

# **Entwicklung eines Mikro-Hohlfaserreaktors zur Anwendung in den Bereichen Kultivierung und Downstream Processing**

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

Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von  
M.Sc. Stephen Kroll  
geboren am 23. Juni 1979 in Verden (Aller)

Hannover, im Juli 2008

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 10.07.2008

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

Hannover, Juli 2008

---

Stephen Kroll

## **Publikationen**

### **Artikel in Fachzeitschriften**

Villain, L., Meyer, L., Kroll, S., Beutel, S., Scheper, T.: "Development of a Novel Membrane Aerated Hollow-Fiber Microbioreactor", *Biotechnology Progress* 2008, 24, 367-371.

Kroll, S., Meyer, L., Graf, A-M., Beutel, S., Glökler, J., Döring, S., Klaus, U., Scheper, T.: "Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes for use in micro-reactor systems", *Journal of Membrane Science* 2007, 299, 181-189.

### **Vorträge**

Meyer, L., Kroll, S., Villain, L., Beutel, S., Glökler, J., Döring, S., Klaus, U., Scheper, T.: "Hollow fiber micro-bioreactors for different applications in cultivation and downstreaming", *European BioPerspectives* 2007, Köln, Deutschland.

Kroll, S., Meyer, L., Beutel, S., Glökler, J., Döring, S., Klaus, U., Scheper, T.: "Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes and application to integrated downstream processes", *DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen* 2006, Wiesbaden, Deutschland.

Meyer, L., Kroll, S., Beutel, S., Glökler, J., Döring, S., Klaus, U., Scheper, T.: "Applications for novel hollow fiber micro-bioreactor in cultivation and downstreaming", *6<sup>th</sup> European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES)* 2006, Salzburg, Österreich.

## **Posterpräsentationen**

Kroll, S., Meyer, L., Beutel, S., Glökler, J., Döring, S., Klaus, U., Scheper, T.: "Application of novel hollow fiber micro-bioreactor to integrated downstream processes", European BioPerspectives 2007, Köln, Deutschland.

Beutel, S., Kroll, S., Tippkötter, N., Stückmann, H., Noack, U., Scheper, T., Ulber, R.: "Development of a dipstick immunoassay for the detection of algae toxins", The 7<sup>th</sup> Workshop on Biosensors and Bioanalytical  $\mu$ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis 2006, Kusadasi, Türkei.

Meyer, L., Kroll, S., Beutel, S., Glökler, J., Döring, S., Klaus, U., Scheper, T.: "Processing of a hollow fiber micro-bioreactor for applications in cultivation and downstreaming", DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen 2006, Wiesbaden, Deutschland.

Kroll, S., Meyer, L., Graf, A-M., Beutel, S., Glökler, J., Döring, S., Klaus, U., Scheper, T.: "Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes and the utilization of affinity membranes in purification processes", 6<sup>th</sup> European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES) 2006, Salzburg, Österreich.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2004 bis November 2007 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich herzlich für seine Unterstützung, viele interessante Hinweise und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen, danken.

Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Lina Meyer möchte ich an dieser Stelle für die tolle und unkomplizierte Zusammenarbeit während der Promotionszeit und auch für die lustige Zeit außerhalb der Universität danken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Sascha Beutel für die vielen interessanten Besprechungen während der Promotionszeit und für das Korrekturlesen von nicht nur dieser Arbeit, sondern auch von den unzähligen Zetteln, die ich ihm in den vergangenen Jahren habe zukommen lassen.

Weiterhin möchte ich mich bei Alain Graf und Anne Schmidt für ihre wissenschaftliche Unterstützung sowie ihre interessierte Mitarbeit während ihrer Diplom- bzw. Masterarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Martina Weiß, die einem immer mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn es darum ging, praktische Versuchsprobleme zu lösen. Der Feinmechanik-Werkstatt soll ebenso ein großer Dank zu Teil werden, da sie unsere theoretischen Reaktorskizzen immer zuverlässig und schnell in anwendbare Module umgesetzt haben.

Yvonne Stark möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Analysen danken.

Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei allen Mitgliedern des AK Scheper für das freundliche und herzliche Arbeitsklima bedanken. Insbesondere den Mitarbeitern des TCI-Altbaus sei für die gute Stimmung in Büro, Labor und Kaffeepause – sowohl bei fachlichen als auch bei fußballrelevanten Gesprächen – sowie für das Korrekturlesen gedankt.

Mein herzlicher Dank geht an Tina Büschleb für ihre liebevolle und ermunternde Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

# Zusammenfassung

Stephen Kroll

## **Entwicklung eines Mikro-Hohlfaserreaktors zur Anwendung in den Bereichen Kultivierung und Downstream Processing**

Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von Mikro-Hohlfaserreaktoren in den verschiedenen Einsatzgebieten der Biotechnologie sind noch immer aufgrund einer nicht ausreichenden Oberflächenfunktionalität der Membranen begrenzt. In dieser Arbeit wird ein Verfahren zur Aktivierung und Funktionalisierung von Polyethersulfon- und Polysulfonmembranen gefolgt von deren Einsatz in integrierten Downstreamprozessen dargestellt.

Ausgehend von generierten Epoxyhohlfasermembranen besteht die Möglichkeit, ein breites Spektrum an reaktiven Liganden auf die Membranoberfläche aufzubringen. Besonders synthetisierte Ionenaustauscher- und IMAC-Hohlfasern ermöglichen ein großes Anwendungspotential in membranbasierten chromatographischen Prozessen. Um eine unversehrte Hohlfasermembranoberfläche nach durchgeführter Ligandendekoration sicherzustellen, sind rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt worden.

Der Einfluss verschiedener Typen von Ionenaustauscher- und IMAC-Membranen auf die Bindungsstärke sowie auf die Selektivität in Proteinaufreinigungsprozessen ist untersucht worden. Dabei sind vorerst modifizierte Anionenaustauscher-Hohlfasermembranen (Q- und D-Typ) für die Aufreinigung eines Modellproteins in Form von Rinderserumalbumin eingesetzt worden. Auf Basis von IMAC-Hohlfasern ist der Einfluss verschiedener zweiwertig positiv geladener Metallionen in der Form von  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  bei der Aufreinigung von rekombinanten, his-getagten Proteinen in der Form von GFP-His und  $\beta$ -Glucanase-His aus verschiedenen *E.coli*-Stämmen untersucht worden. Des Weiteren ist eine geeignete Regenerationsmethode für die Wiederverwendbarkeit von IMAC-Hohlfasermembranen etabliert worden.

Ein weiterer Anwendungsbereich befasst sich mit dem Einsatz von modifizierten IMAC-Affinitätshohlfasermodulen bei der Aufreinigung von his-getagten GFP-Molekülen. In Bezug zu den einzelnen Aufreinigungsschritten in der Form von Adsorption, Wasch- und Elutionsprozess sind Durchbruchskurven, unterschiedliche Betriebsweisen der Module für ein effizientes Entfernen ungebundener und schwach gebundener Produktmoleküle sowie der Einfluss verschiedener Flussraten im Elutionsprozess bestimmt worden.

Abschließend ist eine Strategie zur Realisierung eines integrierten Downstreamprozesses unter Verwendung von Mikro-Hohlfaserreaktoren bei der Aufreinigung einer extrazellulär gebildeten Levansucrase-His aus *B.megaterium* entwickelt worden .

**Stichworte:** Polyethersulfon/Polysulfon, Membranmodifizierung, IMAC, Mikro-Hohlfaserreaktor, integriertes Downstream Processing

## Abstract

Stephen Kroll

### **Development of a hollow fiber micro-bioreactor for utilization in cultivation and downstream processing**

The broad application of hollow fiber micro-bioreactors in various areas of biotechnology is still restricted due to a limited functionality of the membranes. In this thesis, a straight forward procedure for polyethersulfone and polysulfone membrane activation and functionalization followed by their utilization in integrated downstream processes is presented.

Based on generated epoxy hollow fiber membranes it is possible to couple a wide variety of reactive ligands to a membrane surface. Especially, synthesized ion exchange and IMAC hollow fibers offer a great potential in membrane-based chromatographic processes. To assure intact hollow fiber surface after modification with specific ligands scanning electron microscopic analyses were performed.

The influence of different types of ion exchange and IMAC membranes on binding strength and selectivity in protein purification processes were investigated. Modified anion exchange hollow fibers (Q- and D-type) were primarily used for the purification of model protein bovine serum albumin. On the basis of IMAC hollow fibers the influence of different divalent metal ions in the form of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  on purification of recombinant GFP-His and  $\beta$ -Glucanase-His from different *E.coli* strains were studied. Furthermore, a development of a convenient regeneration method for reuse of IMAC hollow fiber membranes was established.

Another field of application deals with the utilization of modified IMAC hollow fiber reactor in downstream processes for purification of his-tagged GFP. With regard to single purification steps in the form of adsorption, wash and elution process breakthrough curves, different operating methods for efficient removal of unbound and weakly bound product molecules as well as the influence of varying flow rates during elution were determined.

Finally, an integrated downstream processing strategy for the recovery and purification of extracellular Levansucrase-His from *B.megaterium* using hollow fiber micro-bioreactor were developed.

**Keywords:** Polyethersulfone/Polysulfone, membrane modification, IMAC, hollow fiber micro-bioreactor, integrated downstream process

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b> .....	1
<b>2 Theoretische Grundlagen</b> .....	3
2.1 Membranen.....	3
2.1.1 Membranmaterialien .....	3
2.1.2 Membrantypen.....	4
2.1.3 Polyethersulfon- und Polysulfonmembranen .....	7
2.2 Membrantrennprozesse .....	8
2.2.1 Strategien der Membranmodifizierung .....	10
2.3 Membranchromatographie .....	14
2.3.1 Ionenaustausch-Chromatographie.....	15
2.3.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie.....	17
2.4 Mikro-Hohlfaserreaktoren in der Biotechnologie .....	18
<b>3 Experimenteller Teil</b> .....	20
3.1 Heterogene Oberflächenmodifizierung von Hohlfasermembranen für deren Einsatz in Mikroreaktionssystemen .....	20
3.1.1 Verwendete Membranmaterialien .....	21
3.1.2 Grundaktivierung der Basismembran zur Anbindung von Liganden .....	22
3.1.2.1 Kupplung des Diepoxids EGDGE an die Basishohlfasermembran .....	24
3.1.2.2 Immobilisierung von Cellulosederivaten an Epoxymembranen .....	27
3.1.2.3 Generierung einer epoxyaktivierten Matrixhohlfasermembran .....	31
3.1.2.4 Übertragbarkeit des optimierten Modifikationsprotokolls der Grundaktivierung auf verschiedene Hohlfasermembrantypen.....	32
3.1.2.5 BET-Charakterisierung der Membranoberfläche.....	36
3.1.2.6 REM-Untersuchungen der Membranoberflächenstruktur.....	37
3.1.2.7 Zusammenfassung und Diskussion .....	39
3.1.3 Entwicklung und Charakterisierung von Ligandensystemen.....	40
3.1.3.1 <i>prim.</i> -Amin-Funktionalisierung .....	42

3.1.3.2 Hydroxy-Funktionalisierung .....	44
3.1.3.3 Herstellung von Ionenaustauschermembranen .....	46
3.1.3.4 Herstellung von Membranen mit chelatisierenden Eigenschaften .....	51
3.1.3.5 Herstellung von IMAC-Hohlfasermembranen auf IDA-Basis .....	53
3.1.3.6 Langzeitstabilitätsanalyse von IMAC-Hohlfasermembranen .....	56
3.1.3.7 Zusammenfassung und Diskussion .....	58
3.2 Testung, Etablierung und Optimierung von modifizierten Hohlfasermembranen im Bereich Downstream Processing .....	61
3.2.1 Aufreinigung des Modellproteins BSA mit Anionenaustauscher- und IDA- aktivierten Hohlfasermembranen .....	61
3.2.2 Kultivierung von <i>E.coli</i> K12 JM109 zur Produktion his-getagter Proteine .....	66
3.2.3 Einsatz von IMAC-Hohlfasermembranen für die Aufreinigung his-getagter Proteine aus <i>E.coli</i> .....	67
3.2.3.1 Einsatz von IMAC-Hohlfasermembranen für die Aufreinigung von GFP-His aus <i>E.coli</i> .....	67
3.2.3.2 Einsatz von IMAC-Hohlfasermembranen für die Aufreinigung des Enzyms Bgl-His aus <i>E.coli</i> .....	72
3.2.4 Regeneration und Wiederverwendbarkeit von IMAC-Hohlfasermembranen.....	77
3.2.5 Zusammenfassung und Diskussion .....	79
3.3 Entwicklung und Etablierung eines Aufarbeitungsprozesses durch Einsatz von modifizierten IMAC-Hohlfasermembranen.....	81
3.3.1 Charakterisierung von IMAC-Hohlfasermembranen durch die Bestimmung von Adsorptionsisothermen.....	82
3.3.2 Bestimmung von Durchbruchkurven für die Adsorption von GFP-His an IMAC-Hohlfasermembranen .....	85
3.3.3 Evaluierung eines geeigneten Waschprotokolls bei der Aufreinigung von GFP-His mit IMAC-Hohlfasermembranen.....	88
3.3.4 Einsatz von IMAC-Hohlfasermembranen bei der Etablierung von geeigneten Elutionsprofilen .....	91
3.3.5 Zusammenfassung und Diskussion .....	93

3.4 Etablierung von Bioprozessen mit integrierter Produktaufarbeitung.....	95
3.4.1 Einfluss des Desinfektionsprotokolls auf die Stabilität von IMAC- Hohlfasermembranen.....	96
3.4.2 Einfluss und Belastbarkeit modifizierter IMAC-Hohlfasermembranen im Anwendungsbereich integriertes Downstreaming.....	97
3.4.3 Etablierung eines Prozesses zum integrierten Downstreaming im System MHFR durch Einsatz von <i>B.megaterium</i> (Lev-His) .....	102
3.4.4 Realisierung von Bioprozessen durch Entkopplung integrierter Abläufe in Form eines separaten Kultivierungs- und Aufarbeitungsprozesses unter Verwendung von MHFR .....	108
3.4.4.1 Kultivierung von <i>E.coli</i> (GFP-His) im MHFR mit nachgeschalteter Produktaufreinigung.....	109
3.4.4.2 Kultivierung von <i>E.coli</i> (Bgl-His) im MHFR mit nachgeschalteter Produktaufreinigung.....	113
3.4.5 Zusammenfassung und Diskussion .....	117
<b>4 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>120</b>
<b>5 Literatur .....</b>	<b>125</b>
<b>6 Anhang.....</b>	<b>133</b>
6.1 Verwendete Chemikalien und Materialien.....	133
6.1.1 Chemikalien.....	133
6.1.2 Materialien.....	135
6.2 Verwendete Lösungen.....	136
6.3 Verwendete Geräte .....	139
6.4 Versuchsprotokolle zur Grundaktivierung .....	140
6.5 Versuchsprotokolle zur Ligandendekoration .....	141
6.6 Versuchsprotokolle zur Bestimmung der Beladungskapazitäten modifizierter Hohlfasermembranen .....	144
6.6.1 Acid-Orange-2-Test (AO2-Test).....	144
6.6.2 Phenol-Schwefelsäure-Test.....	144

6.6.3 EDTA-Test .....	146
6.7 Versuchsprotokolle im Bereich Proteinaufreinigung .....	147
6.7.1 Aufreinigung von BSA mit Anionenaustauscher- und IDA-aktivierten Hohlfasermembranen .....	147
6.7.2 Aufreinigung von GFP-His mit IMAC-Hohlfasermembranen .....	148
6.7.3 Aufreinigung von Bgl-His mit IMAC-Hohlfasermembranen .....	148
6.7.4 Aufreinigung von Bgl-His mit Co <sup>2+</sup> -dekorierten Membranadsorbermodulen ...	149
6.8 Nachweis von GFP-His mittels fluoreszenzspektroskopischer Messung .....	150
6.9 Proteinbestimmungs- und Enzymaktivitäts-Tests .....	151
6.9.1 Bradford-Test (Proteinsbestimmungs-Test) .....	151
6.9.2 Enzymaktivitäts-Test zum Nachweis von Bgl-His .....	154
6.9.3 Enzymaktivitäts-Test zum Nachweis von Lev-His .....	155
6.10 SDS-PAGE.....	157
6.10.1 Probenvorbereitung und Durchführung einer SDS-PAGE .....	157
6.10.2 Silberfärbung .....	157
6.11 Aufbau von Mikro-Hohlfaserreaktoren.....	158
6.11.1 Affinitätshohlfasermodul auf IMAC-Basis .....	158
6.11.2 Mikro-Hohlfaserreaktor.....	160
6.12 Abkürzungen .....	162

## Lebenslauf

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Komplexe biotechnologische Abläufe sind oft nicht mit den klassischen Reaktortypen, wie z.B. Rührkessel, Festbett- oder Plattenreaktoren, oder sonstigen Verfahrenselementen zu realisieren. Die Suche nach alternativen Verfahrenselementen, die die kontinuierliche Produktion und die Integration von Prozessschritten ermöglichen, stellt daher eine der großen Herausforderungen der modernen Bioverfahrenstechnik dar. Ein zukunftsweisender Ansatz für die Durchführung kontinuierlicher und integrierter biotechnologischer Verfahren ist die Einbindung von Hohlfasermodulen in den Produktionsprozess.

Durch die Modularisierung der Verfahrenselemente im Mikromaßstab kann dabei nicht nur eine Verbesserung der Ökonomie bei der Entwicklung von Prozessabläufen erreicht werden, sondern auch eine erhebliche Umweltentlastung durch verringerte Reststofffrachten und geringen Substrat- und Energieeinsatz. Die Hohlfasermodule können sowohl im Bereich Downstreaming zur Produktabtrennung als auch im Bereich Kultivierung und Reaktion zur Rückhaltung von Zellen oder immobilisierten Biokatalysatoren eingesetzt werden. Besonders das zeit- und kostenintensive Downstreaming kann dabei durch Bereitstellung wesentlich höherwertiger Produkte in Folge integrierter Vorreinigung, Zellabtrennung oder Abreicherung von Störkomponenten und Kontaminanten wesentlich entlastet werden.

Eine große Bedeutung kommt bei den biotechnologischen Prozessen den Hohlfasermembranen zu. Ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften beeinflussen ganz wesentlich den Trennvorgang. Die Herstellung maßgeschneiderter Hohlfasermembranen durch Aktivierung und Funktionalisierung der Membranoberfläche ist somit ein wichtiger Baustein für die Realisierung effizienter Hohlfasermodule. Diese modifizierten Module können je nach Zielsetzung zur hochaffinen Bindung von Metaboliten bzw. zur Abreicherung von Störkomponenten genutzt werden.

Thema und Ziel dieser Arbeit ist es, Hohlfasermembranen aus Polyarylethersulfonen zu funktionalisieren und somit Anwendungen im Bereich integrierter Downstreaming Prozesse zu erschließen. Ein Schwerpunkt stellt die Entwicklung einer geeigneten Methode zur Aktivierung von Membranoberflächen mit anschließender Ligandendekoration dar. Besonders großes Anwendungspotential im Bereich Downstreaming zeigen dabei Hohlfasermembranen, die für die gezielte Abtrennung von Proteinen durch Affinitäts- oder ionische Wechselwirkungen eingesetzt werden. Daran angelehnt soll die Effizienz modifizierter Hohlfaser-

---

module im Bereich der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie bei der Aufreinigung his-getagter Proteine aus dem Modellorganismus *E.coli* beschrieben und diskutiert werden. Weiterhin soll auf die Frage nach der Kompatibilität modifizierter Hohlfasermembranen für integrierte Prozesse ebenso eingegangen werden wie auf die Veränderungen der Membranoberfläche durch die Modifizierung und den Kultivierungsprozess. Abschließend steht unter Verwendung eines produktsekretierenden Testorganismus in der Form von *B.megaterium* die Realisierung eines Bioprozesses mit integrierter Produktaufarbeitung im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zum Teil in einem von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) geförderten Vorhaben mit Namen „Modularer Mikro-Hohlfaserreaktor zur maßgeschneiderten Proteinabtrennung in Zellkulturtechnik“ (Aktenzeichen 13120) in Zusammenarbeit mit Lina Meyer erzielt worden sind [Meyer, 2008].

## 2 Theoretische Grundlagen

Einführend wird neben einer Definition zum Begriff „Membran“ ein Überblick über die in der Biotechnologie häufig verwendeten Membranmaterialien und -typen gegeben, wobei ein besonderes Augenmerk auf Polyethersulfon- und Polysulfonmembranen gelegt wird. Anschließend wird das Potential gängiger membranbasierter Trennprozesse in der Biotechnologie aufgezeigt. Weiterhin werden verschiedene Strategien zur Membranmodifizierung und daran angelehnt die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Membranchromatographie näher erläutert. Abschließend wird ein miniaturisiertes Reaktorsystem in Form eines Mikro-Hohlfaserreaktors vorgestellt.

### 2.1 Membranen

Die Membrantechnologie gilt heute als eigenständige Gruppe von verfahrenstechnischen Grundoperationen, die in der Industrie zunehmend an technischer Bedeutung gewinnt. Der Begriff „Membran“ wird nach Staude wie folgt definiert:

Natürliche oder künstlich hergestellte flächige Gebilde, die fluiden Phasen oder auch zwei Volumina einer Phase mit unterschiedlicher Zusammensetzung voneinander trennen und deren Fähigkeit darin besteht, den Stoffaustausch zwischen ihnen zu ermöglichen, werden als Membranen bezeichnet. Im Gegensatz zu Phasengrenzflächen, ausgebildet zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten oder zwischen einem Gas und einer Flüssigkeit, bildet die Membran eine eigene Phase [Staude, 1992].

#### 2.1.1 Membranmaterialien

Zur Herstellung von Membranen lässt sich grundsätzlich eine Vielzahl von Materialien verwenden. Entscheidend dafür ist die Verfügbarkeit einer Technik, die eine geeignete Morphologie des Materials für die vorgesehene Anwendung generiert. Im Wesentlichen wird zwischen den organisch polymeren Membranen und den anorganischen Membranen wie z.B. Glas, Keramik, Metall und Kohlenstoff unterschieden [Ripperger, 1992].

Letztere zeichnen sich durch hohe Temperaturbeständigkeit, mechanische und chemische Stabilität sowie eine gut definierte, beständige Porenstruktur aus. Dennoch bieten organisch polymere Membranen eine Reihe von Vorteilen, in denen sie anorganischen Materialien überlegen sind:

- geringe Herstellungskosten
- Realisierung verschiedener geometrischer Formen
- Möglichkeit der chemischen Modifizierung für spezielle Applikationen
- günstiges Verhältnis von Festigkeit zu Gewicht
- mechanische Flexibilität

Nachteilig in industriellen Prozessen können sich geringere Temperaturstabilität, die mangelnde Resistenz gegen Chemikalien sowie Alterungserscheinungen, mit denen eine Veränderung der Membrankenndaten einhergeht, auswirken. Zudem resultieren aus der hohen Hydrophobie mancher Polymeroberflächen (z.B. Polyethersulfon, Polysulfon, Polyvinylidendifluorid, Polypropylen) Probleme bei der Benetzbarkeit mit hydrophilen Medien, dem aber durch eine gezielte Membranmodifizierung entgegengewirkt werden kann (Kap. 2.2.1).

### **2.1.2 Membrantypen**

Die mittlerweile sehr umfangreichen Anwendungen der Membrantechnologie unter den verschiedensten Prozessbedingungen verlangen nach speziellen Membrantypen, die individuell und gezielt in den verschiedenen Bereichen der Biotechnologie eingesetzt werden können. Neben der Klassifizierung der Membranen nach dem Material besteht die Möglichkeit einer weiterführenden Einteilung der organisch polymeren Membranen nach den in Tab. 1 angegebenen Unterscheidungsmerkmalen.

**Tab. 1:** Unterscheidungsmerkmale organisch polymerer Membrantypen [Kula et al., 1985]

Unterscheidungsmerkmal	Typ A	Typ B
Zusammensetzung	homogen (unipolymer / interpolymere)	heterogen (mehrschichtig / verstärkt)
Porenstruktur	symmetrisch	asymmetrisch
Oberfläche	porös	dicht
Elektrochemisches Verhalten	ionisch (geladen)	nicht-ionisch (ungeladen)
Form	flach	tubular

Es besteht die Möglichkeit, Membranen aus nur einem Polymer oder aber auch aus Gemischen herzustellen, so dass zwischen homogenen und heterogenen Membranen unterschieden wird. Im Hinblick auf die Homogenität der Porenstruktur entlang des Membranquerschnitts wird zwischen symmetrischen und asymmetrischen Membranen unterschieden, von der Oberfläche ausgehend zwischen porösen und dichten Membranen. Vom Polymer hängt es ab, ob geladene oder ungeladene Membranen vorliegen, bedingt durch positive oder negative Festladungen in der Matrix. Im Wesentlichen können die Membran-geometrien als flach oder tubular klassifiziert werden. Tubulare Membranen werden abhängig vom Außendurchmesser weiter unterteilt in:

- röhrenförmige Membranen (5 – 25 mm)
- Kapillarmembranen (0,5 – 5 mm)
- Hohlfasermembranen (0,05 – 0,5 mm)

Hohlfasermembranen haben gegenüber Flachmembranen die Vorteile eines größeren Verhältnisses von Fläche zu Volumen, einer flexibleren Anwendung durch Ausnutzung von zwei voneinander getrennten Reaktionsräumen (intra- und extrakapillarer Bereich) und die Betriebsweise bei geringeren Drücken. Zudem kann ein Up-Scaling durch Integration mehrerer Hohlfasermembranen in eine Modulform (z.B. Kapillarmodul, Hohlfasermodul) einfach realisiert werden (Kap. 2.4). Nachteilig bei der Verwendung von Hohlfasermembranen wirkt sich jedoch vor allem die Neigung zum Membranfouling aus.

Die meisten Polymermembranen werden nach dem sog. Phaseninversionsverfahren hergestellt. Das Polymer wird dabei zunächst in einem geeigneten Lösemittel bzw. Lösemittelgemisch gelöst (Gießlösung). Danach kann die homogene Lösung zu einer Flachmembran vergossen bzw. zu einer tubularen Membran versponnen werden (Spinntechnik). Während dieses Vorgangs wird eine Phaseninversion eingeleitet, d.h. durch die gewählten Verfahrensparameter wird die homogene Lösung in ein Zweiphasensystem überführt. Das Polymer fällt aus und bildet die Membranstruktur und das Lösemittel bzw. die Lösemittelkomponenten sind in den Poren dieser Struktur eingelagert (Porenbildner). Die Phaseninversion kann durch folgende Vorgänge eingeleitet werden [Pereira Nunes et al., 2006], [Rösler, 2005], [Ripperger, 1992]:

- durch Zugabe eines sog. Fällmittels in die Lösung (Nassfällungsverfahren)
- durch Verdunstung eines Teils des Lösemittels bzw. der Lösemittelkomponente (Kombinierte Verdunstungs-Nassfällung)
- durch eine Temperaturänderung (Thermische Phaseninversion)

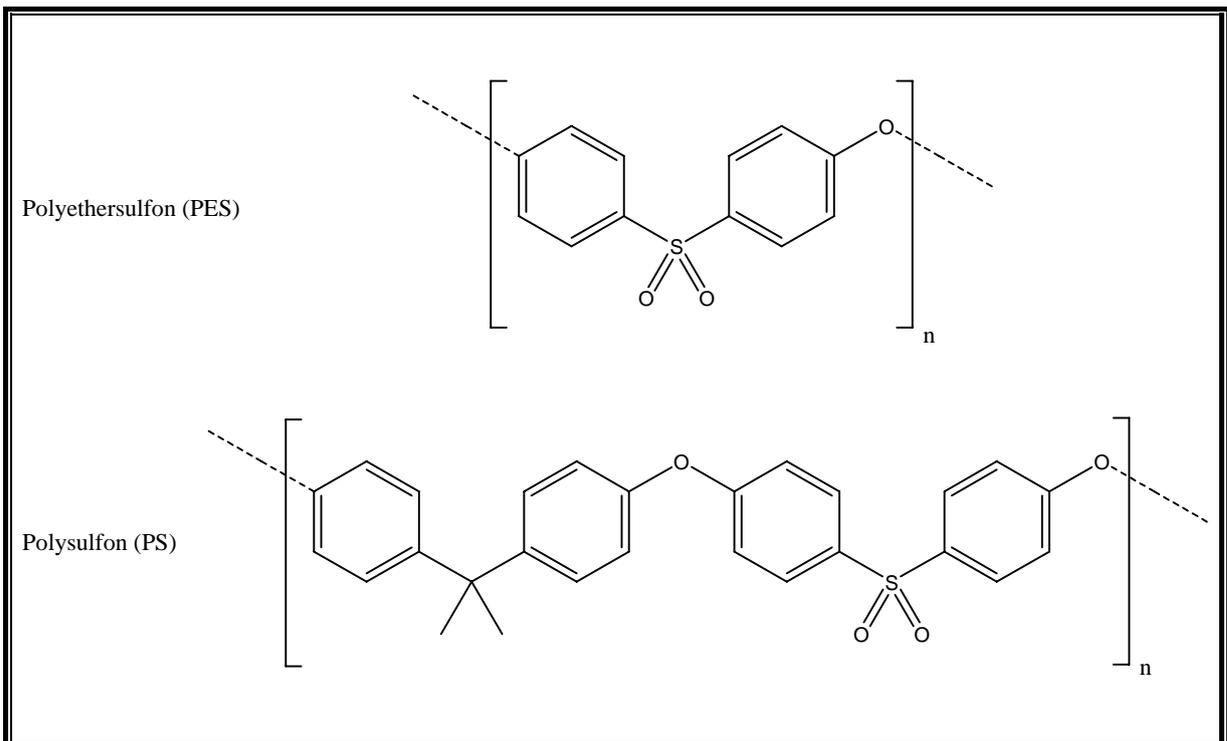
Weitere physikalische Verfahren zur Membranherstellung, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden soll, sind das Verdampfungsfilmverfahren, das Sintern von Polymerpulvern und die Reckung extrudierter Folien. Auf Seite der chemischen Verfahren haben sich zum Einen das Verfahren der Grenzflächenpolykondensation und zum Anderen das Kernspur-Verfahren (Track-etching) etabliert [Rösler, 2005].

Heutzutage wird ein Großteil der Membranen aus Polyethersulfon (PES) und Polysulfon (PS) hergestellt, da diese Membranmaterialien, abgesehen von der Hydrophilie der Membranoberfläche, alle entscheidenden Anforderungen für biotechnologische Anwendungen erfüllen. Im nachfolgenden Kap. 2.1.3 werden die Eigenschaften dieser Membranmaterialien beschrieben.

### 2.1.3 Polyethersulfon- und Polysulfonmembranen

Allen Polyarylethersulfonen ist die para-substituierte, gewinkelte Diphenylsulfon-Komponente gemeinsam, die verantwortlich für die physikalischen Eigenschaften ist. Abb.1 stellt die entsprechenden Strukturformeln von PES und PS dar.

Beide Polymere besitzen hohe Glasübergangstemperaturen (230 °C für PES und 195 °C für PS), sind weitgehend amorph und zeichnen sich durch sehr hohe Beständigkeit gegenüber Säuren und Laugen aus (pH 2-12). Für die meisten Prozesse ist die thermische Stabilität ausreichend. Zudem sind sie resistent gegen aggressive Chemikalien und Gamma-Strahlung und lassen sich leicht verarbeiten [Pereira Nunes et al., 2006].



**Abb. 1:** Strukturformeln von Polyarylethersulfonen in der Form von Polyethersulfon und Polysulfon.

Flach- und Hohlfasermembranen aus PES bzw. PS sind kommerziell in verschiedenen Porengrößen erhältlich (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen; Pall GmbH, Dreieich; Membrana GmbH, Wuppertal), so dass sie gezielt in den Bereichen der Ultra- und Mikrofiltration eingesetzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sind neben zwei PS-Hohlfasermembranen mit einem cutoff von 5 bzw. 30 kDa (Low Flux bzw. High Flux) auch

zwei Hohlfasermembranen aus PES mit Namen UltraPES (cutoff 70 kDa) und MicroPES (0,2 µm-Sterilmembran) zum Einsatz gekommen.

## 2.2 Membrantrennprozesse

Membranen und Membranprozessen wird heute im Zusammenhang mit biotechnologischen Produktionsverfahren ein ganz erhebliches Interesse entgegengebracht. Von der konsequenten Nutzung von Membranen bzw. Membrantrennprozessen werden eine erheblich vereinfachte Prozessführung und eventuell auch preisgünstigere und qualitativ bessere Produkte erwartet. Für eine Anwendung in der Biotechnologie sind Membranprozesse besonders geeignet, weil hier

- die Stofftrennung ein physikalischer Vorgang ist und die zu trennenden Stoffe chemisch nicht verändert werden
- die Trennung des Gemisches bei Raumtemperatur (RT) abläuft und somit keine thermischen Belastungen auftreten
- bei der Trennung keine Nebenprodukte auftreten, die zu einer Umweltbelastung führen könnten
- und die Membranstofftrennverfahren wirtschaftliche Prozesse mit relativ geringen Energie- und Investitionskosten sind [Strathmann, 1985].

Somit sind sie den konventionellen Trennprozessen, wie z.B. Destillation, Trocknung, Adsorption und Kristallisation in vielerlei Hinsicht überlegen. Die wichtigsten in der Biotechnologie benutzten Membranen und Membrantrennprozesse mit Anwendungsbeispielen sind in der Tab. 2 zusammengefasst.

Die technischen Membranen lassen sich dabei hinsichtlich der zu trennenden Komponenten in zwei Kategorien einteilen. Es wird unterschieden zwischen Membranen zur Trennung von Komponenten verschiedener Größe und Gestalt (Mikro-, Ultra- und Nanofiltration) und Membranen zur Trennung von Komponenten ähnlicher Gestalt (Umkehrosmose, Elektrodialyse, Gastrennung, Pervaporation) [Rösler, 2005].

**Tab. 2:** In der Biotechnologie eingesetzte Membrantrennprozesse [Ulbricht, 2006], [Ripperger, 1992]

Membran-trennprozess	Membrantyp	Porendurch-messer	Trenn-mechanismus	Anwendungsbeispiele
Mikrofiltration	symmetrische Porenmembran	~ 0,05 – 10 µm (makroporös)	konvektiver Transport (Siebeffekt)	Abtrennung von suspendierten Zellbestandteilen/ Stoffen
Ultrafiltration	asymmetrische Porenmembran	~ 2 – 100 nm (> 50 nm makroporös, 2 – 50 nm mesoporös)	konvektiver Transport (Siebeffekt)	Gewinnung von Proteinen, Enzymen und Stärke
Nanofiltration	asymmetrische Löslichkeitsmembran aus homogenem Polymer	< 2 nm (mikroporös)	überwiegend Sorption und Diffusion	Rückgewinnung homogener Katalysatoren, Entsalzung von Brackwasser
Umkehrosmose	asymmetrische Membran	< 2 nm (mikroporös)	überwiegend Sorption und Diffusion	Meerwasserentsalzung, Wasseraufbereitung
Elektrodialyse	Ionenaustauscher-membran	< 0,1 nm (dicht)	elektrische Potenzialdifferenz	Entsalzung/Entsäuerung von Prozesswasser
Gastrennung	asymmetrische Löslichkeitsmembran	< 0,1 nm (dicht)	Sorption und Diffusion	Trennung von Gasen/Dämpfen, z.B. Sauerstoff/Stickstoff

Bei der Mikro- und Ultrafiltration werden Substanzen im Wesentlichen über konvektiven Fluss (bedingt durch den transmembranen Druckgradienten) durch die Membranporen transportiert. Diffusionsvorgänge spielen eine untergeordnete Rolle. Je nachdem, ob ein konvektiver Fluss einer Lösung unter Druck tangential über oder orthogonal gegen die Oberfläche einer Membran geführt wird, differenziert man zwischen Cross-Flow- bzw. Dead-End-Filtration.

Im Gegensatz dazu kommen bei der Gastrennung dichte Gas-Diffusions-Membranen zum Einsatz. Die permeierende Komponente wird in der Membran sorbiert und diffusiv hindurch transportiert. Nanofiltrationsmembranen besitzen Poren mit einem Durchmesser von ca. 1 nm. Aus diesem Grund sind hinsichtlich des Stofftransports sowohl konvektive als auch diffusive Anteile zu berücksichtigen. Ferner können membranspezifische Oberflächeneigenschaften (Ladungen/Polarisierungen, funktionelle Gruppen, etc.) den Permeatfluss und das Rückhaltevermögen beeinflussen.

In Trennprozessen können jedoch auch unerwünschte Effekte eintreten, die die Trenneffizienz und damit die Haltbarkeit von Membranen negativ beeinflussen. Abzutrennende Substanzen, die die Membranporen nicht passieren können, können die unter dem in der Literatur verwendeten Oberbegriff des Membranfoulings nachfolgend aufgeführten Effekte nach sich ziehen [Ramesh et al., 2006], [Le-Clech et al., 2006]:

- Konzentrationspolarisation
- Ausbildung einer Gelschicht / eines Biofilms
- Direkte Verblockung der Membranporen

Membranen mit einem hydrophoben Charakter, wie z.B. PES und PS, neigen bei der Abtrennung von Proteinen in biotechnologischen Prozessen verstärkt zur Bildung eines Biofilms. Der Grund dafür liegt in der Interaktion zwischen Protein, Mikroorganismen und Membranmaterial. Zur Minderung des sog. Biofoulings fokussiert sich der Blick der Forschung auf die hydrophile Modifizierung solcher Membranen. Im folgenden Abschnitt werden die unterschiedlichen Strategien vorgestellt.

### **2.2.1 Strategien der Membranmodifizierung**

Die Praxis hat gezeigt, dass maßgeschneiderte Matrixmembranen notwendig sind, um selektiv und effizient zu trennen und dem Problem des Foulings entgegenzuwirken. Eine ideale Membran muss also die ausgezeichneten Werkstoffeigenschaften von hydrophoben Polymeren hinsichtlich ihres inneren Aufbaus vereinen mit Oberflächeneigenschaften hydrophiler Materialien.

Die Herstellung von chemisch modifizierten Membranen kann sowohl mit homogener als auch mit heterogener Reaktionsführung erreicht werden. Bei der homogenen Synthesevariante gelingt die Einführung gewünschter funktioneller Gruppen derart, dass dem in einem geeigneten Lösemittel gelösten Polymer (Polymergießlösung) entsprechende Additive zugegeben werden und die Membran anschließend durch eine der in Kap. 2.1.2 dargestellten Methoden hergestellt werden kann.

Als besonders erfolgreich bei der homogenen Reaktionsführung zur Modifizierung von PS hat sich die Metallierung unter Verwendung von n-Butyllithium in Tetrahydrofuran herausgestellt. Dabei aktiviert die Sulfongruppe des PS-Gerüsts die benachbarten aromatischen Ringe und dirigiert die Lithiierung so, dass bis zu zwei Wasserstoffatome gegen Li ausgetauscht werden. Dieses intermediär gebildete PS-Li lässt sich mit einer Vielzahl von Elektrophilen umsetzen und eröffnet ein breites Spektrum an PS-Derivaten [Möckel, 1998]. Bei Nabe ist z.B. die Reaktion von lithiiertem PS mit Glycidyl-4-oxoheptylether zur Synthese einer epoxyaktivierten Membran dargestellt [Nabe, 1997].

Da in vielen Fällen das gewünschte Polymer unter entsprechenden Reaktionsbedingungen anvisierter Derivatisierungen nicht mehr löslich ist, kommt der heterogenen Reaktionsführung eine große Bedeutung zu. In der Regel lassen sich die heterogenen Oberflächenmodifizierungen von Membranen einer der nachfolgend aufgeführten Methoden zuordnen:

#### *Pfropfpolymerisation („Graft“-Polymerisation)*

Bei der Pfropfpolymerisation werden zuerst auf der porösen Oberfläche der Membranen bifunktionelle Moleküle oder Monomere (z.B. Vinyl- oder Acrylmonomere) aufgebracht. Anschließend wird durch Plasma-Behandlung, UV- oder Gamma-Strahlung eine radikalische Polymerisation initiiert, bei der das Polymerisat kovalent an das Membrangrundgerüst gebunden wird.

Ulbricht et al. nutzten beispielsweise UV-Strahlung, um das Modellmonomer Acrylsäure auf PS- sowie PES-Membranen zu propfen. Die synthetisierten Membranen mit reaktiven Carboxylat-Endgruppen konnten somit auf der einen Seite in Matrices mit einem hydrophileren Charakter überführt werden und auf der anderen Seite mit reaktiven Gruppen zur Bindung von Biomolekülen (BSA, Invertase) belegt werden [Ulbricht et al., 1996].

#### *Beschichtungstechnik („reactive coating“)*

Durch Einsatz der Beschichtungstechnik gelingt es, amphiphile Polymere auf hydrophobe Membranoberflächen adhäsiv bzw. adsorptiv zu binden. Somit lassen sich die günstigen Eigenschaften des aufgetragenen Funktionspolymers auf die Trägermatrix übertragen. Zudem

können die aufgebrauchten funktionellen Gruppen des Funktionspolymers für weitere Modifikationen genutzt werden.

Yang et al. berichteten von mit Chitosan beschichteten Affinitätsmembranen, die erfolgreich im Bereich der Aufreinigung von Antikörpern eingesetzt worden sind. Dabei wurden an die Hydroxyfunktionen adhäsiv gebundener Chitosanmoleküle über einen C11-Spacer Protein A-Moleküle gekoppelt, die zur Aufreinigung von menschlichem IgG genutzt worden sind [Yang et al., 2002].

Vorteile der „Coating“-Technik liegen neben der einfachen und schnellen Durchführung der Beschichtungen vor allem in der Tatsache begründet, dass aufgebrauchte Funktionspolymere nach durchgeführtem Reaktionsprozess leicht wieder entfernt werden können, um die ursprünglichen Eigenschaften der Membranen wiederherzustellen. Daran angelehnt ist aber gleichzeitig auch der Nachteil dieser Methode zu suchen, da oberflächenaktive Substanzen die Bindung zwischen den Polymeren lösen können und ihrerseits an der Membran adsorbieren [Rios et al., 2007].

### *Nasschemische Membranmodifizierung*

Bei der Methode der nasschemischen Membranmodifizierung kann auf ein breites Spektrum von chemischen Reaktionen zurückgegriffen werden, so dass die Möglichkeit besteht, verschiedenste reaktive Gruppen oder Funktionspolymere auf der Polymermatrix zu binden. Den Angriffspunkt für angestrebte Derivatisierungen und Ligandenanbindungen bilden häufig die bei der Polymerkondensation entstehenden funktionellen Endgruppen.

Um an diesen Endgruppen (z.B. Hydroxy- oder Aminfunktionen) erfolgreich gewünschte Ligandensysteme zu generieren, müssen diese in der Regel zuerst aktiviert werden. Mögliche Variationen der Derivatisierungsschemie können beispielsweise Epoxy-, Aldehyd- und Bromcyanaktivierungen sein. Häufig werden bei den Derivatisierungsreagenzien länger-kettige Moleküle (C3-C11) favorisiert (z.B. 1,4-Butandiol diglycidylether, Glutaraldehyd), so dass sich die terminalen reaktiven Gruppen über Spacer an der Membranoberfläche ausrichten können, um nachfolgende Reaktionen in einer sterisch ungehinderten Form zu realisieren. Auf Basis der aktivierten Membran können abschließend gewünschte Liganden kovalent gekoppelt werden.

Klein et al. entwickelten eine Möglichkeit, Hohlfasermembranen aus PS durch Einsatz eines Diepoxids in Form von Ethylenglycoldiglycidylether (EGDGE) zu aktivieren. Durch eine anschließende Beschichtung mit Hydroxyethylcellulose gefolgt von einer erneuten Aktivierung mit EGDGE konnte zum Einen die Anzahl an reaktiven Gruppen und zum Anderen der Grad der Hydrophilie entscheidend erhöht werden. Auf Basis der synthetisierten Epoxymembran sind über Diaminohexan-Linker u.a. Protein-A-Moleküle kovalent gebunden worden. Die Effizienz der generierten Protein-A-Membranen ist abschließend bei der Antikörperaufreinigung von menschlichem IgG getestet worden [Klein et al., 1994].

Ein Schwachpunkt der nasschemischen Technik kann insbesondere bei mikroporösen Membranen die geringe Oberflächenselektivität und der diffusionskontrollierte Reaktivitätsgradient sein. Dennoch überzeugt sie häufig wegen des apparativ geringen Aufwands und der daraus resultierenden kostengünstigen Herstellung.

Jede der drei Methoden besitzt eine Reihe von Vorteilen, aber auch Nachteile. Welche Methode favorisiert wird, richtet sich deshalb nach den speziellen Anforderungen an die herzustellende Membran. In biotechnologischen Prozessen sollte die Polymer-Matrixmembran im Allgemeinen folgende Charakteristika aufweisen [Rösler, 2005], [Ripperger, 1992], [Krause, 1992]:

- hohe mechanische Stabilität
- hohe chemische und physikalische Stabilität während des eigentlichen Trennprozesses
- hohe Porosität mit großer Oberfläche, um eine gute Zugänglichkeit der zu bindenden Moleküle zu erzielen
- hydrophile Oberfläche, um die unspezifische Adsorption von bioaktiven Spezies zu minimieren und eine genügende Biokompatibilität zu gewährleisten
- Resistenz gegen Mikroorganismen
- Verfügbarkeit und kostengünstige Herstellung
- ausreichende Anzahl an funktionellen Gruppen zur Bindung von Linker-Molekülen und Liganden

Im Rahmen dieser Arbeit ist die *nasschemische* Variante der Beschichtungstechnik – gerade auch wegen des geringen apparativen Aufwands – die Erfolg versprechendste und effizienteste Methode, um kommerziell erhältlicher PES- und PS-Hohlfasermembranen zu modifizieren. Die in dieser Arbeit vorgestellte Strategie der Membranmodifizierung orientiert sich dabei an das von Klein et al. entwickelte Protokoll zur Herstellung von Affinitätsmembranen [Klein, 2000], [Klein et al., 1994].

## 2.3 Membranchromatographie

Die Chromatographie ist bei einer entsprechenden Wahl von stationärer und mobiler Phase ein schonendes Trennverfahren für das Produkt, da meist bei Raumtemperatur in gepufferten Lösungen gearbeitet wird und niedrige Scherkräfte auftreten. Darüber hinaus zeigen chromatographische Trennmethode bei entsprechend angepassten Parametern eine hohe Selektivität [Chmiel, 2006].

Ein besonders in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückter Bereich der Chromatographie geht von der Verwendung von Membranen als Trägermaterial aus. Mikroporöse Membranen stellen dabei die Idealform eines sehr kurzen Säulenbettes (hohe Durchflussraten) bei gleichzeitiger großer Oberfläche (hohe Kapazitäten) dar. Ein weiterer leistungssteigernder Faktor sind die stark verkürzten Diffusionswege (Molekül – Ligand) in der Membranmatrix, da hier überwiegend konvektiv gearbeitet wird. Wichtige Chromatographieverfahren in der Biotechnologie sind [Lottspeich et al., 1998]:

- Ionenaustausch-Chromatographie (IEX)
- Reversed-Phase-Chromatographie (RPC)
- Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)
- Größenausschluss-Chromatographie (SEC)
- Affinitätschromatographie
- Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Im Kontext dieser Arbeit sind vor allem die Ionenaustausch-Chromatographie und die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie wichtig. Im Folgenden wird auf diese beiden Chromatographietechniken – unter besonderer Berücksichtigung des Aspekts der Proteintrennung – genauer eingegangen.

### 2.3.1 Ionenaustausch-Chromatographie

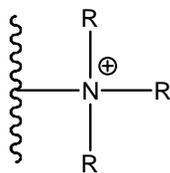
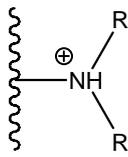
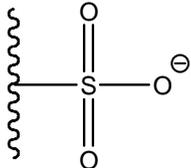
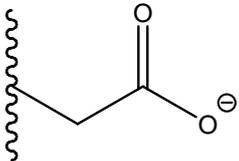
Die Grundlage für den Ionenaustausch ist die kompetitive Wechselwirkung geladener Ionen. Dabei konkurriert ein Probenmolekül mit Salzionen um die geladenen Positionen auf einer Ionenaustauscher-Matrix. Bei der Ionenaustausch-Chromatographie wird das amphotere Verhalten der Proteine ausgenutzt. Der Gesamtladungszustand der Proteine hängt dabei vom pH-Wert der umgebenden Lösung sowie von der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) und der räumlichen Konformation der Proteine (Sekundär- und Tertiärstruktur) ab. Die Aminosäurekomposition bestimmt somit den isoelektrischen Punkt (pI) eines Proteins, an dem es eine Nettoladung von Null besitzt. Proteine wechselwirken mit den entgegengesetzt geladenen Ankergruppen der stationären Matrix und substituieren deren Gegenionen. Die selektive Trennung einer Proteinspezies von anderen beruht auf der unterschiedlich großen Bindungsaffinität verschiedener Proteine. Die Bindungsaffinität ist allgemein abhängig von folgenden Faktoren [Weiß, 2001]:

- Ladung der Ionen
- Größe der Ionen
- Art der Gegenionen in der mobilen Phase
- pH-Wert der mobilen Phase
- Ionenstärke der mobilen Phase
- Typ des Ionenaustauschers

Um adsorbierte Proteine von den Ankergruppen zu eluieren, werden Ionenstärke des Puffers und pH-Wert variiert. Dies verringert die Bindungsaffinität entweder kompetitiv (Salz-Gradient) oder direkt durch Änderung der Proteinladung (pH-Gradient).

Für die chromatographische Anwendung stehen die in der Tab. 3 aufgeführten Anionen- und Kationenaustauscher zur Verfügung. Je nachdem, ob positiv oder negativ geladene Ankergruppen auf der Matrix immobilisiert sind, unterscheidet man zwischen Anionen- bzw. Kationenaustauscher. Innerhalb dieser beiden Klassen wird bezüglich der Säure/Base-Stärke der Austauschergruppen und der Chemie der Substituenten geordnet.

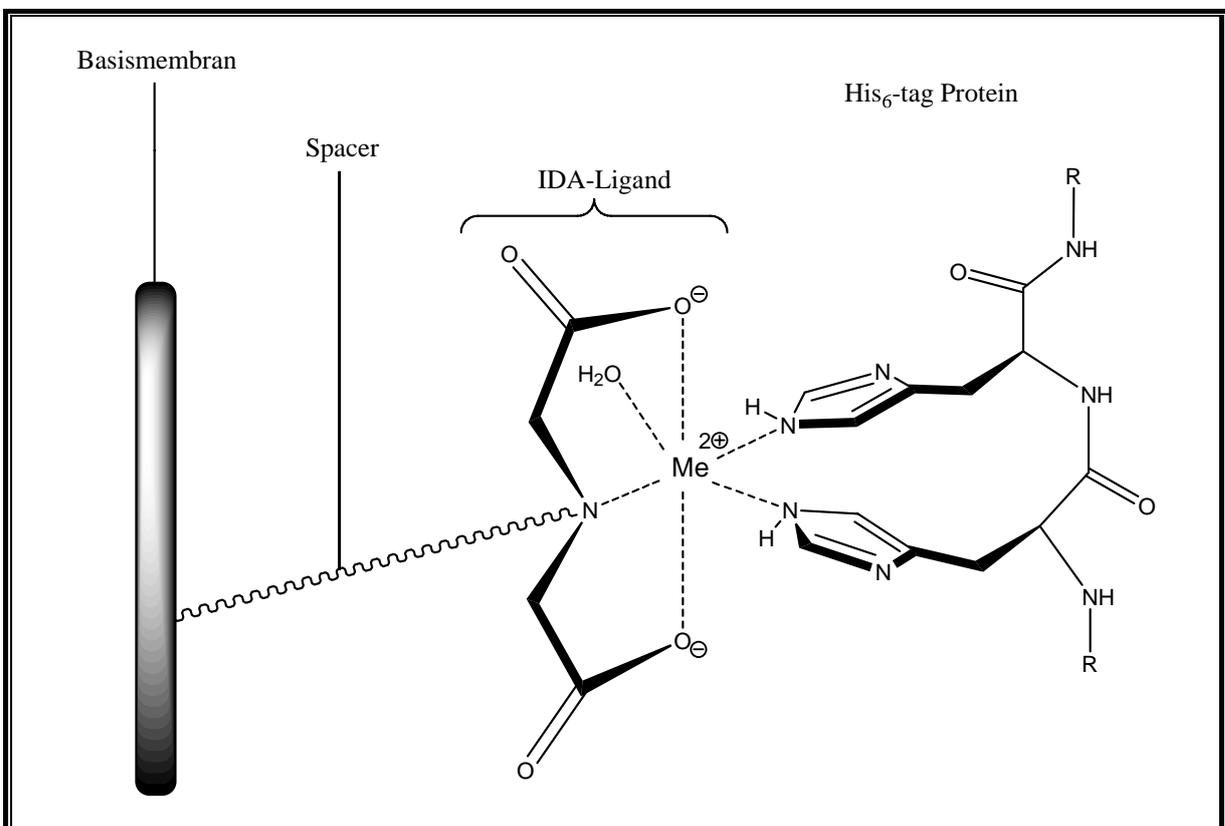
**Tab. 3:** Funktionelle Gruppen der Ionenaustausch-Chromatographie

Bezeichnung	Typ	Funktionelle Gruppe
Q ( <i>quart.</i> Ammoniumgruppe)	anionisch stark	
D ( <i>tert.</i> Ammoniumgruppe)	anionisch schwach	
S (Sulfonsäuregruppe)	kationisch stark	
C (Carboxymethylgruppe)	kationisch schwach	

Im Rahmen dieser Arbeit werden ausgehend von epoxyaktivierten PES-Hohlfasermembranen Synthesewege zur Herstellung von Anionenaustauschern (Q- und D-Typ) und Kationenaustauschern (S- und C-Typ) beschrieben. Darauf aufbauend ist die Effizienz von generierten Q- und D-Hohlfasermembranen bei der Aufreinigung eines Modellproteins (BSA) getestet worden.

### 2.3.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie

Eine besondere Art der Affinitätschromatographie, die nicht auf biospezifischen Erkennungsmechanismen beruht, ist die von Porath eingeführte immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) [Porath et al., 1975]. Bei diesem Chromatographie-Typ ist eine metallchelatisierende Gruppe – meist Iminodiessigsäure (IDA), Nitrilotriessigsäure (NTA) oder Tris(carboxymethyl)ethylendiamin (TED) – an der aktivierten Membranmatrix immobilisiert. Ein multivalentes Übergangsmetallion wird daran so gebunden, dass eine oder mehrere Koordinationsbindungen für eine Interaktion mit basischen Gruppen von Proteinen zur Verfügung stehen. Die am häufigsten eingesetzten Metallionen sind  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$ . Mit Hilfe der IMAC können insbesondere rekombinante Proteine, in deren Sequenz meist sechs aufeinanderfolgende Histidineinheiten eingefügt sind (His<sub>6</sub>-tag), schnell, effektiv und selektiv abgetrennt werden. Die Trennung basiert auf koordinativen Bindungen zwischen den Elektronendonorguppen des Histidins (Imidazolgruppe) und dem Metallion. Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der Koordination eines His<sub>6</sub>-tag Proteins an eine IMAC-Membran [Gutiérrez et al., 2007], [Suen et al., 2003], [Klein, 2000], [Porath, 1992].



**Abb. 2:** Koordination eines His<sub>6</sub>-tag Proteins an eine IMAC-Membran auf IDA-Basis.

Um unerwünschte Ionenaustauscheffekte zu vermeiden, werden meist neutrale Puffer mit hoher Ionenstärke (0,3-1 M NaCl) verwendet. Die Dissoziation des Komplexes kann durch Protonierung der Histidineinheiten (pH-Absenkung) bzw. durch Einsatz von konkurrierenden Komplexbildnern in Form von z.B. Ammoniumionen, Imidazol oder Histidin erzwungen werden. Für die Regeneration der Membranmatrix werden in der Regel EDTA-haltige Lösungen eingesetzt, welche die Metallionen samt noch gebundenen Proteinen von dem Träger ablösen.

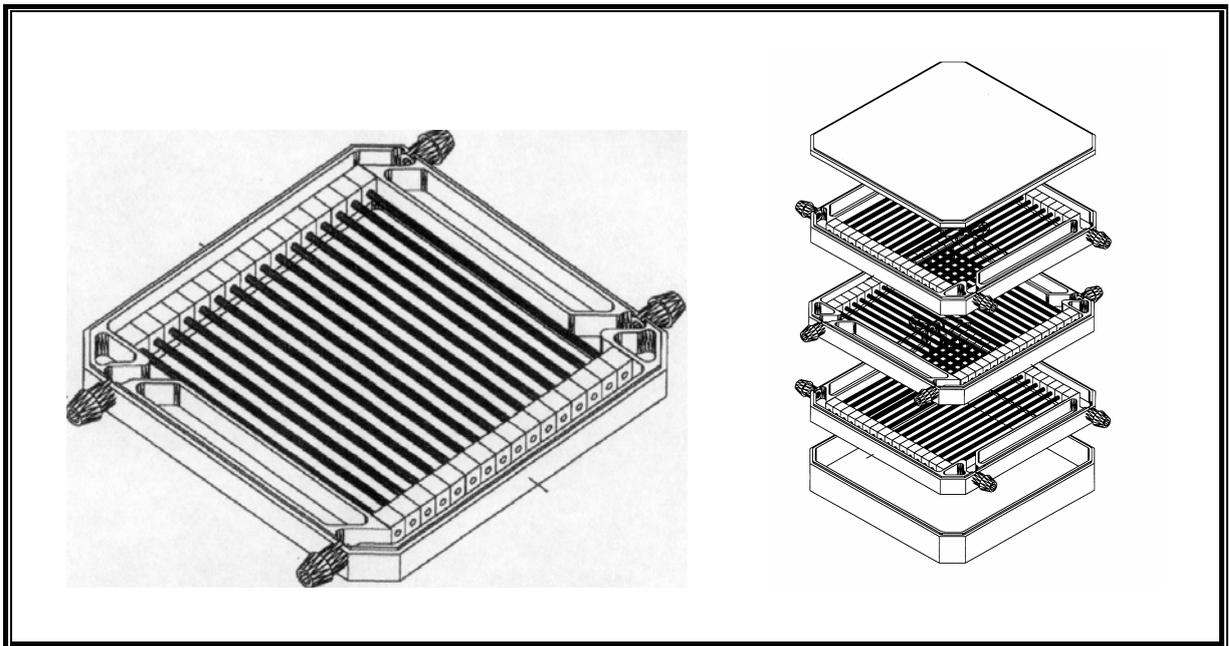
Ein aktuelles Einsatzgebiet im Bereich der IMAC beschäftigt sich mit der Aufreinigung phosphorylierter Proteine durch Verwendung von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen [Feng et al., 2007], [Imam-Sghiouar et al., 2005].

## 2.4 Mikro-Hohlfaserreaktoren in der Biotechnologie

Um Membranen effektiv einsetzen zu können, müssen sie in entsprechende Module eingebaut werden. Verschiedene heute in der Biotechnologie gebräuchliche Modultypen sind neben Mikro-Hohlfaserreaktoren Rohrmembran- und Kapillarrohrmembranmodule sowie Plattenmodulsysteme und Wickelmodule [Pereira Nunes et al., 2006], [Rautenbach et al., 1981].

Ein zukunftsweisender Ansatz für die Durchführung kontinuierlicher und integrierter Prozesse ist die Einbindung von Hohlfasermembranmodulen in den Produktionsprozess. Diese sind in der Lage, auf einfache Weise die selektive Abtrennung von Produkten bzw. Zugabe von Substraten oder die Rückhaltung von Verfahrensbestandteilen (z.B. Zellen, immobilisierte Biokatalysatoren) zu ermöglichen [Villain et al., 2008].

Die Abb. 3 zeigt den schematischen Aufbau eines Hohlfasermembranmoduls. Im Hinblick auf die Strömungsführungen ist das System flexibel in biotechnologischen Prozessen einsetzbar. Verfahrensvarianten beinhalten zum Einen einen möglichen Stoffeintrag (Gas, fluide Phasen) in das System durch die Hohlfasern (lumen-side) oder über den extrakapillaren Bereich (shell-side), zum Anderen kann das Modul sowohl im Gleichstrom als auch im Gegenstrom betrieben werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, modularisierte Einzelreaktoren in Form von sog. „stacks“ oder in Flächenanordnungen (Reihen- oder Parallelschaltung) miteinander zu kombinieren, um neben einem einfachen Up-Scaling des Systems auch ein einfaches Screening von Verfahrensparametern im Kleinmaßstab zu ermöglichen.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung eines Hohlfasermembranmoduls. Links: Aufsicht auf ein einzelnes Modul. Rechts: Zusammengesetztes System in Form eines Stapels („stack“-Aufbau).

Die Vorteile von Mikro-Hohlfaserreaktoren ergeben sich hauptsächlich aus dem kleinen Reaktorvolumen von wenigen Millilitern und aus der großen Anpassungsfähigkeit an individuelle Prozesse und lassen sich wie folgt zusammenfassen [Binkowski, 2007], [Abetz et al., 2006]:

- Hohe spezifische Oberfläche und somit eine definierte Austauschfläche
- Ressourcenschonung und Verringerung der Reststoffströme
- flexible und einfache Handhabung
- erleichtertes Up-Scaling in den Produktionsmaßstab
- Erleichterung des Downstreamings (insbesondere durch integriertes Downstreaming)
- breites Anwendungspotential

Das große Anwendungspotential von Hohlfasermodulen für Verfahrensschritte wie Produktion, Isolierung und Aufreinigung erlaubt zudem die Integration der Verfahrensschritte zur Vereinfachung und Verkürzung von Produktionsprozessen. Besonders das zeit- und kostenintensive Downstreaming kann so, durch Bereitstellung wesentlich höherwertiger Rohprodukte in Folge integrierter Vorreinigung, Zellabtrennung oder Abreicherung von Störkomponenten, wesentlich entlastet werden [Chmiel, 2006].

## 3 Experimenteller Teil

In dem Kap. 3 wird zunächst eine Funktionalisierungsstrategie aufgezeigt, wie sich kommerziell erhältliche Hohlfasermembranen aus Polyethersulfon bzw. Polysulfon nasschemisch aktivieren lassen (Kap. 3.1.2). Darauf aufbauend werden die aktivierten Matrizes in Form von Epoxyhohlfasermembranen mit verschiedenen Ligandensystemen dekoriert, wobei neben der Einführung von funktionellen Gruppen – wie etwa Amin- und Hydroxygruppen – die Synthese von Ionenaustauscher- und IMAC-Membranen im Mittelpunkt der Untersuchungen steht (Kap. 3.1.3). Weiterhin werden mit Liganden dekorierte Hohlfasern im Bereich des Downstream Processings getestet, wobei sowohl generierte Anionenaustauscher-Hohlfasermembranen bei der Aufreinigung eines Modellproteins in der Form von BSA als auch IMAC-Hohlfasermembranen bei der Aufreinigung his-getagter Proteine aus *E.coli* zum Einsatz gekommen sind (Kap. 3.2). Anhand der Verwendung eines mit IMAC-Hohlfasermembranen ausgestatteten Mikro-Hohlfaserreaktors (MHFR) bei der Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* wird das eingesetzte Affinitäts-hohlfasermodul in Bezug zu den einzelnen Prozessschritten der Proteinaufreinigung in Form von Adsorption, Waschprozess und Elution beschrieben (Kap. 3.3). Abschließend erfolgt die Testung, Etablierung und Optimierung von Bioprozessen im System MHFR mit einer integrierten Produktaufarbeitung unter Verwendung verschiedener bakterieller Testorganismen (*B.megaterium*, *E.coli*) zur Produktion his-getagter Proteine (Kap. 3.4).

### 3.1 Heterogene Oberflächenmodifizierung von Hohlfasermembranen für deren Einsatz in Mikroreaktionssystemen

Dieser Abschnitt befasst sich mit der Entwicklung einer geeigneten Strategie zur heterogenen Modifizierung kommerziell erhältlicher Hohlfasermembranen aus Polyethersulfon (PES) bzw. Polysulfon (PS).

Membranen lassen sich grundsätzlich in drei verschiedene Bereiche einteilen: Die Membranbasis, der Bereich der Derivatisierung und die Ligandendekoration. Als Membranbasis können eine Vielzahl von Hohlfasermembranen eingesetzt werden, welche in der Regel auf synthetische Polymere zurückzuführen sind. Neben der chemischen und physikalischen Beständigkeit werden PES- und PS-Hohlfasermembranen auch bevorzugt

wegen ihrer breiten Verfügbarkeit hinsichtlich variierender Porengrößen in verschiedenen Bereichen der Membrantechnologie eingesetzt.

Ziel der Derivatisierungsreaktion ist es, die inerte Basismembran zu aktivieren, d.h. mit gewünschten reaktiven funktionellen Gruppen zu belegen. Die in dieser Arbeit vorgestellte Derivatisierungsstrategie beruht auf einer 3-Schrittsynthese, bei der zuerst die terminalen Hydroxygruppen des Membranpolymers PES bzw. PS mit einem Diepoxid umgesetzt werden, um anschließend erfolgreich Zuckermoleküle kovalent immobilisieren zu können. Entscheidend sind hier zum Einen die Erhöhung der Oberflächenaktivität und zum Anderen die Umwandlung der inerten, hydrophoben Matrix in eine Membran mit hydrophilen Eigenschaften. Im finalen Derivatisierungsschritt können die zahlreichen Hydroxygruppen durch Ankopplung eines Diepoxid-Linkers in reaktive Epoxygruppen überführt werden (Kap. 3.1.2).

Auf Basis dieser reaktiven Epoxy-Hohlfasermembranmatrix können gezielt Liganden auf der Membranoberfläche dekoriert werden. Häufig eingesetzte Dekorationen sind Ionenaustauschergruppen (IEX), Protein A, Concanavalin A (Con A), Aptamere (sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Basis) und Metallchelate. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht neben der Synthese von IEX-Hohlfasermembranen die Etablierung eines Protokolls zur Herstellung von Metallchelat-Hohlfasermembranen (Kap. 3.1.3).

In weiterführenden Kapiteln wird die Effizienz synthetisierter Affinitätsmembranen bei biotechnologischen Proteinaufreinigungsprozessen dargestellt und diskutiert (Kap. 3.2-3.4).

### 3.1.1 Verwendete Membranmaterialien

Für die gezielte Oberflächenmodifizierung kommen in dieser Arbeit je nach Anwendungsbereich verschiedene Typen von kommerziell erhältlichen Hohlfasermembranen aus PES und PS zum Einsatz. Die nachfolgende Tab. 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Hohlfasermembranen und deren Kenngrößen (Membrana GmbH, Wuppertal). Der Membrantyp MicroPES steht zudem noch als Flachmembran mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  zur Verfügung (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen), welcher bevorzugt bei REM-Analysen von oberflächenaktivierten Membranen eingesetzt wird.

Aufgrund der breit gefächerten Einsatzbereiche bei der Bearbeitung biotechnologischer Fragestellungen ist es vorteilhaft, auf einen Pool verschiedener Hohlfasermembrantypen mit

variierenden Kennzahlen (Porengröße, Durchmesser) zurückgreifen zu können. Somit besteht die Möglichkeit, entsprechende Membrantypen und deren Eigenschaften gezielt und problemorientiert für ausgewählte Fragestellungen einzusetzen.

**Tab. 4:** Verwendete Hohlfasermembranen und deren Kenngrößen

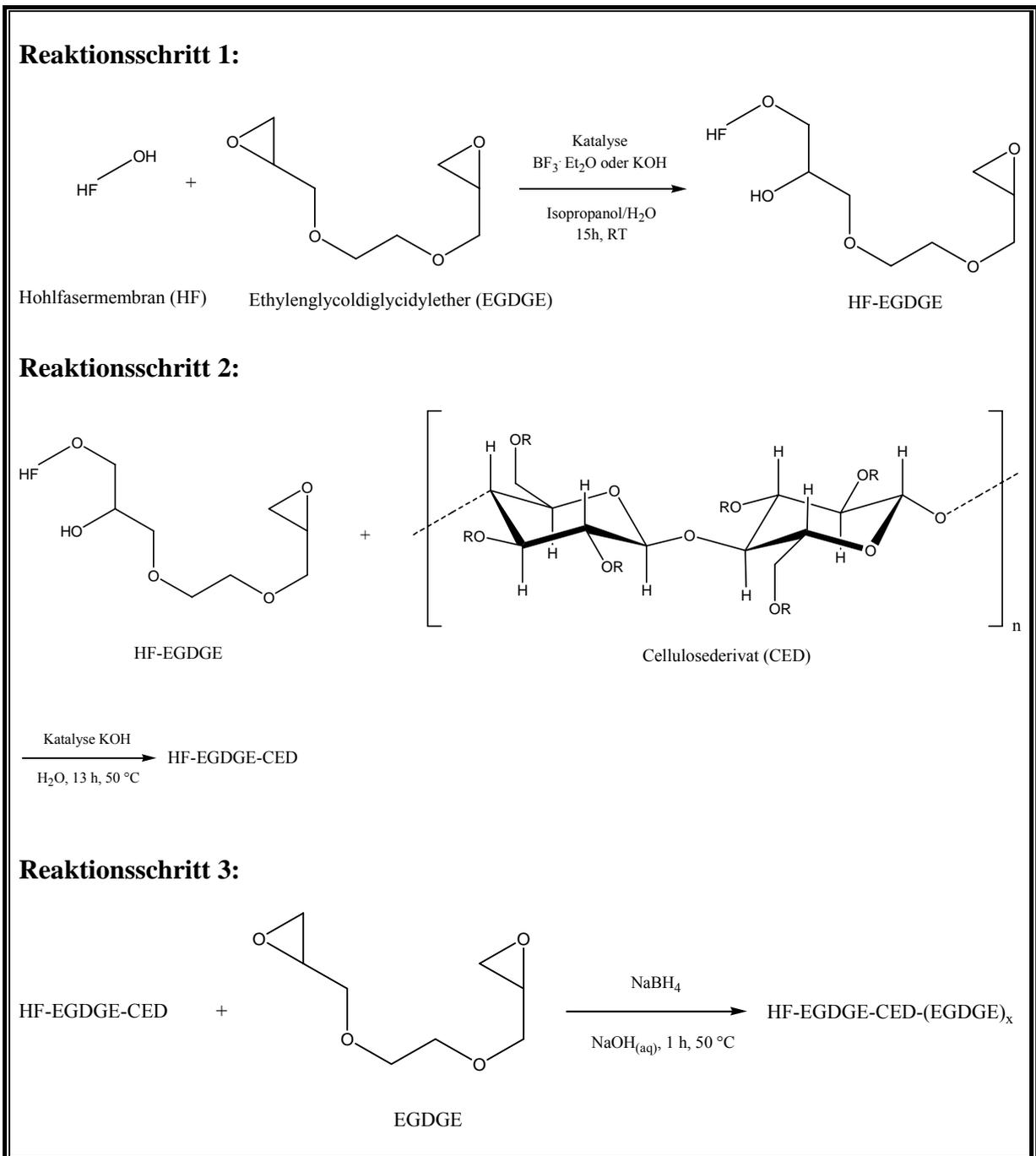
Membrantyp	Polymer	Porengröße *	Innerer / Äußerer Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]
1. MicroPES	Polyethersulfon	0,2 $\mu\text{m}$	300 / 500
2. UltraPES	Polyethersulfon	70 kDa	700 / 1000
3. High Flux	Polysulfon	30 kDa	200 / 280
4. Low Flux	Polysulfon	5 kDa	200 / 280

\* Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Bubble-Point-Messung (Blasentest) an Ultrafiltrationsmembranen (2-4) werden in der Regel Kennzahlen zum MWCO angegeben, um die Porengröße zu beschreiben.

### 3.1.2 Grundaktivierung der Basismembran zur Anbindung von Liganden

Die Oberfläche der Hohlfasermembranen aus PES bzw. PS weist herstellungsbedingt eine geringe Anzahl an terminalen Hydroxygruppen auf. Es wird hier deshalb von einer unzureichend aktivierten Membranoberfläche gesprochen. Außerdem ist sie hydrophob, was zum Einen das Problem des Membranfoulings verstärkt und zum Anderen die Problematik nach sich zieht, dass die Membran nicht ausreichend mit wässrigen Reaktionslösungen benetzt werden kann und ein Arbeiten mit organischen Lösungsmitteln in den ersten Reaktionsschritten unabdingbar macht.

Um die Basishohlfasermembran in Form von PES bzw. PS für nachfolgende Ligandenanbindungen zu aktivieren, dient das in Abb. 4 dargestellte Reaktionsschema als Grundlage für die Durchführung der Grundaktivierung (Reaktionsschritte 1-3). Die Strategie dieser Grundaktivierung beinhaltet die Entwicklung einer Syntheseroute, bei der die chemisch inerte Basismembran verschiedenen Derivatisierungsreaktionen unterzogen wird, um eine aktivierte, hydrophile Membranoberfläche zu generieren. Dies wird durch sog. hydrophiles, kovalentes Coating realisiert [Klein, 2000], [Klein et al., 1994], [Hochuli, 1988], [Sundberg et al., 1974].



**Abb. 4:** Reaktionsschema der Grundaktivierung der Basishohlfasermembran aus Polyethersulfon bzw. Polysulfon zur Anbindung von Liganden.

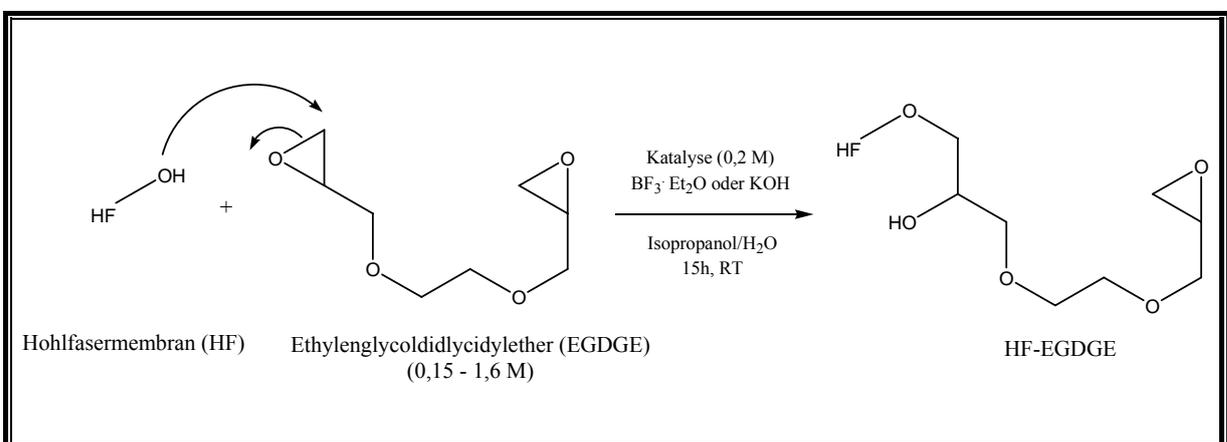
Dabei werden im Reaktionsschritt 1 die terminalen Hydroxygruppen des Funktionspolymers mit einem Diepoxid (Ethylenglycoldiglycidylether, EGDGE) umgesetzt, wobei neben unterschiedlichen Epoxykonzentrationen auch unterschiedliche Katalysebedingungen untersucht worden sind (Kap. 3.1.2.1). Im zweiten Reaktionsschritt werden an die generierten Epoxygruppen kovalent Cellulosederivate (CED) gebunden, wodurch eine Vervielfältigung

der Hydroxygruppen stattfindet und der Grad der Hydrophilie entscheidend erhöht wird. Die Immobilisierung verschiedener Cellulosederivate in der Form von zwei Hydroxyethylcellulose-Molekülen („Polyquaternium 10“ und „Cellosize WP-40“), mikrokristalliner Cellulose sowie Methylcellulose an Epoxyhohlfasermembranen werden in dem Kap. 3.1.2.2 näher betrachtet. Mittels zweiter Epoxidierungsreaktion (Reaktionsschritt 3) wird final eine Epoxyhohlfasermembran geschaffen, die in nachfolgenden Reaktionen mit verschiedenen bifunktionellen Aminderivaten umgesetzt werden kann, um diverse Ligandensysteme auf der Hohlfaseroberfläche zu generieren. Der Einfluss unterschiedlicher EGDGE-Konzentrationen auf die finale Beladungsdichte gebundener Epoxyfunktionen ist in Kap. 3.1.2.3 beschrieben. Alle Optimierungen in Bezug zur Grundaktivierung sind basierend auf dem Hohlfasermembrantyp UltraPES durchgeführt worden.

Nach der Übertragbarkeit des optimierten Protokolls der Grundaktivierung auf die weiteren zur Verfügung stehenden Hohlfasermembrantypen (MicroPES, High Flux PS und Low Flux PS) haben abschließende Untersuchungen in Form von REM-Analysen und BET-Messungen stattgefunden, um Aussagen im Hinblick auf die Struktur, Verteilung und Größe der Membranporen machen zu können (Kap. 3.1.2.4-3.1.2.6).

### 3.1.2.1 Kupplung des Diepoxids EGDGE an die Basishohlfasermembran

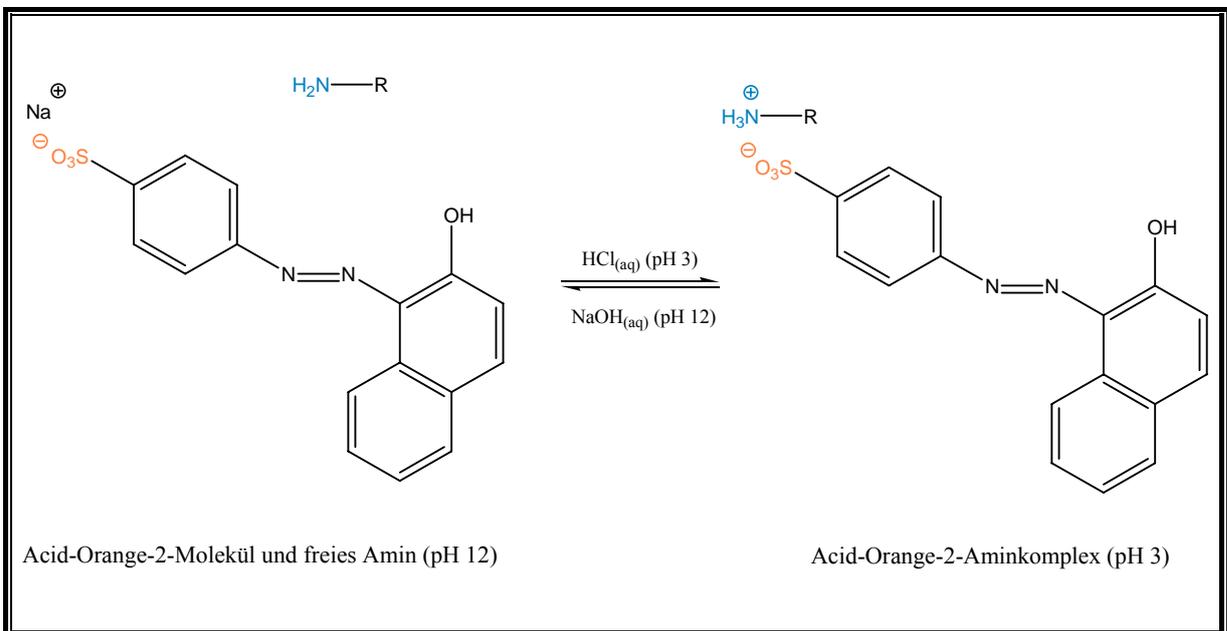
In Reaktionsschritt 1 reagieren die terminalen Hydroxygruppen der Basishohlfasermembran aus PES bzw. PS mit dem Diepoxid EGDGE (Abb. 5).



**Abb. 5:** Anbindung des Diepoxid-Linkers an die Basismembran.

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Basishohlfasermembran hat sich die Verwendung eines Isopropanol/Wasser-Azeotrops als zweckmäßig erwiesen, weil es die Grenzflächenspannung zwischen hydrophober Membranoberfläche und Agens verringert. Der reaktive Epoxy-Dreiring wird durch die Hydroxygruppe der Membran nukleophil geöffnet. Mechanistisch handelt es sich um eine bimolekulare nukleophile Substitution ( $S_N2$ ). Die Reaktionsgeschwindigkeit lässt sich steigern, indem katalytische Mengen Säure oder Base verwendet werden. Lewis-Säuren verringern die Elektronendichte am Epoxy-Kohlenstoff, wohingegen Lewis-Basen die Nukleophilie des Hydroxy-Sauerstoffs erhöhen. Neben unterschiedlichen EGDGE-Konzentrationen werden auch unterschiedliche Katalysebedingungen durch Zugabe von Bortrifluorid-Etherat (saure Katalyse) oder Kalilauge (basische Katalyse) getestet [Klein et al., 1994].

Die Anzahl der auf der Membranoberfläche generierten Epoxygruppen wird indirekt mittels des Acid-Orange-2-Tests (AO2-Test) bestimmt. Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der ein Farbstoffmolekül mit Aminen ionisch wechselwirkt (Abb. 6).



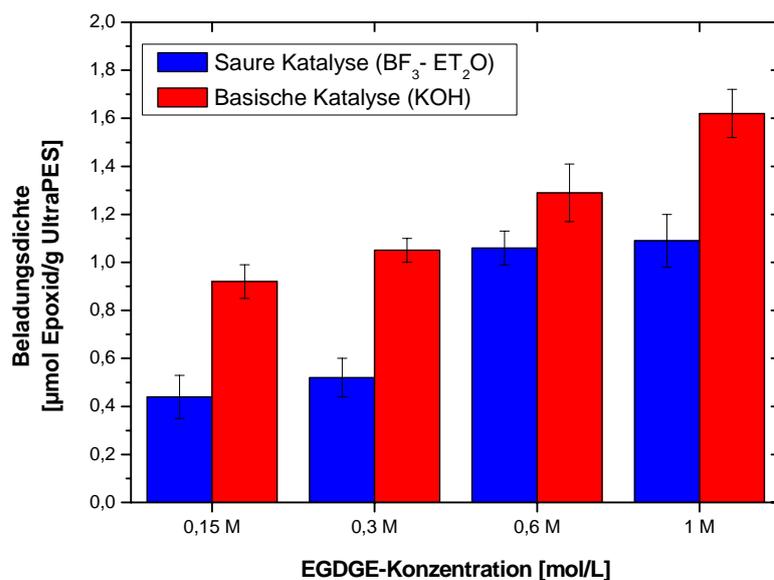
**Abb. 6:** Säure-Base-Gleichgewicht des Acid-Orange-2-Farbstoffmoleküls.

Für die Detektion der Epoxyfunktionen müssen diese daher zunächst mit Ammoniak aminiert werden [Albrecht et al., 2003]. Für den zu ermittelnden Blindwert fällt der Aminierungsschritt weg (Erfassung des Hintergrundrauschens). Beim Inkubationsschritt bildet der Farbstoff bei pH 3 mit den Amingruppen der Membranoberfläche das

entsprechende Ammoniumsalz (Protonierung der Amine und Bildung des AO2-Amin-Komplexes). Der entscheidende Vorteil gegenüber anderen Nachweisreagenzien auf Amine (z.B. Ninhydrin [Zhu et al., 2002]) liegt darin, dass AO2-Farbstoffmoleküle reversibel in Abhängigkeit vom pH-Wert an der Membran binden. Erfolgt ein pH-Shift auf pH 12, entsteht durch Deprotonierung das freie Amin und der immobilisierte Farbstoff wird von der Membran gelöst. Die Absorption der Lösung wird photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 483 \text{ nm}$  bestimmt. Auf Basis der durch die Anzahl der Wechselwirkungen zwischen Aminfunktionen und AO2-Farbstoffmolekülen vermittelten Absorptionsänderung lässt sich die Anzahl der Aminfunktionen und damit indirekt die der Epoxygruppen berechnen (Kap. 6.6.1). Bei der Bewertung des Amingehaltes wird angenommen, dass eine Amingruppe mit einem AO2-Molekül komplexiert wird. Amide werden nicht angefärbt [Santoso, 2004], [Uchida et al., 1993].

Die im Folgenden angegebenen Fehlerintervalle in Bezug zu Resultaten des AO2-Tests wurden anhand von Dreifachbestimmungen ermittelt. Eine detaillierte Beschreibung zur Durchführung des AO2-Tests ist im Anhang (Kap. 6.6.1) zu finden.

In der Abb. 7 sind die Ergebnisse des AO2-Tests in Bezug zur ersten Epoxidierungsreaktion, bei der sowohl der Einfluss unterschiedlicher EGDGE-Konzentrationen als auch unterschiedlicher Katalysebedingungen getestet worden sind, dargestellt.



**Abb. 7:** Beladungsdichten nach der ersten Epoxidierung (Reaktionsschritt 1) bei Variation der Epoxykonzentrationen und Katalysebedingungen.

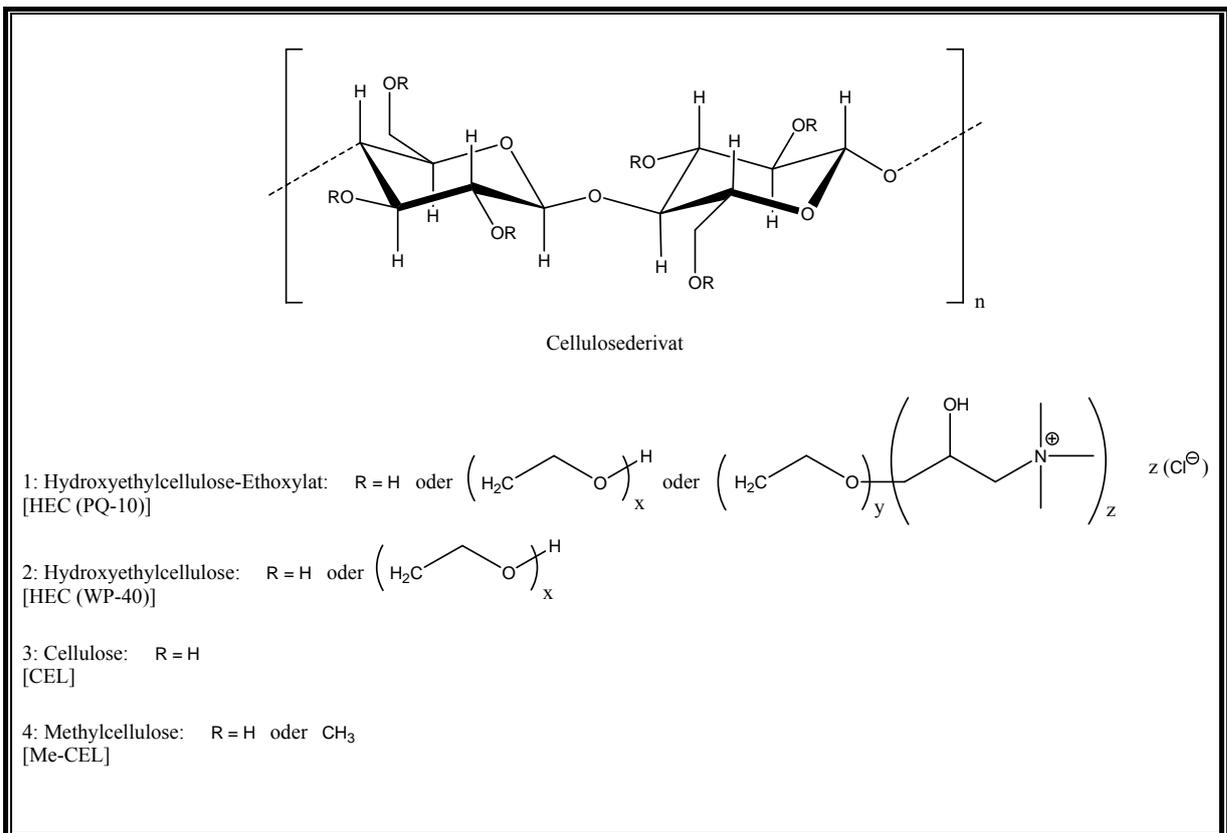
Sowohl beim Einsatz von  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  als auch von KOH als Katalysator werden mit ansteigenden EGDGE-Konzentrationen auch erhöhte Epoxybeladungsdichten erreicht. Der Vergleich beider Katalysebedingungen zeigt auf, dass die Verwendung einer basischen Katalyse (KOH) eine 1,2- bis 2,1-fache Erhöhung der Epoxybeladung pro g UltraPES in Abhängigkeit von den eingesetzten EGDGE-Konzentrationen liefert. Es ist hier jedoch anzumerken, dass nach durchgeführter Inkubation beim Einsatz von höher konzentrierten EGDGE-Reaktionslösungen ( $\geq 1 \text{ M}$ ) deutliche Beschädigungen der Membranoberfläche und Verformungen des Hohlfasermembranmaterials entstanden sind, so dass bei nachfolgenden Membranmodifizierungen in Schritt 1 milde Reaktionsbedingungen gewährleistet werden müssen. Die Methode der Wahl beim ersten Reaktionsschritt ist die basisch katalysierte Diepoxid-Kupplung unter Verwendung einer 0,3 M EGDGE-Reaktionslösung, wobei eine Epoxybeladung von  $1,05 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$  UltraPES-Hohlfaser erzielt worden ist. Entsprechende REM-Aufnahmen belegen, dass unter diesen Reaktionsbedingungen keine Beschädigung des Fasermaterials sowie keine Beeinträchtigung der Porenstruktur stattfinden (siehe Kap. 3.1.2.6).

Weiterführende Untersuchungen zur eingesetzten Katalysatorkonzentration (KOH) haben ergeben, dass im Bereich von 0,1-1 M zugegebener KOH keine signifikanten Änderungen der Epoxybeladung konstatiert werden konnten, so dass in Übereinstimmung mit Literaturdaten für nachfolgende Membranmodifizierungen standardmäßig eine 0,2 M KOH-Lösung verwendet wird [Klein et al., 1994].

### 3.1.2.2 Immobilisierung von Cellulosederivaten an Epoxymembranen

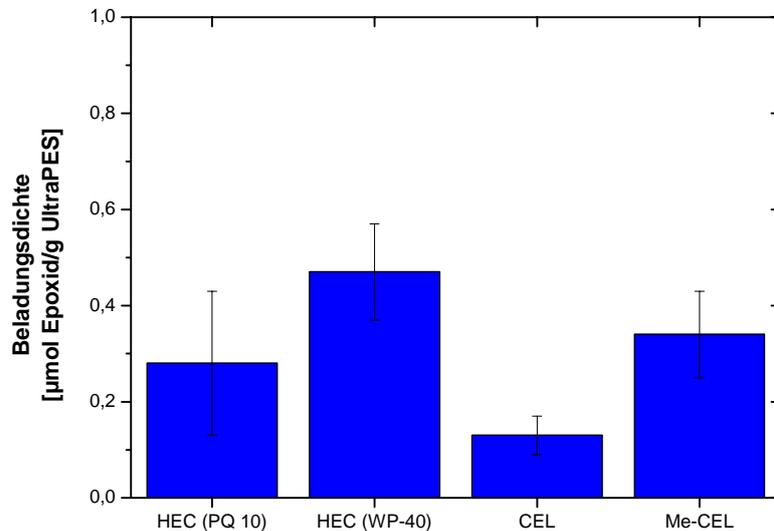
In Reaktionsschritt 2 wird die kovalente Immobilisierung verschiedener Cellulosederivate über Diepoxid-Linker an UltraPES-Hohlfasermembranen untersucht. Getestet werden Cellulosederivate in der Form von Hydroxyethylcellulose-Ethoxylat (PQ 10), Hydroxyethylcellulose (Cellosize WP-40), nicht modifizierte Cellulose und Methylcellulose (Abb. 8, 1-4). Durch die Anbindung der Cellulosemoleküle können zum Einen zahlreiche endständige Hydroxygruppen generiert werden, was zu einer entscheidenden Erhöhung der Oberflächenaktivität führt. Zum Anderen resultiert daraus die gewünschte erhöhte Hydrophilie, so dass nachfolgende Modifikationen in polaren Lösemitteln (z.B. Wasser, Methanol) durchgeführt werden können [Ausar et al., 2005], [Ruckenstein et al., 2004].

Die Anbindung der verschiedenen Cellulosederivate erfolgt über die Hydroxygruppen der im Überschuss eingesetzten Zuckermoleküle bei 50 °C. Die Reaktion wird entsprechend zu Reaktionsschritt 1 durch KOH katalysiert.



**Abb. 8:** Eingesetzte Cellulosederivate bei der Durchführung des hydrophilen Coatings.

Um die nicht umgesetzten Epoxygruppen nach Ankopplung der Cellulosederivate zu bestimmen, werden die entsprechenden aminierten Hohlfasermembranen bzw. die nicht-aminieren Membranen für die Blindprobe mittels AO2-Test analysiert. Wie erwartet werden bei allen Syntheserouten der Zuckeranopplung niedrigere Epoxybeladungsdichten (Faktor 2,2-8,1) als im Vergleich zum ersten Reaktionsschritt detektiert (Abb. 9). In Bezug zu den eingesetzten Cellulosederivaten liegen die Werte der nicht umgesetzten Epoxygruppen zwischen 0,47 und 0,13  $\mu\text{mol/g}$  UltraPES.



**Abb. 9:** Bestimmung der nicht umgesetzten Epoxygruppen bei der Immobilisierung verschiedener Cellulose-derivate in Reaktionsschritt 2.

Der direkte Nachweis gebundener Cellulose-derivate auf der Membranoberfläche wird nach einem kalorimetrischen Verfahren, basierend auf der Methode von DuBois et al., durchgeführt [DuBois et al., 1956]. Dabei bilden Zucker und ihre Derivate mit Schwefelsäure und Phenol beständige gelb-orangene Farbkomplexe, deren Farbintensität proportional zur Menge des Zuckerderivates in der Probe ist. Die Probe wird mit Phenol-Lösung (80 %) und konz. Schwefelsäure versetzt. Di-, Oligo- und Polysaccharide werden zunächst durch die Schwefelsäure hydrolysiert, um die entstehenden Monosaccharide durch Dehydratisierung in Furfuralderivate zu überführen. Die Färbung beruht auf der Bildung eines Komplexes aus je zwei Phenolringen und dem Furfuralderivat. Mit Hilfe dieses empfindlichen und schnellen Schwefelsäure-Phenol-Tests wird der Anteil der auf der Membran gebundenen Cellulose-moleküle photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 490 \text{ nm}$  bestimmt. Die im Folgenden angegebenen Fehlerintervalle sind anhand von Zweifachbestimmungen ermittelt worden. Eine detaillierte Beschreibung zur Durchführung des Phenol-Schwefelsäure-Tests ist im Anhang (Kap. 6.6.2) zu finden.

Die Ergebnisse bezüglich der Cellulose-Beladungsdichten für die vier untersuchten Syntheserouten zur Herstellung hydroxyaktivierter UltraPES-Hohlfasermembranen sind in der Tab. 5 zusammengefasst.

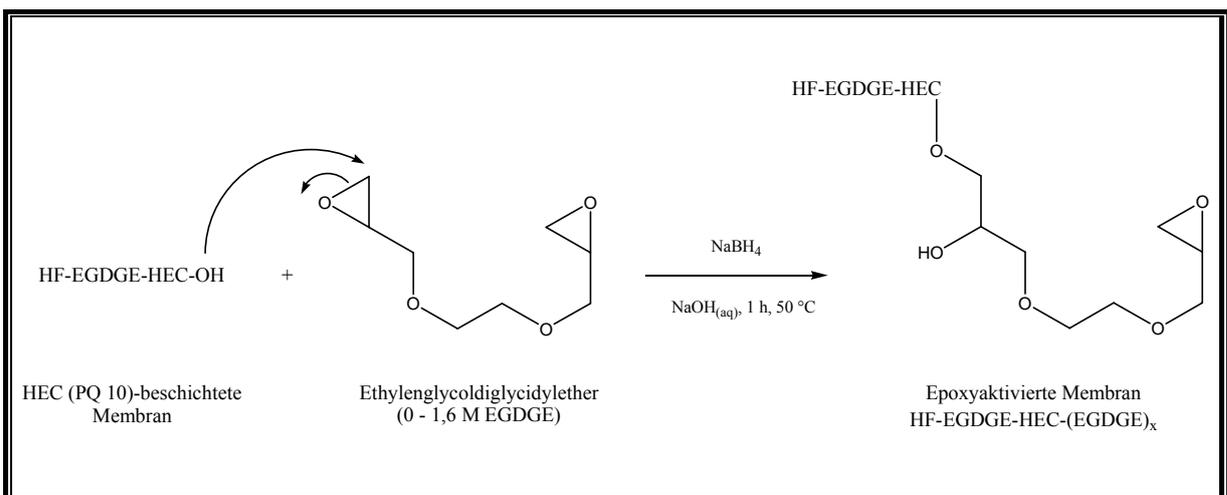
**Tab. 5:** Ergebnisse des Phenol-Schwefelsäure-Tests nach Immobilisierung verschiedener Cellulosederivate

Cellulosederivat	Molekulargewicht [Da]	Beladungsdichte [mg/g UltraPES]	Beladungsdichte [ $\mu\text{mol/g}$ UltraPES]
HEC (PQ 10)	574	$14,33 \pm 2,55$	$24,96 \pm 4,44$
HEC (WP-40)	$\sim 123.000$	$17,37 \pm 2,23$	$0,14 \pm 0,02$
CEL	$\sim 35.640$	$5,01 \pm 0,53$	$0,14 \pm 0,01$
Me-CEL	$\sim 63.000$	$34,21 \pm 5,56$	$0,54 \pm 0,09$

Neben den ermittelten Beladungsdichten gebundener Cellulosemoleküle ist im Hinblick auf die Erreichbarkeit der Poren der Hohlfasermembranoberfläche das Molekulargewicht der eingesetzten Cellulosederivate ein wichtiger Aspekt. Durch den Einsatz der verwendeten Polysaccharide (HEC-WP-40, CEL, Me-CEL) besteht die Möglichkeit der sterischen Hinderung, so dass zum Einen eine Verblockung der Poren auftreten kann und zum Anderen gebundene Cellulosemoleküle schwer zugänglich für nachfolgende Derivatisierungsreagenzien sein können. Zudem soll das optimierte Protokoll der Grundaktivierung auf weitere Hohlfasermembrantypen mit geringeren Porengrößen in der Form von High Flux PS (30 kDa) und Low Flux PS (5 kDa) übertragen werden, was eine Verwendung des Oligosaccharids HEC (PQ 10) mit relativ niedrigem Molekulargewicht favorisiert. Die mit diesem Funktionspolymer beschichteten UltraPES-Hohlfasermembranen weisen eine deutlich erhöhte Anzahl an Hydroxygruppen ( $24,96 \pm 4,44 \mu\text{mol HEC-PQ 10/g UltraPES}$ ) auf und dienen als Ausgangsmaterial für die nachfolgende zweite Epoxidierungsreaktion in Reaktionsschritt 3. Eine Langzeitstabilitätsanalyse ergibt, dass die getrockneten und bei Raumtemperatur gelagerten Hohlfasermembranen (HEC-PQ 10-beschichtet) mindestens acht Wochen stabil sind.

### 3.1.2.3 Generierung einer epoxyaktivierten Matrixhohlfasermembran

Die Reaktion in Reaktionsschritt 3 ist vergleichbar mit dem Reaktionsschritt 1. Es reagieren die Hydroxygruppen des Funktionspolymers mit dem Diepoxid EGDGE [Rodriguez-Tenreiro et al., 2006], [Rodriguez et al., 2003].



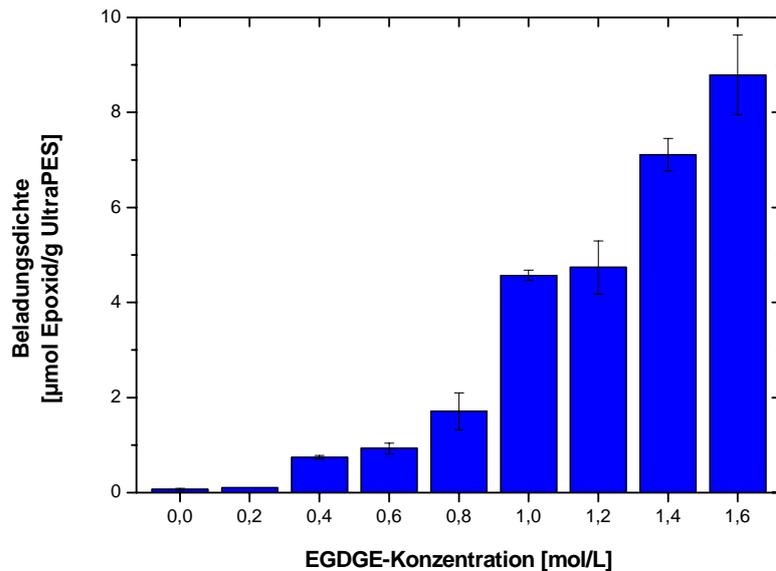
**Abb. 10:** Ankopplung von EGDGE an die Hydroxygruppen der beschichteten HEC (PQ 10)-Membran.

Die Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung polymerer Zucker ist durch stereoelektronische Effekte besonders stabilisiert, so dass die direkte Modifikation schwer zugänglich ist. Daher werden die nukleophilen Eigenschaften der Hydroxygruppe genutzt. Diepoxid-Linker werden gekuppelt, um neue reaktive Seitenketten zu erzeugen (Abb. 10). Diese können sich auf der Membranoberfläche ausrichten und sind daher sterisch weniger abgeschirmt.

Um möglichst hohe Epoxybeladungsdichten im finalen Schritt der Grundaktivierung zu erhalten, werden verschiedene Diepoxid-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 1,6 M EGDGE (gelöst in 0,4 M NaOH) analysiert. Natriumborhydrid verhindert zwar die bei 50 °C auftretende Oxidation des Diepoxids, trotzdem muss die Reaktionszeit auf eine Stunde limitiert werden, damit das Agens EGDGE im alkalischen Medium nicht in sein Glykol hydrolysiert [Klein et al., 1994].

Die Abb. 11 zeigt die Resultate des AO<sub>2</sub>-Tests nach finalen Reaktionsschritt der Grundaktivierung (zweite Epoxidierungsreaktion) bei Verwendung unterschiedlicher Agens-Konzentrationen. Erwartungsgemäß steigen die Epoxybeladungsdichten beim Einsatz ansteigender EGDGE-Konzentrationen an, wobei ein maximaler Bedeckungsgrad an Epoxygruppen von  $8,79 \pm 0,84 \mu\text{mol/g}$  UltraPES bei Verwendung einer 1,6 M Reaktions-

lösung erreicht worden ist. Nachfolgende Diepoxid-Kupplungen werden deshalb in einem 1:1-Gemisch von 0,4 M NaOH und technischem EGDGE (entspricht einer Konzentration von 1,6 M des Diepoxids) ausgeführt.



**Abb. 11:** Beladungsdichten von epoxyaktivierten UltraPES-Hohlfasermembranen nach Reaktionsschritt 3 bei Variation der Reagenzkonzentration EGDGE.

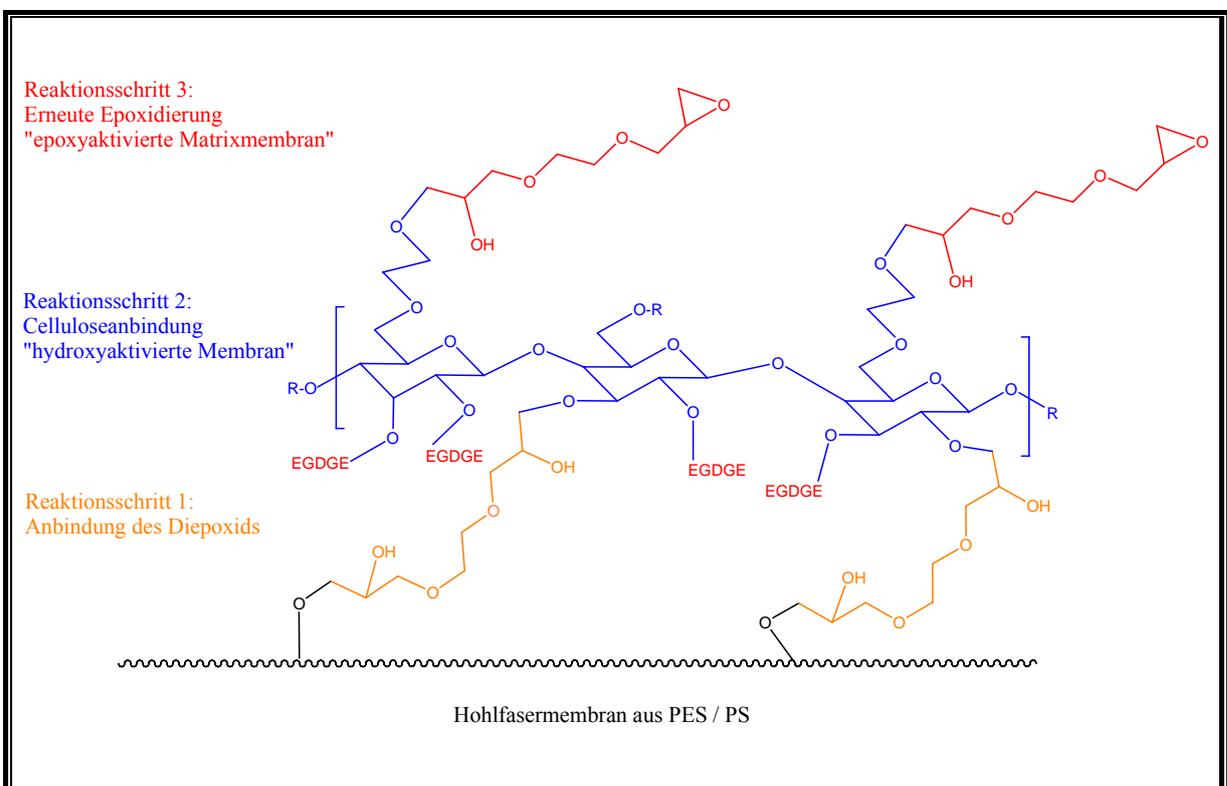
Nach Optimierung des Protokolls für die Grundaktivierung zur Synthese einer epoxyaktivierten Matrixhohlfasermembran am Beispiel des Hohlfasertyps UltraPES soll nachfolgend das entwickelte Standardprotokoll auf weitere Hohlfasermembrantypen aus PES und PS (MicroPES, High Flux und Low Flux) übertragen werden. Zudem werden Untersuchungen in der Form von REM- und BET-Analysen nach jedem Reaktionsschritt der Grundaktivierung durchgeführt, um sowohl Aussagen hinsichtlich der Membranoberflächenstruktur als auch über charakteristische Größen in Bezug zu den Membranporen (Porengröße, Porenvolumen) treffen zu können (Kap. 3.1.2.4).

#### **3.1.2.4 Übertragbarkeit des optimierten Modifikationsprotokolls der Grundaktivierung auf verschiedene Hohlfasermembrantypen**

Für den angestrebten Einbau modifizierter Hohlfasermembranen in das System MHFR (Kap. 3.3 und 3.4) hat sich bei der Übertragbarkeit des Protokolls der Grundaktivierung auf die

verschiedenen Hohlfasertypen das Arbeiten mit losen Faserbündeln á 9 cm in 50 mL-Reaktionsröhrchen als zweckmäßig erwiesen. Zur besseren Veranschaulichung des entwickelten und optimierten Protokolls der Grundaktivierung dient das in Abb. 12 dargestellte Syntheschema. Dabei wird die hydrophobe Basismembran aus PES bzw. PS in drei Reaktionsschritten in eine epoxyaktivierte Matrixmembran mit einem hydrophilen und zugleich auch reaktiven Charakter überführt:

- Schritt 1: Reaktion der endständigen Hydroxygruppen der Basismembran mit dem Diepoxid-Linker EGDGE
- Schritt 2: Kovalente Anbindung des Cellulosederivates (HEC-PQ 10) an die generierten Epoxygruppen zur Herstellung einer hydrophilen, hydroxyaktivierten Membran
- Schritt 3: Erneute Epoxidierungsreaktion (EGDGE) zur Synthese einer epoxyaktivierten Matrixhohlfasermembran



**Abb. 12:** Syntheschema des schrittweisen Aufbaus einer epoxyaktivierten Matrixhohlfasermembran.

Durch Einsatz des Spacermoleküls in Form des Diepoxid-Linkers EGDGE in Reaktionsschritt 1 und 3 können nachfolgende Kupplungsreaktionen in einer sterisch ungehinderten Form realisiert werden. Alternative Linker-Moleküle auf Diepoxidbasis mit variierender Kettenlänge sind 1,3-Butandiol diglycidylether, 1,4-Butandiol diglycidylether sowie Diethylenglycol diglycidylether [Sundberg et al., 1974].

Tab. 6 zeigt die Resultate der Beladungsdichten pro Membranmasse (g) nach jedem Reaktionsschritt der Grundaktivierung für die zur Verfügung stehenden Hohlfasertypen in der Form von MicroPES, UltraPES, High Flux PS und Low Flux PS. Je nach Hohlfasermembran werden nach dem ersten Reaktionsschritt Epoxybeladungsdichten zwischen 0,33 und 0,58  $\mu\text{mol/g}$  Hohlfaser erreicht. Deutlich erkennbar ist bei jedem der vier Membrantypen die Abnahme der Epoxyaktivität in Reaktionsschritt 2 sowie die Zunahme um ein Vielfaches in Reaktionsschritt 3, wobei die Epoxybeladungen je nach Membrantyp zwischen 7,33 und 10,30  $\mu\text{mol/g}$  Hohlfasermembran liegen. Im Vergleich zu der epoxyaktivierten Basismembran nach Reaktionsschritt 1 werden um den Faktor 16 bis 22 höhere Epoxybeladungsdichten im finalen Schritt der Grundaktivierung erreicht. Die Vervielfältigung der reaktiven Gruppen basiert auf der Immobilisierung des Cellulosederivates HEC (PQ 10), wobei je nach Membrantyp HEC-Beladungsdichten von 9,86 bis 14,33 mg/g Hohlfaser erzielt worden sind. Es besteht die Möglichkeit, dass sich nicht alle Epoxygruppen auf der Hohlfaseroberfläche an erreichbaren Stellen der Membranporen befinden, so dass HEC-Moleküle nicht anbinden können, wodurch sich die geringen Werte der Epoxybeladungen nach Schritt 2 erklären lassen. Terminal gebundene Epoxygruppen können vor Durchführung des AO2-Tests bereits in ihre Diol-Form hydrolysiert sein, so dass die totalen Epoxykonzentrationswerte im Vergleich zu den ermittelten Werten höher einzuschätzen sind. Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass sich die Membrantypen hinsichtlich der massenbezogenen Beladungen nur graduell unterscheiden.

Bei der Analyse der Beladungskapazitäten bezogen auf das Membranvolumen ( $\text{cm}^3$ ) ist in Tab. 7 deutlich zu erkennen, dass final die höchsten Epoxybeladungen mit dem Membrantyp MicroPES erreicht werden konnten ( $1,33 \pm 0,18 \mu\text{mol/cm}^3$ ). Die Frage nach der Ursache für die höheren Werte bei MicroPES-Membranen wird durch die unterschiedlichen Membraneigenschaften beantwortet. MicroPES-Hohlfasern sind mikroporös und ermöglichen im Vergleich zu mesoporösen PS-Membranen (High Flux und Low Flux) einen schnelleren diffusiven Stofftransport der Reagenzien zu den aktiven Zentren. Auf die Charakteristika der

MicroPES-Membranoberfläche und deren Veränderung nach jedem Syntheseschritt der Grundaktivierung wird im nachfolgenden Kap. 3.1.2.5 näher eingegangen.

**Tab. 6:** Gegenüberstellung der Beladungsdichten pro Membranmasse nach jedem Reaktionsschritt der Grundaktivierung

Hohlfasermembrantyp (Porengröße)	Beladungsdichte [ $\mu\text{mol}$ bzw. mg funktionelle Gruppen / g HF]			
	Schritt 1	Schritt 2		Schritt 3
	$\mu\text{mol}$ Epoxid	$\mu\text{mol}$ Epoxid	mg HEC (PQ 10)	$\mu\text{mol}$ Epoxid
MicroPES (0,2 $\mu\text{m}$ )	$0,48 \pm 0,09$	$0,10 \pm 0,13$	$11,80 \pm 2,41$	$8,96 \pm 1,21$
UltraPES (70 kDa)	$0,33 \pm 0,12$	$0,12 \pm 0,04$	$14,33 \pm 2,55$	$7,35 \pm 0,52$
High Flux (30 kDa)	$0,46 \pm 0,13$	$0,30 \pm 0,16$	$9,86 \pm 2,37$	$7,33 \pm 0,63$
Low Flux (5 kDa)	$0,58 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,06$	$11,24 \pm 2,45$	$10,30 \pm 0,65$

**Tab. 7:** Vergleich der Beladungsdichten pro Membranvolumen nach jedem Schritt der Syntheseroute der Grundaktivierung

Hohlfasermembrantyp (Porengröße)	Beladungsdichte [ $\mu\text{mol}$ bzw. mg funktionelle Gruppen / $\text{cm}^3$ HF]			
	Schritt 1	Schritt 2		Schritt 3
	$\mu\text{mol}$ Epoxid	$\mu\text{mol}$ Epoxid	mg HEC (PQ 10)	$\mu\text{mol}$ Epoxid
MicroPES (0,2 $\mu\text{m}$ )	$0,07 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,02$	$1,76 \pm 0,36$	$1,33 \pm 0,18$
UltraPES (70 kDa)	$0,05 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$	$2,15 \pm 0,38$	$1,10 \pm 0,08$
High Flux (30 kDa)	$0,05 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,02$	$1,09 \pm 0,26$	$0,81 \pm 0,07$
Low Flux (5 kDa)	$0,07 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$1,26 \pm 0,28$	$1,15 \pm 0,07$

Eine alternative Funktionalisierungsstrategie zur Aktivierung von PES/PS-Membranen besteht in der Anwendung der heterogenen Lithiierung durch Einsatz von n-Butyllithium.

Durch Addition verschiedener elektrophiler Gruppen an aktivierte Li-Membranen kann ein breites Spektrum modifizierter Affinitätsmembranen realisiert werden [Guiver et al., 1993], [Breitbach et al., 1991]. Auf den Einsatz dieser Methode ist jedoch im Hinblick auf die aufwendigen sicherheitstechnischen Anforderungen im Handling metall-organischer Verbindungen im Rahmen dieser Arbeit verzichtet worden.

### 3.1.2.5 BET-Charakterisierung der Membranoberfläche

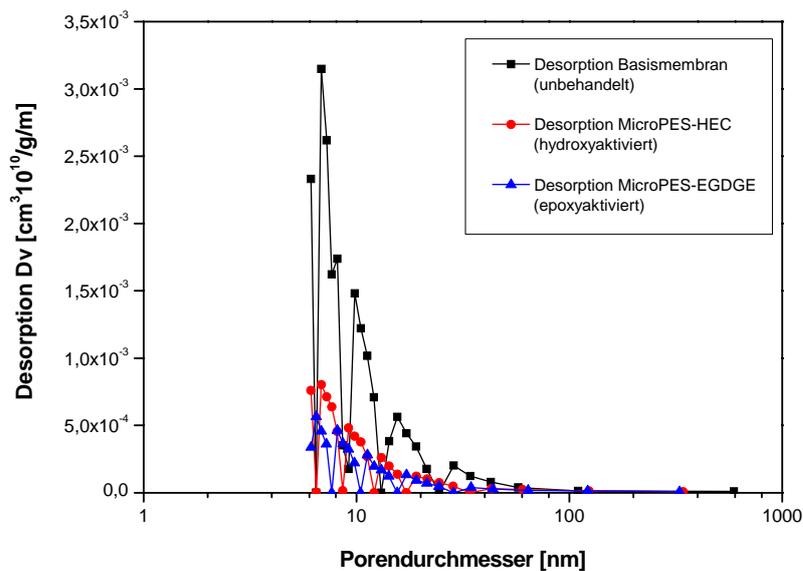
In diesem Abschnitt wird die Oberflächenstruktur ausgewählter, modifizierter MicroPES-Hohlfasermembranen mit Hilfe von Stickstoff-Desorptionsisothermen untersucht. Die Messungen werden automatisiert am Gerät Autosorb-1 der Firma Quantachrome durchgeführt. Unter Verwendung der Gleichung von Brunauer, Emmett und Teller (BET) werden mit der Software „Autosorb for Windows (Version 1.19.22)“ charakteristische Größen der Membranoberflächen bestimmt. Um die Veränderung der Oberflächenstruktur einordnen zu können, wird als Referenz eine unbehandelte Basismembran aus PES vermessen. In der Tab. 8 sind BET-Oberfläche und Porenvolumen der untersuchten Membranen zusammengefasst.

**Tab. 8:** Untersuchung modifizierter MicroPES-Hohlfasermembranen mittels BET-Analyse

Probe	Seitenkette	BET-Oberfläche [m <sup>2</sup> /g MicroPES]	Porenvolumen [cm <sup>3</sup> /g MicroPES]
Basismembran (unbehandelt)	-----	42,88	0,06874
MicroPES-HEC (hydroxyaktiviert)	-OH	16,10	0,02854
MicroPES-EGDGE (epoxyaktiviert)	Diepoxid-Linker	17,81	0,02450

Das gebundene Funktionspolymer führt je nach Modifikation zu einem prozentualen Rückgang der Porenvolumina um 58 bzw. 64 %. Die damit verbundene Abnahme der BET-Oberfläche liegt zwischen 58 und 62 %. Die Anbindung der HEC-Moleküle in Reaktionsschritt 2 und die Diepoxid-Kupplung in Schritt 3 verringern wie erwartet das Porenvolumen. Weiterhin ist festzuhalten, dass die epoxyaktivierte Matrixmembran verglichen mit der hydroxyaktivierten eine um etwa 10 % höhere BET-Oberfläche aufweist.

Wie die graphische Darstellung in Abb. 13 verdeutlicht, wirken sich die Modifikationen nicht auf die Porengrößenverteilung aus. Des Weiteren bleiben die mikroporösen Eigenschaften mit Porendurchmesser zwischen 6 und 200 nm erhalten. Die spezifische Trenngrenze des Membrantyps MicroPES von 200 nm wird demnach nicht durch das angewendete Protokoll der Grundaktivierung beeinflusst.

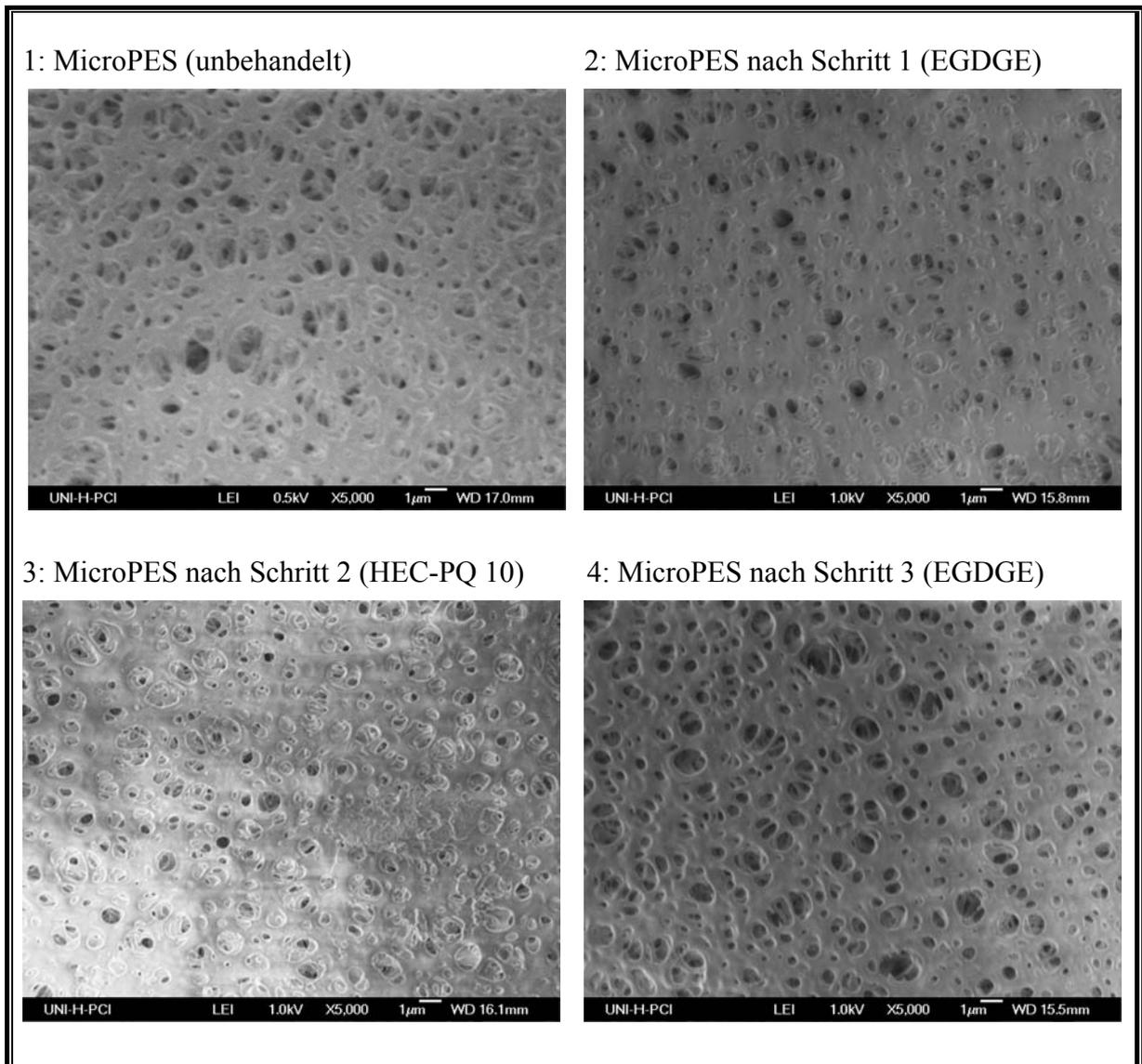


**Abb. 13:** Darstellung der Porengrößenverteilung von modifizierten MicroPES-Membranen bei der Grundaktivierung im Vergleich zur unbehandelten Basismembran.

### 3.1.2.6 REM-Untersuchungen der Membranoberflächenstruktur

Neben den Ergebnissen, welche auf entsprechenden BET-Messungen (BET-Oberfläche, Porenvolumen und Porengrößenverteilung) beruhen, können mittels REM-Analysen qualitative Aussagen über die Porenstruktur und -größe sowie über den Grad an Verblockungen der Poren gemacht werden. Für einen erfolgreichen Einsatz aktivierter Hohlfasermembranen in den Anwendungsbereichen Kultivierung und Downstream Processing (Kap. 3.2 bis 3.4) ist es essentiell, dass die jeweils angewendeten Reaktionsschritte der Grundaktivierung keine Beeinträchtigung der Porenstruktur nach sich ziehen. Die zu untersuchenden Membranen sind basierend auf dem oben dargestellten Standardprotokoll (Kap. 3.1.2.4) sowohl mit EGDGE als auch mit HEC (PQ 10) modifiziert worden. Die Abb. 14 zeigt entsprechende REM-

Aufnahmen nach jedem Reaktionsschritt der Grundaktivierung bei einer 5.000-fachen Vergrößerung.



**Abb. 14:** REM-Aufnahmen bei einer 5.000-fachen Vergrößerung von oberflächenaktivierten MicroPES-Flachmembranen nach jedem Reaktionsschritt der Grundaktivierung (2-4) im Vergleich zu einer unbehandelten Membran (1).

Die REM-Aufnahmen zeigen, dass das angewendete Standardprotokoll der Grundaktivierung zur Herstellung einer epoxyaktivierten Matrixmembran keine Beeinträchtigung der Porenstruktur nach sich zieht. Im Vergleich zur Referenz (unbehandelte Membran) kann die Porenverteilung als homogen beschrieben werden und es treten keine Verblockungen der Poren auf.

### 3.1.2.7 Zusammenfassung und Diskussion

Die nasschemische Modifikation von Hohlfasermembranen aus PES und PS (MicroPES, UltraPES, High Flux PS und Low Flux PS) in hydrophile, epoxyaktivierte Matrixmembranen lässt sich in drei Reaktionsschritten erfolgreich realisieren. Nach der Kupplung des Diepoxid-Linkers im ersten Reaktionsschritt liegen die Epoxybeladungen der vier Membrantypen zwischen 0,33 und 0,58  $\mu\text{mol/g}$  (0,05 und 0,07  $\mu\text{mol/cm}^3$ ). Aufgrund von Beschädigungen und Verformungen der Hohlfasermembran beim Einsatz von hoch konzentrierten EGDGE-Reaktionslösungen ( $\geq 1 \text{ M}$  gelöst in einem Isopropanol/Wasser-Azeotrop) werden im ersten Reaktionsschritt standardmäßig 0,3 M EGDGE-Lösungen unter Berücksichtigung von milden Reaktionsbedingungen verwendet. Weiterführende Analysen im Hinblick auf die Katalysebedingungen haben ergeben, dass dabei die basisch katalysierte Reaktion unter Verwendung von KOH eine um den Faktor 2 höhere Epoxybeladung pro Membranmasse im Vergleich zum Einsatz von  $\text{BF}_3$ -Etherat (saure Katalyse) liefert.

Im zweiten Reaktionsschritt werden die epoxyaktivierte Hohlfasern mit verschiedenen Cellulosederivaten in der Form des Oligosaccharids HEC-Ethoxylat (PQ 10) und den Polysacchariden HEC (Cellosize WP-40), Cellulose und Methylcellulose beschichtet. Aufgrund möglicher sterischer Hinderungen (Porenverblockung sowie eingeschränkte Zugänglichkeit nachfolgender Derivatisierungsreagenzien) beim Einsatz der hochmolekularen Polysaccharide ist auf die Verwendung von HEC (PQ 10) zurückgegriffen worden. Entsprechend beschichtete HEC-Hohlfasermembranen aus PES und PS weisen Beladungsdichten zwischen 9,86 und 14,33 mg/g Membranmaterial auf. Da auf der hydroxyaktivierten Matrixmembran weniger Epoxygruppen als nach dem ersten Reaktionsschritt nachweisbar sind, kann gefolgert werden, dass das Cellulosederivat HEC kovalent gebunden worden ist. Charakteristisch für die beschichteten Membranen ist die hydrophile Oberfläche, die im Vergleich zur unbehandelten Hohlfaser eine deutlich erhöhte Zahl an Hydroxygruppen aufweist. Nachfolgende Modifikationen können daher in polaren Solventien durchgeführt werden. Ferner sind die Fasern in getrockneter Form luftunempfindlich und lassen sich für weitere Synthesen problemlos mehrere Wochen bei RT aufbewahren.

Im dritten Reaktionsschritt der Grundaktivierung gelingt es, Diepoxid-Linker final an das Funktionspolymer zu koppeln. Entsprechend der hohen Hydroxyaktivität werden schon bei niedrigen Diepoxid-Konzentrationen (0,4 M) deutlich detektierbare Epoxybeladungen ( $0,74 \pm 0,04 \mu\text{mol/g}$ ) erreicht. Deutlich höhere Beladungen, die je nach Membrantyp

zwischen 7,33 und 10,30  $\mu\text{mol}$  Epoxygruppen pro Gramm Hohlfaser ( $0,81\text{-}1,33 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$ ) liegen, liefert der Einsatz der am höchsten konzentrierten Reaktionslösung (1,6 M).

Zusammenfassend sind in den Tab. 6 und 7 (Kap. 3.1.2.4) die Beladungsdichten nach jedem Reaktionsschritt der Grundaktivierung für jeden Hohlfasermembrantyp sowohl in Bezug zur Membranmasse (g) als auch zum Membranzvolumen ( $\text{cm}^3$ ) dargestellt.

Anhand von BET-Analysen können quantitative Aussagen hinsichtlich charakteristischer Membrankennzahlen wie z.B. BET-Oberfläche, Porenvolumen und Porengrößenverteilung gemacht werden. Wie erwartet verringert sich das Porenvolumen nach den erfolgten Reaktionsschritten der Grundaktivierung durch die Ankopplung der entsprechenden Moleküle (EGDGE und HEC-PQ 10). Des Weiteren wirken sich die Modifikationen nicht auf die Porengrößenverteilung aus, so dass die spezifischen Trenngrenzen (MWCO) der Membranen nicht beeinflusst werden.

Basierend auf REM-Analysen konnte qualitativ aufgezeigt werden, dass das optimierte Protokoll der Grundaktivierung keine Beeinträchtigung der Porenstruktur nach sich zieht. Im Vergleich zu einer unbehandelten Membran kann die Porenverteilung der aktivierten Membranoberflächen als homogen beschrieben werden und zudem treten keine Verblockungen der Poren sowie Ablagerungen auf der Oberfläche auf.

Das nachfolgende Kapitel (3.1.3) beschäftigt sich mit der Entwicklung und Charakterisierung von Ligandensystemen, wobei die hergestellte, epoxyaktivierte Matrixmembran aus der Grundaktivierung als Basis für nachfolgende Ligandendekorationen dient.

### 3.1.3 Entwicklung und Charakterisierung von Ligandensystemen

In diesem Kapitel werden Synthesen vorgestellt, wie epoxyaktivierte PES-Matrixhohlfasermembranen (Kap. 3.1.2) mit unterschiedlichen Funktionalitäten versehen werden können. Die Variation der funktionellen Ankergruppen eröffnet ein breites Spektrum an Kupplungsreaktionen, durch die verschiedenste Liganden an die Membran gebunden werden können. Solche Affinitätsmembranen sind von großem Interesse bei chromatographischen Anwendungen und im Bereich des Downstream Processings [Zou et al., 2001].

Die hohe Reaktivität der Epoxyfunktionen ermöglicht zahlreiche Umsetzungen mit nukleophilen Reagenzien. Als besonders erfolgreich hat sich die nukleophile Epoxidöffnung mit Aminen erwiesen. Daher werden u.a. bifunktionelle Aminderivate eingesetzt, die neben

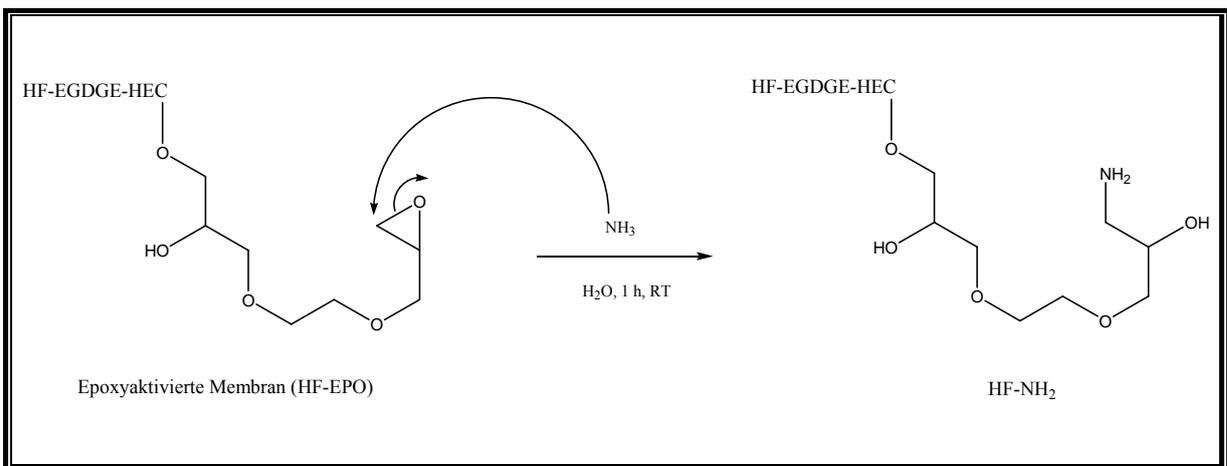
der Aminofunktion an einem Terminus Amino- oder Hydroxygruppen tragen (Kap. 3.1.3.1 und 3.1.3.2). Derartige Gruppen können entsprechende Targetmoleküle über Amid- oder Ether- bzw. Esterbrücken auf der Membran immobilisieren. Je nach Kettenlänge der eingesetzten Aminderivate ist die Flexibilität des Spacers bei der Bindung der Zielmoleküle steuerbar [Mateo et al., 2000].

Im Hinblick auf den angestrebten Einsatz modifizierter Membranen im Bereich der Proteinreinigung nehmen Ionenaustauschermembranen einen großen Stellenwert bei der Etablierung entsprechender Ligandendekorationen ein (Kap. 3.1.3.3). Die Generierung von starken bzw. schwachen Anionenaustauschern erfolgt ausgehend von der epoxyaktivierten Matrixmembran durch Kupplung von Triethylamin (TEA) bzw. Diethylamin (DEA). Die Synthese entsprechender starker bzw. schwacher Kationenaustauschermembranen kann durch die Anbindung von 2-Aminoethansulfonsäure (Taurin, TAU) bzw. Glycin (GLY) oder 6-Aminohexansäure (AHS) realisiert werden. Endständige, reaktive Gruppen sind demnach Sulfonat- und Carboxylatfunktionen.

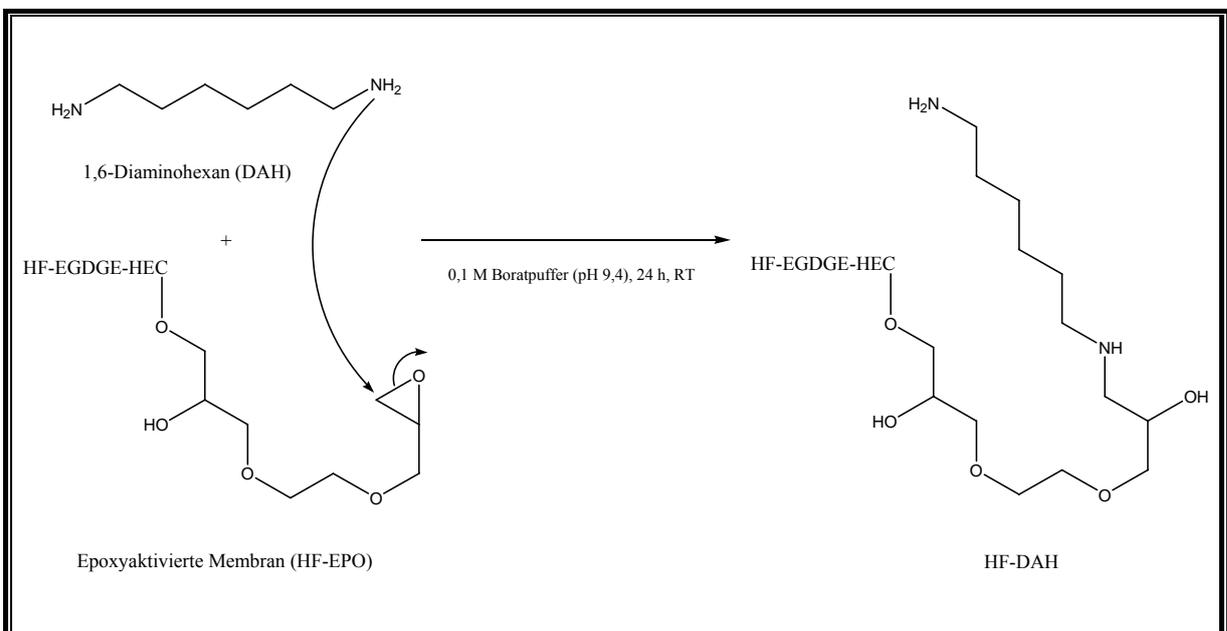
Abschließend wird in diesem Abschnitt gezeigt, wie epoxyaktivierte Hohlfasern für Anwendungen im Bereich der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) modifiziert werden können (Kap. 3.1.3.4 und 3.1.3.5). Bei der Herstellung von Membranen mit chelatisierenden Eigenschaften wird die Präparation einer IDA-funktionalisierten Membran vorgestellt. Entsprechend hergestellte Chelatmembranen werden final mit zweiwertigen Übergangsmetallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ ) dekoriert. Eine Langzeitstabilitätsanalyse synthetisierter IMAC-Membranen gibt Aufschluss über die Stabilitätseigenschaften von mit Metallionen dekorierten Membranen (Kap. 3.1.3.6). In weiterführenden Kapiteln dieser Arbeit (Kap. 3.2-3.4) kommen die generierten IMAC-Hohlfasermembranen bei der Aufreinigung Histidin-markierter Proteine zum Einsatz.

### 3.1.3.1 *prim.*-Amin-Funktionalisierung

Primäre Aminogruppen werden auf der epoxyaktivierten Matrixmembran dadurch erzeugt, dass die Epoxygruppen entweder mit Ammoniak zur HF-NH<sub>2</sub>-Membran oder aber mit 1,6-Diaminohexan (DAH) zur HF-DAH-Membran umgesetzt werden. Die entsprechenden Reaktionsschemata und Inkubationsbedingungen sind in Abb. 15 und Abb. 16 dargestellt.



**Abb. 15:** Darstellung von HF-NH<sub>2</sub>-Membranen mit Ammoniak.



**Abb. 16:** Darstellung von HF-DAH-Membranen mit 1,6-Diaminohexan.

Eine wässrige Lösung von Ammoniak (25 %) öffnet den Epoxy-Dreiring der Seitenkette nukleophil und bildet direkt ein  $\alpha$ -Hydroxyamin. Die Reaktion der bifunktionellen

Verbindung 1,6-Diaminohexan (DAH, 2 %) in 0,1 M Boratpuffer (pH 9,4) verlängert die Seitenkette hingegen um sechs Kohlenstoffatome und schafft darüber hinaus eine terminale Aminfunktion mit höherer Basizität [Klein, 2000], [Klein et al., 1994].

Die Anzahl der gebundenen Amingruppen wird mittels AO2-Test bestimmt. Eine vorherige Aminierung der Proben ist nicht notwendig. Als Blindprobe zur Erfassung des Hintergrundsignals fungiert eine nicht-aminierte Epoxymatrixmembran nach durchgeführtem Reaktionsschritt 3 der Grundaktivierung. Es muss hier jedoch berücksichtigt werden, dass HF-DAH-Membranen sowohl primäre als auch sekundäre Aminfunktionen besitzen und der Farbstoff in gleichem Maße an beide Gruppen komplexiert. Die Ergebnisse des AO2-Tests für die Beladungsdichten der HF-NH<sub>2</sub>- und HF-DAH-Membranen aus PES (MicroPES und UltraPES) sind in Tab. 9 gezeigt.

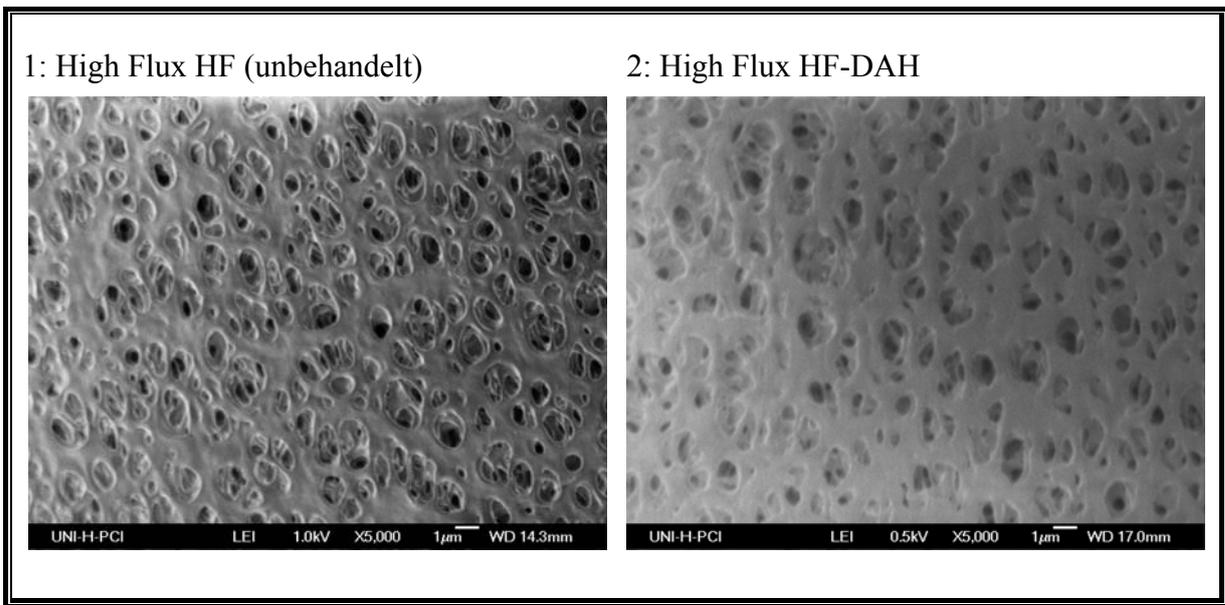
**Tab. 9:** Ergebnisse des AO2-Tests verschiedener HF-NH<sub>2</sub>- und HF-DAH-Membranen

Membrantyp	Amin-Beladung [ $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ HF]	Amin-Beladung [ $\mu\text{mol}/\text{g}$ HF]
MicroPES-NH <sub>2</sub>	1,33 ± 0,18	8,96 ± 1,21
UltraPES-NH <sub>2</sub>	1,10 ± 0,08	7,35 ± 0,52
MicroPES-DAH	1,06 ± 0,01	7,08 ± 0,10
UltraPES-DAH	0,92 ± 0,02	6,10 ± 0,14

Je nach Membran liegen die Amin-Beladungen der HF-NH<sub>2</sub>-Membranen bei 7,35  $\mu\text{mol}/\text{g}$  und 8,96  $\mu\text{mol}/\text{g}$ , die der HF-DAH-Membranen bei 6,10 und 7,08  $\mu\text{mol}/\text{g}$ . Zum Vergleich ist es Kugel et al. gelungen, Konzentrationen von Aminendgruppen auf porösen Nylon-6-Hohlfasern im Bereich von 21  $\mu\text{mol}/\text{g}$  zu erreichen [Kugel et al., 1992].

Zur qualitativen Bewertung der Oberflächenstruktur aminfunktionalisierter Membranen sind exemplarisch mit DAH dekorierte High Flux PS-Hohlfasermembranen mittels REM-Untersuchungen analysiert worden. Die Abb. 17 zeigt eine entsprechende mit DAH funktionalisierte Hohlfasermembran im Vergleich zu einer unbehandelten Probe bei einer 5.000-fachen Vergrößerung. Die REM-Aufnahmen belegen, dass unter angewendetem Protokoll (Inkubation der epoxyaktivierten Membran für 24 h in 2 % DAH gelöst in 0,1 M Boratpuffer bei 1.000 rpm, siehe Abb. 16) keine Beeinträchtigung der Porenstruktur zu

erkennen ist. Im Vergleich zur Referenz kann die Porenverteilung als homogen beschrieben werden und zudem werden keine Ablagerungen sowie Verblockungen der Poren nachgewiesen.



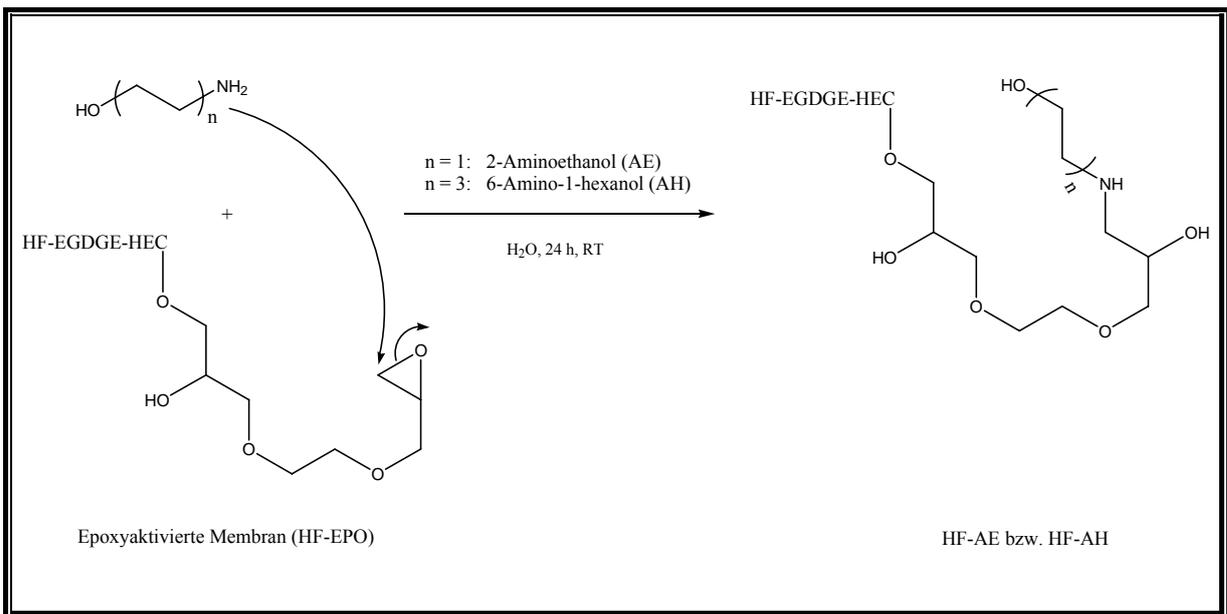
**Abb. 17:** REM-Aufnahmen bei einer 5.000-fachen Vergrößerung von einer oberflächenaktivierten High Flux-Hohlfasermembran, die mit dem bifunktionellen Aminderivat 1,6-Diaminohexan (DAH) dekoriert worden ist, im Vergleich zur Referenz.

### 3.1.3.2 Hydroxy-Funktionalisierung

Neben der *prim.*-Amin-Funktionalisierung besteht die Möglichkeit, Membranen mit terminalen Hydroxygruppen zu dekorieren. Ausgehend von der epoxyaktivierten Matrixmembran (HF-EPO) werden in Abhängigkeit der bifunktionellen Aminderivate 2-Aminoethanol (AE) und 6-Amino-1-hexanol (AH) hydroxyaktivierte Membranen mit variierender Kettenlänge erzeugt. Mechanistisch greift das freie Elektronenpaar des Aminostickstoffs nukleophil am endständigen Epoxykohlenstoff an. Aufgrund der höheren Basizität der Aminogruppe im Vergleich zur Hydroxygruppe des bifunktionellen Aminderivates ist ein nukleophiler Angriff der Aminogruppe am elektrophilen C-Atom der Epoxidverbindung favorisiert. Der Vorteil im Vergleich zur hydroxyaktivierten Membran nach dem Reaktionsschritt 2 der Grundaktivierung (HEC-PQ 10-beschichtet, Kap. 3.1.2.2) liegt hier in der freien Zugänglichkeit der Hydroxygruppen durch Ankopplung des Diepoxid-Linkers gefolgt von der Anbindung der Aminderivate AE bzw. AH. Somit können sich die endständigen, reaktiven

Gruppen auf der Hohlfasermembranoberfläche ausrichten und sind sterisch weniger abgeschirmt.

Das Reaktionsschema von HF-EPO-Membranen mit einer wässrigen Lösung des bifunktionellen Aminderivates 2-Aminoethanol (2 M) bzw. 6-Amino-1-hexanol (5 %) ist in Abb. 18 gezeigt.



**Abb. 18:** Darstellung von HF-AE-Membranen mit 2-Aminoethanol (AE) bzw. HF-AH-Membranen mit 6-Amino-1-hexanol (AH).

Die Anzahl der gebundenen Moleküle wird anhand der *sek.*-Amingruppen durch einen AO2-Test ermittelt (Tab. 10). Epoxyaktivierte Membranen dienen dabei als Blindproben. Die Hydroxybeladungsdichten liegen abhängig vom PES-Membrantyp und gebundenen Reagenz in der Form von AE bzw. AH bei 6,63-11,70  $\mu\text{mol/g}$  (1,00-1,76  $\mu\text{mol/cm}^3$ ). Im Vergleich zu den Beladungskapazitäten hergestellter epoxyaktivierter Micro- und UltraPES-Hohlfasermembranen (Kap. 3.1.2.4, Tab. 6 und 7) kann von einer vollständigen Umsetzung der Epoxygruppen mit den bifunktionellen Aminderivaten AE und AH ausgegangen werden.

Eine mögliche Variante zur Synthese hydroxyaktivierter Membranen besteht in der Umsetzung von PES/PS-Hohlfasermembranen mit dem Epoxyderivat Propylenoxid [Higuchi et al., 1991]. Aufgrund der Giftigkeit des Reagenzes ist jedoch eine Anwendung der oben beschriebenen Syntheserouten vorzuziehen.

**Tab. 10:** Ergebnisse des AO2-Tests verschiedener HF-AE- und HF-AH-Membranen

Membrantyp	Hydroxy-Beladung [ $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ HF]	Hydroxy-Beladung [ $\mu\text{mol}/\text{g}$ HF]
MicroPES-AE	$1,54 \pm 0,02$	$10,35 \pm 0,13$
UltraPES-AE	$1,00 \pm 0,02$	$6,63 \pm 0,12$
MicroPES-AH	$1,61 \pm 0,07$	$10,81 \pm 0,46$
UltraPES-AH	$1,76 \pm 0,05$	$11,70 \pm 0,32$

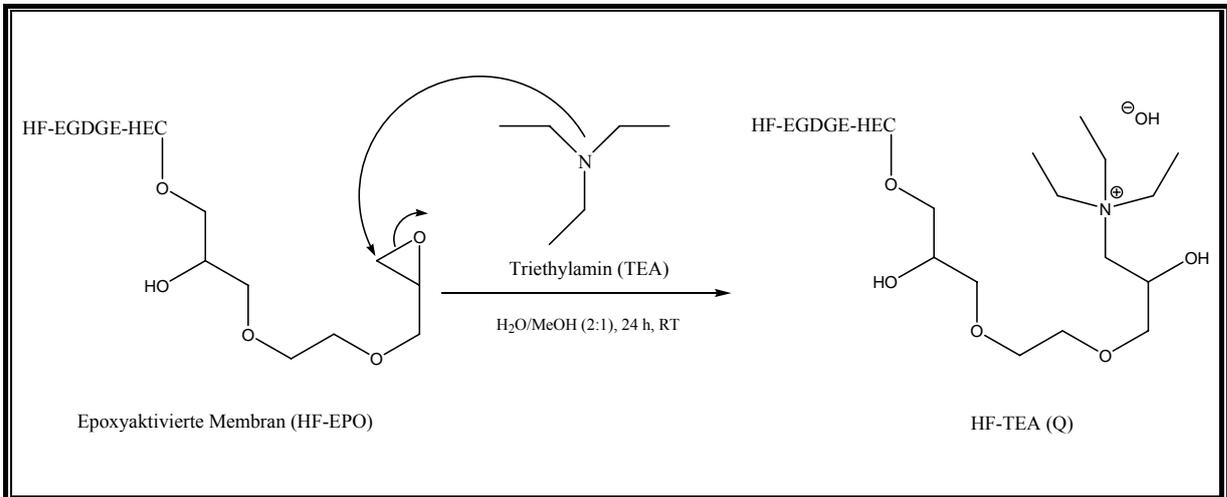
### 3.1.3.3 Herstellung von Ionenaustauschermembranen

Thema dieses Kapitels ist die Darstellung von Ionenaustauschermembranen ausgehend von epoxyaktivierten PES-Fasern. Je nachdem, ob positiv oder negativ geladene Ankergruppen auf der Membranmatrix immobilisiert werden, wird zwischen Anionen- bzw. Kationenaustauschern differenziert. Innerhalb dieser beider Klassen wird hinsichtlich der Säure/Base-Stärke der Austauschergruppen und der Chemie der Substituenten geordnet. Die am häufigsten verwendeten endständigen, funktionellen Gruppen von Ionenaustauschermembranen auf Seiten der Anionenaustauscher sind quartäre bzw. tertiäre Ammoniumgruppen und auf Seiten der Kationenaustauscher Sulfonat- bzw. Carboxylatgruppen [Lu et al., 2005], [Kir et al., 2001], [Kara et al., 2001], [Ersöz et al., 2001], [Rodemann, 1994], [Stäude et al., 1991].

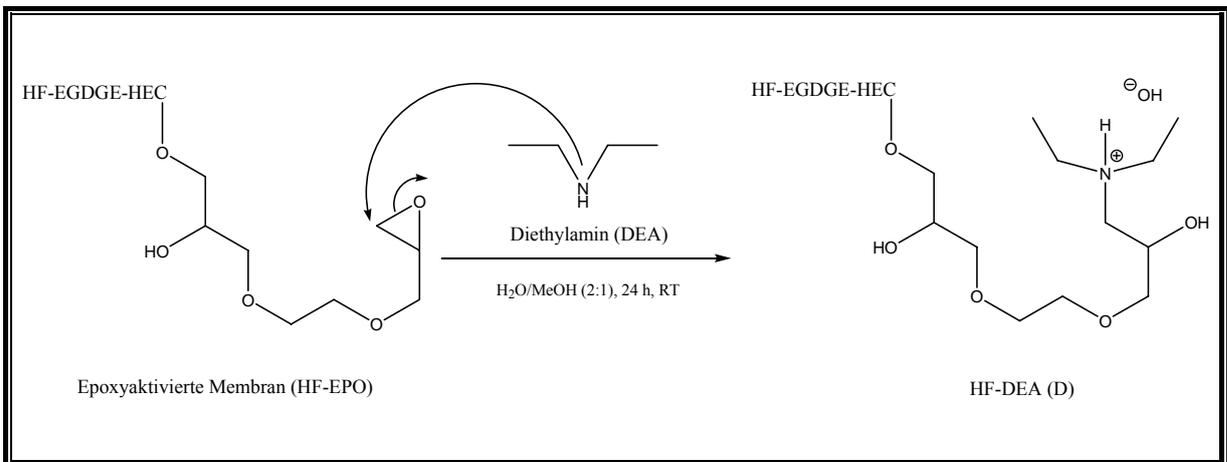
#### *Anionenaustauschermembranen*

Die Addition von Triethylamin (TEA) bzw. Diethylamin (DEA) an die reaktiven Epoxyfunktionen der Membranmatrix erzeugt eine positiv geladene quartäre Ammoniumgruppe. Im wässrig basischen Medium werden die Ladungen durch Hydroxidionen ausgeglichen. Die Reaktion wird für 24 h bei RT in einem 2:1-Gemisch aus Wasser und Methanol als Lösemittel durchgeführt [Rodemann et al., 1995]. Das organische Co-Solvens ist nötig, um entsprechend hohe Konzentrationen der Reaktionslösungen von 2 M TEA bzw. DEA herstellen zu können, da sich in Wasser allein weniger als 10 % lösen lassen. Das

Reaktionsschema der TEA- und DEA-Anbindung zur Synthese starker und schwacher Anionenaustauschermembranen ist in den Abb. 19 und 20 dargestellt.



**Abb. 19:** Darstellung von starken Anionenaustauschermembranen (Q) durch Anbindung von TEA.



**Abb. 20:** Darstellung von schwachen Anionenaustauschermembranen (D) durch Anbindung von DEA.

Für den Nachweis der Beladungskapazitäten gebundener Ammoniumfunktionen wird ein AO2-Test verwendet. Sowohl die TEA-Anbindung zur Herstellung starker Anionenaustauscherhohlfasermembranen (Q) als auch die Ankopplung von DEA an die Epoxymembran zur Darstellung schwacher Anionenaustauscher (D) konnte erfolgreich realisiert werden (Tab. 11). Die Beladungskapazitäten der Q-Hohlfasermembranen liegen je nach Membrantyp bei 3,68 und 4,01  $\mu\text{mol/g}$  Hohlfasermembran, die der D-Hohlfasermembranen bei 7,84 und 8,32  $\mu\text{mol/g}$ . Der Grund für die etwa um die Hälfte geringere Ammoniumbeladungsdichte der Q-Membranen im Vergleich zu den D-Membranen ist eventuell auf die eingeschränkte

Anlagerungsfähigkeit des sperrigen AO2-Farbstoffmoleküls an das durch die drei Ethylgruppen abgeschirmte Stickstoffatom zu suchen. Die Beladungskapazitäten der D-Hohlfasermembranen liegen wie erwartet in der gleichen Größenordnung wie die der chemisch ähnlichen Reaktion der Amin-Funktionalisierung mit Ammoniak (Kap. 3.1.3.1).

**Tab. 11:** Beladungskapazitäten synthetisierter Anionenaustauschermembranen

Membrantyp	Amin-Beladung [ $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ HF]	Amin-Beladung [ $\mu\text{mol}/\text{g}$ HF]
MicroPES-TEA (M-Q)	$0,55 \pm 0,02$	$3,68 \pm 0,13$
UltraPES-TEA (U-Q)	$0,60 \pm 0,06$	$4,01 \pm 0,43$
MicroPES-DEA (M-D)	$1,17 \pm 0,05$	$7,84 \pm 0,36$
UltraPES-DEA (U-D)	$1,25 \pm 0,27$	$8,32 \pm 1,77$

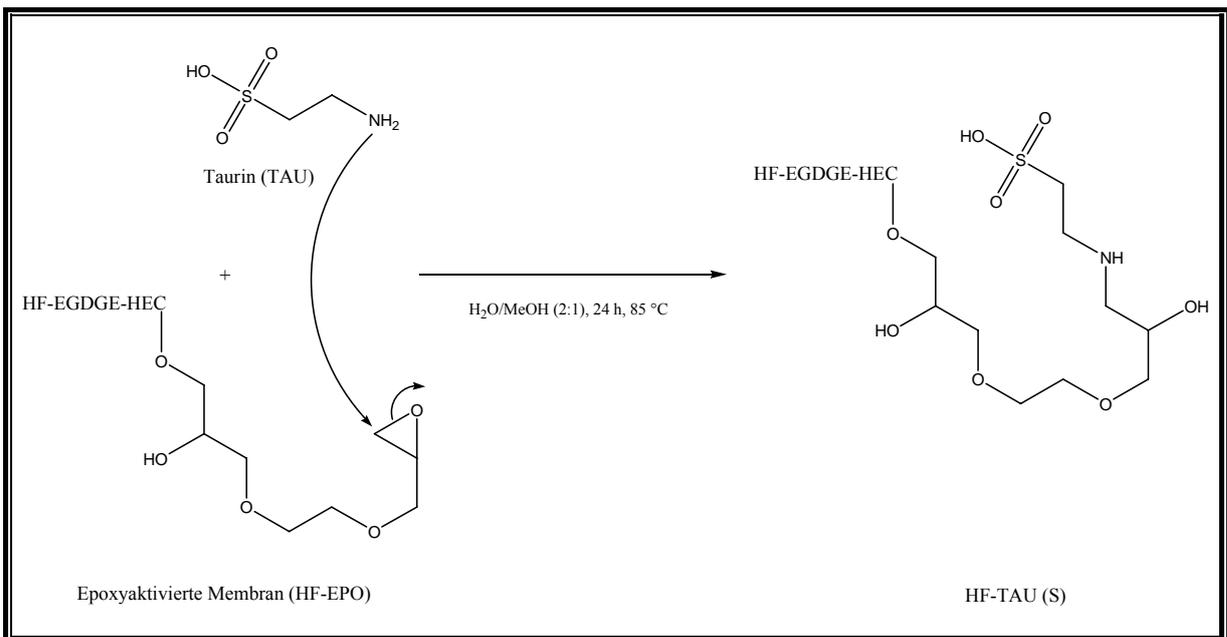
Entsprechend synthetisierte starke und schwache UltraPES-Anionenaustauschermembranen (U-Q und U-D) werden im Kap. 3.2.1 eingesetzt, um ihre Effektivität im Bereich des Downstreaming am Beispiel der Aufreinigung eines Modellproteins in der Form von bovinem Serum Albumin (BSA) zu testen.

### *Kationenaustauschermembranen*

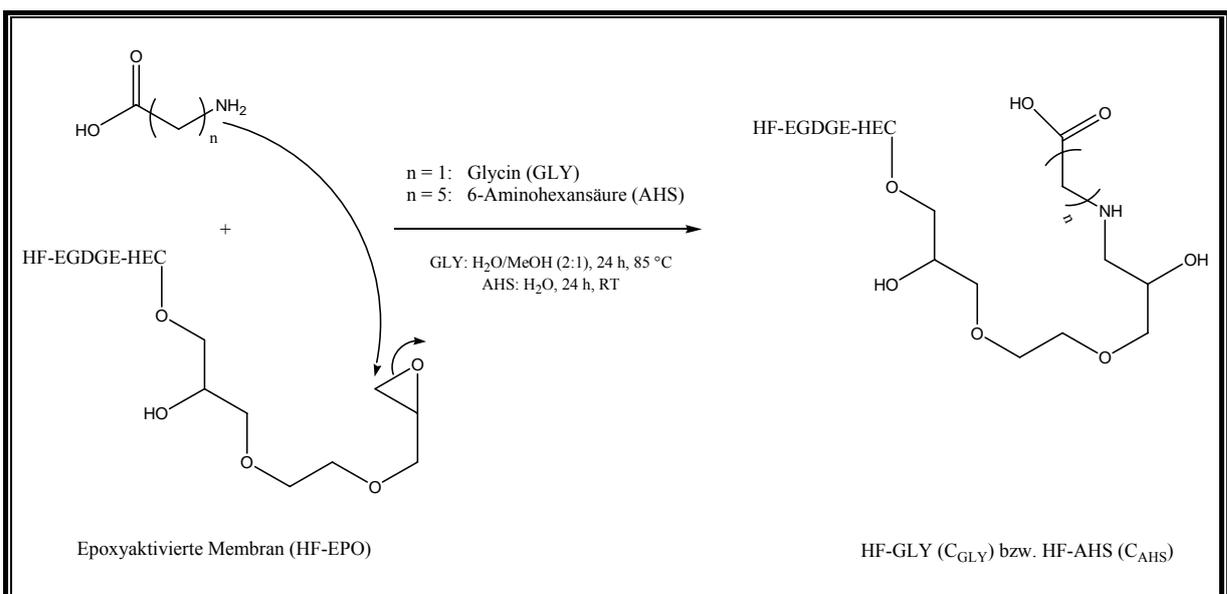
Die Ankupplung von Taurin (TAU, 2-Aminoethansulfonsäure; 0,4 M) an die epoxyaktivierte Hohlfaseroberfläche zur Synthese einer starken Kationenaustauschermembran (S) lässt sich in einem Wasser/Methanol-Gemisch (2:1) bei 85 °C (Wasserbad) durchführen. Abb. 21 zeigt den genauen Reaktionsmechanismus, wobei das freie Elektronenpaar des Stickstoff-Moleküls die Epoxyfunktion nukleophil angreifen kann. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird zweckmäßigerweise auf pH 10 eingestellt, um zu gewährleisten, dass die Amingruppen genügend nukleophil sind, um mit den Epoxygruppen reagieren zu können [Rodemann et al., 1995].

Für die Herstellung von schwachen Kationenaustauscher-Hohlfasermembranen (C) werden in diesem Abschnitt parallel zwei Syntheserouten verfolgt. Neben der Anbindung von Glycin (GLY) an die Epoxyhohlfasermembran wird zudem auch ein längerkettiges Molekül in der

Form von 6-Aminohexansäure (AHS) getestet, um terminale Carboxylatfunktionen zu generieren. Das Reaktionsschema und die entsprechenden Inkubationsbedingungen sind in der Abb. 22 dargestellt. Damit die Aminofunktion nicht in ihrer protonierten Form vorliegt, wird der pH-Wert der Reaktionslösungen mit NaOH auf pH 10 eingestellt [Higuchi et al., 2004].



**Abb. 21:** Synthese von starken Kationenaustauschermembranen (S) durch Anknüpfung von Taurin (TAU).



**Abb. 22:** Synthese von schwachen Kationenaustauschermembranen (C) durch Anbindung von Glycine (GLY, C2-Spacer) bzw. 6-Aminohexansäure (AHS, C6-Spacer).

Die Anzahl gebundener Moleküle wird quantitativ anhand der *sek.*-Amingruppen mittels AO2-Test ermittelt, wobei epoxyaktivierte Matrixhohlfasermembranen als Blindprobe fungieren (Tab. 12).

**Tab. 12:** Beladungskapazitäten synthetisierter Kationenaustauschermembranen

Membrantyp	Sulfonat bzw. Carboxylat-Beladung [ $\mu\text{mol}/\text{cm}^3 \text{ HF}$ ]	Sulfonat- bzw. Carboxylat-Beladung [ $\mu\text{mol}/\text{g HF}$ ]
MicroPES-TAU (M-S)	$0,10 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,14$
UltraPES-TAU (U-S)	$0,11 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,26$
MicroPES-GLY (M-C <sub>GLY</sub> )	$0,07 \pm 0,01$	$0,49 \pm 0,07$
UltraPES-GLY (U-C <sub>GLY</sub> )	$0,38 \pm 0,07$	$2,53 \pm 0,64$
MicroPES-AHS (M-C <sub>AHS</sub> )	$0,21 \pm 0,02$	$1,42 \pm 0,14$
UltraPES-AHS (U-C <sub>AHS</sub> )	$1,00 \pm 0,10$	$6,64 \pm 0,66$

Es kann konstatiert werden, dass sich im Bereich der Herstellung starker Kationenaustauscher-Hohlfasermembranen (M-S und U-S) nur rel. geringe Beladungskapazitäten von ca.  $0,70 \mu\text{mol TAU}$  pro Gramm Membranmaterial unter den oben genannten Reaktionsbedingungen realisieren lassen. Bei Higuchi et al. sind zwei alternative Syntheserouten zur Herstellung von S-Hohlfasermembranen aus PS beschrieben, bei denen mittels 1,3-Propansulton (Katalysator  $\text{SnCl}_4$ ) bzw. konz. Schwefelsäure erfolgreich terminale Sulfonsäuregruppen generiert werden können [Higuchi et al., 1990].

Da bei der Synthese schwacher Kationenaustauschermembranen auf MicroPES-Basis (M-C<sub>GLY</sub> und M-C<sub>AHS</sub>) ähnlich niedrige Beladungsdichten detektiert worden sind, hat es sich hier als zweckmäßig erwiesen, beim Einsatz des Hohlfasertyps UltraPES Protokoll-optimierungen durch Erhöhung der Reagenzkonzentration durchzuführen. Ausgehend von Reagenzkonzentrationen von jeweils  $0,4 \text{ M}$  bei der MicroPES-C-Reihe sind Konzentrationen von  $1 \text{ M AHS}$  bzw.  $2 \text{ M GLY}$  bei der Modifizierung der UltraPES-Fasern verwendet worden. Entsprechende Beladungskapazitäten der UltraPES-C-Membranen belaufen sich auf  $2,53 \mu\text{mol}/\text{g}$  (U-C<sub>GLY</sub>) bzw.  $6,64 \mu\text{mol}/\text{g}$  (U-C<sub>AHS</sub>) und sind im Vergleich zur MicroPES-C-Reihe um den Faktor  $5,2$  bzw.  $4,7$  höher.

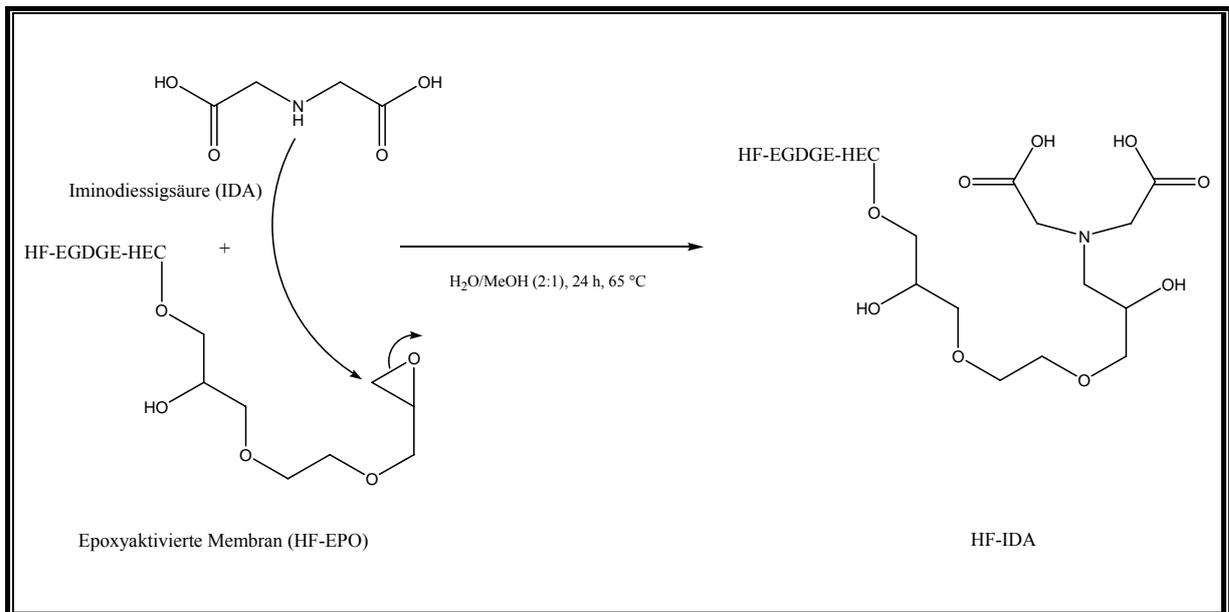
Eine Möglichkeit, synthetisierte C-Membranen im Anwendungsbereich Downstream Processing zu testen, ist die Aufreinigung des Modellproteins Lysozym, welches sich bei einem pH-Wert von 9,3 isoelektrisch verhält. Durch Einsatz von gepufferten Lysozym-lösungen (z.B. Bindungspuffer Tris/HCl) mit einem  $\text{pH} \leq \text{pI}$  können entsprechende Lysozym-Moleküle mit positiver Nettoladung an die terminal generierten Carboxylatfunktionen adsorbieren. Nach Anwendung von ausreichenden Waschschritten können gebundene Lysozym-Moleküle mittels ansteigendem Salzgradienten (NaCl) final eluiert werden [Kökpinar et al., 2006].

### 3.1.3.4 Herstellung von Membranen mit chelatisierenden Eigenschaften

Der Einsatz von Chelatmembranen nimmt einen hohen Stellenwert im Bereich der Membranchromatographie ein. Als chelatisierende Gruppen stehen eine Vielzahl von Substanzen zur Verfügung. Am häufigsten werden Iminodiessigsäure (IDA) und Nitrilotriessigsäure (NTA) eingesetzt. Alternative Chelatoren sind u.a. Tris(Carboxymethyl)Ethylendiamin-Gruppen (TED) und Tris(2-Aminoethyl)-Amin (TREN). Auf Basis der chelatisierenden Membranen können nachfolgend verschiedene Metallionen immobilisiert werden, um sog. IMAC-Membranen herzustellen (Kap. 3.1.3.5).

In diesem Abschnitt wird gezeigt, wie epoxyaktivierte Hohlfasern (HF-EPO) mit IDA dekoriert werden können, um Membranen mit chelatisierenden Eigenschaften zu erzeugen. Als Grundlage für die Protokollentwicklung dieser Ligandenankupplungen dienen verschiedene Arbeiten im Bereich der Membranmodifizierung [Camperi et al., 2000], [Nabe et al., 1997], [Rodemann et al., 1995], [Rodemann et al., 1994], [Smidl et al., 1992], [Porath et al., 1975].

Für die Präparation der Chelat-Hohlfasermembranen wird das dreizählig chelatisierende IDA in einem Wasser/Methanol-Gemisch (2:1) kovalent an die Epoxygruppen der Membran addiert. Es wird dabei in einem basischem pH-Bereich (pH 10) gearbeitet, um eine ausreichend hohe Nukleophilie der *sek.*-Amingruppe zu gewährleisten. Weiterhin können effektivere Umsetzungen durch lange Reaktionszeiten und hohe Temperaturen realisiert werden. Das entsprechende Reaktionsschema ist in Abb. 23 dargestellt.



**Abb. 23:** Anbindung des chelatisierenden Liganden Iminodiessigsäure (IDA) an die epoxyaktivierte Membran.

Auf einen AO2-Test zur Bestimmung der Beladungskapazitäten gebundener IDA-Gruppen ist hier verzichtet worden, da sterische und elektronische Faktoren die Farbstoffanlagerung an den Aminfunktionen erschweren und somit die Ergebnisse verfälschen. In der Regel werden entsprechende Beladungen des Chelators indirekt über die Immobilisierung von Metallionen mit dem Chelatbildner quantifiziert. Eine geeignete Methode zum Nachweis auf der Membranoberfläche gebundener Metallionen wird im nachfolgenden Kapitel dargestellt.

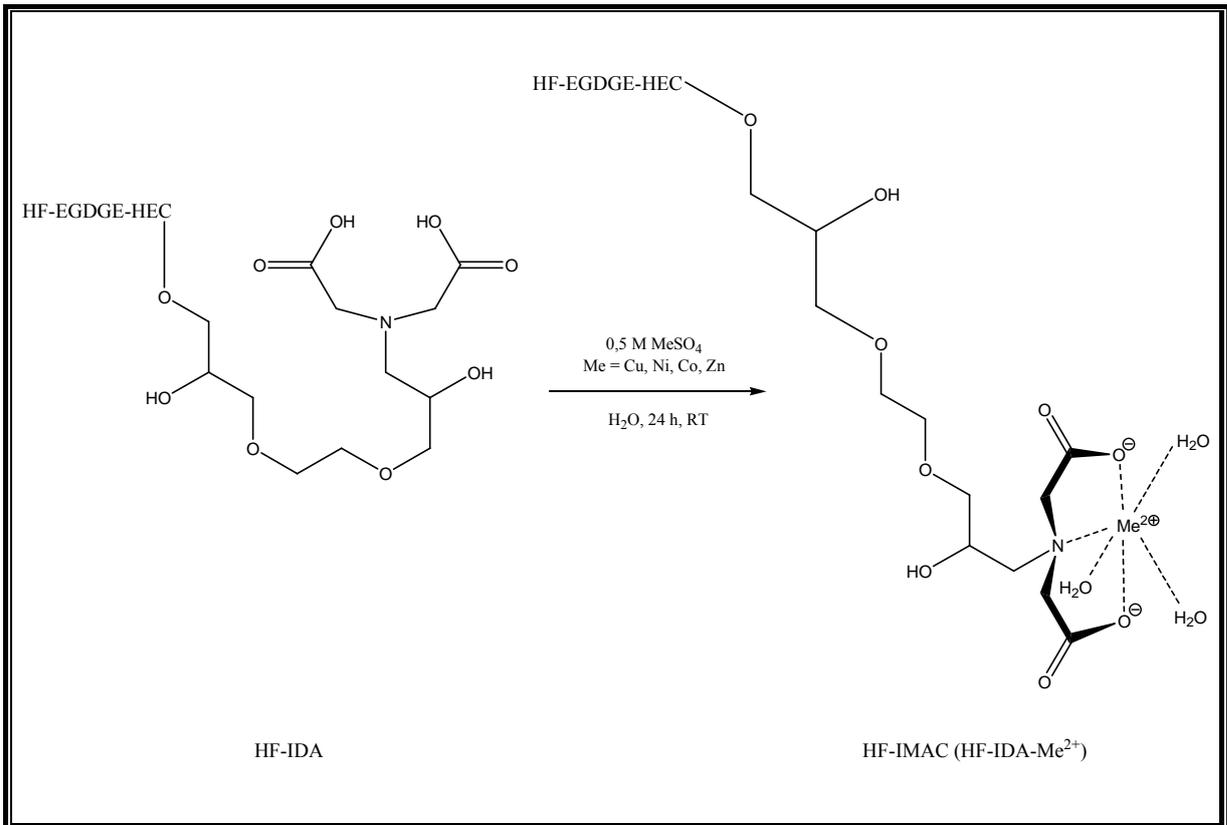
Iminodiessigsäure weist neben chelatisierenden Eigenschaften auch funktionelle Gruppen zur ionischen Bindung auf, weshalb ein Einsatz IDA-dekorierter Membranen im Bereich der IEX-Chromatographie denkbar ist. Die Wirkungsweise der funktionellen Gruppen ist im Wesentlichen durch ihr Dissoziationsverhalten bestimmt. Die Lage des Austauschergleichgewichtes ist daher hauptsächlich vom pH-Wert abhängig, so dass gewünschte Dissoziationsstufen durch den verwendeten pH-Bereich steuerbar sind [Stetter, 2004], [Dorfner, 1991]. In dem Kap. 3.2.1 wird auf den Einsatz einer IDA-Membran als Ionenaustauscher näher eingegangen.

### 3.1.3.5 Herstellung von IMAC-Hohlfasermembranen auf IDA-Basis

Um die synthetisierten Chelatmembranen mit zweiwertigen Metallionen in der Form von  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  zu dekorieren, werden IDA-funktionalisierte PES-Hohlfasermembranen zunächst mit wässrigen 0,5 M Metallsulfat-Lösungen für 24 h bei RT inkubiert. Chelatisierende IDA-Liganden können mit den Metallionen starke koordinative Komplexbindungen eingehen [Harkensee, 2007], [de Aquino et al., 2006]. Die Abb. 24 zeigt das Reaktionsschema der Komplexierung von  $\text{Me}^{2+}$ -Ionen an einen dreizähligen IDA-Liganden.

Für die Quantifizierung komplexierter Metallionen und somit auch für die indirekte Bestimmung gebundener Chelatoren wird ein sog. EDTA-Test angewendet. Dabei werden die mit Metallionen abgesättigten Hohlfasermembranen mit einer 0,1 M EDTA-2Na-Lösung behandelt. Wegen der größeren Stabilität der  $\text{Me}^{2+}$ -EDTA-Komplexe werden die Metallionen von der IDA-Membranoberfläche abgelöst und gehen in die flüssige Phase über. Die Absorption der  $\text{Me}^{2+}$ -EDTA-Lösungen kann anschließend photometrisch vermessen werden und mit  $\text{Me}^{2+}$ -EDTA-Lösungen bekannter Konzentrationen verglichen werden [Camperi et al., 2000], [Smidl et al., 1992]. Um niedrige Absorptionswerte im Bereich der Nachweisgrenze zu vermeiden, wird das Verhältnis von Membranmenge zum Volumen der 0,1 M EDTA-2Na-Lösung maximal gewählt. Die im Folgenden angegebenen Fehlerintervalle wurden anhand von Zweifachbestimmungen ermittelt.

Eine detaillierte Beschreibung des EDTA-Tests sowie entsprechende Kalibrationsgeraden der  $\text{Me}^{2+}$ -EDTA-Lösungen sind im Anhang unter Kap. 6.6.3 zu finden.



**Abb. 24:** Synthese von IMAC-Hohlfasermembranen auf IDA-Basis durch Komplexierung von zweiwertig positiv geladenen Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ ).

Die Tab. 13 zeigt die durch einen EDTA-Test ermittelten Metallionensättigungskapazitäten für  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen in Abhängigkeit vom Hohlfasermembrantyp (MicroPES, UltraPES). Aufgrund der deutlich detektierbaren Signale im Hinblick auf die Metallionenbeladung kann davon ausgegangen werden, dass sich der Chelator IDA erfolgreich an epoxyaktivierte PES-Fasern kuppeln lässt.

Auf Basis IDA-aktivierter PES-Membranen nehmen die Metallionensättigungskapazitäten in der Reihenfolge  $\text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$  ab. Es werden dabei Sättigungskapazitäten zwischen 20,14 und 5,27  $\mu\text{mol Me}^{2+}/\text{g HF}$  (3,00 und 0,79  $\mu\text{mol Me}^{2+}/\text{cm}^3 \text{ HF}$ ) erreicht. Wie erwartet sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den IDA-funktionalisierten Membrantypen Micro- und UltraPES hinsichtlich der Metallionenbeladungen zu erkennen und Abweichungen werden annähernd durch das Fehlerintervall berücksichtigt.

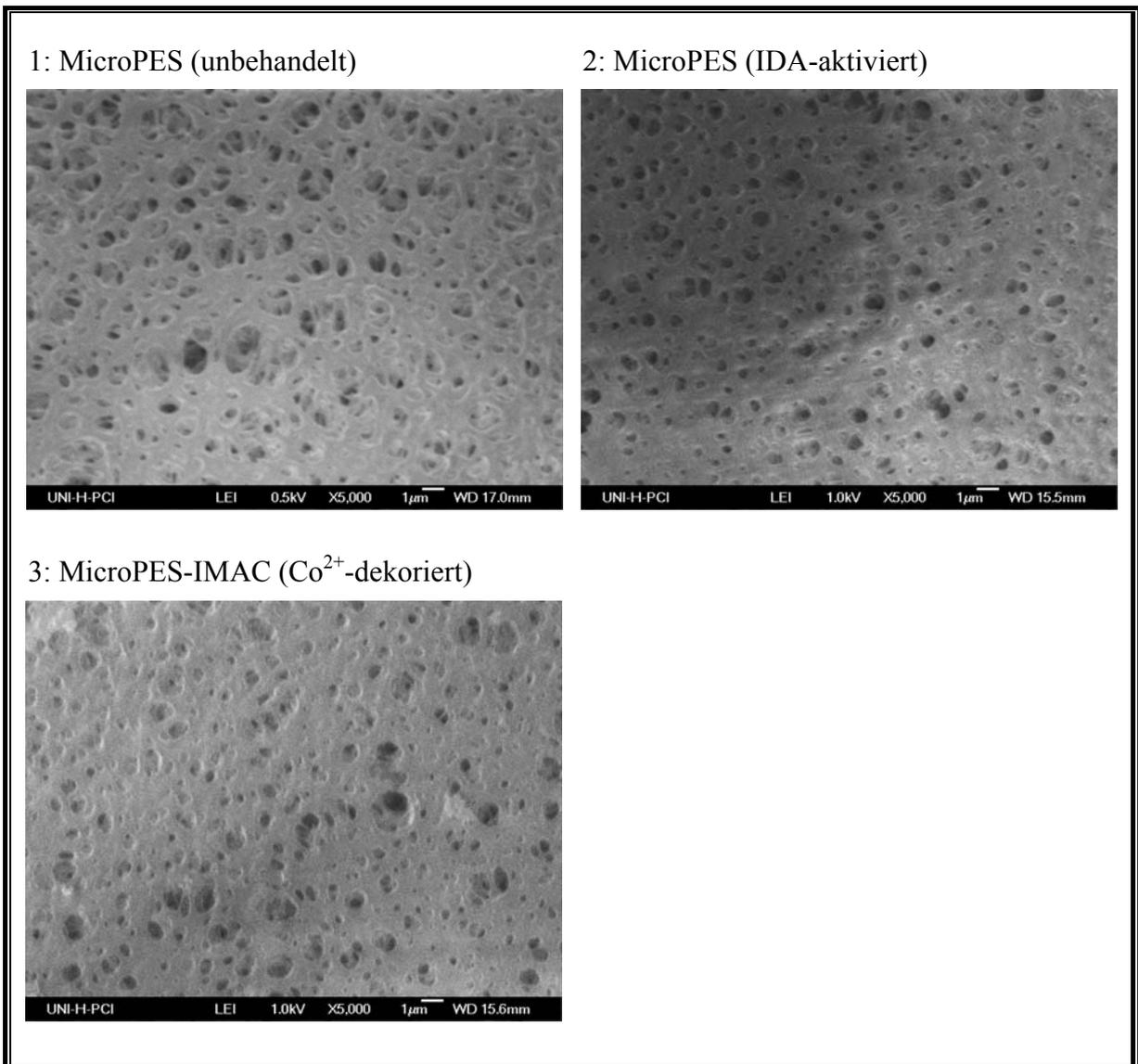
**Tab. 13:** Metallionensättigungskapazitäten von IDA-funktionalisierten Hohlfasermembranen aus PES

Chelatmembrantyp	Metallion	Metallionenbeladung [ $\mu\text{mol Me}^{2+}/\text{cm}^3 \text{ HF}$ ]	Metallionenbeladung [ $\mu\text{mol Me}^{2+}/\text{g HF}$ ]
MicroPES-IDA	$\text{Cu}^{2+}$	$0,79 \pm 0,03$	$5,27 \pm 0,21$
	$\text{Ni}^{2+}$	$3,00 \pm 0,43$	$20,14 \pm 2,88$
	$\text{Co}^{2+}$	$2,13 \pm 0,19$	$14,29 \pm 1,30$
UltraPES-IDA	$\text{Cu}^{2+}$	$1,04 \pm 0,03$	$6,96 \pm 0,21$
	$\text{Ni}^{2+}$	$2,37 \pm 0,22$	$15,83 \pm 1,44$
	$\text{Co}^{2+}$	$1,75 \pm 0,19$	$11,69 \pm 1,30$

Zum Vergleich haben Serpa et al. auf Basis  $\text{Cu}^{2+}$ -dekorieter PEVA-IDA-Hohlfasermembranen Beladungskapazitäten von  $38 \mu\text{mol/g}$  erreicht. Yang et al. haben basierend auf IDA-Cellulosemembranen  $\text{Cu}^{2+}$ -Beladungen von  $15,8 \mu\text{mol/g}$  erzielt [Serpa et al., 2005], [Suen et al., 2003], [Yang et al., 1999].

Insgesamt betrachtet, übersteigen die ermittelten Metallionenbeladungen zum Teil die Anzahl der nachgewiesenen Epoxygruppen auf den eingesetzten Membranen (Kap. 3.1.2.4). Ein Erklärungsansatz für diesen scheinbaren Widerspruch ist in der Tatsache zu suchen, dass die Möglichkeit besteht, dass terminale Epoxygruppen bereits vor Durchführung des AO2-Tests in ihre Diol-Form hydrolysiert sein könnten. Somit liegt die tatsächliche Epoxybeladungsdichte vermutlich über dem mittels AO2-Test ermittelten Level.

Um sicher zu stellen, dass das angewendete Funktionalisierungsprotokoll für die Synthese einer IMAC-Membran keine negative Beeinflussung der Porenstruktur nach sich zieht, sind exemplarisch REM-Untersuchungen von einer IDA-aktivierten Membran und einer mit  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen dekorierten Membran durchgeführt worden (Abb. 25). Im Vergleich zur Referenzmembran (1) bleibt sowohl bei der Chelatmembran (2) als auch bei der IMAC-Membran (3) die homogene Porenverteilung der Membranoberfläche erhalten. Es ist hier jedoch anzumerken, dass sich bei der mit  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen beladenen Membran geringfügige Ablagerungen auf der Membranoberfläche befinden. Durch eine Erhöhung der Anzahl der Waschschrte ( $\text{H}_2\text{O}$ ) unter Berücksichtigung möglicher auftretender Auswascheffekte der Metallionen sollten nachfolgend jedoch Ablagerungen vermieden werden können.



**Abb. 25:** Darstellung der Oberflächenstruktur von einer Chelatmembran (IDA-modifiziert) und einer IMAC-Membran ( $\text{Co}^{2+}$ -dekoriert) im Vergleich zur Referenzmembran mittels REM-Analyse bei einer 5.000-fachen Vergrößerung.

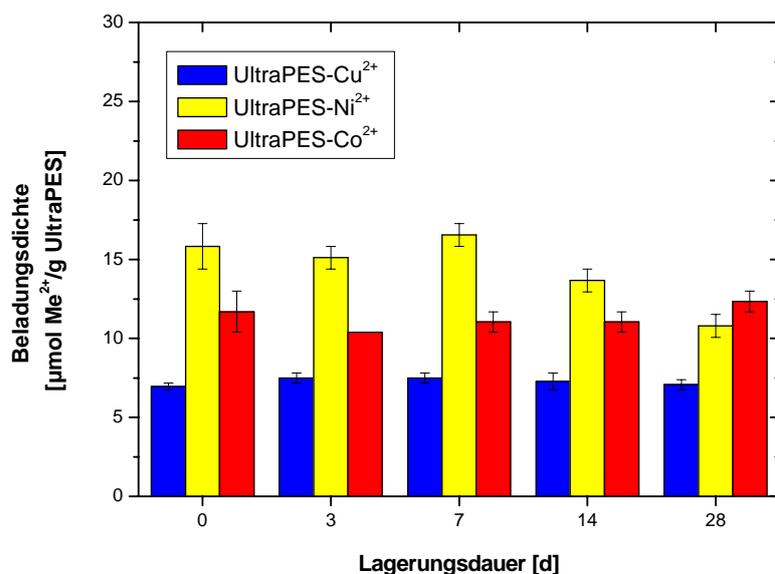
Im nachfolgenden Kapitel wird näher auf die Langzeitstabilität modifizierter IMAC-Hohlfasermembranen auf IDA-Basis eingegangen.

### 3.1.3.6 Langzeitstabilitätsanalyse von IMAC-Hohlfasermembranen

Bei der Modifizierung von IMAC-Hohlfasermembranen und deren weiterführenden Einsatz in verschiedenen Proteinaufreinigungsprozessen ist es erstrebenswert, über einen längeren Zeitraum von mehreren Wochen stabile IMAC-Membranen zu generieren. Auch für den

anvisierten Aufbau und Einsatz eines sog. Affinitätshohlfasermoduls (Kap. 3.3 und 3.4) ist die Verwendung langzeitstabiler IMAC-Fasern unabdingbar.

Nachdem die IMAC-Hohlfasermembranen mit den gewünschten Metallionen beladen und überschüssige Metallionen ausgewaschen worden sind, werden die Fasern über Nacht getrocknet und können anschließend bei RT in 50 mL-Reaktionsröhrchen gelagert werden. In der Abb. 26 ist eine Langzeitstabilitätsanalyse von UltraPES-IMAC-Hohlfasermembranen auf IDA-Basis auf Grundlage der Resultate eines EDTA-Tests in einem Zeitraum von vier Wochen gezeigt. Die Beladungsdichte der komplexierten Metallionen  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  ist in  $\mu\text{mol/g}$  UltraPES angegeben. Probenanalysen sind am Tag der Herstellung der IMAC-Membranen, nach 3 Tagen, nach einer, zwei und vier Wochen Lagerungsdauer erfolgt.



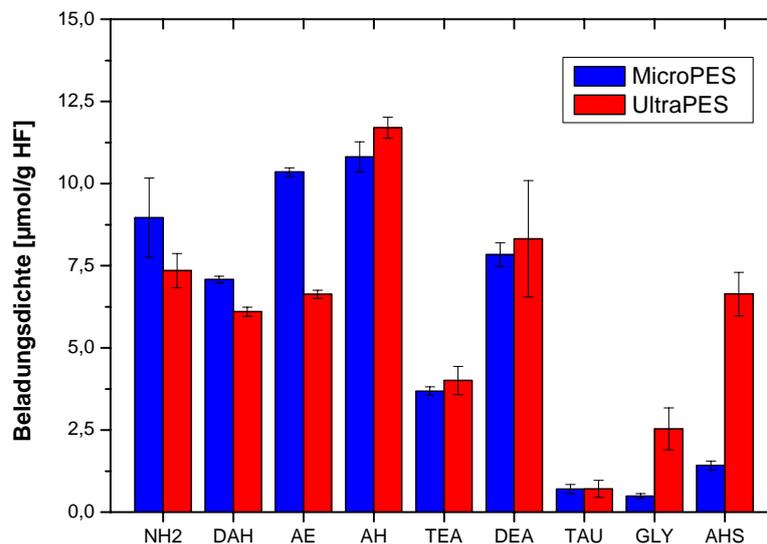
**Abb. 26:** Langzeitstabilitätsanalyse von UltraPES-IMAC-Hohlfasermembranen auf IDA-Basis.

Es ist deutlich zu erkennen, dass mit ansteigender Lagerungsdauer keine signifikanten Abnahmen der  $\text{Me}^{2+}$ -Beladungsdichten zu verzeichnen sind. Somit kann konstatiert werden, dass auf Grundlage des in den Kap. 3.1.2 und 3.1.3 beschriebenen Protokolls entsprechend synthetisierte IMAC-Hohlfasermembranen über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen als stabil zu beschreiben sind.

Eine parallel durchgeführte Stabilitätsanalyse, bezogen auf den Hohlfasermembrantyp MicroPES, liefert ebenfalls das Ergebnis einer stabilen Metallionensättigungskapazität von mindestens vier Wochen (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.3.7 Zusammenfassung und Diskussion

Durch die Entwicklung und Charakterisierung verschiedener Ligandensysteme konnte aufgezeigt werden, welches Potential der heterogenen Oberflächenmodifizierung von Membranen zu Teil wird. Basierend auf einer epoxyaktivierten MicroPES- bzw. UltraPES-Matrixmembran können eine Vielzahl verschiedener terminaler Ankergruppen auf der Hohlfasermembranoberfläche gebunden werden. Besonders vorteilhaft bei den Ligandenanbindungen hat sich der Einsatz entsprechender bifunktionaler Aminderivate erwiesen, wobei durch die Kettenlänge der Moleküle die Flexibilität der Liganden steuerbar ist. Es wird deutlich, dass die Nucleophilie der angreifenden Amingruppe einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der Kupplungsreaktion hat. Sie nimmt mit ansteigendem pH-Wert und mit erhöhter Elektronendichte am Stickstoffatom, z.B. durch elektronenliefernde Substituenten, zu. Zur besseren Übersicht sind hier noch einmal in der Abb. 27 die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.



**Abb. 27:** Vergleich der Beladungsdichten pro Membranmasse von verschiedenen Liganden, die an epoxyaktivierte Hohlfasermembranen aus PES angekoppelt worden sind.

Neben der erfolgreichen Etablierung einer Methode zur Synthese von Hohlfasermembranen mit terminalen sowie internen Amingruppen (*prim.*-Amin-Funktionalisierung) konnten zudem hydroxyaktivierte Membranen (Hydroxy-Funktionalisierung) geschaffen werden. Die Beladungskapazitäten der Aminmembranen (HF-NH<sub>2</sub>, HF-DAH) liegen zwischen 6,10 und

8,96  $\mu\text{mol/g}$  (0,92 und 1,33  $\mu\text{mol/cm}^3$ ), die der Hydroxymembranen (HF-AE, HF-AH) zwischen 6,63 und 11,70  $\mu\text{mol/g}$  (1,00 und 1,76  $\mu\text{mol/cm}^3$ ). Der Grad der Flexibilität lässt sich hier über die Spacerlänge der bifunktionellen Aminderivate steuern. Weiterhin konnten durch REM-Analysen die Unversehrtheit modifizierter Membranen belegt werden.

Des Weiteren ist es gelungen, eine Funktionalisierungsstrategie zur Synthese von Ionenaustauscher-Hohlfasermembranen zu entwickeln. Die Generierung von starken (Q) bzw. schwachen (D) Anionenaustauschern ist durch die kovalente Anbindung von TEA bzw. DEA realisiert worden. In Abhängigkeit vom Membrantyp und Liganden sind Beladungskapazitäten der Q-Membranen von ca. 4  $\mu\text{mol/g}$  (ca. 0,6  $\mu\text{mol/cm}^3$ ) und der D-Membranen von ca. 8  $\mu\text{mol/g}$  (ca. 1,2  $\mu\text{mol/cm}^3$ ) ermittelt worden. Durch die Anbindung von Taurin (TAU) an Epoxymembranen konnten S-Membranen mit Beladungsdichten im Bereich von lediglich 0,70  $\mu\text{mol/g}$  erzielt werden, so dass hier für einen erfolgreichen Einsatz im Bereich der Proteinreinigung Protokolloptimierungen nötig sind. In Bezug zur Synthese von schwachen Kationenaustauschermembranen (C) ist eine deutliche Erhöhung der Beladungskapazität durch Erhöhung der entsprechenden Reagenzkonzentrationen (GLY und AHS) bei der UltraPES-C-Reihe erzielt worden (Vgl. Kap. 3.1.3.3). Final konnten Carboxylatbeladungen in Form von GLY- und AHS-Funktionalitäten von 2,53 und 6,64  $\mu\text{mol/g}$  (0,38 und 1,00  $\mu\text{mol/cm}^3$ ) UltraPES mittels AO2-Test ermittelt werden.

Zum Abschluss dieses Kapitels ist gezeigt worden, wie epoxyaktivierte Hohlfasermembranen für Anwendungen im Bereich IMAC modifiziert werden können. Bei der Auswahl des Chelators hat es sich als zweckmäßig erwiesen, mit dem in der Praxis häufig eingesetzten Typ IDA zu arbeiten. Entsprechende chelatisierende Membranen konnten final erfolgreich mit diversen zweiwertig positiv geladenen Metallionen in der Form von  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  dekoriert werden, wobei mittels EDTA-Test Metallionensättigungskapazitäten auf IDA-Basis im Bereich von 5,27-20,14  $\mu\text{mol/g}$  (0,79-3,00  $\mu\text{mol/cm}^3$ ) erzielt worden sind. Durch REM-Untersuchungen modifizierter Chelat- und IMAC-Membranen (MicroPES-IDA- $\text{Co}^{2+}$ ) konnte eine negative Beeinflussung der Membranoberflächenstruktur durch das Funktionalisierungsprotokoll ausgeschlossen werden. Eine Langzeitstabilitätsanalyse ergibt, dass die getrockneten und bei RT gelagerten IMAC-Hohlfasermembranen aus PES mindestens vier Wochen stabil sind.

Weiterführende Analysen im Bereich der Synthese von IMAC-Membranen könnten Optimierungen hinsichtlich der Verwendung verschiedener Chelator Typen (z.B. NTA, TED) beinhalten. In Bezug zu Literaturquellen finden neben etablierten Aufreinigungs-Kits auf Basis von Ni<sup>2+</sup>-NTA (z.B. His•Bind<sup>®</sup> Kits von Novagen, Ni-NTA Aufreinigungstools von Qiagen) auch vermehrt Cu<sup>2+</sup>-NTA-modifizierte Matrizes Anwendung im Bereich des Downstream Processings [Gaberac-Porekar et al., 2005].

Auf den Einsatz modifizierter Hohlfasermembranen im Anwendungsbereich Downstream Processing wird im nächsten Kapitel (Kap. 3.2) näher eingegangen. Dabei wird zum Einen der Einsatz generierter IEX- und IDA-Membranen bei der Aufreinigung eines Modellproteins in der Form von BSA getestet und zum Anderen die Effektivität synthetisierter IMAC-Hohlfasermembranen bei der Aufreinigung von aus *E.coli* gewonnenen His-tag Proteinen analysiert.

## **3.2 Testung, Etablierung und Optimierung von modifizierten Hohlfasermembranen im Bereich Downstream Processing**

Im diesem Kapitel wird der Einsatz modifizierter Affinitätshohlfasermembranen im Bereich Downstream Processing beschrieben. Es hat sich als vorteilhaft herausgestellt, vorerst mit einzelnen Hohlfasermembranen in Probenreaktionsröhrchen bei der Entwicklung geeigneter Aufreinigungsprotokolle zu arbeiten, um zum Einen ein einfaches Probenhandling und zum Anderen einen hohen Probendurchsatz realisieren zu können. Bei der Synthese gewünschter Affinitätsmembranen werden auf die im Kap. 3.1 etablierten Modifizierungsprotokolle zurückgegriffen.

Neben der Aufreinigung eines Modellproteins in der Form von BSA mittels Ionenaustauscher- und IDA-aktivierten Hohlfasermembranen (Kap. 3.2.1) ist zudem die Verwendung generierter IMAC-Hohlfasermembranen bei der Aufreinigung his-getagter Proteine aus *E.coli* untersucht worden (Kap. 3.2.2 und 3.2.3). Für die Bereitstellung entsprechender Produktmoleküle (GFP-His, Bgl-His) im Bereich Downstream Processing sind Kultivierungen im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt worden. Des Weiteren haben Analysen im Hinblick auf die Regeneration von IMAC-Hohlfasermembranen stattgefunden, um Aussagen hinsichtlich Stabilität und Wiederverwendbarkeit entsprechender Affinitätshohlfasern machen zu können (Kap. 3.2.4).

### **3.2.1 Aufreinigung des Modellproteins BSA mit Anionenaustauscher- und IDA-aktivierten Hohlfasermembranen**

In diesem Abschnitt wird der Einsatz verschiedener mit Liganden dekorierte UltraPES-Hohlfasermembranen bei der Aufreinigung des Modellproteins BSA dargestellt. Neben Anionenaustauschermembranen (UltraPES-Q und -D, Kap. 3.1.3.3) werden auch mit IDA-beladene Fasern (Kap. 3.1.3.4) bei der Proteinreinigung getestet. Durch Einsatz eines Puffersystems im schwach basischen pH-Bereich (pH 7,5) liegen die an der Hohlfasermembran gebundenen IDA-Moleküle in ihrer bipolaren Form vor, so dass terminal neben *tert.* Ammoniumfunktionen auch Carboxylatgruppen zu finden sind.

Durch die Verwendung von Anionenaustauscher- und IDA-aktivierten Membranen lassen sich Proteine, die eine negative Nettoladung aufweisen, an die generierten

Ammoniumgruppen adsorbieren. Als zweckmäßig erweist sich der Einsatz von BSA als Modellprotein, welches sich bei einem pH von 4,8 isoelektrisch verhält und somit in Puffersystemen mit einem pH > pI negativ geladen ist [Aravind et al., 2007]. Bei einer Analyse verschiedener Puffersysteme hat sich die Verwendung von Tris/HCl (pH 7,5) bei der Aufreinigung von BSA als Methode der Wahl herausgestellt [Harkensee et al., 2007], [Kökpınar et al., 2006].

Nach Equilibrierung der zu testenden Hohlfasermembranen (Q-, D- und IDA-Membran) werden diese jeweils mit einer 5 mg/mL-haltigen BSA-Lösung in 25 mM Tris/HCl bei pH 7,5 (Bindungspuffer) für 1 h bei RT inkubiert. Nach ausreichend durchgeführten Waschschritten, um überschüssige und schwach gebundene BSA-Moleküle zu entfernen, werden adsorbierte BSA-Moleküle durch Verwendung von Elutionspuffern mit ansteigender Salzkonzentration (NaCl) aufgereinigt. Für die Elutionen werden vier unterschiedliche 25 mM Tris/HCl-haltige Puffer (pH 7,5) eingesetzt, deren NaCl-Konzentrationen 0,3 M, 0,6 M, 0,9 M bzw. 1,5 M betragen. Eine detaillierte Beschreibung der BSA-Aufreinigung mit modifizierten Q-, D- und IDA-Membranen ist dem Anhang unter Kap. 6.7.1 zu entnehmen.

Um die Effizienz der BSA-Aufreinigungen bewerten zu können, sind die Proteinkonzentrationen der Proben mittels Bradford-Test bestimmt worden (siehe Kap. 6.9.1). Dieser quantitative Proteinbestimmungs-Test beruht darauf, dass sich in Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu das Absorptionsmaximum des eingesetzten Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G250 von 465 zu 595 nm verschiebt. Der Grund für die Stabilisierung des Farbstoffes in seiner unprotonierten, anionischen Sulfatform ist auf die Komplexbildung zwischen dem Protein in der Probe und dem Farbstoff zurückzuführen [Lottspeich et al., 1998], [Bradford, 1976].

Die Tab. 14 zeigt die durch einen Bradford-Test ermittelten BSA-Beladungskapazitäten bei der Proteinaufreinigung mit Q-, D- und IDA-UltraPES-Hohlfasermembranen.

Die Bestimmung der an den Membranen adsorbierten BSA-Moleküle (Beladung) ergibt sich aus dem Differenzwert des Signals von Inkubations- und Überstandslösung und liegt in Abhängigkeit von der modifizierten Membran (Q, D, IDA) zwischen 52,08 und 34,64 mg BSA/g UltraPES. Um nicht adsorbierte und schwach gebundene BSA-Moleküle zu entfernen, sind jeweils sechs Waschschriffe bis zur Detektion des Nullwertes angewendet worden. In der Tab. 14 sind zur besseren Übersicht die aufsummierten Werte der BSA-Beladungsdichten bezüglich durchgeführter Waschschriffe angegeben. Erwartungsgemäß nehmen die BSA-

Beladungsdichten hinsichtlich der Elutionen in der Reihenfolge  $E1 > E2 > E3 > E4$  ab. Der Grund für die höheren Elutionswerte beim Einsatz der schwachen Anionenaustauschermembran (D) im Vergleich zur starken Anionenaustauschermembran (Q) ist auf die ermittelten DEA- bzw. TEA-Beladungsdichten von ca. 8 bzw. 4  $\mu\text{mol/g}$  Hohlfasermembran zurückzuführen (Kap. 3.1.3.3), wodurch der D-Membran eine höhere BSA-Beladungskapazität zuzuschreiben ist. Durch Einsatz ansteigender NaCl-Konzentrationen in den Elutionspuffern gelingt es, die adsorbierten BSA-Moleküle fast vollständig von den Membranoberflächen abzulösen, so dass im finalen Elutionsschritt E4 lediglich BSA-Beladungsdichten von  $\leq 0,03$  mg/g nachgewiesen werden.

**Tab. 14:** Ergebnisse der BSA-Aufreinigung basierend auf den Resultaten des Bradford-Tests

Probe	BSA-Beladungskapazitäten [mg/g UltraPES]		
	UltraPES-Q	UltraPES-D	UltraPES-IDA
Beladung	41,41 $\pm$ 27,34	52,08 $\pm$ 9,90	34,64 $\pm$ 9,64
$\Sigma$ Waschfraktionen W1-W6	33,78	34,24	29,86
Elution E1 (0,3 M NaCl)	5,03 $\pm$ 0,02	9,41 $\pm$ 0,35	1,56 $\pm$ 0,02
Elution E2 (0,6 M NaCl)	1,79 $\pm$ 0,02	2,62 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,02
Elution E3 (0,9 M NaCl)	0,62 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,01	0,07
Elution E4 (1,5 M NaCl)	0,03 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,00
$\Sigma$ Waschfraktionen und Elutionen	41,35	47,54	32,04

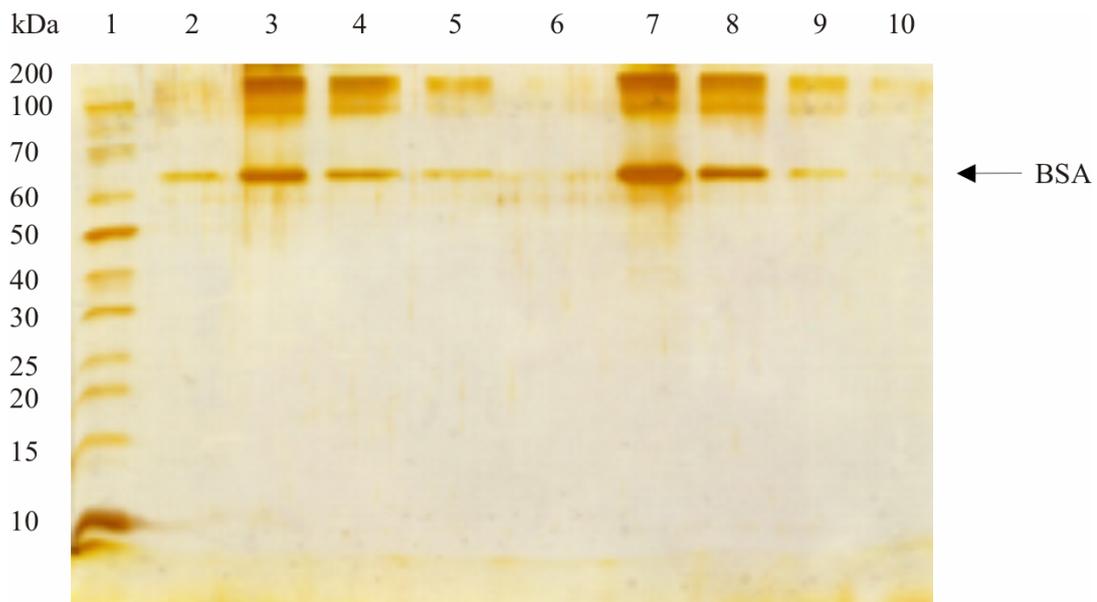
Neben der erfolgreichen BSA-Aufreinigung mit Anionenaustauschern gelingt zudem eine Proteinaufreinigung mit IDA-aktivierten Hohlfasermembranen, wobei jedoch deutlich geringere Beladungskapazitäten erreicht werden. In Bezug zur Beladung nimmt der aufsummierte Anteil aufgereinigter BSA-Moleküle in den Eluaten ( $\Sigma$  E1 bis E4) in der Reihenfolge D (26 %) > Q (18 %) > IDA (6 %) ab, so dass sich erwartungsgemäß der zwitterionische Charakter der an die Membran angekoppelten IDA-Moleküle negativ auf die BSA-Aufreinigung auswirkt. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die in der Literatur

beschriebene Aufreinigung einer Proteinmischung (Albumine, Globuline, Fibrinogene) mit IEX-Hohlfasermembranen aus PS im Vergleich zu PS-Membranen, die terminal angekoppelte Asparaginsäure-Moleküle in zwitterionischer Form aufweisen [Higuchi et al., 2004].

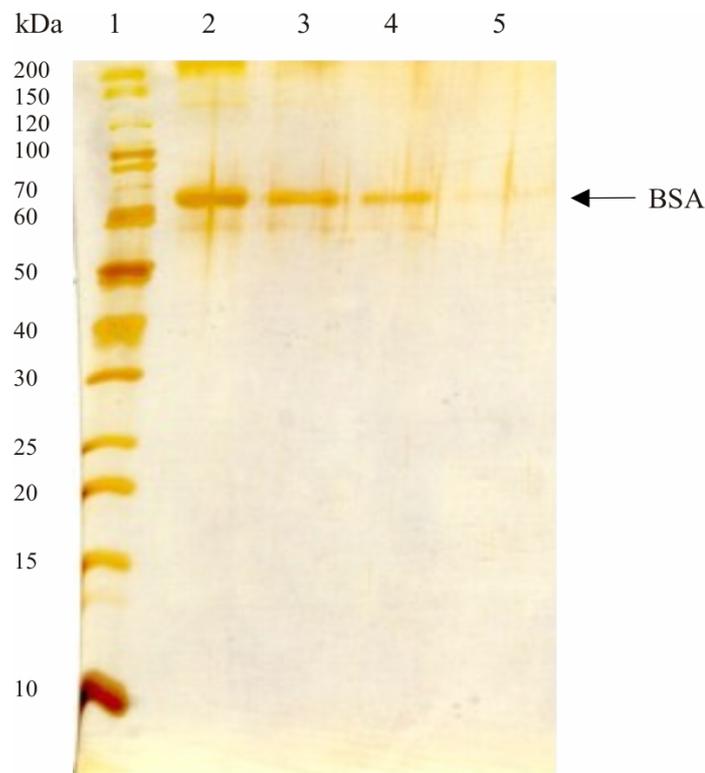
Das Verhältnis der Summe der Wasch- und Eluatfraktionen zur Membranbeladung gibt die Produktwiederfindung an. In Bezug zu den eingesetzten Q-, D- und IDA-Hohlfasermembranen beträgt die Produktwiederfindung 99,9 %, 91,3 % und 92,5 %.

Anhand von Analysen mittels SDS-PAGE können die durch den Bradford-Test erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf die BSA-Aufreinigung bestätigt werden (Abb. 28 und 29). Sowohl bei der Proteinaufreinigung mit Anionenaustauscher- (Q, D) als auch mit IDA-Hohlfasermembranen können BSA-Banden ( $MW_{BSA} = 66,7 \text{ kDa}$ ) in den Eluatfraktionen nachgewiesen werden (Abb. 28, Spur 3-10; Abb. 29, Spur 2-5). Es ist zudem deutlich zu erkennen, dass erwartungsgemäß jeweils die Bandenintensitäten mit ansteigenden Elutionsschritten ( $E1 > E2 > E3 > E4$ ) abnehmen. Die zusätzlich auftretenden Proteinbanden oberhalb des Molekulargewichtes von BSA lassen sich darauf zurückführen, dass Proteine zu Di- bzw. Oligomerisierungen neigen [Marianayagam et al., 2004].

Eine detaillierte Beschreibung zur Durchführung der SDS-PAGE [Laemmli, 1970] und Gelfärbung nach der Silbernitratmethode [Blum et al., 1987] ist im Anhang unter Kap. 6.10 zu finden.



**Abb. 28:** SDS-PAGE-Analyse (15 %iges Acrylamidgel, Silber gefärbt) von der BSA-Aufreinigung mittels Q- und D-UltraPES-Hohlfasermembranen. Spur 1: Marker, Spur 2: pos. Kontrolle (50  $\mu\text{g/mL}$  BSA in Bindungspuffer), Spur 3-6: Elutionen E1-E4 der Q-Membran, Spur 7-10: Elutionen E1-E4 der D-Membran.



**Abb. 29:** SDS-PAGE-Analyse (15 %iges Acrylamidgel, Silber gefärbt) von der BSA-Aufreinigung mittels IDA-aktivierten Hohlfasermembranen. Spur 1: Marker, Spur 2-5: Elutionen E1-E4 der IDA-Membranen.

Nach der erfolgreichen Anwendung von IEX- und IDA-Hohlfasermembranen bei der Aufreinigung eines Modellproteins in der Form von BSA soll in den nachfolgenden Kapiteln der Einsatz synthetisierter IMAC-Hohlfasermembranen bei der Aufreinigung von aus *E.coli* gewonnenen his-getagten Proteinen untersucht werden (Kap. 3.2.3 und Kap. 3.2.4). Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die *E.coli*-Kultivierungen in Schüttelkolben mit 1 L LB-Medium durchzuführen, um ausreichende Produktmengen an his-getagten Proteinen für die nachfolgenden beschriebenen Versuche im Bereich Downstream Processing zur Verfügung stellen zu können (Kap. 3.2.2).

### 3.2.2 Kultivierung von *E.coli* K12 JM109 zur Produktion his-getagter Proteine

Im Bereich der Kultivierung werden zwei unterschiedliche rekombinante *E.coli*-Stämme verwendet, welche von PD Dr. Karl Friehs (AG Fermentationstechnik, Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt worden sind [Miksch et al., 1997], [Borriss et al., 1990]:

- *E.coli*-Stamm K12 JM109 (pGFPx6His) für die Analyse eines intrazellulär gebildeten his-getagten Proteins in der Form von GFP-His (Grün Fluoreszierendes Protein)
- *E.coli*-Stamm K12 JM109 (pET-Bgl-His) für die Analyse eines his-getagten Enzyms in der Form von Bgl-His ( $\beta$ -Glucanase-His), dass sowohl intrazellulär gebildet als auch sekretiert wird

Die Schüttelkolbenkultivierungen der beiden Stämme *E.coli* (GFP-His) und *E.coli* (Bgl-His) sind jeweils mit Zellen aus einer Stammhaltungsplatte in 1 L LB-Medium (10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl) mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin bei 120 rpm und 30 °C für 27 h durchgeführt worden. Die Stämme stehen unter Einfluss des *lac*-Promotors und können entsprechend durch Zugabe des synthetischen Induktors IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) Produkt in der Form von GFP-His bzw. Bgl-His exprimieren. Die Induktion mit IPTG (1 mM IPTG Endkonzentration im Medium) ist nach ca. 4 h bei einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,9 rel. AU erfolgt. Nach Beendigung der Kultivierung ist für den Stamm *E.coli* (GFP-His) eine  $\text{OD}_{600}$  von 4,06 rel. AU ermittelt worden, für den Stamm *E.coli* (Bgl-His) eine  $\text{OD}_{600}$  von 5,09 rel. AU.

Die Zellernte der Bakterien ist mittels Zentrifugation (15 min bei 4 °C und 4.000 rpm) in 50 mL-Reaktionsröhrchen durchgeführt worden. Die entsprechenden Zellpellets sind anschließend einmal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen worden, um restliche Medienbestandteile zu entfernen (Zentrifugationsschritt: 30 min bei 4 °C und 4.000 rpm). Nach Resuspendieren der Zellpellets in Aufschlusspuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, pH 8) werden diese vereinigt und können durch wiederholendes Einfrieren und Auftauen (sieben Zyklen) aufgeschlossen werden. Nach durchgeführter Zell-Lyse werden die Zelldebris durch Zentrifugation (30 min bei 4 °C und 4.000 rpm) abgetrennt und die erhaltenen Überstände können für Versuche im Bereich des Downstream Processings eingesetzt werden.

Da in Bezug zum Stamm *E.coli* (Bgl-His) neben der intrazellulären Produktbildung auch die Produktsekretion im Mittelpunkt der Untersuchungen stand, sind hier das Zellpellet sowie der Kulturüberstand separat voneinander aufgearbeitet worden. Bis zur Verwendung entsprechender aufgearbeiteter Proben im Bereich des Downstream Processings his-getagter Proteine durch Einsatz von IMAC-Hohlfasermembranen können diese bei -20 °C gelagert werden.

### **3.2.3 Einsatz von IMAC-Hohlfasermembranen für die Aufreinigung his-getagter Proteine aus *E.coli***

Um die Effizienz synthetisierter IMAC-Hohlfasermembranen (Kap. 3.1.3.5) bei der Aufarbeitung his-getagter Proteine (GFP-His, Bgl-His) aus *E.coli* zu testen, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, mit modifizierten Einzelfasern in Probenröhrchen zu arbeiten, um neben dem einfachen Probenhandling einen hohen Probendurchsatz realisieren zu können. Nach der Etablierung geeigneter Aufarbeitungsprotokolle wird eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das System Mikro-Hohlfaserreaktor (MHFR) angestrebt, wobei entsprechende mit IMAC-Hohlfasermembranen ausgestattete Module (IMAC-Hohlfasermodule) hinsichtlich optimierter Adsorptions-, Wasch- und Elutionsprofile getestet werden (Kap. 3.3).

In den nachfolgenden Kapiteln 3.2.3.1 und 3.2.3.2 wird die Proteinaufreinigung der his-getagten Proteine in der Form von GFP-His (intrazelluläre Produktbildung) und Bgl-His (Analyse des intrazellulär gebildeten und des sekretierten Produktes) aus *E.coli* mittels IMAC-Hohlfasermembranen auf MicroPES- und UltraPES-Basis untersucht.

#### **3.2.3.1 Einsatz von IMAC-Hohlfasermembranen für die Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli***

In diesem Abschnitt wird die Effektivität synthetisierter IMAC-Hohlfasermembranen auf IDA-Basis bei der Aufreinigung des intrazellulär gebildeten Proteins GFP-His aus *E.coli* beschrieben. Für die Proteinaufreinigung werden verschiedene IMAC-Hohlfasermembran-typen in der Form von Micro- und UltraPES-Fasern eingesetzt, welche mit unterschiedlichen Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) dekoriert worden sind (Kap. 3.1.3.5). Neben der

Ermittlung der Beladungskapazität der verschiedenen IMAC-Membranen, um die Bindungsstärke entsprechender komplexierter Metallionen im Aufreinigungsprozess zu beschreiben, ist der Einfluss der eingesetzten Metallionen im Hinblick auf die Selektivität bei der GFP-His-Aufreinigung ein wichtiger zu untersuchender Aspekt.

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, mit jeweils 100 mg IMAC-Hohlfasermembranen in Probenreaktionsröhrchen zu arbeiten, wobei die verschiedenen Schritte des Aufarbeitungsprozesses standardmäßig bei RT und 1.000 rpm durchgeführt worden sind.

Nach der Equilibrierung der IMAC-Hohlfasern (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) für 15 min werden diese mit 5 mL einer 138,6 µg/mL-haltigen GFP-His-Lösung (verdünnt mit Aufschlusspuffer) für 1 h inkubiert. Nach ausreichend durchgeführten Waschschritten (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) zur Entfernung nicht und schwach gebundener Moleküle werden gebundene GFP-His-Moleküle durch Verwendung eines 250 mM-Imidazol-haltigen Elutionspuffers (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8) von den IMAC-Hohlfasermembranen abgelöst und liegen in aufgereinigter Form vor (Kap. 6.7.2) [Miksch et al., 1997], [Borriss et al., 1990].

Um die Effizienz der Aufreinigungsprozesse bewerten zu können, sind zum Einen über eine indirekte Produktbestimmung die Proteinkonzentrationen der Proben mittels Bradford-Test bestimmt worden. Zum Anderen ist ein direkter Nachweis des GFP-His in den Proben mittels fluoreszenzspektroskopischer Messung (Hitachi Fluoreszenz-Spektralphotometer F-4500) erfolgt, wobei die entsprechende Exzitations- bzw. Emissionswellenlänge des Hauptpeaks bei 395 nm bzw. 510 nm verwendet worden ist. Die Erstellung der Kalibrationen im Hinblick auf die verschiedenen eingesetzten Puffersysteme (Aufschluss-, Wasch-, Elutions- und Regenerationspuffer) ist durch Verwendung eines kommerziell erhältlichen rekombinanten GFP aus transformierten *E.coli*-Zellen (BD Biosciences, Heidelberg) erfolgt [Mazzola et al., 2006]. Die entsprechenden Kalibrationen sind im Anhang unter Kap. 6.8 dargestellt.

Die Tab. 15 zeigt die Ergebnisse der Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* durch Einsatz von mit verschiedenen Metallionen (Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup>) dekorierten IMAC-Hohlfasermembranen auf MicroPES- und UltraPES-Basis. Um die Bindungsstärke der verschiedenen eingesetzten Metallionen bewerten zu können, sind die Beladungskapazitäten bezüglich der adsorbierten Moleküle (Beladung) sowie der eluierten Moleküle (Elution)

dargestellt. Entsprechende Probenanalysen sind durch Bestimmung des Gesamtprotein-gehaltes und der GFP-His-Konzentration erfolgt.

**Tab. 15:** Resultate der Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* mittels IMAC-Hohlfasermembranen aus PES

IMAC-Hohlfasermembran	Beladungskapazitäten [mg/g Hohlfaser]			
	Proteinbeladungsdichte [mg Protein/g Hohlfaser]		GFP-His-Beladungsdichte [mg GFP-His/g Hohlfaser]	
	Beladung	Elution	Beladung	Elution
MicroPES-Cu <sup>2+</sup>	43,57	5,81	5,45	3,01
MicroPES-Ni <sup>2+</sup>	18,13	3,03	5,58	1,96
MicroPES-Co <sup>2+</sup>	12,87	0,21	4,87	0,04
MicroPES-Zn <sup>2+</sup>	26,90	0,31	4,83	0,04
UltraPES-Cu <sup>2+</sup>	36,55	1,66	5,05	1,14
UltraPES-Ni <sup>2+</sup>	19,88	2,82	5,36	1,84
UltraPES-Co <sup>2+</sup>	35,67	0,32	4,65	0,22
UltraPES-Zn <sup>2+</sup>	32,16	1,95	4,55	0,89

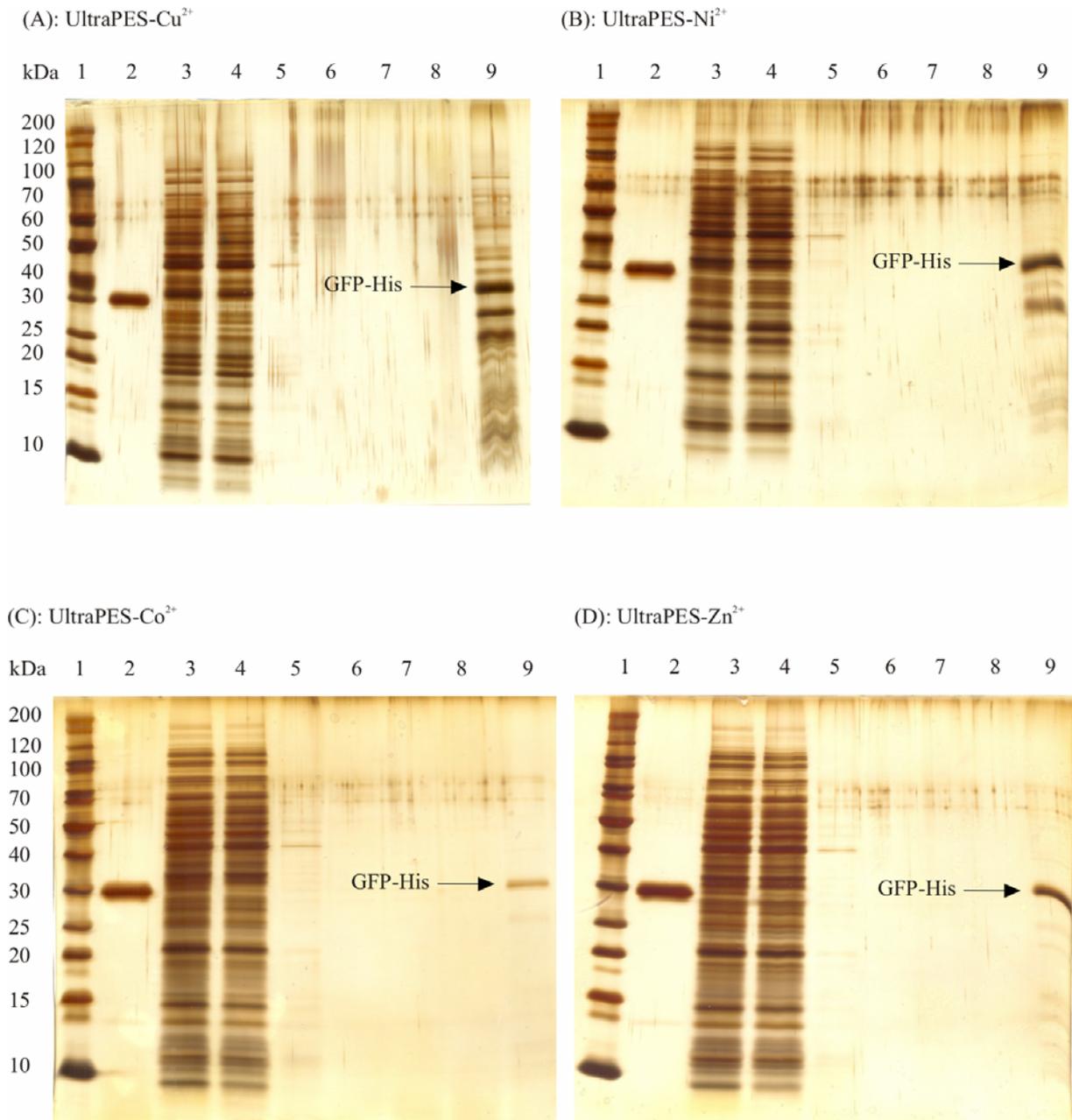
Wie erwartet sind die ermittelten Konzentrationswerte der Beladungen deutlich höher als die der Elutionen, da unspezifische Bindungseffekte bei der Adsorption berücksichtigt werden. Weitere Gründe für die geringeren Elutionswerte können in der Unzugänglichkeit komplexierter Metallionen in den Membranporen oder in Auswascheffekten durch Verwendung eines 20 mM-Imidazol-haltigen Puffers liegen. In Abhängigkeit der eingesetzten IMAC-Hohlfasern werden bei der Adsorption (Beladung) Beladungskapazitäten von 43,57-12,87 mg Protein/g Hohlfaser bzw. 5,58-4,55 mg GFP-His/g Hohlfaser ermittelt. In Anlehnung an die Arbeiten von Porath und Sulkowski sollte die Bindungsstärke von Proteinen mit zugänglichen His-Resten (z.B. His-tag Proteine) an IMAC-Matrizes in der Reihenfolge Cu<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > Co<sup>2+</sup> abnehmen [Porath, 1992], [Sulkowski, 1989]. Bei Betrachtung der Elutionswerte (mg GFP-His/g Hohlfaser) kann diese vorgeschlagene Reihenfolge mit Aus-

nahme einer vertauschten Reihenfolge hinsichtlich UltraPES-Cu<sup>2+</sup> und UltraPES-Ni<sup>2+</sup> bestätigt werden.

Neben der Analyse der Bindungsstärke von GFP-His an IMAC-Hohlfasermembranen ist die Beurteilung der Selektivität beim Aufreinigungsprozess ein wichtiger zu untersuchender Aspekt, um Aussagen hinsichtlich der Reinheit aufgearbeiteter Proben machen zu können.

In der Abb. 30 ist die Analyse via SDS-PAGE von der Aufreinigung von GFP-His aus dem Zell-Lysat aufgeschlossener *E.coli*-Zellen mittels IMAC-Hohlfasermembranen auf UltraPES-Basis dargestellt. Wie erwartet zeigen die Spuren, die die Inkubationslösungen und die Probenüberstände repräsentieren (A-D, Spuren 3 und 4), eine Proteinmischung, bestehend aus dem Produkt GFP-His (ca. 27 kDa) sowie weiteren Proteinen (z.B. Stoffwechsel- und Membranproteine), die auf die Zell-Lyse zurückzuführen sind. Durch Anwendung von vier Waschschrritten konnte eine ausreichende Entfernung ungebundener und schwach gebundener Moleküle erzielt werden (A-D, Spuren 5-8). Hinsichtlich der Elution kann konstatiert werden, dass die eingesetzte IMAC-Membran in Form von UltraPES-Co<sup>2+</sup> die höchste Selektivität beim Aufreinigungsprozess aufweist, da neben dem Produkt GFP-His keine Proteinverunreinigungen detektiert werden (C, Spur 9). Der Grad der Selektivität bei der Aufreinigung von GFP-His nimmt in Übereinstimmung mit Literaturdaten in umgekehrter Reihenfolge in Bezug zur Bindungsstärke ab: Co<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup> (A-D, Spur 9) [de Aquino et al., 2006], [Owens et al., 2001], [Porath, 1992], [Porath, 1988].

Somit können je nach Zielsetzung im Aufreinigungsprozess Prioritäten durch die Auswahl eingesetzter Metallionen hinsichtlich Bindungsstärke und Selektivität gesetzt werden. Für die im nachfolgenden Kap. 3.2.3.2 beschriebene Aufreinigung von Bgl-His aus *E.coli* werden ausschließlich mit Co<sup>2+</sup>-Ionen dekorierte IDA-Membranen verwendet, um eine Produkt-aufreinigung mit hohem Reinheitsgrad realisieren zu können.



**Abb. 30:** SDS-PAGE-Analyse (15 %iges Acrylamidgel, Silber gefärbt) von der Aufreinigung von GFP-His aus dem Zell-Lysat aufgeschlossener *E.coli*-Zellen mittels UltraPES-IMAC-Hohlfasermembranen (A-D). Spur 1: Marker, Spur 2: pos. Kontrolle (50 µg/mL rek. GFP in Aufschlusspuffer), Spur 3: Inkubationslösung (Zell-Lysat ohne Zelltrümmer), Spur 4: Überstand, Spur 5-8: Waschfraktionen W1-W4, Spur 9: Eluatfraktion.

### 3.2.3.2 Einsatz von IMAC-Hohlfasermembranen für die Aufreinigung des Enzyms Bgl-His aus *E.coli*

In diesem Abschnitt wird die Effizienz von mit  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen dekorierten Membranen bei der Aufreinigung des Enzyms Bgl-His aus *E.coli* untersucht. Neben der Analyse des intrazellulär gebildeten Produktes nach durchgeführter Zell-Lyse (wiederholendes Einfrieren und Auftauen, sieben Zyklen) ist auch der Kulturüberstand im Hinblick auf den Anteil sekretierter Bgl-His-Moleküle untersucht worden.

Um eine vollständige Absättigung der IMAC-Membranen mit Produktmolekülen aus dem Kulturüberstand zu erreichen, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, zum Einen mit aufkonzentrierten Proben (Faktor 10) durch Verwendung sog. Zentrifugalkonzentratoren (Sartorius Stedim Biotec, Göttingen; Vivaspin 20 mL, MWCO 5 kDa) zu arbeiten und zum Anderen eine dreimalige Beladung mit entsprechender Bgl-His-Inkubationslösung durchzuführen. Um die Effektivität synthetisierter Hohlfasermembranen des Typs UltraPES- $\text{Co}^{2+}$  (Kap. 3.1.3.5) bei der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Kulturüberstand bewerten zu können, hat an dieser Stelle ein Vergleich mit kommerziell erhältlichen Proteinaufreinigungs-tools in der Form von Membranadsorber-Modulen auf IMAC-Basis (Sartorius Stedim Biotec, Göttingen; Vivapure Metal chelate Mini Spin Columns,  $\text{Co}^{2+}$ -dekoriert) stattgefunden. Diese Module werden als Einsätze in 2 mL-Reaktionsgefäßen verwendet, wobei die Aufreinigungsprozedur in Tischzentrifugen durchgeführt werden kann. Die Cellulose-Membranen der eingesetzten Spin-Module (15-lagig) sind mit metallchelatisierenden IDA-Gruppen vor-funktionalisiert und können durch Beladung mit entsprechenden Metallionen (z.B.  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen) in den jeweiligen IMAC-Membrantyp überführt werden [Harkensee, 2007], [Kökpinar et al., 2006].

Die Proteinaufreinigungen mittels UltraPES- $\text{Co}^{2+}$ -Hohlfasermembranen bzw. Spin-Modulen sind in Anlehnung an das verwendete Puffersystem, dass bei der Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* (Kap. 3.2.3.1) angewendet worden ist, durchgeführt worden. Eine detaillierte Beschreibung der Aufreinigungsprozesse ist im Anhang unter Kap. 6.7.3 und 6.7.4 zu finden.

Die Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte sind hinsichtlich der Gesamtprotein-konzentration (Bradford-Test) und der Enzymaktivität untersucht worden.

Der angewendete Enzymaktivitäts-Test basiert auf den von Ghose und Miller dargestellten Methoden zum Nachweis reduzierender Zucker mittels Dinitrosalicylsäure-Reagenz (DNS-

Reagenz) [Ghose, 1987], [Miller, 1959]. Das Enzym  $\beta$ -Glucanase (EC 3.2.1.6) ist den O-glykosidisch spaltenden Hydrolasen zuzuordnen und ist in der Lage entsprechende 1,3- und 1,4-O-glycosidische Bindungen zwischen verknüpften Glukoseeinheiten eines Polysaccharids (Glucans) zu spalten. Es hat sich bei der Entwicklung des Enzymassays als zweckmäßig erwiesen, mit einem Substrat in der Form von  $\beta$ -D-Glucan (aus Gerste) zu arbeiten. Glucanase-haltige Proben zeichnen sich dadurch aus, dass reduzierende Zuckermoleküle (Glukoseeinheiten) aus dem Substrat  $\beta$ -D-Glucan freigesetzt werden, welche über eine Farbreaktion mit DNS-Reagenz nachgewiesen und photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 540$  nm quantifiziert werden können. Eine genaue Beschreibung zur Durchführung des Enzymaktivitäts-Tests ist im Anhang (Kap. 6.9.2) dargestellt.

Die Tab. 16 zeigt die Ergebnisse des Bradford- und Enzymaktivitäts-Tests von der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zell-Lysat und Kulturüberstand von *E.coli* mittels  $\text{Co}^{2+}$ -beladenen Membranen.

Es kann konstatiert werden, dass sowohl das intrazellulär als auch das extrazellulär gebildete Bgl-His erfolgreich aufgereinigt werden konnte, wobei die ermittelten Beladungskapazitäten bezüglich der Proteinkonzentration und Enzymaktivität bei der Aufreinigung des intrazellulären im Vergleich zum sekretierten Produkt deutlich höher ausfallen. Es werden bei der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zell-Lysat im Hinblick auf die Elution Beladungskapazitäten von  $0,25 \pm 0,01$  mg Protein/g Hohlfaser bzw. 27 U/g Hohlfasermembran ermittelt.

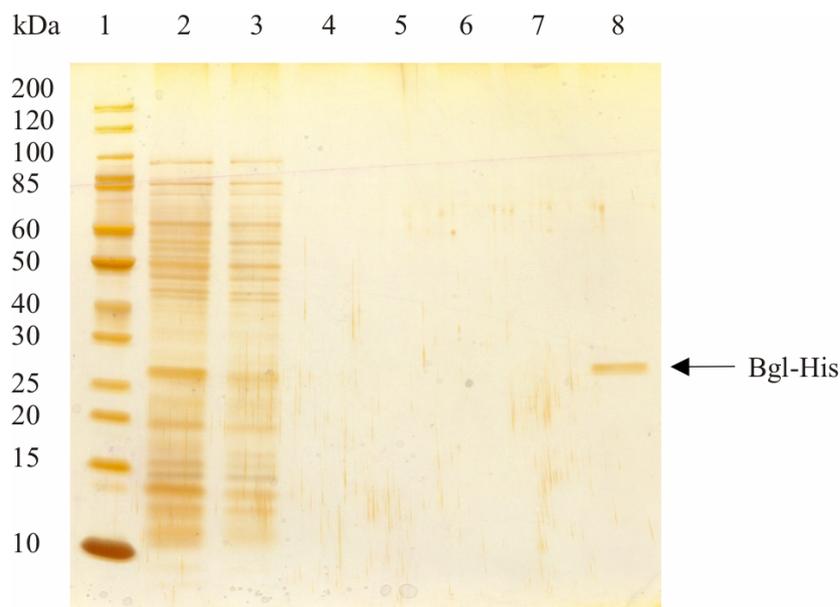
**Tab. 16:** Ergebnisse der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zell-Lysat und Kulturüberstand von *E.coli* mittels  $\text{Co}^{2+}$ -beladenen IDA-Membranen

Aufreinigungsstrategie (IMAC-Membrantyp)	Beladungskapazitäten			
	Proteinbeladungsdichte [mg Protein/g Membran]		Enzymaktivität [U/g Membran]	
	Beladung	Elution	Beladung	Elution
Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zell-Lysat (UltraPES- $\text{Co}^{2+}$ )	19,52 ± 3,29	0,25 ± 0,01	2.100	27
Aufreinigung von Bgl-His aus dem Kulturüberstand (UltraPES- $\text{Co}^{2+}$ )	B1: 1,11 ± 0,79 B2: 1,02 ± 0,03 B3: 0,85	E1: 0,16 ± 0,02 E2: 0,05 ± 0,02 E3: 0,03 ± 0,01	B1: 87 B2: 70 B3: 67	E1: 9 E2: 0 E3: 0
Aufreinigung von Bgl-His aus dem Kulturüberstand (Spin-Modul, $\text{Co}^{2+}$ -dekoriert)	B1: 0,14 ± 0,02 B2: 0,06 ± 0,02 B3: 0,02 ± 0,01	E1: 0,06 ± 0,05 E2: 0,01 E3: 0	B1: 30 B2: 26 B3: 24	E1: 14 E2: 0 E3: 0

Für eine detailliertere Beschreibung des Aufreinigungsprozesses von Bgl-His aus dem Kulturüberstand ist neben UltraPES- $\text{Co}^{2+}$ -Fasern auch ein kommerziell erhältliches Produkt in Form eines Spin-Moduls ( $\text{Co}^{2+}$ -beladene Membranadsorbereinheit) verwendet worden. Bei diesen Aufreinigungsprozeduren sind entsprechende IMAC-Membranen dreimal mit dem aufkonzentrierten Kulturüberstand (Faktor 10) beladen worden (B1-B3) und nach ausreichend angewendeten Waschschritten sind gebundene Produktmoleküle mittels dreimaliger Elution (E1-E3) isoliert worden. Wie erwartet können aufgrund der Absättigung der IMAC-Membranen mit Produktmolekülen mit ansteigenden Beladungsschritten ( $B1 > B2 > B3$ ) immer weniger Produktmoleküle anbinden. Im Hinblick auf die ermittelten Proteinbeladungskapazitäten der Elutionswerte zeigt sich, dass mit ansteigender Anzahl durchgeführter Elutionen immer weniger Produktmoleküle von der Membran abgelöst werden können ( $E1 > E2 > E3$ ). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch bei Betrachtung der Enzym-

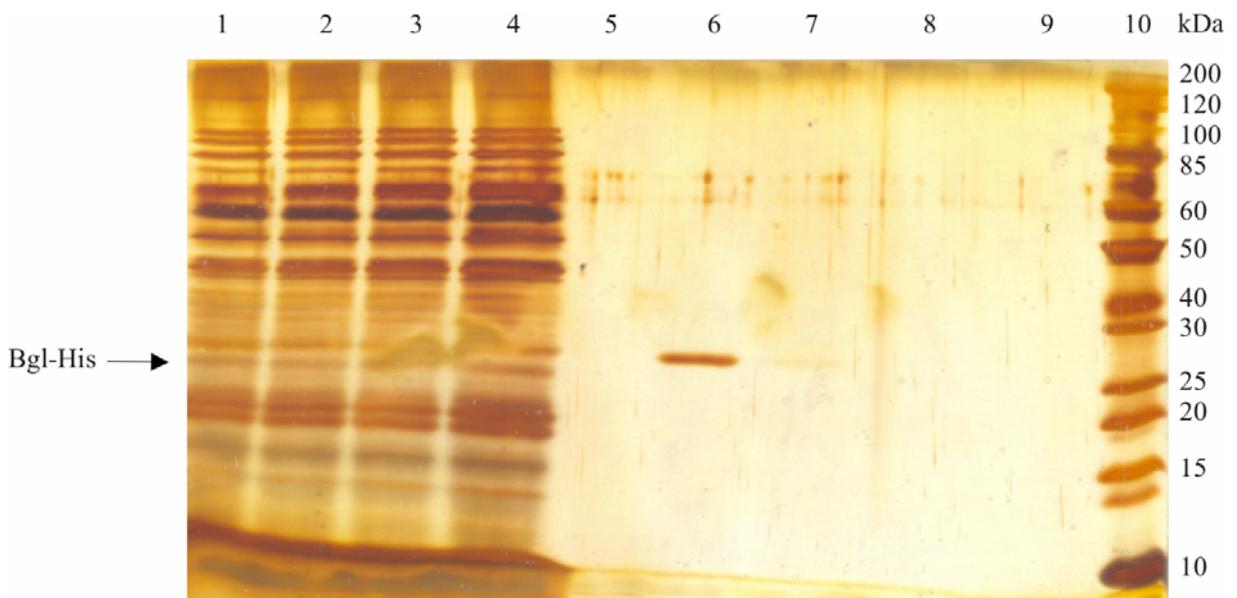
aktivitäten der Elutionsproben wider, wobei nur in den ersten Elutionsproben (E1) beim Einsatz von UltraPES-Co<sup>2+</sup>-Fasern bzw. Spin-Modulen Enzymaktivitäten von 9 bzw. 14 U/g Membran nachgewiesen werden konnten.

Durch eine abschließende Analyse mittels SDS-PAGE kann neben den quantitativen Ergebnissen auch die Probenreinheit bei der Proteinaufreinigung beschrieben werden. Die in den Abb. 31 und 32 dargestellten SDS-PAGE-Analysen bestätigen die auf den Bradford- und Enzymaktivitäts-Test basierenden Ergebnisse. Bei der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zell-Lysat zeigen die Spuren der Inkubationslösung und des Probenüberstandes eine Proteinmischung, bestehend aus dem Produkt Bgl-His (ca. 26,7 kDa) sowie weiteren Proteinen (z.B. Stoffwechsel- und Membranproteine), die auf die Zell-Lyse zurückzuführen sind (Abb. 31, Spur 2 und 3). Wie erwartet ist dabei die Bandenintensität des Moleküls Bgl-His des Probenüberstandes im Vergleich zur Inkubationslösung deutlich schwächer, so dass davon ausgegangen werden kann, dass entsprechende Produktmoleküle an den IMAC-Membranen adsorbiert haben. Durch Anwendung von vier Waschschritten konnte eine ausreichende Entfernung ungebundener und schwach gebundener Moleküle erzielt werden (Abb. 31, Spuren 4-7). Mittels eines Imidazol-haltigen Puffers (250 mM) konnte das Produkt Bgl-His erfolgreich und mit hohem Reinheitsgrad isoliert werden (Abb. 31, Spur 8).



**Abb. 31:** SDS-PAGE-Analyse (15 %iges Acrylamidgel, Silber gefärbt) von der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zell-Lysat aufgeschlossener *E.coli*-Zellen mittels UltraPES-Co<sup>2+</sup> Hohlfasermembranen. Spur 1: Marker, Spur 2: Inkubationslösung (Zell-Lysat ohne Zelltrümmer), Spur 3: Überstand, Spur 4-7: Waschfraktionen W1-W4, Spur 8: Eluatfraktion.

Des Weiteren gelingt ebenfalls die Aufreinigung des sekretierten Produktes Bgl-His aus dem Kulturüberstand durch Verwendung  $\text{Co}^{2+}$ -funktionalisierter Spin-Module. Erwartungsgemäß sind Bgl-His-Banden bei der Spur der Inkubationslösung (Abb. 32, Spur 1) und in abgeschwächter Intensität bei den Spuren der Durchläufe D1-D3 (Abb. 32, Spuren 2-4) zu erkennen. Hinsichtlich durchgeführter Elutionen kann wie erwartet nur in der ersten Eluatfraktion (Abb. 32, Spur 6, E1) das Produktmolekül Bgl-His ohne Proteinverunreinigungen nachgewiesen werden.



**Abb. 32:** SDS-PAGE-Analyse (15 %iges Acrylamidgel, Silber gefärbt) von der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Kulturüberstand (*E.coli*) durch Einsatz von mit  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen beladenen Spin-Modulen. Spur 1: Inkubationslösung (aufkonzentrierter Kulturüberstand, Faktor 10), Spur 2-4: Durchläufe D1-D3, Spur 5: finale Waschfraktion W3, Spur 6-8: Eluatfraktionen E1-E3, Spur 9: Regenerationsprobe, Spur 10: Marker.

Im Hinblick auf die Realisierung integrierter Abläufe durch Kombination von Kultivierungs- und Aufreinigungsprozessen in dem System MHFR kann somit der Modellorganismus *E.coli* (Bgl-His) eingesetzt und getestet werden (Kap. 3.4). Ziel dieses integrierten Downstreamings soll es sein, dass das während der Kultivierung sekretierte Produkt Bgl-His an vor-funktionalisierte  $\text{Co}^{2+}$ -Hohlfasern im System binden und nach Abführung der Kulturbrühe aus dem Reaktor aufgereinigt werden kann.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Entwicklung von Aufreinigungsprozessen ist die Regeneration und damit verbundene Wiederverwendbarkeit der Affinitätsmatrizes, welche im nachfolgenden Kap. 3.2.4 näher beschrieben wird.

### 3.2.4 Regeneration und Wiederverwendbarkeit von IMAC-Hohlfasermembranen

Es hat sich bei den Versuchen zur Regeneration und Wiederverwendbarkeit als zweckmäßig erwiesen mit  $\text{Cu}^{2+}$ - und  $\text{Ni}^{2+}$ -dekorierten UltraPES-Fasern á 100 mg (18,91  $\mu\text{mol Cu}^{2+}$  bzw. 21,31  $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{g}$  UltraPES) zu arbeiten, da diesen IMAC-Membranen eine hohe Bindungsstärke gegenüber his-getagten Proteinen zuzuschreiben ist (Kap. 3.2.3.1).

Im Hinblick auf die Aufreinigungsprozedur wird das in Kap. 3.2.3.1 beschriebene Protokoll zur Produktaufreinigung übernommen, wobei hier die IMAC-Hohlfasermembranen abweichend mit einer 32,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -haltigen GFP-His-Inkubationslösung (4 mL) beladen worden sind. Nach ausreichend durchgeführten Waschsritten und Anwendung eines Elutionsschrittes werden die IMAC-Fasern regeneriert, wobei zwei unterschiedliche Regenerationsmethoden getestet werden. Zum Einen wird der Einfluss der Verwendung eines starken Chelators in der Form einer 50 mM EDTA-2Na-Lösung (pH 8) gefolgt von einer Neubeladung mit Metallionen im Hinblick auf die Wiederverwendbarkeit der IMAC-Membranen untersucht. Zum Anderen wird ein hoch konzentrierter Imidazol-haltiger Puffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, pH 8,5) zur Regeneration eingesetzt. Nach durchgeführter Regeneration werden die Fasern re-equilibriert und können erneut beladen werden [de Aquino et al., 2006], [Serpa et al., 2005], [Yang et al., 1999].

Um die Effizienz der Regenerationsmethoden bewerten zu können, sind die Elutionsproben nach jedem Regenerationszyklus auf den GFP-His-Gehalt fluoreszenzspektroskopisch untersucht worden. In der Tab. 17 sind die Resultate in Bezug zur Regeneration mittels EDTA dargestellt.

**Tab. 17:** Regeneration von UltraPES-Cu<sup>2+</sup>- und UltraPES-Ni<sup>2+</sup>-Hohlfasermembranen mittels EDTA

Regenerationszyklus	Absolute Menge eluierter GFP-His-Moleküle [ $\mu\text{g}$ ]	
	UltraPES-Cu <sup>2+</sup>	UltraPES-Ni <sup>2+</sup>
1	0,88 $\pm$ 0,01	1,69 $\pm$ 0,03
2	0,82 $\pm$ 0,10	1,62 $\pm$ 0,02
3	0,83 $\pm$ 0,05	1,64 $\pm$ 0,08
4	0,82 $\pm$ 0,10	1,55 $\pm$ 0,01
5	0,75 $\pm$ 0,04	1,62 $\pm$ 0,08

Es ist erkennbar, dass hinsichtlich eingesetzter UltraPES-Cu<sup>2+</sup>- und UltraPES-Ni<sup>2+</sup>-Hohlfasermembranen die Menge an eluierten GFP-His-Molekülen nur insignifikant nach fünf Regenerationszyklen abnimmt. Im Gegensatz dazu können beim Einsatz des 1 M Imidazolhaltigen Regenerationspuffers bereits nach dem ersten Regenerationszyklus keine Fluoreszenzintensitäten in den Elutionsproben detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Es ist anzunehmen, dass die Verwendung einer solch hohen Imidazolkonzentration (1 M) zu einer irreversiblen Blockierung der Metallionen auf der Hohlfaseroberfläche führt, so dass während der zweiten Probenbeladung keine weiteren GFP-His-Moleküle anbinden können. Um entsprechend starke Blockierungseffekte zu vermeiden, empfiehlt es sich, Imidazolkonzentrationen im Bereich von 200-500 mM zu verwenden. Yang et al. berichten von einer erfolgreichen Regeneration von Cellulose-IDA-Cu<sup>2+</sup>-Membranen bei der Aufreinigung einer Katalase durch Verwendung eines 200 mM Imidazolhaltigen Puffers, wobei sich jedoch die Bindungskapazitäten nach jedem Regenerationszyklus verringern [Yang et al., 1999].

Beim Vergleich beider Regenerationsmethoden kann konstatiert werden, dass die Verwendung des starken Chelators EDTA gefolgt von einer Neubeladung mit Metallionen für eine erfolgreiche Regeneration und Wiederverwendbarkeit von IMAC-Hohlfasermembranen genutzt werden kann. Im Vergleich zur Imidazol-Methode wirken sich jedoch die zeitintensive Ablösung und Neubeladung der Metallionen und der damit einhergehende Mehrverbrauch an Metallsulfatlösungen nachteilig aus.

### 3.2.5 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Abschnitt konnte aufgezeigt werden, wie heterogen modifizierte Affinitäts-hohlfasermembranen in der Form von Ionenaustauscher-, IDA-aktivierten und IMAC-Hohlfasern erfolgreich im Bereich des Downstream Processings eingesetzt worden sind.

Durch den Einsatz modifizierter Q- und D-Hohlfasermembranen konnte die Aufreinigung eines Modellproteins in der Form von BSA realisiert werden. Weiterhin zeigen IDA-aktivierte Membranen neben ihren chelatisierenden Eigenschaften auch Anwendungspotential im Bereich der Proteinaufreinigung, wobei der zwitterionische Charakter terminaler Funktionsgruppen (Ammonium- und Carboxylatgruppen) über den pH-Wert der eingesetzten Reaktionslösungen steuerbar ist. Im Vergleich zu den verwendeten Anionenaustauscher-membranen bei der BSA-Aufreinigung werden jedoch deutlich geringere Beladungs-kapazitäten erreicht (Kap. 3.2.1).

Anhand der Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* (Kap. 3.2.3.1) ist der Einfluss häufig verwendeter Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) von IMAC-Hohlfasermembranen im Hinblick auf die Bindungsstärke und Selektivität im Aufreinigungsprozess untersucht worden. In Übereinstimmung mit Literaturdaten konnte aufgezeigt werden, dass die Bindungsstärke gegenüber GFP-His-Molekülen in der Reihenfolge  $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$  abnimmt. In Bezug zur Selektivität eingesetzter Metallionen ist anhand von SDS-PAGE-Analysen nachgewiesen worden, dass die Probenreinheit in den Eluatfraktionen in umgekehrter Reihenfolge zur Bindungsstärke abnimmt ( $\text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ ).

Der Testorganismus *E.coli* (Bgl-His) ist in der Lage, das his-getagte Produkt sowohl intrazellulär zu bilden als auch zu sekretieren, so dass Produktaufreinigungen aus dem Zell-Lysat und Kulturüberstand durchgeführt worden sind. Durch Einsatz von mit  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen beladenen IMAC-Membranen kann eine erfolgreiche Aufreinigung des intra- und extrazellulär gebildeten Enzyms Bgl-His mit hohem Reinheitsgrad und in aktiver Form (9-27 U/g Membran) erreicht werden (Kap. 3.2.3.2)

Für die angestrebte Wiederverwendbarkeit modifizierter IMAC-Hohlfasermembranen hat es sich als zweckmäßig erwiesen, nach durchgeführten Elutionsschritten des Proteinaufrei-nigungsprozesses komplexierte Metallionen durch Verwendung eines starken Chelators in der Form von EDTA von der Hohlfasermembranoberfläche abzulösen und die Chelatmembranen erneut mit gewünschten Metallionen zu dekorieren. Nach Re-Equilibration der IMAC-

Membranen können diese für weitere Anwendungen im Bereich Downstream Processing genutzt werden (Kap. 3.2.4).

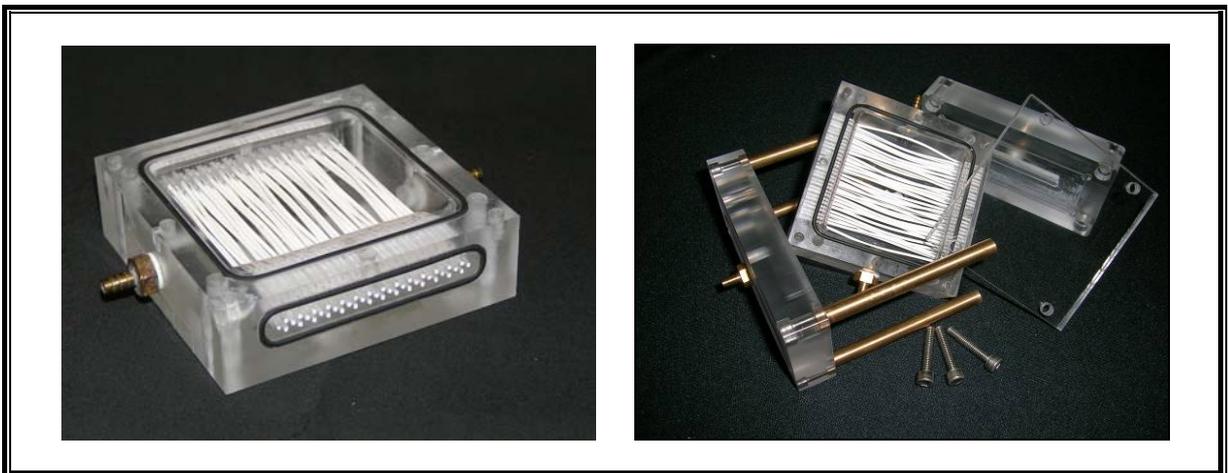
Die in diesem Kapitel erzielten Ergebnisse dienen als Grundlage für den Einsatz des Systems MHFR im Anwendungsbereich Downstream Processing. Dabei werden heterogen modifizierte Hohlfasermembranen in das miniaturisierte Reaktorsystem integriert, so dass entsprechende Hohlfasermodule als Proteinaufarbeitungstools (Affinitätshohlfasermodule) genutzt werden können. Im Kap. 3.3 wird die Entwicklung eines Aufarbeitungsprozesses durch Verwendung von IMAC-Hohlfasermodulen am Beispiel der Proteinaufreinigung von GFP-His aus *E.coli* näher beschrieben.

### 3.3 Entwicklung und Etablierung eines Aufarbeitungsprozesses durch Einsatz von modifizierten IMAC-Hohlfasermodulen

In diesem Kapitel werden die einzelnen Prozessschritte (Adsorption, Waschprozess und Elution) am Beispiel der Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* mittels IMAC-Hohlfasermodulen näher beschrieben.

Es hat sich als vorteilhaft bei der Optimierung der Prozessschritte im Bereich Downstream Processing unter Verwendung von IMAC-Hohlfasermodulen herausgestellt, mit dem Testorganismus *E.coli* (GFP-His) zu arbeiten, da entsprechende Probenanalysen zum GFP-His-Nachweis auf Basis fluoreszenzspektroskopischer Messungen einfach, schnell und in einem sensitiven Messbereich zu realisieren sind (Kap. 3.2.2).

In Anlehnung an parallel durchgeführte Arbeiten in diesem Projekt im Bereich der Etablierung von Kultivierungsprozessen in dem System MHFR ist das Grundschema des Reaktors für den Aufbau von Affinitätshohlfasermodulen übernommen worden [Meyer, 2008], [Villain et al., 2008]. In der Abb. 33 ist der Aufbau eines standardmäßig verwendeten IMAC-Hohlfasermoduls dargestellt.



**Abb. 33:** Aufbau eines Affinitätshohlfasermoduls auf IMAC-Basis. Links: Reaktorrohling bestückt mit 43 UltraPES-Co<sup>2+</sup>-Fasern. Rechts: IMAC-Hohlfasermodul mit Anschluss-System, integriertem Magnetührstäbchen und abnehmbarer Deckplatte.

In den aus Plexiglas bestehenden Reaktorrohling ist eine rundliche Vertiefung eingefasst worden, so dass die Möglichkeit besteht, ein Magnetührstäbchen in das System zu integrieren, um eine homogene Durchmischung des extrakapillaren Bereiches zu erreichen. Die synthetisierten Affinitätshohlfasermembranen (Kap. 3.1.3) können mit einer Pinzette in

die vorgebohrten Löcher des Reaktorrohrlings eingefädelt und mit einem Zweikomponenten-Silikon (Elastosil RT 601 A, Wacker, Ottobrunn) verklebt werden. Die in dieser Arbeit standardmäßig verwendeten IMAC-Hohlfasermodule sind mit 43 mit  $\text{Me}^{2+}$ -Ionen dekorierten UltraPES-Hohlfasermembranen ausgestattet, so dass dem System ein definiertes Fasergewicht bzw. eine definierte Faseroberfläche von 223,7 mg bzw.  $1,5 \text{ cm}^3$  zugeschrieben werden kann. Des Weiteren sind die Hohlfasermodule mit einem Anschluss-System ausgestattet, das eine Anströmung der Hohlfasern über entsprechende Ports (Tüllen) möglich macht. Im Hinblick auf die Führung der Stoffströme des intrakapillaren und extrakapillaren Bereiches über entsprechende Schlauchverbindungen ist das Reaktorsystem flexibel im Bereich des Downstream Processings einsetzbar.

Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus eines Affinitätshohlfasermoduls (Grundkörper des Reaktorrohrlings, Anschluss-System, Verbindungswellen, Deckel) in Form von technischen Zeichnungen ist im Anhang (Kap. 6.11.1) dargestellt.

Im Folgenden wird der Einsatz von IMAC-Hohlfasermodulen bei der Charakterisierung der einzelnen Prozessschritte bei der Aufarbeitung von GFP-His aus *E.coli* getestet. Neben Analysen zum Adsorptionsschritt (Produktbeladung) durch Bestimmung von Adsorptionsisothermen (Kap. 3.3.1) und Durchbruchkurven (Kap. 3.3.2) haben Optimierungen hinsichtlich der Entwicklung geeigneter Wasch- und Elutionsprofile (Kap. 3.3.3 und 3.3.4) stattgefunden.

### **3.3.1 Charakterisierung von IMAC-Hohlfasermembranen durch die Bestimmung von Adsorptionsisothermen**

Bei der Beladung modifizierter Matrices bildet sich zwischen den freien und den adsorbierten Molekülen ein dynamisches Gleichgewicht aus. Für eine gegebene Temperatur besteht eine Beziehung zwischen der Zahl der pro Oberflächeneinheit adsorbierten und der in der Probenlösung vorliegenden Moleküle. Die Kurve, die diese Beziehung zwischen der adsorbierten Menge, ausgedrückt durch die Beladung, und der Konzentration in der Lösung beschreibt, wird Adsorptionsisotherme genannt [Atkins et al., 2006].

Ein einfaches und häufig angewendetes Modell zur Beschreibung der Proteinadsorption an Membranoberflächen basiert auf den von Langmuir abgeleiteten Beziehungen, welche auf den drei nachfolgend beschriebenen Annahmen beruhen [Shentu et al., 2007], [Sun et al., 2006]:

- Die Adsorption führt höchstens zu einem Monolayer adsorbierter Moleküle.
- Die Adsorptionseenthalpie ist für alle Adsorptionsplätze gleich und hängt nicht vom Bedeckungsgrad ab.
- Zwischen den adsorbierten Molekülen bestehen keine Wechselwirkungen.

Unter diesen Voraussetzungen gilt die folgende Beziehung, welche als Langmuir-Isotherme bezeichnet wird:

$$Q = \frac{Q_{\max} \cdot C}{K_d + C} \quad (3.1)$$

mit  $Q$  = Beladungskapazität [mg/g]

$Q_{\max}$  = maximale Beladungskapazität [mg/g]

$K_d$  = Dissoziationskonstante [mol/L]

$C$  = Konzentration nicht adsorbierter Moleküle im Probenüberstand [mol/L]

Durch Anwendung einer linearisierten Darstellung, bei der  $C/Q$  gegen  $C$  aufgetragen wird, können anhand der Geradensteigung und des y-Achsenabschnittes die Parameter  $Q_{\max}$  und  $K_d$  bestimmt werden (Gleichung 3.2). Die einheitslose Konstante  $K_d$  ist dabei ein Maß für die Affinität zwischen Adsorbent und Adsorbat.

$$\frac{C}{Q} = \frac{C}{Q_{\max}} + \frac{1}{K_d \cdot Q_{\max}} \quad (3.2)$$

Die Versuche zur Bestimmung der Adsorptionsisotherme sind unter Verwendung GFP-His-haltiger Lösungen (in Aufschlusspuffer) bei 22 °C und 1.000 rpm durchgeführt worden. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen mit 30 mg-Proben entsprechender IMAC-Hohlfasermembrantypen (UltraPES-Cu<sup>2+</sup>, -Ni<sup>2+</sup>, -Co<sup>2+</sup>, -Zn<sup>2+</sup>) in 2 mL-Reaktionsgefäßen zu arbeiten. Die Beladungskapazitäten eingesetzter IMAC-Fasern sind mittels EDTA-Test bestimmt worden (UltraPES-Cu<sup>2+</sup>: 15,36 ± 0,89 µmol/g; UltraPES-Ni<sup>2+</sup>: 11,58 ± 1,30 µmol/g; UltraPES-Co<sup>2+</sup>: 31,11 ± 5,23 µmol/g). Nach Equilibrierung der IMAC-Membranen für 15 min

(2 mL) werden den Affinitätsmembranen Aliquots von 1,5 mL GFP-His-haltiger Lösung unterschiedlicher Konzentrationen im Bereich von 0-70  $\mu\text{g/mL}$  (0; 5; 10; 15; 25; 35; 50 und 70  $\mu\text{g/mL}$ ) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wird durch Anwendung eines Zentrifugationsschrittes (10.000 rpm, 22 °C, 3 min) das Hohlfasermaterial und der Probenüberstand voneinander getrennt und die Konzentration nicht gebundener GFP-His-Moleküle im Überstand (C) fluoreszenzspektroskopisch bestimmt (Doppelbestimmung). Die Beladungskapazität Q wird über den Differenzwert der eingesetzten Inkubationslösungen und entsprechender Probenüberstände unter Berücksichtigung der verwendeten IMAC-Hohlfasermenge (30 mg) bestimmt [de Aquino et al., 2006], [Bueno et al., 1995].

In Tab. 18 sind die aus Langmuir-Isotherm-Modellen berechneten Parameter  $Q_{\text{max}}$  und  $K_d$  für vier unterschiedliche IMAC-Hohlfasermembrantypen auf UltraPES-Basis dargestellt. Unter Annahme einer monomolekularen Belegung der Hohlfaseroberfläche mit GFP-His-Molekülen nehmen die maximalen Beladungskapazitäten  $Q_{\text{max}}$  entsprechend ihrer Metallionensättigungskapazität in der Reihenfolge  $\text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$  ab. Die berechneten Werte der entsprechenden Dissoziationskonstanten  $K_d$ , welche ein Maß für die Affinität zwischen Ligand und Targetmolekül darstellen, bestätigen das Ergebnis. Die Werte für  $K_d$  liegen in einer Größenordnung von  $10^{-6}$  M, was einer mittleren Affinität entspricht und typisch für pseudobiospezifische Affinitätsliganden, wie z.B. IMAC-Matrizes, sind [de Aquino et al., 2006], [Vijayalakshmi, 1989].

**Tab. 18:** Bestimmung der Adsorptionsparameter für die Anbindung von GFP-His an IMAC-Hohlfasermembranen unter Verwendung von Langmuir-Isothermen

Langmuir-Isotherm-Modell (linearisiert)	IMAC-Hohlfasermembrantyp			
	UltraPES-Cu <sup>2+</sup>	UltraPES-Ni <sup>2+</sup>	UltraPES-Co <sup>2+</sup>	UltraPES-Zn <sup>2+</sup>
$Q_{\text{max}}$ [mg GFP-His/g UltraPES-Me <sup>2+</sup> ]	1,00	0,76	1,53	1,32
$K_d$ [mol/L]	$1,26 \cdot 10^{-6}$	$3,44 \cdot 10^{-6}$	$5,33 \cdot 10^{-6}$	$1,51 \cdot 10^{-6}$
$R^2$	0,68	0,93	0,99	0,73

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, anhand der Verhältnisse von maximaler Beladungskapazität der Produktmoleküle zur entsprechenden Metallionensättigungskapazität

( $Q_{\max}$  [mg GFP-His/g UltraPES] /  $Q_{\text{Me}}$  [ $\mu\text{mol Me}^{2+}$ /g UltraPES]) Aussagen hinsichtlich der Bindungsstärke verwendeter IMAC-Hohlfasermembranen im Adsorptionsprozess zu machen. Dabei nehmen die Werte der Verhältnisse von  $Q_{\max}/Q_{\text{Me}}$  [mg GFP-His/ $\mu\text{mol Me}^{2+}$ ] in der Reihenfolge  $\text{Ni}^{2+}$  (0,066) >  $\text{Cu}^{2+}$  (0,065) >  $\text{Co}^{2+}$  (0,049) ab. Somit werden wie erwartet den mit  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen dekorierten Membranen im Vergleich zu  $\text{Co}^{2+}$ -Membranen höhere Bindungsstärken gegenüber his-getagten Proteinen (GFP-His) zu Teil (Vgl. Kap. 3.2.3.1).

In der Regel kann jedoch davon ausgegangen werden, dass Produktmoleküle in Form einer mehrschichtigen Belegung an die Matrix binden und sich zudem auch unspezifische Bindungseffekte auswirken. Solch eine Mehrschichtadsorption kann anhand von BET-Isothermen beschrieben werden, wobei die erste adsorbierte Schicht als Adsorptionszentrum für weitere Moleküladsorptionen dienen kann [Varela et al., 2001]. Im Bezug zu solch einer Mehrschichtadsorption können sich GFP-His-Moleküle über Di- und Oligomerisierungen an die IMAC-Hohlfasermembran binden. Es kann an dieser Stelle davon ausgegangen werden, dass sich unter Verwendung  $\text{Co}^{2+}$ -modifizierter Membranen im Vergleich zu den anderen IMAC-Membrantypen fast ausschließlich GFP-His-Moleküle in der ersten Monolayer ohne Proteinkontaminationen anbinden können, was auch im Einklang mit der ermittelten hohen Selektivität entsprechender Elutionsproben im Aufreinigungsprozess steht (Vgl. Kap. 3.2.3.1).

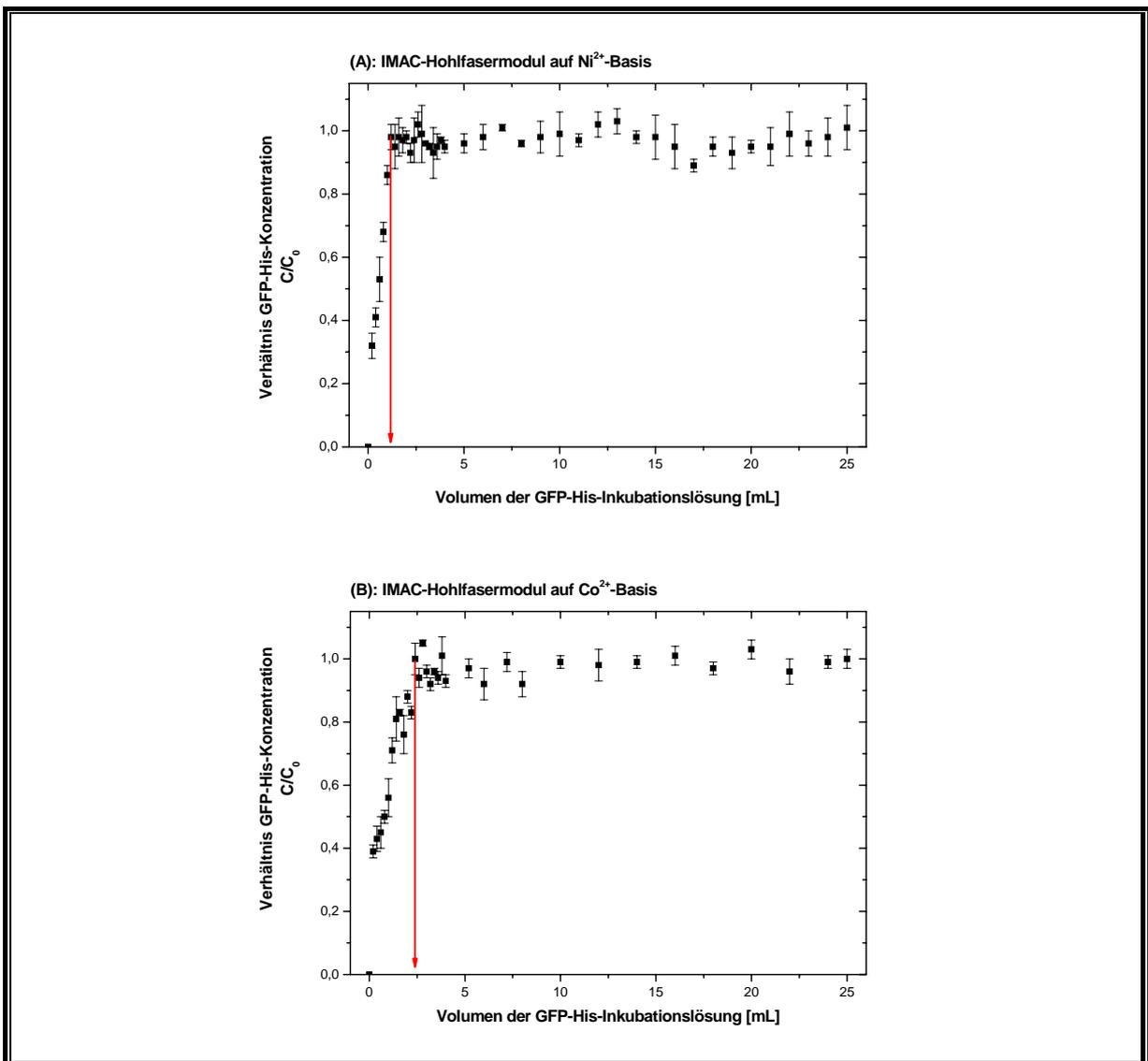
### 3.3.2 Bestimmung von Durchbruchkurven für die Adsorption von GFP-His an IMAC-Hohlfasermembranen

Um neben der Verwendung einzelner IMAC-Hohlfasermembranen auch entsprechende IMAC-Hohlfasermodule während des Adsorptionsprozesses charakterisieren zu können, sind Durchbruchkurven für die Adsorption von GFP-His unter Verwendung von  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Hohlfasermembranen bestimmt worden [Tsai et al., 2001], [Camperi et al., 1999].

Es hat sich bei der Bestimmung der Durchbruchkurven als zweckmäßig erwiesen, nach Equilibrierung des Systems einzig den intrakapillaren Reaktionsraum ( $V_{\text{In}} = 662 \mu\text{L}$ ) der Hohlfasermodule für die Produktbeladung zu nutzen und den extrakapillaren Reaktionsraum geschlossen zu halten. Somit besteht die Möglichkeit, unter Verwendung einer gering konzentrierten GFP-His-Inkubationslösung ( $C_0 = 0,31 \mu\text{g/mL}$ , verdünnt mit Aufschlusspuffer) die Absättigung eingesetzter IMAC-Hohlfasermodule mittels fluoreszenzspektroskopischer Messung am Reaktorausgang ohne nachträgliche Aufkonzentrierung der Proben zu

beobachten. Es ist bei der Probenbeladung standardmäßig mit einer Flussrate von 0,5 mL/min gearbeitet worden, so dass am Reaktorausgang im offline-Modus in Zeitintervallen von 24 s (entspricht 200  $\mu$ L) die Probendurchläufe gesammelt werden können. Es ist darauf zu achten, den Weg vom Reaktorausgang zu den Probengefäßen so kurz wie möglich zu halten, um Rückvermischungen zu vermeiden.

In der Abb. 34 sind die Durchbruchkurven für die Adsorption von GFP-His an IMAC-Hohlfasermodule, welche mit  $\text{Ni}^{2+}$ - (A) und  $\text{Co}^{2+}$ -UltraPES-Fasern (B) bestückt sind, dargestellt.



**Abb. 34:** Bestimmung von Durchbruchkurven für die Adsorption von GFP-His an UltraPES- $\text{Ni}^{2+}$ -Fasern (A) und - $\text{Co}^{2+}$ -Fasern (B) unter Verwendung entsprechender IMAC-Hohlfasermodule.

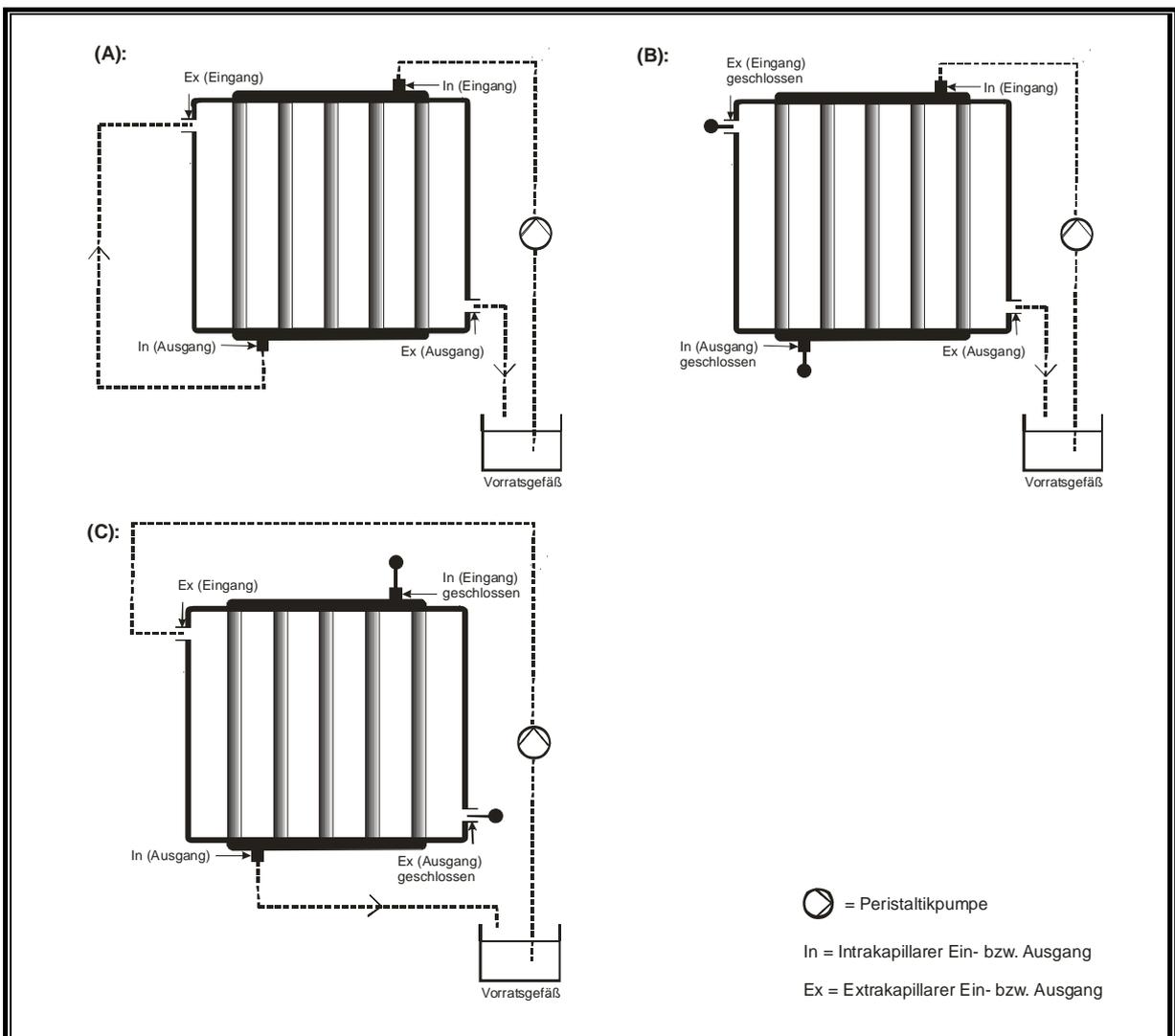
In der Regel kann die Form von Durchbruchkurven als sigmoid beschrieben werden. Dabei wird bis zum Erreichen des Durchbruchpunktes kein Signal am Reaktorausgang gemessen (Null-Linie), da sich alle Produktmoleküle der Inkubationslösung an die Affinitätsliganden anbinden können. Erst danach können Signale mit ansteigenden Intensitäten am Reaktorausgang detektiert werden, bis die Affinitätsmatrizes mit Produkt abgesättigt sind und sich ein Plateau ausbildet [de Aquino et al., 2006], [Clemmitt et al., 2000], [Kubota et al., 1995].

Anhand der ermittelten Kurvenverläufe kann kein Durchbruchpunkt bestimmt werden, da sich die entsprechenden IMAC-Hohlfasermembranen der Module bereits zu Beginn im Bereich von 0-1 mL GFP-His-Inkubationslösung in der Absättigungsphase befinden. Es besteht aber die Möglichkeit, die eingesetzten IMAC-Hohlfasermodule im Hinblick auf das Erreichen der Absättigung der Membran mit GFP-His-Molekülen ( $C/C_0 = \sim 1$ ) zu vergleichen. Es kann konstatiert werden, dass der Punkt der Absättigung für das  $\text{Ni}^{2+}$ - bzw.  $\text{Co}^{2+}$ -Modul nach Verwendung von 1,2 bzw. 2,4 mL GFP-His-Lösung erreicht wird. Somit können an den IMAC-Hohlfasermembrantyp UltraPES- $\text{Co}^{2+}$  im Vergleich zu UltraPES- $\text{Ni}^{2+}$  etwa doppelt so viele GFP-His-Moleküle binden. Dies wird durch die in Kap. 3.3.1 ermittelten maximalen Beladungskapazitäten ( $Q_{\max}$ ), beruhend auf der Anwendung von Langmuir-Isotherm-Modellen, bestätigt.

Wie bereits erwähnt, beziehen sich die Experimente zur Bestimmung der Durchbruchkurven und der damit verbundenen Charakterisierung des Verlaufes der Absättigung der IMAC-Membran mit Produktmolekülen nur auf den intrakapillaren Reaktionsraum verwendeter IMAC-Hohlfasermodule. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Adsorptionsisotherm-Experimente empfiehlt es sich, für nachfolgende Analysen bei der Etablierung geeigneter Wasch- und Elutionsprofile (Kap. 3.3.3 und 3.3.4) standardmäßig mit einer höher konzentrierten Inkubationslösung in Form einer 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -haltigen GFP-His-Lösung bei der Beladung entsprechender IMAC-Hohlfasermodule zu arbeiten. Durch einen Überschuss an GFP-His-Molekülen in der Inkubationslösung kann von einer ausreichenden Beladung der IMAC-Fasern im Affinitätshohlfasermodule ausgegangen werden.

### 3.3.3 Evaluierung eines geeigneten Waschprotokolls bei der Aufreinigung von GFP-His mit IMAC-Hohlfasermodulen

In diesem Abschnitt werden drei unterschiedliche Betriebsweisen der IMAC-Hohlfasermodule ( $\text{Co}^{2+}$ -dekoriert,  $20,65 \mu\text{mol/g}$  UltraPES) bei der Evaluierung eines geeigneten Waschprotokolls im Aufreinigungsprozess von GFP-His aus *E.coli* getestet. Zur besseren Veranschaulichung zeigt die Abb. 35 die schematischen Aufbauski­zen der Betriebsweise der  $\text{Co}^{2+}$ -Hohlfasermodule beim Equilibrierungs- und Adsorptionsschritt (A) sowie bei der Optimierung des Waschprozesses durch Anwendung von drei unterschiedlichen Waschprotokollen (A-C) [Wang et al., 2005], [Marrot et al., 2004].



**Abb. 35:** Schematische Darstellung der Stoffströme in Affinitätshohlfasermodulen auf IMAC-Basis bei der Adsorption von Produktmolekülen (Modus A) und bei der Optimierung des Waschprotokolls (Modi A-C).

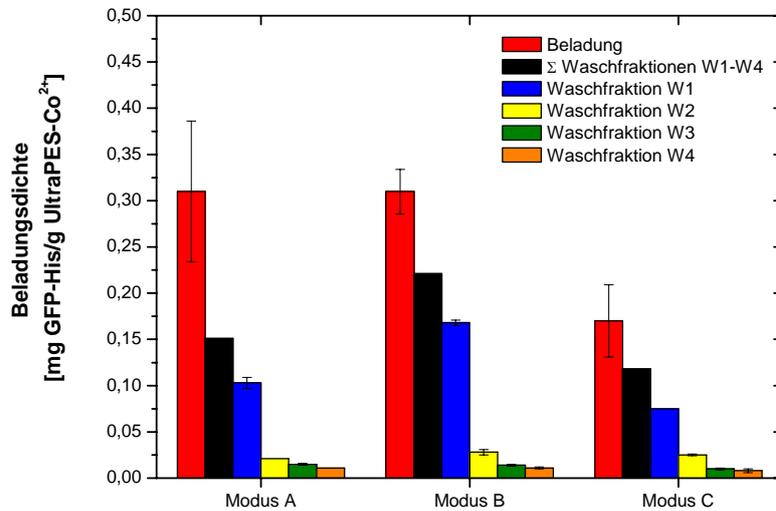
Im Folgenden wird sich bei weiterführenden Experimenten im Bereich der Proteinaufreinigung mittels modifizierten Hohlfasermodule (Kap. 3.3.4 und 3.4) auf die in diesem Kapitel dargestellten Betriebsweisen bezogen.

Standardmäßig sind die Experimente bei RT und einer Flussrate von 5 mL/min durchgeführt worden. Zudem hat es sich als zweckmäßig erwiesen, bei einer Rührerdrehzahl von 300 rpm zu arbeiten, um eine homogene Durchmischung des extrakapillaren Reaktionsraumes zu gewährleisten. Bei den einzelnen Prozessschritten der Aufreinigung (Equilibrierung, Adsorption und Waschschrte) sind entsprechend einem Reaktorvolumen einschließlich Schlauchverbindungen jeweils 35 mL der entsprechenden Puffer- oder Inkubationslösung im Vorratsgefäß vorgelegt worden. Nach dem Befüllen des Reaktors ist der Kreislauf des Systems geschlossen und der entsprechende Aufreinigungsschritt gestartet worden.

Nach Equilibrierung der  $\text{Co}^{2+}$ -Hohlfasermodule für 15 min (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) sind diese anschließend für 1 h mit einer 10  $\mu\text{g/mL}$ -haltigen GFP-His-Inkubationslösung beladen worden (Abb. 35, Betriebsmodus A). Für die Entwicklung geeigneter Waschprotokolle zur Entfernung nicht und schwach gebundener Produktmoleküle im System hat sich die Anwendung von vier Waschschrten für jeweils 10 min (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) als zweckmäßig herausgestellt. Dabei sind drei unterschiedliche Betriebsweisen getestet worden [Ramesh et al., 2006]:

- Modus A: Intrakapillare Durchströmung der Hohlfaser gefolgt von einer Umströmung der Hohlfaseraußenfläche im extrakapillaren Raum
- Modus B: Durchströmung der Hohlfasermembranporen von innen nach außen
- Modus C: Durchströmung der Hohlfasermembranporen von außen nach innen

Die in der Abb. 36 dargestellten Ergebnisse basieren auf den Resultaten fluoreszenzspektroskopischen Messungen (Doppelbestimmung) zur Bestimmung der GFP-His-Konzentration in den entsprechenden Proben. Neben der Beladung adsorbierter GFP-His-Moleküle ist der Anteil entfernter GFP-His-Moleküle in den einzelnen Waschfraktionen (W1-W4) und als entsprechend aufsummierter Wert in Bezug zum Gewicht eingesetzter  $\text{Co}^{2+}$ -UltraPES-Hohlfasern im Reaktor gezeigt.



**Abb. 36:** Ergebnisse im Hinblick auf die Effizienz angewendeter Waschprotokolle bei Verwendung unterschiedlicher Betriebsweisen (Modi A-C) im Aufreinigungsprozess von GFP-His mittels  $\text{Co}^{2+}$ -Hohlfasermodulen.

In Bezug zu den verwendeten Betriebsmodi (A-C) kann festgehalten werden, dass durch die Anwendung von vier Waschschritten jeweils eine ausreichende Entfernung ungebundener und schwach gebundener GFP-His-Moleküle realisiert werden kann, wobei wie erwartet die GFP-His-Konzentration in den Waschfraktionen in der Reihenfolge  $W1 > W2 > W3 > W4$  abnimmt. Anhand der Verhältnisse (in %) der GFP-His-Konzentrationen in den Waschfraktionen ( $\Sigma W1-W4$ ) in Bezug zur Beladung kann die Effizienz der verschiedenen Betriebsweisen (Modi A-C) im Waschprozess miteinander verglichen werden. Dabei kann konstatiert werden, dass den Betriebsmodi B (71 %) und C (69 %) eine wesentlich höhere Effizienz bei der Entfernung ungebundener und schwach gebundener Produktmoleküle im Vergleich zum Betriebsmodus A (49 %) zuzuschreiben ist. Somit gelingt erwartungsgemäß ein effizienterer Waschprozess, indem die Poren der Hohlfasermembran direkt mit Waschlösung von innen nach außen (Modus B) oder umgekehrt (Modus C) durchspült werden als im Vergleich zur Durchströmung des intrakapillaren Raumes gefolgt von einer Umströmung der Hohlfaseraußenfläche (Modus A).

### 3.3.4 Einsatz von IMAC-Hohlfasermodulen bei der Etablierung von geeigneten Elutionsprofilen

Neben der Charakterisierung des Aufreinigungsprozesses von GFP-His aus *E.coli* im Hinblick auf die Anwendung von Adsorptions- und Waschschritten (Kap. 3.3.1-3.3.3) ist die Etablierung eines geeigneten Elutionsprofils für die erfolgreiche Produktisolation unter Verwendung von Affinitätshohlfasermodulen von entscheidender Bedeutung [Hu et al., 2006], [Reif et al., 1994].

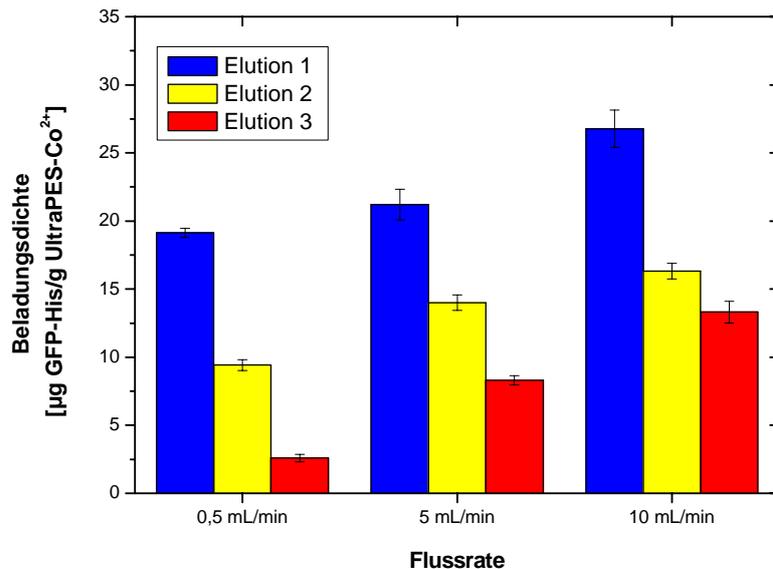
In diesem Kapitel ist der Einfluss verschiedener Flussraten (0,5; 5 und 10 mL/min) bei der Elution von GFP-His unter Einsatz von IMAC-Hohlfasermodulen auf  $\text{Co}^{2+}$ -Basis untersucht worden. Die in den vorherigen Kapiteln erzielten Ergebnisse bezüglich des Adsorptions- und Waschprozesses (Kap. 3.3.2 und 3.3.3) dienen hier als Grundlage für die Beladung der  $\text{Co}^{2+}$ -Module mit GFP-His-Molekülen und für die Entfernung nicht und schwach gebundener Produktmoleküle. Zur besseren Übersicht sind nachfolgend die Bedingungen der einzelnen Prozessschritte bei der Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* aufgelistet:

- Equilibrierung (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) für 15 min bei 5 mL/min im Betriebsmodus A
- Adsorption (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GFP-His) für 1 h bei 5 mL/min im Betriebsmodus A
- Waschschr. (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) für jeweils 10 min bei 10 mL/min im Betriebsmodus B
- Dreimalige Elution (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8) des intrakapillaren Reaktionsraumes für jeweils 15 min bei entsprechender Flussrate
- Regeneration (50 mM EDTA-2Na, pH 8) für 15 min und erneute Beladung mit Metallionen (0,5 M  $\text{MeSO}_4$ ) für 1 h, jeweils bei 5 mL/min im Betriebsmodus A

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die Elutionsschritte in Form einer intrakapillaren Durchströmung mit 5 mL Elutionspuffer durchzuführen, um die erhaltenen Elutionsfraktionen (E1-E3) direkt ohne Aufkonzentrierungsschritt auf ihren GFP-His-Gehalt fluoreszenzspektroskopisch vermessen zu können. Dabei wird der Elutionspuffer in einem Vorratsgefäß

vorgelegt und für jeweils 15 min bei entsprechender Flussrate im Kreislauf (intrakapillar) geführt.

Die Abb. 37 zeigt die Resultate im Hinblick auf den GFP-His-Gehalt in den Elutionsfraktionen (E1-E3) bei Variation der Flussraten in Form von 0,5, 5 und 10 mL/min.



**Abb. 37:** Optimierung des Elutionsschrittes bei der Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* mittels Co<sup>2+</sup>-Hohlfasermodule durch Variation der Flussraten.

Erwartungsgemäß nimmt der Anteil eluierter GFP-His-Moleküle bei allen angewendeten Flussraten in der Reihenfolge E1 > E2 > E3 ab, da während des ersten Elutionsschrittes bereits ein Großteil (61-47 %) gebundener GFP-His-Moleküle eluiert werden kann.

Im Hinblick auf das angewendete Elutionsprofil in Form einer im Kreislauf geführten Durchströmung des intrakapillaren Raumes der Hohlfasern kann davon ausgegangen werden, dass sich nur die an der Hohlfaserinnenseite gebundenen GFP-His-Moleküle ablösen lassen. Somit fallen die ermittelten Beladungsdichten im Vergleich zu vorherigen Versuchen, bei denen die gesamte Hohlfaser mit Elutionspuffer behandelt worden ist, deutlich niedriger aus (Vgl. Kap. 3.2.3.1). Der Vorteil der „intrakapillaren“ Elution ist hauptsächlich in der Tatsache begründet, dass durch den Einsatz rel. geringer Elutionsvolumina (5 mL) entsprechende Elutionsproben zur Produktanalyse nicht weiter aufkonzentriert werden müssen.

Es ist zu erkennen, dass mit ansteigender Flussrate die GFP-His-Konzentration in den entsprechenden Elutionsfraktionen (E1, E2 bzw. E3) zunimmt, da es durch Verwendung höherer Flussraten möglich ist, mehr Elutionsvolumen pro Zeit durch den Hohlfaserinnenraum zu führen. Folglich können mehr Produktmoleküle eluiert werden. Durch die Anwendung von jeweils drei Elutionsschritten werden in Abhängigkeit von der gewählten Flussrate Beladungsdichten der Eluate ( $\Sigma$  E1-E3) von 31,14 (0,5 mL/min), 43,52 (5 mL/min) und 56,40 (10 mL/min)  $\mu\text{g}$  GFP-His/g UltraPES-Co<sup>2+</sup> ermittelt.

Im Hinblick auf weiterführende Versuche im Bereich des Downstream Processings (Kap. 3.4) unter Verwendung von Affinitätsmodulen besteht zudem die Möglichkeit, Elutionsprofile derart zu fahren, dass die Membranporen der Hohlfasern direkt mit Elutionspuffer bei hohen Flussraten (10 mL/min) durchspült werden können (Modus B), um gebundene Produktmoleküle effizient aufzureinigen zu können.

### 3.3.5 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel ist der erfolgreiche Einsatz von Affinitätshohlfasermodulen auf IMAC-Basis am Beispiel der Aufreinigung des his-getagten Proteins GFP-His aus *E.coli* beschrieben worden, wobei Optimierungen der einzelnen Prozessschritte (Adsorption, Waschprozess, Elution) im Mittelpunkt der Untersuchungen standen.

Basierend auf den Ergebnissen der Langmuir-Isotherme konnte anhand der Verhältnisse  $Q_{\text{max}}/Q_{\text{Me}}$  (max. Beladungskapazität gebundener GFP-His-Moleküle in Bezug zur Metallionensättigungskapazität) eine Abnahme der Bindungsstärke gegenüber his-getagten Proteinen in der Reihenfolge  $\text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+}$  verwendeter IMAC-UltraPES-Hohlfasermembranen nachgewiesen werden, welche im Einklang mit vorherigen Resultaten hinsichtlich des Einsatzes von IMAC-Membranen in Aufreinigungsprozessen (Kap. 3.2.3.1) stehen. Es besteht die Möglichkeit, anhand von weiterführenden Analysen durch die Verwendung von Modellen, die auf den Annahmen einer Mehrschichtadsorption beruhen (z.B. BET-Isotherme), Aussagen in Bezug zur Beladungskapazität und Stabilität entsprechender Monolayer ( $Q_{\text{mono}}$ ) zu machen.

Weiterhin konnte bei der Bestimmung von Durchbruchkurven unter Verwendung von Ni<sup>2+</sup>- und Co<sup>2+</sup>-Hohlfasermodulen der Einfluss der Metallionenbeladungsdichte auf das

Erreichen der Absättigung der Membran mit GFP-His-Molekülen untersucht werden. Erwartungsgemäß konnte dabei dem  $\text{Co}^{2+}$ -Modul aufgrund einer um den Faktor 2,7 höheren Metallionensättigungskapazität im Vergleich zum  $\text{Ni}^{2+}$ -Modul ein höherer Absättigungspunkt durch Einsatz der doppelten Menge an GFP-His-haltiger Inkubationslösung zugeschrieben werden.

Für die Evaluierung eines geeigneten Waschprotokolls zur effizienten Entfernung ungebundener und schwach gebundener Produktmoleküle sind drei unterschiedliche Betriebsweisen der Affinitätsmodule in Form von A: Umströmung der Hohlfaserinnen- und -außenfläche, B: direkter Durchströmung der Membranporen der Hohlfasern von innen nach außen, bzw. C: Porendurchströmung von außen nach innen getestet worden. Als Methode der Wahl hat sich die direkte Durchströmung der Hohlfasermembranporen mit Waschpuffer (Modi B und C) herausgestellt, so dass nicht gebundene und unspezifisch gebundene Proteinmoleküle sowohl von der Hohlfaserinnen- und -außenseite als auch innerhalb der Poren effektiv aus dem System entfernt werden können.

Bei der Anwendung verschiedener Flussraten (0,5, 5 und 10 mL/min) des im Kreislauf geschalteten Elutionsprozesses (intrakapillarer Bereich) konnte aufgezeigt werden, dass es mit ansteigender Flussrate und der damit einhergehenden Durchspülung der Hohlfaserinnenraumes mit mehr Elutionsvolumen pro Zeit möglich ist, höhere Beladungskapazitäten der Elutionsfraktionen zu realisieren.

### 3.4 Etablierung von Bioprocessen mit integrierter Produktaufarbeitung

Dieses Kapitel befasst sich abschließend mit der Integration von bereits optimierten Aufreinigungsverfahren im Bereich IMAC (Kap. 3.2 und 3.3) in einen Bioproduktionsprozess (*Integriertes Downstreaming* oder auch *in situ product removal, ISPR*). Dabei soll die schnelle Entfernung des entstehenden Produktes in Form his-getagter Proteine aus dem Bioreaktionsraum (extrakapillarer Bereich des MHFR) realisiert werden, so dass zum Einen eine mögliche Produktinhibierung oder ein Produktabbau vermieden werden soll. Zum Anderen können somit auch die Aufarbeitungsschritte verringert werden, was sich positiv auf den Zeit- und Kostenaufwand auswirkt [Chmiel, 2006].

Für die Etablierung eines integrierten Downstreamprozesses ist es essentiell, sowohl den Einfluss des Desinfektionsprotokolls auf die Stabilität verwendeter IMAC-Hohlfasermembranen (Kap. 3.4.1) als auch den Einfluss und die Belastbarkeit der IMAC-Membranen im Kultivierungsprozess (Kap. 3.4.2) vorab zu untersuchen.

Als Modellsystem für die Entwicklung von Bioprocessen mit integrierter Produktaufarbeitung eignet sich besonders aufgrund einer hohen Sekretionskapazität und Plasmidstabilität und aufgrund einer inhärent geringen Proteaseaktivität das Gram-positive Bakterium *B.megaterium* [Hollmann et al., 2006]. Im Kap. 3.4.3 wird ein integrierter Downstreamprozess unter Verwendung von *B.megaterium* (Levansucrase-His) im System MHFR beschrieben und diskutiert.

Als alternative Prozessführung zum integrierten Downstreaming wird der Einsatz von zwei verschiedenen *E.coli*-Stämmen zur Produktion von GFP-His (intrazellulär) und Bgl-His (extrazellulär) im Bereich der MHFR-Kultivierung mit einer nachgeschalteten Produktaufreinigung durch Verwendung von IMAC-Affinitätshohlfasermembranen getestet (Kap. 3.4.4).

Es ist hier anzumerken, dass die im System MHFR durchgeführten Kultivierungen der jeweiligen Testorganismen (*B.megaterium*, *E.coli*) auf im Gesamtprojekt parallel durchgeführten Arbeiten von Meyer zurückzuführen sind und die entsprechenden Ergebnisse zur Beschreibung der Kultivierungsverläufe (Kap. 3.4.3 und 3.4.4) übernommen worden sind [Meyer, 2008].

### 3.4.1 Einfluss des Desinfektionsprotokolls auf die Stabilität von IMAC-Hohlfasermembranen

In parallel durchgeführten Arbeiten bei der Entwicklung einer geeigneten Sterilisations- bzw. Desinfektionsmethode für einen erfolgreichen Einsatz des Systems MHFR im Bereich Zellkultivierung hat sich als Methode der Wahl die Inkubation in 1 %igem Natriumhypochlorit (NaOCl) herausgestellt. Auf Basis von REM-Aufnahmen desinfizierter Membranen konnte eine Beeinträchtigung der Porenstruktur ausgeschlossen werden [Meyer, 2008], [Arkhangelsky et al., 2007].

Im Hinblick auf die Durchführung von Bioprozessen mit integrierter Produktaufarbeitung ist es essentiell, dass das verwendete Desinfektionsprotokoll neben der Gewährleistung eines kontaminationsfreien Kultivierungsprozesses auch die Stabilität eingesetzter IMAC-Hohlfasermembranen nicht beeinträchtigt. Daher ist der Einfluss des Desinfektionsprotokolls auf die Metallionensättigungskapazität von IMAC-UltraPES-Fasern ( $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -dekoriert) untersucht worden.

Es hat sich dabei als zweckmäßig erwiesen, mit jeweils 100 mg IMAC-UltraPES-Fasern in 15 mL-Probenreaktionsröhrchen bei RT und 1.000 rpm zu arbeiten. Nach Inkubation der Hohlfasermembranen für 30 min in 15 mL einer wässrigen 1 %igen NaOCl-Lösung (pH 12) sind zur ausreichenden Entfernung der Desinfektionslösung drei Waschschrte unter Verwendung von jeweils 15 mL sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  für 3 min durchgeführt worden. Um den Einfluss des Desinfektionsprotokolls auf die Metallionenbeladungsdichte verwendeter IMAC-Hohlfasermembranen untersuchen zu können, sind die Beladungskapazitäten der jeweiligen Membrantypen ( $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -dekoriert) vor und nach dem Desinfektionsschritt mittels EDTA-Test (Doppelbestimmung) bestimmt worden.

In der Abb. 38 sind die ermittelten Metallionenbeladungskapazitäten vor und nach dem Desinfektionsschritt dargestellt. Es kann konstatiert werden, dass in Abhängigkeit der verwendeten IMAC-Hohlfasermembranen in Form von UltraPES- $\text{Cu}^{2+}$ , UltraPES- $\text{Ni}^{2+}$  und UltraPES- $\text{Co}^{2+}$  die Beladungsdichten gebundener Metallionen nach durchgeführter Desinfektion mit NaOCl um 23-30 % abnehmen. Somit werden zwar auf der einen Seite komplexierte Metallionen ausgewaschen, auf der anderen Seite liegen jedoch die Metallionenbeladungskapazitäten nach angewendetem Desinfektionsschritt (9,68-19,48  $\mu\text{mol Me}^{2+}/\text{g UltraPES}$ ) in einem Bereich, mit dem es möglich ist, erfolgreich his-getagte Proteine aufzureinigen (Vgl. Kap. 3.2.3 und 3.3.4).

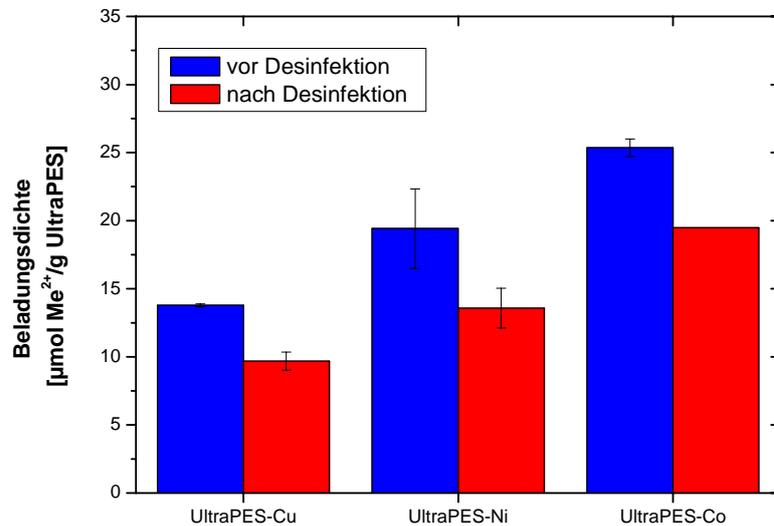


Abb. 38: Stabilitätsanalyse von IMAC-Hohlfasermembranen nach Desinfektion mit 1 %iger NaOCl-Lösung.

### 3.4.2 Einfluss und Belastbarkeit modifizierter IMAC-Hohlfasermembranen im Anwendungsbereich integriertes Downstreaming

In diesem Abschnitt wird die Eignung unterschiedlich modifizierter UltraPES-Hohlfasermembranen auf IMAC-Basis im Bereich des integrierten Downstreaming geprüft. Speziell wird untersucht, inwieweit die Anwesenheit modifizierter und unbehandelter Hohlfasermembranen Auswirkungen auf das Zellwachstum der Testorganismen *E.coli* (Bgl-His) und *B.megaterium* (Lev-His) und deren Produktivität hat. Außerdem wird überprüft, ob durch die Kultivierungen die modifizierte IMAC-Membranoberfläche chemisch verändert wird.

Der verwendete *E.coli*-Stamm zur Bgl-His-Produktion ist von PD Dr. Karl Friehs (AG Fermentationstechnik, Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt worden (Kap. 3.2.2). Die Kultivierungen sind mit Zellen aus einer Stammhaltungsplatte in 500 mL Schüttelkolben mit jeweils 100 mg desinfiziertem Membranmaterial und 100 mL LB-Medium bei 30 °C und 120 rpm für 25 h erfolgt.

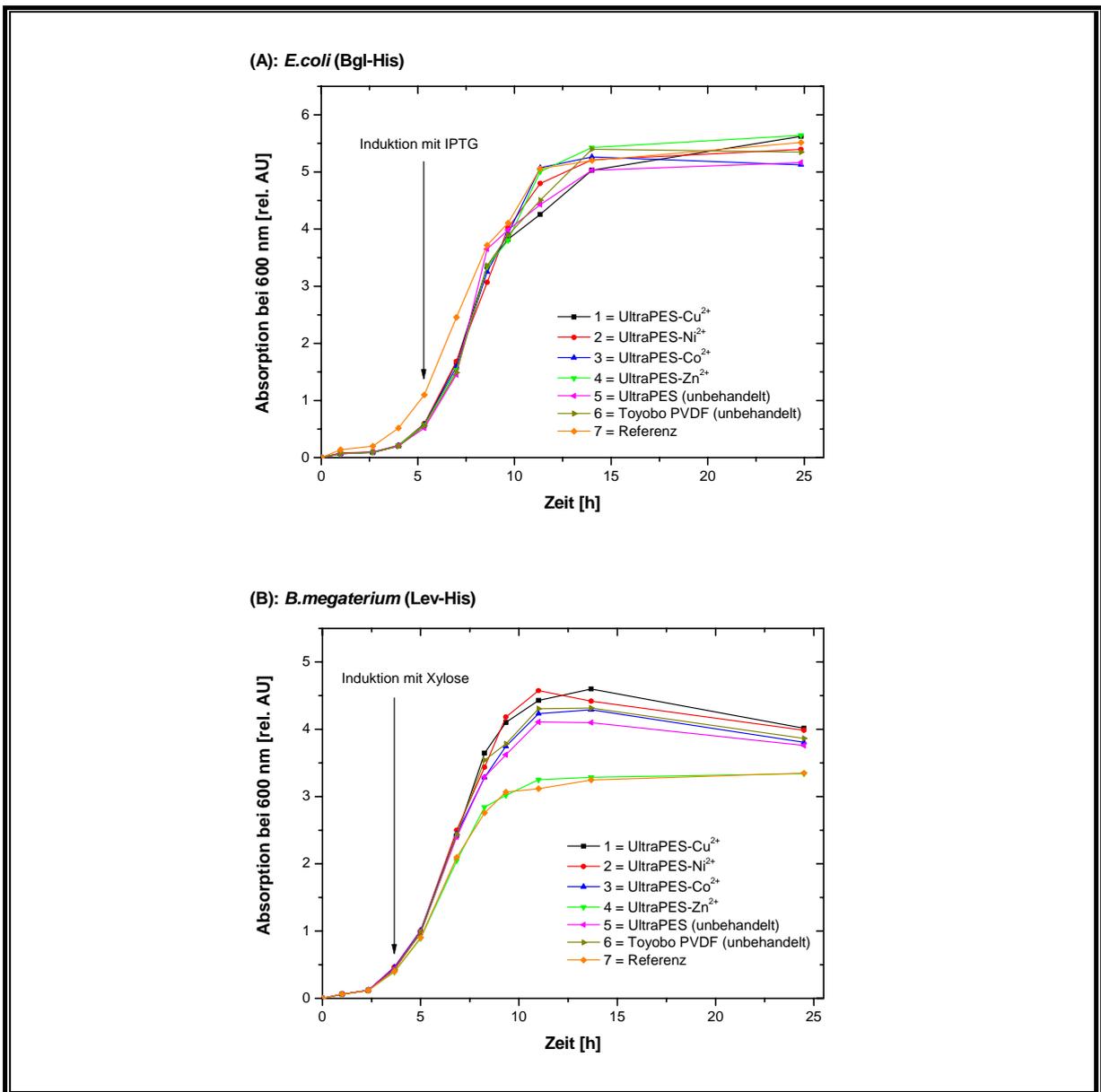
Der zweite eingesetzte Testorganismus in Form von *B.megaterium* zur Lev-His-Produktion (MS 941, pRBBm15,  $P_{xylA}$ -SP<sub>lipA</sub>-lev773His) ist von Prof. Dr. Dieter Jahn (Institut für

Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig) zur Verfügung gestellt worden [Malten et al., 2006].

Die Schüttelkolbenkultivierungen des *B.megaterium*-Stammes sind jeweils mit Zellen aus einer Stammhaltungsplatte in 100 mL LB-Medium (10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl) mit 10 µg/mL Tetracyclin bei 100 rpm und 34 °C für 25 h durchgeführt worden. Der Stamm steht unter Einfluss eines *xyIA*-Promotors und kann entsprechend durch Zugabe von Xylose Produkt in der Form einer his-getagten Levansucrase (Lev-His) exprimieren und in das Kulturmedium abgeben (Produktsekretion vermittelt durch das Signalpeptid *LipA*). Die Induktion mit Xylose (0,5 % Xylose Endkonzentration im Medium) ist nach ca. 4 h bei einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,4 rel. AU erfolgt [Biedendieck et al., 2007]. Analog zur Kultivierung von *E.coli* (Bgl-His) sind den Schüttelkolbenkulturen jeweils 100 mg desinfierte Hohlfasermembranen zugegeben worden.

Das Zellwachstum wird durch Messung der optischen Dichte (OD) bei  $\lambda = 600$  nm gegen 0,9 % NaCl-Lösung überwacht. Die Abb. 39 zeigt die Wachstumskurven für die Schüttelkolbenkultivierungen von *E.coli* (Bgl-His) (A) und *B.megaterium* (Lev-His) (B), mit dem jeweiligen Hohlfasermembranmaterial (Proben 1-6) darin, im Vergleich zu einer Referenz (Probe 7, Kultivierung ohne Membranzugabe).

Beim internen Vergleich der Wachstumskurven der Kultivierungsreihe A (*E.coli*) und B (*B.megaterium*) untereinander kann festgehalten werden, dass das Wachstum der Bakterien durch die Membranen in Bezug zur Referenz nicht signifikant beeinflusst wird. Sowohl die Anwesenheit modifizierter IMAC-UltraPES-Fasern (Proben 1-4) als auch die der unbehandelten UltraPES- und PVDF-Hohlfasermembranen (Proben 5 und 6) beeinflussen nicht das bakterielle Zellwachstum, so dass die charakteristischen Wachstumsphasen in Form von lag-, exponentieller, stationärer und Absterbe-Phase mit ihren Übergängen zu erkennen sind (Abb. 39).



**Abb. 39:** Wachstumskurvenverläufe der Kultivierungen von *E. coli* (Bgl-His) und *B. megaterium* (Lev-His) im Schüttelkolbenmaßstab in Anwesenheit von Hohlfasermembranen (UltraPES-Me<sup>2+</sup>, unbehandelte UltraPES- und PVDF-Fasern) im Vergleich zu einer Referenz (ohne Membranzugabe).

Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,9 rel. AU (A: *E. coli*) bzw. 0,4 rel. AU (B: *B. megaterium*) wird die Produktion von Bgl-His mit IPTG bzw. Lev-His mit Xylose induziert (Abb. 39). Nach Beendigung der Kultivierung (25 h) werden die Zellen mittels Zentrifugation (15 min bei 4 °C und 4.000 rpm) abgetrennt und der Kulturüberstand zur weiteren Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

Um Aussagen hinsichtlich der Produktivität der his-getagten Enzyme Bgl-His und Lev-His machen zu können, sind die Enzymaktivitäten in den Kulturüberständen bestimmt worden.

Beide Enzymaktivitäts-Tests basieren auf dem Nachweis reduzierender Zucker mittels DNS-Reagenz [Miller, 1959]. Auf die Bestimmung der Enzymaktivität von Bgl-His unter Verwendung des Substrates  $\beta$ -D-Glucan (aus Gerste) ist bereits im Kap. 3.2.3.2 näher eingegangen worden.

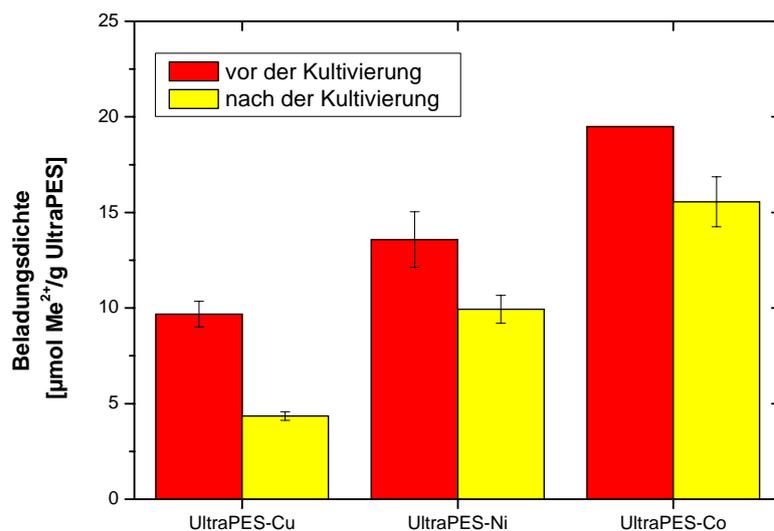
Für die Bestimmung der Enzymaktivität von Lev-His (EC 2.4.1.10) aus *B.megaterium* ist Saccharose als Substrat verwendet worden. Diese Glycosyltransferase ist in der Lage, das Substrat Saccharose in Fruktose, die in ein wachsendes Fruktan (Polysaccharid Levan) eingebaut wird und in Glukose, die in die Reaktionslösung freigesetzt wird, zu spalten. Außerdem besitzt das Enzym hydrolytische Aktivität, so dass es auch beide Monomere aus der Saccharosespaltung freisetzen kann. Die in der Reaktionslösung befindlichen reduzierenden Zucker (Glukose und Fruktose) können über eine Farbreaktion mit DNS-Reagenz nachgewiesen und photometrisch bei  $\lambda = 540$  nm quantifiziert werden [Homann et al., 2007], [van Hijum et al., 2004]. Eine detaillierte Beschreibung zur Durchführung des Enzymaktivitäts-Tests ist im Anhang (Kap. 6.9.3) dargestellt.

In der Tab. 19 sind die ermittelten Volumenaktivitäten der sekretierten Enzyme Bgl-His aus *E.coli* und Lev-His aus *B.megaterium* in Bezug zu den Schüttelkolbenkultivierungen mit enthaltenden IMAC-Hohlfasermembranen ( $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -dekoriert) im Vergleich zur Referenz gezeigt. Die Volumenaktivitäten des Enzyms Bgl-His liegen im Bereich zwischen 6,99 und 8,76 U/mL, die des Enzyms Lev-His im Bereich zwischen 15,83 und 30,24 U/mL. Bezüglich des Referenzwertes weichen die Volumenaktivitäten der Reihe Bgl-His aus *E.coli* um 4 % nach oben und 16 % nach unten ab, die Volumenaktivitäten der Reihe Lev-His aus *B.megaterium* weichen um 47 % nach oben und 23 % nach unten ab. Es bleibt festzuhalten, dass in allen Kulturüberständen das Zielprotein nachweisbar ist und deren produzierte Mengen, basierend auf einer Einfachbestimmung, annähernd in gleicher Größenordnung liegen.

**Tab. 19:** Einfluss von IMAC-Hohlfasermembranen auf die Produktivität verwendeter Testorganismen in der Form von *E.coli* (Bgl-His) und *B.megaterium* (Lev-His)

Zur Schüttelkolbenkultur zugegebener Hohlfasermembrantyp	Volumenaktivität des sekretierten Enzyms [U/mL]	
	Bgl-His aus <i>E.coli</i>	Lev-His aus <i>B.megaterium</i>
UltraPES-Cu <sup>2+</sup>	7,43	28,99
UltraPES-Ni <sup>2+</sup>	8,76	15,83
UltraPES-Co <sup>2+</sup>	6,99	30,24
Referenz	8,37	20,63

Abschließend wird beurteilt, ob die IMAC-Modifikationen der Hohlfasermembranen nach der Kultivierung weitestgehend erhalten geblieben sind. Dazu werden die Membranen aus den Probenreihen 1-3 (UltraPES-Cu<sup>2+</sup>, UltraPES-Ni<sup>2+</sup> und UltraPES-Co<sup>2+</sup>, siehe Abb. 39, B) der *B.megaterium*-Kulturen entnommen, ausreichend mit H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mittels EDTA-Test auf ihre Beladungskapazität komplexierter Metallionen getestet. Abb. 40 stellt die Ergebnisse vor und nach der Kultivierung dar.

**Abb. 40:** Untersuchung der Belastbarkeit modifizierter IMAC-UltraPES-Hohlfasermembranen durch Analyse der Metallionenbeladungsdichte vor und nach der Kultivierung (*B.megaterium*).

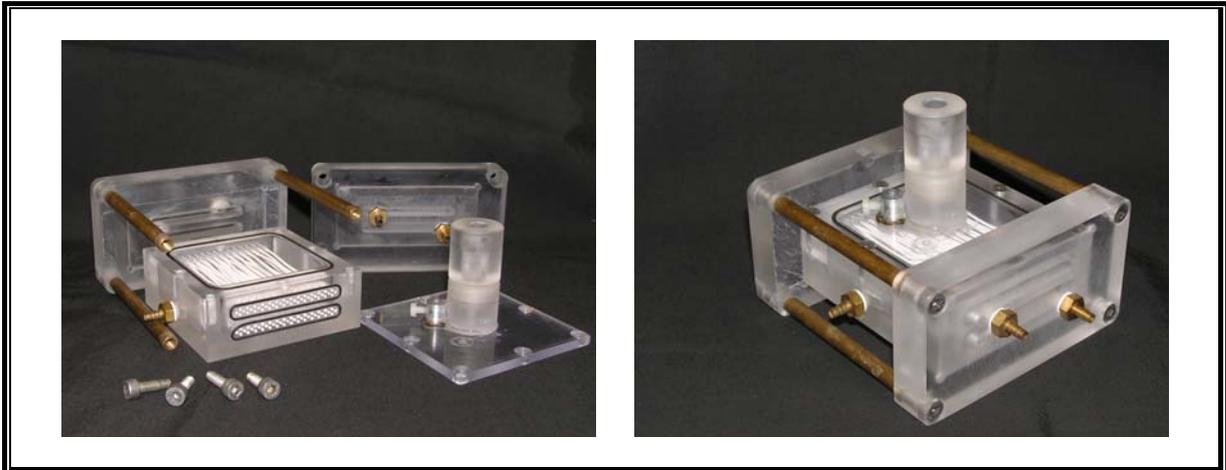
Es zeigt sich, dass die Beladungskapazitäten komplexierter Metallionen nach durchgeführter Kultivierung des *B.megaterium*-Stammes um 20-55 % abnehmen, so dass während des Kultivierungsprozesses Metallionen ausgewaschen werden. Nichtsdestotrotz liegen die ermittelten Metallionensättigungskapazitäten nach den Kultivierungen noch in einem Bereich von 4,35-15,56  $\mu\text{mol Me}^{2+}/\text{g}$  UltraPES, so dass es möglich sein sollte, integrierte Downstreamprozesse zu realisieren. Das Kap. 3.4.3 befasst sich mit der Etablierung eines Prozesses zum integrierten Downstreaming im System MHFR durch Einsatz von *B. megaterium* (Lev-His).

### **3.4.3 Etablierung eines Prozesses zum integrierten Downstreaming im System MHFR durch Einsatz von *B.megaterium* (Lev-His)**

Ziel dieses Versuches zum integrierten Downstreaming ist es, dass vom Testorganismus *B.megaterium* während der Kultivierung im extrakapillaren Raum des MHFR sekretierte Produkt Lev-His über vor-funktionalisierte IMAC-Hohlfasermembranen im System aufzureinigen.

Es ist hier anzumerken, dass die in diesem Projekt durchgeführten Arbeitspakete im Hinblick auf den Aufbau von MHFR und die Entwicklung und Testung dieser Reaktorsysteme im Bereich der Zellkultivierung auf den Arbeiten von Meyer basieren [Meyer, 2008].

Die Abb. 41 zeigt den Aufbau eines MHFR zur Anwendung im Bereich der Zellkultivierung mit integriertem Downstreamprozess.



**Abb. 41:** Aufbau eines MHFR zur Anwendung im Bereich der Zellkultivierung mit integriertem Downstreamprozess. Links: Reaktorrohling bestückt mit 43 Toyobo PVDF-Fasern (untere Faserlage, O<sub>2</sub>-Eintrag) und 43 Co<sup>2+</sup>-UltraPES-Fasern (obere Faserlage, Mediumzufuhr sowie Produktaufarbeitung), Deckel mit integriertem Probenahmesystem und faseroptischem Sensorsport zur pO<sub>2</sub>-Bestimmung. Rechts: Einsatzbereiter MHFR mit Anschluss-System zur getrennten Ansteuerung des intra- und extrakapillaren Reaktionsraumes.

Der MHFR ist mit zwei unterschiedlichen Lagen von jeweils 43 Hohlfasermembranen ausgestattet, wobei für die untere Faserlage Hohlfasermembranen aus PVDF und für die obere Faserlage vor-funktionalisierte IMAC-UltraPES-Hohlfasern eingesetzt worden sind. Im Prozess werden die PVDF-Fasern für die Realisierung eines O<sub>2</sub>-Eintrages genutzt, die IMAC-Hohlfasern dagegen dienen zum Einen für die Zufuhr von frischem Medium und zum Anderen als Affinitätsmatrix für die während der Kultivierung sekretierten Lev-His-Moleküle. Der Größenausschluss modifizierter IMAC-UltraPES-Hohlfasern beträgt 70 kDa, so dass sich die im extrakapillaren Bereich produzierten his-getagten Enzyme mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa ausschließlich an die Außenseite der Hohlfasern anlagern können und nicht die Membranbarriere passieren können. Das Reaktorvolumen des MHFR (bis zu den Ausgängen) beträgt ca. 35 mL.

Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus des MHFR (Grundkörper des Reaktorrohlings, Anschluss-System, Deckel mit Probenahmesystem) in Form von technischen Zeichnungen ist im Anhang (Kap. 6.11.2) dargestellt.

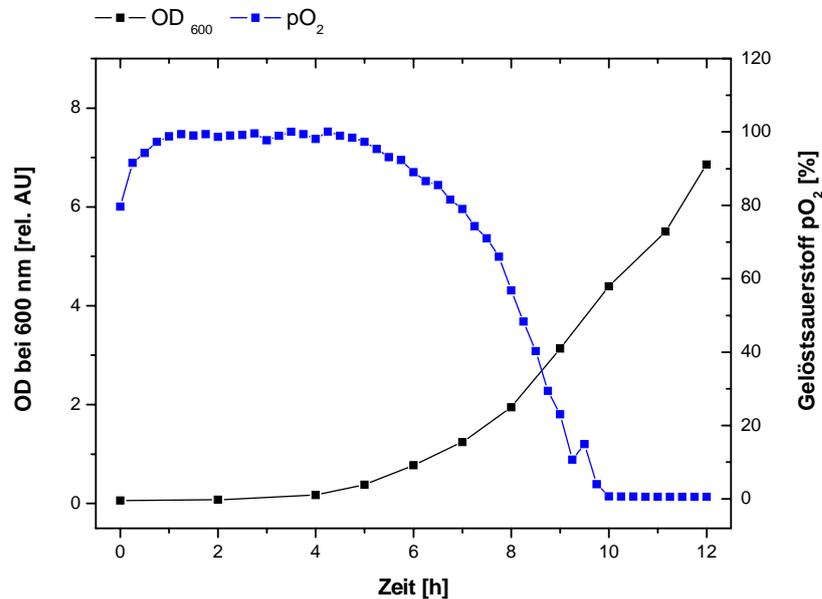
Bei der Kultivierung von *B.megaterium* im System MHFR hat es sich als zweckmäßig erwiesen, mit drei Reaktoren unter Verwendung verschiedener IMAC-Membrantypen in der Form von UltraPES-Cu<sup>2+</sup>, UltraPES-Ni<sup>2+</sup> und UltraPES-Co<sup>2+</sup> parallel zu arbeiten, so dass mögliche Einflüsse verwendeter Metallionen auf den integrierten Downstreamprozess untersucht werden können.

Nach Desinfektion der MHFR mit 1 %iger NaOCl-Lösung und ausreichendem Waschen mit sterilem H<sub>2</sub>O sind die extrakapillaren Räume der Reaktoren mit LB-Medium (siehe Kap. 3.4.2) befüllt und mit Zellen aus einer Vorkultur angeimpft worden. Aufgrund von stabilisierenden Eigenschaften von Ca<sup>2+</sup>-Ionen im Hinblick auf die Aktivität synthetisierter Lev-His-Moleküle sind dem LB-Medium zusätzlich 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> zugegeben worden [Biedendieck et al., 2007], [van Hijum et al., 2004].

Die Kultivierungen sind bei 300 rpm (integriertes Magnetrührstäbchen am Reaktorboden) und 34 °C (Wasserbad) für 12 h durchgeführt worden. Die Zufuhr von frischem Medium ist über den intrakapillaren Raum der IMAC-Hohlfasermembranen erfolgt (0,5 mL/min), der O<sub>2</sub>-Eintrag (reines O<sub>2</sub>) über die Toyobo PVDF-Fasern (10 mL/min). Es hat sich beim Kultivierungsprozess als zweckmäßig erwiesen, den extrakapillaren Raum der MHFR geschlossen zu halten und die Zufuhr des Mediums und des Sauerstoffs über den intrakapillaren Raum ohne Zirkulation der Stoffströme mit einem nachgeschalteten Abfallgefäß zu realisieren, um das Kontaminationsrisiko so gering wie möglich zu halten. Der Induktor Xylose (0,5 % Endkonzentration im Medium) ist dem LB-Medium von vornherein zugegeben worden.

Anhand der Bestimmung des Gelöstsauerstoffs (pO<sub>2</sub>) via online-Messung über faseroptische Sensorspots sowie der Bestimmung der offline-Parameter in Form von OD<sub>600</sub> und finaler Enzymaktivität wird der Kultivierungsprozess überwacht.

In Abb. 42 sind die Wachstumskurve (OD<sub>600</sub>) und der pO<sub>2</sub>-Verlauf am Beispiel der Kultivierung von *B.megaterium* (Lev-His) im MHFR, welcher mit Co<sup>2+</sup>-UltraPES-Fasern ausgestattet worden ist, gezeigt. Basierend auf Vorversuchen zur Produktivität verwendeter *B.megaterium*-Stämme und im Hinblick auf die Stabilität sekretierter Lev-His-Moleküle hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Kultivierungsdauer auf 12 h zu begrenzen, so dass sich die Zellen am Ende der Kultivierung in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die ermittelte OD<sub>600</sub> nach 12 h beträgt 6,86 rel. AU. Erwartungsgemäß nimmt mit ansteigender Zellzahl der Anteil an gelöstem Sauerstoff im Medium ab bis er nach ca. 10 h auf einen Wert von 0 % abgesunken ist. Hinsichtlich der parallel durchgeführten Kultivierungen in den MHFR, die mit anderen IMAC-Membrantypen (UltraPES-Cu<sup>2+</sup> und -Ni<sup>2+</sup>) ausgestattet worden sind, sind ähnliche Wachstumskurven- und pO<sub>2</sub>-Verläufe bestimmt worden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 42:** Kultivierung von *B.megaterium* (Lev-His) im System MHFR mit Co<sup>2+</sup>-dekorierten UltraPES-Hohlfasermembranen

Nach durchgeführter Kultivierung im MHFR sind die abzentrifugierten Kulturüberstände mittels Enzymaktivitäts-Test (DNS-Test) auf ihren Gehalt an aktiven Lev-His-Molekülen untersucht worden. In Bezug zu den drei parallel durchgeführten MHFR-Kultivierungen unter Verwendung von Cu<sup>2+</sup>-, Ni<sup>2+</sup>- und Co<sup>2+</sup>-UltraPES-Hohlfasermembranen konnten Volumensaktivitäten des Enzyms Lev-His von 354, 414 bzw. 688 U/mL ermittelt werden. Im Vergleich zu Schüttelkolbenkultivierungen ohne CaCl<sub>2</sub>-Zusatz in Anwesenheit modifizierter IMAC-Membranen werden hier durch CaCl<sub>2</sub>-Zugabe (2,5 mM) deutlich höhere Enzymaktivitäten (Faktor 12-26) während den *B.megaterium*-Kultivierungen erreicht (Vgl. Kap. 3.4.2). Folglich kann die durch die Ca<sup>2+</sup>-Ionen vermittelte stabilitätsfördernde Wirkung bestätigt werden [van Hijum et al., 2004], [Colomer-Pallas et al., 2003].

Somit sollten während des Kultivierungsprozesses sekretierte Lev-His-Moleküle an die vor-funktionalisierten IMAC-Hohlfasern im MHFR gebunden haben. Nach Abführen der Kulturbrühen aus den jeweiligen MHFR sind die Reaktoren ausreichend mit Waschpuffer gewaschen worden (Modus B, 10 min bei 5 mL/min). Anschließend hat eine dreimalige Elution mit jeweils 5 mL Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8) für 30 min bei 10 mL/min im Betriebsmodus B (Durchströmung der Hohlfasermembranporen von innen nach außen) stattgefunden, um die an die IMAC-Membranen (obere Faserlage) gebundenen his-getagten Lev-Moleküle aufzureinigen. Die

entsprechenden Elutionsproben E1-E3 der verschiedenen eingesetzten MHFR-Typen sind mittels Bradford-Test und Enzymaktivitäts-Test auf ihre Proteinkonzentration und den Gehalt an aktiven Lev-His-Molekülen untersucht worden (Tab. 20).

**Tab. 20:** Resultate des Bradford- und Enzymaktivitäts-Tests der Elutionsproben im Hinblick auf die Aufreinigung von Lev-His aus *B.megaterium* unter Einsatz verschiedener MHFR-Typen bei der Realisierung eines integrierten Downstreamprozesses

MHFR-Typ	Beladungskapazitäten	
	Proteinbeladungsdichte [mg Protein/g UltraPES]	Enzymaktivität [U/g UltraPES]
MHFR-Cu <sup>2+</sup>	E1: 0,48	E1: 0
	E2: 0,22	E2: 0
	E3: 0,15 ± 0,03	E3: 0
MHFR-Ni <sup>2+</sup>	E1: 0,53 ± 0,05	E1: 0
	E2: 0,24 ± 0,02	E2: 0
	E3: 0,18 ± 0,03	E3: 0
MHFR-Co <sup>2+</sup>	E1: 0,42 ± 0,06	E1: 0
	E2: 0,16 ± 0,06	E2: 0
	E3: 0,11 ± 0,03	E3: 0

Es zeigt sich, dass auf der einen Seite die Beladungskapazitäten der Proteine wie erwartet in der Reihenfolge  $E1 > E2 > E3$  bei allen MHFR-Typen abnehmen, wobei sich die entsprechenden Werte hinsichtlich eingesetzter MHFR nur graduell unterscheiden. Die Beladungskapazitäten gebundener Proteine liegen in Abhängigkeit vom MHFR-Typ und Elutionsschritt zwischen 0,53 und 0,11 mg Protein/g IMAC-UltraPES. Auf der anderen Seite konnten jedoch keine Enzymaktivitäten in den Elutionsproben nachgewiesen werden, so dass eine weiterführende Analyse mittels SDS-PAGE Aufschluss über die in den jeweiligen Elutionsproben enthaltenen Proteinen geben sollte, welche in der Abb. 43 dargestellt ist.



**Abb. 43:** SDS-PAGE-Analyse (15 %iges Acrylamidgel, Silber gefärbt) von der integrierten Aufreinigung von Lev-His mittels MHFR. Spur 1: Marker, Spur 2-4: Elutionen E1-E3 (MHFR-Cu<sup>2+</sup>), Spur 5-7: Elutionen E1-E3 (MHFR-Ni<sup>2+</sup>), Spur 8-10: Elutionen E1-E3 (MHFR-Co<sup>2+</sup>).

Anhand der SDS-PAGE-Analyse kann aufgezeigt werden, dass keine Produktbanden des Moleküls Lev-His bei ca. 110 kDa in den Elutionsproben E1-E3 der drei eingesetzten MHFR nachgewiesen werden konnten. In den untersuchten Eluatensproben können lediglich neben einem starken Hintergrundsignal im Bereich von ca. 50-110 kDa zwei intensiver gefärbte Proteinbanden bei ca. 70 und 85 kDa detektiert werden. In Anlehnung an die Ergebnisse des Bradford- und Enzymaktivitäts-Test kann vermutet werden, dass es sich hierbei entweder um Zerfallsfragmente des Enzyms Lev-His oder um im LB-Medium vorhandene Proteine, die auf die Verwendung von Bacto-Trypton bzw. Hefeextrakt zurückzuführen sind, handeln könnte.

Somit kann festgehalten werden, dass es unter diesen Bedingungen nicht möglich gewesen ist, ein integriertes Downstreaming unter Verwendung von *B.megaterium* (Lev-His) durchzuführen. Nachfolgend sind mögliche Fehlerquellen angegeben, die für zukünftige Optimierungsarbeiten beachtet werden sollten:

- Auswaschen gebundener Liganden (Me<sup>2+</sup>-Ionen) während des Kultivierungsprozesses
- Blockierung der Me<sup>2+</sup>-Bindungsstellen von IMAC-Hohlfasermembranen durch im LB-Medium vorhandene Proteine (kompetitive Inhibierung)
- Optimierung des Waschprotokolls, um ein mögliches Auswaschen gebundener Produktmoleküle zu verhindern

- Entwicklung eines geeigneten Elutionsprotokolls unter Berücksichtigung möglicher inhibierender Effekte eingesetzter Metallionen
- Stabilitätsanalysen bezüglich des aufzureinigenden Enzyms Lev-His

Alternativ besteht die Möglichkeit, eine integrierte Prozessführung derart durchzuführen, dass dem MHFR für den Kultivierungsprozess ein IMAC-Affinitätshohlfasermodule zur Aufreinigung his-getagter Proteine nachgeschaltet wird (Kap. 3.4.4). Somit können zum Einen auftretende Auswascheffekte während des Kultivierungsprozesses vermieden werden und zum Anderen zwischengeschaltete Prozessschritte nach der Kultivierung, wie z.B. eine erforderliche Zell-Lyse bei Aufarbeitungen von intrazellulär gebildeten Produkten oder ein Aufkonzentrierungsschritt, etabliert werden. Im Kap. 3.4.4.1 wird ein integrierter Ablauf anhand der Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) im System MHFR, anschließender Zell-Lyse und finaler Produktaufreinigung durch Einsatz eines nachgeschalteten IMAC-Affinitätshohlfasermodule beschrieben und diskutiert. Beim Kap. 3.4.4.2 hingegen wird ein produktsekretierender Stamm in der Form von *E.coli* (Bgl-His) im System MHFR kultiviert, der Kulturüberstand anschließend aufgrund geringer Produktkonzentration aufkonzentriert und der Downstreamprozess über ein nachgeschaltetes IMAC-Affinitätsmodul realisiert [Xu et al., 2005].

#### **3.4.4 Realisierung von Bioprozessen durch Entkopplung integrierter Abläufe in Form eines separaten Kultivierungs- und Aufarbeitungsprozesses unter Verwendung von MHFR**

In diesem Kapitel werden Bioprozesse durch die Entkopplung integrierter Abläufe in Form eines Kultivierungsprozesses im System MHFR mit nachgeschalteter Produktaufreinigung unter Verwendung von Affinitätshohlfasermodule getestet. Die Kultivierung der Testorganismen *E.coli* (GFP-His, intrazellulär) bzw. *E.coli* (Bgl-His, extrazellulär) ist im System MHFR standardmäßig unter Verwendung von PVDF-Hohlfasermembranen (O<sub>2</sub>-Eintrag) und nicht-funktionalisierten UltraPES-Hohlfasern (Mediumzufuhr) durchgeführt worden. Entsprechende Kultivierungsbedingungen (Kap. 3.2.2) und Führungen der Stoffströme im intra- und extrakapillaren Bereich des MHFR (Kap. 3.4.3) sind aus vorherigen Kultivierungsversuchen übernommen worden. Die nachgeschaltete Aufreinigung der

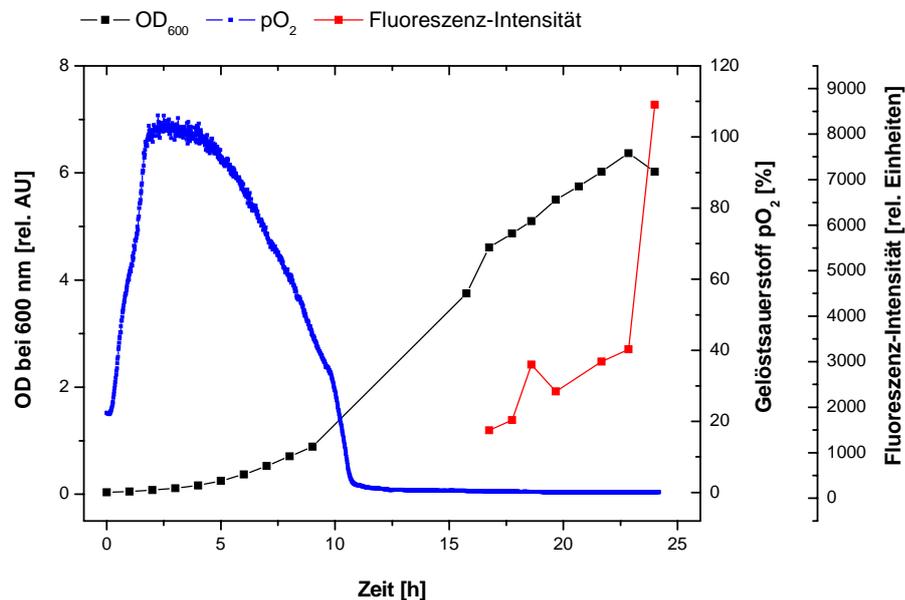
produzierten his-getagten Proteine ist mittels  $\text{Co}^{2+}$ -dekorierten Affinitätshohlfasermodulen erfolgt, um einen hohen Reinheitsgrad ohne Proteinkontaminationen im Aufarbeitungsprozess zu gewährleisten.

#### **3.4.4.1 Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) im MHFR mit nachgeschalteter Produkt-aufreinigung**

Der desinfizierte MHFR (1 % NaOCl) ist nach ausreichendem Waschen mit sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  mit LB-Medium (siehe Kap. 3.2.2) befüllt und mit Zellen aus einer Vorkultur angeimpft worden. Die Kultivierung ist bei 300 rpm (integriertes Magnetrührstäbchen am Reaktorboden) und  $30\text{ }^\circ\text{C}$  (Wasserbad) für 24 h durchgeführt worden. Die Zufuhr von frischem Medium ist über den intrakapillaren Raum der UltraPES-Hohlfasermembranen erfolgt (hier: Rezirkulation des Feed-Mediums bei 4 mL/min), der  $\text{O}_2$ -Eintrag über die Toyobo PVDF-Fasern (10 mL/min).

Anhand der Bestimmung des Anteils an gelöstem  $\text{O}_2$  im Medium mittels online-Messung über einen faseroptischen Sensorspot sowie der Bestimmung der  $\text{OD}_{600}$  und GFP-His-Konzentration in den *E.coli*-Zellen im offline-Modus wird der Kultivierungsprozess überwacht. Für den Nachweis von GFP-His in den *E.coli*-Zellen werden die Proben der Kulturbrühe (100  $\mu\text{L}$ ) abzentrifugiert (4.000 rpm, RT, 5 min), zweimal mit 0,9 % NaCl gewaschen, das Zellpellet in 1 mL 0,9 % NaCl resuspendiert und die zell-haltige Lösung am Fluoreszenzspektrometer vermessen.

Die Abb. 44 stellt die ermittelten Ergebnisse der Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) im MHFR dar. In Bezug zur Wachstumskurve sind die charakteristischen Wachstumsphasen in Form von lag-Phase (0-6 h), exponentieller Phase (7-21 h) und stationärer Phase/Absterbephase (22-24 h) zu erkennen, wobei nach 24 h eine  $\text{OD}_{600}$  von 6,02 rel. AU erreicht worden ist. Erwartungsgemäß nimmt mit ansteigender Zellzahl die Konzentration an gebildeten GFP-His-Molekülen in den Zellen zu. Der Anteil an gelöstem  $\text{O}_2$  im Medium fällt nach ca. 10 h auf einen Wert von 0 % ab.



**Abb. 44:** Darstellung der Wachstumskurve, des pO<sub>2</sub>-Verlaufes sowie der Konzentration an gebildetem GFP-His in den Zellen in Bezug zur Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) im MHFR bei 30 °C für 24 h [Meyer, 2008].

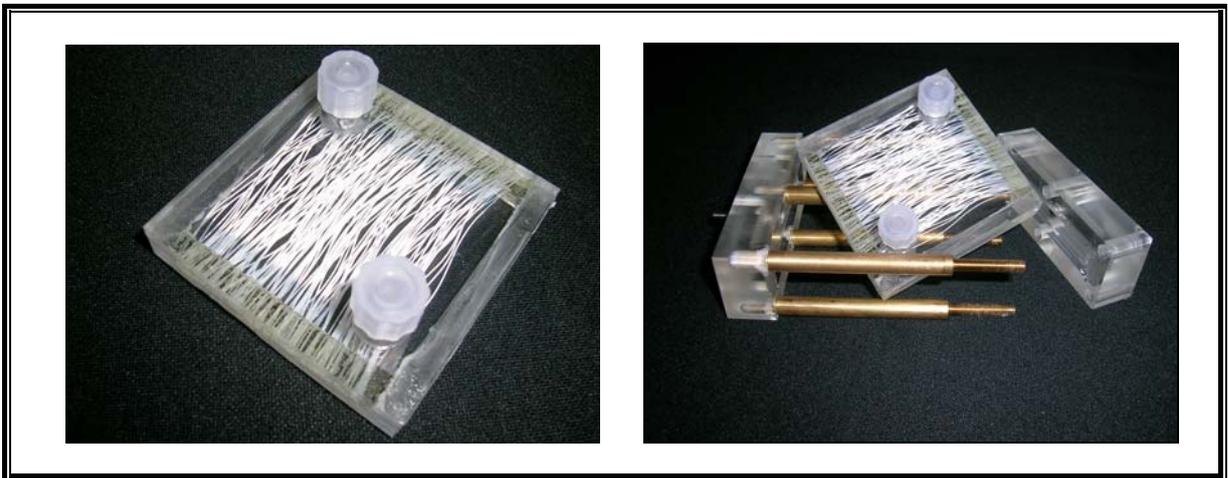
Nach durchgeführter Kultivierung wird die Kulturbrühe aus dem extracapillaren Raum des MHFR in ein 50 mL-Falcon Tube abgeführt und die *E.coli*-Zellen werden mittels wiederholtem Einfrieren und Auftauen (sechs Zyklen) aufgeschlossen. Für die nachgeschaltete Aufreinigung von GFP-His werden an dieser Stelle vier unterschiedliche IMAC-Affinitätshohlfasermodule auf Co<sup>2+</sup>-Basis parallel getestet, die sich hinsichtlich des verwendeten Hohlfasertyps sowie ihrer Porengröße unterscheiden.

Neben dem im Kap. 3.3 vorgestellten Affinitätsmodul, welches mit 43 UltraPES-Co<sup>2+</sup>-Fasern (MWCO 70 kDa) ausgestattet worden ist (Typ 1), kommen drei weitere kommerziell erhältliche sog. Hohlfasermodulekassetten der Firma Saxon BioTec GmbH (Radeberg) zum Einsatz:

- Typ 2: MicroPES (150 Hohlfasern, MWCO 0,2 µm)
- Typ 3: High Flux PS (300 Hohlfasern, MWCO 30 kDa)
- Typ 4: Low Flux PS (200 Hohlfasern, MWCO 5 kDa)

Der Aufbau einer solchen Hohlfasermodulkassette ist in der Abb. 45 gezeigt. Die Ansteuerung des extrakapillaren Bereiches gelingt dabei über standardmäßig verwendete Luer-Lock-Verbindungssysteme, die des intrakapillaren Bereiches über das von der hauseigenen Feinmechanikwerkstatt etablierte Anschluss-System.

Die Modifikation dieser Module zur Herstellung  $\text{Co}^{2+}$ -beladener Affinitätsmodule auf IDA-Basis ist in Anlehnung an das etablierte Protokoll zur Synthese von IMAC-Hohlfasermembranen durchgeführt worden (Kap. 3.1.2 und 3.1.3). Die entsprechenden Reaktionsschritte sind jeweils unter Verwendung von 10 mL Reaktionslösung bei 5 mL/min im Betriebsmodus A (Kap. 3.3.3) durchgeführt worden.



**Abb. 45:** Darstellung einer Hohlfasermodulkassette (Typ Saxonia). Links: Einzelne Hohlfasermodulkassette bestückt mit 150 MicroPES-Hohlfasern. Rechts: Hohlfasermodulkassette mit Anschluss-System.

Die nachgeschaltete Aufreinigung von GFP-His mittels IMAC-Affinitätshohlfasermodulen orientiert sich an dem etablierten Protokoll zur Aufarbeitung his-getagter Proteine (Kap. 3.3.4). Die equilibrierten Hohlfasermodule sind dabei jeweils mit 35 mL (Typ 1) bzw. 20 mL (Typ 2-4) einer 115,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GFP-His-haltigen Inkubationslösung (aufgeschlossene *E.coli*-Zellen in Anwesenheit der Zelldebris, verdünnt mit Aufschlusspuffer) für 1 h inkubiert worden. Nach ausreichend durchgeführten Waschschritten sind die gebundenen GFP-His-Moleküle durch Anwendung einer dreimaligen Elution des intrakapillaren Raumes (E1-E3) aufgereinigt worden, so dass hier sowohl die Separation der Reaktionsräume der Module als auch der Einsatz von relativ geringen Elutionsvolumina (5 mL) vorteilhaft ausgenutzt werden kann.

Tab. 21 zeigt basierend auf den Ergebnissen fluoreszenzspektroskopischer Messungen (Hauptpeak<sub>GFP-His</sub> bei Ex:  $\lambda = 395$  nm und Em:  $\lambda = 510$  nm) die entsprechenden Beladungskapazitäten gebundener GFP-His-Moleküle (Beladung) und eluierter GFP-His-Moleküle (Elutionen E1-E3) in Bezug zu den eingesetzten IMAC-Hohlfasermodulen.

**Tab. 21:** Resultate der dem Kultivierungsprozess nachgeschalteten Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* mittels vier verschiedenen Co<sup>2+</sup>-Hohlfasermodulen. In Klammern ist die Hohlfaseranzahl der verwendeten Module angegeben.

Probe	Beladungskapazitäten der Co <sup>2+</sup> -Hohlfasermodule [mg GFP-His/g Hohlfasermembran]			
	UltraPES (43)	MicroPES (150)	High Flux PS (300)	Low Flux PS (200)
Beladung	1,24	1,12	1,19	3,03
Elution E1	0,09	0,14	0,04	0,17
Elution E2	0,06	0,05	0,03	0,07
Elution E3	0,05	0,02	0,02	0,07
Σ Elutionen E1-E3	0,20	0,21	0,09	0,31

Je nach Affinitätshohlfasermodule werden GFP-His-Konzentrationswerte in den Eluatfraktionen (Σ Elutionen E1-E3) zwischen 0,09 und 0,31 mg/g Hohlfaser erreicht. Wie erwartet verringern sich die GFP-His-Konzentrationswerte der Eluatfraktionen in Abhängigkeit von der Anzahl der durchgeführten Elutionsschritte, so dass ein Großteil des gebundenen Produktes bereits nach dem ersten und zweiten Elutionsschritt (75-90 %) von der entsprechenden Hohlfasermembran der Module abgelöst werden kann. Im Vergleich zu den ermittelten Beladungen sind die entsprechenden Elutionswerte (Σ Elutionen) um den Faktor 6 bis 13 geringer, was hauptsächlich auf den Aspekt zurückzuführen ist, dass es sich hier ausschließlich um eine intrakapillare Elution handelt und folglich Produkt, welches an die Hohlfaseraußenseite gebunden hat, auf diese Weise nicht abgelöst werden kann. Zudem können sich auch Effekte der unspezifischen Produkthanbindung an die Co<sup>2+</sup>-Hohlfaser und Auswascheffekte auswirken.

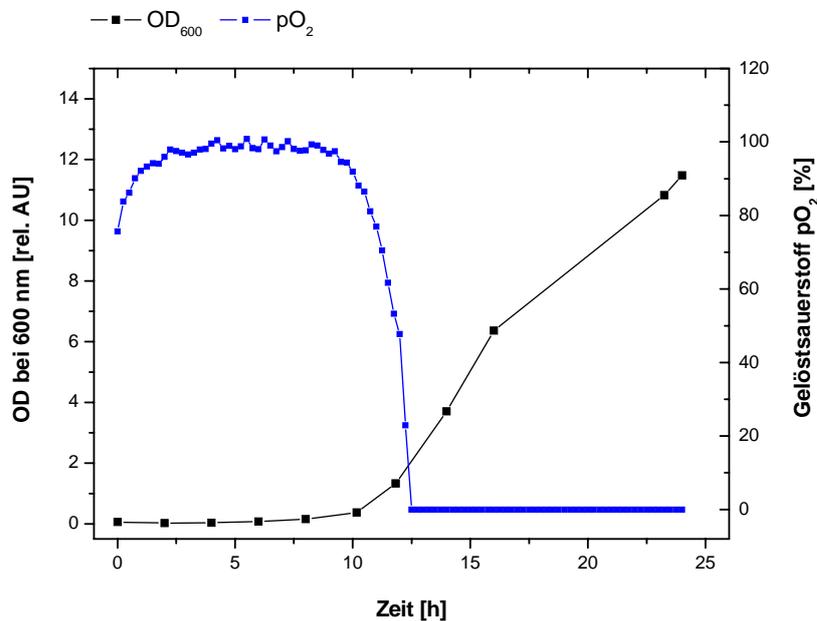
Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass eine dem Kultivierungsprozess im System MHFR nachgeschaltete Produktaufreinigung unter Verwendung des Testorganismus *E.coli* (GFP-His) erfolgreich durchgeführt werden konnte. Zudem gelingt eine Produktaufreinigung mittels verschiedenen Typen von Affinitätsmodulen, die sich in Hohlfasermaterial (PES bzw. PS) und den geometrischen Kennzahlen (Porengröße, Hohlfaserdurchmesser, Faseranzahl) unterscheiden. Somit kann besonders im Hinblick auf die Porengröße verwendeter Hohlfasern das System MHFR/Affinitätshohlfasermodul flexibel und problemorientiert für biotechnologische Fragestellungen im Bereich des Downstream Processings eingesetzt werden. Weiterhin wird dem MHFR im Kultivierungsprozess und dem Affinitätsmodul als Aufarbeitungstool durch die Möglichkeit der Kopplung der Systeme ein großes Potential zu Teil [Xu et al., 2005], [Kubota et al., 1997], [Bueno et al., 1995].

#### **3.4.4.2 Kultivierung von *E.coli* (Bgl-His) im MHFR mit nachgeschalteter Produktaufreinigung**

Die Kultivierung von *E.coli* (Bgl-His) im MHFR ist analog zu der im Kap. 3.4.4.1 beschriebenen Kultivierung von *E.coli* (GFP-His) durchgeführt worden, mit Ausnahme, dass die Zufuhr des frischen Mediums im „one way“-Modus mit nachgeschaltetem Abfallgefäß (0,5 mL/min) realisiert worden ist.

Es sind an dieser Stelle drei Kultivierungen unter Verwendung von drei MHFR parallel durchgeführt worden (Multimixersystem), um zum Einen die Reproduzierbarkeit ermittelter Daten zum Kultivierungsprozess zu überprüfen und zum Anderen aufgrund der geringen Produktkonzentration sekretierter Bgl-His-Moleküle ein größeres Volumen an Kulturüberstand zur Verfügung zu haben.

Exemplarisch zeigt die Abb. 46 die Daten einer Kultivierung (Wachstumskurve, pO<sub>2</sub>-Verlauf) von *E.coli* (Bgl-His) im MHFR.



**Abb. 46:** Darstellung der Wachstumskurve und des pO<sub>2</sub>-Verlaufes einer Kultivierung von *E.coli* (Bgl-His) im MHFR bei 30 °C für 24 h [Meyer, 2008].

Die Wachstumskurve zeigt die charakteristischen Wachstumsphasen in Form von lag-Phase (0-10 h), exponentieller Phase (11-23 h) und dem Übergang zur stationären Phase (23-24 h), wobei nach 24 h eine OD<sub>600</sub> von 11,47 rel. AU erreicht worden ist. Wie zu erwarten, nimmt mit ansteigender Zellzahl (Anfang der exponentiellen Phase, nach 10 h) der Anteil an gelöstem O<sub>2</sub> im Medium stark ab, bis er nach ca. 13 h auf einen Wert von 0 % abgesunken ist. Im Hinblick auf die zwei weiteren durchgeführten Kultivierungen im MHFR werden ähnliche Wachstumskurven und pO<sub>2</sub>-Verläufe beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Basierend auf den in Kap. 3.2.3.2 erhaltenen Ergebnissen bei der Aufreinigung von Bgl-His mittels einzelnen Co<sup>2+</sup>-Hohlfasermembranen in Probenreaktionsröhrchen hat es sich als zweckmäßig erwiesen, mit aufkonzentrierten Kulturüberständen im Downstreamprozess zu arbeiten. Daher sind die abzentrifugierten Kulturüberstände der drei MHFR-Kultivierungen vereinigt und mittels Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin, MWCO 5 kDa) aufkonzentriert (Faktor 10) worden.

Anschließend ist die nachgeschaltete Aufreinigung von Bgl-His durch Einsatz eines Co<sup>2+</sup>-Affinitätshohlfasermoduls (Typ 1, 43 UltraPES-Co<sup>2+</sup>-Fasern, siehe Kap. 3.3, Abb. 33) durchgeführt worden. Zur besseren Übersicht sind nachfolgend die einzelnen Schritte des Aufreinigungsprozesses angeben:

- Adsorption des aufkonzentrierten Kulturüberstandes (9 mL) für 1 h bei 5 mL/min im Betriebsmodus B (Durchströmung der Hohlfasermembranporen von innen nach außen)
- Drei Waschschritte (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8) für jeweils 10 min bei 5 mL/min im Betriebsmodus B
- Dreimalige Elution mit jeweils 5 mL Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8) im Betriebsmodus B für jeweils 15 min bei 5 mL/min
- Regeneration (50 mM EDTA-2Na, pH 8) für 15 min bei 5 mL/min im Betriebsmodus B

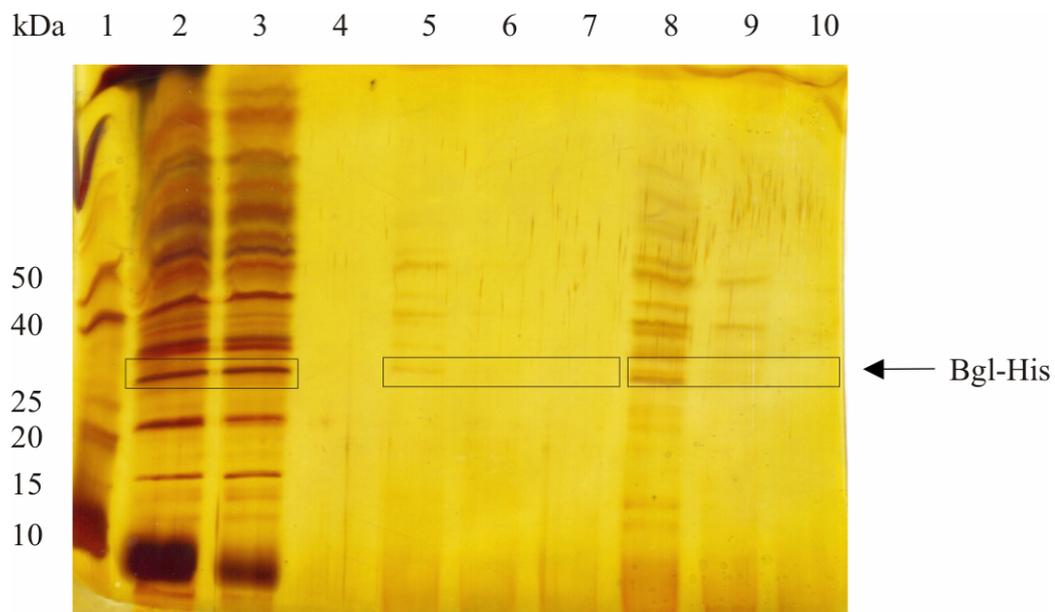
Es ist hier anzumerken, dass hinsichtlich des verwendeten Standardprotokolls zur Aufreinigung his-getagter Proteine mittels IMAC-Affinitätshohlfasermembranen hier abweichend ein Waschpuffer ohne Imidazol verwendet worden ist, um ein mögliches Auswaschen an Produktmolekülen zu verhindern. Zudem werden die Hohlfasermembranporen (MWCO 70 kDa) direkt mit den Pufferlösungen in Form von Elutions- und Regenerationspuffer durchspült (Modus B), um gebundene Bgl-His-Moleküle (26,7 kDa) effizienter aufzureinigen zu können.

Die Tab. 22 zeigt die Ergebnisse des Bradford- und Enzymaktivitäts-Tests von der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Kulturüberstand von *E.coli* des MHFR mittels eines Co<sup>2+</sup>-Affinitätsmoduls. Für die Beladung des Co<sup>2+</sup>-Moduls mit einer aufkonzentrierten Bgl-His-Inkubationslösung werden Beladungskapazitäten von 8,81 mg Protein/g UltraPES bzw. 157 U/g UltraPES ermittelt. Erwartungsgemäß nehmen mit ansteigenden Elutionsschritten (E1-E3) sowohl die Proteinkonzentrationen als auch die Enzymaktivitäten der entsprechenden Proben ab, so dass es bereits nach der ersten Elution gelingt, einen Großteil an aktiven Bgl-His (60 %) aufzureinigen. Durch einen nach den Elutionsschritten angewendeten Regenerationsschritt können lediglich unspezifisch gebundene Proteine oder inaktive Bgl-His-Moleküle (0,07 mg Protein/g UltraPES) von der Hohlfaser abgelöst werden.

**Tab. 22:** Ergebnisse der dem Kultivierungsprozess im MHFR nachgeschalteten Aufreinigung von Bgl-His aus *E.coli* mit einem  $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätsmodul

Probe	Beladungskapazitäten des $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätsmoduls	
	Proteinbeladungsdichte [mg Protein/g UltraPES]	Enzymaktivität [U/g UltraPES]
Beladung	$8,81 \pm 0,30$	157
Elution E1	$0,57 \pm 0,01$	61
Elution E2	$0,20 \pm 0,01$	26
Elution E3	0,10	14
Regeneration	0,07	0

Die in der Abb. 47 dargestellte SDS-PAGE-Analyse bestätigt die auf den Bradford- und Enzymaktivitäts-Test basierenden Ergebnisse.

**Abb. 47:** SDS-PAGE-Analyse (15 %iges Acrylamidgel, Silber gefärbt) von der Aufreinigung von Bgl-His aus dem aufkonzentrierten Kulturüberstand eines MHFR durch Verwendung eines nachgeschalteten  $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätsmoduls. Spur 1: Marker, Spur 2: Inkubationslösung (aufkonzentrierter Kulturüberstand, Faktor 10), Spur 3: Überstandsprobe, Spur 4: finale Waschfraktion W3, Spur 5-7: Eluatfraktionen E1-E3, Spur 8-10: Eluatfraktionen E1-E3 (aufkonzentriert, Faktor 3,2).

Bei der Aufreinigung von Bgl-His aus den Kulturüberständen der MHFR zeigen die Spuren der Inkubationslösung und des Probenüberstandes eine Proteinmischung, bestehend aus dem Produkt Bgl-His (26,7 kDa) als auch aus weiteren Proteinen, die auf Bestandteile des verwendeten LB-Mediums zurückzuführen sind (Spur 2 und 3). Durch Anwendung von drei Waschschritten konnte eine ausreichende Entfernung ungebundener und schwach gebundener Moleküle erzielt werden (Spur 4). Hinsichtlich durchgeführter Elutionen (E1-E3) kann in der ersten Eluatfraktion (Spur 5 bzw. 8) und in abgeschwächter Bandenintensität auch in der zweiten Eluatfraktion (Spur 9) das Produktmolekül Bgl-His nachgewiesen werden. Es zeigt sich jedoch, dass neben dem Produkt auch Proteinverunreinigungen in den Elutionsproben nachgewiesen werden, die sich auf die Verwendung eines Waschpuffers ohne Imidazol zurückführen lassen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es auf Basis einer MHFR-Kultivierung von *E.coli* (Bgl-His) mit nachgeschalteter Produktaufreinigung durch Verwendung eines  $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätshohlfasermembranmoduls möglich ist, das sekretierte Produkt aus dem Kulturüberstand zu isolieren (Primärseparation). Die Produktaufreinigung hingegen gelingt nur bedingt, da sich in den Eluatproben Proteinverunreinigungen nachweisen lassen. Durch eine Optimierung des Waschprozesses (z.B. Imidazol-haltige Waschpuffer) sollte der Grad an Proteinkontaminationen jedoch deutlich verringert werden können.

### 3.4.5 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Abschnitt ist die Durchführung integrierter Bioprozesse im MHFR-System beschrieben worden. Nachfolgend werden zur besseren Übersicht noch einmal die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst und diskutiert.

Bei der Realisierung integrierter Abläufe ist es vorab wichtig, zum Einen den Einfluss des standardmäßig verwendeten Desinfektionsprotokolls (1 % NaOCl) auf die Stabilität eingesetzter Affinitätshohlfasermembranen und zum Anderen den Einfluss der Affinitätsmembranen auf den Kultivierungsprozess zu untersuchen. Es ist im Hinblick auf den angewendeten Desinfektionsschritt eine Abnahme der Metallionenbeladungskapazität eingesetzter IMAC-Hohlfasermembranen ( $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$ -dekoriert) von 23-30 % ermittelt worden, so dass auf der einen Seite zwar Auswascheffekte auftreten, aber auf der anderen Seite die finale  $\text{Me}^{2+}$ -Beladung desinfizierter Fasern (9,68-19,48  $\mu\text{mol Me}^{2+}/\text{g}$

UltraPES) für einen erfolgreichen Einsatz im Downstreamprozess ausreichend sein sollte. Des Weiteren wird die Kultivierung anhand der Analyse der Wachstumskurvenverläufe und Produktivitäten der produktsekretierenden Testorganismen *B.megaterium* (Lev-His) und *E.coli* (Bgl-His) im Vergleich zu einer Referenz durch die Anwesenheit von IMAC-Hohlfasermembranen nicht signifikant beeinflusst. Es zeigt sich jedoch, dass durch den Kultivierungsprozess (24 h Kultivierungsdauer) komplexierte Metallionen der IMAC-Membranen in einem hohen Maße ausgewaschen werden (20-55 %) und die finalen Beladungskapazitäten gebundener Metallionen in einem Bereich von 4,35-15,56  $\mu\text{mol Me}^{2+}/\text{g}$  UltraPES liegen.

Um den auftretenden Auswascheffekten entgegenzuwirken, besteht die Möglichkeit, zum Einen die Kultivierungsdauer bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase zu verkürzen und zum Anderen die Stabilität gebundener Metallionen durch Optimierungen des Modifikationsprotokolls zu verbessern. Dabei könnte neben der Etablierung anderer Derivatisierungen zur Membranaktivierung auch die Analyse weiterer Metallionen (z.B.  $\text{Fe}^{3+}$ ) im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen [Suen et al., 2003], [Klein, 2000].

Anhand des integrierten Downstreamprozesses unter Einsatz von *B.megaterium* (Lev-His) im MHFR ist aufgezeigt worden, dass die während der Kultivierung ins Kulturmedium sekretierten Lev-His-Moleküle nicht über die mit  $\text{Me}^{2+}$ -Ionen dekorierten UltraPES-Fasern des MHFR aufgereinigt werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass zum Einen die Metallionenbeladungskapazität entscheidend durch den Kultivierungsprozess verringert wird und zum Anderen die restlichen, nicht ausgewaschenen Metallionen durch die im LB-Medium vorhandenen Proteine kompetitiv blockiert werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass sekretierte Lev-His-Moleküle im Hinblick auf das angewendete Aufreinigungsprotokoll nicht stabil sind und das aufgereinigte Enzym in einer inaktiven Form vorliegt. Für die erfolgreiche Durchführung eines integrierten Bioprozesses wird es zukünftig die Aufgabe sein, eine gegenüber Auswascheffekten stabile IMAC-Affinitätsmembran mit ausreichender Beladungsdichte gebundener Metallionen in das System MHFR einzufügen.

Alternativ besteht jedoch die Möglichkeit, eine integrierte Prozessführung in der Art durchzuführen, dass dem MHFR für den Kultivierungsprozess ein IMAC-Affinitätshohlfasermodule zur Aufreinigung his-getagter Proteine nachgeschaltet wird. Somit können erforderliche Prozessschritte nach der Kultivierung, wie z.B. eine Zell-Lyse bei Aufarbeitungen von intrazellulär gebildeten Produkten oder ein Aufkonzentrierungsschritt des

Kulturüberstandes bei geringer Produktkonzentration, durchgeführt werden. Es konnte anhand der Verwendung von zwei verschiedenen Testorganismen in Form von *E.coli* (GFP-His, intrazellulär) und *E.coli* (Bgl-His, extrazellulär) im System MHFR eine erfolgreiche Produktisolierung (Primärseparation) über nachgeschaltete  $\text{Co}^{2+}$ -Affinitätsmodule realisiert werden. Eine Produktaufreinigung mit einem höheren Reinheitsgrad sollte durch Optimierungen des Wasch- und Elutionsprozesses (z.B. Variation des Puffersystems und der Inkubationsbedingungen) realisierbar sein. Nichtsdestotrotz ist das gekoppelte System aus MHFR und nachgeschaltetem Affinitätsmodul flexibel in den Anwendungsbereichen Kultivierung und Downstream Processing einsetzbar und kann an verschiedenste Problemstellungen angepasst werden.

Für zukünftige Arbeiten bei der Etablierung integrierter Downstreamprozesse wird es wichtig sein, in detaillierter Form auf die Thematik des Biofoulings näher einzugehen, um die Eigenschaften eingesetzter Hohlfasermembranen in Kultivierungs- und Aufreinigungsprozessen näher charakterisieren zu können. Neben vielen in der Literatur beschriebenen Methoden (physikalisch, chemisch, biologisch) zur Reinigung und Wiederverwendbarkeit von in Bioprozessen eingesetzten Membranen wird der chemischen Reinigungsmethode in Form von der Verwendung von NaOCl ein großes Potential zugesprochen [Meyer, 2008], [Le-Clech et al., 2006], [Ramesh et al., 2006], [Curcio et al., 2005].

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Hinblick auf die Aufgabenstellung (Kap. 1) können auf Basis der praktisch durchgeführten Arbeiten folgende Ergebnisse festgehalten werden:

Ausgehend von Hohlfasermembranen aus Polyethersulfon (MicroPES, UltraPES) und Polysulfon (High Flux PS, Low Flux PS) kann die Aktivierung und Funktionalisierung der Membranoberfläche erfolgreich realisiert werden. Die kombinierte Methode aus nasschemischer Modifikation und Beschichtungstechnik stellt dabei ein effizientes Verfahren dar, die Oberflächenaktivität entscheidend zu erhöhen. Die Methode der Wahl der Grundaktivierung ist eine 3-Schrittsynthese, die den Einsatz eines Diepoxid-Linkers (EGDGE) in Reaktionsschritt 1 und 3 sowie eines Cellulosederivates in der Form von Hydroxyethylcellulose in Reaktionsschritt 2 favorisiert. Die Beladungsdichten epoxy-aktivierter Hohlfasermembranen nach durchgeführter Grundaktivierung liegen im unteren  $\mu\text{mol/g}$ -Bereich ( $7,33\text{-}10,30 \mu\text{mol/g}$ ) und lassen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Hohlfasermembrantypen aus PES und PS erkennen. Basierend auf REM-Analysen konnte qualitativ aufgezeigt werden, dass das Protokoll der Grundaktivierung keine negative Beeinflussung der Porenstruktur in Form von Porenverblockungen oder Ablagerungen nach sich zieht. Zudem ergeben BET-Analysen der Oberflächenstruktur mikroporöser PES-Hohlfasermembranen, dass sich die BET-Oberfläche um etwa zwei Drittel verringert, ohne dass dies Auswirkungen auf die Membrantyp-spezifischen Trenngrenzen hat.

Aufgrund der hohen Reaktivität terminal angebundener Epoxygruppen besteht die Möglichkeit zur weiteren Modifikation mit nukleophilen Stickstoffreagenzien, um gewünschte Ligandensysteme auf der Membranoberfläche zu generieren. Durch Einsatz von bifunktionellen Aminderivaten, die neben der Aminofunktion an einem Terminus Amino- oder Hydroxygruppen tragen, können Membranen mit neuen kovalent auf der Oberfläche gebundenen Endgruppen geschaffen werden. Dabei ist je nach Kettenlänge der eingesetzten Aminderivate die Flexibilität des Spacers bei der Bindung anvisierter Zielmoleküle steuerbar.

Des Weiteren ist es gelungen, Funktionalisierungsstrategien zur erfolgreichen Synthese von Ionenaustauscher-Hohlfasermembranen zu entwickeln. Die Generierung von starken (Q) bzw. schwachen (D) Anionenaustauschern ist dabei durch die kovalente Anbindung von Triethylamin bzw. Diethylamin realisiert worden. Die Synthese entsprechender starker bzw. schwacher Kationenaustauschermembranen (S- bzw. C-Typ) findet durch die Anbindung von

2-Aminoethansulfonsäure bzw. Glycin (C2-Spacer) oder 6-Aminohexansäure (C6-Spacer) statt. Aufgrund geringer Beladungsdichten hergestellter S-Membranen ( $< 1 \mu\text{mol/g}$ ) bietet es sich an, alternative Syntheserouten in Betracht zu ziehen, die andere Funktionalisierungsreagenzien, wie z.B. 1,3-Propansulton oder konz. Schwefelsäure, favorisieren [Higuchi et al., 1990]. Erzielte Beladungskapazitäten liegen in Abhängigkeit vom Membrantyp auf Seite der Anionenaustauscher bei  $3,68\text{-}8,32 \mu\text{mol/g}$ , auf Seite der schwachen Kationenaustauscher ( $\text{C}_{\text{GLY}}$ - bzw.  $\text{C}_{\text{AHS}}$ -Typ) bei  $2,53\text{-}6,64 \mu\text{mol/g}$ .

An modifizierten Hohlfasermembranen aus PES können durch die Anbindung von chelatisierendem Iminodiacetat Kupfer-, Nickel- und Cobaltionen mit Sättigungskapazitäten zwischen ca.  $5$  und  $20 \mu\text{mol/g}$  immobilisiert werden. Basierend auf REM-Aufnahmen von IDA-aktivierten und mit  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen dekorierten Membranen kann eine homogene Porenverteilung und -struktur im Vergleich zu einer unbehandelten Membran aufgezeigt werden. Eine Langzeitstabilitätsanalyse ergibt, dass die getrockneten und bei RT gelagerten IMAC-Hohlfasermembranen mindestens vier Wochen stabil sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit schaffen ein breites Spektrum an Kupplungsmöglichkeiten für spezifische Liganden und ermöglichen somit einen variablen Einsatz im Bereich der Membranchromatographie. Besonders das große Anwendungspotential heterogen modifizierter Hohlfasermembranen in der Form von Ionenaustauscher- und IMAC-Matrizes im Bereich des Downstream Processings wird aufgezeigt. Durch den Einsatz modifizierter Q- und D-Hohlfasermembranen ist es gelungen, ein Modellprotein in der Form von BSA erfolgreich und mit hoher Produktwiederfindung ( $99,9$  und  $91,3 \%$ ) aufzureinigen. Weiterhin zeigen IDA-aktivierte Membranen neben ihren chelatisierenden Eigenschaften auch Anwendungspotential im Bereich der Proteinaufreinigung, wobei der zwitterionische Charakter terminaler Funktionsgruppen (Ammonium- und Carboxylatgruppen) über den pH-Wert eingesetzter Reaktionslösungen steuerbar ist. Im Vergleich zu eingesetzten Anionenaustauschermembranen liegen die Proteinbindungskapazitäten der IDA-Membranen jedoch deutlich unter deren Level.

Ein besonderes Interesse im Hinblick auf die Aufreinigung his-getagter Proteine aus verschiedenen zur Verfügung stehenden Testorganismen (*E.coli*, *B.megaterium*) richtet sich auf den Einsatz von IMAC-Hohlfasermembranen im Bereich des Downstream Processings. Anhand der Aufreinigung des intrazellulär gebildeten Proteins GFP-His aus *E.coli* steht der Einfluss häufig verwendeter Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ ) von IMAC-

Hohlfasermembranen auf die Bindungsstärke und Selektivität im Aufreinigungsprozess im Mittelpunkt der Untersuchungen. In Übereinstimmung mit Literaturdaten kann aufgezeigt werden, dass die Bindungsstärke gegenüber GFP-His-Molekülen in der Reihenfolge  $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$  abnimmt, in Bezug zur Selektivität jedoch genau die umgekehrte Reihenfolge ( $\text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ ) nachgewiesen wird [Owens et al., 2001], [Porath, 1992], [Porath, 1988].

Aufbauend auf diesen Ergebnissen ist eine Aufreinigung des his-getagten Enzyms Bgl-His mittels  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen beladenen IMAC-Membranen sowohl aus dem Zell-Lysat als auch aus dem Kulturüberstand des zweiten zur Verfügung stehenden *E.coli*-Stammes erfolgt. Erwartungsgemäß wird eine Aufreinigung des his-getagten Enzyms mit hoher Probenreinheit und in aktiver Form erzielt.

Untersuchungen ausgewählter IMAC-Hohlfasern zeigen, dass es durch Einsatz starker Chelatoren in Form von z.B. EDTA, gekoppelt mit einer nachfolgenden Neubeladung gewünschter Metallionen, möglich ist, entsprechende IMAC-Fasern nach Benutzung im Proteinaufreinigungsprozess zu regenerieren und wieder zu verwenden.

Auf Grundlage der bisher erzielten Ergebnisse werden Hohlfasermembranmodule auf IMAC-Basis im Bereich des Downstream Processings bei der Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* hinsichtlich des Adsorptions-, Wasch- und Elutionsprozesses näher beschrieben. Anhand ermittelter Durchbruchkurven sowie berechneter maximaler Bindungskapazitäten ( $Q_{\max}$ ), basierend auf Langmuir-Isotherm-Modellen, wird der Einfluss verschiedener Metallionen bei der Adsorption (Produktbeladung) aufgezeigt. Dabei werden in Übereinstimmung mit vorherigen Resultaten den  $\text{Cu}^{2+}$ - und  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen im Vergleich zu  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen deutlich höhere Bindungsstärken gegenüber his-getagten Proteinen zugeschrieben. Weiterführend gelingt ein effizienterer Waschprozess zur Entfernung ungebundener und schwach gebundener Produktmoleküle, indem die Poren der Hohlfasermembranen direkt mit Waschlösung durchspült werden, anstatt im Vergleich zu einer Umströmung der Hohlfaseraußenflächen. Durch eine Erhöhung der Flussrate im Elutionsprozess von 0,5 auf 10 mL/min bei einer im Kreislauf geschalteten Stoffführung (intrapapillärer Bereich) werden aufgrund der Durchspülung des Hohlfaserinnenraumes mit mehr Elutionsvolumen pro Zeit höhere Beladungskapazitäten der entsprechenden Elutionsfraktionen E1-E3 (Faktor 1,4-5,1) erreicht.

Im Hinblick auf die Realisierung von Bioprocessen mit einer integrierten Produktaufarbeitung wird im Rahmen dieser Arbeit aufgrund einer hohen Sekretionskapazität und Plasmidstabilität auf den Testorganismus *B.megaterium* (Lev-His) zurückgegriffen. Wichtige vorab zu untersuchende Aspekte sind dabei sowohl der Einfluss des angewendeten Desinfektionsprotokolls (NaOCl) auf die Stabilität eingesetzter IMAC-Hohlfasermembranen als auch der Einfluss und die Belastbarkeit der IMAC-Membranen im Kultivierungsprozess. Die Analyse ausgewählter IMAC-Membranen zeigt, dass die Modifizierung keinen signifikanten Einfluss auf die Kultivierung von *B.megaterium* (Lev-His) hat und die typischen Wachstumsphasen in Form von lag-, exponentieller, stationärer und Absterbe-Phase zu erkennen sind. Zudem wird die Produktion an aktiven Lev-His-Molekülen des Testorganismus nicht durch die modifizierten IMAC-Membranen beeinflusst. Die Anwendung des Desinfektionsprotokolls sowie die Kultivierung ihrerseits führen jedoch zu einer Verringerung der an der Membranoberfläche komplexierten Metallionen, so dass sich Auswascheffekte negativ auf die Metallionensättigungskapazitäten dekorierte  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Membranen auswirken und die Beladungskapazitäten nach Desinfektion und durchgeführter Kultivierung um 39-68 % abnehmen.

Die Kultivierung von *B.megaterium* im System MHFR mit bestückten IMAC-Hohlfasern kann wie erwartet erfolgreich realisiert werden, so dass neben den typischen Wachstumskurvenverläufen auch deutliche Aktivitäten des Enzyms Lev-His in der Kulturbrühe (354-688 U/mL) detektiert werden. Durch die Anwendung des bereits etablierten Protokolls zur Aufreinigung his-getagter Proteine können zwar deutliche Proteinmengen jedoch keine aktiven Lev-His-Moleküle in den Elutionsproben nachgewiesen werden. Für weiterführende Analysen bei der Optimierung von Bioprocessen mit einer integrierten Produktaufarbeitung sollten daher nachfolgend angegebene mögliche Fehlerquellen in Betracht gezogen werden.

Es wird zukünftig die Aufgabe sein, zum Einen eine gegenüber Auswascheffekten stabile IMAC-Affinitätsmembran mit ausreichender Beladungsdichte gebundener Metallionen in das System MHFR einzufügen. Dabei könnte neben der Etablierung anderer Derivatisierungen zur Membranaktivierung auch die Analyse weiterer Chelatoren (z.B. NTA, TED, TREN) sowie alternativer Metallionen (z.B.  $\text{Fe}^{3+}$ ) im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen. Zum Anderen besteht die Möglichkeit, dass sekretierte Lev-His-Moleküle im Hinblick auf das angewendete Aufreinigungsprotokoll nicht stabil sind und das aufgereinigte Enzym in einer

inaktiven Form vorliegt, so dass ein Screening nach einem geeigneteren Puffersystem (Wasch- sowie Elutionspuffer) anzustreben ist. Hinsichtlich einer möglichen Blockierung der  $Me^{2+}$ -Koordinationsstellen der Membran durch im LB-Medium vorhandene histidin-haltige Proteine, die auf die Verwendung von Bacto-Trypton bzw. Hefeextrakt zurückzuführen sind, empfiehlt es sich, geeignetere synthetische Medien zu testen.

Alternativ besteht jedoch die Möglichkeit, eine integrierte Prozessführung in der Art durchzuführen, dass dem MHFR für den Kultivierungsprozess ein IMAC-Affinitätshohlfasermodule zur Aufreinigung his-getagter Proteine nachgeschaltet wird. Somit können erforderliche Prozessschritte nach der Kultivierung, wie z.B. eine Zell-Lyse bei Aufarbeitungen von intrazellulär gebildeten Produkten oder ein Aufkonzentrierungsschritt des Kulturüberstandes bei geringer Produktkonzentration, durchgeführt werden. Zudem wird somit die Problematik auftretender Auswascheffekte umgangen. Durch Einsatz der Testorganismen *E.coli* (GFP-His, intrazellulär) und *E.coli* (Bgl-His, extrazellulär) im System MHFR gelingt eine erfolgreiche Produktaufreinigung über verschiedene Typen nachgeschalteter  $Co^{2+}$ -Affinitätsmodule, die sich im Membranmaterial sowie Porengröße unterscheiden. Somit ist das gekoppelte System aus MHFR und nachgeschaltetem Affinitätsmodul flexibel in den Anwendungsbereichen Kultivierung und Downstream Processing einsetzbar und kann an verschiedene biotechnologische Problemstellungen angepasst werden.

Zukünftige Untersuchungen im Bereich Kultivierung und integriertes Downstreaming sollten sich intensiv mit dem Thema des Biofouling beschäftigen, um die Eigenschaften eingesetzter Hohlfasermembranen in Kultivierungs- und Aufreinigungsprozessen näher charakterisieren zu können. Zudem sollte sich der Blick auf die Stabilität modifizierter Hohlfasern gegenüber gängigen Desinfektions- sowie Sterilisationsverfahren richten.

## 5 Literatur

**Abetz, V., Brinkmann, T., Dijkstra, M., Ebert, K., Fritsch, D., Ohlrogge, K., Paul, D., Peinemann, K-V., Pereira Nunes, S., Scharnagl, N., Schossig, M.:** "Developments in Membrane Research: from Material via Process Design to Industrial Application", *Advanced Engineering Materials* **2006**, 8, 328-358.

**Albrecht, W., Seifert, B., Weigel, T., Schossig, M., Holländer, A., Groth, T., Hilke, R.:** "Amination of Poly(etherimide) Membranes Using Di- and Multivalent Amines", *Macromolecular Chemistry and Physics* **2003**, 204, 510-521.

**Aravind, U. K., Mathew, J., Aravindakumar, C. T.:** "Transport studies of BSA, lysozyme and ovalbumin through chitosan/polystyrene sulfonate multilayer membrane", *Journal of Membrane Science* **2007**, 299, 146-155.

**Arkhangelsky, E., Kuzmenko, D., Gitis V.:** "Impact of chemical cleaning on properties and functioning of polyethersulfone membranes", *Journal of Membrane Science* **2007**, 305, 176-184.

**Atkins, P. W., de Paula, J.:** "Physikalische Chemie", 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2006**.

**Ausar, S. F., Bianco, I. D., Castagna, L. F., Alasino, R. V., Narambuena, C. F., Leiva, E. P. M., Beltramo, D. M.:** "Reversible precipitation of casein micelles with a cationic hydroxyethylcellulose", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 9031-9038.

**Biedendieck, R., Beine, R., Gamer, M., Jordan, E., Buchholz, K., Seibel, J., Dijkhuizen, L., Malten, M., Jahn, D.:** "Export, purification, and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*", *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, 74, 1062-1073.

**Binkowski, S.:** "Zur modellgestützten Bestimmung von Stoffübergangskoeffizienten der Gasabsorption für Hohlfaser-Membranmodule", Dissertation, Universität Dortmund, **2007**.

**Blum, H., Hildburg, B., Gross, H.:** "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels", *Electrophoresis* **1987**, 8, 93-99.

**Borriss, R., Buettner, K., Maentsaelae, P.:** "Structure of the beta-1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*: homologies to other beta-glucanases", *Molecular and General Genetics* **1990**, 222, 278-283.

**Bradford, M. M.:** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry* **1976**, 72, 248-254.

**Breitbach, L., Hinke, E., Staude, E.:** "Heterogeneous functionalizing of polysulfone membranes", *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1991**, 184, 183-196.

**Bueno, S. M. A., Haupt, K., Vijayalakshmi, M. A.:** "Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immobilized L-histidine in hollow fibre membranes", *Journal of Chromatography B* **1995**, 667, 57-67.

**Camperi, S. A., Grasselli, M., Cascone, O.:** "High-speed pectic enzyme fractionation by immobilised metal ion affinity membranes", *Bioseparation* **2000**, 9, 173-177.

**Camperi, S. A., del Canizo, A. A. N., Wolman, F. J., Smolko, E. E., Cascone, O., Grasselli, M.:** "Protein Adsorption onto Tentacle Cation-Exchange Hollow-Fiber Membranes", *Biotechnology Progress* **1999**, 15, 500-505.

**Chmiel, H.:** "Bioprozesstechnik", 2. Auflage, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, **2006**.

**Clemmitt, R. H., Chase, H. A.:** "Facilitated Downstream Processing of a Histidine-Tagged Protein from Unclarified *E. Coli* Homogenates Using Immobilized Metal Affinity Expanded-Bed Adsorption", *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, 67, 206-216.

**Colomer-Pallas, A., Pereira, Y., Petit-Glatron, M-F., Chambert, R.:** "Calcium triggers the refolding of *Bacillus subtilis* chitosanase", *Biochemical Journal* **2003**, 369, 731-738.

**Curcio, E., De Bartolo, L., Barbieri, G., Rende, M., Giorno, L., Morelli, S., Drioli, E.:** "Diffusive and convective transport through hollow fiber membranes for liver cell culture", *Journal of Biotechnology* **2005**, 117, 309-321.

**de Aquino, L. C. L., de Sousa, H. R. T., Miranda, E. A., Vilela, L., Bueno, S. M. A.:** "Evaluation of IDA-PEVA hollow fiber membrane metal ion affinity chromatography for purification of a histidine-tagged human proinsulin", *Journal of Chromatography B* **2006**, 834, 68-76.

**Dorfner, K.:** "Introduction to Ion Exchange and Ion Exchangers", Ion Exchangers, de Gruyter, Berlin, New York, **1991**.

**DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F.:** "Calorimetric method for determination of sugars and related substances", *Analytical Chemistry* **1956**, 28, 350-356.

**Ersöz, M., Gügöl, I. H., Cimen, A., Leylek, B., Yildiz, S.:** "The sorption of metals on the polysulfone cation exchange membranes", *Turkish Journal of Chemistry* **2001**, 25, 39-48.

**Feng, S., Pan, C., Jiang, X., Xu, S., Zhou, H., Ye, M., Zou, H.:** " $\text{Fe}^{3+}$  immobilized metal affinity chromatography with silica monolithic capillary column for phosphoproteome analysis", *Proteomics* **2007**, 7, 351-360.

**Gaberac-Porekar, V., Menart, V.:** "Potential for Using Histidine Tags in Purification of Proteins at Large Scale", *Chemical Engineering and Technology* **2005**, 28, 1306-1314.

**Ghose, T. K.:** "Measurement of cellulase activities", *Pure and Applied Chemistry* **1987**, 59, 257-268.

**Guiver, M. D., Black, P., Tam, C. M., Deslandes, Y.:** "Functionalized polysulfone membranes by heterogeneous Lithiation", *Journal of Applied Polymer Science* **1993**, 48, 1597-1606.

**Gutiérrez, R., Martín del Valle, E. M., Galán, M. A.:** "Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends", *Separation and Purification Reviews* **2007**, 36, 71-111.

**Harkensee, D.:** "Membranmodule im Mikrolitermaßstab – Anwendungen als Membranreaktor und zur Isolierung von Glykoproteinen", Dissertation, Leibniz Universität Hannover, **2007**.

**Harkensee, D., Kökpınar, Ö., Walter, J., Kasper, C., Beutel, S., Reif, O-W., Scheper, T., Ulber, R.:** "Fast Screening for the Purification of Proteins Using Membrane Adsorber Technology", *Engineering in Life Sciences* **2007**, 7, 388-394.

**Higuchi, A., Hashiba, H., Hayashi, R., Yoon, B. O., Sakurai, M., Hara, M.:** "Serum protein adsorption and platelet adhesion on aspartic-acid-immobilized polysulfone membranes", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2004**, 15, 1051-1063.

**Higuchi, A., Mishima, S., Nakagawa, T.:** "Separation of proteins by surface modified polysulfone membranes", *Journal of Membrane Science* **1991**, 57, 175-185.

**Higuchi, A., Iwata, N., Nakagawa, T.:** "Surface-Modified Polysulfone Hollow Fibers. II. Fibers Having CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Segments and Immersed in HCl Solution", *Journal of Applied Polymer Science* **1990**, 40, 709-717.

**Hochuli, E.:** "Large-scale chromatography of recombinant proteins", *Journal of Chromatography* **1988**, 444, 293-302.

**Hollmann, R., Malten, M., Biedendieck, R., Yang, Y., Wang, W., Jahn, D., Deckwer, W-D.:** "*Bacillus megaterium* as a Host for Recombinant Protein Production", *Engineering in Life Sciences* **2006**, 6, 470-474.

**Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., Seibel, J.:** "Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*", *Biochemical Journal* **2007**, 407, 189-198.

**Hu, H-L., Wang, M-Y., Chung, C-H., Suen, S-Y.:** "Purification of VP3 protein of infectious bursal disease virus using nickel ion-immobilized regenerated cellulose-based membranes", *Journal of Chromatography B* **2006**, 840, 76-84.

**Imam-Sghiouar, N., Joubert-Caron, R., Caron, M.:** "Application of metal-chelate affinity chromatography to the study of the phosphoproteome", *Amino Acids* **2005**, 28, 105-109.

**Kara, H., Yazicigil, Z., Durmaz, F., Ersöz, M.:** "Transport of amino acids through charged cation-exchange membrane", *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2001**, 66, 1429-1442.

**Kir, E., Gengelöglu, Y., Ersöz, M.:** "Sorption of nickel and iron on polysulfone cation exchange membranes", Collection of Czechoslovak Chemical Communications **2001**, 66, 1420-1428.

**Klein, E.:** "Affinity membranes: a 10-year review", Journal of Membrane Science **2000**, 179, 1-27.

**Klein, E., Eichholz, E., Yeager D. H.:** "Affinity membranes prepared from hydrophilic coatings on microporous polysulfone hollow fibers", Journal of Membrane Science **1994**, 90, 69-80.

**Kökpınar, Ö., Harkensee, D., Kasper, C., Scheper, T., Zeidler, R., Reif, O-W., Ulber, R.:** "Innovative modular membrane adsorber system for high-throughput downstream screening for protein purification", Biotechnology Progress **2006**, 22, 1215-1219.

**Krause, S.:** "Einsatz oberflächenmodifizierter Membranen zur Proteinaufarbeitung", Dissertation, Technische Universität Berlin, **1992**.

**Kubota, N., Konno, Y., Saito, K., Sugita, K., Watanabe, K., Sugo, T.:** "Module performance of anion-exchange porous hollow-fiber membranes for high-speed protein recovery", Journal of Chromatography A **1997**, 782, 159-165.

**Kubota, N., Kounosu, M., Saito, K., Sugita, K., Watanabe, K., Sugo, T.:** "Preparation of a hydrophobic porous membrane containing phenyl groups and its protein adsorption performance", Journal of Chromatography A **1995**, 718, 27-34.

**Kugel, K., Moseley, A., Harding, G. B., Klein, E.:** "Microporous poly(caprolactam) hollow fibers for therapeutic affinity adsorption", Journal of Membrane Science **1992**, 74, 115-129.

**Kula, M-R., Schügerl, K., Wandrey, C.:** "Technische Membranen in der Biotechnologie", GBF Monographien Band 9, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **1985**.

**Laemmli, U. K.:** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature **1970**, 227, 680-685.

**Le-Clech, P., Chen, V., Fane, T. A. G.:** "Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment", Journal of Membrane Science **2006**, 284, 17-53.

**Lottspeich, F., Zorbas, H.:** "Bioanalytik", 1. Auflage, Spektrum, Heidelberg, Berlin, **1998**.

**Lu, D., Zou, H., Guan, R., Dai, H., Lu, L.:** "Sulfonation of Polyethersulfone by Chlorosulfonic Acid, Polymer Bulletin **2005**, 54, 21-28.

**Malet, C., Vallés, J., Bou, J., Planas, A.:** "A specific chromophoric substrate for activity assays of 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolases", Journal of Biotechnology **1996**, 48, 209-219.

- Malten, M., Biedendieck, R., Gamer, M., Drews, A-C., Stammen, S., Buchholz, K., Dijkhuizen, L., Jahn, D.:** "A *Bacillus megaterium* Plasmid System for the Production, Export, and One-Step Purification of Affinity-Tagged Heterologous Levansucrase from Growth Medium", Applied and Environmental Microbiology **2006**, 72, 1677-1679.
- Marianayagam, N. J., Sunde, M., Matthews, J. M.:** "The power of two: protein dimerization in biology", Trends in Biochemical Sciences **2004**, 29, 618-625.
- Marrot, B., Barrios-Martinez, A., Moulin, P., Roche N.:** "Industrial Wastewater Treatment in a Membrane Bioreactor: A Review", Environmental Progress **2004**, 23, 59-68.
- Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M.:** "Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage", Biomacromolecules **2000**, 1, 739-745.
- Mazzola, P. G., Lam, H., Kavooosi, M., Haynes, C. A., Pessoa Jr., A., Penna, T. C. V., Wang, D. I. C., Blankschtein, D.:** "Affinity-Tagged Green Fluorescent Protein (GFP) Extraction From a Clarified *E. coli* Cell Lysate Using a Two-Phase Aqueous Micellar System", Biotechnology and Bioengineering **2006**, 93, 998-1004.
- Meyer, L.:** "Aufbau eines modularen Mikro-Hohlfaserreaktorsystems zum Screening von Verfahrensparametern im Bereich der mikrobiellen Produktion", Dissertation, Leibniz Universität Hannover, **2008**.
- Miksch, G., Fiedler, E., Dobrowolski, P., Friehs, K.:** "The kil gene of the ColE1 plasmid of *Escherichia coli* controlled by a growth-phasedependent promoter mediates the secretion of a heterologous periplasmic protein during the stationary phase", Archives of Microbiology **1997**, 167, 143-150.
- Miller, G. L.:** "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Analytical Chemistry **1959**, 31, 426-428.
- Möckel, D.:** "Ultrafiltrationsmembranen aus hydrophilisierten Polysulfonen – Verminderung der Foulingneigung?", Dissertation, Universität Essen, **1998**.
- Nabe, A.:** "Untersuchungen zur Separation von Aminosäure- und Proteingemischen mit modifizierten Polysulfon-Membranen", Dissertation, Universität Essen, **1997**.
- Nabe, A., Staude, E., Belfort, G.:** "Surface modification of polysulfone ultrafiltration membranes and fouling by BSA solutions", Journal of Membrane Science **1997**, 133, 57-72.
- Owens, R. M., Grant, A., Davies, N., O'Connor, C. D.:** "Copurification of the Lac Repressor with Polyhistidine-Tagged Proteins in Immobilized Metal Affinity Chromatography", Protein Expression and Purification **2001**, 21, 352-360.
- Pereira Nunes, S., Peinemann K-V.:** "Membrane Technology in the chemical Industry", Second Edition, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2006**.

**Porath, J.:** "Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography", Protein Expression and Purification **1992**, 3, 263-281.

**Porath, J.:** "IMAC – Immobilized metal ion affinity based chromatography", Trends in Analytical Chemistry **1988**, 7, 254-259.

**Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G.:** "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation", Nature **1975**, 258, 598-599.

**Ramesh, A., Lee, D. J., Wang, M. L., Hsu, J. P., Juang, R. S., Hwang, K. J., Liu, J. C., Tseng, S. J.:** "Biofouling in Membrane Bioreactor", Separation Science and Technology **2006**, 41, 1345-1370.

**Rautenbach, R., Albrecht, R.:** "Membrantrennverfahren – Ultrafiltration und Umkehrosmose", 1. Auflage, Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main, Berlin, München, **1981**.

**Reif, O-W., Nier, V., Bahr, U., Freitag, R.:** "Immobilized metal affinity membrane adsorbers as stationary phases for metal interaction protein separation", Journal of Chromatography A **1994**, 664, 13-25.

**Rios, G. M., Belleville, M-P., Paolucci-Jeanjean, D.:** "Membrane engineering in biotechnology: *quo vamus?*", Trends in Biotechnology **2007**, 25, 242-246.

**Ripperger, S.:** "Mikrofiltration mit Membranen – Grundlagen, Verfahren und Anwendungen", 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **1992**.

**Rodemann, K., Staude, E.:** "Polysulfone Affinity Membranes for the Treatment of Amino Acid Mixtures", Biotechnology and Bioengineering **1995**, 46, 503-509.

**Rodemann, K., Staude, E.:** "Preparation and Characterization of Porous Polysulfone Membranes with Spacer-Bonded N-Containing Groups", Journal of Applied Polymer Science **1995**, 57, 903-910.

**Rodemann, K.:** "Synthese und Charakterisierung von Affinitätsmembranen auf Basis von Polysulfon", Dissertation, Universität Essen, **1994**.

**Rodemann, K., Staude, E.:** "Synthesis and characterization of affinity membranes made from polysulfone", Journal of Membrane Science **1994**, 88, 271-278.

**Rodriguez, R., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A.:** "Cationic cellulose hydrogels: kinetics of the cross-linking process and characterization as pH-/ion-sensitive drug delivery systems", Journal of Controlled Release **2003**, 86, 253-265.

**Rodriguez-Tenreiro, C., Alvarez-Lorenzo, C., Rodriguez-Perez, A., Concheiro, A., Torres-Labandeira, J. J.:** "New cyclodextrin hydrogels cross-linked with diglycidylethers with a high drug loading and controlled release ability", Pharmaceutical Research **2006**, 23, 121-130.

**Rösler, H-W.:** "Membrantechnologie in der Prozessindustrie – Polymere Membranwerkstoffe", *Chemie Ingenieur Technik* **2005**, 77, 487-503.

**Ruckenstein, E., Guo, W.:** "Cellulose and glass fiber affinity membranes for the chromatographic separation of biomolecules", *Biotechnology Progress* **2004**, 20, 13-25.

**Santoso, F.:** "Untersuchungen zur simultanen Aminierung und Porenöffnung von Polyetherimid-Membranen", Dissertation, Technische Universität Berlin, **2004**.

**Serpa, G., Augusto, E. F. P., Tamashiro, W. M. S. C., Ribeiro, M. B., Miranda, E. A., Bueno, S. M. A.:** "Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G1 monoclonal antibody", *Journal of Chromatography B* **2005**, 816, 259-268.

**Shentu, B., Zhu, Q., Liu, Q., Weng, Z.:** "Kinetics and Equilibrium of Cobalt Ion Adsorption on Cross-Linked Polyethylenimine Membrane", *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, 105, 1964-1967.

**Smidl, P., Plicka, J., Kleinmann, I.:** "Separon HEMA modified for immobilized metal ion affinity chromatographic separation of proteins", *Journal of Chromatography* **1992**, 598, 15-21.

**Stade, E.:** "Membranen und Membranprozesse", Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **1992**.

**Stade, E., Breitbach, L.:** "Polysulfones and Their Derivatives: Materials for Membranes for Different Separation Operations", *Journal of Applied Polymer Science* **1991**, 43, 559-566.

**Stetter, D.:** "Dimensionierung von Chelat-Ionenaustauschern bei der Trinkwasseraufbereitung", Dissertation, Universität Duisburg-Essen, **2004**.

**Strathmann, H.:** "Membranes and membrane processes in biotechnology", *Trends in Biotechnology* **1985**, 3, 112-118.

**Suen, S-Y., Liu, Y-C., Chang, C-S.:** "Exploiting immobilized metal affinity membranes for the isolation or purification of therapeutically relevant species", *Journal of Chromatography B* **2003**, 797, 305-319.

**Sulkowski, E.:** "The Saga of IMAC and MIT", *BioEssays* **1989**, 10, 170-175.

**Sundberg, L., Porath, J.:** "Preparation of Adsorbents for biospecific affinity chromatography, I. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes", *Journal of Chromatographie* **1974**, 90, 87-98.

**Tsai, Y-D., Suen, S-Y.:** "Breakthrough Curve Performance Using Plate-and-Frame Affinity-Membrane Modules", *Industrial and Engineering Chemistry Research* **2001**, 40, 854-861.

**Uchida, E., Uyama, Y., Ikada, Y.:** "Sorption of Low-Molecular-Weight Anions into Thin Polycation Layers Grafted onto a Film", *Langmuir* **1993**, 9, 1121-1124.

- Ulbricht, M.:** "Advanced functional polymer membranes", *Polymer* **2006**, 47, 2217-2262.
- Ulbricht, M., Riedel, M., Marx, U.:** "Novel photochemical surface functionalization of polysulfone ultrafiltration membranes for covalent immobilization of biomolecules", *Journal of Membrane Science* **1996**, 120, 239-259.
- van Hijum, S. A. F. T., Szalowska, E., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L.:** "Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*", *Microbiology* **2004**, 150, 621-630.
- Varela, L. M., Garcia, M., Perez-Rodriguez, M., Taboada, P., Ruso, J. M., Mosquera, V.:** "Multilayer adsorption model for the protein-ligand interaction", *Journal of Chemical Physics* **2001**, 114, 7682-7687.
- Vijayalakshmi, M. A.:** "Pseudobiospecific ligand affinity chromatography", *Trends in Biotechnology* **1989**, 7, 71-76.
- Villain, L., Meyer, L., Kroll, S., Beutel, S., Scheper, T.:** "Development of a Novel Membrane Aerated Hollow-Fiber Microbioreactor", *Biotechnology Progress* **2008**, 24, 367-371.
- Wang, A. A., Chen, W., Mulchandani, A.:** "Detoxification of Organophosphate Nerve Agents by Immobilized Dual Functional Biocatalysts in a Cellulose Hollow Fiber Bioreactor", *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 91, 379-386.
- Weiß, J.:** "Ionenchromatographie", 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2001**.
- Xu, Y., Sirkar, K. K., Dai, X-P., Luo, R. G.:** "A New Integrated Membrane Filtration and Chromatographic Device", *Biotechnology Progress* **2005**, 21, 590-597.
- Yang, L., Hsiao, W. W., Chen, P.:** "Chitosan-cellulose composite membrane for affinity purification of biopolymers and immunoadsorption", *Journal of Membrane Science* **2002**, 197, 185-197.
- Yang, L., Jia, L., Zou, H., Zhang, Y.:** "Immobilized iminodiacetic acid (IDA)-type Cu<sup>2+</sup>-chelating membrane affinity chromatography for purification of bovine liver catalase", *Biomedical Chromatography* **1999**, 13, 229-234.
- Zhu Y., Gao, C., Liu, X., Shen, J.:** "Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells", *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1312-1319.
- Zou, H., Luo, Q., Zhou, D.:** "Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2001**, 49, 199-240.

## 6 Anhang

### 6.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien

**Acid-Orange-2 (AO2)**, Natriumsalz, Sigma/Aldrich

**2-Aminoethanol (AE)**, Fluka

**6-Amino-1-hexanol (AH)**, Fluka

**6-Aminohexansäure (AHS)**, Fluka

**Ampicillin**, Sigma/Aldrich

**Bacto-Trypton**, Fluka

**Bortrifluorid-Etherat**, Fluka

**Bovines Serum Albumin (BSA)**, Serva

**Calciumchlorid Dihydrat**, Sigma/Aldrich

**Cellulose**, Serva

**Cobalt(II)-sulfat Heptahydrat**, Sigma/Aldrich

**Coomassie Brilliant Blau G250**, Serva

**1,6-Diaminohexan (DAH)**, Fluka

**Diethylamin (DEA)**, Riedel-de Haën

**3,5-Dinitrosalicylsäure**, Sigma/Aldrich

**Essigsäure**, Riedel-de Haën

**Ethanol**, Fluka

**Ethylendiamintetraacetat Dihydrat, Dinatriumsalz (EDTA-2Na)**, Fluka

**Ethylenglycoldiglycidylether (EGDGE)**, techn. 50 %, Sigma/Aldrich

**Formaldehyd**, Fluka

**Rek. GFP**, BD Biosciences

**$\beta$ -D-Glucan (aus Gerste)**, Sigma/Aldrich

**$\beta$ -Glucanase (aus *B.subtilis*)**, Sigma/Aldrich

**Glukose**, Sigma/Aldrich

**Glycin**, Fluka

**Hefeextrakt**, Sigma/Aldrich

**Hydroxyethylcellulose (HEC, Cellosize WP-40)**, Fluka  
**Hydroxyethylcellulose-Ethoxylat (HEC, PQ 10)**, Sigma/Aldrich  
**Imidazol**, Sigma/Aldrich  
**Iminodiessigsäure (IDA)**, Sigma/Aldrich  
**Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid**, Sigma/Aldrich  
**Kaliumhydroxid**, Sigma/Aldrich  
**Kalium-Natrium-Tartrat**, Sigma/Aldrich  
**Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat**, Fluka  
**Marker für SDS-PAGE (PageRuler<sup>TM</sup> Protein Ladder, #SM0661)**, Fermentas  
 **$\beta$ -Mercaptoethanol**, Sigma/Aldrich  
**Methanol**, Riedel-de Haën  
**Methylcellulose**, Sigma/Aldrich  
**Natriumacetat Trihydrat**, Fluka  
**Natriumazid**, Sigma/Aldrich  
**Natriumborhydrid**, Sigma/Aldrich  
**Natriumcarbonat**, Fluka  
**Natriumchlorid**, Fluka  
**Natriumdihydrogenphosphat**, Fluka  
**Natriumdodecylsulfat**, Sigma/Aldrich  
**Natriumhydroxid**, Sigma/Aldrich  
**Natriumhypochlorit (~ 10 %)**, Sigma/Aldrich  
**Natriumsulfat**, Sigma/Aldrich  
**Nickel(II)-sulfat Hexahydrat**, Riedel-de Haën  
**Phenol**, Fluka  
**Phosphorsäure (85 %)**, Fluka  
**2-Propanol**, Fluka  
**Saccharose**, Sigma/Aldrich  
**Salzsäure**, Fluka  
**Schwefelsäure (konz.)**, Riedel-de Haën  
**Silbernitrat**, Riedel-de Haën  
**Taurin (TAU)**, Sigma/Aldrich  
**Triethylamin (TEA)**, Sigma/Aldrich

**Trikaliumhexacyanoferrat(III)**, Sigma/Aldrich

**Tris Base (pH 7-9)**, Sigma/Aldrich

**Zink(II)-sulfat Heptahydrat**, Sigma/Aldrich

### 6.1.2 Materialien

**Einmalküvetten**, Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag.

**Einmalspritzen**, Chirana-Prema Deutschland, Aachen.

**High Flux PS- und Low Flux PS-Hohlfasermembranen**, Membrana GmbH, Wuppertal.

**MicroPES-Flachmembranen**, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.

**MicroPES- und UltraPES-Hohlfasermembranen**, Membrana GmbH, Wuppertal.

**Pipettenspitzen**, Eppendorf AG, Hamburg.

**PVDF-Hohlfasermembranen**, Toyobo, Japan.

**Quarzglasküvetten**, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim.

**Schläuche (Silikon, PVC)**, VWR, Darmstadt.

**Silikonkleber Elastosil RT 601**, Wacker Silicone, Ottobrunn.

**Spin-Module**, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.

**Sterilfilter 0,2 µm Minisart 2000**, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.

**Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin 20 ml**, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.

## 6.2 Verwendete Lösungen

### Aufschlusspuffer bei der Aufreinigung his-getagter Proteine

- 0,599 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (50 mM)
- 1,7535 g  $\text{NaCl}$  (300 mM)
- 90 mL entionisiertes  $\text{H}_2\text{O}$  zugeben
- mit  $\text{NaOH}$  auf pH 8,0 einstellen
- mit entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 mL auffüllen

### Equilibrierungspuffer bei der Aufreinigung his-getagter Proteine

- 0,599 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (50 mM)
- 1,7535 g  $\text{NaCl}$  (300 mM)
- 0,0681 g Imidazol (10 mM)
- 90 mL entionisiertes  $\text{H}_2\text{O}$  zugeben
- mit  $\text{NaOH}$  auf pH 8,0 einstellen
- mit entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 mL auffüllen

### Waschpuffer bei der Aufreinigung his-getagter Proteine

- Herstellung wie Equilibrierungspuffer mit der Ausnahme, dass 0,1362 g Imidazol (20 mM) eingesetzt werden

### Elutionspuffer bei der Aufreinigung his-getagter Proteine

- Herstellung wie Equilibrierungspuffer mit der Ausnahme, dass 1,702 g Imidazol (250 mM) eingesetzt werden

### Bradford-Reagenzlösung zur Proteinbestimmung

- 10 mg Coomassie Brilliant Blau G250
- 5 mL Ethanol (95 %)
- 10 mL Phosphorsäure (85 %)
- mit entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 mL auffüllen

### DNS-Reagenzlösung für die Enzymaktivitäts-Tests

- 1 g 3,5-Dinitrosalicylsäure
- 30 g Kalium-Natrium-Tartrat
- 1,6 g  $\text{NaOH}$
- mit entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 mL auffüllen

**EDTA-2Na-Lösung zur Ablösung komplexierter Metallionen**

- 3,7224 g EDTA-2Na · 2 H<sub>2</sub>O (100 mM)
- mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auf 100 mL auffüllen (pH 5,4)

**LB-Medium 1 (Ampicillin-haltig, 100 µg/mL)**

- 10 g Bacto-Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- 990 mL entionisiertes H<sub>2</sub>O zugeben
- Die Lösung wird anschließend für 30 min bei 121 °C autoklaviert.
- Nach dem Abkühlen werden noch 10 mL einer 10 mg/mL-haltigen Ampicillin-Lösung zugegeben.

**LB-Medium 2 (Tetracyclin-haltig, 10 µg/mL)**

- 10 g Bacto-Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- 990 mL entionisiertes H<sub>2</sub>O zugeben
- Die Lösung wird anschließend für 30 min bei 121 °C autoklaviert.
- Nach dem Abkühlen werden noch 10 mL einer 1 mg/mL-haltigen Tetracyclin-Lösung zugegeben.

**0,9 %ige NaCl-Lösung**

- 0,9 g NaCl
- mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auf 100 mL auffüllen

**Regenerationspuffer 1 für IMAC-Membranen (EDTA-haltig)**

- 1,8612 g EDTA-2Na · 2 H<sub>2</sub>O (50 mM)
- 90 mL entionisiertes H<sub>2</sub>O zugeben
- mit NaOH auf pH 8 einstellen
- mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auf 100 mL auffüllen

**Regenerationspuffer 2 für IMAC-Membranen (Imidazol-haltig)**

- 0,599 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM)
- 1,7535 g NaCl (300 mM)
- 6,81 g Imidazol (1 M)
- 90 mL entionisiertes H<sub>2</sub>O zugeben
- mit HCl auf pH 8,5 einstellen
- mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auf 100 mL auffüllen

**SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE**

- 0,315 g Tris/HCl (20 mM)
- 58 mg EDTA (2 mM)
- 5 g SDS (5 %)
- 20 mg Bromphenolblau (0,02 %)
- 80 mL entionisiertes H<sub>2</sub>O zugeben
- Direkt vor der Benutzung werden noch 10 mL  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie 10 mL Glycerin (55 %ig) zugesetzt.

**SDS-Laufpuffer für die SDS-PAGE (1 x TGS-Puffer)**

- 0,3 g Tris Base (25 mM)
- 14 g Glycin (192 mM)
- 1 g SDS (0,1 %)
- werden in 1 L entionisiertem H<sub>2</sub>O gelöst (pH 8,3)

**Entfärber/Fixierer-Lösung für die Silberfärbung**

- 400 mL Ethanol, 400 mL entionisiertes H<sub>2</sub>O und 80 mL Essigsäure werden miteinander vermischt.

**Farmers Reducer-Lösung für die Silberfärbung**

- Eine Spatelspitze K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] und eine Spatelspitze Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> werden in 100 mL entionisiertem H<sub>2</sub>O gelöst.

**Tris/HCl-Puffer 1 (Bindungs- und Waschpuffer bei der BSA-Aufreinigung)**

- 0,30285 g Tris Base (25 mM)
- 90 mL entionisiertes H<sub>2</sub>O zugeben
- mit HCl auf pH 7,5 einstellen
- mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auf 100 mL auffüllen

**Tris/HCl-Puffer 2-5 (Elutionspuffer 1-4 bei der BSA-Aufreinigung)**

- 0,30285 g Tris Base (25 mM)
- 1,7535 g (0,3 M) bzw. 3,507 g (0,6 M) bzw. 5,2605 g (0,9 M) bzw. 8,7675 g (1,5 M) NaCl
- 90 mL entionisiertes H<sub>2</sub>O zugeben
- mit HCl auf pH 7,5 einstellen
- mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auf 100 mL auffüllen

### 6.3 Verwendete Geräte

**Analysenwaage „Analytik AC 210S“**, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.

**Autoklav U150**, Systec GmbH, Wettengel.

**BET-Analysegerät**, Quantachrome Autosorb-1.

**Fluoreszenz-Spektralphotometer**, Hitachi F-4500, Hitachi High Technology Europe GmbH.

**Gelelektrophorese-System Criterion System**, Bio-Rad, München.

**pH-Elektrode InLab422**, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz.

**pH-Meter**, Metrohm, Filderstadt.

**Photospektrometer Multiskan**, Thermolabsystems, Langenselbold.

**Photospektrometer Cary 50**, Varian, Darmstadt.

**Pipetten und Reaktionsgefäße**, Eppendorf AG, Hamburg.

**Pumpe IPC-N**, Ismatec GmbH, Wertheim-Mondfeld.

**Schüttelschrank Certomat HK**, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.

**Sterilbank LaminAir**, Holten, Allerød, Dänemark.

**Thermoschüttler**, Eppendorf AG, Hamburg.

**Tischzentrifuge BioFuge Pico**, Heraeus, Hanau.

**Trockenschrank**, WTB Binder, Tuttlingen.

**Vortex Mixer Raex top**, Heidolph, Kelheim.

**Wasseraufbereitungsanlage**, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.

**Wasserbad**, Julabo UC, Seelbach.

**Zentrifuge IEC CL30**, Heraeus, Hanau.

## **6.4 Versuchsprotokolle zur Grundaktivierung**

### **6.4.1 Kupplung des Diepoxids EGDGE an die Basishohlfasermembran**

In 50 mL einer 0,15-1,6 M EGDGE-Lösung (in 2-Propanol-Wasser-Azeotrop) werden 0,5 g Membranmaterial sowie 250  $\mu$ L Katalysator (0,2 M Kalilauge bzw. Bortrifluorid-Etherat) gegeben und 15 h bei RT und 1.000 rpm im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wird das Membranmaterial fünfmal mit je 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

### **6.4.2 Immobilisierung von Cellulosederivaten an Epoxymembranen**

Jeweils 0,5 g Membranmaterial werden mit 50 mL einer wässrigen 0,611 %igen Lösung von a) Hydroxyethylcellulose-Ethoxylat (PQ 10), b) Hydroxyethylcellulose (Cellosize WP-40), c) Cellulose bzw. d) Methylcellulose und 750  $\mu$ L 1 M Kalilauge als Katalysator bei 50 °C erhitzt (Wasserbad). Nach 13 h Reaktionsdauer wird das Membranmaterial fünfmal mit je 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

Die verwendeten Reaktionslösungen a) bis d) sind vor dem Einsatz über Nacht bei RT gerührt worden.

### **6.4.3 Generierung einer epoxyaktivierten Matrixhohlfasermembran**

50 mL EGDGE-haltige Reaktionslösungen (0-1,6 M) in 0,4 M NaOH und 100 mg Natriumborhydrid werden mit 0,5 g Membranmaterial 1 h bei 50 °C (Wasserbad) erhitzt. Im Anschluss daran wird das Membranmaterial sofort fünfmal mit je 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

## **6.5 Versuchsprotokolle zur Ligandendekoration**

### **6.5.1 *prim.*-Amin-Funktionalisierung**

#### **6.5.1.1 Direkte Aminierung mit Ammoniak**

5 mg (bzw. 0,5 g) Membranmaterial werden mit 2 mL (bzw. 50 mL) wässriger Ammoniak-Lösung (25 %) bei RT 1 h im Thermomixer geschüttelt (1.000 rpm). Danach werden die Membranen fünfmal mit je 2 mL (bzw. 50 mL) entionisiertem Wasser gewaschen.

#### **6.5.1.2 Umsetzung mit 1,6-Diaminohexan**

Zu 0,5 g Membranmaterial werden 50 mL einer 2 %igen Lösung von Diaminohexan in 0,1 M Boratpuffer (pH 9,4) gegeben und 24 h bei RT im Thermomixer geschüttelt (1.000 rpm). Anschließend wird das Membranmaterial fünfmal mit je 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

### **6.5.2 Hydroxy-Funktionalisierung**

#### **6.5.2.1 Umsetzung mit 2-Aminoethanol**

90 mg Membranmaterial werden mit 15 mL einer wässrigen 2 M 2-Aminoethanol-Lösung (pH 12) bei RT für 24 h im Thermomixer geschüttelt (1.000 rpm). Danach werden die Membranen fünfmal mit 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

#### **6.5.2.2 Umsetzung mit 6-Amino-1-hexanol**

90 mg Membranmaterial werden mit 15 mL einer wässrigen 5 %igen 6-Amino-1-hexanol-Lösung (pH 12) bei RT für 24 h im Thermomixer geschüttelt (1.000 rpm). Danach werden die Membranen fünfmal mit 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

### 6.5.3 Herstellung von Ionenaustauschermembranen

#### 6.5.3.1 Anionenaustauschermembranen

*Q-Membranen (TEA-Funktionalisierung) und D-Membranen (DEA-Funktionalisierung)*

0,5 g Membranmaterial werden mit 50 mL einer 2 M Lösung (pH 12) von TEA bzw. DEA in einem 2:1-Gemisch Wasser/Methanol versetzt und bei RT im Thermomixer (1.000 rpm) geschüttelt. Nach 24 h wird das Membranmaterial fünfmal mit je 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

#### 6.5.3.2 Kationenaustauschermembranen

*S-Membranen (TAU-Funktionalisierung)*

Zu 0,5 g Membranmaterial werden 50 mL einer 0,4 M Lösung (pH 10) von 2-Aminoethansulfonsäure (Taurin) in einem 2:1-Gemisch Wasser/Methanol gegeben und 24 h bei 85 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wird das Membranmaterial fünf Mal mit je 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

*C-Membranen (GLY-Funktionalisierung, C2-Spacer)*

Zu 0,5 g MicroPES-Hohlfasern (bzw. UltraPES-Hohlfasern) werden 50 mL einer 0,4 M (bzw. 2 M) Glycin-Lösung (pH 10) in einem 2:1-Gemisch Wasser/Methanol gegeben und 24 h bei 85 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wird das Membranmaterial fünfmal mit je 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

*C-Membranen (AHS-Funktionalisierung, C6-Spacer)*

Zu 0,5 g MicroPES-Hohlfasern (bzw. UltraPES-Hohlfasern) werden 50 mL einer wässrigen 0,4 M (bzw. 1 M) 6-Aminohexansäure-Lösung (pH 10) gegeben und 24 h bei RT im Wasserbad erhitzt. Anschließend wird das Membranmaterial fünfmal mit je 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

#### **6.5.4 Herstellung von Membranen mit chelatisierenden Eigenschaften**

Zu 0,5 g Membranmaterial wird eine Reaktionslösung (2 M IDA-2Na, pH 10) aus 4,7 g NaOH in 23 mL entionisiertem Wasser, 8,7 g Iminodiessigsäure und 11 mL Methanol gegeben und für 24 h bei 65 °C (Wasserbad) erhitzt. Danach wird das Membranmaterial fünfmal mit je 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

#### **6.5.5 Herstellung von IMAC-Hohlfasermembranen auf IDA-Basis**

0,5 g Chelatmembranmaterial werden mit 50 mL 0,5 M Metallsulfat-Lösung versetzt und bei RT im Thermomixer (1.000 rpm) geschüttelt. Nach 24 h wird das Membranmaterial fünfmal mit je 50 mL entionisiertem Wasser gewaschen.

Die Berechnung der Beladung an Metallionen pro Masse bzw. pro Oberfläche erfolgte mit Hilfe der in Abb. 50 (EDTA-Test) dargestellten Kalibrationsgeraden.

## 6.6 Versuchsprotokolle zur Bestimmung der Beladungskapazitäten modifizierter Hohlfasermembranen

### 6.6.1 Acid-Orange-2-Test (AO2-Test)

5 mg Membranmaterial werden mit 2 mL 0,5 mM Acid-Orange-2-Lösung (pH 3) versetzt und 24 h bei RT im Thermomixer (1.000 rpm) geschüttelt. Anschließend wird das Membranmaterial fünfmal mit 2 mL verdünnter Salzsäure (pH 3) gewaschen. Anschließend werden dem Membranmaterial 2 mL verdünnte NaOH-Lösung (pH 12) zugegeben und für 15 min bei RT und 1.000 rpm im Thermomixer geschüttelt. Nach Inkubation mit NaOH wird die Absorption der erhaltenen Farbstofflösung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 483$  nm gegen verdünnte NaOH-Lösung (pH 12) als Referenz am Photometer bestimmt. Die Berechnung der Beladung an funktionellen Gruppen pro Masse bzw. pro Oberfläche erfolgt mit Hilfe der in Abb. 48 dargestellten Kalibrationsgerade.

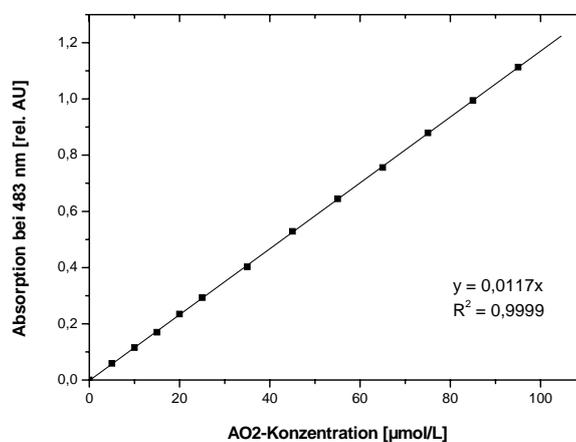


Abb. 48: Kalibrationsgerade für den AO2-Test.

### 6.6.2 Phenol-Schwefelsäure-Test

Zu einer Reaktionslösung, bestehend aus 2 mL deionisiertem Wasser, 50 µL wässriger Phenol-Lösung (80 %) und 5 mL konz. Schwefelsäure werden 25 mg Membranmaterial hinzugefügt. Zu testende Membranproben sind hydroxyaktivierte Membranen, die mit HEC (PQ 10), HEC (WP-40), CEL oder Me-CEL beschichtet worden sind. Der Reaktionsansatz wird 10 min bei

RT stehen gelassen, anschließend kurz geschüttelt und dann für 15 min bei 27,5 °C im Wasserbad temperiert. Die Absorption der Probenlösungen wird bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 490 \text{ nm}$  am Photometer bestimmt. Als Referenz dient die Reaktionslösung ohne Membranmaterial. Die Bestimmung der Zuckerkonzentrationen erfolgt mit den entsprechenden Kalibrationsgeraden (Abb. 49).

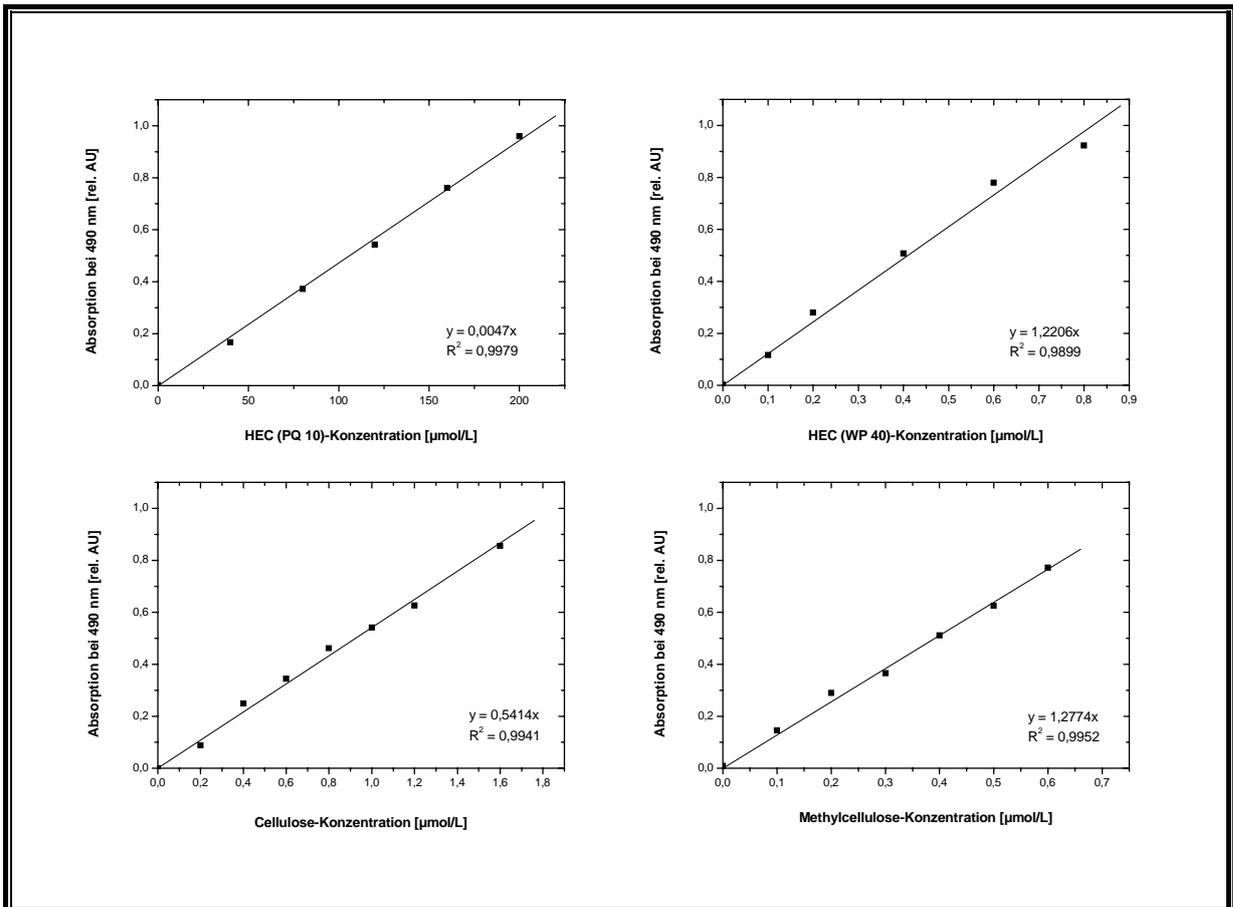
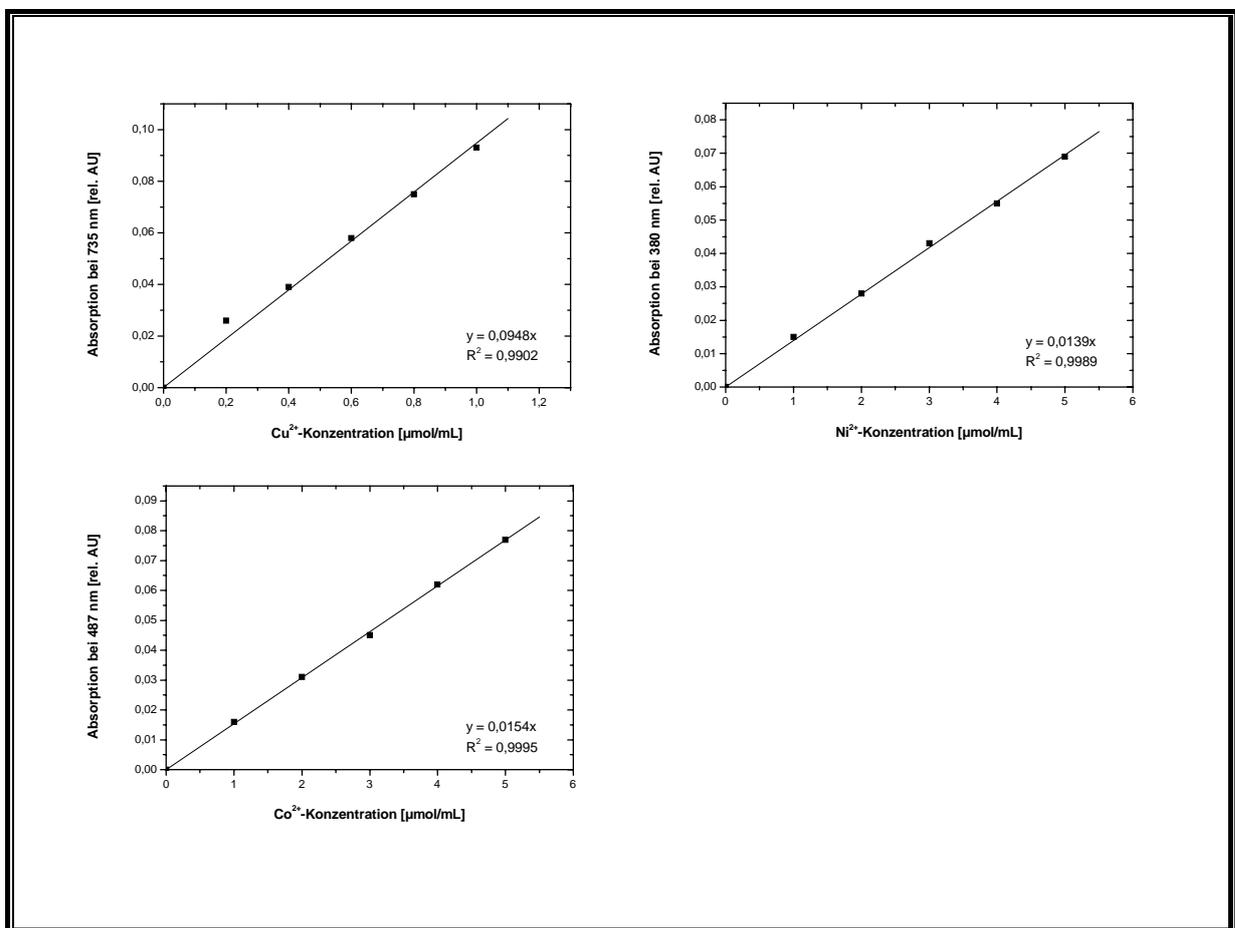


Abb. 49: Kalibrationsgeraden für den Phenol-Schwefelsäure-Test.

### 6.6.3 EDTA-Test

50 mg des mit Metallionen beladenen Membranmaterials werden mit 1 mL einer 0,1 M EDTA-2Na-Lösung (pH 5,4) versetzt und für 1 h bei RT und 1.000 rpm geschüttelt. Die Absorption der Lösung wird in Abhängigkeit der zu vermessenden Metallionenlösung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 735$  nm ( $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen),  $\lambda = 380$  nm ( $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen) oder  $\lambda = 487$  nm ( $\text{Co}^{2+}$ -Ionen) gegen 0,1 M EDTA-2Na-Lösung als Referenz am Photometer bestimmt. Die entsprechenden Kalibrationsgeraden sind in Abb. 50 dargestellt.



**Abb. 50:** Kalibrationsgeraden für  $\text{Me}^{2+}$ -Ionen in 0,1 M EDTA-2Na-Lösung bei entsprechenden Wellenlängen ( $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen bei  $\lambda = 735$  nm,  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen bei  $\lambda = 380$  nm und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen bei  $\lambda = 487$  nm).

## 6.7 Versuchsprotokolle im Bereich der Proteinaufreinigung

Die nachfolgend aufgeführten Versuchsprotokolle zur Proteinaufreinigung (Kap. 6.7.1-6.7.3) sind jeweils mit 100 mg modifizierten Hohlfasermembranen in Probenreaktionsröhrchen bei RT und 1.000 rpm durchgeführt worden.

### 6.7.1 Aufreinigung von BSA mit Anionenaustauscher- und IDA-aktivierten Hohlfasermembranen

**Tab. 23:** Prozessschritte bei der Aufreinigung von BSA mit Anionenaustauscher- und IDA-Membranen

Schritt	Lösung	Volumen [mL]	Dauer [min]
Equilibrierung	25 mM Tris/HCl (pH 7,5)	5	15
Proteinbindung	5 mg/mL BSA in 25 mM Tris/HCl (pH 7,5)	5	60
Waschschritte	25 mM Tris/HCl (pH 7,5)	6 x 15	3
Elution 1	25 mM Tris/HCl, 0,3 M NaCl (pH 7,5)	1,5	15
Elution 2	25 mM Tris/HCl, 0,6 M NaCl (pH 7,5)	1,5	15
Elution 3	25 mM Tris/HCl, 0,9 M NaCl (pH 7,5)	1,5	15
Elution 4	25 mM Tris/HCl, 1,5 M NaCl (pH 7,5)	1,5	15

### 6.7.2 Aufreinigung von GFP-His mit IMAC-Hohlfasermembranen

**Tab. 24:** Prozessschritte bei der Aufreinigung von GFP-His aus *E.coli* mit IMAC-MicroPES- und IMAC-UltraPES-Hohlfasermembranen

Schritt	Lösung	Volumen [mL]	Dauer [min]
Equilibrierung	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol (pH 8)	5	15
Proteinbindung	138,6 µg/mL GFP-His in 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl (pH 8)	5	60
Waschschritte	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol (pH 8)	4 x 50	15
Elution	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol (pH 8)	1,5	30

### 6.7.3 Aufreinigung von Bgl-His mit IMAC-Hohlfasermembranen

**Tab. 25:** Prozessschritte bei der Aufreinigung von Bgl-His aus *E.coli* mit Co<sup>2+</sup>-dekorierten UltraPES-Hohlfasermembranen

Schritt	Lösung	Volumen [mL]	Dauer [min]
Equilibrierung	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol (pH 8)	5	15
Proteinbindung	Aufreinigung aus dem Zell-Lysat: Bgl-His in 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl (pH 8)	5	60
	Aufreinigung aus dem Kulturüberstand: Bgl-His in LB-Medium	3 x 4	20
Waschschritte	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol (pH 8)	4 x 50	15
Elution	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol (pH 8)	1 x bzw. 3 x 1,5	30

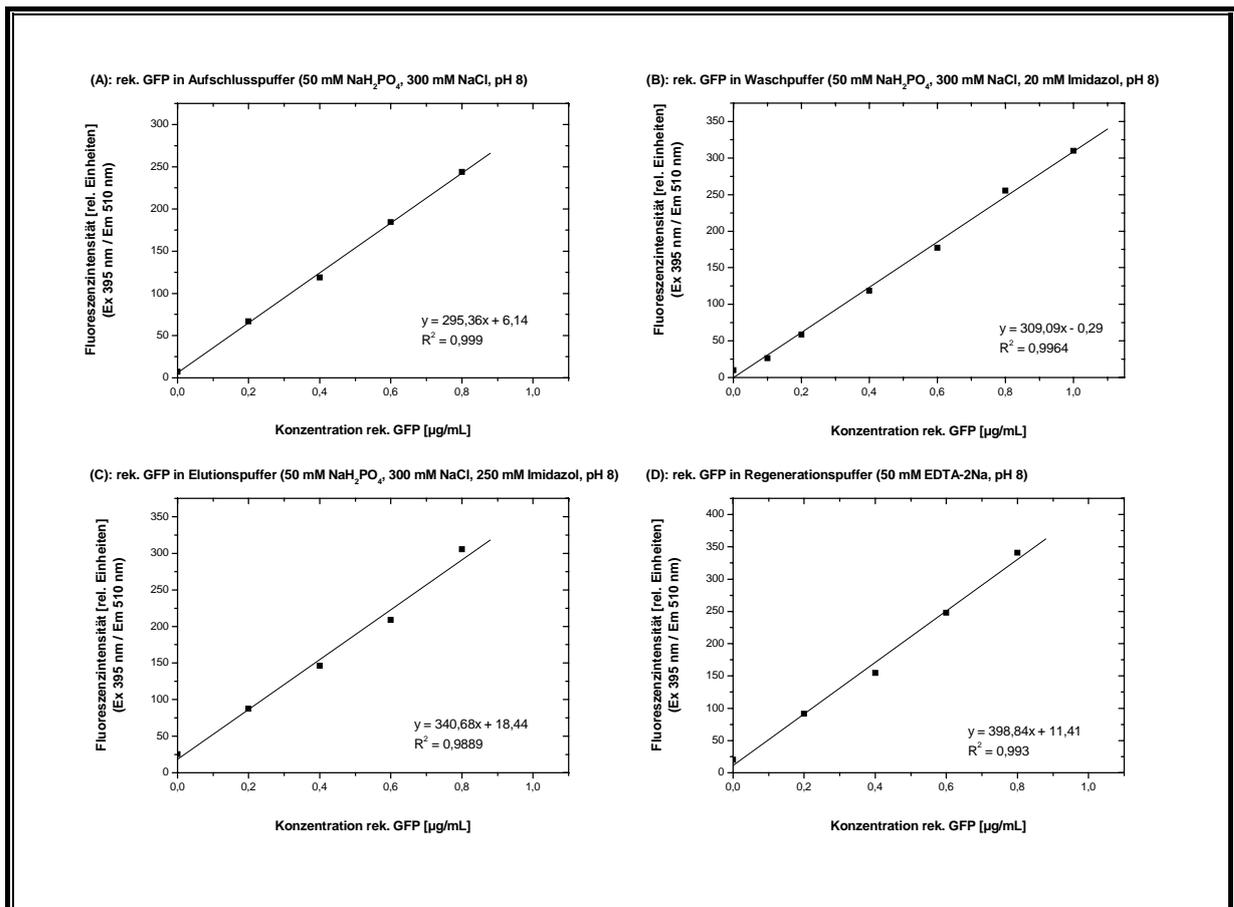
### 6.7.4 Aufreinigung von Bgl-His mit $\text{Co}^{2+}$ -dekorierten Membranadsorbermodulen (Vivapure Metal chelate Mini Spin Columns)

**Tab. 26:** Prozessschritte bei der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Kulturüberstand von *E.coli* mit  $\text{Co}^{2+}$ -dekorierten Membranadsorbermodulen

Schritt	Lösung	Volumen [mL]	Zentrifugationsgeschwindigkeit [rpm]	Zentrifugationsdauer [min]
Equilibrierung	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol (pH 8)	2 x 0,4	5.700	1
Proteinbindung	Bgl-His im Kulturüberstand (LB-Medium)	3 x 0,4	5.700	3
Waschschritte	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol (pH 8)	3 x 0,4	5.700	3
Elution	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol (pH 8)	3 x 0,4	4.000	3
Regeneration	50 mM EDTA-2Na (pH 8)	0,4	4.000	3

## 6.8 Nachweis von GFP-His mittels fluoreszenzspektroskopischer Messung

Der Nachweis von GFP-His in den zu analysierenden Proben ist mittels fluoreszenzspektroskopischer Messung (Hitachi Fluoreszenz-Spektralphotometer F-4500) erfolgt, wobei die entsprechende Exzitations- bzw. Emissionswellenlänge des Hauptpeaks bei 395 nm bzw. 510 nm verwendet worden sind. Die Erstellung der Kalibrationen im Hinblick auf die verschiedenen eingesetzten Puffersysteme (Aufschluss-, Wasch-, Elutions- und Regenerationspuffer) ist durch Verwendung eines kommerziell erhältlichen rekombinanten GFP aus transformierten *E.coli*-Zellen (BD Biosciences, Heidelberg) erfolgt [Mazzola et al., 2006]. Abb. 51 zeigt die entsprechenden Kalibrationen (A-D).



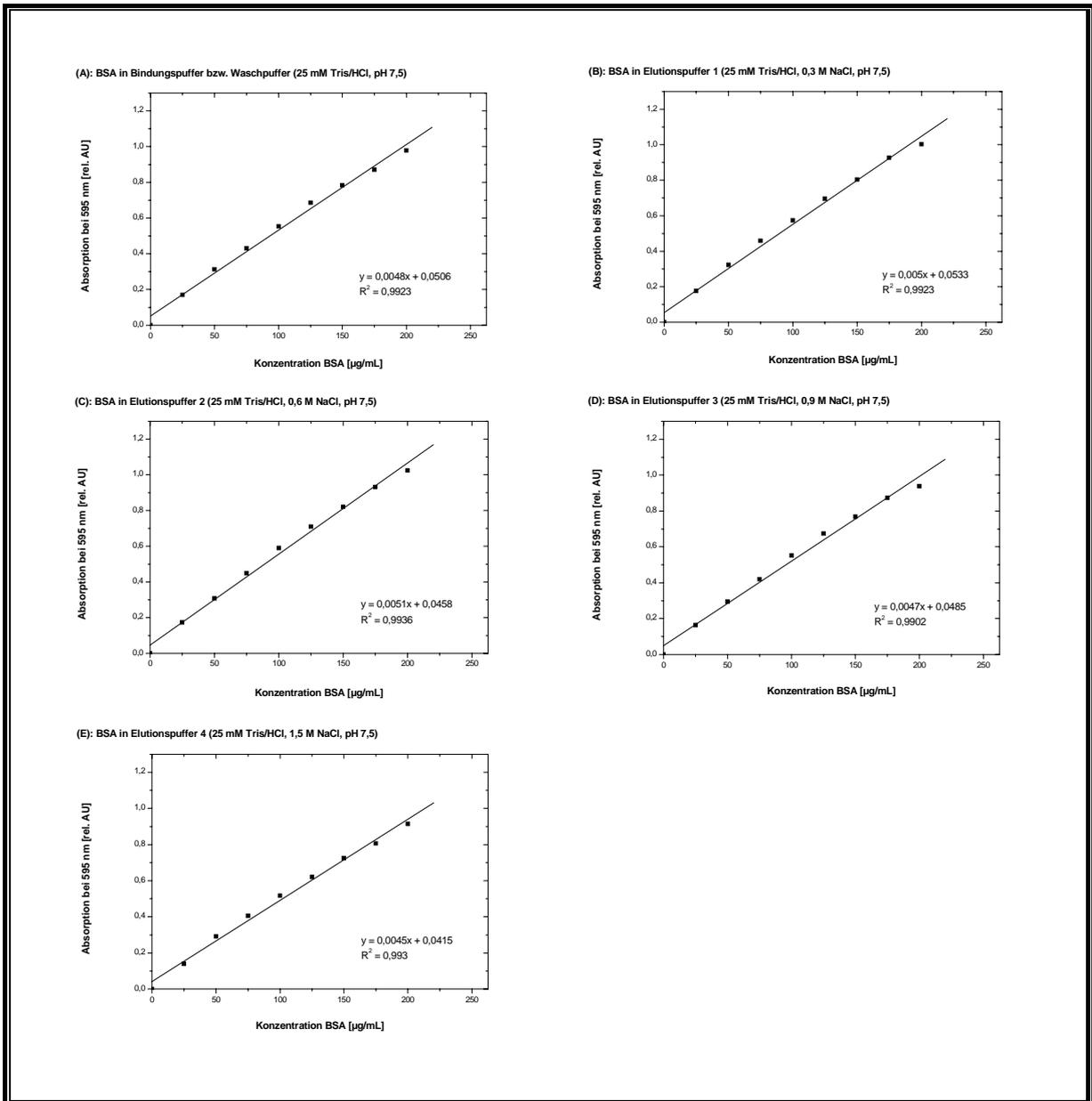
**Abb. 51:** Kalibrationsgeraden für den fluoreszenzspektroskopischen Nachweis von GFP-His in verschiedenen Puffersystemen.

## 6.9 Proteinbestimmungs- und Enzymaktivitäts-Tests

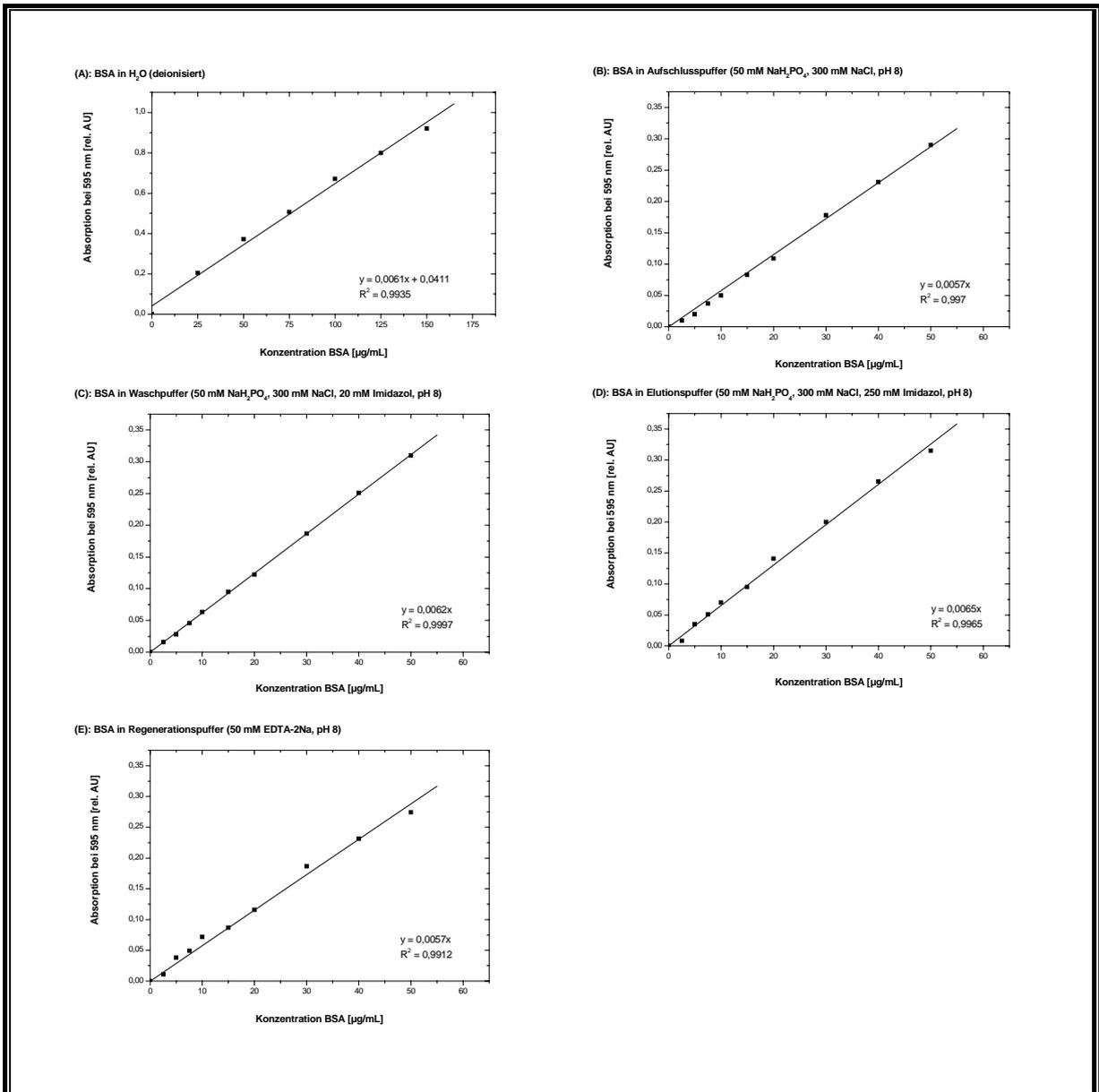
### 6.9.1 Bradford-Test (Proteinbestimmungs-Test)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration werden 100  $\mu\text{L}$  der zu untersuchenden Probe in einem 2 mL-Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt, anschließend mit 900  $\mu\text{L}$  Bradford-Reagenz versetzt und kurz geschüttelt. Nach Inkubation der Proben für 5 min bei RT wird die Reaktionslösung in eine Plastikkuvette überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595 \text{ nm}$  gegen eine Blindprobe (100  $\mu\text{L}$  Puffer + 900  $\mu\text{L}$  Bradford-Reagenz) vermessen.

Für die Erstellung der Kalibrationsgeraden ist jeweils mit BSA als Standard gearbeitet worden. Im Hinblick auf den Einsatz verschiedener Puffersysteme bei den entsprechenden Versuchen zur Proteinaufreinigung sind nachfolgend in den Abb. 52 und 53 die in dieser Arbeit verwendeten Kalibrationen dargestellt.



**Abb. 52:** Kalibrationsgeraden des Bradford-Tests für den Nachweis von BSA in verschiedenen Tris/HCl-Puffersystemen bei der Proteinaufreinigung mittels Anionenaustauscher- und IDA-Membranen.



**Abb. 53:** Kalibrationsgeraden des Bradford-Tests für den Nachweis von his-getagten Proteinen (GFP-His, Bgl-His, Lev-His) in verschiedenen Puffersystemen bei der Proteinaufreinigung mittels IMAC-Membranen. Für die Erstellung der Kalibrationen ist BSA als Standard verwendet worden.

### 6.9.2 Enzymaktivitäts-Test zum Nachweis von Bgl-His

Der angewendete Enzymaktivitäts-Test basiert auf den von Ghose und Miller dargestellten Methoden zum Nachweis reduzierender Zucker mittels Dinitrosalicylsäure-Reagenz (DNS-Reagenz) [Ghose, 1987], [Miller, 1959].

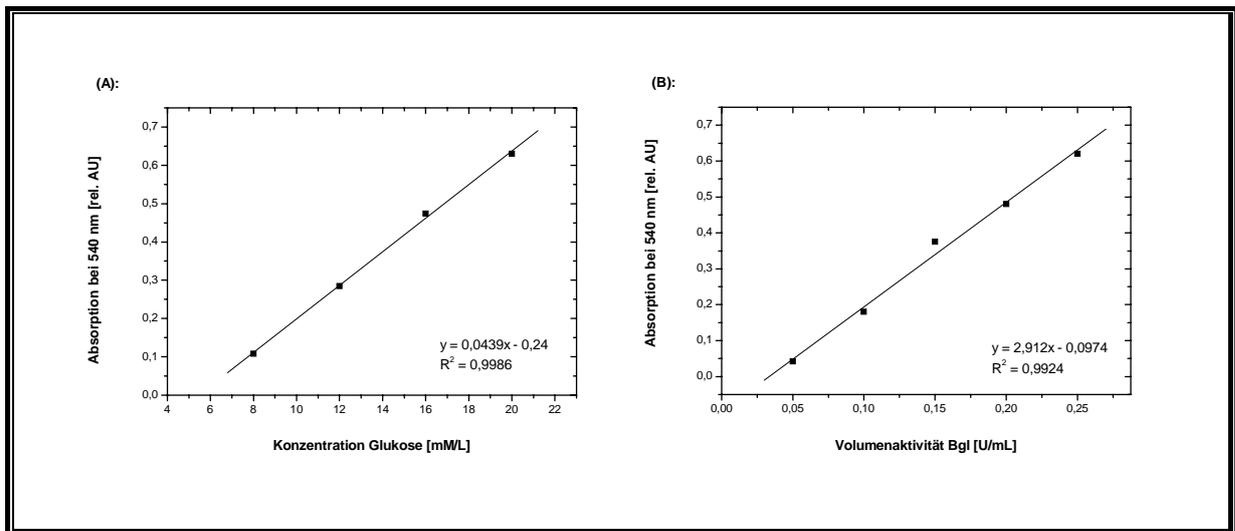
**Tab. 27:** Durchführung des Enzymaktivitäts-Tests zum Nachweis von Bgl-His aus *E.coli*

Schritt	Lösung	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Dauer [min]
1. Substratlösung vorlegen	1 mg/mL $\beta$ -D-Glucan in 50 mM Citratpuffer (pH 6)	720	55	10
2. Probenzugabe	Probenlösung	80	55	10
3. Zugabe des DNS-Reagenzes	DNS-Reagenz	1.200	99	5
4. Abkühlung der Probenlösung	Probenlösung	2.000	RT	10

Nachdem die Probe abgekühlt ist, kann die Reaktionslösung in eine Plastikkuvette überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 540 \text{ nm}$  gegen eine Blindprobe (Probenzugabe durch Einsatz von  $80 \mu\text{L}$  eines  $50 \text{ mM}$  Citratpuffers) vermessen werden.

Für die Erstellung der Kalibrationsgerade sind unterschiedliche Glukosekonzentrationen der Probenlösung im Bereich zwischen  $0$  und  $20 \text{ mM}$  eingesetzt worden (Abb. 54, A). In Anlehnung an das in Tab. 27 dargestellte Protokoll (Reaktionszeit von  $10 \text{ min}$ ) entspricht eine in der zu analysierenden Probe vorhandene Glukosekonzentration von  $10 \text{ mM}$  einer Volumenaktivität von  $16,67 \text{ nkat/mL}$  ( $1 \text{ U/mL}$ ). Anhand dieser Beziehung und unter Berücksichtigung der Kalibration können die Volumenaktivitäten von Bgl-His-haltigen Proben bestimmt werden [Ghose, 1987].

Weiterhin ist es wichtig, dass entsprechende enzymhaltige Proben nur in einem linearen Konzentrationsbereich aussagekräftige Ergebnisse liefern, so dass zusätzlich die Enzymvolumenaktivitäten eines Bgl-Standards im Bereich von  $0$  bis  $0,25 \text{ U/mL}$  analysiert worden sind (Abb. 54, B).



**Abb. 54:** Kalibrationsgeraden des Enzymaktivitäts-Tests für den Nachweis von Bgl-His bei der Protein-aufreinigung mittels IMAC-Membranen.

### 6.9.3 Enzymaktivitäts-Test zum Nachweis von Lev-His

**Tab. 28:** Durchführung des Enzymaktivitäts-Tests zum Nachweis von Lev-His aus *B.megaterium*

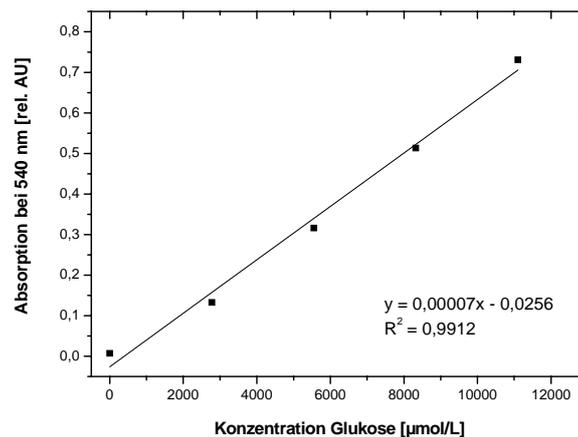
Schritt	Lösung	Volumen [ $\mu$ L]	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]
1. Substratlösung vorlegen	Saccharose-haltige Reaktionslösung *	1.350	37	10
2. Probenzugabe	Probenlösung	150	37	120
Beginnend mit einer Nullprobe sind, je nach Reaktionsstärke, verteilt über einen Zeitraum von bis zu 120 min 100 $\mu$ L Proben aus dem Reaktionsgemisch entnommen und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt worden.				
3. Zugabe des DNS-Reagenzes	DNS-Reagenz	100	99	5
4. Abkühlung der Probenlösung	Probenlösung + DNS-Reagenz	200	Eisbad	3
5. Zugabe von H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O (entionisiert)	1.000	RT	----

\* 1.350  $\mu$ L Saccharose-haltige Reaktionslösung bestehend aus 375  $\mu$ L eines 100 mM Natriumacetat-Puffers (pH 5,4), 44,1  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>-Lösung (5 g/L), 4,5  $\mu$ L Natriumazid-Lösung (10 g/L), 102,7  $\mu$ L Saccharose-Lösung (50 % (w/v)) und 823,7  $\mu$ L entionisiertem H<sub>2</sub>O.

Nachdem der Probenlösung 1 mL entionisiertes H<sub>2</sub>O zugegeben worden ist, kann die Reaktionslösung in eine Plastikkuvette überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge

von  $\lambda = 540$  nm gegen eine Blindprobe (Schritt 2: Probenzugabe durch Einsatz von 150  $\mu\text{L}$  entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$ ) vermessen werden.

Zur Erstellung der Kalibrationsgerade sind neben den Proben außerdem je 100  $\mu\text{L}$  Glukosehaltige Lösungen von 0-2 g/L mit 100  $\mu\text{L}$  DNS-Reagenz vermischt worden und nach dem in Tab. 28 dargestellten Protokoll weiter behandelt worden. Aus der in  $\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$  angegebenen Steigung der ermittelten Konzentrationswerte über den jeweiligen Messzeitraum kann die Aktivität der Levansucrase (Lev) determiniert werden. Die so ermittelte Enzymaktivität beschreibt die freigesetzte Menge an Fruktose und Glukose pro Minute. Um einen Vergleich zu Literaturwerten zuzulassen, ist mit einem Faktor von 0,56 multipliziert worden, um so eine Unit Definition zu erhalten, die die freigesetzte Menge an Glukose in  $\mu\text{mol}$  pro Minute beschreibt [Malten, 2005], [van Hijum et al., 2002].



**Abb. 55:** Kalibrationsgerade für den Enzymaktivitäts-Test zum Nachweis von Lev-His.

## **6.10 SDS-PAGE**

### **6.10.1 Probenvorbereitung und Durchführung einer SDS-PAGE**

Die Proben werden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer, dem zusätzlich noch 10 % Mercaptoethanol und 10 % Glycerin zugegeben werden, verdünnt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend werden die Proben bei maximaler Zentrifugenleistung 5 min zentrifugiert, damit sich eventuell gebildete Präzipitate absetzen. Das Gel wird in der Kammer platziert und die Elektrophoresekammer wird mit Laufpuffer (1 x TGS-Puffer) gefüllt. Nach der Entfernung des Kamms werden die Geltaschen mit einer Spritze ausgespült. Nachfolgend werden der Molekulargewichtsmarker und die vorbereiteten Proben in die Geltaschen gegeben (5 µL Marker, 12 µL Proben). Die Gelelektrophorese wird durch Anlegen einer Spannung von 100 V gestartet. Nach ca. 30 min wird die Spannung auf 200 V erhöht. Die Gelelektrophorese wird gestoppt, wenn die Bromphenolblau-Bande am unteren Gelrand angelangt ist. Die Proteinbanden auf dem Gel werden nachfolgend mittels Silberfärbung visualisiert.

### **6.10.2 Silberfärbung**

Das Gel wird für 30 min in einem Entfärber/Fixierer unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird es zweimal kurz mit entionisiertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wird es für 2,5 min in Farmers Reducer geschwenkt und solange mit entionisiertem H<sub>2</sub>O gewaschen bis das Gel vollständig entfärbt ist. Zur Komplexierung der Silberionen wird das Gel anschließend für 30 min in einer frisch zubereiteten 0,1 %-igen AgNO<sub>3</sub>-Lösung inkubiert. Danach wird es für jeweils 30 s mit entionisiertem H<sub>2</sub>O und anschließend mit einer 2,5 %-igen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Zur Entwicklung wird das Gel in 100 mL einer 2,5 %-igen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 400 µL CH<sub>2</sub>O-Lösung solange inkubiert, bis deutliche Banden sichtbar werden. Gestoppt wird die Färbung durch Schwenken des Gels für 10 min in einer 5 %-igen Essigsäure-Lösung. Danach kann das Gel zur Aufbewahrung in H<sub>2</sub>O gelagert werden.

## 6.11 Aufbau von Mikro-Hohlfaserreaktoren

### 6.11.1 Affinitätshohlfasermodul auf IMAC-Basis

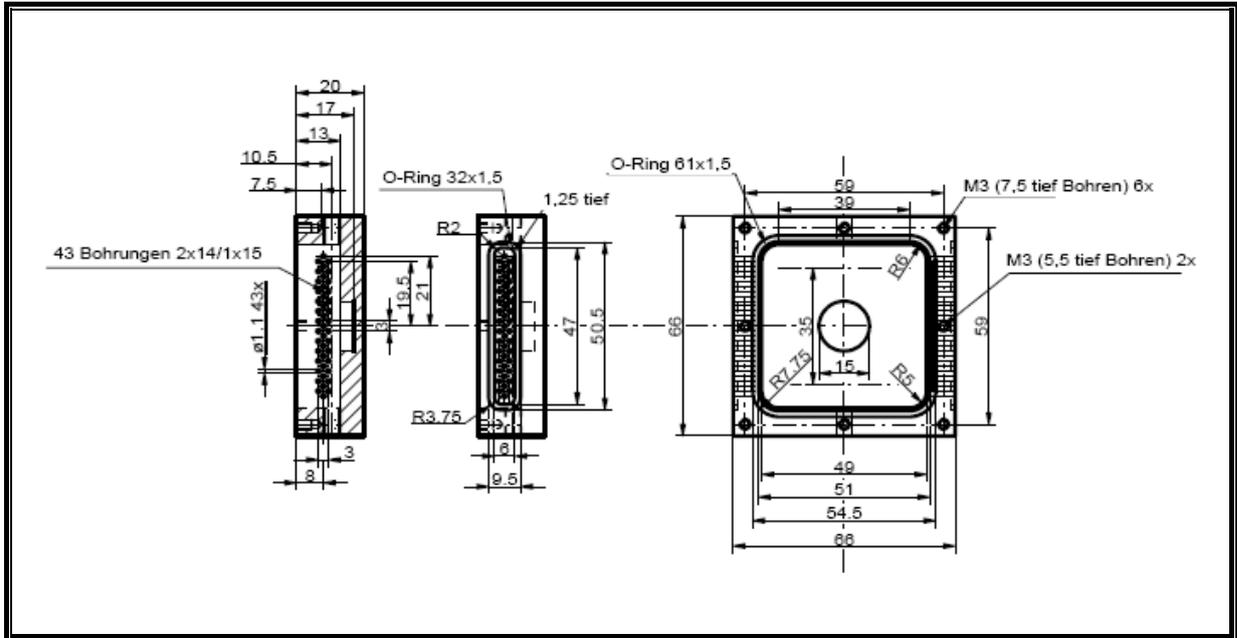


Abb. 56: Technische Zeichnung vom Aufbau des Grundkörpers eines Affinitätshohlfasermoduls, Rohstoff: PMMA (Polymethylmethacrylat, Plexiglas).

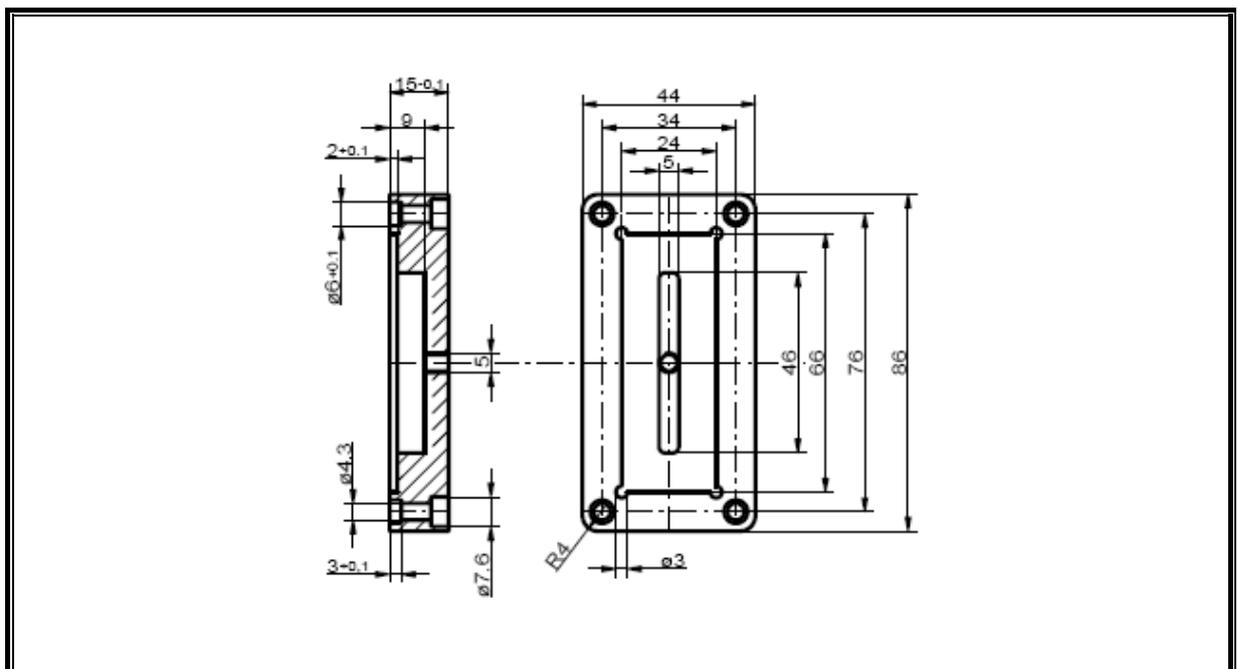


Abb. 57: Technische Zeichnung vom Aufbau des Anschluss-Systems (Seitenteil) eines Affinitätshohlfasermoduls, Rohstoff: PMMA.



## 6.11.2 Mikro-Hohlfaserreaktor

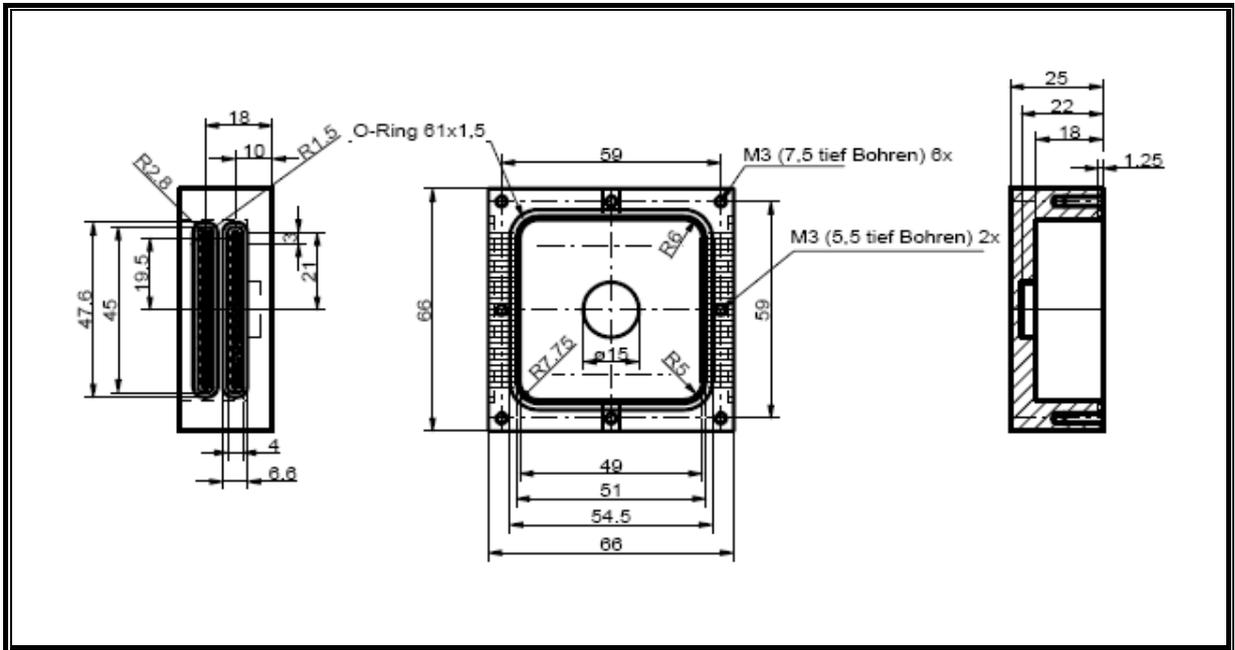


Abb. 60: Technische Zeichnung vom Aufbau des Grundkörpers eines MHFR, Rohstoff: PMMA.

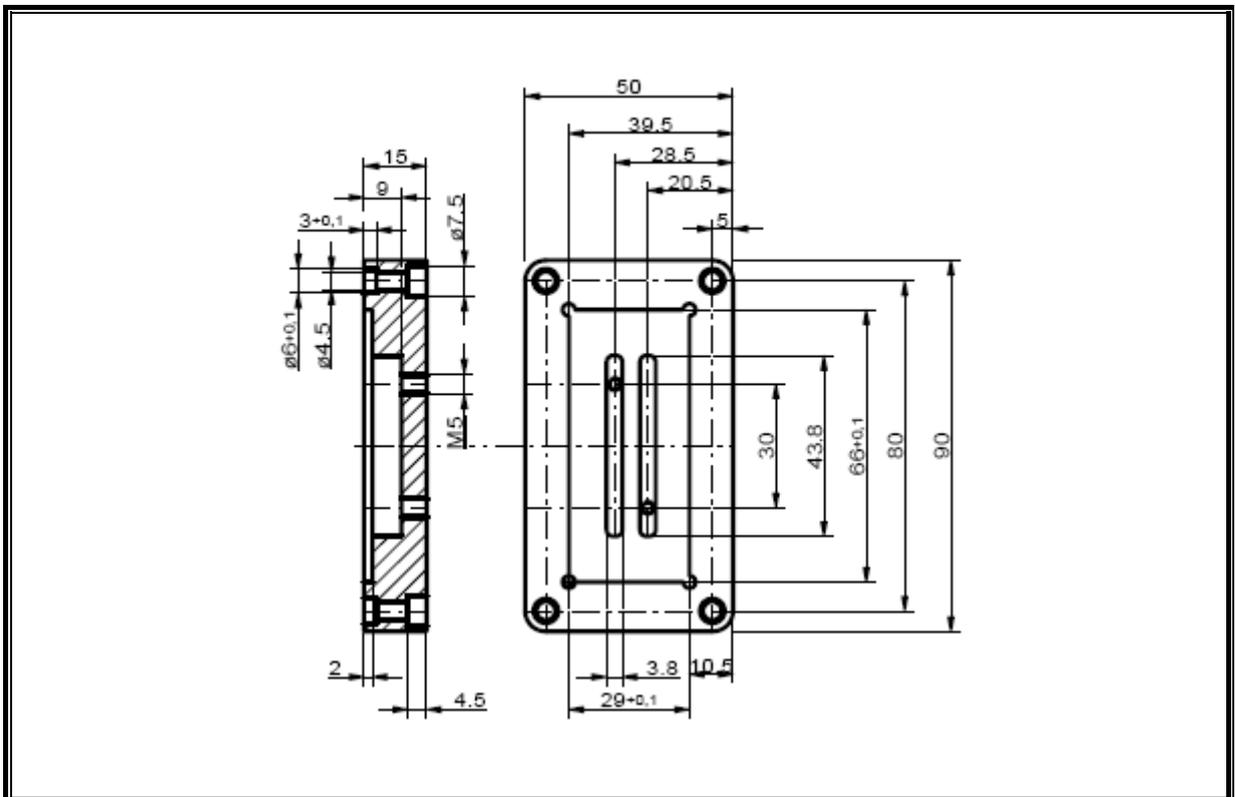
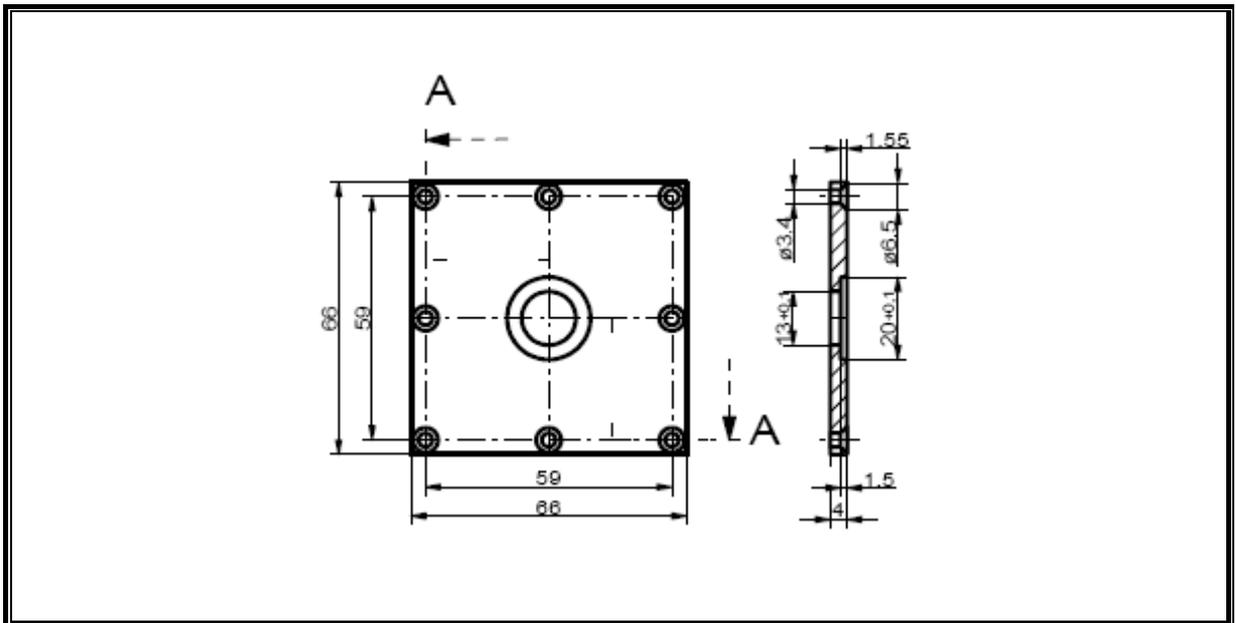


Abb. 61: Technische Zeichnung vom Aufbau des Anschluss-Systems (Seitenteil) eines MHFR, Rohstoff: PMMA.



**Abb. 62:** Technische Zeichnung vom Aufbau des Deckels (mit integriertem Probenahmesystem) eines MHFR, Rohstoff: PMMA.

## 6.12 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AE	2-Aminoethanol
AH	6-Amino-1-hexanol
AHS	6-Aminohexansäure
AO2	Acid-Orange-2
aq.	wässrig
AU	Absorptionseinheit
BET	Brunauer, Emmet, Teller
Bgl	$\beta$ -Glucanase
<i>B.megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CED	Cellulosederivat
CEL	Cellulose
Da	Dalton
DAH	1,6-Diaminohexan
DEA	Diethylamin
d.h.	das heißt
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGDGE	Ethylenglycoldiglycidylether
Em	Emissionswellenlänge
Ex	Exzitationswellenlänge
g	Gramm
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GLY	Glycin
h	Stunde(n)
HEC PQ-10	Hydroxyethylcellulose („Polyquaternium 10“)

---

HEC WP-40	Hydroxyethylcellulose („Cellosize WP-40“)
HF	Hohlfasermembran
HF-EPO	epoxyaktivierte Hohlfasermembran
His	Histidin
IDA	Iminodiessigsäure
IEX	Ionenaustausch-
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	kilo-
Kap.	Kapitel
L	Liter
Lev	Levansucrase
Li	Lithium
$\mu$	mikro-
m	milli-
M	molar
Me-CEL	Methylcellulose
MHFR	Mikro-Hohlfaserreaktor
min	Minute(n)
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
n	nano-
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PES	Polyethersulfon
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PMMA	Polymethylmethacrylat
pos.	positiv
<i>prim.</i>	primär
PS	Polysulfon
PVDF	Polyvinylidendifluorid

---

<i>quart.</i>	quartär
rek.	rekombinant
rel.	relativ
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>sek.</i>	sekundär
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TAU	Taurin
TEA	Triethylamin
TED	Tris(Carboxymethyl)-Ethylendiamin
<i>tert.</i>	tertiär
TREN	Tris(2-Aminoethyl)-Amin
U	Unit
Vgl.	Vergleich
z.B.	zum Beispiel

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Stephen Kroll
Geburtsdatum	23.06.1979
Geburtsort	Verden (Aller)
Familienstand	ledig

## Schulische Ausbildung

1985 - 1989	Grundschule Bendingbostel
1989 - 1991	Orientierungsstufe Kirchlinteln
1991 - 1998	Domgymnasium Verden
06/1998	Abitur

## Zivildienst

1998 - 1999	Städtisches Krankenhaus Verden / Arbeiterwohlfahrt Verden
-------------	---

## Hochschulausbildung

1999 - 2001	Grundstudium Biologie an der Universität Hannover
2001 - 2002	Studium im Bachelorstudiengang Life Science an der Universität Hannover
2002 - 2004	Studium im Masterstudiengang Life Science an der Universität Hannover
05/2004 - 11/2004	Masterarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover. Thema: Immunologische Toxinanalyse - Markierung von Antikörpern und deren Einsatz in Querfließ-Testformaten
seit 12/2004	Promotionsstudium an der Leibniz Universität Hannover unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

## Beruflicher Werdegang

12/2004 - 12/2005	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover
01/2006 - 11/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover
12/2007 - 05/2008	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover