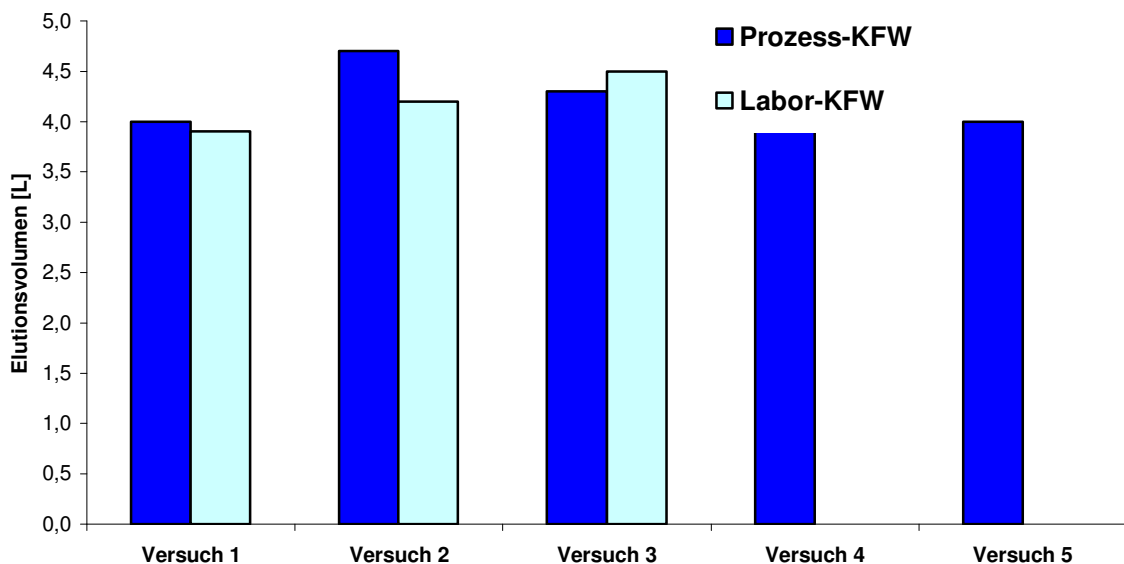


Abbildung 7.7: Elutionsvolumina der S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul-Versuche mit Prozess- und Labor-KFW

Die benötigten mittleren Elutionsvolumina bei Prozess- und Labor-KFW waren mit 4,2 L identisch. Die mittleren Abweichungen betragen 5,3 % bzw. 4,8 %. Während der fünf Zyklen kam es, wie schon bei den Bindungskapazitäten, zu einem geringen Abfallen der Werte beim Prozess-KFW.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Versuchen mit S-Sartobind Direct-Wickelmodulen nur minimale Unterschiede zwischen Prozess- und Labor-KFW festgestellt wurden. Jedoch gab es beim Prozess-KFW eine leichte Tendenz zu geringer werdenden Bindungskapazitäten und Elutionsvolumina. Dagegen kam es zu tailing-bedingten Abweichungen bei den Elutionsvolumina der Versuche mit Q-

Sartobind Direct-Wickelmodulen. Der mögliche Grund dafür war die Alterung des KFWs, die sich offensichtlich stärker bei den Proteinen der Q-Fraktion auswirkt.

7.6 Variation der Elutionsgeschwindigkeit

Um die Dauer eines Sartobind Direct-Wickelmodul-Zyklus zu reduzieren, ist es denkbar, die Elutionsgeschwindigkeit zu erhöhen. Diese Erhöhung könnte jedoch zur Folge haben, dass die Elution mit einem höheren Verbrauch an Eluenten verbunden ist oder die Elutionspeaks weniger scharf aufgelöst werden. Als Resultat würde die vermeintlich kürzere Zykluszeit durch höhere Verbrauchskosten unökonomisch. Um festzustellen, ob eine Optimierung der Elutionsgeschwindigkeit möglich ist, wurden drei Zyklen auf die gleiche Art mit gleicher Beladung aber unterschiedlichen Elutionsgeschwindigkeiten von 0,2 L/min, 0,4 L/min und 1 L/min durchgeführt. In Abbildung 7.8 sind die Ergebnisse dieser Versuche abgebildet.

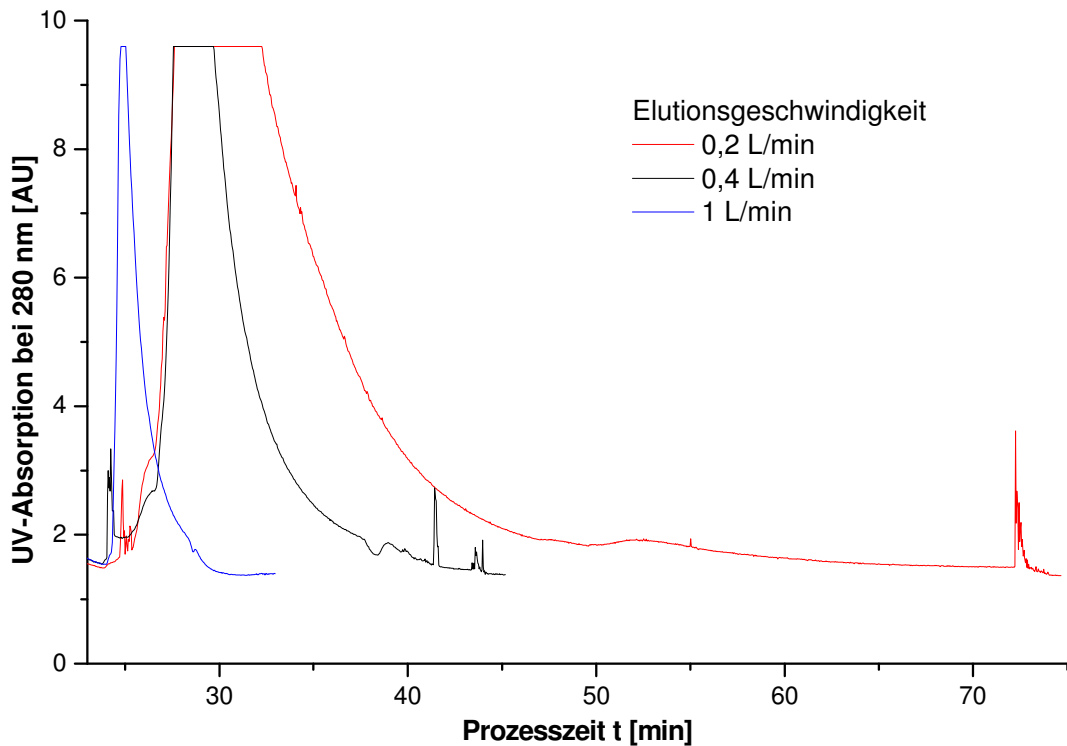


Abbildung 7.8: UV-Werte der S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul-Versuche über die Zeit bei Elutionsgeschwindigkeiten von 0,2 L/min, 0,4 L/min und 1 L/min

Die Elutionspeaks zogen sich mit abnehmender Elutionsgeschwindigkeit immer mehr in die Breite. Durch die Zunahme der Elutionsgeschwindigkeit von 0,2 L/min auf 1 L/min konnte die Zyklusdauer von ca. 70 min auf 33 min halbiert werden. Dabei wurde statt 3,9 L Elutionslösung 4,5 L verbraucht und damit die Konzentration dieser Proteinlösung auf 70 % verringert.

Durch die Erhöhung der Elutionsgeschwindigkeit wurde der Verbrauch des Eluenten gesteigert. Bei einer Erhöhung des Eluentenverbrauchs von 3,9 L auf 4,5 L (+15 %) sank die Elutionsdauer von 22 min auf 4,4 min (-78 %). Der Gewinn dieser Zeit, würde es ermöglichen mehr Zyklen am Tag durchzuführen. Die geringe Erhöhung der Kosten scheint daher vertretbar.

7.7 Variation der Beladungsdauer des Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls

Neben der Elutionsgeschwindigkeit trägt auch die Beladungsdauer wesentlich zur Dauer eines Sartobind Direct-Wickelmodul-Zyklus bei. Die vorherigen Sartobind Direct-Wickelmodul-Versuche wurden auf Anraten des Herstellers (Sartorius AG) mit einer Beladungsdauer von 20 min durchgeführt. Es wurde dabei davon ausgegangen, dass bei dieser Dauer die maximale Bindungskapazität erreicht wird. Um die Zyklus-Zeit zu optimieren, wurden in diesen Versuchen verschiedene Beladungsdauern von 5-60 min getestet. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 7.9 dargestellt.

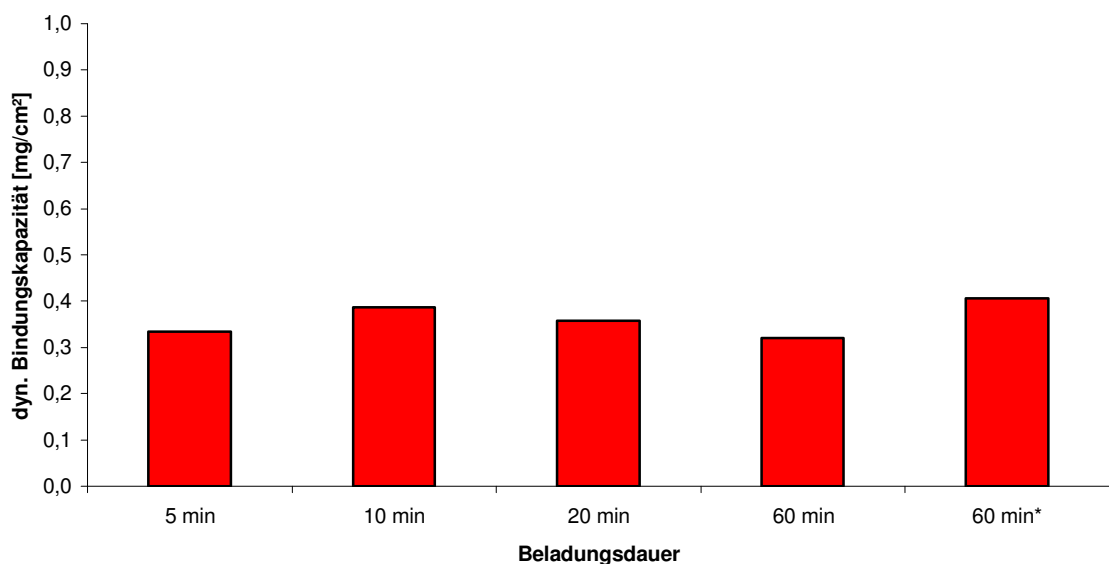


Abbildung 7.9: Optimierung der Beladungsdauer des Q-Sartobind Direct-Wickelmodul (Beladungsgeschwindigkeit = 8 L/min, * = 2 L/min)

Die höchste Bindungskapazität wurde mit 0,41 mg/cm² bei einer Beladungsdauer von 60 min erzielt, die niedrigste bei einer Beladungsdauer von 5 min. Eine lange Beladungszeit war demnach generell günstig zur Erzielung einer hohen Bindungskapazität. Eine Ausnahme bildete der Versuch mit einer Beladungszeit von 20 min, bei dem die Bindungskapazität mit 0,36 mg/cm² ein wenig unterhalb der des Versuches mit einer Beladungszeit von 10 min mit einer Bindungskapazität von 0,39 mg/cm² lag. Der Versuch mit einer Beladungsdauer von 60 min

und einer Beladungsgeschwindigkeit von 8 L/min wurde bei diesen Betrachtungen nicht berücksichtigt, da es aufgrund der langen Pumpdauer bei hoher Geschwindigkeit zu einer starken Erwärmung der Pumpe und damit des KFW-Vorlagebehälters auf 29 °C kam. Da Patatin sehr temperaturempfindlich ist, scheint dies der Grund dafür zu sein, dass die Bindungskapazität mit 0,32 mg/cm² die niedrigste war. Generell lagen alle Bindungskapazitäten relativ dicht beieinander, so dass die schon bei vorherigen Versuchen beobachteten Schwankungen über mehrere Zyklen berücksichtigt werden müssen.

Lange Beladungszeiten führten bei den Versuchen zu leicht höheren Bindungskapazitäten. Da diese allerdings im Bereich der Zyklus-Schwankungen lagen, scheinen Beladungsdauern von 10 min für die Erreichung der maximalen Bindungskapazität auszureichen. Dies könnte durch die Durchführung von Langzeitstudien weiter optimiert werden.

7.8 Reinigung der Sartobind Direct-Wickelmodule

Wie schon in Kapitel 7.4 gezeigt werden konnte, kam es auch auf den Sartobind Direct-Wickelmodulen zur Ablagerungen von Verunreinigungen. Infolge dessen war eine Reinigung der Module notwendig. Im Folgenden ist die Optimierung der Reinigungsprozedur für Sartobind Direct-Wickelmodule beschrieben. Diese erfolgte nach fünf Methoden, die jeweils im Anschluss an einen Zyklus durchgeführt wurden. Als Betriebsart wurden sowohl Dead-end-Spülungen als auch Rezirkulationen verwendet. Es ist bereits bekannt, dass höhere Konzentrationen und Temperaturen, ebenso wie längere Reinigungszeiten, einen positiven Einfluss auf die Reinigung der Membranen haben. Dieses Wissen wurde für die Methodenentwicklung genutzt.

In Tabelle 7.3 sind die verschiedenen Methoden mit ihren Ergebnissen aufgeführt.

Tabelle 7.3: Reinigungsmethoden für ein Sartobind Direct-Wickelmodul

Methode	Reinigungsschritt	Dauer	Flussrate	V	p _{ein}	p _{aus}	UV-Wert	UV-Wert	T	Betriebsart
		[min]	[L/min]	[L]	[bar]	[bar]	Start [AU]	Ende [AU]	[°C]	
A	NaPP (20 mM, pH=7)	2	4	8	0,5	0,2	1,85	1,40	20	dead-end
	NaOH (0,1M)	30	5	10	0,6	0,3	3,20	1,40	45	Rezirkulation
	NaPP (20 mM, pH=7)	1	4	5	0,5	0,2	1,40	0,89	20	dead-end
	gesamt	33								
B	NaPP (20 mM, pH=7)	2	4	8	0,5	0,2	n.b.	n.b.	20	dead-end
	NaOH (0,1M)	20	5	10	0,6	0,3	3,50	1,85	40	Rezirkulation
	NaPP (20 mM, pH=7)	1	4	5	n.b.	n.b.	1,85	1,01	20	dead-end
	gesamt	23								
C	NaPP (20 mM, pH=7)	2	4	8	0,5	0,2	1,68	1,37	20	dead-end
	NaOH (0,1M)	10	5	10	0,6	0,3	1,95	1,50	45	Rezirkulation
	Citronensäure (0,5 %)	1	5	5	0,6	0,2	1,50	0,81	22	dead-end
	NaPP (20 mM, pH=7)	1	4	5	0,5	0,2	0,81	0,97	20	dead-end
gesamt	14									
D	NaPP (20 mM, pH=7)	2	4	8	0,5	0,2	1,87	1,43	20	dead-end
	NaOH (0,1M)	2	5	10	0,6	0,3	3,50	1,80	43	dead-end
	Citronensäure (0,5 %)	1	5	5	0,5	0,2	1,80	1,19	20	dead-end
	NaPP (20 mM, pH=7)	1	4	5	0,5	0,2	1,19	1,16	20	dead-end
gesamt	6									
E	NaPP (20 mM, pH=7)	2	4	8	0,5	0,2	1,78	1,39	20	dead-end
	NaOH (0,1M)	2	5	10	0,6	0,3	4,50	1,74	43	dead-end
	Citronensäure (0,5 %)	2	5	10	0,5	0,2	1,74	1,22	21	dead-end
	NaPP (20 mM, pH=7)	1	4	5	0,5	0,2	1,22	1,26	20	dead-end
gesamt	7									

Anhand des UV-Wertes kann der Grad der Verunreinigungen, die am Ausgang des Moduls austreten, verfolgt werden. Ist der UV-Wert hoch, wurden viele Verunreinigungen im Lösungsmittel ausgewaschen, andernfalls wenige. Während des Waschvorgangs mit NaPP (20 mM, pH 7) nahm der UV-Wert bei allen fünf Versuchen ab, allerdings nicht auf den ursprünglichen Wert. Bei der Reinigung mit Natronlauge kam es bei allen fünf Versuchen zu einem schnellen Anstieg des UV-Wertes, gefolgt von einem flachen Abfall. Hier war erwartungsgemäß die größte Reinigungswirkung zu verzeichnen. Nach der zweiten Wäsche mit NaPP (20 mM, pH 7) hatte Versuch A zusammen mit C den geringsten UV-Wert. Dies spricht dafür, dass hier die effektivsten Reinigungen stattfanden. Die 30 minütige Reinigung mit Natronlauge in Versuch A war etwas effektiver als die 20 minütige in Versuch B. Die zehnminütige Reinigung mit Natronlauge und anschließender Zitronensäure-Spülung in Versuch C war ebenfalls erfolgreich. Die Reinigung der

Versuche D und E zeigten, dass eine Dead-end-Spülung mit Natronlauge im Verbrauch wesentlich ineffektiver ist als eine Rezirkulation. Aus diesem Grunde scheint eine Reinigung mit Natronlauge für 30 min im Kreis die unkomplizierteste und zugleich effektivste Methode zu sein. Für eine schnellere Reinigung wäre eine höhere Konzentration der Lauge notwendig, die bei einem pH-Wert von über 13 auf Dauer jedoch die Membran schädigen würde. Die längere Nachspülzeit und der höhere Verbrauch an Zitronensäure als Neutralisator wären außerdem unweigerlich mit höheren Kosten verbunden.

7.9 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die Isolierung von Kartoffelproteinen auch mit den Sartobind Direct-Wickelmodulen des Q- und S-Typs erfolgreich ist. Dabei kam es während der Beladungsdauer zu keinerlei Verblockungsproblemen, ebenso wenig wie bei der Durchführung von drei Zyklen, die ohne zwischenzeitliche Reinigung durchgeführt wurden. Allerdings ließ der Abfall der Trübungswerte während der Beladungen auf eine Ablagerung von Verunreinigungen auf der Membran schließen. Die mittleren Bindungskapazitäten von Prozess- und Labor-KFW für Q-Typ Sartobind Direct-Wickelmodule erreichten bei fünf, bzw. drei Zyklen $0,39 \text{ mg/cm}^2$ und $0,32 \text{ mg/cm}^2$. Die Elutionsvolumina betragen $14,2 \text{ L}$, bzw. $7,8 \text{ L}$. Der Unterschied lässt sich mit der Alterung des Prozess-KFWs erklären, welches über Nacht im Kühlraum aufbewahrt wurde. Bei den Versuchen mit S-Typ Sartobind Direct-Wickelmodulen wurden nur minimale Unterschiede zwischen Prozess- und Labor-KFW festgestellt. Die Bindungskapazitäten betragen $0,36 \text{ mg/cm}^2$, bzw. $0,38 \text{ mg/cm}^2$. Das mittlere Elutionsvolumen betrug bei beiden Medien $4,2 \text{ L}$.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Veränderungen der Bindungskapazitäten und Elutionsvolumina über alle Zyklen minimal waren. Durch die Erhöhung der Elutionsgeschwindigkeit auf 1 L/min konnte die Elutionszeit um 78% reduziert werden. Dies geschah auf Kosten eines leicht höheren Eluentenverbrauchs von 15% . Außerdem wurde die optimale Beladungsdauer bei

etwa 10 min bestimmt. Als beste Reinigungsmethode erwies sich 0,1 M Natronlauge, die 30 min rezirkuliert wurde. Die Reinigung sollte auch bei den Sartobind Direct-Wickelmodulen nach 5 Zyklen erfolgen, so dass gewährleistet ist, dass die Bindungskapazität möglichst unverändert bleibt.

8 Prozessschritt 3: Aufreinigung durch Ultra- und Diafiltration

Die Aufarbeitung der Protein-Eluate, die durch die Q- und S-Adsorber (0,5 M NaCl) gewonnen wurden, erfolgte durch Ultra- und Diafiltration im Crossflow-Betrieb. Bei der Ultrafiltration wurde eine Porengröße verwendet, die kleiner war als die der Kartoffelproteine Patatin, bzw. als der Großteil der Protease-Inhibitoren und somit für diese undurchlässig. Dadurch wurde eine Aufkonzentrierung der Lösungen erreicht. Daneben sorgte dieser Prozess-Schritt dafür, dass unerwünschte Bestandteile der Proteinfractionen wie Salze und Proteinfragmente zum größten Teil abgetrennt wurden. Im Anschluss daran wurde die Diafiltration durchgeführt. Dabei wurde dem zuvor hergestellten Proteinkonzentrat kontinuierlich VE-Wasser bzw. Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer zugeführt. Durch die gleichzeitige Filtration kommt es so zu einer fortwährenden Auswaschung der Salzfrachten, ohne die Proteinkonzentration zu verringern. In Abbildung 8.1 ist eine Skizze der Ultra-, bzw. Diafiltrationsanlage dargestellt.

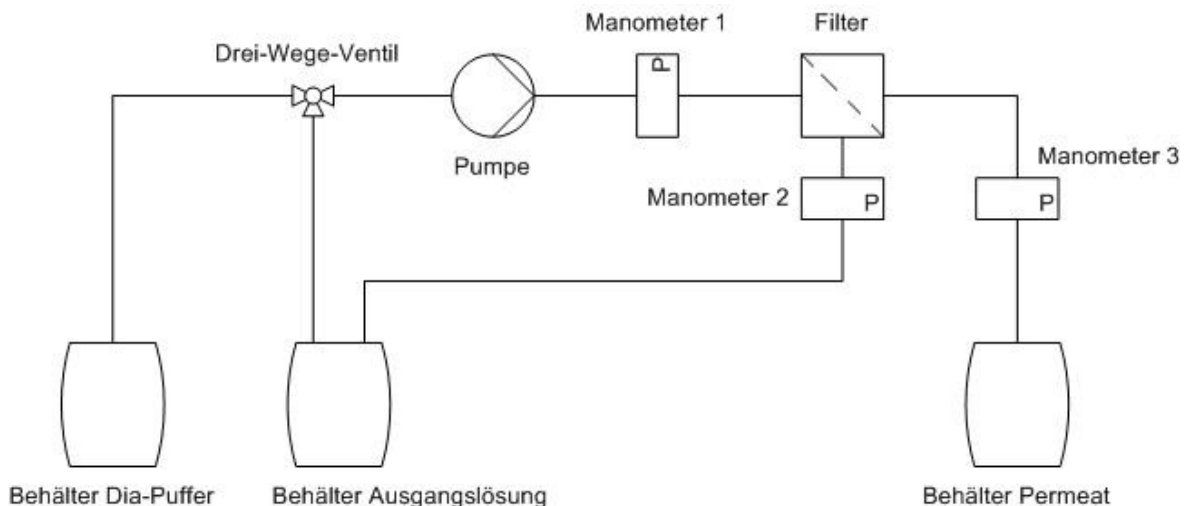


Abbildung 8.1: Skizze der Ultra- und Diafiltrationsanlage

Bei diesem Prozess-Schritt wurden Porengröße, Membranmaterial sowie Diafiltrationspuffer variiert, um ihn zu optimieren.

8.1 Variation der Porengröße

Da das Zielprotein Patatin im Q-Eluat 1 eine Größe von ca. 40 kDa hat, erschien für die Ultrafiltration eine Porengröße von 10 kDa geeignet. Eine Alternative dazu war eine Porengröße von 30 kDa. Diese sollte erwartungsgemäß die Filtrationsleistung aufgrund der größeren Durchlässigkeit erhöhen, führt eventuell aber zu einer qualitativen Veränderung des Retentates. Um dies zu untersuchen, wurde je ein Versuch mit einer 10 kDa- und einer 30 kDa-Hydrosart-Kassette durchgeführt. In Abbildung 8.2 sind die Fluxwerte dieser Versuche gegen die Zeit aufgetragen.

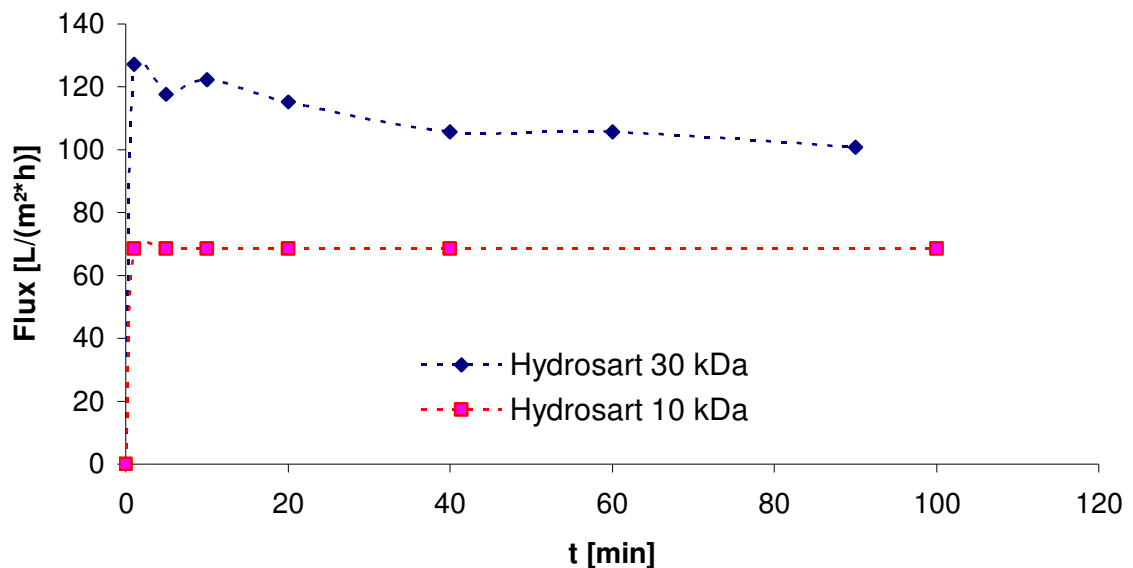


Abbildung 8.2: Vergleich der Fluxwerte von Ultrafiltrationen der Q-Eluate mit 10 kDa- und 30 kDa-Hydrosart-Kassetten über die Zeit ($p_{\text{ein}} = 2,6$ bar)

Während die 10 kDa-Kassette von Beginn an über 100 min einen absolut konstanten Flux von 68 L/(m²·h) annahm, sank der Flux bei der 30 kDa-Kassette innerhalb von 90 min stetig von 127 auf 101 L/(m²·h) ab. Es ist deutlich zu erkennen, dass wie erwartet der Flux mit größerer Porengröße der Kassette zunahm. Gewöhnlich geht ein Abfallen des Fluxes mit einer Deckschichtbildung auf der Membran einher, die durch denaturierte Proteine erzeugt wird. Die Denaturierung kommt normalerweise durch hohe Scherkräfte oder Wärmeentwicklung zustande, die auf die Proteine einwirken. Dagegen ist der über die gesamte Versuchsdauer konstante Flux der 10 kDa-Kassette für die spätere Prozess-

führung von großem Vorteil, da die Kassette offensichtlich nur gering verunreinigt wurde. Durch die verminderte Deckschichtbildung verlängert sich die zur Verfügung stehende Filtrationszeit. Dadurch verringern sich die Anzahl reinigungsbedingter Totzeiten dieser Prozess-Stufe.

Die Reinigung der Kassetten wurde bei mit 5 L 0,1 M Natronlauge bei Raumtemperatur durchgeführt. Diese wurde für 20 min im Kreis rezirkuliert. Der Wasserwert erreichte dabei mit 98 % nahezu den Ausgangswert. Im Falle einer starken Deckschichtbildung auf der Membran sollte entweder die Natronlaugekonzentration oder ihre Temperatur erhöht werden.

8.2 Variation des Membranmaterials

Um zu untersuchen, welches Membranmaterial für die Ultrafiltration der Eluate ideal geeignet ist, wurden Versuche mit 10 kDa-Kassetten aus Hydrosart- und Polyethersulfon (PESU)-Material durchgeführt. In Abbildung 8.3 sind die Fluxwerte dieser Versuche über die Zeit dargestellt.

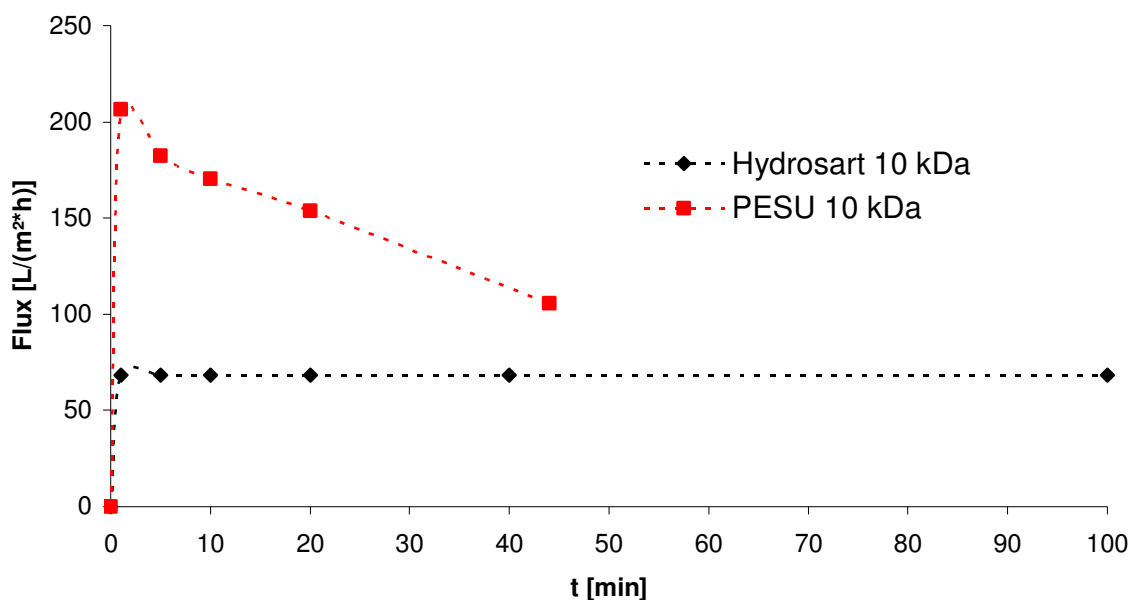


Abbildung 8.3: Vergleich der Fluxwerte von Ultrafiltrationen von Q-Eluat mit 10 kDa-Hydrosart- und PESU-Kassette über die Zeit ($p_{\text{ein}} = 2,6$ bar)

Im Gegensatz zur Hydrosart-Kassette, die einen konstanten Flux von $68 \text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ aufwies, sank der Flux bei der PESU-Membran stetig. Zu Beginn befand sich der Flux auf einem Niveau von $206 \text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$, fiel aber schon nach 44 min auf $106 \text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ ab. Obwohl die Flux-Werte auch nach 44 min noch über dem des Hydrosart-Materials lagen, führte das PESU-Material zu größeren Ablagerungen und erscheint daher für längere Versuche ungeeignet.

Die 10 kDa-Hydrosart-Kassette erwies sich als die am besten geeignete Kassette für die Ultrafiltration, da sie über die gesamte Versuchsdauer konstante Fluxwerte lieferte und daher zu einem geringen Reinigungsaufwand führte.

8.3 Variation des Diafiltrationspuffers

In der Literatur zur Ultrafiltration von KFW wurde Ammonium-Hydrogencarbonat als Diafiltrationspuffer verwendet, welcher deutlich geringere Fouling-Wirkung auf die Membran bewirkte als Wasser [77]. Deshalb wurde bei der Diafiltration der Eluate dieses Prozesses ein Vergleich dieser beiden Puffer durchgeführt. Die Versuche bei einem Eingangsdruck von 2,8 bar ergaben für Q-Eluate, die mit 10 kDa-Hydrosart-Kassetten ultrafiltriert wurden, 48 und $51 \text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$. Die beiden verwendeten Q-Eluate wurden am gleichen Tag auf identische Weise produziert, wobei das zweite einen geringeren Proteingehalt besaß. Das erste dieser beiden Retentate wurde mit VE-Wasser diafiltriert, während für das zweite Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer verwendet wurde. Der Flux mit $58 \text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ war unter identischen Bedingungen von 2,5 bar Eingangsdruck bei beiden Versuchen identisch und blieb konstant. Am Ende unterschieden sich die beiden Versuche nur in der Leitfähigkeit, die bei der Diafiltration mit VE-Wasser mit $1,46 \text{ mS}/\text{cm}$ erwartungsgemäß niedriger lag als bei der Diafiltration mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer mit $8,95 \text{ mS}/\text{cm}$. Der Versuch zeigte, dass die Durchführung der Diafiltration nicht beeinflusst wurde durch die Art des Dia-Puffers.

9 Prozessschritt 4: Trocknung der kartoffelprotein-haltigen Lösungen

Um thermoempfindliche Bioprodukte zu trocknen, ist eine sehr schonende Temperatur-Methode nötig. Nach Art der Trocknung werden Kontaktrockner, Konvektionstrockner und Strahlungstrockner unterschieden. Je nach dem im Trockner herrschenden Druck wird außerdem in Normaldruck- und Vakuumtrockner unterteilt. Für die Trocknung der proteinhaltigen Dia-Retentate der Q- und S-Eluate wurden Gefrier- und Sprühtrocknung miteinander verglichen. Bei der ebenfalls durchgeführten Optimierung wurde mehr Wert auf die Optimierung der Trocknung der Q-Fraktion gelegt, da diese das temperaturempfindlichere Patatin enthielt.

9.1 Gefriertrocknung (Lyophilisierung)

Unter Gefriertrocknung (Lyophilisierung) versteht man im engeren Sinne die sublimative Entfernung von Wasser aus wässrigen Lösungen. Das noch feuchte Produkt wird dabei eingefroren, um anschließend die Feuchtigkeit schonend unter Vakuum aus dem erstarrten Gut über Sublimation zu entfernen. Die Wärmezufuhr erfolgt durch Kontakt, durch Strahlung und, in Abhängigkeit vom Vakuum in der Trocknungskammer, durch Konvektion [106, 107]. Beim Einfrieren wird zunächst Wasser als Eis auskristallisiert und die verbleibende gesättigte Lösung wird aufgrund des weiteren Auskristallisierens von Eis immer mehr aufkonzentriert [108-110]. Für empfindliche Güter ist ein schnelles Einfrieren erwünscht, denn das Produkt erhält dadurch eine große innere Oberfläche mit einer hohen Lösungsgeschwindigkeit [111]. In der Praxis wird die Investitions- und Betriebskosten aufwendige Gefriertrocknung nur bei hochwertigen thermisch empfindlichen Gütern eingesetzt, wenn es auf die Erhaltung gewisser Eigenschaften, wie Aroma, Geschmack und Farbe und gewisser Inhaltsstoffe, wie Eiweiße und Vitamine, ankommt [108].

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Gefriertrocknungen wurde mit einer Alpha-Anlage der Firma Christ gearbeitet. Für die Trocknung wurde Produktlösung auf Glaskolben zu je 150 ml verteilt und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Kolben wurden direkt an den Trockenrechen der Gefriertrocknung angeschlossen und die aus dem Produkt diffundierende Feuchtigkeit in der Kondensatorkammer aufgenommen. Nach 1-2 Tagen konnte das getrocknete Produkt entnommen werden.

9.1.1 Natives Gel

Es wurde bei diesen Versuchen untersucht, ob die entstandenen Lyophilisate noch in nativer Form vorliegen oder denaturiert wurden. In Abbildung 9.1 ist ein natives Gel zu sehen, auf dem die getrockneten Proben aufgegeben worden sind und mit den zur Trocknung verwendeten Retentaten verglichen werden können.

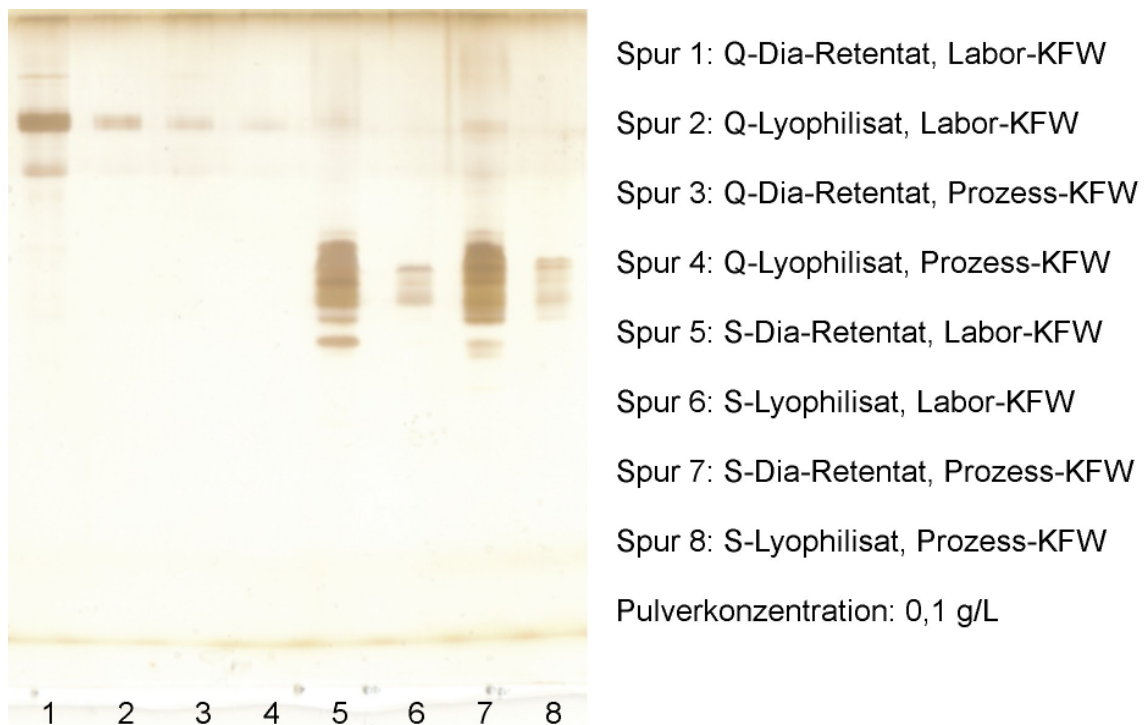


Abbildung 9.1: Natives Gel von mit Q- und S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodulen aus Labor- und Prozess-KFW gewonnenen Retentaten und der zugehörigen Lyophilisate (15 % Tris-HCl, Silberfärbung)

Die Spuren 1 und 2 zeigen die Proben des mit dem Q-Sartobind Direct-Wickelmodul aus Labor-KFW gewonnenen Dia-Retentates und des zugehörigen Lyophilisats. Auf den Spuren 3 und 4 ist das mit einem Q-Sartobind Direct-Wickelmodul aus Prozess-KFW gewonnene Retentat und dessen zugehöriges Lyophilisat dargestellt. Es ist deutlich ein starke obere und eine schwache untere Bande in den Q-Dia-Retentaten des Labor-KFWs zu erkennen. In den Lyophilisaten ist dagegen nur noch die obere Bande in abgeschwächter Form zu erkennen. Ein deutlicher Unterschied der Bandenmuster besteht dagegen bei den S-Dia-Retentaten von Labor- und Prozess-KFW (Spur 5 und 7) gegenüber ihren Lyophilisaten (Spur 6 und 8). Während bei beiden Dia-Retentaten ein dichte Schar von Banden zu erkennen ist, mit einer einzelnen Bande, die ein wenig darunter liegt, sind davon nur noch einige wenige in den Lyophilisaten zu erkennen. Hier scheint es zu einer gravierenden Verminderung der Anzahl an Banden und damit nativen Proteinen gekommen zu sein. Die Gefriertrocknung scheint demnach einen negativen Einfluss auf die Produktqualität gehabt zu haben. Es ist aber insgesamt festzustellen, dass die Produkte der Versuche mit Labor-KFW von denen mit Prozess-KFW aus Emlichheim nicht zu unterscheiden waren.

9.2 Sprühtrocknung

Sprühtrockner, auch Zerstäubungstrockner genannt, überführen flüssige bis pastige Nassgüter und Lösungen in pulvrige Stoffe [108]. Die Sprühtrocknung gehört zur Klasse der konvektiven Trocknung. Sie arbeiten kontinuierlich, zerteilen das Gut in kleine Partikel von ca. 2–400 μm , in Sonderfällen bis 2000 μm , verbreiten die Teilchen in einem Luftstrom, trocknen den schwebenden Teilchenstrom mit der Wärme der erhitzten Luft und trennen ihn wieder ab. Die Zerstäubung des Sprühgutes kann durch Druck- oder Zentrifugalkräfte hervorgerufen werden. Dabei müssen Adhäsions-, Trägheits- und Viskositätskräfte überwunden werden. Die Zerstäubung der Eduktlösung ist der elementare Punkt der Sprühtrocknung, denn dadurch wird vorgegeben wie groß die spezifische Oberfläche der erzeugten Partikel wird. Dementsprechend gibt die Zerstäubung

auch die Geschwindigkeit der Trocknung und die Eigenschaften des Produktes vor. Die große, relative Oberfläche der Flüssigkeitströpfchen bewirkt einen effektiven, schnellen Wärme- und Stoffaustausch zwischen den beiden Phasen (Suspension und Heißluft) [112].

Die Versuche mit der Sprühtrocknung wurden mit einem Mini-Spray-Dryer der Firma Büchi durchgeführt. In Abbildung 9.2 ist der Verlauf der Trocknungsluft sowie der Produktverlauf schematisch dargestellt.

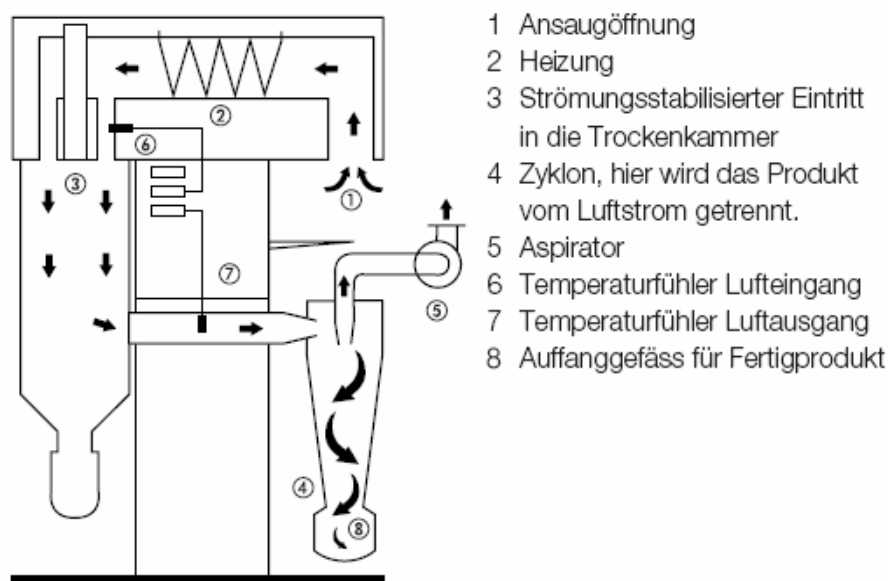


Abbildung 9.2: Schema des Produkt- und Trocknungsluftverlaufs [113]

Ziel war es, optimale Bedingungen für die Trocknung zu finden. Dabei bildeten die Geschwindigkeit der Trocknung und der Erhalt der Eigenschaften des aufgegebenen Proteins die entscheidenden Parameter. Die zu trocknende Lösung wurde über eine peristaltische Pumpe angesaugt, erhitzt und über eine feine Düse zerstäubt. Sie verdampft durch diese Ausdehnung rasch. Währenddessen wird sie in einen Zyklon eingeleitet, wo das getrocknete Pulver aufgefangen wird. Über die Variation der Ein- und Ausgangstemperatur ist es möglich, die Qualität des Produktes wie Feuchte und Denaturierungsgrad zu steuern.

9.2.1 Untersuchung eines Q- und S-Typ-Membranadsorber-Gesamtprozesses

Für die Beurteilung der Reinheit der mittels Membranadsorber isolierten und bis zum getrockneten Pulver aufgearbeiteten Proteine wurden SDS-Gele angefertigt. Auf diesen sollten idealerweise nur die Banden der Zielproteine zu finden sein. In Abbildung 9.3 sind die Produkte der Gefrier- und Sprühtrocknungen der Membranadsorber zu sehen. Es wurden sowohl Q- als auch S-Eluate in diesen Prozessen verarbeitet.

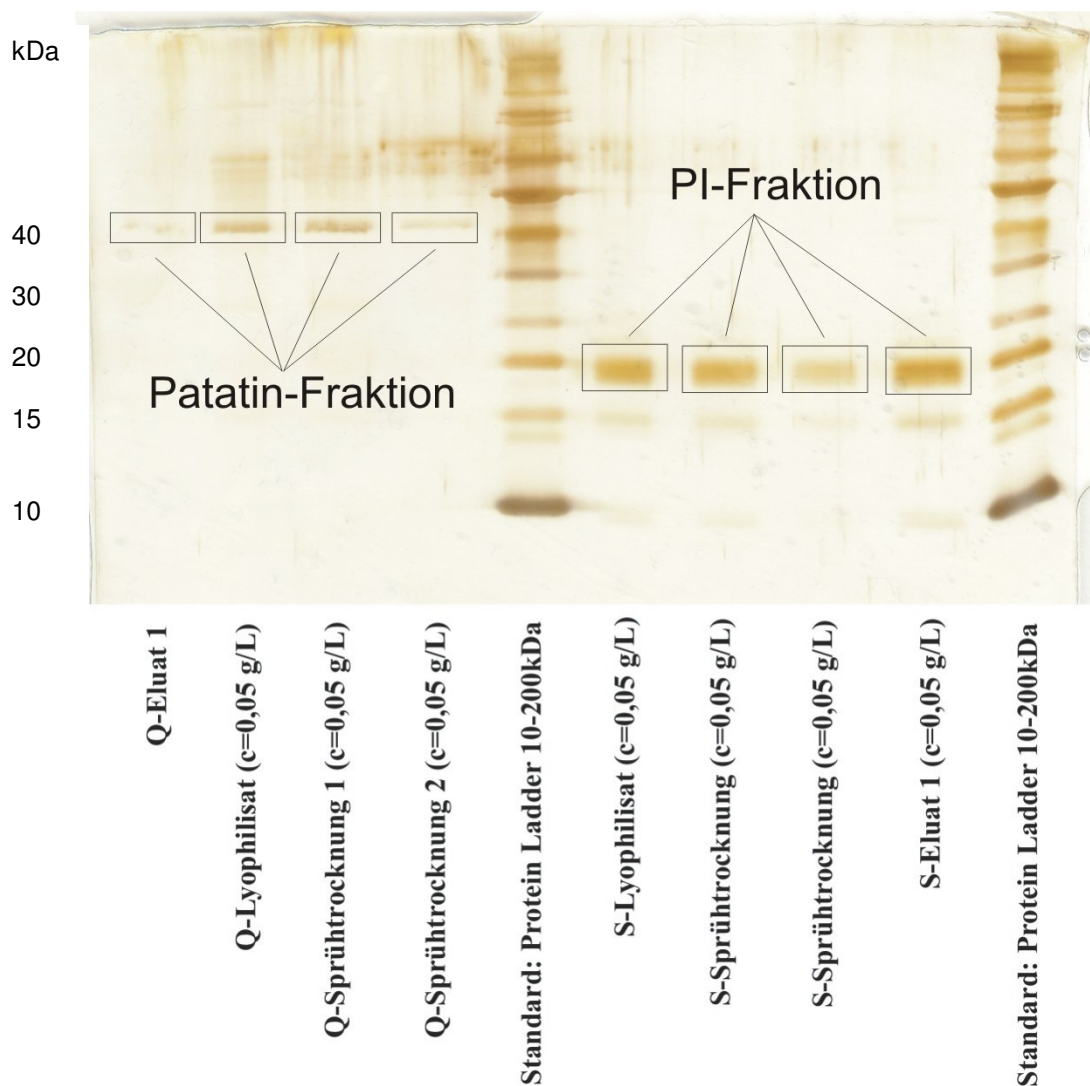


Abbildung 9.3: SDS-Gel der Produkte eines Membranadsorber-Gesamtprozesses (15 % Tris-HCl, Silberfärbung)

Es ist deutlich zu erkennen, dass das S-Eluat 1 eine starke Bande bei 20 kDa besitzt. Darunter ist ansatzweise eine schwache Bande bei ca. 15 kDa zu erkennen. Dasselbe Bandenmuster ist auch bei den Gefrier- und Sprühtrocknungsprodukten zu erkennen. Die Banden stimmen mit denen bei Protease-Inhibitoren überein und belegen die hohe Reinheit der Produkte. Beim Q-Eluat 1 ist die 40 kDa nur zu erahnen. Dagegen ist die Bande bei den Gefrier- und Sprühtrocknungsprodukten deutlich zu erkennen. Das Q-Eluat 1 konnte offensichtlich in dieser Verdünnung nicht wahrgenommen werden. Auch bei den Q-Produkten entspricht die 40 kDa-Bande der bei Patatin erwarteten Bande und spricht auch hier für die Reinheit. Allerdings sind auf dem SDS-Gel einige Schlieren oberhalb von 40 kDa zu erkennen. Diese Schlieren sind ein Hinweis auf noch vorhandene Verunreinigungen wie Polyphenoloxidasen.

9.2.2 Untersuchung eines Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul-Gesamtprozesses

Für die Untersuchung der Sprühtrocknungspulver eines Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul-Gesamtprozesses wurde die Trocknung bei 80 °C Eingangs- und 55 °C Ausgangstemperatur durchgeführt. Dies ist der von der Firma Büchi angegebene Erfahrungswert für Enzym-Lösungen. Er scheint sich auch bei diesen Protein-Lösungen zu bestätigen. In Abbildung 9.4 ist ein SDS-Gel mit den Produkten eines gesamten Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul-Prozesses zu sehen.

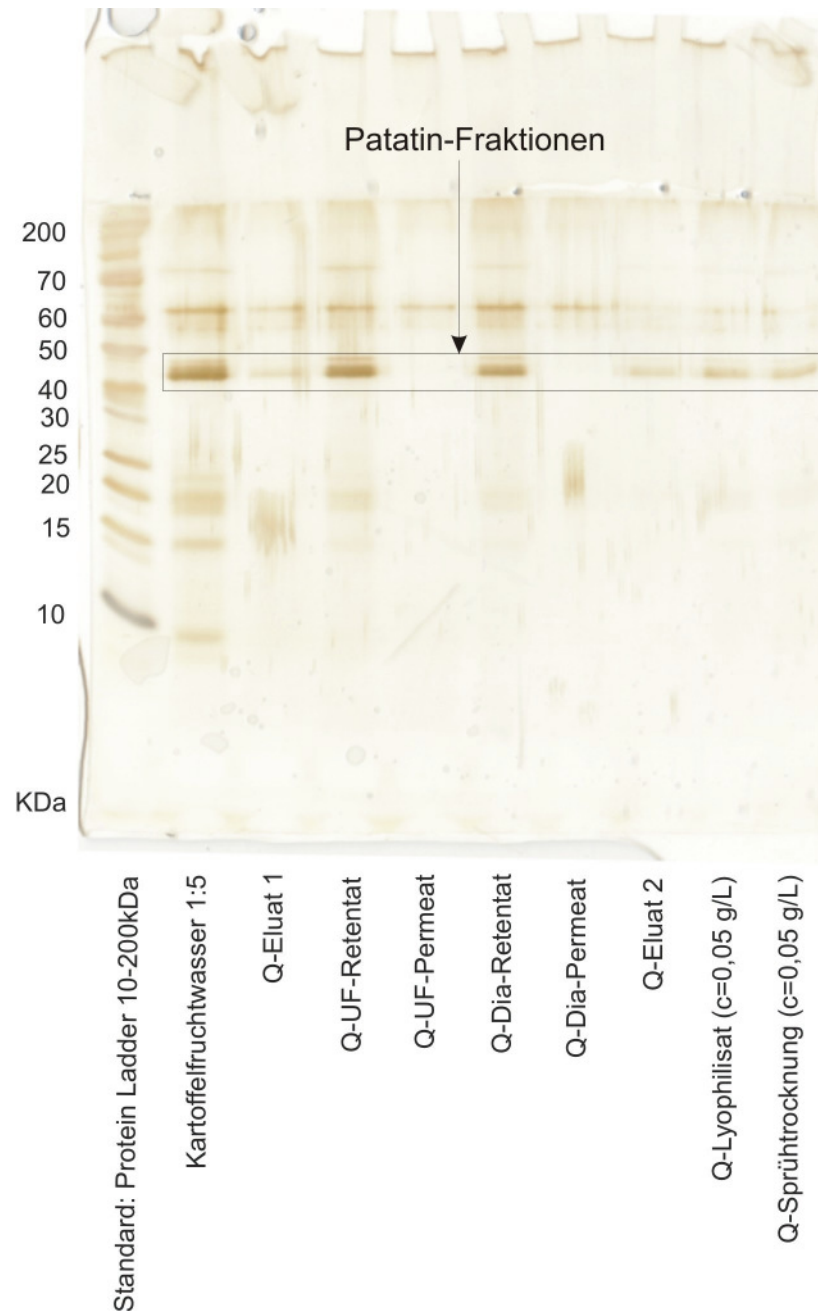


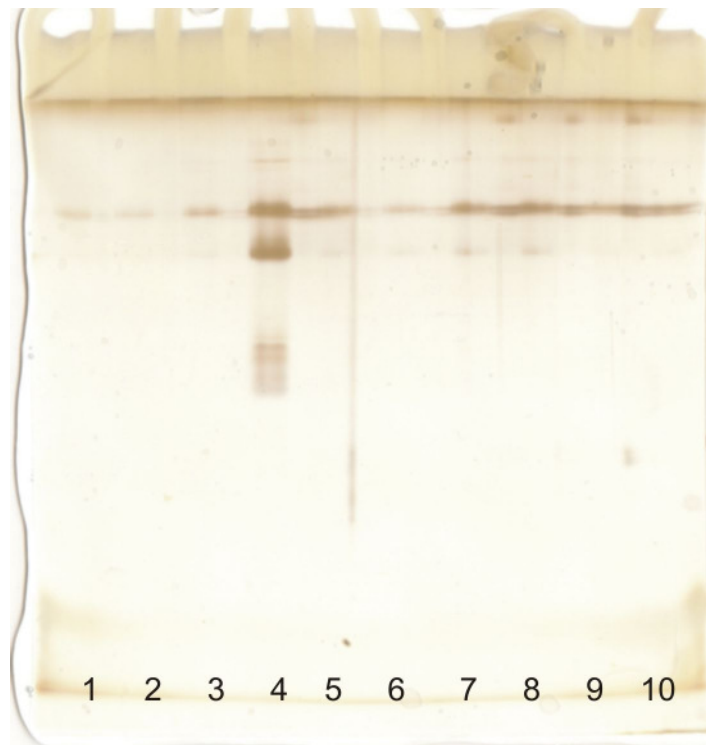
Abbildung 9.4: SDS-Gel eines mit einem Q-Sartobind Direct-Wickelmodul durchgeführten Prozesses bis hin zum getrockneten Lyophilisat und Sprühtrocknungspulver (15 % Tris-HCl, Silberfärbung)

Das Produkt mit einem Molekulargewicht von 40 kDa, das mit der des erwarteten Patatin übereinstimmt, wurde in hoher Reinheit gewonnen. Dies ist sowohl in den Retentaten als auch in den Proben nach Gefrier- und Sprühtrocknung gut zu erkennen.

9.2.3 Variation der Ausgangstemperatur bei Q-Dia-Retentaten

Ziel dieses Versuches war es, die Ausgangstemperatur für die Trocknung der Q-Dia-Retentate zu optimieren. Sie sind dazu bei einer Eingangstemperatur von 80 °C getrocknet worden. Bei einer Ausnahme betrug die Eingangstemperatur 100 °C. In Abbildung 9.5 sind die Ergebnisse der Trocknungen dargestellt. Die Retentate stammten von drei verschiedenen Sartobind Direct-Wickelmodul-Zyklen derselben KFW-Charge. Anhand der Gel-Banden ist zu erkennen, dass die Variation der Ausgangstemperatur zwischen 46 und 60 °C keinen wesentlichen Effekt auf die Stabilität der Proteine gehabt zu haben schien. Als Vergleich wurde 1:5 verdünntes KFW aufgegeben. Es sind drei Hauptbanden des KFWs auf dem Gel zu erkennen. Eine sehr breite Bande liegt sehr weit unten markiert wie schon in Abbildung 9.1 zu sehen war, die auf der S-Membran gebundenen Proteine, die Protease-Inhibitoren. Da aber bei diesen Sprühtrocknungsversuchen ausschließlich Q-Membranen verwendet worden sind, war diese Bande in keiner dieser Sprühtrocknungsproben zu finden. Stattdessen ist auf allen Probenspuren die oberste der drei Hauptbanden deutlich zu erkennen.

Alle durch Gefrier- und Sprühtrocknung hergestellten Pulver waren beigefarben. Durch die Färbung der einzelnen Pulver lässt sich abschätzen, inwieweit die durch Polyphenoloxidasen hervorgerufene enzymatische Bräunung und die damit verbundene Bildung von Melanin vorangeschritten sind. Es wird angenommen, je dunkler das Pulver gefärbt ist, desto mehr Melanin wurde gebildet. Aufgrund der beobachteten Färbung kann eine starke Aktivität der Polyphenoloxidase ausgeschlossen werden.



Spur 1: Q-Sprühtrocknung A, T(Ein)=80°C,T(Aus)=55°C
Spur 2: Q-Sprühtrocknung A, T(Ein)=80°C,T(Aus)=60°C
Spur 3: Q-Sprühtrocknung A, T(Ein)=80°C,T(Aus)=50°C
Spur 4: Kartoffelfruchtwasser 1:5 verdünnt
Spur 5: Q-Sprühtrocknung B, T(Ein)=100°C,T(Aus)=60°C
Spur 6: Q-Sprühtrocknung B, T(Ein)=80°C,T(Aus)=55°C
Spur 7: Q-Sprühtrocknung B, T(Ein)=80°C,T(Aus)=50°C
Spur 8: Q-Sprühtrocknung C, T(Ein)=80°C,T(Aus)=55°C
Spur 9: Q-Sprühtrocknung C, T(Ein)=80°C,T(Aus)=53°C
Spur 10: Q-Sprühtrocknung C, T(Ein)=80°C,T(Aus)=46°C

Pulverkonzentration: 0,1 g/L

Abbildung 9.5: Natives Gel von Sprühtrocknungspulvern aus mit Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul gewonnenen KFW-Proteinlösungen (15 % Tris-HCl, Silberfärbung)

10 Prozessbegleitende Analytik

Für die industrielle Produktion ist, neben einer simplen und sicheren Prozessführung, die Qualitätskontrolle des Prozesses von großer Bedeutung. In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Reinheit der Q- und S-Fractionen durch SDS-Gele belegt. In diesem Kapitel soll nun auch der Erhalt der nativen Natur der Produkte bestätigt werden. Dazu wurden spezifische Aktivitätstests verwendet, die zusammen mit Dr. Veronika Alt für diesen Prozess etabliert wurden [61]. Für den Nachweis von Patatin wurde ein Assay der Acyl-Nebenaktivität etabliert. Der Nachweis von Protease-Inhibitoren erfolgte durch Inhibierung der Trypsin-Aktivität. Für die Bestimmung der Aktivität der unerwünschten Polyphenoloxidasen wurde ein Assay entwickelt. Daneben wurde auch der Polyphenol-Gehalt gemessen. Die Assays werden im Anhang F-J genauer erläutert. Die Messungen erfolgten in allen Prozessschritten vom Ausgangsmedium bis hin zum fertigen Produkt.

Während der Herstellung der fertigen Q-Fraktion wurde die Aktivität des Mikrofiltrationspermeates (MF-Permeat), sowie der in vier unterschiedlichen Durchläufen identisch hergestellten Eluate gemessen. Auch die Ultra- und Diafiltrations-Retentate und deren Permeate wurden, ebenso wie die Produkte der Sprüh- und Gefriertrocknung, untersucht. Um die prozentuale Enzymaktivität des Patatins zu berechnen, muss zunächst die gemessene Volumenaktivität mit dem Elutionsvolumen multipliziert werden. Damit kann die verbliebene Aktivität bezogen auf die Ausgangslösung in Prozent angegeben werden. Entsprechend wird die prozentuale Inhibierung der Protease-Inhibitoren aus der Inhibitor-konzentration berechnet.

10.1 *Biologische Aktivität des Mikrofiltrates*

In Tabelle 10.1 sind die Ausbeuten der Mikrofiltration mit einer 0,2µm Hydrosart-Kassette dargestellt.

Tabelle 10.1: Mikrofiltrations-Ausbeuten der Proteine

Probe	Ausbeute Protein			Enzymaktivität Patatin			Inhibierung PI		
	m _{Protein} [g]	V [L]	[%]	U/mL	U/mg	[%]	[μmol/L]	[μmol/mg]	[%]
KFW	428,4	15,0	100,0	5,429	0,190	100,0	324,47	1,14E-02	100,0
MF-Permeat	278,6	10,8	65,0	5,962	0,231	79,1	236,97	9,19E-03	52,6

Mit 65 % ist die Proteinausbeute der Mikrofiltration zufriedenstellend ausgefallen. Sie ließ sich aber in weiteren Versuchen bis auf 85 % steigern (s. 5.5 Druckverhalten). Die prozentuale Enzymaktivität des Patatins und die Inhibierung durch die Protease-Inhibitoren sollten sich im Bereich von 65 % befinden, wichen allerdings um 13-14 % ab. Dies lag im Rahmen der erreichbaren Messgenauigkeit.

10.2 Biologische Aktivität der S-Fraktion hergestellt mit Sartobind-Membranadsorber

Während der Membranadsorption mit S-Typ-Membranadsorbern wurden die Aktivitäten und der Proteingehalt des Mikrofiltrates und der beiden Eluate mit 0,5 M und 1 M NaCl-Lösung gemessen. Die daraus berechneten Ausbeuten dieser Messungen sind in Tabelle 10.2 zu sehen.

Tabelle 10.2: Membranadsorber-Ausbeuten der S-Fraktion

Probe	Ausbeute Protein			Inhibierung PI		
	m _{Protein} [g]	V [L]	[%]	[μmol/L]	[μmol/mg]	[%]
MF-Permeat 1:5	51,58	10,0	100,0	47,4	0,009	100,0
S-Eluat 1	6,84	6,0	13,3	82,3	0,072	104,1
S-Eluat 2	0,23	5,0	0,5	k.D.	k.D.	k.D.
S-Eluat 1	7,03	6,0	13,6	74,8	0,064	94,7
S-Eluat 2	0,58	5,0	1,1	k.D.	k.D.	k.D.
S-Eluat 1	6,36	6,0	12,3	78,8	0,074	99,7
S-Eluat 2	0,23	5,0	0,5	k.D.	k.D.	k.D.
S-Eluat 1	6,12	6,0	11,9	65,2	0,064	82,5
S-Eluat 2	0,03	5,0	0,1	k.D.	k.D.	k.D.
S-Eluate 1			12,8			95,3

Die Proteinausbeute des S-Eluates 1 lag bei durchschnittlich 12,8 %, die von S-Eluat 2 bei nur 0,5 %. Es ist in S-Eluat 1 gelungen, den größten Teil der das Trypsin tatsächlich inhibierenden Protease-Inhibitoren aus dem Mikrofiltrat zu gewinnen. Dies führte zu einer Erhöhung der auf die Masse bezogenen Inhibitorkonzentration im S-Eluat 1, die auf eine gesteigerte Reinheit der gewonnenen Fraktion hinweist. Aufgrund des geringen Proteingehaltes wurde von einer Inhibierungsmessung im S-Eluat 2 abgesehen. Es handelt sich bei der Lösung hauptsächlich um die zum Eluieren verwendete NaCl-Lösung.

10.3 Biologische Aktivität der S-Fraktion hergestellt mit Sartobind Direct-Wickelmodul

Die Aktivitäten und Proteinausbeuten, der mit dem Sartobind Direct-Wickelmodul gewonnenen S-Fractionen, wurden vor und nach dem Beladungszyklus gemessen, sowie bei den S-Eluaten 1 und 2. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.3 aufgelistet.

Tabelle 10.3: Sartobind Direct-Wickelmodul-Ausbeuten S-Fraktion

Probe	Ausbeute Protein			Inhibierung PI		
	m _{Protein} [g]	V [L]	[%]	[μmol/L]	[μmol/mg]	[%]
KFW 1:5	25,35	7,0	100,0	16,22	4,48E-03	100,0
nach 20 min	20,28	7,0	80,0	15,30	5,28E-03	94,3
S-Eluat 1	5,03	3,9	19,8	6,18	4,94E-03	22,9
S-Eluat 2	0,24	5,0	0,9	0,49	1,03E-02	2,2

Die Proteinausbeute betrug beim S-Eluat 1 19,8 % und lag damit weit über dem Wert des Membranadsorbermoduls mit 12,8 %. Es ist daher anzunehmen, dass es beim Membranadsorber noch Optimierungspotential gibt. Auch die Ausbeute des S-Eluats 2 war mit 0,9 % größer, weshalb seine Inhibitorkonzentration bestimmt wurde. Anhand der Bilanz des Proteingehalts ließ sich keine Ablagerung denaturierter Proteine auf der Membran feststellen. Die prozentuale Inhibierung des S-Eluats 1 war mit 22,9 % niedriger als die des Membranadsorbers. Die prozentuale Inhibierung des S-Eluats 2 lag bei 2,2 %. Allerdings war die Ausbeute im KFW nach 20 min viel höher als sie es nach der Bilanz sein dürfte. Dies zeigt, dass die Inhibierungsmessungen im KFW durch die Vielzahl an Inhaltsstoffen stark gestört wurden. Es kam ebenfalls allgemein zu einer großen Differenz der Inhibitorkonzentration des Ausgangs-KFWs von Membranadsorber und Sartobind Direct-Wickelmodul. Gründe dafür könnten neben unterschiedlichen Kartoffelsorten vor Versuchsbeginn aufgetretene Denaturierungen sein.

10.4 Biologische Aktivität der Ultra- und Dia-Retentate aus S-Eluaten 1

Die im Prozess gewonnenen S-Eluate 1 wurden durch Ultra- und Diafiltration mit einer 10 kDa-Hydrosart-Kassette aufgearbeitet. Dabei wurde die Inhibierungswirkung der Retentate und Permeate gemessen. Tabelle 10.4 enthält die Werte dieser Messungen.

Tabelle 10.4: Ultrafiltrations-Ausbeuten der S-Fraktion

Probe	Ausbeute Protein			Inhibierung PI		
	m _{Protein} [g]	V [L]	[%]	[μmol/L]	[μmol/mg]	[%]
S-Eluate 1	15,76	12,6	100,0	6,18	4,94E-03	100,0
S-UF-Retentat	16,50	0,7	104,7	82,43	3,50E-03	74,1
S-UF-Permeat	2,38	11,5	15,1	0,88	4,25E-03	13,0
S-Dia-Retentat	16,94	0,9	107,5	66,96	3,56E-03	77,4
S-Dia-Permeat	0,18	4,4	1,1	0,78	1,94E-02	4,4

An den Proteinausbeuten des UF-Retentats mit 105 % und 108 % beim Dia-Retentat, ist zu erkennen, dass es zu keinerlei Proteinverlusten bei der Ultra- und Diafiltration kam. Allerdings führte die Addition der Messungenauigkeiten zu einer abweichenden Bilanz. Die prozentuale Inhibierung betrug 77,4 %. Der Aktivitätsverlust könnte eine Folge der, bei der Aufkonzentrierung nicht zu verhindern gewesenen, Schaumbildung sein.

10.5 Biologische Aktivität der Trocknungsprodukte der Dia-Retentate aus S-Eluaten 1

Auch beim Trocknungsschritt wurde die Inhibierung gemessen. In Tabelle 10.5 sind die Ausbeuten für die Protease-Inhibitoren nach Gefrier- und Sprühtrocknung aufgelistet.

Tabelle 10.5: Trocknungs-Ausbeuten der S-Fraktion

Probe	Ausbeute Protein			Inhibierung PI		
	m _{Protein} [g]	V [L]	[%]	[μmol/L]	[μmol/mg]	[%]
S-Dia-Retentat	6,88	0,8	100,0	64,30	7,48E-03	100,0
Sprühtrocknung	1,85	fest	27,0	17,29	8,64E-03	31,2
Gefriertrocknung	4,50	fest	65,4	19,48	9,74E-03	85,2

Die Proteinausbeute der Gefriertrocknung betrug 65 %, die der Sprühtrocknung erbrachte dagegen nur 27 %. Ein Grund für die geringen Proteinausbeuten des

Sprühtrockners lag darin, dass die verhältnismäßig geringen Mengen in einer Sprühtrocknungsapparatur weit verteilt sind und damit schwer entnommen werden können. Wie anhand der auf die Masse bezogenen Inhibitorkonzentration zu sehen ist, kam es bei der Trocknung zu keinerlei Denaturierung der Proteine.

10.6 Biologische Aktivität der Q-Fraktion hergestellt mit Sartobind-Membranadsorber

Für die Bestimmung der Q-Fractionen wurde die enzymatische Nebenaktivität des Patatins untersucht. In Tabelle 10.6 sind die Ausbeuten der mittels Q-Typ-Membranadsorber gewonnenen Eluate verschiedener Versuche aufgeführt.

Tabelle 10.6: Membranadsorber-Ausbeuten der Q-Fraktion

Probe	Ausbeute Protein			Enzymaktivität Patatin		
	m _{Protein} [g]	V [L]	[%]	U/mL	U/mg	[%]
MF-Permeat 1:5	51,58	10,0	100,0	1,192	0,231	100,0
Q-Eluat 1	1,57	7,5	3,0	0,287	1,371	18,0
Q-Eluat 2	0,51	6,0	1,0	k.D.	k.D.	k.D.
Q-Eluat 1	3,51	7,5	6,8	0,368	0,787	23,2
Q-Eluat 2	0,46	6,0	0,9	k.D.	k.D.	k.D.
Q-Eluat 1	2,62	7,5	5,1	0,304	0,870	19,1
Q-Eluat 2	0,60	6,0	1,2	k.D.	k.D.	k.D.
Q-Eluat 1	2,09	7,5	4,0	0,568	2,041	35,7
Q-Eluat 2	0,18	6,0	0,3	k.D.	k.D.	k.D.
Q-Eluate 1			4,7			24,0

Die durchschnittliche Proteinausbeute von Q-Eluat 1 lag bei 4,7 %. Die mittlere prozentuale Enzymaktivität des Patatins betrug 24 %. Dabei variierten die Aktivitäten der Eluate unterschiedlicher Versuche zwischen 18 % und 35,7 %. Da die durchschnittliche Proteinausbeute von Q-Eluat 2 unterhalb von 1 % lag, wurden bei ihnen keine Enzymaktivitäten bestimmt.

10.7 Biologische Aktivität der Q-Fraktion hergestellt mit Sartobind Direct-Wickelmodulen

Die biologische Aktivität der mittels Sartobind Direct-Wickelmodul erzeugten Q-Fractionen sind in Tabelle 10.7 angegeben.

Tabelle 10.7: Sartobind Direct-Wickelmodul-Ausbeuten Q-Fraktion

Probe	Ausbeute Protein			Enzymaktivität Patatin		
	m _{Protein} [g]	V [L]	[%]	U/mL	U/mg	[%]
KFW 1:5	35,69	7,0	100,0	6,55	1,28	100,0
nach 20 min	23,00	7,0	64,4	2,93	0,89	44,7
Q-Eluat 1	5,08	17,8	14,2	0,19	0,66	7,3
Q-Eluat 2	0,08	10,0	0,2	0,05	6,60	1,2

Die Proteinausbeute des Q-Eluats 1 betrug 14,2 %. Die Differenz zwischen dem Proteingehalt vor und nach der 20minütigen Rezirkulation lässt sich durch im Modul verbliebene denaturierte Proteine erklären. Die prozentuale Enzymaktivität für das Q-Eluat 1 lag bei 7,3 %. Auch bei dieser Enzymaktivitätsmessung ging die Bilanz nicht auf. Dies lag vermutlich an der teilweisen Denaturierung der Proteine während der Rezirkulierung durch das Modul.

10.8 Biologische Aktivität der Ultra- und Dia-Retentate aus Q-Eluaten 1

In drei Ultrafiltrations- bzw. Diafiltrationsversuchen wurden die Ausbeuten der Patatin enthaltenden Q-Eluate 1 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.8 aufgelistet.

Tabelle 10.8: Ultrafiltrations-Ausbeuten der Q-Fraktion

Probe	Ausbeute Protein			Enzymaktivität Patatin		
	m _{Protein} [g]	V [L]	[%]	U/mL	U/mg	[%]
Q-Eluat 1	5,08	17,8	100,0	0,187	0,656	100,0
Q-UF-Retentate	4,26	0,7	84,0	4,338	0,712	91,1
Q-UF-Permeat	0,64	17,1	12,7	0,000	0,000	0
Q-Dia-Retentate	3,87	0,7	76,3	3,485	0,630	73,2
Q-Dia-Permeat	0,00	6,0	0	0,000	0,000	0
Q-Eluat 1	4,39	14,0	100,0	0,175	0,557	100,0
Q-UF-Retentate	2,94	0,7	67,0	3,617	0,860	103,6
Q-UF-Permeat	0,93	13,3	21,1	0,000	0,000	0
Q-Dia-Retentate	3,73	0,7	84,9	3,175	0,596	90,9
Q-Dia-Permeat	0,04	6,5	0,9	0,000	0,000	0
Q-Eluat 1	2,62	7,5	100,0	0,304	0,870	100,0
Q-UF-Retentate	1,40	0,7	53,5	2,874	1,433	88,1
Q-UF-Permeat	0,40	5,3	15,4	0,000	0,000	0
Q-Dia-Retentate	1,50	0,9	57,4	1,530	0,916	60,3
Q-Dia-Permeat	0,40	5,3	15,3	0,008	0,109	1,9
Q-Dia-Retentate			72,9			74,8

Die durchschnittliche Proteinausbeute der Dia-Retentate lag bei 72,9 %. Die prozentuale Enzymaktivität für Patatin lag bei 74,8 %. Es kam weder zu großen Proteinverlusten noch zu Einbußen bei der Aktivität. Die Permeate hatten nur einen kleinen Proteinanteil und zeigten eine Aktivität, die unterhalb der Nachweisgrenze lag. Die Ergebnisse belegen, dass dieser Prozessschritt erfolgreich durchgeführt wurde.

10.9 Biologische Aktivität der Trocknungsprodukte der Dia-Retentate aus Q-Eluaten 1

In Tabelle 10.9 sind die Ausbeuten der Gefrier- und Sprühtrocknung der aus den Q-Eluaten 1 gewonnenen Dia-Retentate aufgeführt.

Tabelle 10.9: Trocknungs-Ausbeuten der Q-Fraktion

Probe	Ausbeute Protein			Enzymaktivität Patatin		
	m _{Protein} [g]	V [L]	[%]	U/mL	U/mg	[%]
Q-Dia-Retentat	1,50	0,9	100,0	1,530	0,916	100,0
Sprühtrocknung	1,17	fest	77,6	0,815	0,408	34,5
Gefriertrocknung	0,90	fest	59,8	1,192	0,596	39,0

Die Proteinausbeute der Sprühtrocknung erreichte 78 %, die der Gefriertrocknung dagegen 60 %. Wie anhand der auf die Masse bezogenen Aktivitäten zu sehen ist, wurde die Patatinaktivität bei beiden Trocknungsmethoden stark verringert. Eine Optimierung der Trocknung beispielsweise durch Zugabe von proteinstabilisierenden Substanzen ist hier empfehlenswert.

10.10 Bestimmung der PPO-Aktivität

Bei der Entwicklung dieses Prozesses zur Gewinnung von Patatin und Protease-Inhibitoren enthaltender Fraktionen stellten die Gruppe der Polyphenoloxidasen eine Verunreinigung dar. Um Informationen über ihren Verbleib zu erhalten, wurde ein Assay für die photometrische Detektion ihrer Aktivität entwickelt. Mit diesem konnte die Aktivität über den gesamten Prozess verfolgt werden. Der Assay ist im Anhang beschrieben.

In Tabelle 10.10 sind die Aktivitäten der Mikrofiltrations-Prozessstufe angegeben.

Tabelle 10.10: PPO-Aktivität von KFW mit und ohne Zugabe von Bisulfit

Probe	m _{Protein} [g]	V [L]	U/mL	U/mg
KFW (ohne Bisulfit)	428,44	15,0	9,480	0,332
KFW (mit Bisulfit)	428,44	15,0	0,000	0,000
MF-Permeat	278,55	10,8	0,023	0,001

Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln beschrieben, wurde zu Beginn des Prozesses Bisulfit zum KFW gegeben, um durch Bindung des Sauerstoffes die eintretende Verbräunung durch das PPO zu verhindern. Zum besseren Vergleich

der Aktivität wurde auch KFW vermessen, dem kein Bisulfit zugegeben wurde. Es ist zu erkennen, dass die Zugabe des Bisulfits zu einer vollständigen Inhibierung der PPO-Volumenaktivität im KFW führte. Auch das Mikrofiltrations-Permeat zeigte, im Verhältnis zu unbehandeltem KFW, nahezu keinerlei Volumenaktivität. Da bei der Elution der Proteine von den Q- und S-Modulen die Polyphenoloxidasen auf den Gelen nicht nachgewiesen wurden, wurde angenommen, dass dort keine PPO-Aktivität auftritt. Aus diesem Grund erfolgte im Anschluss keine Zugabe des inhibierenden Bisulfits. Zur Kontrolle wurden dennoch die Aktivitäten der nachfolgenden Fraktionen gemessen.

Die Messungen zeigten, dass sich während der Isolierung der S-Fraktion mit Hilfe der Membranadsorption bei mehreren Versuchen leichte PPO-Aktivitäten im S-Eluat 1 nachweisen ließen. In Tabelle 10.11 sind die Werte der S-Eluate 1 sowie die Ergebnisse der Aufkonzentrierung durch Ultra- und Diafiltration zu sehen.

Tabelle 10.11: PPO-Aktivität bei der Ultra- bzw. Diafiltration des S-Eluat 1

Probe	m _{Protein} [g]	V [L]	U/mL	U/mg
S-Eluat 1	6,36	6,0	0,173	0,163
S-UF-Retentat	6,88	0,7	2,705	0,275
S-UF-Permeat	1,10	5,3	0,010	0,047
S-Dia Retentat	6,88	0,8	0,040	0,005
S-Dia-Permeat	0,03	5,3	k.D.	k.D.
S-Eluate 1	18,07	20,5	0,056	0,064
S-UF-Retentat	15,00	0,5	3,220	0,107
S-UF-Permeat	5,51	20,0	0,003	0,011
S-Dia Retentat	14,63	0,5	0,192	0,007
S-Dia-Permeat	0,82	25,0	0,007	0,214

Bei der Aufkonzentrierung der S-Eluate 1 kam es in den Ultrafiltrations-Retentaten zu einer starken Erhöhung der Volumenaktivität der Polyphenoloxidasen. Die Aktivität verringerte sich jedoch bei der Diafiltration wieder um etwa den gleichen Faktor. In den Permeaten lag die Volumenaktivität am Rande der unteren Nachweisgrenze. Die Veränderung der Salzkonzentration oder eingetretene Schaum-

bildung sind mögliche Erklärungen für die geringe PPO-Aktivität des Dia-Retentates. Dies sollte weiter untersucht werden.

Auch bei der Trocknung wurde die Aktivität der Polyphenoloxidasen ermittelt. In Tabelle 10.12 sind die Ergebnisse der Trocknungen von zwei unterschiedlichen S-Retentaten aufgeführt.

Tabelle 10.12: PPO-Aktivität bei der Trocknung der S-Fraktion

Probe	m _{Protein} [g]	V [L]	U/mL	U/mg
S-Dia-Retentate	14,63	0,5	0,192	0,007
Gefriertrocknung	6,81	fest	0,069	0,014
S-Dia-Retentate	6,88	0,8	0,040	0,005
Sprührocknung	3,76	fest	0,008	0,004
Gefriertrocknung	4,50	fest	0,030	0,015

Sowohl bei der Gefrier- als auch bei der Sprührocknung kam es zu keinem signifikanten Rückgang der PPO-Aktivität. Dies ist an der spezifischen Aktivität zu erkennen. Die Volumenaktivität bezieht sich auf in bidest. Wasser gelöste Trocknungsprodukte mit einer Konzentration von 2 mg/mL. Ein direkter Vergleich der Volumenaktivitäten von Retentaten und Trocknungsprodukten ist nicht möglich.

Die Verunreinigung der Polyphenoloxidasen war insgesamt in den Produkten der S-Fractionen nur minimal. Die spezifische Aktivität wurde von 0,332 U/mg im KFW auf bis zu 0,004 U/mg im konfektionierten Endprodukt reduziert. Das entspricht einem Faktor von 83.

Die bei der Membranadsorption gewonnenen Q-Fractionen wurden ebenfalls auf ihre PPO-Aktivität getestet. Die Werte sind zusammen mit den Ergebnissen mehrerer Ultra- bzw. Diafiltrationen in Tabelle 10.13 dargestellt.

Tabelle 10.13: PPO-Aktivität bei der Ultra- bzw. Diafiltration der Q-Eluate

Probe	m _{Protein} [g]	V [L]	U/mL	U/mg
Q-Eluat 1	4,71	13,3	0,009	0,025
Q-UF-Retentate	2,72	0,8	0,206	0,060
Q-UF-Permeat	0,88	12,4	0,004	0,057
Q-Dia-Retentate	3,78	0,7	0,241	0,045
Q-Dia-Permeat	0,18	7,0	0,002	0,076
Q-Eluat 1	5,08	17,8	0,004	0,014
Q-UF-Retentate	4,26	0,7	0,195	0,032
Q-UF-Permeat	0,64	17,1	0,002	0,053
Q-Dia-Retentate	3,87	0,7	0,235	0,042
Q-Dia-Permeat	0,00	6,0	0,003	0,000
Q-Eluat 1	4,39	14,0	0,007	0,022
Q-UF-Retentate	2,94	0,7	0,163	0,039
Q-UF-Permeat	0,93	13,3	0,003	0,043
Q-Dia-Retentate	3,73	0,7	0,164	0,031
Q-Dia-Permeat	0,04	6,5	0,001	0,160

Es kam bei der Aufkonzentrierung zu einer Erhöhung der Volumenaktivität, die aber um den Faktor 10 kleiner war als die der S-Fraktion. Die Aktivität nahm jedoch im Gegensatz zu den S-Fractionen nicht während der Diafiltration ab und hatte dadurch am Ende der Prozessstufe ähnliche hohe Werte. Die Permeate der Q-Fractionen zeigten auch hier keine PPO-Aktivität. Insgesamt lassen die Ergebnisse auf einen effizienten Aufreinigungsschritt schließen.

In Tabelle 10.14 sind die PPO-Aktivitäten der Trocknung der Q-Fraktion aufgelistet.

Tabelle 10.14: PPO-Aktivität bei der Trocknung der Q-Fraktion

Probe	m _{Protein} [g]	V [L]	U/mL	U/mg
Q-Dia-Retentate	3,78	0,7	0,241	0,045
Sprühtrocknung	0,78	fest	0,330	0,066
Gefriertrocknung	0,43	fest	0,243	0,049
Q-Dia-Retentate	3,87	0,7	0,235	0,042
Sprühtrocknung	0,90	fest	0,233	0,047
Gefriertrocknung	0,83	fest	0,302	0,060
Q-Dia-Retentate	3,73	0,7	0,164	0,031
Sprühtrocknung	0,43	fest	0,227	0,045
Gefriertrocknung	0,40	fest	0,283	0,057

Die Aktivität der Polyphenoloxidasen blieb während der Trocknung erhalten. Dies ist auch hier an der spezifischen Aktivität zu erkennen. Die Volumenaktivität bezieht sich auf in bidest. Wasser gelöste Trocknungsprodukte mit einer Konzentration von 2 mg/mL. Ein direkter Vergleich der Volumenaktivitäten ist daher nicht möglich. Die spezifische Aktivität wurde während des Prozesses von 0,332 U/mg im KFW auf bis zu 0,045 U/mg reduziert. Das entspricht etwa dem Faktor 7. Eine Restaktivität der Polyphenoloxidase ist jedoch noch detektierbar.

Die PPO-Aktivitäten der Q- und S-Fractionen wurden während des Prozesses stark verringert. Trotzdem sollte zur vollständigen Inhibierung der minimalen PPO-Aktivität bei einer weiteren Optimierung den Eluaten und dem Diafiltrationspuffer geringe Konzentrationen Bisulfit beigefügt werden.

10.11 Bestimmung des Polyphenolgehalts

Die Polyphenole stellen bei der Proteinaufreinigung eine Verunreinigung in den Proben dar. Demzufolge ist es notwendig, den Gehalt über den gesamten Prozess zu verfolgen. Als Methode wurde ein photometrisches Verfahren mit Folinreagenz verwendet. Sie stellt eine Abwandlung eines bereits bei Trauben etablierten Assays dar [114]. Der Gehalt wurde in Gallussäure-Equivalenten (GAE) angegeben. Die in den folgenden Tabellen verwendete Bezeichnung Beladungs-

fracht ist die berechnete Teilchenzahl der Gallussäure-Equivalente bezogen auf die Teilchenzahl der Ausgangslösung und wird in Prozent angegeben. Sie ist ein Maß für die bei der Aufarbeitung entstandenen Verluste an Polyphenolen.

10.11.1 Prozessbilanz für Polyphenole bei Membranadsorber-Modulen

Ein Membranadsorber-Prozess wurde mit Hilfe des Polyphenol-Assays bilanziert. In Tabelle 10.15 sind die Werte dieser Bilanz dargestellt.

Tabelle 10.15: Polyphenolbilanz der Mikrofiltration

Probe	c [GAE/L]	V[L]	[GAE]	Beladungsfracht [%]
KFW	13,96	11,5	160,6	100,0 %
MF-Permeat	11,48	10,8	123,9	77,2 %

Bei der Mikrofiltration kam es in Folge der Aufkonzentrierung des Retentates zu einem Verlust an Lösung beim Permeat und damit auch einhergehend mit einem Verlust an Polyphenolen. Die Polyphenolfracht betrug 77,2 %.

Von dem hergestellten MF-Permeat wurde für die Beladung eines Membranadsorber-Zyklus 2 L benötigt. Die Beladung der S-Typ- und Q-Typ-Module wurde simultan durchgeführt. In Tabelle 10.16 ist die Bilanz des Membranadsorberzyklus dargestellt.

Tabelle 10.16: Polyphenolbilanz der S- und Q-Typ-Membranadsorption

Probe	c [GAE/L]	V[L]	[GAE]	Beladungsfracht [%]
Beladung 1:5	1,70	10	17,0	100,0 %
Durchbruch	1,18	10	11,8	69,4 %
Spülen	0,45	10	4,5	26,4 %
Q-Eluat 1	0,03	7,5	0,2	1,2 %
Q-Eluat 2	0,00	6	0,0	0 %
S-Eluat 1	0,32	6	1,9	11,2 %
S-Eluat 2	0,13	5	0,7	3,9 %

Der weitaus größte Anteil der Polyphenole wurde im Durchbruch und beim Spülen entfernt. Das Q-Eluat 1 enthielt nur noch 1,2 % der eingesetzten Polyphenole, während das S-Eluat 1 noch einen Anteil von 11,2 % besaß.

In Tabelle 10.17 ist Bilanzierung der Aufarbeitung des Q-Eluates zu sehen. Da die Polyphenolkonzentration bereits im Q-Eluat 1 sehr niedrig war, ist die Ausbeutebestimmung am untersten Rand der Messgenauigkeit. Die getrockneten Proben der Sprüh- und Gefriertrocknung wurden in einer Konzentration von 2 g/L in Wasser gelöst und anschließend vermessen.

Tabelle 10.17: Polyphenolbilanz der Aufarbeitung des Q-Eluates durch Ultra- bzw. Diafiltration und Trocknung

Probe	c [GAE/L]	V[L]	[GAE]	Beladungsfracht [%]
Q-Eluat 1	0,03	7,5	0,2	100,0 %
UF-Retentat Q	1,15	0,7	0,8	410,7 %
UF-Permeat Q	0,06	5,3	0,3	163,4 %
Dia-Retentat Q	0,21	0,9	0,2	96,0 %
Dia-Permeat Q	0,09	5,3	0,5	234,1 %
Sprüh Q (c=2 g/L)	0,25	fest	0,1	32,7 %
Lyo Q (c=2 g/L)	0,09	fest	0,0	20,6 %

Bei der Ultrafiltration kam es zu einer Aufkonzentrierung der Polyphenole im Q-Eluat. Durch die Diafiltration wurde jedoch der größte Anteil im Permeat ausgespült. Die getrockneten Pulver enthielten im Vergleich zu den im KFW gemessenen 17,0 GAE nur 0,0-0,1 GAE. Die Beladungsfracht der Polyphenole war demnach in den Trocknungsprodukten im unteren Nachweisbereich.

Die Bilanz der S-Eluat-Aufarbeitung ist in Tabelle 10.18 dargestellt.

Tabelle 10.18: Polyphenolbilanz der Aufarbeitung des S-Eluates durch Ultra- bzw. Diafiltration und Trocknung

Probe	c [GAE/L]	c [mg/mL]	V[L]	[GAE]	Beladungsfracht [%]
S-Eluat 1	0,32	0,05	6	1,9	100,0 %
UF-Ret S	1,83	0,31	0,7	1,3	67,1 %
UF-Per S	0,03	0,01	5,3	0,2	9,1 %
Sprüh S (c=2 g/L)	0,70	0,12	fest	0,6	33,8 %
Lyo S (c=2 g/L)	0,55	0,09	fest	1,2	64,8 %

Auch hier kam es bei der Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung der Polyphenol-Konzentration. Bei der anschließenden Trocknung kam es jedoch bei der Gefriertrocknung nur zu einem geringen Verlust an Gallussäure-Equivalenten von 1,3 GAE auf 1,2 GAE. Die Beladungsfracht bei der Sprühtrocknung halbierte sich dagegen auf 0,6 GAE. Die Polyphenolfracht bei der S-Fraktion lag um bis zu Faktor 10 höher als bei der Q-Fraktion. Dies führte allerdings, wie an der Farbe der getrockneten Produkte zu erkennen war, nicht zu einer Verbräunung.

10.12 Zusammenfassung

Bei der prozessbegleitenden Analyse der Q- und S-Fractionen wurde ein erfolgreicher Nachweis ihrer Aktivität durchgeführt. Dieser belegte den Erhalt der nativen Form der Proteine. Die Fähigkeit, der in der S-Fraktion enthaltenen Protease-Inhibitoren, Trypsin zu inhibieren, konnte bei den getrockneten Produkten nachgewiesen werden. Die spezifische Aktivität lag bei der Sprühtrocknung bei $8,64 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/mg}$, die der Gefriertrocknung bei $9,74 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/mg}$. Ein Vergleich mit dem verwendeten Ausgangs-KFW mit einer Inhibierungskonzentration von $1,14 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/mg}$, ergab eine geringe Aufreinigung der S-Fraktion.

Es konnte ebenfalls die Lipidacylhydrolaseaktivität des Patatins in den getrockneten Produkten der Q-Fraktion gefunden werden. Die spezifische Aktivität lag bei der Sprühtrocknung bei 0,408 U/mg, die der Gefriertrocknung bei 0,568 U/mg. Im Verhältnis zum eingesetzten KFW mit 0,105 U/mg kam es dabei nachweisbar zu

einer Erhöhung der Reinheit der Q-Fraktion. Bei Q- und S- Fraktionen zeigten sich aber Verluste der Aktivität, die eine Optimierung des Prozesses nötig machen.

Die für die Produktqualität als störend angesehene Polyphenoloxidase-Aktivität wurde wegen ihrer Verbräunung verursachenden Wirkung minimiert. Der Faktor, um den die Aktivität im Verhältnis zum KFW reduziert wurde, lag bei der S-Fraktion bei bis zu 83, der der Q-Fraktion bei bis zu 7. Die PPO-Aktivität wurde jedoch nicht völlig unterbunden.

Verunreinigungen durch Polyphenole waren in den Produkten der Q- und S-Fraktionen ebenfalls minimal und lagen an der unteren Messgrenze.

11 Bilanzvergleich der Isolationsverfahren

In diesem Kapitel wird die Bilanz der beiden Isolationsverfahren aufgestellt. Durch die Bilanzierung eines Prozesses ist eine bessere Analyse der Kosten treibenden Faktoren möglich. Außerdem kann die Optimierung so auf die wesentlichen Schritte konzentriert werden. Die beiden in dieser Arbeit vorgestellten alternativ verwendbaren Isolierungsschritte zur Kartoffelproteingewinnung mittels Membranadsorber oder Sartobind Direct-Wickelmodul wurden in diesem Kapitel miteinander verglichen. Die Kriterien sind der pro 50 kg Produkt entstehende Chemikalien- und Energieverbrauch sowie das dabei anfallende entsorgungspflichtige Abwasservolumen. Bei dem Vergleich wurde die Mikrofiltration in der Prozesszeit nicht berücksichtigt, da sie parallel zum Isolierungsschritt durchgeführt werden kann. Sie fällt aber im Gegensatz zum Sartobind Direct-Wickelmodulprozess als weiterer Kostenfaktor beim Membranadsorberprozess an. Da die Aufreinigung der Eluate durch Ultra-, bzw. Diafiltration sowie die anschließende Trocknung bei beiden Prozessmethoden identisch waren, wurden sie ebenfalls beim Vergleich der beiden Methoden nicht berücksichtigt.

11.1 Zyklendauer der beiden alternativen Isolierungsschritte

Um die Daten der beiden Prozessmethoden analysieren zu können, sind Dauer und Volumina der einzelnen Zyklusschritte für die S-Typ-Module in Tabelle 11.1 aufgeführt.

Tabelle 11.1: Zyklendauer des Isolierungsschrittes mit S-Typ-Modulen

Zyklusschritt	Membranadsorber S-Typ			Sartobind Direct-Wickelmodul S-Typ		
	Vol. [L]	Flussrate [L/min]	Dauer [min]	Vol. [L]	Flussrate [L/min]	Dauer [min]
Beladen KFW 1:5	10,0	2,0	5,0	7,0	8,0	20,0
Spülen NaPP (20 mM)	10,0	2,2	4,5	15,0	4,0	3,8
Eluieren 1 NaCl (0,5 M)	6,0	2,5	2,4	4,2	1,0	4,2
Eluieren 2 NaCl (1 M)	5,0	2,5	2,0	5,0	4,0	1,3
Equilibrierung NaPP (20 mM)	5,0	1,6	3,1	7,0	4,0	1,8
Reinigung NaOH (nach 5 Zyklen)	5,0	1,7	3,0	10,0	5,0	30,0
Gesamt (ohne Reinigung)			17,1			31,0
Gesamt (mit Reinigung)			17,7			37,0

Von den 17,7 min, die für die Durchführung eines S-Typ-Membranadsorber-Zyklus benötigt wurden, entfällt der Hauptanteil auf die Beladung und das Spülen. Da die Beladung im Vergleich zum Sartobind Direct-Wickelmodul mit relativ niedriger Flussrate durchgeführt wurde, ließe sich dort, wie auch bei allen anderen Schritten, noch Zykluszeit reduzieren. Eine Zykluszeit von unter 10 min wäre so durchaus möglich. Beim 37 minütigen Zyklus des Sartobind Direct-Wickelmoduls war die Beladung mit 20 min der zeitraubende Faktor. Auch die Reinigung ist mit 30 min sehr langwierig. Diese wurde jedoch nur alle 5 Zyklen eingeplant, so dass sie effektiv nur 6 min dauert. Durch höheren Aufwand an Reinigungsmitteln und Temperatur ist sie zudem leicht zu optimieren. Die Optimierung der Zyklusdauer sollte sich daher vor allem auf die Beladung konzentrieren.

Auch für die Analyse der Q-Typ-Module wurden die einzelnen Schritte der beiden Prozessmethoden ausgewertet. Sie sind in Tabelle 11.2 aufgelistet.

Tabelle 11.2: Zyklendauer des Isolierungsschrittes mit Q-Typ-Modulen

Zyklusschritt	Membranadsorber Q-Typ			Sartobind Direct-Wickelmodul Q-Typ		
	Vol. [L]	Flussrate [L/min]	Dauer [min]	Vol. [L]	Flussrate [L/min]	Dauer [min]
Beladen KFW 1:5	10,0	2,0	5,0	7,0	8,0	20,0
Spülen NaPP (20 mM)	10,0	2,2	4,5	18,4	4,2	4,4
Eluieren 1 NaCl (0,5 M)	7,5	3,0	2,5	14,2	2,0	7,1
Eluieren 2 NaCl (1 M)	6,0	3,0	2,0	10,0	2,0	5,0
Equilibrierung NaPP (20 mM)	5,0	1,6	3,1	8,0	4,2	1,9
Reinigung (nach 5 Zyklen)	5,0	1,7	3,0	10,0	5,0	30,0
Gesamt (ohne Reinigung)			17,2			38,4
Gesamt (mit Reinigung)			17,8			44,4

Für die Zyklusdauer des Q-Typ-Membranadsorbers mit 17,8 min gilt das gleiche wie für den S-Typ-Membranadsorber. Durch Erhöhung der Flussraten könnte der Zyklus auf unter 10 min verkürzt werden. Die mit 44,4 min deutlich höhere Zyklusdauer des Sartobind Direct-Wickelmoduls könnte ebenfalls durch Optimierung der Beladung verkürzt werden. Im Vergleich zum S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul spielt die Elutionszeit trotz höherer Flussraten eine stärkere Rolle, da der Verbrauch an Eluent größer ist. Die Möglichkeiten einer Optimierung sind jedoch begrenzt.

11.2 Vergleich der Bindungskapazitäten der Membranadsorber- und Sartobind Direct-Wickelmodule

Die wichtigste Rolle des Kartoffelprotein-Gewinnungsprozesses spielt die Bindungskapazität der Membranen. Sie bestimmt die Leistung des Prozesses, da der Aufwand für die Durchführung eines Zyklus sehr groß ist. In Tabelle 11.3 sind Bindungskapazitäten der verschiedenen Module im Vergleich dargestellt.

Tabelle 11.3: Bindungskapazitäten der Membranadsorber- und Sartobind Direct-Wickelmodule

	Membranadsorber		Sartobind Direct-Wickelmodul	
	S-Typ	Q-Typ	S-Typ	Q-Typ
Membranfläche [cm²]	6600	6600	13568	13145
Bindungskapazität [mg/cm²]	1,00	0,37	0,36	0,39

Für den S-Typ-Membranadsorber wurde eine Bindungskapazität von 1 mg/cm² bestimmt. Dies bedeutet im Vergleich zum Sartobind Direct-Wickelmodul mit 0,36 mg/cm² die dreifache isolierte Menge Protein bei gleicher Membranfläche. Der deutliche Unterschied zwischen Membranadsorber und Sartobind Direct-Wickelmodul ist ungewöhnlich, da es sich um die gleichen Membranen handelt. Dies legt den Schluss nahe, dass die Bestimmung einer der beiden Bindungskapazitäten noch optimiert werden muss. Die Bindungskapazitäten der Q-Typ-Module waren mit 0,37 mg/cm² beim Membranadsorber und 0,39 mg/cm² beim Sartobind Direct-Wickelmodul mit dem des S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls vergleichbar. Damit war der S-Typ-Membranadsorber mit Abstand der Effektivste.

11.3 Chemikalien-Verbrauch der beiden alternativen Isolierungsschritte

Für die Prozesskosten haben die aufgewendete Energie sowie die Mengen an verbrauchten Chemikalien und entstehenden Abwässer entscheidende Bedeutung. In Tabelle 11.4 sind diese Zahlen für die Prozesse mit S-Typ-Modulen aufgelistet.

Tabelle 11.4: Chemikalien- und Energieverbrauch der S-Typ-Module

Verbrauch	Membranadsorber S-Typ		Sartobind Direct-Wickelmodul S-Typ	
	pro Zyklus	pro 50 kg Produkt	pro Zyklus	pro 50 kg Produkt
Isolation				
Na ₂ HPO ₄	26,7 g	202,3 kg	39,2 g	400,9 kg
NaH ₂ PO ₄	23,4 g	177,3 kg	34,3 g	351,3 kg
NaCl	464,0 g	3515,2 kg	411,8 g	4215,4 kg
NaOH	4,0 g	30,3 kg	8,0 g	81,9 kg
VE-H ₂ O	35,0 L	265,2 m ³	38,8 L	397,2 m ³
KFW	2,0 L	15,2 m ³	1,4 L	14,3 m ³
Abwasser	37,0 L	280,4 m ³	40,2 L	411,5 m ³
Energie	0,05 kWh	412,8 kWh	0,11 kWh	1166,2 kWh
Mikrofiltration				
NaOH	4,3 g	32,9 kg	---	---
VE-H ₂ O	1,1 L	8,2 m ³	---	---
Abwasser	1,1 L	8,2 m ³	---	---
Energie	0,05 kWh	406,2 kWh	---	---
Gesamt				
NaOH	8,35 g	63,24 kg	8,0 g	81,9 kg
VE-H ₂ O	36,1 L	273,4 m ³	38,8 L	397,2 m ³
Abwasser	38,1 L	288,6 m ³	40,2 L	411,5 m ³
Energie	0,11 kWh	819,0 kWh	0,11 kWh	1166,2 kWh

Durch die höhere Bindungskapazität ist der Chemikalienverbrauch des Membranadsorbers bezogen auf 50 kg Produkt geringer als der des Sartobind Direct-Wickelmoduls. Das Gesamtabwasservolumen mit 289 m³ gegenüber 412 m³ und der Energieverbrauch mit 819 kWh gegenüber 1166 kWh sind ebenfalls geringer. Die Mikrofiltration für den Membranadsorber trägt dabei nur einen kleinen Teil zum Abwasservolumen und Chemikalienverbrauch bei. Dagegen ist sie zur Hälfte am Energieverbrauch beteiligt. Die größten Verbrauchsposten machten bei beiden Prozessansätzen deutlich das Natriumchlorid und das VE-Wasser aus. Diese erreichten beim Membranadsorber 3,5 t Natriumchlorid und 273 m³ VE-Wasser. Bei den Sartobind Direct-Wickelmodulen wurden von 4,2 t

Natriumchlorid und 397 m³ VE-Wasser verbraucht. Die Optimierung sollte dahin gehen, dass neben der Reduktion der Salzmengen, auch Lösungen auf Wiederverwendbarkeit getestet werden. So könnte z.B. die 1 M Natriumchlorid-Lösung wegen ihrer geringen Verunreinigungen mehrfach für die Elution 2 verwendet werden.

In Tabelle 11.5 ist die vollständige Liste der verwendeten Substanzen für die Q-Typ-Module dargestellt.

Tabelle 11.5: Chemikalien- und Energieverbrauch der Q-Typ-Module

Verbrauch	Membranadsorber Q-Typ		Sartobind Direct-Wickelmodul Q-Typ	
	pro Zyklus	pro 50 kg Produkt	pro Zyklus	pro 50 kg Produkt
Isolation				
Na ₂ HPO ₄	26,7 g	546,7 kg	40,2 g	392,3 kg
NaH ₂ PO ₄	13,4 g	273,3 kg	41,2 g	401,7 kg
NaCl	565,5 g	11578,6 kg	991,8 g	9673,2 kg
NaOH	4,0 g	81,9 kg	8,0 g	78,0 kg
VE-H ₂ O	37,5 L	767,8 m ³	58,2 L	567,6 m ³
KFW	2,0 L	41,0 m ³	1,4 L	13,7 m ³
Abwasser	39,5 L	808,8 m ³	59,6 L	581,3 m ³
Energie	0,05 kWh	1121,9 kWh	0,14 kWh	1334,8 kWh
Mikrofiltration				
NaOH	4,3 g	89,0 kg	---	---
VE-H ₂ O	1,1 L	22,3 m ³	---	---
Abwasser	1,1 L	22,3 m ³	---	---
Energie	0,05 kWh	1097,9 kWh	---	---
Gesamt				
NaOH	8,35 g	170,9 kg	8,0 g	78,0 kg
VE-H ₂ O	38,6 L	790,1 m ³	58,2 L	567,6 m ³
Abwasser	40,6 L	831,1 m ³	59,6 L	581,3 m ³
Energie	0,11 kWh	2219,8 kWh	0,14 kWh	1334,8 kWh

Das entsorgungspflichtige Gesamtwasservolumen liegt beim Membranadsorber mit 831 m³ höher als beim Sartobind Direct-Wickelmodul mit 581 m³. Ebenso ist

der Verbrauch an Chemikalien deutlich höher. So liegt der Verbrauch von Natriumchlorid beim Membranadsorber bei 11,6 t gegenüber 9,7 t beim Sartobind Direct-Wickelmodul. Die Mikrofiltration hat daran bei dieser Prozessführung nur einen geringen Anteil. Allerdings ist der hohe Energieverbrauch des Membranadsorbers mit 2220 kWh gegenüber 1335 kWh beim Sartobind Direct-Wickelmodul zur Hälfte auf diese zurückzuführen.

11.4 Beurteilung der beiden Isolierungsprozesse

Beim Vergleich der Module fällt besonders der S-Typ-Membranadsorber auf. Neben der mit Abstand höchsten Bindungskapazität von 1 mg/cm², hatte er mit 17,7 min auch die kürzeste Zyklusdauer. Dies führte zum geringsten Verbrauch an Chemikalien und Energie und zur Erzeugung des geringsten Abwasservolumens bezogen auf 50 kg Produkt.

Der Proteinisolationsschritt für Patatin ist erheblich kostenaufwendiger als der für Protease-Inhibitoren. Durch die längeren Zykluszeiten liegt der Natriumchloridverbrauch des Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls mehr als doppelt so hoch wie bei dem S-Typ-Wickelmodul. Beim Membranadsorber ist der Verbrauch sogar mehr als dreimal so hoch. Auch die Gesamtabwasservolumina der Q-Typ-Module liegen erheblich höher als die der S-Typ-Wickelmodule.

Durch die lange Beladungsdauer der Sartobind Direct-Wickelmodule ist die Zyklusdauer länger als die der Membranadsorber. Dies führt zu einem höheren Energieverbrauch gegenüber den Membranadsorbern. Besonders auffällig ist der Unterschied zwischen den S-Typ-Modulen, die sich bezogen auf 50 kg Produkt beinahe um Faktor drei unterscheiden. Wird die Mikrofiltration jedoch hinzugezogen, ist der Unterschied im Energieverbrauch weit weniger ausgeprägt. Besonders bei einem so anspruchsvollen Medium wie dem KFW stellen die hohen Energie-, Abwasser- und Materialkosten bei der Filtration einen beträchtlichen Kostenanteil dar. Bei den Q-Typ-Modulen ist durch den hohen Energieverbrauch der Mikrofiltration das Sartobind Direct-Modul zu bevorzugen.

Der S-Typ-Membranadsorber ausgehend von diesen Daten für die Isolation von Protease-Inhibitoren besser geeignet als das Sartobind Direct-Wickelmodul. Für die Gewinnung des Patatins überwiegen die Vorteile des Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls durch einen einfacheren und zugleich Material und Chemikalien sparenderen Betrieb. Für eine kombinierte Gewinnung beider Proteine sind prinzipiell beide Isolationsarten geeignet. Die Isolation mit Sartobind Direct-Wickelmodulen hat bei gleichen Bindungskapazitäten deutlich mehr Vorteile als der Membranadsorber.

12 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein auf Membrantechnologie basierender mehrstufiger Prozess entwickelt, mit dem die Isolierung von nativen Proteinen aus Kartoffelfruchtwasser (KFW) gelungen ist. KFW fällt in großen Mengen als Abfallprodukt bei der industriellen Stärkeproduktion an. Die darin enthaltenen Proteine konnten bislang nur in denaturierter Form isoliert gewonnen werden und haben daher eingeschränkten Nutzen. Nativ gewonnene Proteine würden die industrielle Wertschöpfung erheblich erhöhen. In Kooperation mit der Emslandstärke GmbH führt das Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover und die Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Kaiserslautern aus diesem Grund ein Forschungsprojekt durch, um die nativen Proteine aus dem KFW zu isolieren. Dafür wurden die in vorangegangenen Arbeiten erzielten Forschungsergebnisse aus dem Labor- in den Technikumsmaßstab übertragen und die einzelnen Prozessstufen optimiert.

Prozessstufe 1: Mikrofiltration

Für den Einsatz des KFW bei der Membranadsorption war es zunächst notwendig eine Crossflow-Mikrofiltration durchzuführen. Bei den Versuchen zur am besten geeigneten Betriebsmethode wurden mehrere Porengrößen, Materialien und Modularten untersucht.

Für die Bestimmung der Porengröße wurde ein Ceram-Revolvermodul benutzt, mit welchem simultan vier verschiedene Rohrmodule getestet werden konnten. Es wurden die Porengrößen 0,1 μm , 0,2 μm , 0,45 μm und 0,8 μm verwendet. Aus den Versuchen resultiert, dass geringe Porengrößen höhere Fluxwerte erzielten, dafür aber einen deutlich niedrigeren Proteingehalt im Permeat aufwiesen. Im Hinblick auf den Einsatz in einem industriellen Prozess wurde deshalb eine Porengröße von 0,2 μm gewählt. Sie gewährleistet, dass sämtliche Keime und Bakterien bei der Filtration abgetrennt werden.

Für die Tests des optimalen Membranmaterials kamen Membranen aus Polypropylen (Microdyn) und Titan/Zinkoxid (Ceram) in Rohrmodulen zum Einsatz.

Auf Cellulose basierende Membranen von der Sartorius AG (Hydrosart) wurden in Plattenmodulen (Kassetten) getestet. Die Rohrmodule erzielten deutlich höhere Flussraten als die Hydrosart-Kassette und stellten so, über die Zeit betrachtet, größere Proteinfrachten für den Isolierungsschritt bereit. Diese Bauart scheint demnach für hohe Flussraten bei der Mikrofiltration besser geeignet zu sein. Jedoch ist der Proteingehalt im Permeat des Kassettenmoduls nach 30 min Filtration wesentlich größer als bei den Rohrmodulen. Durch die damit einhergehende geringere Deckschichtbildung bewirkt somit die Hydrosart-Membran, im Gegensatz zu den beiden anderen, nur eine schwache Rückhaltewirkung der Proteine im Retentat. Um die Protein-Zusammensetzung des KFW zu erhalten, wurde sie für die weiteren Versuche ausgewählt. Bei Optimierungsversuchen des Druckes betrug ihr Flux nach 1 h $46 \text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$. Der Proteinverlust lag nach dieser Zeit im Verhältnis zum Ausgangs-KFW bei nur 15 %.

Prozessstufe 2: Membranadsorber

Die Isolierung der Kartoffelproteine aus dem Mikrofiltrat wurde erfolgreich mit Ionenaustauscher-Membranadsorber-Wickelmodulen der Sartorius AG (Sartobind SingleSep: 6600 cm^2 und MultiSep: 10000 cm^2) durchgeführt. Für die Gewinnung des Speicherproteins Patatin wurde eine Q-Typ-Membran, für die Protease-Inhibitoren eine S-Typ-Membran verwendet. Anhand der UV-Peaks und der SDS-Gele war klar zu erkennen, dass die Aufarbeitung mit sehr hoher Reinheit erfolgte. Die durchschnittlichen Bindungskapazitäten der Module lagen bei vier aufeinander folgenden Zyklen beim Q-Modul bei $0,37 \text{ g}/\text{cm}^2$ und beim S-Modul bei $1,00 \text{ g}/\text{cm}^2$.

Alternative Prozessstufe 2b: Sartobind Direct-Wickelmodul

Durch den großen Aufwand der Mikrofiltration vor dem Isolierungsschritt, wurde für die Prozessentwicklung eine neuartige Membrantechnologie getestet. Ein Wickelmodul, welches die Membranen im Gegensatz zum Membranadsorber nicht frontal sondern durch eingebaute Spacerkanäle tangential anströmt, machte eine vorherige Mikrofiltration unnötig. Das Sartobind Direct-Wickelmodul erzielte dabei

die gleiche Reinheit wie ein herkömmlicher Membranadsorber. Für die Versuche wurde KFW sowohl im Labor hergestellt als auch aus dem Prozess der Emslandstärke entnommen. Die mittleren Bindungskapazitäten von Prozess- und Labor-KFW für Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodule erreichten bei fünf, bzw. drei Zyklen $0,39 \text{ mg/cm}^2$ und $0,32 \text{ mg/cm}^2$. Die Bindungskapazitäten der S-Membranen betragen $0,36 \text{ mg/cm}^2$, bzw. $0,38 \text{ mg/cm}^2$. Die langen Zyklusdauern der Sartobind Direct-Wickelmodule mit 44,4 min bzw. 37 min stellten allerdings einen Nachteil gegenüber den Membranadsorbern dar. Dieser zeigte sich besonders bei den S-Fractionen, wo der geringere Energie- und Abwasserverbrauch der Membranadsorber bei der Isolation deutlich wurde. Bei den Q-Fractionen stellten die Sartobind Direct-Wickelmodule dagegen die bessere Wahl dar, wertvolle Inhaltsstoffe mit geringem Aufwand an Energie und Abwasser zu gewinnen. Sie eignen sich besonders für Medien mit besonders hohem Filtrationsaufwand wie Kartoffelfruchtwasser. Eine kombinierte Aufarbeitung von Q- und S-Fractionen ist mit beiden Isolierungsmethoden möglich. Die Isolation mit Sartobind Direct-Wickelmodulen hat aber bei gleichen Bindungskapazitäten deutlich mehr Vorteile als der Membranadsorber.

Prozessstufe 3: Ultra- und Diafiltration

Im Anschluss an die Isolierung wurden die Eluate mittels Ultrafiltrations-Plattenmodulen (Kassetten) aufkonzentriert und durch eine Diafiltration weiter aufgereinigt. Das Molekulargewicht der Protease-Inhibitoren im S-Eluat 1 beträgt 20 kDa. Die geeignete Ausschlussgröße war daher 10 kDa. Da das Zielprotein Patatin im Q-Eluat 1 eine Größe von ca. 40 kDa besitzt, wurden für die Ultrafiltration Hydrosart-Kassetten (Membranfläche: $0,1 \text{ m}^2$) Ausschlussgrößen von 10 kDa und 30 kDa getestet.

Die Hydrosart-Membran erwies sich bei weiteren Versuchen gegenüber Polyethersulfon (PESU) als besser geeignetes Material für die Ultrafiltration, da sie über die gesamte Versuchsdauer konstante Fluxwerte von $68 \text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ lieferte und daher zu einem sehr geringen Reinigungsaufwand führte. Für beide Eluate wurde

die 10 kDa-Hydrosart-Kassette als am besten geeignet eingestuft und im weiteren Prozess verwendet.

Prozessstufe 4: Trocknung

Als Trocknungsmethoden für die Proteinfractionen wurden sowohl die Gefrier- als auch die Sprühtrocknung getestet. Mit beiden Verfahren gelang es, die Proteinfractionen in nativem Zustand zu trocknen. Um die Stabilität der Produkte zu verbessern, sollten hier weitere Optimierungsversuche durchgeführt werden.

Prozessbegleitende Analytik

Um den Erfolg des Proteingewinnungsprozesses verfolgen zu können, wurden die Enzymaktivitäten der wichtigsten Proteine untersucht. Dafür wurden Assays zur Bestimmung der Lipidacylhydrolaseaktivität im Patatin und der inhibierenden Wirkung der Protease-Inhibitoren auf Trypsin verwendet. Es konnte in den getrockneten Produkten der Q-Fractionen die Lipidacylhydrolaseaktivität nachgewiesen werden. Ebenso konnte eine Inhibierungswirkung in den Produkten der S-Fractionen gemessen werden. Im Verlauf des Prozesses kam es allerdings bei beiden Produkten zu Verlusten der Aktivität. Eine Optimierung der Prozessschritte hinsichtlich Haltbarkeit und Stabilität ist hier sinnvoll. Weiterhin wurde ein Assay für die Bestimmung der Polyphenoloxidase-Aktivität etabliert. Dieser ergab, dass die Aktivität in den S- und Q-Fractionen im Verhältnis zum KFW um den Faktor 83 bzw. 7 reduziert wurde, jedoch nicht völlig unterdrückt wurde. Für etwaige Polyphenol-Verunreinigungen wurde ein Polyphenol-Assay etabliert. Dieser ergab, dass die Verunreinigungen in den getrockneten Produkten bei einer Proteinkonzentration von 2 g/L unterhalb von 1 GAE/L lagen und damit im Vergleich zum ursprünglichen KFW mit 13,96 GAE/L gering waren.

Langfristig ist es sinnvoll, eine Analyse-Methode zu entwickeln, die es erlaubt die Proteinfractionen von Patatin und der Protease-Inhibitoren getrennt zu quantifizieren. Erste Versuche mit HPLC oder Kapillarelektrophorese, die von Veronika Alt in ihrer Dissertation durchgeführt wurden, liefern dafür erste Ansätze.

Für eine Nutzung der Proteinfractionen im nativen Zustand ist eine Optimierung des Prozesses im Hinblick auf den Erhalt der Stabilität notwendig. Außerdem ist für die Zukunft des Kartoffelprotein-Prozesses die Optimierung der neuen Betriebsweise der Sartobind Direct-Wickelmodule sinnvoll. Es ist bereits eine Anlage im Bau, die im Technikum der Emslandstärke GmbH in Emlichheim betrieben werden soll. Mit ihrer Hilfe sollen die Prozessparameter im Hinblick auf Stabilität der Produkte, Prozessdauer und Chemikalienverbrauch weiter optimiert werden. Sie werden Aufschluss geben über die langfristigen Einsatzmöglichkeiten der Membranmodule. Dadurch wird sich zeigen, ob der Prozess sich wirtschaftlich bewähren kann.

13 Anhang

Anhang A: Abkürzungsverzeichnis

APS – Ammoniumpersulfat
bideest. - bidestilliert
denat. – denaturiert
Dia – Diafiltration
E.C. – Enzyme Commission
GA - Gallussäure
k.D. – keine Daten
kDa – Kilo-Dalton
KFW – Kartoffelfruchtwasser
m - Masse
MF – Mikrofiltration
MG – Molekulargewicht
mM – Millimol
m/s – Meter pro Sekunde
m/S - Millisiemens
Per – Permeat
PESU - Polyethersulfon
pI – isoelektrischer Punkt
PI – Protease-Inhibitor
Ret – Retentat
SDS - Sodium-Dodecyl-Sulfate (Natriumdodekylsulfat)
STI – Soybean Trypsin-Inhibitor
TAME - N_α-p-Tosyl-L-Arginin-Methylester
TCA – Trichloressigsäure
TEMED – Tetramethylethylendiamin
TMP – Transmembrandruck
U - Unit

UF – Ultrafiltration

UV – Ultraviolett

V – Volumen

VE – vollständig entsalzt

Anhang B: Chemikalienliste

Gelelektrophorese

Ethylendiamintetraessigsäure, 98 %	Fluka
Acrylamid p.a.	Amersham
Bisacrylamid p.a.	Amersham
Natriumdodekylsulfat (SDS) p.a.	Fluka
Tetralmethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS) p.a.	Sigma
Natriumcarbonat p.a.	Fluka
Silbernitrat p.a.	Riedel-de-Haën
Essigsäure p.a.	Fluka
2-Mercaptoethanol p.a.	Fluka
Formaldehyd p.a.	Fluka
Natriumthiosulfat p.a.	Fluka

Polyphenol-Assay

Trichloressigsäure (TCA)	Sigma
Gallussäure	Sigma
Folinreagenz	Pierce
bidest. Wasser	

Polyphenoloxidase-Assay

Ascorbinsäure (Vitamin C), 99 %	Fluka
Chlorogensäure 95 %	Sigma
Catechol	Sigma
Kaffesäure	Sigma

Kaliumphosphat	Fluka
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka

Protease-Inhibitor-Assay

Trypsin aus Rinderpankreas (3.4.21.4)	Sigma
Trypsininhibitor aus <i>Glycine max</i> [L.] Merr. (Sojabohne)	Fluka
N _α -p-Tosyl-L-Arginin-Methylester (TAME)	Sigma
Trizma® pre-set crystals, pH 8,3	Sigma
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Sigma

Patatin-Assay

p-Nitrophenylcaprat	Sigma (als syn. p-Nitrophenyldecanoat)
Acetonitril (HPLC-grade)	Fluka
Trizma® pre-set crystals, pH 8,0	Sigma
Triton X-100	Sigma

Mikro- und Ultrafiltration

Natriumhydroxid – Microprills	Riedel-de-Haën
-------------------------------	----------------

Membranadsorber

Natriumchlorid	VWR
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat	Riedel-de-Haën
Natriumbisulfit p.a.	Sigma
Zitronensäure	Riedel-de-Haën

Lowry-Test

Modified Lowry Protein Test Kit	Pierce
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma

Anhang C: Geräteliste

Entsafter	Powerjuicer „Jack la Lane“
Zentrifuge	Megafuge 1.0 RS
Beutelzentrifuge	Emslandstärke
Pumpe	Sartocon jet, Fa. Sartorius AG Leistung:185 Watt
Vorfilter	Sartorius AG 1. Sartopure PP, 5 µm 2. Sartopure PP, 10 µm
Sartocon-Slice-Filtrationsanlage	Sartorius AG
Plattenmodule (Kassetten)	Sartorius AG, Membranfläche: 0,1 m ² 1. Hydrosart, Porengröße: 0,2 µm 2. Hydrosart, Porengröße: 10 kDa 3. Hydrosart, Porengröße: 30 kDa 4. Polyethersulfon (PESU), Porengröße 30 kDa
Rohrmodule	1. Microdyn MD020TP2N, Membranfläche:0,036 m ² , Polypropylen, Porengröße: 0,2 µm 2. Ceram, Membranfläche: 4x0,0225 m ² , Titan-Zinkoxid, Porengröße: 0,2 µm
SingleSep-Wickelmodule	Sartorius AG, Membranfläche: 6600 cm ² Q-und S-Typ
MultiSep-Wickelmodule	Sartorius AG, Membranfläche: 10000 cm ² Q-und S-Typ
Sartobind Direct-Wickelmodul	Sartorius AG, Gewebedicke: 0,24 mm, extrudiert Membranfläche Q-Typ: 13145 cm ² Membranfläche S-Typ: 13568 cm ²
Sprühtrockner	B-191 Mini-Spray-Dryer Fa. Büchi
Gefriertrockner	Alpha Anlage Fa. Christ
Thermometer	

Leitfähigkeitsmessgerät	WTW, Cond 315i
Photometer	Varian Cary 50 Bio
	Thermo Multiscan Spectrum Multiplate
UV-Küvetten	Hellma QS 10.00mm
Pipetten	Eppendorf (10-1000 µL)
Sterilfilter-Spritzenaufsätze	Sartorius AG, Porengröße: 0,2 µm
Zentrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5415 C
Magnetrührer und Rührkerne	
pH-Meter	Checker by HANNA
Vortex-Schüttler	

Anhang D: Bereitstellung des Kartoffelfruchtwassers

Da die Nutzung des Kartoffelfruchtwasser aus dem Prozess der Emslandstärke an die Kampagnezeiten der Stärkeproduktion (etwa von August-März) gebunden ist, wurde für die Zeiträume dazwischen das Fruchtwasser im Technikum des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover aus Kartoffeln hergestellt. Im Folgenden werden beide Methoden der Bereitstellung von KFW erläutert.

Labor-KFW aus Kartoffeln

Festkochende Kartoffeln wurden zunächst gewaschen und mit einem Entsafter zerkleinert. In einem 25 L Kanister wurde das Antioxidanz Bisulfit vorgelegt, um die rasche Bräunung des KFW zu stoppen. Die Menge wurde so gewählt, dass die Konzentration des Bisulfits etwa 5 g/L im Überstand betrug. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Ausbeute des Überstandes im Verhältnis zum Gewicht der Kartoffeln bei 50 % lag. Der zurückgebliebene Feststoff wurde verworfen und der Kanister mit dem KFW einige Minuten zur Sedimentation der Feststoffpartikel stehen gelassen. Dabei bildete die enthaltene Stärke eine einige Zentimeter hohe Bodenschicht. Darüber befand sich das KFW mit einer erheblichen Schaumschicht. Der Überstand wurde anschließend dekantiert.

Prozess-KFW aus Kartoffeln

Nach dem die ersten Versuche der Proteingewinnung mit Hilfe der Sartobind Direct-Wickelmodule erfolgreich verliefen, wurde statt des Labor-KFW werkeigenes Prozess-KFW aus Emlichheim verwendet. Dazu wurde das KFW am Vortag des Versuches direkt aus dem Oberlauf des Prozesses zur Stärkeproduktion entnommen, mit Bisulfit versetzt und von Emlichheim nach Hannover transportiert, wo es bei 5 °C im Kühlraum gelagert wurde.

Anhang E: Photometrische Bestimmungsmethode

Anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes lassen sich Absorptionswerte von Lösungen bestimmen.

$$E = \frac{\ln I_0}{\ln I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (13.1)$$

E – Extinktion

I_0 und I – Anfangs- und aktuelle Intensität

ε – Extinktionskoeffizient [L/(mmol*cm)]

c – Konzentration [mmol/L]

d – Schichtdicke (1 cm)

Mit folgender Formel können dann die gemessenen Werte in die Volumenaktivität U/mL umgerechnet werden.

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} \cdot \text{min}} = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V \cdot F}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \quad (13.2)$$

U – Aktivität

$\Delta E / \text{min}$ – Extinktionsänderung pro Minute

V – Gesamtvolumen [μL]

v – Probenvolumen [μL]

F - Verdünnungsfaktor

Anhang F: Lowry-Assay für Microplates [115]

Die Methode beruht auf der Reaktion von Proteinen mit Kupfersulfat und -tartrat in alkalischer Umgebung. Dabei entsteht ein Tetridentat-Kupfer-Protein-Komplex. Nach Zugabe des Folin-Ciocalteu-Reagenz entsteht ein wasserlösliches Produkt, dessen blaue Farbe bei 750 nm photometrisch gemessen werden kann. Als Kalibrationsreihe wurde ein BSA-Standard verwendet.

Die Durchführung des Assays war wie folgt:

- Verdünnung des Folin-Ciocalteu-Reagenz mit Wasser (1:1)
- Vorlage von 40 µL Probe
- Zugabe von 200 µl Lowry-Reagenz
- Inkubation für 10 min bei RT
- Zugabe von 20 µL Folin-Ciocalteu-Reagenz (1:1 mit bidest. Wasser verdünnt)
- Inkubation für 30 min
- Absorptionsmessung des Microplate bei 750 nm im Photometer

Anhang G: Patatin-Assay nach Dr. Veronika Alt [61]

Die Bestimmung der Lipidacylhydrolaseaktivität des vakuolären Kartoffel-Glykoproteins Patatin erfolgt über die Hydrolyse des chromogenen Substrats p-Nitrophenylcaprat. Die Detektion des gebildeten Produkts erfolgt photometrisch durch Messung der Absorptionzunahme bei einer Wellenlänge von 400 nm und ist deutlich erkennbar durch die gelbe Färbung des p-Nitrophenolats. Der Extinktionskoeffizient liegt bei 16888 L / (mol · cm). Das Testsystem funktioniert besonders gut für Patatin, ist aber nicht spezifisch für dieses Protein. Vielmehr drückt eine mit diesem Test bestimmte Aktivität die lipolytische Summenaktivität gegenüber p-Nitrophenylcaprat bei einem pH-Wert von 8,0 und einer Temperatur von 25 °C aus.

Lösungen:

- Pufferlösung: 10 mM Tris · HCl (pH 8,0) in H₂O (bidest.)
- Substratlösung: 10,22 mM p-Nitrophenylcaprat in Acetonitril
- Detergenzlösung: 4 mM Triton X-100 in Pufferlsg.

Testzusammensetzung:

- Gesamtansatzvolumen: 1 mL
- Volumina in Reihenfolge der Zugabe:
 - 10 µL Substratlösung
 - 250 µL Detergenzlösung
 - 690 µL Pufferlösung
 - 50 µL Probe

Anhang H: Protease-Inhibitor-Assay nach Dr. Veronika Alt [61]

Die Bestimmung der biologischen Aktivität von Protease-Inhibitoren erfolgt über ihre hemmende Wirkung auf die Aktivität der Serinprotease Trypsin (*E.C.* 3.4.21.4). Die Hydrolysegeschwindigkeit der Esterbindung des verwendeten Substrats N_{α} -p-Tosyl-L-Arginin-Methylester (TAME) sinkt mit zunehmender Inhibitoraktivität. Die Detektion des gebildeten Produkts erfolgt photometrisch durch Messung der Absorptionzunahme bei einer Wellenlänge von 247 nm. Der Extinktionskoeffizient liegt dabei bei 449,5 L / (mol*cm). Eine zusätzliche Quantifizierung der Inhibitoraktivität erfolgt über eine Kalibrierung des Testsystems unter Verwendung eines definiert eingesetzten Protease-Inhibitors. Hierzu wird der syn. Kunitz-Trypsin-Inhibitor (soybean trypsin inhibitor: SBTI, STI) verwendet. Der STI (MG 20,1 kDa) bildet stöchiometrisch einen 1:1 Komplex mit dem aktiven Zentrum des Trypsins, wobei diese Assoziation reversibel und pH-abhängig ist (Assoziationskonstantem (pH 8,0) $> 10^9$). Durch die Bindung an Trypsin kann der Inhibitor durch Trypsin-vermittelte Spaltung einer Arginin-Isoleucin-Bindung modifiziert werden. Somit kann der Inhibitor entweder nativ oder modifiziert aus dem Trypsin-Inhibitor-Komplex hervorgehen.

Lösungen

- Pufferlösung: 50 mM Tris · HCl, 10 mM CaCl₂ (pH 8,3) in H₂O (bidest.)
- Substratlösung: 2,64 mM TAME · HCl in Pufferlösung
- Enzymlösung: 4,35 μM Trypsin in Pufferlösung
- Enzyminhibitorlösung: 4,98 μM Trypsininhibitor (STI) in Pufferlösung

Testzusammensetzung

- Gesamtansatzvolumen: 1 mL
- Volumina in Reihenfolge der Zugabe:
 - 20 μL Enzymlg. + Probe [1:1 gemischt, 15 min Inkubiert bei 25 °C]
 - 580 μL Pufferlg.
 - 400 μL Substratlg.

Tabelle 13.1: Pipettierschema für die Kalibrierung des Protease-Inhibitor-Assays

Molares Verhältnis im Gesamtansatz: (STI / Trypsin)	STI-Konzentration im Gesamtansatz	Enzyminhibitor- Lösung	Pufferlsg.
[%]	[nM]	[μ L]	[μ L]
0,00	0	0	50
20,60	8,96	9	41
38,91	16,9	17	33
59,50	25,9	26	24
80,10	34,8	35	15
100,70	43,8	44	6

Anhang I: Polyphenoloxidase-Assay

Der Assay basiert auf der photometrischen Messung des Abbaus von Ascorbinsäure. Diese reduziert ortho-Chinone, die Produkte bei der durch Polyphenoloxidase enzymatisch katalysierten Oxidation von Sauerstoff mit Catechol sind. Der Abbau der Ascorbinsäure kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 265 nm gemessen werden. Der Extinktionskoeffizient beträgt 7 L/(mmol·cm).

Lösungen

- KPP-Puffer: 0,1 M, pH 7
- EDTA-Puffer: 0,001 M in 0,1 M KPP-Puffer (pH 7)
- (+)-Ascorbinsäure: $5,6 \cdot 10^{-5}$ M
- Chlorogensäure 5,7 mM

Testzusammensetzung

- Gesamtansatzvolumen: 1 mL
 - 0,5 mL EDTA-Puffer
 - 0,5 mL Ascorbinsäure
 - 0,01 mL Chlorogensäure
 - 0,01 mL Probe

Die Küvette wird vor Zugabe der Probe in das Photometer gestellt. Mit einem Rührstäbchen wird dreimal in der Küvette umgerührt. Nach 3 min wird die Messung beendet und die Steigung bestimmt.

Anhang J: Polyphenol-Assay

Die Proben wurden 15 min bei 4° C mit 3000 g zentrifugiert und die Überstände für den weiteren Assay verwendet. Je 960 µL Probe wurden entnommen und mit 40 µL TCA-Lsg. (10 %) in einem Mikroreaktionsgefäß vermischt. Das Probengefäß wurde währenddessen in einem Eisbad aufbewahrt und anschließend 10 min bei 4° C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde es erneut bei 3000 g zentrifugiert und dem Überstand 120 µL Natronlauge (0,5 M) zum Neutralisieren zugegeben. Die Probe war nun bereit für die Messung. Als Kalibrationsstandard wurde Gallussäure (GA) verwendet (170,1 g/mol).

Tabelle 13.2: Kalibrationsreihe des Polyphenol-Assays mit Gallussäure

Konz. GA [mM]	Volumen GA [µL]	Volumen bidest. Wasser [µL]
0	0	1000
0,25	100	900
0,5	200	800
1,0	400	600
1,5	600	400
2,0	800	200
2,5	1000	0

Durchführung der Messung in einem Eppendorfgefäß:

- Zugabe von 685 µL bidest. Wasser
- Zugabe von 250 µL Natronlauge (0,5 M)
- Zugabe vonr 40 µL Probe (ideal: etwa 1:4 verdünnt)
- Sofortige Zugabe von 25 µL Folinreagenz
- 15 min bei 37° C im Inkubationsschüttler (Schüttelgeschwindigkeit: mäßig)
- 1 min unter kaltem Wasser abkühlen
- Messung Absorption bei 736 nm im Detektions-Photometer (Küvettschichtdicke: 1 cm)

Reproduzierbarkeit der Methode

Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden 10 Messungen einer Probe Labor-KFW ohne Bisulfitzusatz durchgeführt. Anschließend wurden alle Proben aus dem Eisbad genommen und bei Raumtemperatur stengelassen. Nach 16 h wurden erneut 10 Messungen der Probe durchgeführt. Die Proben färbten sich während des Versuches von gelb ins bräunliche. Nach 16 h waren alle braun. Die Messergebnisse sind in Tabelle 13.3 dargestellt.

Tabelle 13.3: Reproduzierbarkeitsmessungen des Polyphenolassays über einen Zeitraum von 16 h

Probe	Abs Start	c [mM]	c [GAE/mL]	Abs Ende	c [mM]	c [GAE/mL]
1	0,443	4,90	834	0,471	5,23	889
2	0,527	5,88	1000	0,464	5,15	875
3	0,478	5,31	903	0,415	4,58	778
4	0,475	5,28	897	0,438	4,84	824
5	0,465	5,16	877	0,462	5,12	871
6	0,395	4,34	739	0,361	3,95	671
7	0,479	5,32	905	0,487	5,41	921
8	0,423	4,67	794	0,531	5,93	1008
9	0,437	4,83	822	0,396	4,35	741
10	0,517	5,76	981	0,469	5,21	885

Die mittleren Abweichungen der 10 gemessenen Proben lagen mit 7,1 % zu Beginn und 8,8 % nach 16 h in einem akzeptablen Bereich. Die Endwerte waren im Mittel 3,3 % geringer als die der Startwert. Diese Werte belegten, dass die Aktivität der Polyphenoloxidasen durch die Ausfällung der Proteine unterbunden wurde. Es ist daher möglich, den Gesamtgehalt der Polyphenole mit dieser Methode zu bestimmen.

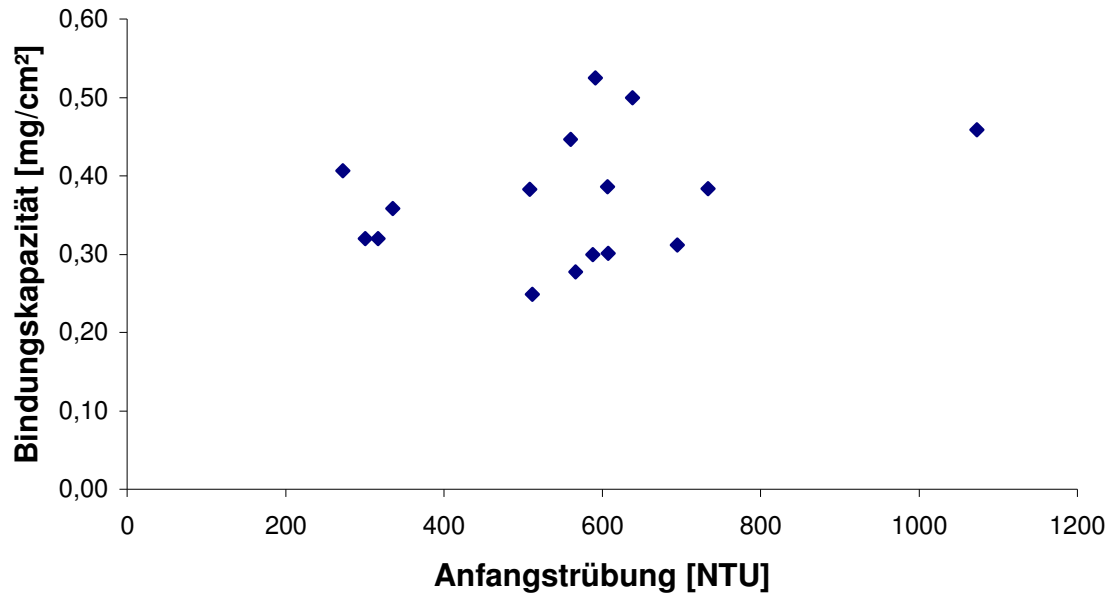
Anhang K: Korrelation zwischen Trübung und Bindungskapazität

Abbildung 13.1: Korrelationsanalyse zwischen Bindungskapazität und Anfangstrübung des Fruchtwassers verschiedener Versuche bei der Beladung

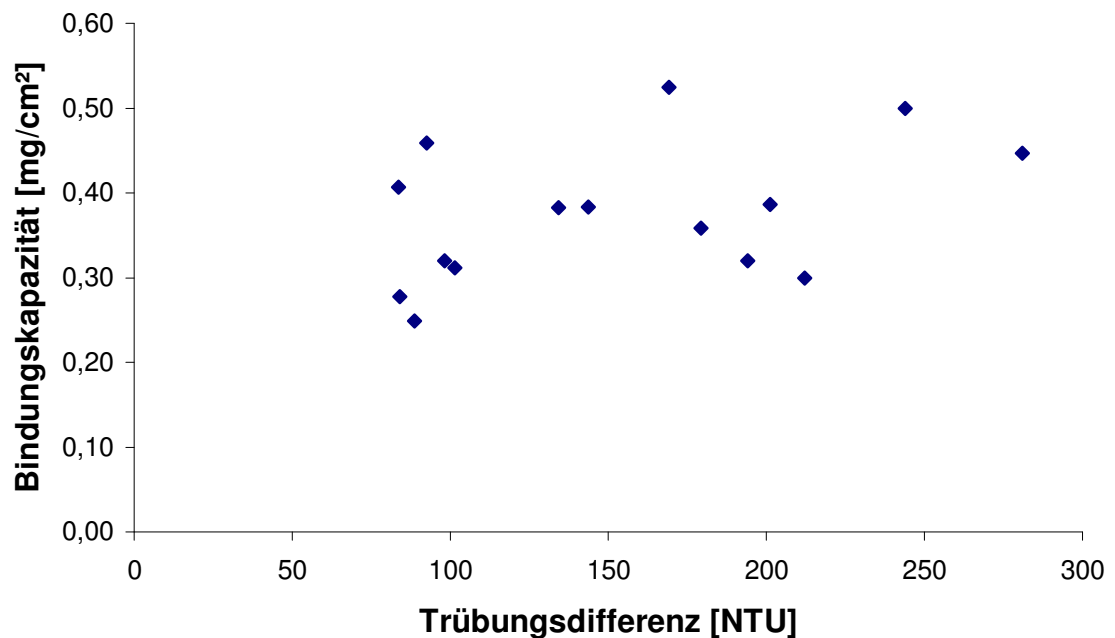


Abbildung 13.2: Korrelationsanalyse zwischen Bindungskapazität und Trübungsdifferenz der Anfangs- und Endtrübung des KFW verschiedener Versuche bei der Beladung

Anhang L: Langzeitstabilitätstests Sartobind Direct-Wickelmodul**Tabelle 13.4:** Messdaten der Beladung der Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodule mit Prozess-KFW

t [min]	Fluss- rate [L/min]	Versuch A		Versuch B		Versuch C		Versuch D		Versuch E	
		p ein [bar]	p aus [bar]	p ein [bar]	p aus [bar]	p ein [bar]	p aus [bar]	p ein [bar]	p aus [bar]	p ein [bar]	p aus [bar]
0	8,3	1,9	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9	1,9	0,9
5	8,3	1,9	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9
10	8,3	1,9	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9
15	8,3	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9
20	8,3	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9
Waschen	4,3	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2
Elution 1	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Elution 2	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Waschen	4,3	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2

Tabelle 13.5: Messdaten der Beladung der S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodule mit Prozess-KFW

t [min]	Fluss- rate [L/min]	Versuch A		Versuch B		Versuch C		Versuch D		Versuch E	
		p ein [bar]	p aus [bar]	p ein [bar]	p aus [bar]	p ein [bar]	p aus [bar]	p ein [bar]	p aus [bar]	p ein [bar]	p aus [bar]
0	8	2	0,9	1,9	0,9	1,9	0,9	1,9	0,9	1,9	0,9
5	8	2	0,9	1,9	0,9	1,9	0,9	1,9	0,9	1,8	0,9
10	8	1,9	0,9	1,9	0,9	1,9	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9
15	8	1,9	0,9	1,9	0,9	1,9	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9
20	8	1,9	0,9	1,9	0,9	1,9	0,9	1,8	0,9	1,8	0,9
Waschen [L/min]	4	0,7	0,2	0,7	0,2	0,7	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2
Elution 1 [L/min]	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Elution 2 [L/min]	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Waschen [L/min]	4	0,6	0,2	0,7	0,2	0,5	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2

Anhang M: Elutionsgeschwindigkeit des S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls**Tabelle 13.6:** Variation der Elutionsgeschwindigkeiten des Eluats 1 (0,5M NaCl) mit S-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul

Elutionsgeschwindigkeit [L/min]	Volumen [L]	Dauer der Elution 1 [min]	p ein [bar]	p aus [bar]
0,2	3,9	22	<0,1	<0,1
0,4	4,2	13,1	<0,1	<0,1
1	4,5	4,4	<0,1	<0,1

Anhang N: Beladungsdauer des Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls**Tabelle 13.7:** Variation der Beladungsdauer des Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls

Versuch	Dyn. Bindungs- kapazität [mg/cm ²]	Elutions- volumen [L]	Beladungs- geschwindigkeit [L/min]	Beladungs- dauer [min]	Durch- läufe
A	0,36	13,3	8,3	20	24
B	0,39	17,8	8,3	10	12
C	0,32	13,4	8,3	5	6
D	0,32	18,0	8,3	60	71
E	0,41	18,8	2,8	60	24
Mittelwert	0,36	16,3			

Anhang O: Wasserwerte der Sartobind Direct-Wickelmodule

Gewöhnlich werden für die Bestimmung der Reinigungseffizienz die Wasserwerte der Module vor und nach den Versuchen verwendet. Aus diesen lassen sich gewöhnlich Aussagen über die Verblockung der Module machen. Dies war bei den durchgeführten Reinigungsmethoden jedoch nicht möglich, da die Drücke bei allen Versuchen wieder die Ausgangsbedingungen erreichten. Damit waren alle Wasserwerte bei 100 % Effizienz. In Tabelle 13.8 sind die Drücke und Wasserwerte am Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmodul dargestellt.

Tabelle 13.8: Wasserwertbestimmung des Q-Typ-Sartobind Direct-Wickelmoduls

Methode	V= 2 L/min		V= 4 L/min		V= 6 L/min		Wasserwert [%]
	p _{ein} [bar]	p _{aus} [bar]	p _{ein} [bar]	p _{aus} [bar]	p _{ein} [bar]	p _{aus} [bar]	
Ausgangswert	0,17	0	0,5	0,15	1,0	0,4	100,0 %
A	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.
B	0,2	0	0,5	0,2	1,0	0,4	100,3 %
C	0,2	0	0,5	0,2	1,0	0,4	100,3 %
D	0,2	0	0,5	0,2	1,0	0,4	100,3 %
E	0,2	0	0,5	0,2	0,9	0,4	108,9 %

Der Grund für die effizienten Wasserwerte sollte nicht in einer guten Reinigung gesucht werden sondern in der Modulbauart. Typische Membranadsorber werden frontal angeströmt, so dass das Medium durch die Membran durchfließen muss. Eine Deckschicht würde diesen Fluss stark behindern. Dagegen wurden die Sartobind Direct-Wickelmodule mit Spacern zwischen den Membranen gebaut, an denen das Medium tangential entlang fließt. Der Durchfluss von Flüssigkeiten ist bei geringer Deckschichtbildung generell problemlos. Erst bei massiver Deckschichtbildung käme es zu einer Verengung des Spacerkanals. Diese würde dazu führen würde, dass sich die Strömungsgeschwindigkeit deutlich verändert. Leichte Verunreinigungen sind jedoch mit der Wasserwertbestimmungsmethode schwer zu verfolgen.

Anhang P: Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer relativen Molekülmasse wurde ein denaturierendes, diskontinuierliches Elektrophorese-System verwendet, wobei die Ladung bei allen Proteinen und Fragmenten gleich negativ ist. Die Auftrennung nach Ladung und Größe erfolgt mit der nativen PAGE, wobei die Proteine in ihrer unveränderten Form aufgebracht wurden. Abbildung 13.3 zeigt den Aufbau eines elektrophoretischen Trennsystems.

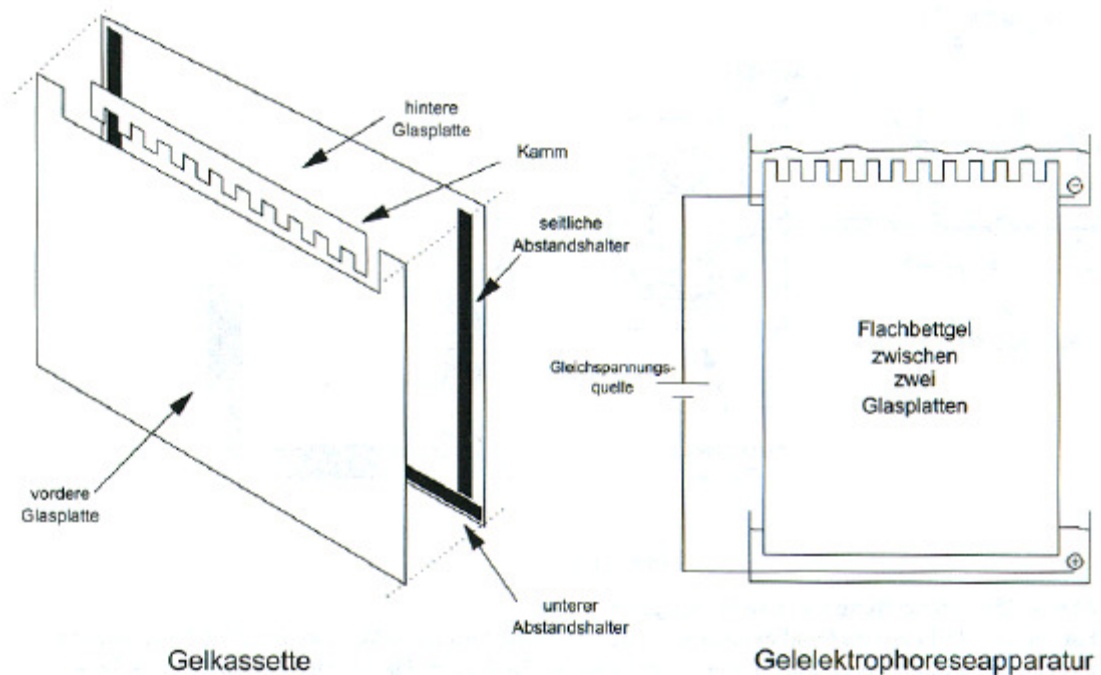


Abbildung 13.3: Allgemeines Schema zur Gel-Elektrophorese [116]

Durchführung und Messergebnisse

Zunächst wurde der Puffer aus 450 μl SDS-Puffer, vermischt mit Bromphenolblau und Glycerin, und 50 μl β -Mercaptoethanol hergestellt. Jede Probe wurde im Verhältnis 1:1 mit dem Puffer gemischt, folgend für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend 5 min zentrifugiert. Die Proben wurden im Gefrierschrank aufbewahrt.

Zum Herstellen der Gelplatte werden innere Glasplatte (Material: Keramik), 1 mm Spacer und äußere Glasplatte mit einem Gelhalter fixiert und im Gießständer eingespannt.

Für die Konzentrierung der Proteine dient ein relativ grobporiges Sammelgel (6 % Acrylamid), während die Auftrennung in einem kleinerporigen Trenngel (15 % Acrylamid) erfolgt. Zunächst wurde das Trenngel aus folgenden Chemikalien hergestellt:

- 3,7 ml Acrylamid
- 2 ml Bisacrylamid
- 2,8 ml Tris-Puffer pH 8,8
- 1 ml SDS
- 0,6 ml bidest. Wasser
- 20 µl TEMED
- 20 µl APS

Nach Zugabe der Katalysatoren TEMED und APS wurde die Lösung sofort zwischen die Glasplatten pipettiert. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Gelfront zu erhalten und nach der Polymerisation wieder entfernt. Die Polymerisationszeit betrug 40 min.

Analog zum Trenngel erfolgt die Herstellung des Sammelgels:

- 731 µl Acrylamid
- 390 µl Bisacrylamid
- 760 µl Tris-Puffer pH 6,8
- 300 µl SDS
- 3,82 ml bidest. Wasser
- 10 µl TEMED
- 10 µl APS

Nach Einfüllen des Sammelgels wurde der Kamm für die Probenaschen zwischen die Glasplatten eingeführt. Während der Polymerisation musste mehrfach Sammelgel-Lösung nachgefüllt werden, um die Taschengröße zu erhalten. Die Polymerisationszeit betrug 30 min.

Vor Entfernen des Kamms wurden die einzelnen Probestaschen markiert. Das Gel wurde in die vertikale Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt und beide Pufferbehälter mit Tris-Glycin-SDS (TGS) Elektrodenpuffer befüllt. Die Geltaschen wurden mit 10 µl Probe, wobei eine Tasche mit dem Proteinstandard befüllt wurde. Für das Durchlaufen des Sammelgels wurde eine Spannung von 100 mV angelegt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 200 mV. Mit dem Durchlaufen des Trenngels wurde die Elektrophorese beendet.

Nach der Auftrennung wurde das Gel für 30 min mit dem Entfärber fixiert. Nach zweimaligem kurzem spülen mit dest. Wasser erfolgte eine Inkubation im Farmer`s Reducer für 150 sec.

In Folge wurde viermal, jeweils 5 min, mit dest. Wasser gespült und für 30 min in einer Silbernitrat-Lösung inkubiert. Nach Spülen mit einer Natriumcarbonat-Lösung (4,5 %) wurden die Proteinbanden in einer Lösung aus 100 ml Natriumcarbonat (4,5 %) und 400 µl Formaldehyd entwickelt. Bei ausreichender Färbung der Proteinbanden wurde die Entwicklung mit Essigsäure (5 %) abgebrochen. Als letztes wurde noch kurz mit dest. Wasser gespült. Mit Hilfe eines Scanners wurden die Gele anschließend am PC eingelesen.

Anhang Q: Bestimmung der Reynoldszahl

Die Reynoldszahl (Re) ist eine dimensionslose Zahl, die das Verhältnis von Trägheitskräften zu Reibungskräften in flüssigkeitsdurchströmten Rohren definiert [100, 117].

Re < 2300 laminare Strömung

Re > 2300 turbulente Strömung

Durchführung

Die Kartoffel wurde entsaftet und bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend durch einen Blaurandfilter genutscht. Die Bestimmung der dynamischen Viskosität erfolgte anschließend in einem Ubbelohde-Viskosimeter bei 20 °C (SCHOTT Instruments, Kapillardurchflussmesser: Typ-Nr.03-0c, Durchmesser: 0,47 mm)

Reynoldszahl
$$Re = \frac{d \cdot w \cdot \rho}{\eta} \quad (13-1)$$

d – Rohrdurchmesser (Ceram-Rohrmodul): 0,36 cm

w – Anströmgeschwindigkeit

η - dynamische Viskosität: $1,29 \pm 0,01$ mPa·s

ρ -Dichte: $1,0339 \pm 0,008$ g/cm³

Anhang R: Bestimmung der permeierten Proteinmasse pro Membranfläche nach 30 min Mikrofiltration

Bei der Mikrofiltration wurde die Proteinmasse pro Membranfläche bestimmt, die innerhalb von einer halben Stunde die drei unterschiedlichen Mikrofiltrationsmodule passiert. Dafür wurde das Produkt der Proteingehalte und der Fluxwerte zu verschiedenen Zeitpunkten gebildet und über einen Zeitraum von 30 min integriert. Das Ergebnis waren die Proteinmassen pro Membranfläche in g/m^2 . Für die Berechnung der Abnahme des Proteingehaltes durch Deckschichtbildung wurde ein linearer Abfall angenommen. Dabei wurde von einer Protein-Ausgangskonzentration von 20 g/L ausgegangen, die innerhalb von 30 min auf die Endkonzentration abfiel.

1. *Bericht zur technologischen Leistungsfähigkeit Deutschlands*, Bundesministerium für Bildung und Forschung, **2006**
2. *BMELV-Informationen Nr.16*, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, **2006**
3. Microsoft, *Encarta 2006 Premium - Stichwort Kartoffel*.
4. <http://www.emslandstaerke.de>, Emslandstärke GmbH, **2006**
5. Ryan, C.A., *Compositions and methods for reducing the risk of sunlight and ultraviolet induced skin cancer*, Patent US 4,906,457, **1988**
6. Peikin, S.R., *Method of stimulating satiety in mammals*, Patent US 4,491,578, **1983**
7. Menzel, F., Scheper T., Zeidler, *Abtrennung wertvoller Kartoffelproteine mit Hilfe von Membranadsorbentien*, Biospektrum, **2002**, 11(1/05), 105-106
8. Alt, V., *Entwicklung verschiedener Aufreinigungs- und Analysestrategien für Proteine und Glykoalkaloide in Kartoffelfruchtwasser*. **2006**, Dissertation Universität Hannover
9. *Brockhaus AG*, **2002**
10. Stroot, S., *Eine praxisorientierte Labormethode zur Ermittlung der Wirksamkeit von Pektinasen für die Sekundärmembran-Minderung bei Membrantrenn-Prozessen*, Dissertation Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, **2001**
11. Tegge, G., *Stärke und Stärkederivate*, Behr's Verlag, **1984**
12. Lotz, M., *Biokonversion nachwachsender Rohstoffe: Die Stärkekartoffel als Rohstoff für die Biokonversion*. **2003**, Emslandstärke GmbH
13. van Koningsveld, G., *Physico-chemical and functional properties of potato proteins*, Proefschrift Wageningen Universität, **2001**
14. Tumer, C., Corsini, Love, *Control of enzymatic browning in potato by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase*, Journal of Agric. Food Chemistry, **2001**, 49, 652-657
15. Bashton, B., Dlakic, *Protein families database of alignments and HMMs*, Sanger Institute, **2003**
16. Paiva, E., Lister, R.M, Park, W.D., *Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles*, Plant Physiol., **1983**, 71, 161-168
17. Galliard, T., *The enzymic deacylation of phospholipids and galactolipids in plants, Purification and properties of a lipolytic acyl-hydrolase from potato tubers*, Biochem.J., **1971**, 121, 379-390
18. Galliard, T., Berkeley, H.D, *Lipids of potato tubers.IV.Effect of growth and storage on the lipid-degrading enzymes of the potato tuber*, journal of the science of food and agriculture, **1974**, 25(7), 869-873
19. Racusen, D., Foote, M., *A major soluble glycoprotein of potato-tubers*, Journal of food biochemistry, **1980**, 4(1), 43-52
20. Racusen, D., Weller, D.L., *Molecular-weight of patatin, a major potato-tuber protein*, Journal of food biochemistry, **1984**, 8(2), 103-107
21. Park, W.D., Blackwood, C., Mignery, G.A., Hermodson, M.A., Lister, R.M., *Analysis of the heterogeneity of the 40,000 molecular-weight tuber glycoprotein of potatoes by immunological methods and by NH2-terminal sequence-analysis*, Plant physiology, **1983**, 71(1), 156-160

22. Pots, A., H. Gruppen, M. Hessing, M. van Boekel, and A. Voragen, *Isolation and characterization of patatin isoforms*, Journal of agricultural and food chemistry, **1999**, 47(11), 4587-4592
23. Park, W.D., *Tuber Proteins of Potato - A New Surprising Molecular System*, Plant Molecular Biology Reporter, **1983**, 1(2), 61-66
24. Straetkvern, K.O., Schwarz, J.G., Wiesenborn, D.P., Zafirakos, E., Lihme, A., *Expanded bed adsorption for recovery of patatin from crude potato juice*, Bioseparation, **1999**, 7(6), 333-345
25. Mignery, G.A., Pikaard, C.S., Hannapel, D.J., Park, W.D., *Isolation and sequence analysis of cDNAs for the major potato tuber protein, patatin*, Nucleic Acids Research, **1984**, 12, 7987-8000
26. Shewry, P.R., *Tuber storage proteins*, Annals of botany, **2003**, 91(7), 755-769
27. Racusen, D., *Lipid acyl hydrolase of patatin*, Canadian journal of botany-revue canadienne de botanique, **1984**, 62(8), 1640-1644
28. Racusen, D., *Patatin and esterase in desiree potato-tubers*, Journal of food biochemistry, **1985**, 9(4), 361-367
29. van Loon, L.C., van Strien, E.A., *The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins*, Physiological and Molecular Plant Pathology, **1999**, 55, 85-97
30. Dhont, S., Geoffroy, P., Stelmach, B.A., Legrand, M., Heitz, T., *Soluble phospholipase A2 activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes*, The Plant journal, **2000**, 23, 431-440
31. Matos, A.R., d'Arcy Lameta, A., Franca, M., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T., *A patatin-like protein with galactolipase activity is induced by drought stress in Vigna unguiculata leaves*, Biochemical Society Transactions, **2000**, 28, 779-781
32. Matos, A.R., d'Arcy Lameta, A., Franca, M., Petres, S., Edelmann, L., Kader, J.-C., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T., *A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase*, FEBS Letters, **2001**, 491, 188-192
33. Kapoor, A., Desborough S.L., Li, P.H., *Potato tuber proteins and their nutritional quality*, Potato Research, **1975**, 18, 469-478
34. Holm, F., Eriksen, S., *Emulsify properties of undenatured potato protein concentrate*, Journal of Food Technology, **1980**, 15, 71-83
35. Wojnowska, I., Poznanski, S., Bednarski, W., *Processing of potato protein concentrates and their properties*, Journal of Food Science, **1981**, 47, 167-172
36. Jackmann, R.L., Yada, R.Y., *Functional properties of whey-potato protein composite blends in model system*, Journal of Food Science, **1988**, 53, 1427-1432
37. Ralet, M.C., Gueguen, J., *Fractionation of potato proteins: Solubility, thermal coagulation and emulsifying properties*, Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie - Food science and technology, **2000**, 33(5), 380-387
38. Seppälä U., A.H., Turjanmaa K., Reunala T., Palosuo T., Kalkkinen N., *Identification of patatin as a novel allergen for the children with positive skin*

- prick test responses to raw potato*, Journal of Allergy and Immunology, **1999**, 103, 165-171
39. Majamaa, H., Seppälä, U., Palosuo, T., Turjanmaa, K., Kalkkinen, N., Reunala, T., *Positive skin and oral challenge responses to potato and occurrence of immunoglobulin E antibodies to patatin in infants with atopic dermatitis*, Paediatric Allergy and Immunology, **2001**, 12, 283-288
40. Kostyal D.A., H.V.L., Noti J.D., Sussmann G.L., Beezhold D.H., *Cloning and characterization of a latex allergen (Hev b7): homology to patatin, a plant PLA (2)*, Clinical and experimental Immunology, **1998**, 112, 355-362
41. Seppälä U., P.T., Kalkkinen N., Ylitalo L., Reunala T., Turjanmaa K., *IgE reactivity to patatin-like latex allergen, Hev b7, and to patatin of potato tuber, Sol t 1, in adults and children allergic to natural rubber latex*, Allergy, **2000**, 55, 266-273
42. Lämmle, K., *Neue Enzyme für industrielle Anwendungen aus Boden-Genbanken*, Dissertation Universität Stuttgart, **2004**
43. Bode, W., *Activation, activity and inhibition of bovine trypsin*, Naturwissenschaften, **1979**, 66(5), 251-258
44. Finkenstadt, W.R., et al. *Proteinase Inhibitors*. **1974**. Bayer Symp. V.
45. Quast, V., *Stopped-flow kinetics of the resynthesis of the reactive site peptide bond in kallikrein inhibitor (Kunitz) by beta-trypsin*, Biochemistry, **1978**, 17, 1678
46. Valueva, T.A., Revina, T.A., Mosolov, V.V., Mentele, R., *Primary structure of potato Kunitz-type serine proteinase inhibitor*, Biological chemistry, **2000**, 381(12), 1215-1221
47. Walsh, T., *Two Kunitz-Type Proteinase Inhibitors from Potato Tubers*, Plant Physiol., **1991**, 97(1), 15-18
48. Ryan, C.A., Kuo, T., Pearce, G., Kunkel, R., *Variability in concentration of 3 heat-stable proteinase-inhibitor proteins in potato-tubers*, American potato journal, **1976**, 53(12), 443-455
49. Ryan, C.A., Hass, G.M., Kuhn, R.W., *Purification and properties of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes*, Journal of biological chemistry, **1974**, 249(17), 5495-5499
50. Melville, J.C., Ryan, C.A., *Chymotrypsin inhibitor I from potatoes - large-scale preparation and characterization of its subunit components*, Journal of biological chemistry, **1972**, 247(11), 3445ff
51. Bryant, J., Green, T.R., Gurusaddaiah, I., Ryan, C.A., *Proteinase-inhibitor 2 from potatoes - isolation and characterization of its protomer components*, Biochemistry, **1976**, 15(16), 3418-3424
52. Phillips, W., Schwartz, J. G., *Diagnosis and treatment of humans with diabetes or at risk to develop diabetes*, Patent US 5,187,154, **1990**
53. Hill, A.J., Peikin, S.R., Ryan, C.A., Blundell, J.E., *Oral administration of Proteinase Inhibitor II from potatoes reduces energy intake in man*, Physiology and behavior, **1990**, 48, 241-246
54. García-Canovas, F., García-Sevilla, J.A., Rodríguez-López, J.N., Tudela, J., *Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones*, Biochimica et Biophysica Acta, **2001**, 1548, 1-22

55. Yoruk, M., *Plant polyphenol oxidase: A review*, Journal of Food Biochemistry, **2003**, 27(5), 361-422
56. Solomon, E.I., Sundaram U.M., Machonkin, T.E., *Multicopper oxidases and oxygenases*, Chem. Rev., **1996**, 96(7), 2563-2606
57. Filipiak, M., *Electrochemical analysis of polyphenolic compounds*, Analytical Sciences, **2001**, 17-Supplement, 1667-1671
58. Matheis, G., Belitz, H.D., *Enzymic browning of potatoes (Solanum tuberosum), 1. Phenoloxidasen und phenolische Verbindungen aus verschiedenen Sorten*, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -forschung, **1977**, 163(2), 92-95
59. Kadam, P.Y., Dhumal, S.A., *Potato: production, processing and products*, **1991**
60. Breitmaier, E., *Alkaloide - Betäubungsmittel, Halluzinogene und andere Wirkstoffe, Leitstrukturen aus der Natur* -, Vol. 2. Auflage, **2002**
61. Alt, V., Steinhof, R., Lotz, M., Ulber, R., Kasper, C., Scheper, Th., *Optimization of Glycoalkaloid Analysis for Use in Industrial Potato Fruit Juice Downstreaming*, Eng. Life Sc., **2005**, 6(5), 1-6
62. Udalova, Z., S. Zinov'eva, I. Vasil'eva, and V. Paseshnichenko, *Correlation between the structure of plant steroids and their effects on phytoparasitic nematodes*, Applied Biochemistry and Microbiology, **2004**, 40(1), 93-97
63. Smith, D.B., Roddick, J.G., Jones, J.L., *Potato glycoalkaloids: Some unanswered questions*, Trends in Food Science & Technology, **1996**, 7, 126-131
64. Friedman, M., McDonald, G.M., *Potato glycoalkaloids: Chemistry, analysis, safety, and plant physiology*, Critical Reviews in plant sciences, **1997**, 16(1), 55-132
65. Gerstner, G., *Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Lebensmittel: Glykoalkaloide in transgenen Kartoffeln*, Dissertation Universität München, **2000**
66. Valkonen, J., M. Keskitalo, T. Vasara, and L. Pietila, *Potato glycoalkaloids: A burden or a blessing?* Critical Reviews in Plant Sciences, **1996**, 15(1), 1-20
67. Zrust, J., Horackova, V., Prichystalova, V., Rejlkova, M., *Light-induced alpha-chaconine and alpha-solanine accumulation in potato tubers (Solanum tuberosum L.) after harvest*, Rostlinna Vyroba, **2001**, 47(11), 469-474
68. Sengul, M., Keles, F., Keles, M.S., *The effect of storage conditions (temperature, light, time) and variety on the glycoalkaloid content of potato tubers and sprouts*, Food Control, **2004**, 15(4), 281-286
69. Lorey, H., *Tartuffli - Alte Kartoffelsorten neu entdeckt*, **2002**, Münster-Hiltrup: Landwirtschaftsverlag GmbH
70. Strolle, E.O., Cording J.Jr., Aceto, N.C., *Recovering potato proteins coagulated by steam injection heating*, Journal of agriculture and food chemistry, **1973**, 21(6), 974 - 977
71. Olsen, H.S., *Method for treatment of potato fruit water*, Patent US 5,573,795, **1994**

72. Kemme-Kroonsberg, C., van Uffelen, E.J.F., Verhaart, J.C.J., *Purified heat-coagulated potato protein for use in animal feed*, Patent US 6,042,872, **2000**
73. Ryan, C.A., Pearce, G.L., *Methods for the isolation of proteinase inhibitor proteins from potato tubers*, Patent WO9901474, **1998**
74. Fallert, H.G., Stomp, R., *Raw Material selection and analysis for the isolation of protease inhibitor II from whole potatoes*, Patent WO03027318, **2003**
75. Davison, B., Fallert, H., Mathe,r G., Ausich, R., Sheabar, F.Z., Stomp, R., *Method of enhancing the extraction of proteinase inhibitors*, Patent WO03003838, **2003**
76. Davison, B., Fallert, H., Mathe,r G., Ausich, R., Sheabar, F.Z., Stomp, R., *Method for controlling the yield and purity of proteinase inhibitor II during extraction*, Patent WO03003835, **2003**
77. Ausich, R., Sheabar, F.Z., Stomp, R., *Method for the elimination of Kunitz and Bowman-Birk Trypsin Inhibitors and carboxydase inhibitor from potato proteins*, Patent WO03003836, **2003**
78. Sheabar, F.Z., Stomp,R., *Isolation and purification of proteinase inhibitor II*, Patent WO03003837, **2003**
79. Zwijnenberg, H.J., Kemperman, A.J.B., Boerrigter, M.E., Lotz, M., Dijksterhuis, J.F., Poulsen, P.E., Koops, G.H., *Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration*, Desalination, **2002**, 144(1-3), 331-334
80. Gschwendtner, O., *Anreicherung von Pflanzenproteinen mit Hilfe der adsorbiven Zerschäumung*, Dissertation Technische Universität München, **2000**
81. Parlar, H., Gschwendtner, O., Anschütz, A., Leupold, G., Görg, A., *Influence of selected parameters on the isoelectric adsorptive bubble separation (IABS) of potato proteins*, Advances in Food Sciences, **2001**, 23(1), 2-10
82. Safarikova, M., Safarik, I., *One-step partial purification of Solanum tuberosum tuber lectin using magnetic chitosan particles*, Biotechnology letters, **2000**, 22(11), 941-945
83. Lindner, P., Kaplan, B., Weiler, E., Bengera, I., *Fractionation of potato juice proteins into acid-soluble and acid-coagulable fractions*, Food chemistry, **1981**, 6(4), 323-335
84. Ralla, K., *laufende Dissertation*, Universität Hannover, **2007**
85. Ulber, R., *Biotechnologische Methoden zur effizienteren Rohstoffnutzung*, Habilitationsschrift Universität Hannover, **2002**
86. Schwarz, J., *Downstream-Processing und Biotransformation von nachwachsenden Rohstoffen*, Dissertation Universität Hannover, **2006**
87. Scheper, T., Reif, O.-W., *Aufreinigung*, Angewandte Mikrobiologie, ed. G. Antranikian, **2006**, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 430-445
88. Robert, J., Dickmann, K., Matthes, K.-J., Kümmel, R., *Entwicklung lasergestützter Arbeitsmethoden zur Herstellung neuartiger, mikrostrukturierter Edelstahlfiltersysteme*. **2002**, Fraunhofer-Institut für Umwelt-, Sicherheits- und Energietechnik UMSICHT, Laserzentrum Münster, Institut für Fertigungs- und Schweißtechnik der TU Chemnitz

89. Staude, E., *Membranen und Membranprozesse*, **1992**, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH
90. Microdyn, *Anleitung*, **2004**
91. Millipore, *Protein Concentration and Diafiltration by Tangential Flow Filtration - An Overview*, **2003**, 1-23
92. Rautenbach, R., *Membranverfahren: Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*, **1997**, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag
93. <http://www.sartorius.de>, Sartorius AG, **2006**
94. Weiß, T., *Neue Membrantechnologien zur Isolierung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke - Methodenentwicklung für den industriellen Einsatz*, Dissertation Universität Hannover, **1999**
95. Milchwirtschaft, F.E.F.f., *Neue Milchprodukte dank Membrantrenntechnik*. **2003**.
96. *Einführung in die Ultrafiltration - Technisches Handbuch*, Inge AG, **2002**
97. Howell, J.A., Nyström, M., *Fouling Phenomena In: Membranes in Bioprocessing: Theory and Application*, Membranes in Bioprocessing, ed. J.A. Eds. Howell, Sanchez, V., Field, R., **1993**: Chapman & Hall, London, 203-241
98. Mulder, M., *Basic principles of membrane technology*, 2nd ed, **1996**, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1-564
99. Russotti, G., Göklen, K.E., *Crossflow Membrane Filtration of Fermentation Broth*, second ed, Membrane Separations in Biotechnology, ed. W.K. Wang, **2001**, 85-159
100. Rippberger, S., *Mikrofiltration mit Membranen: Grundlagen, Verfahren, Anwendungen*, 1st ed, **1992**, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1-285
101. Davis, R.H., *Cross-flow Microfiltration with Backpulsing in Membrane Separations in Biotechnology*, second ed, Membrane Separations in Biotechnology, ed. W.K. Wang, **2001**, 161-188
102. Cheryan, M., *Ultrafiltration and Microfiltration*, **1998**, Basel, Switzerland: Technomic Publishing Company AG, 1-527
103. Jensen, D., *Grundlagen der Ionenchromatographie*, 3. ed, **2000**: Dionex GmbH
104. Fischer-Frühholz, S., *Membranadsorber - Chromatographische Aufreinigung in neuen Dimensionen*, GIT Labor-Fachzeitschrift, **2004**, 6, 603-605
105. Fischer-Frühholz, S., *Membranadsorber - Schneller am Ziel in der Biochromatographie*, GIT Labor-Fachzeitschrift, **2004**, 9, 1-4
106. <http://www.roempp-online.de>, Thieme, **2005**
107. Rupprecht, R., *Physikalisch-chemische Grundlagen der Gefriertrocknung*, **1993**, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
108. Vauck, W.R.A., Müller, H.A., *Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik*, **2001**, Weinheim: Wiley-VCH
109. Bauer, K.H., Frömmig, K.-H., Führer, C., *Pharmazeutische Technologie*, 3. Auflage ed, **1991**: Thieme-Verlag
110. Pikel, M.J., *Freeze Drying*, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, **1992**, 6, 275-303

111. Kneule, F., *Grundlagen der chemischen Technik - Das Trocknen*, 3.Auflage ed, **1975**
112. Sattler, K., *Thermische Trennverfahren*, 3. Auflage ed, **2001**: Wiley-VCH
113. <http://www.buchi.com>, *Schulungsunterlagen*, Büchi, **2006**
114. Harkensee, D., *Entwicklung eines photometrischen Biosensorsystems zur Anwendung in der Qualitätsicherung bei der Produktion von Weinen*, Diplomarbeit Universität Hannover, **2003**
115. Pierce, *Gebrauchsanleitung*, **2006**
116. Kleinert, T., *Elektrophoretische Methoden in der Proteinanalytik*, **1990**: Thieme
117. Gasper, H., Oechsle, D., Pongratz, E., *Handbuch der industriellen Fest/Flüssig-Filtration*, **2000**, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH

Persönliche Daten

Name: Rafael Steinhof
Geburtstag: 18.06.1977
Geburtsort: Rosenberg

Adresse: Karl-Kraut-Str.13, 30177 Hannover
Telefon: 0511/ 1 69 68 30
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Praktika, berufliche Tätigkeiten

11/2002 – 04/2003 Amino GmbH, Forschungslabor Braunschweig, Diplomand,
Thema: „Verfahrensoptimierung der Tryptophansynthese“

- Optimierung eines bereits für die pharmazeutische Verwendung etablierten biokatalytischen Aminosäureprozesses
- Kultivierung von überexprimierten *Escherichia coli*-Zellen im Labor- und Technikumsmaßstab
- HPLC-Analytik
- Dokumentation

08/2000 – 06/2001 TÜV Gruppe Nord, Niederlassung Hannover, Bereich Umwelt- und Schadstoffanalytik, studienbegleitende Teilzeittätigkeit:

- Vorbereitung von Dioxin- und Formaldehydhaltigen Proben für die Massenspektrometrie-Analytik

Studium

06/2003 – 05/2007 Dissertation an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Kaiserslautern, der Emsland Group und der Sartorius AG, Thema: „Aufbau eines Downstream-Prozesses zur Proteingewinnung mittels Membrantechnologie am Beispiel von Kartoffelfruchtwasser“

- Laborversuche: FPLC, Mikro-, Ultra- und Diafiltrationen
- Übertragung der Laborversuche in den Technikumsmaßstab (Volumina bis 100 L)
- Technikumsversuche: Mikro-, Ultra- und Diafiltrationen, Sprüh- und Gefriertrocknung, Ionenaustauschchromatographie, Betreiben eines über Computer gesteuerten teilautomatischen Prozesses
- Proteinanalytik: UV/VIS-Spektroskopie (Proteinassays, Enzymaktivitäten), Gelelektrophorese, HPLC

05.05.2003 Chemie-Diplom
11/2002 – 04/2003 Diplomarbeit in Zusammenarbeit mit der Amino GmbH:
„Verfahrensoptimierung der Tryptophansynthese“
02/2000 - 04/2003 Hauptstudium der Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover
11/2001 – 01/2002 Schwerpunktpraktikum in Zusammenarbeit mit der Firma
Biolac am Institut für Technische Chemie: „Industrielle
Nitratanreicherung in Molke und Molkeprodukten“
19.02.2000 Vordiplom
10/1997 – 02/2000 Grundstudium der Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover

Schule und Wehrdienst

09/1996 – 06/1997 Wehrdienst, Luftwaffentransportgeschwader 62, Wunstorf
21.05.1996 Abitur am Kurt-Schwitters-Gymnasium Misburg, Hannover