

Neue Membranadsorbertechnologie zur Anwendung in der Enzymproduktion

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

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Andrea Münster
geboren am 04.11.1982 in Haselünne

2011

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin: PD Dr. Cornelia Kasper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 16.08.2011

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Diese Arbeit wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im Juni 2011

Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover anfertigen zu dürfen und für die Bereitstellung des interessanten Themas. Ebenso danke ich ihm für die freundliche Unterstützung während meiner Promotion.

Frau PD. Dr. Cornelia Kasper danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats, sowie für die Betreuung und Zusammenarbeit über diese Arbeit hinaus.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves möchte ich mich für die Bereitschaft meine Prüfung im Nebenfach abzunehmen bedanken.

Dr. Sascha Beutel danke ich für seine stetige Hilfsbereitschaft, ebenso für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung in den letzten drei Jahren. Ihm danke ich zudem für das Korrekturlesen dieser Arbeit aber auch aller Berichte, Präsentationen etc. die während der vergangenen Jahre anfielen.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Dr. André Pastor und Dr. Louis Villain von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung während meiner Promotion. Sie standen immer für Fragen zur Verfügung, haben wertvolle Ratschläge gegeben und nicht zuletzt mir stets all meine „Materialwünsche“ erfüllt.

Dr. Ralf Grote und Tobias Halbsguth von der TUHH gilt ebenfalls mein Dank für die freundliche Zusammenarbeit innerhalb des Projektes.

Ein großes Dankeschön an meine Diplomandin Selvihan Özmen und Janina Sieg für die ergebnisreiche Zusammenarbeit und die damit zu meiner Arbeit geleisteten Beiträge. Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen möchte ich mich bei Clarissa Baumanis bedanken. Allen Mitarbeitern des TCIs sei für das angenehme Arbeitsklima und die permanente Hilfsbereitschaft gedankt.

Ein besonderer Dank gilt meinen „Sekt-Mädels“ Friederike, Steffi, Julia, Britta und Clarissa für die gegenseitigen Aufmunterungen und Abwechslungen in den unzähligen Mittags- und Kaffeepausen, sowie für die gemeinsamen Sektabende. Ich hoffe, dass diese auch noch über unsere Promotion hinaus Bestand haben werden.

Weiterer Dank gilt meiner besten Freundin Claudia für die moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums und nicht zuletzt während der Doktorarbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Geschwistern, Eltern und Großeltern für ihre Liebe und Unterstützung in jeder Hinsicht.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1. Einleitung	5
2. Zielsetzung	7
3. Theoretischer Hintergrund	9
3.1. <i>Enzyme als Biokatalysatoren</i>	9
3.2. <i>Enzymaufarbeitung und -aufreinigung</i>	11
3.2.1. Aufarbeitung technischer Enzyme	12
3.2.1.1. Enzymisolierung durch Kristallisation	13
3.2.1.2. Wässrige Zweiphasen-Extraktion	14
3.2.1.3. Expanded Bed Adsorption	15
3.2.1.4. Klassische chromatographische Aufreinigungsverfahren	16
3.2.2. Aufreinigung diagnostischer und therapeutischer Enzyme	18
3.2.2.1. Abtrennung von Nukleinsäuren	19
3.2.2.2. Affinitätschromatographische Methoden	19
4. Experimenteller Teil	21
4.1. <i>Aufreinigung von Penicillin G Amidase über Ionenaustausch-Chromatographie</i>	23
4.1.1. Screening Mikroliter-Maßstab	23
4.1.2. Übertragung der Screening-Ergebnisse auf den Milliliter-Maßstab	36
4.1.3. Zusammenfassung	41
4.2. <i>Aufreinigung der Cellulase Cel5A über Affinitätschromatographie</i>	42
4.2.1. Screening der Bindungs- und Elutionsbedingungen	43
4.2.2. Untersuchungen zur Membranintegrität	50
4.2.3. Übertragung der Ergebnisse auf eine Membranfläche von 15 cm ²	54
4.2.4. Zusammenfassung	56
4.3. <i>Isolierung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand</i>	57
4.3.1. Charakterisierung und Optimierung der Lipase aGTL-Produktion	58
4.3.2. Aufreinigung der Lipase aGTL über Hydrophobe Interaktionschromatographie	67
4.3.2.1. Screening der Bindungs- und Elutionsbedingungen	68
4.3.2.2. Aufreinigung der Lipase aGTL im Milliliter-Maßstab	70
4.3.2.3. Optimierung der Lipaseelution	72
4.3.2.4. Zusammenfassung	76
4.3.3. Aufreinigung der Lipase aGTL über die Mixed-mode Membran	77
4.3.3.1. Screening im Mikroliter-Maßstab	77
4.3.3.2. Isolierung der Lipase aGTL über die Mixed-mode Membran mit dem LP15-Modul	80

4.3.4. Direkte Isolierung der Lipase aGTL über ein partikelgängiges Membranadsorber-Modul	83
4.3.4.1. Isolierung der Lipase aGTL aus zellfreiem Kulturüberstand	85
4.3.4.2. Isolierung der Lipase aGTL aus zellhaltigem Kulturüberstand	93
4.3.4.3. Zusammenfassung	97
5. Zusammenfassung und Ausblick	98
6. Anhang	104
6.1. Bakterienstämme	104
6.1.2. <i>E.coli</i> 5K pHM12 (Penicillin G Amidase)	104
6.1.3. <i>E.coli</i> (Cellulase Cel5A)	104
6.1.4. <i>Staphylococcus carnosus</i> (Lipase aGTL)	105
6.1.5. Messung der optischen Dichte	106
6.1.6. Gefrierkulturen	106
6.1.7. Verwendete Medien	107
6.2. Versuchsdurchführungen	108
6.2.2. Hochdurchsatz-Screening	108
6.2.3. Versuchsdurchführung LP 15-Modul	110
6.2.4. Versuchsdurchführung zur direkten Aufreinigung der Lipase aGLT mit dem partikelgängigen Direct-Modul	112
6.3. Standardanalyseverfahren	114
6.3.2. Assays zur Aktivitätsbestimmungen	114
6.3.2.1. Messung der Enzymaktivität von Penicillin G Amidase (NIPAB-Test)	114
6.3.2.2. Dinitrosalicylsäure-Assay (DNS-Test)	115
6.3.2.3. <i>para</i> -Nitrophenylpalmitat-Test (<i>p</i> NPP-Test)	116
6.3.3. Assays zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen	118
6.3.3.1. UV-photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	118
6.3.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	119
6.3.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)	120
6.3.4.1. Silberfärbung	121
6.3.4.2. Aktivitätsfärbung (Zymogramm)	122
6.3.5. Bestimmung der Adsorptionsisothermen nach Langmuir	122
6.3.6. Berechnung der Ausbeute, Wiederfindungsrate und des Reinigungsfaktors	123
6.4. Weitere Ergebnisse	124
6.4.2. REM-Aufnahmen zur Untersuchung der Membranintegrität	124
6.5. Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte	125
6.5.2. Chemikalien	125
6.5.3. Materialien	127
6.5.4. Geräte	128
6.6. Abkürzungsverzeichnis	129
7. Literaturverzeichnis	131

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Aufreinigungsverfahren zur Isolierung rekombinanter Enzyme aus Zelllysaten und Fermentationsbrühen auf Basis der Membranadsorbertechnologie entwickelt. Die Bestimmung der optimalen Bindungs- und Elutionsbedingungen der Modellenzyme Penicillin G Amidase, Cellulase Cel5A und Lipase aGTL im Mikrolitermaßstab stellt einen wesentlichen Aspekt dieser Arbeit dar. Für jedes Enzym konnte eine spezifische Membranfunktionalisierung gefunden werden, über die das Enzym entsprechend seiner physikochemischen und biologischen Eigenschaften in hoher Selektivität aus komplexen biologischen Lösungen isoliert werden kann. Im Hinblick auf eine Steigerung der Bindungskapazität wurden ebenfalls adsorptive Membranen auf doppelporöser Membranbasis vergleichend zur klassischen gepfropften Membranmodifikation charakterisiert. Auf diese Weise konnten die dynamischen Bindungskapazitäten für die Bindung der Modellenzyme an die Membranen fast verdreifacht werden. Aspekte wie die Salztoleranz der Adsorber-Membranen wurden ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen. Um speziell nach einer Isolierung der Cellulase Cel5A eine unversehrte Membranintegrität sicherzustellen, sind rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt worden.

Eine direkte Übertragung der ermittelten optimalen Aufreinigungsstrategien vom Mikrolitermaßstab in den Labormaßstab konnte schließlich erfolgreich realisiert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist der Einsatz partikelgängiger Membranadsorber-Module zur direkten Aufreinigung der Lipase aGTL aus zellhaltigem Kulturüberstand. Derartige Adsorber-Module sollen die Anzahl der Prozessschritte in einem Aufarbeitungsprozess reduzieren, indem die Schritte Zellabtrennung, Aufkonzentrierung und Produktisolierung in einen Prozessschritt integriert werden. Um hierfür eine ausreichende Sekretion des Zielenzym in den Kulturüberstand zu gewährleisten, wurde die Lipase aGTL-Produktion im Produktionsstamm *Staphylococcus carnosus* im Vorfeld charakterisiert und optimiert. Bei einer anschließenden Isolierung der Lipase aGTL aus zellfreiem und zellhaltigem Kulturüberstand konnte gezeigt werden, dass die Zellen keinen Einfluss auf die Enzymaufreinigung bewirkt. Die Lipase aGTL konnte in hohen Ausbeuten ohne Verlust der Enzymaktivität direkt aus dem zellhaltigem Kulturüberstand aufgereinigt werden.

Schlagerwörter: Enzymaufreinigung, Membranadsorber, Penicillin G Amidase, Cellulase Cel5A, Lipase aGTL

Abstract

The application of enzymes in industrial biocatalysis gains in importance. The isolation and purification of the product dominates the costs in modern enzyme production and can make up to 90 % of the cost of the entire process. Therefore, there is intensive research for efficient and inexpensive purification strategies in the field of downstreaming.

In this thesis, new purification strategies by membrane adsorbers for the isolation of recombinant enzymes from cell lysates and fermentation broths were investigated. The determination of the optimal loading and elution conditions for penicillin G amidase, cellulase Cel5A and lipase aGTL in microliter scale are key aspects of this thesis. For each enzyme, a specific membrane functionalization was found out, thus isolating the enzyme with a high selectivity from complex biological solutions by exploiting its physicochemical and biological nature. In order to make membrane adsorbers more efficient, an adsorptive membrane with a double porous membrane structure was characterized comparative to a grafted membrane structure in this thesis. The dynamic binding capacities for the binding of the enzymes to the membranes are three times higher by this membrane modification. Salt-tolerant membranes were also characterized. To confirm the intactness of the cellulose membranes after purification of cellulase Cel5A, scanning electron microscopic analysis was performed.

A scale-up was demonstrated by using adsorber devices with higher surface areas.

Another focal point of this thesis is the application of particle-permeable membrane adsorber devices for the purification of lipase aGTL from cell-containing supernatant. These devices should reduce the number of steps within a purification process by integrating cell separation, concentration and capturing of the target protein in one single step. For this purpose, a sufficient secretion of the target enzyme in the supernatant is a necessity. Thus, the production of lipase aGTL in *Staphylococcus carnosus* was optimized. Consequently, the purification of the lipase aGTL from cell-free and cell-containing supernatant was carried out. It has been demonstrated that the cells have no influence on the enzyme purification. A direct capture of the lipase aGTL has been realized with high enzyme yields and without loss of enzymatic activity.

Keywords: enzyme purification, membrane adsorber, penicillin G amidase, cellulase Cel5A, lipase aGTL,

1. Einleitung

Die Biokatalyse gilt heutzutage als essenzieller und zentraler Bestandteil industrieller Prozesse. Dabei werden hauptsächlich Enzyme als Biokatalysatoren zur Produktion und Umsetzung bestimmter Stoffe eingesetzt. Aufgrund ihrer Substratspezifität setzen sie nur bestimmte Edukte zu definierten Produkten um und sind daher im Allgemeinen präziser als chemische Katalysatoren. Durch ihre Enantioselektivität nehmen Enzyme u.a. eine wichtige Rolle in der Arzneimittelherstellung bei der Produktion enantiomeren reiner Substanzen ein. In der klassischen chemischen Synthese bedarf es hingegen aufwändiger Techniken, um unerwünschte Enantiomere abzutrennen. Das Aktivitätsoptimum der meisten Enzyme liegt bei Temperaturen zwischen 20 - 45 °C, wodurch das Auftreten thermischer Nebenreaktionen verringert wird¹. Aufgrund dieser Eigenschaften der Enzyme und der Tatsache, dass sie biologischen Ursprungs sind, gewinnt der Einsatz von Enzymen auch aus ökonomischer und ökologischer Sicht zunehmend an Bedeutung und macht ihren Einsatz in industriellen Prozessen immer bedeutungsvoller. Selbst etablierte chemische Verfahren, wie z.B. die Produktion von Vitamin B₂, wurden aufgrund entsprechender Wirtschaftlichkeit durch biokatalysierte Prozesse ersetzt^{2,3}.

Dennoch ist ihrer Anwendung oftmals nur begrenzt möglich, da ihre natürlichen Eigenschaften häufig nicht an die jeweiligen Prozessbedingungen angepasst sind. Die Fortschritte in der Gentechnik und die damit verbundenen modernen molekularbiologischen Methoden, wie das Metagenom-Screening und das Protein-Engineering, ermöglichen die Produktion interessanter rekombinanter Enzyme in Host-Mikroorganismen. Des Weiteren können die katalytischen Eigenschaften natürlicher Enzyme so modifiziert werden, dass sie gezielt den Anforderungen ihres Anwendungsgebietes angepasst werden können. So werden Enzyme mit veränderten pH- und Temperatur-Optima und Stabilitäten konstruiert und eine Expression rekombinanter Enzymen in extrem hohen Ausbeuten ohne unerwünschte Nebenaktivitäten wird ermöglicht^{4,5}. Auf diese Weise wird eine Ausweitung der industriellen Anwendung von Enzymen gewährleistet.

Angesichts der fortwährenden Weiterentwicklungen und zielgerichteten Optimierungen der Biokatalysatoren, steigt das Interesse an effizienten Aufreinigungsprozessen rekombinanter Enzyme. Dabei stellen sich für technische Enzyme, die z.B. in der Waschmittel- und Lebensmittelindustrie oder zum Aufschluss nachwachsender Rohstoffe Verwendung finden, andere Anforderungen an die Produktreinheit, als für Enzyme, die in der Diagnostik oder Therapie eingesetzt werden. Letztere bedürfen eine sehr hohe Reinheit, da Verunreinigungen

ebenfalls katalytische Aktivitäten aufweisen können, die die diagnostische bzw. therapeutische Funktion des Zielenzyms beeinflussen.

Zur Reduzierung der Prozessdauer und –kosten werden immer größere Anforderungen an den Aufreinigungsprozess eines biotechnologisch hergestellten Enzyms gestellt. Hinsichtlich der Notwendigkeit in neue Aufreinigungsmethoden zu investieren, um Prozessausbeute zu steigern und Prozesskosten zu senken, spielt die Entwicklung und Optimierung von Chromatographie-Materialien eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang erfahren Membranadsorber eine zunehmende Anwendung. Adsorptive Membranen werden bereits erfolgreich in Polishing-Steps zur Entfernung von Kontaminanten wie Viren, Endotoxine und DNA eingesetzt⁶⁻⁸. Membranadsorber bestehen aus chemisch funktionalisierten makroporösen Membranen, dessen Poren konvektiv durchströmt werden. Hierdurch werden konstante Bindungskapazitäten auch bei hohen Flussraten erzielt.

Auf der Suche nach schnellen und effizienten Aufarbeitungsprozessen rücken integrierte Verfahren immer weiter ins Blickfeld. Durch Kombination mehrerer Aufarbeitungsschritte zu einem Prozessschritt wird der Aufarbeitungsprozess verkürzt, wodurch Prozesskosten gesenkt und die Produktausbeuten gesteigert werden. Vor diesem Hintergrund wurden auf Basis der Membranadsorbertechnologie partikelgängige Adsorber-Module entwickelt, die eine direkte Aufreinigung von Proteinen aus zell-/partikelhaltigen Fermentationsbrühen ermöglichen. Auf diese Weise soll eine schnelle und effiziente Produktisolierung ohne vorherige Behandlung der Fermentationsbrühe gewährleistet werden.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung effektiver, kostengünstiger Aufreinigungsverfahren zur direkten Isolierung von Enzymen aus Zellslysaten und Fermentationsbrühen auf Basis der Membranadsorbertechnologie.¹ Hierzu wurden im Rahmen des BMBF-Projektes repräsentativ für die technisch relevanten Enzymklassen Amidasen, Esterasen und Hydrolasen drei Modellenzyme für die Untersuchungen ausgewählt. Unterschiedlich funktionalisierte Membranadsorber der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen sollen hinsichtlich ihrer Eignung zur Aufreinigung der Modellenzyme Penicillin G Amidase, Cellulase Cel5A und Lipase aGTL charakterisiert werden. Hierbei soll die Isolierung jedes Modellenzym auf speziell einer Chromatographie-Art basieren. Im Parallel-Screening im Mikroliter-Maßstab werden zunächst geeignete Bindungs- und Elutionsbedingungen ermittelt. Die optimalen Aufreinigungsstrategien sollen anschließend auf den Milliliter-Maßstab übertragen werden. Ziel ist es, eine direkte Übertragung vom Screening in den Labormaßstab und später darüber hinaus in den Produktionsmaßstab zu ermöglichen.

Ein vollständiger Herstellungsprozess von der Kultivierung bis zur Produktisolierung soll am Beispiel des extrazellulären Modellenzym Lipase aGTL entwickelt werden. Dazu soll ein neuartiges partikelgängiges Membranadsorber-Modul zur direkten Aufreinigung des Zielenzym aus zellhaltiger Fermentationsbrühe getestet werden. Partikelgängige Membranadsorber-Module wurden speziell entwickelt, um Prozesskosten zu senken, indem Zellabtrennung, Produktisolierung, Reinigung und Aufkonzentrierung in einem Prozessschritt zusammengefasst werden. Eine ausreichende Sekretion des Zielenzym in den Kulturüberstand ist eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung derartiger integrierter Aufreinigungsverfahren. Nach Optimierung der Lipase aGTL-Produktion im rekombinanten Produktionsstamm *Staphylococcus carnosus* soll das Modellenzym vergleichend aus zellfreiem und zellhaltigem Kulturüberstand isoliert werden.

¹ Die Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-Biokatalyse 2021-Projektes „Neue Membranadsorbertechnologie zur Aufarbeitung in der Enzymproduktion“ angefertigt.

3. Theoretischer Hintergrund

3.1. Enzyme als Biokatalysatoren

Enzyme, Ribonukleinsäuren (Ribozyme) und spezielle Antikörper sind Biomolekülklassen mit katalytischer Aktivität⁹. Innerhalb der Biokatalyse stellen Enzyme die bedeutendste Klasse dar. Sie sind an vielen Reaktionen in allen lebenden Organismen beteiligt, die von biochemischen Verdauungsprozessen (Proteasen und Lipasen) bis zur Replikation der Erbinformation, z.B. durch DNAPolymerase, reichen.

Mikrobielle Enzyme machen heutzutage ca. 90 % des gesamten Enzymmarktes aus. Aber auch Enzyme von Pflanzen und Tieren, hauptsächlich Proteasen, sind auf dem Markt vertreten¹⁰. Hier sind Enzyme wie Katalase aus der Leber¹¹ oder Lipase, Pepsin und Trypsin aus dem Pankreas¹² von relevanter Bedeutung. Auch Enzyme, wie Papain und Bromelain, die aus Pflanzen extrahiert werden, sind weiterhin von industrieller Bedeutung^{10, 12, 13}. Tab. 1 zeigt einen Überblick der in industriellen Prozessen eingesetzten Enzyme und ihre jährliche Produktionsmenge. Neben ihren Einsatzgebieten sind auch Angaben zum Produktionsmaßstab der Enzyme angegeben. Der weltweite Umsatz an Enzymen wird auf ca. 2 Milliarden Euro geschätzt, bei einer jährlichen Wachstumsrate von 5-10 %^{3, 9}. Der Einsatz von Enzymen in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie macht dabei 50 % des Weltmarktes aus. Ein weiterer großer Anwendungsbereich der Enzyme liegt in der Waschmittel- und Reinigungsindustrie mit 35 % (vgl. Abb. 1). In der Pharmaindustrie gewinnt der Einsatz von Enzymen immer weiter an Bedeutung. Die Enzympreise können je nach Reinheit und den damit verbundenen Aufwand für die Isolierung und Aufreinigung stark schwanken.

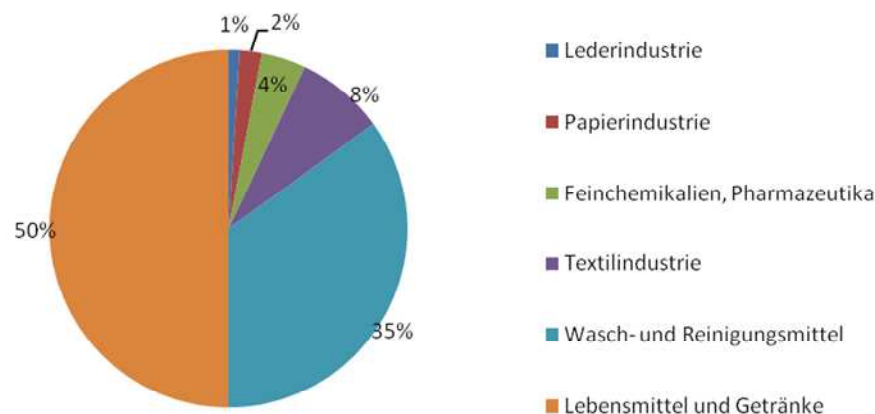


Abb. 1: Anwendungsgebiete der Enzyme auf dem Weltmarkt.¹⁴

Tab. 1: Wichtige industrielle Enzyme und ihrer Quellen und Haupteinsatzgebieten.¹⁵

EC Nummer	Enzym	Quelle / Produzent	Intra-/Extrazellulär	Hautanwendungsgebiete	Produktionsmaßstab [t/a]
	Tierische Enzyme				
1.1.1.6	Katalase	Leber	intrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
3.4.21.1	Chymotrypsin	Pankreas	extrazellulär	Lederindustrie	< 1
3.1.1.3	Lipase	Pankreas	extrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
3.4.23.4	Rennet	Abomasum	extrazellulär	Milchindustrie/Käseherstellung	> 1
3.4.21.4	Trypsin	Pankreas	extrazellulär	Lederindustrie	< 1
	Pflanzliche Enzyme				
3.4.22.14	Actinidin	Kiwi Frucht	extrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
3.2.1.1	α -Amylase	Malted Barley	extrazellulär	Bierbrauen	> 100
3.2.1.1.2	β - Amylase	Malted Barley	extrazellulär	Bierbrauen	> 100
3.4.22. 4	Bromelain	Pineapple latex	extrazellulär	Bierbrauen	< 1
3.2.1.6	β -Glucanase	Malted Barley	extrazellulär	Bierbrauen	> 10
3.4.22.3	Ficin	Fig latex	extrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
1.13.11.12	Lipoxygenase	Soybeans	intrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
3.4.22.2	Papain	Pawpaw latex	extrazellulär	Fleischbearbeitung	> 10
	Bakterielle Enzyme				
3.2.1.1	α -Amylase	<i>Bacillus</i>	extrazellulär	Stärkeumwandlung	> 100
3.2.1.2	β - Amylase	<i>Bacillus</i>	extrazellulär	Stärkeumwandlung	> 1
3.5.1.1	Asparaginase	<i>E.coli</i>	intrazellulär	Gesundheit	< 1
5.3.1.5	Glukoseisomerase	<i>Bacillus, Streptomyces</i>	intrazellulär	Fructose-Sirup	> 10
3.5.1.11	Penicillin G Amidase	<i>Bacillus</i>	intrazellulär	Pharmaindustrie	< 1
3.2.21.14	Protease	<i>Bacillus</i>	extrazellulär	Detergenz	> 100
3.2.1.41	Pullanase	<i>Klebsiella, Bacillus</i>	extrazellulär	Stärkeumwandlung	< 1
	Pilz-Enzyme				
3.2.1.1	α -Amylase	<i>Aspergillus</i>	extrazellulär	Backen	> 10
3.5.1.14	Aminoacylase	<i>Aspergillus</i>	intrazellulär	Pharmaindustrie	< 1
3.2.1.3	Glucoamylase	<i>Aspergillus, Rhizopus</i>	extrazellulär	Stärkeumwandlung	> 100
1.1.1.6	Katalase	<i>Aspergillus</i>	intrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
3.2.1.4	Cellulase	<i>Trichoderma</i>	extrazellulär	Abfallindustrie	< 1
3.2.1.11	Dextranase	<i>Penicillium</i>	extrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
1.1.3.4	Glucoseoxidase	<i>Aspergillus</i>	intrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
3.2.1.23	Lactase	<i>Aspergillus</i>	extrazellulär	Milchindustrie	< 1
3.1.1.3	Lipase	<i>Rhizopus</i>	extrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
3.4.23.6	Rennet	<i>Mucor miehei</i>	extrazellulär	Milchindustrie/Käseherstellung	> 10
3.2.1.15	Pectinase	<i>Aspergillus</i>	extrazellulär	Getränkeindustrie	> 10
4.2.2.10	Pectin Lyase	<i>Aspergillus</i>	extrazellulär	Getränkeindustrie	< 1
3.4.23.6	Protease	<i>Aspergillus</i>	extrazellulär	Backen	> 1
3.2.1.22	Raffinase	<i>Mortierella</i>	intrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
	Hefe Enzyme				
3.2.1.26	Invertase	<i>Saccharomyces</i>	intra-/extrazellulär	Konfektionierung	< 1
3.2.1.23	β -Galactosidase (Lactase)	<i>Klyveromyces</i>	intra-/extrazellulär	Milchindustrie	< 1
3.1.1.3	Lipase	<i>Candida</i>	extrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1
3.2.1.11	α - Galactosidase (Raffinase)	<i>Saccharomyces</i>	intrazellulär	Lebensmittelindustrie	< 1

3.2. Enzymaufarbeitung und -aufreinigung

Im Prinzip kann jede Aufarbeitungs- und Aufreinigungsmethode, die zur Proteinaufreinigung verwendet wird, auch zur Aufreinigung von Enzymen eingesetzt werden. Jedoch sind viele in der Literatur beschriebene Methoden zur Proteinaufreinigung im Labormaßstab, schwer in der großtechnischen Enzymaufreinigung einsetzbar, da sie aus vielen und/oder komplizierten Schritten bestehen und geringe Ausbeuten und Wiederfindungsraten aufweisen¹⁶⁻¹⁸. In jedem einzelnen Aufarbeitungsschritt wird die biologische Aktivität des Enzyms beeinträchtigt und Produktverluste von bis zu 10 % verzeichnet, die sich in geringeren Wiederfindungsraten widerspiegeln. Daher sollte die Anzahl der Aufreinigungsschritte in einem Produktionsprozess so gering wie möglich gehalten werden^{5,10}. Die generellen Aufarbeitungsschritte die zur Enzymisolierung notwendig sind, sind in Abb. 2 dargestellt.

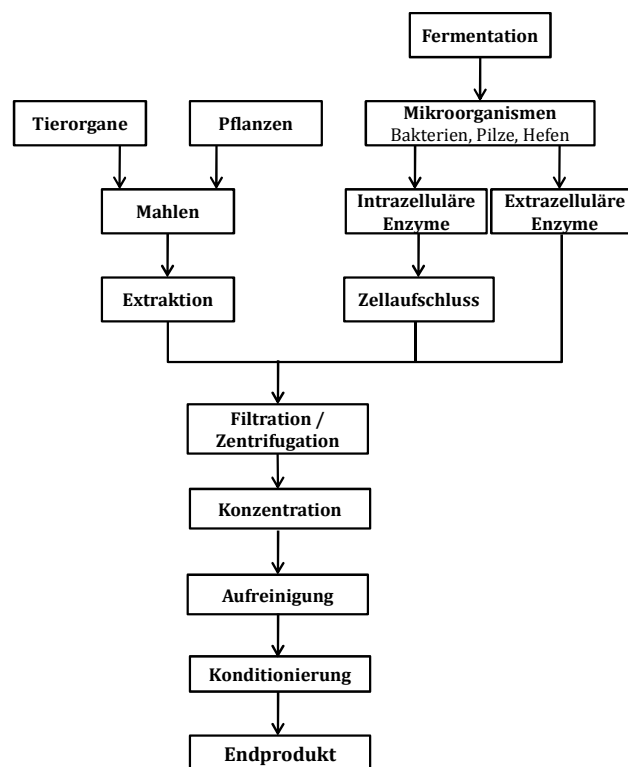


Abb. 2: Aufarbeitungsschritte zur Enzymisolierung.²

Das Wirtssystem in dem Enzyme produziert werden, ist maßgebend für die Art des Downstream Processing, welches bis zu 90 % der Herstellungskosten einnehmen kann. Zielprodukte werden von Gram-positiven Wirtssystemen direkt in das Kulturmedium sekretiert, welches neben dem Zielenzym nur wenige weitere extrazelluläre Proteine und Komponenten geringeren Molekulargewichts beinhaltet. Dies macht eine Aufarbeitung einfach, da viele kostenintensive Produktaufarbeitungs- und Aufreinigungsschritte entfallen. Intrazellulär produzierte Enzyme in Gram-negativen Organismen müssen dagegen nach einem

Zellaufschluss von sehr vielen weiteren Komponenten, wie Zellproteinen, Nukleinsäuren und Polysacchariden abgetrennt werden. Dies hat viele aufwändige und kostenintensive Aufreinigungsschritte zur Folge. Nach der Extraktion tierischer und pflanzlicher Enzyme vom entsprechenden Gewebe, muss das restliche Pflanzen- und Tiermaterial abgetrennt werden. Entsprechend folgt nach der Fermentation mikrobieller Enzyme die Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer nach dem Zellaufschluss. Verfahren, die in der Industrie hierfür Anwendung finden, sind die kontinuierliche Filtration oder Zentrifugation ^{2, 10}.

Konzentrierung

Aufgrund der großen Volumina der zellfreien Fermentationsbrühe und des Rohextraktes liegt das Zielenzym nach der Zellabtrennung in sehr verdünnter Konzentration vor. Um eine ökonomische Aufreinigung des Zielproduktes zu erzielen, ist eine Aufkonzentrierung notwendig ^{2, 19}. Eine einfache Methode Enzyme aufzukonzentrieren ist die Präzipitation, eine hochselektiver Aufarbeitungsschritt.

Zur Enzymfällung eignen sich sowohl Salze, wie Ammoniumsulfat oder Natriumsulfat, als auch organische Lösemittel, wie Ethanol und Aceton ²⁰, oder Polymere, wie Polyethylenglykol und Polyethylenimin ^{2, 10}. Da eine Präzipitation in größeren Maßstäben schwer zu bewerkstelligen ist, wird die Präzipitation im Allgemeinen nur bei kleinen Produktionsmaßstäben eingesetzt. Aus ökonomischer Sicht sollte eine Präzipitation mit Salzen im Industriemaßstab vermieden werden, da ein so hoher Salzgehalt zu erheblichen Kosten bei der Abwasseraufarbeitung führt. Zur Aufkonzentrierung größerer Mengen wird daher im Allgemeinen eine Ultrafiltration durchgeführt. Bei dieser Methode werden sowohl Verunreinigungen geringen Molekulargewichts mit Größen bis zu 300 kDa entfernt, als auch Salze, die bei weiteren Aufreinigungsschritten stören könnten, abgetrennt. Unter Verwendung der Ultrafiltration kann neben der Aufkonzentrierung gleichzeitig ein Desalting erfolgen. Oftmals wird für ein Desalting von Enzymlösungen jedoch eine Diafiltration unter Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen durchgeführt ^{2, 21}.

3.2.1. Aufarbeitung technischer Enzyme

Enzyme lassen sich entsprechend ihres Reinigungsaufwandes in technische Enzyme und analytische oder therapeutische Enzyme einteilen. Technische Enzyme werden zur Massenproduktion von z.B. Lebensmitteln oder Waschmitteln eingesetzt und im Tonnen-Maßstab produziert. Das nach der Aufkonzentrierung des enzymhaltigem Rohextraktes oder Mediums erhaltene Rohenzymkonzentrat enthält neben dem Zielenzym andere Proteine, wie

z.B. störende Enzyme, Nukleinsäuren und Polysaccharide. Diese müssen je nach Einsatzgebiet des Zielenzyms in weiteren Aufreinigungsschritten abgetrennt werden. Haben diese Komponenten keinen Einfluss auf die biokatalytische Reaktivität des Produktes, ist häufig keine weitere Aufreinigung des Zielenzyms erforderlich. Für die meisten industriellen Anwendungen technischer Enzyme bedarf es ebenfalls keiner speziellen und aufwändigen Aufreinigung, da ein reines Enzym keinen effektiveren Nutzen zeigen würde. Wichtiger als die Reinheit ist bei technischen Enzymen die Wiederfindungsrate. Um höhere Produktausbeuten zu erzielen, wird die Anzahl der Aufarbeitungsschritte daher minimal gehalten. So beinhaltet die Aufarbeitung technischer Enzyme oftmals nur eine Konzentrierung, wie sie im vorherigen Abschnitt beschrieben worden ist, oder eine partielle Aufreinigung, bei der lediglich störende Enzyme abgetrennt werden^{5, 10}. In der Lebensmittelindustrie werden z.B. Enzympräparate eingesetzt, welche neben dem Zielenzym und Stabilisations- und Konservierungsmitteln ebenso Stoffwechselprodukte des Produktionsorganismus und restliche Bestandteile des Kulturmediums sowie Agentien, die während der Produktaufarbeitung zugefügt wurden, enthalten^{4, 22}. Andere Anwendungs- und Einsatzbereiche technischer Enzyme erfordern die Abtrennung weiterer im Rohenzymkonzentrat enthaltener Komponenten. Hierzu werden spezielle Verfahren wie Kristallisation, Wässrige-Zweiphasen-Extraktion oder Chromatographie-Verfahren eingesetzt. Diese Aufarbeitungsmethoden werden nachfolgend näher charakterisiert.

3.2.1.1. Enzymisolierung durch Kristallisation

Die Kristallisation ist eine der ältesten chemischen Aufreinigungsmethoden. Sehr viele industrielle Herstellungsprozesse von Enzymen beinhalten ein Kristallisationsverfahren zur Isolierung des Zielenzyms. Große Enzymhersteller, wie Genencor^{23, 24} oder Novozym²⁵ haben sich in den 90er Jahren entsprechende Verfahren patentieren lassen. Besonderheiten der Kristallisation als kosteneffektive Aufreinigungsmethode sind hohe Prozessausbeuten und Produktreinheiten von über 95 %^{26, 27}. Um Kristalle mit einer definierten Größe und Morphologie zu gewinnen, muss der Kristallisationsprozess sorgfältig designt und entwickelt werden. Bei Produktionen im Industriemaßstab dienen mehrere 1.000 Liter verunreinigte Enzymlösung als Startmaterial. In diesen Lösungen muss eine Enzymübersättigung herbeigeführt werden, damit die Enzyme auskristallisieren oder Protein-Protein-Wechselwirkungen eingehen. Dies kann durch Zugabe von Impfkristallen oder Fällungsmittel wie Salze geschehen oder aber durch Temperatur- oder pH-Wert Änderungen hervorgerufen werden. Viele Faktoren, wie Salzart und -konzentration, Vermischung, Animpfung und die

Anwesenheit weitere Biomoleküle (Verunreinigungen) beeinflussen die Enzymkristallisation und haben ebenso Einfluss auf die Kristallgröße und Morphologie der Kristalle ²⁶.

In der Literatur sind Enzymkristallisationen als Aufreinigungsmethode nach einer großtechnischen Fermentation beschrieben: Enzyme wie Cellulasen ²⁸, Glucose-isomerase ²⁹⁻³¹, Subtilisin ³² und Alkohloxidase ^{33, 34} wurden für einen Einsatz in kommerziellen Produktion kristallisiert. Ebenso ist die Kristallisation ein beliebtes Verfahren auf dem Gebiet der Enantiomerentrennung ³⁵⁻³⁷.

Eine Schlüsselrolle bei der Kristallisationsrate sowie bei der Kristallmorphologie spielt die Temperatur. Mit steigender Temperatur wird z.B. bei der Kristallisation von Cellulase und Subtilisin eine zunehmende Kristallisationsrate beobachtet. Bei niedrigeren Temperaturen kristallisiert Subtilisin in Form von Stäbchen aus, während bei höheren Temperaturen plattenförmige Subtilisin-Kristalle gewonnen werden ³⁸.

3.2.1.2. Wässrige Zweiphasen-Extraktion

Eine Proteinextraktion in wässrigen Zweiphasen-Systemen ist eine geeignete Methode, um in einem ersten Schritt eines Aufarbeitungsprozesses unerwünschte Komponenten, wie Zellproteine und Polysaccharide einfach abzutrennen ^{39,40}. Wässrige Zweiphasen-Systeme basieren auf eine Mischung zweier wasserlöslicher hydrophiler Polymere (z.B. Polyethylenglykol und Dextran) oder einer Mischung aus einem Polymer mit einem Salz (z.B. Polyethylenglykol und Kaliumphosphat). Oberhalb einer gewissen Konzentration dieser Komponenten bilden sich zwei Phasen, in der jeweils eine der Komponenten angereichert ist. Das Zielenzym wird dabei unter Erhalt der biologischen Aktivität in einer der Phasen angereichert ⁴¹. Wichtige Parameter, sind das Molekulargewicht des Polymers, Typ und Konzentration der phasenbildenden Komponente, sowie pH-Wert und Temperatur ⁴². Das System Polyethylenglykol (PEG)/Salz eignet sich zur erfolgreichen Abtrennung von Amylase ⁴⁰. Ebenfalls ist der Einsatz der wässrigen Zweiphasen-Extraktion zur Gewinnung von Trypsin ^{43,44}, α -Chymotrypsin ⁴⁴ und verschiedener Proteasen ^{39,45,46} in der Literatur beschrieben.

Eine Variante der wässrigen Zweiphasen-Extraktion ist die Extraktion des Zielenzyms mittels reverser Mizellen. Tenside bilden ab einer bestimmten Konzentration Mizellen aus. In unpolaren Lösungsmitteln bilden sich so genannte reverse Mizellen, die sich dadurch auszeichnen, dass die polare Kopfgruppe in das Zentrum der Mizelle ragt, während die unpolaren Reste in die umgebende organische Phase ragen. Diese reversen Mizellen eignen sich insbesondere zum Extrahieren von hydrophilen Proteinen aus wässrigen Phasen, welche im

Innen der reversen Mizellen gelöst werden können⁴⁷⁻⁴⁹. Abb. 3 zeigt die Struktur einer reversen Mizelle. Als Tensid dient hier Aerosol OT (AOT, Natrium-di-(2-ethylhexyl)-sulfosuccinat).

In der Literatur sind Mischungssysteme verschiedener Komponenten zur Enzymisolierung beschrieben. Aerosol OT eignet sich zur Isolierung von α -Amylase⁵⁰ und Lysozym⁵¹. Glucoseisomerase kann dagegen erfolgreich durch Mischung nichtionischer Tenside ($C_{10}E_4$) mit kationischen Tensiden (C_n TAB, $n=8,10$ oder 12) aus wässrigen Phasen extrahiert werden⁵².

Hohe Salzkonzentrationen vermindern die Wechselwirkungen in den Mizellen und führen zur Ausscheidung der gelösten Proteine aus den Mizellen. Auf diese Weise können die extrahierten Enzyme zurückgewonnen werden.

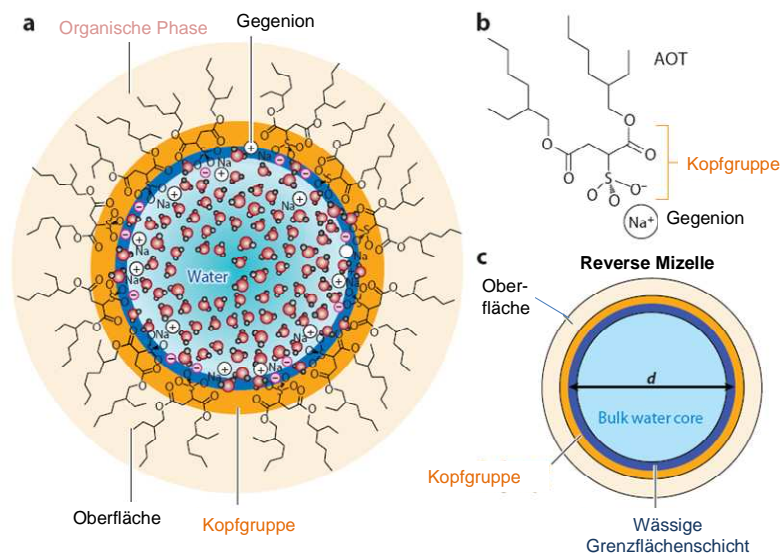


Abb. 3: Reverse Mizelle. a) Schematische Beschreibung der Struktur einer reverse Mizelle. Wassermoleküle befinden sich im Inneren und wechselwirken mit den Kopfgruppen und Gegenionen. Die Tensidgruppen sind im ständigen Kontakt mit der unpolaren, organischen Phase. b) chemische Struktur des Tensids AOT, c) Schema einer reversen Mizelle mit den wichtigsten Eigenschaften.⁵³

3.2.1.3. Expanded Bed Adsorption

Die Expanded Bed Adsorption wurde in den 90er Jahren entwickelt und basiert auf einem säulenchromatographischen Prozess. Die partikelgefüllte Säule wird im Gegensatz zur klassischen Säulenchromatographie von unten durchströmt. Aufgrund der zur Schwerkraft der Adsorberpartikel entgegengesetzt gerichteten Strömungsrichtung sind die Adsorberpartikel nicht dicht gepackt, sondern schweben durch die Säule. Auf diese Weise kann die Expanded Bed Adsorption zur Enzymisolierung aus partikelhaltiger Zellsuspension erfolgen, ohne dass diese vom Adsorber zurückgehalten werden und die Säule verblockt. Durch die Integration der

Prozessschritte Filtration bzw. Zentrifugation und Produktisolierung zu einem Aufarbeitungsschritt reduzieren sich Prozesszeit und -kosten. Aufgrund der Aufrechterhaltung des Fließbettes sind die Flussraten, die von der Größe und Dichte der Partikel abhängig sind, jedoch begrenzt. Ebenso sind die Bindungskapazitäten oftmals gering, da verstärkt Filmdiffusion auftritt⁵⁴⁻⁵⁶.

Die Expanded Bed Adsorption wird erfolgreich zur großtechnischen Enzymherstellung in der Industrie eingesetzt⁵⁶⁻⁵⁹. Die Isolierung von Chymosin aus der Fermentationsbrühe von *Aspergillus niger* bei Chr. Hansen erfolgt z.B. über eine Expanded Bed Adsorption.

3.2.1.4. Klassische chromatographische Aufreinigungsverfahren

Eine Enzymaufarbeitung durch Kristallisation, Wässrige Zweiphasen-Adsorption oder Expanded Bed Adsorption sind vielversprechende Alternativen zu klassischen chromatographischen Prozessen, die schnelle und kostengünstige Aufarbeitung des Zielenzym gewährleisten. Obwohl es immer mehr derartiger Alternativen zur klassischen Chromatographie-Methoden gibt, nimmt die Chromatographie weiter eine fundamentale Bedeutung in der Enzymaufreinigung ein und wird im Allgemeinen zur Abtrennung weiterer Komponenten aus dem Enzymrohextrakt verwendet¹⁰.

Je nach Chromatographie-Art werden Moleküle entsprechend ihrer physikalischen Eigenschaften (Größe, Form, Ladung, Hydrophobizität), ihren chemischen Eigenschaften (kovalente Bindung) oder biologischen Eigenschaften (biospezifische Affinität) voneinander getrennt. Technische Enzyme werden hauptsächlich über ihre physikochemischen Eigenschaften von weiteren Proteinen abgetrennt. Die in diesem Zusammenhang bedeutungsvollsten Chromatographie-Methoden sind die Größenausschluss-Chromatographie, Ionenaustauschen-Chromatographie und die Hydrophobe-Interaktionschromatographie, sowie die Affinitätschromatographie zur Feinreinigung.

Größenausschluss-Chromatographie/Gelfiltration

Die Größenausschluss-Chromatographie oder auch Gelfiltration genannt, trennt Proteingemische ihrer Größe nach auf. Kleinere Moleküle werden im Inneren der porösen Gelmatrix zurückgehalten, während größere Moleküle nicht in die Poren der stationären Phase eindringen können und die Säule demzufolge früher wieder verlassen. Verschiedene Partikelgrößen und Vernetzungsgrade der stationären Gelmatrix ermöglichen eine Proteinfractionierung in verschiedenen Molekulargrößenbereichen. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich die Größenausschluss-Chromatographie nicht nur zur Enzymisolierung sondern auch zur Abtrennung von Ionen aus der Enzymlösung (Desalting)^{2,10}.

Die Größenausschluss-Chromatographie ist eine Methode, die sich durch hohe Auflösungen auszeichnet. Im Vergleich dazu sind die Durchsatzraten und Kapazitäten jedoch gering und es resultieren lange Prozesszeiten. Entsprechend sollte das Probevolumen, welches auf die Säule gegeben wird, höchstens 10 % des Säulenvolumens ausmachen. Daher sind konzentrierte Lösungen notwendig. Alkaline Protease wird z.B. nach einer Präzipitation mit Ammoniumsulfat und einer anschließenden Dialyse über eine Gelfiltration spezifischer aufgearbeitet. Eine Isolierung einer α -Amylase über Größenausschluss-Chromatographie erfolgt dagegen direkt aus dem Rohenzymkonzentrat⁶⁰. Die Anwesenheit vieler weiterer Biomoleküle in den konzentrierten Enzymlösungen kann eine Abnahme der Auflösung mit sich führen. Aus diesem Grund wird in einem Enzymproduktionsprozess eine Gelfiltration häufiger als einer der letzten Aufreinigungsschritte bzw. als letzter Polishing-Schritt eingesetzt^{61, 62}.

Ionenaustausch-Chromatographie

Proteine besitzen eine vom pH-Wert abhängige Teilladung. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um Proteine über Anionenaustauscher (positiv geladen) und Kationenaustauscher (negativ geladen) zu trennen. Zur Aufreinigung eines Enzyms über Ionenaustausch-Chromatographie müssen Enzymlösungen mit geringen Ionenstärken vorliegen. Ist dies nicht der Fall, kann dies durch eine vorherige Dialyse erreicht werden. Die Elution erfolgt über einen ansteigenden Salzgradienten, bei der das Zielenzym in konzentrierter Form von der Säule eluiert wird. Aufgrund des Konzentrierungseffektes können Proben in verdünnter Form verwendet werden. Die Möglichkeit große Volumina zu bearbeiten und die Elution zuvor verdünnter Komponenten in konzentrierter Form zu erreichen, macht die Ionenaustausch-Chromatographie für die Enzymaufreinigung sehr wertvoll. Um Enzymdenaturierungen vorzubeugen sollte die stationäre Phase ausreichend hydrophil sein. Für industrielle Anwendungen werden Ionenaustauscher benötigt, die eine hohe Kapazität gegenüber großen Molekülen aufweisen, gute Auflösungen gewähren, hohe Flussraten erlauben und komplett regeneriert werden können.

Die Ionenaustausch-Chromatographie zeichnet sich gegenüber der Größenausschluss-Chromatographie durch höhere Durchsatzraten aus. Daher werden Ionenaustauscher als einzige Aufreinigungsmethode technischer Enzyme eingesetzt, wie z. B. zur Aufreinigung von Peroxidasen oder Alkaline Proteasen⁶⁰ oder sie bilden einer der ersten Schritte in einem Aufreinigungsprozess⁶³. So wird z.B. Glucoseisomerase nach einer Konzentrierung durch Präzipitation über die Ionenaustausch-Chromatographie weiter aufgereinigt und anschließend eine Größenausschluss-Chromatographie eingesetzt⁶¹.

Die Ionenaustausch-Chromatographie ist eine sehr leistungsfähige Methode zur Enzymaufreinigung. Sogar Proteine mit einem ähnlichen isoelektrischen Punkt können in geeigneter Weise getrennt werden, da die Wechselwirkungen mit der Matrix über die Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche und nicht über die Teilladung alleine erfolgt ⁶⁴.

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Eine weitere Chromatographie-Methode, welche die physikalischen Eigenschaften der Proteine ausnutzt und immer bedeutungsvoller in der Enzymaufreinigung wird, ist die Hydrophobe-Interaktionschromatographie. Sie basiert auf der Wechselwirkung hydrophober Proteinregionen mit hydrophoben Gruppen der Säulenmatrix. Mit steigender Ionenstärke nehmen die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Enzymmolekülen zu. Für eine effiziente Fraktionierung über die Hydrophobe-Interaktionschromatographie ist eine hohe Ionenstärke erforderlich. Diese Anforderungen machen den Einsatz der Hydrophobe-Interaktionschromatographie als Aufreinigungsschritt direkt nach einer Präzipitation mit Salzen wie Ammoniumsulfat anwendbar. Die Elution gebundener Moleküle erfolgt über einen absteigenden Salzgradienten oder durch pH-Veränderungen.

Die Hydrophobe-Interaktionschromatographie zeichnet sich durch hohe Durchsatzraten aus, jedoch ist die Auflösung im Vergleich mit der Ionenaustausch-Chromatographie geringer. Da diese Chromatographie-Methode auf einen anderen Mechanismus basiert, kann sie effizient mit weiteren Chromatographie-Arten kombiniert werden kann ⁶⁴. Xylanasen, Lipasen und Penicillin G Amidase können erfolgreich über diese Chromatographie-Methode aufgereinigt werden ⁶⁵⁻⁶⁷.

3.2.2. Aufreinigung diagnostischer und therapeutischer Enzyme

Um Enzyme als Therapeutika oder in der Diagnostik einsetzen zu können, müssen sie zum einen in ausreichender Menge hergestellt werden können und zum anderen eine sehr hohe Reinheit aufweisen. In der Diagnostik eingesetzte Enzyme müssen von weiteren Proteinen, die ebenfalls katalytische Aktivitäten aufzeigen, abgetrennt werden, da diese die diagnostische Funktion des Zielenzym beeinflussen können. Diese Abtrennung erfolgt in so wenigen Chromatographie-Schritten wie nötig. Bei therapeutischen Enzymen ist der Reinigungsaufwand noch größer. Neben weiteren Proteinen müssen auch Nukleinsäuren, Viren und Endotoxine vollständig abgetrennt werden. Damit Enzyme in der Therapie eingesetzt werden können, bedürfen sie einer Reinheit von 95-98 %. Hierzu sind im Allgemeinen wenigstens drei Chromatographie-Schritte notwendig, welche meistens Gelfiltration, Ionenaustausch und Hydrophobe Interaktionschromatographie beinhalten ^{13,68}.

3.2.2.1. Abtrennung von Nukleinsäuren

Sowohl Fermentationsbrühe, als auch Zellysate enthalten Nukleinsäuren. Obwohl ihr Anteil im Zellysate natürlich deutlich größer ist als in einer Fermentationsbrühe, können in dieser dennoch DNA-Konzentrationen von bis zu 100 mg/L nachgewiesen werden⁶⁹. Diese Verunreinigungen müssen von der konzentrierten Enzymlösung separiert werden. Die zulässige Konzentration an Nukleinsäuren in einem Enzymprodukt hängt vom späteren Einsatzgebiet des Enzyms ab. Gerade für rekombinante Enzyme ist es wichtig, dass die in der Lösung enthaltene DNA entfernt oder hydrolysiert wird, um die Gefahr von unerwünschtem Gentransfer bei der Verwendung des finalen Zielproduktes zu minimieren¹⁹. Möglichkeiten der Abtrennung von Nukleinsäuren sind z.B. der Einsatz von Nukleasen⁷⁰ oder die Präzipitation mit verschiedenen Agentien. Der Einsatz von Nukleasen ist eine sehr kostenintensive Methode, die kaum Anwendung findet. Zur Ausfällung von Nukleinsäuren können unter anderem Enzyme, wie z. B. Lysozym⁷¹ eingesetzt werden. Eine Fällung der Nukleinsäuren mit Ammoniumsulfat findet ebenfalls Anwendung, ist aber nicht sehr spezifisch, da dieses Agens ebenso Proteine ausfällt. Geeigneter auf diesem Gebiet sind positiv geladene Agenzien, die mit den negativ geladenen Phosphatresten der Nukleinsäuren Komplexe bilden. Hierzu zählen: Polyethylenimin^{72,73}, Cetyltrimethylammoniumbromid^{74,75}, Streptomycinsulfat sowie Protaminsulfat⁷⁶. Ebenso wird in der Literatur der Einsatz von „Submicron-Sized Polymeric Particles“ zur Entfernung von Nukleinsäuren und Endotoxinen beschrieben^{77,78}. Die konzentrierten Enzymlösungen enthalten weitere unvorteilhafte Proteine und Enzyme wie Proteasen und Peptidasen, die eine Degradierung des Zielenzym bewirken können. Diese sollten in ersten Aufarbeitungsschritten früh abgetrennt werden.

3.2.2.2. Affinitätschromatographische Methoden

Ein Aufreinigungsprozess therapeutischer Enzyme beinhaltet häufig einen sehr spezifischen Reinigungsschritt zur Feinreinigung, welcher nicht auf die physikochemischen Eigenschaften des Enzyms sondern auf seine funktionellen Eigenschaften basiert. Dies ermöglicht die Affinitätschromatographie. Sie ist die leistungsstärkste Chromatographie-Methode und ist heutzutage in den meisten Aufreinigungsprozessen therapeutischer und diagnostischer Enzyme integriert. Speziell zur Isolierung von Enzymen ist die Affinitätschromatographie geeignet, da diese basierend auf ihren katalytischen oder immunogenischen Eigenschaften sehr spezifisch aufgereinigt werden können. In einigen Fällen kann die erforderte finale Reinheit in nur einem Schritt erreicht werden^{79,80}. Die hohen Kosten machen in den meisten Fällen ein scale-up in den Produktionsmaßstab unmöglich. Daher ist diese Chromatographie-Methode vorwiegend

zur Aufreinigung hochwertiger Spezialenzyme, die im kleinen Maßstab produziert werden, interessant⁸¹.

Das aufzureinigende Enzym wird spezifisch und reversibel an einen biospezifischen Liganden, welcher über spezielle, flexible Linker an einer unlöslichen Matrix gekoppelt ist, gebunden. Biospezifische Liganden, die zur Enzymisolierung eingesetzt werden sind Substrate und Enzyminhibitoren, die spezifisch gegenüber bestimmten Enzyme sind, oder Coenzyme und Cofaktoren, welche hochspezifisch gegenüber bestimmte Gruppen, wie z.B. NAD⁺ für Dehydrogenasen oder ATP für Kinasen, sind. Die Wahl des Liganden ist wichtig für eine erfolgreiche Enzymisolierung. Der Ligand sollte zum einen stark genug an das Enzym binden, damit es vollständig in der Chromatographie-Säule zurückgehalten wird. Zum anderen darf die Bindung zwischen Ligand und Enzym nicht zu stark sein, da sonst eine Elution erschwert wird. Enzymsubstrate erfordern kontinuierliche, nicht reaktive Prozessbedingungen, damit eine vorzeitige Enzymabtrennung vermieden wird. Auch Inhibitoren sind aufgrund ihrer hohen Dissoziationskonstanten häufig zu schwach das Enzym vollständig zurückzuhalten. Daher werden bevorzugt ihre Analoga als biospezifische Liganden eingesetzt.

Kostengünstige, chemische Cofaktoranaloga, wie z.B. kommerzielle Triazin-Farbstoffe, eignen sich ebenfalls zur spezifischen Enzymisolierung⁸². Procion-Rot wird zur Aufreinigung mehrere NAD⁺ oder FAD⁺ abhängige Dehydrogenasen verwendet⁸³. Weitere Enzymklassen, wie z.B. Serin-Proteasen binden spezifisch an den Farbstoff Cibacron-Blau^{84, 85}. Ebenso wurden biomimetische Analoga der industriellen Triazin-Farbstoffe zur Aufreinigung der FADH abhängigen Formate-Dehydrogenase in der Literatur beschrieben⁸⁶.

Metallionen können ebenso als Liganden eingesetzt werden. Sie werden mit Hilfe von Chelatbildner wie z.B. Iminodiessigsäure an die stationäre Phase gebunden. Auf diese Weise lassen sich rekombinante His-tagged Enzyme auf Basis ihrer unterschiedlich starken Wechselwirkungen mit den Metallionen von weiteren Biomolekülen abtrennen. Die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie wird erfolgreich zur Aufreinigung industriell relevanter Enzyme in nur einem Schritt eingesetzt⁸⁷⁻⁸⁹.

Viele eukaryotische Enzyme sind Glycoproteine. Sie lassen sich spezifisch über die Lektin-Affinitätschromatographie aufreinigen. Als Ligand dient hier in den meisten Fällen das Lektin Concanavalin A, welches bevorzugt Mannosyl- und Glucosyl-Reste bindet⁹⁰⁻⁹³.

Eine weitere spezielle Art der Affinitätschromatographie ist die Immunoaffinitätschromatographie. Sie wird hauptsächlich zur Aufreinigung von Enzymen für Forschungszwecken oder zur Reinigung therapeutischer Enzyme eingesetzt. Als Liganden werden hier für das Zielenzym spezifische monoklonale Antikörper eingesetzt. Sie macht die Isolierung einer spezifischen Substanz aus einer komplexen biologischen Lösung in einem Schritt möglich^{94, 95}.

4. Experimenteller Teil

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Aufreinigung von Modellenzymen über Membranadsorber mit der Zielsetzung effiziente Aufreinigungsverfahren zu entwickeln und die Membranadsorbertechnologie in der biotechnologischen Enzymgewinnung zu etablieren.

Herkömmliche zur Enzymisolierung eingesetzte Chromatographie-Verfahren basieren im Allgemeinen auf dem Prinzip der klassischen Säulenchromatographie. Ein Hauptproblem in den partikelgefüllten Chromatographie-Säulen ist die Diffusionslimitierung. Die innere Oberfläche der porösen Partikel, an der die spezifische Wechselwirkung stattfindet, ist für gelöste Substanzen nur durch Diffusion erreichbar (s. Abb. 4). Dies führt zu erhöhten Transportzeiten und daraus resultierenden erhöhten Elutionsvolumina ⁷.

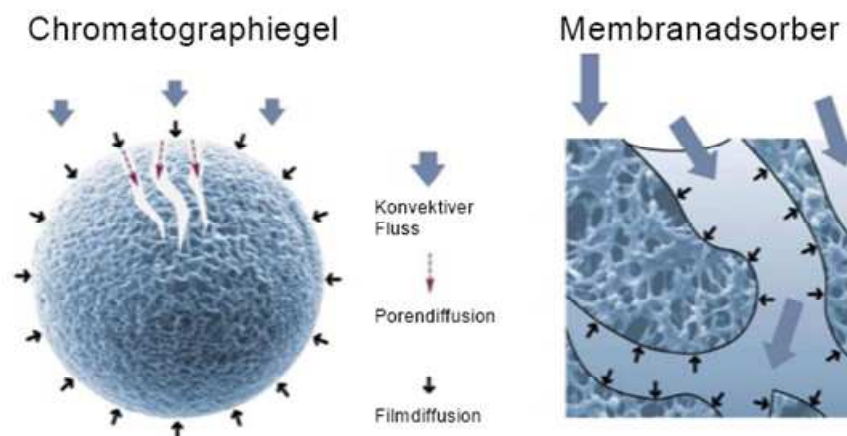


Abb. 4: Vergleich Stofftransfer in Chromatographiegelen und Membranadsorbern.⁹⁶

Membranadsorber bestehen aus mehreren Lagen chemisch modifizierter makroporöser Membranen, die biospezifische Liganden auf ihren inneren Porenoberflächen tragen. Im Gegensatz zu herkömmlichen porösen Chromatographiegelen werden die Poren der Membranadsorber konvektiv durchströmt (s. Abb. 4). Auf diese Weise wird verhindert, dass die Adsorptionskinetik durch Diffusionsvorgänge limitiert wird. Hierdurch können Prozesszeit sowie Elutionsvolumen deutlich reduziert werden. Konstante Bindungskapazitäten auch bei hohen Flussraten gewähren zudem eine schnelle Trennung von Proteingemischen und eine hohe Durchsatzrate ^{97,98}. Aufgrund der schnellen Durchführbarkeit von Aufreinigungsprozessen sind diese häufig produktschonend, da eine unnötig lange Handhabung der biologisch aktiven Substanzen unter eventuell denaturierenden Bedingungen vermieden wird. Membranadsorber sind im Allgemeinen in Form von Wickel- oder Stapelmodulen aufgebaut, in

denen unterschiedlich große Membranflächen eingebaut sind. Die Membranadsorbertechnologie wird seit einigen Jahren erfolgreich als Polishing-Step am Ende eines Aufreinigungsprozesses eingesetzt, wobei Proteine, DNA und Viren abgetrennt werden. Diese Kontaminanten-Entfernung erfolgt im Allgemeinen im Flow-through Modus^{6, 99-101}. Aber auch als Capture-Schritt, bei dem das Zielprotein an der Membran bindet, findet die Membranadsorbertechnologie Anwendung^{6, 102, 103}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Membranadsorber verschiedener Funktionalität als Capture-Schritt eingesetzt, um die Modellenzyme der drei technisch relevanten Enzymklassen aus dem Zellysat oder der Fermentationsbrühe zu isolieren. Die Modellenzyme wurden unter Ausnutzung ihrer unterschiedlichen physikochemischen und biologischen Eigenschaften über verschiedene biospezifische Liganden isoliert, wobei ionische, hydrophobe und Affinitätswechselwirkungen getestet wurden. Eine Penicillin G Amidase diente dabei als Modellenzym aus der Klasse der Amidasen.

Penicillin G Amidase ist ein industriell relevantes Enzym, welches hauptsächlich in der Pharmaindustrie zur Antibiotika-Herstellung eingesetzt wird. Das Modellenzym wird in *E. coli* 5KpHM12 exprimiert. Der entsprechende Produktionsstamm ist ein Stamm aus dem Haus des Instituts für Technische Chemie, Hannover. Im Vorfeld wurde die Enzymproduktion im Technikums-Maßstab bereits optimiert und charakterisiert¹⁰⁴. Das Gen der Cellulase Cel5A, ein Modellenzym aus der Klasse der Esterasen, wurde an der Technischen Universität Hamburg-Harburg (TUHH) aus *Fervidobacterium gondwanense* isoliert und erfolgreich in *E. coli* M 15 kloniert. Die Produktion der Cellulase Cel5A im Technikums-Maßstab ist ein etablierter Prozess an der TUHH. Zur Entwicklung eines Aufreinigungsverfahrens dieser Cellulase wurde der rekombinante Produktionsstamm von der TUHH für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Mehr als 75 % der industriellen Enzyme sind Hydrolasen. Die Lipase aGTL aus *Geobacillus thermoleovorans* stellt ein Modellenzym dieser Enzymklasse dar. Das rekombinante Modellenzym wird von *Staphylococcus carnosus* TM300 (*S. carnosus*) exprimiert. Für die Aufreinigungsversuche in dieser Arbeit wurde dieser Stamm von der Uni Greifswald bereitgestellt. Bei diesem Produktionssystem wurde bis heute lediglich die Expression der Lipase aGTL in den Kulturüberstand angepasst. Eine Charakterisierung und Optimierung der Lipase-Produktion erfolgte hingegen nicht. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit am Beispiel des Modellenzym Lipase aGTL einen vollständigen Herstellungsprozess von der Kultivierung bis zur Produktisolierung zu entwickeln.

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Vorgehensweisen und Ergebnisse der einzelnen Aufreinigungsverfahren vorgestellt.

4.1. Aufreinigung von Penicillin G Amidase über Ionenaustausch-Chromatographie

Penicillin G Amidase [3.5.1.11] findet hauptsächlich in der Pharmaindustrie Anwendung. Dieses Enzym katalysiert die Synthese halbsynthetischer β -Lactam-Antibiotika sowie die Produktion von 6-Aminopenicillansäure (6-APA) durch Hydrolyse unterschiedlicher Penicilline. 6-APA dient als Ausgangssubstanz für die Synthese verschiedener halbsynthetischer β -Lactam-Antibiotika. 9.000 t/a 6-APA werden heutzutage enzymatisch mit Penicillin G Amidase produziert (vgl. Abb. 5). Ebenso wird Penicillin G Amidase als Biokatalysator in der Peptidsynthese sowie zur Abtrennung chiraler Komponenten aus racemischen Gemischen eingesetzt¹⁰⁵.

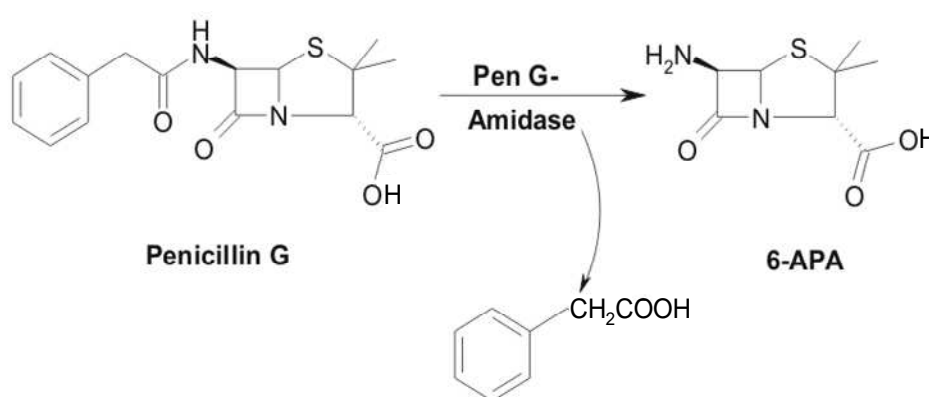


Abb. 5: Enzymatische Amidspaltung von Penicillin G in 6-Aminopenicillansäure (6-APA) und Phenyllessigsäure.¹⁰⁴

In der Literatur sind viele Aufreinigungsstrategien der Penicillin G Amidase beschrieben. Eine Isolierung aus dem Zellextrakt erfolgt sowohl über wässrige Zweiphasen-Extraktion^{106, 107}, als auch über chromatographische Methoden. Häufig erfolgt die Aufreinigung der Penicillin G Amidase über Ionenaustausch- oder Hydrophobe Interaktionschromatographie^{66, 108}. Im Folgendem wurde ein geeignetes Aufreinigungsverfahren zur Isolierung der Penicillin G Amidase aus dem Zelllysate über Ionenaustausch-Chromatographie entwickelt.

4.1.1. Screening Mikroliter-Maßstab

Die Isolierung der Penicillin G Amidase aus dem Zelllysate erfolgte über verschiedene Ionenaustauscher-Membranen. In Hochdurchsatz-Screenings im Mikroliter-Maßstab wurden Anionenaustauscher-, Kationenaustauscher- und salztolerante Ionenaustauscher-Membranen auf ihre Bindungseffizienz und Selektivität hin untersucht. Für derartige Screenings hat sich der Einsatz von Membranadsorber-Zentrifugeneinheiten bewährt^{109, 110}. Entsprechende Vivawell-

8-strips (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) bestehen aus acht nebeneinander angeordneten Adsorbereinheiten. Sie können über einen Lochrahmen mit einer 96-well-Mikrotiterplatte kombiniert werden (s. Abb. 66 im Anhang). Auf diese Weise ist es möglich, ein Screening nach optimalen Bindungs- und Elutionsbedingungen für mehrere Proben im Mikrotiterplattenformat parallel durchzuführen. Alle im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Membranen wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit diesen Zentrifugeneinheiten hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens untersucht (Vorgehensweise siehe Abschnitt 6.2.1). Dabei bestand jede Adsorbereinheit aus 15 Membranlagen mit einer Gesamtmembranfläche von $4,8 \text{ cm}^2$. Zur Bestimmung der optimalen Bindungsbedingung wurde die pH-Abhängigkeit der Adsorption an die Ionenaustauscher-Membranen ermittelt. Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen ansteigenden Salzgradienten bei gleichzeitiger Variation des pH-Wertes. Die Selektivität der Bindungs- und Elutionserfolge wurde anschließend qualitativ über SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung nachgewiesen (vgl. Abschnitt 6.3.3).

Anionenaustauscher-Membran (Q-Membran)

Klassische starke Anionenaustauscher-Membranen der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen tragen quaternäres Ammonium (Q) als funktionelle Gruppe auf ihren inneren Porenoberflächen. Die Cellulose-Membranen dieser Membranadsorber werden mittels eines Propfverfahrens mit einem reaktiven Polymer beschichtet. Diese Hydrogelschicht kleidet die Membranporen unter Bildung einer drei-dimensionalen Struktur aus, so dass eine hohe spezifische Oberfläche erhalten wird (vgl. Abb. 10, links) ^{6,103,111}.

Die pH-Abhängigkeit der Penicillin G Amidase-Adsorption an die Q-Membran wurde im pH-Bereich von pH 6-10 ermittelt. Das Zelllysate wurde hierzu jeweils auf die verschiedenen pH-Werte eingestellt und die Penicillin G Amidase anschließend aus dem Zelllysate heraus an die Q-Membran gebunden. Eine ausführliche Versuchsdurchführung ist im Anhang unter Abschnitt 6.2.1 beschrieben. Die Penicillin G Amidase hat einen pI-Wert = 8,5. Das heißt, bei pH-Werten größer pH 9,0 ist das Enzym negativ geladen und sollte somit an die positiv geladene Q-Membran binden. Abb. 6 zeigt die Durchlauf-Fraktionen der Zelllysate bei Beladung der Q-Membran. Mit steigendem pH-Wert erfolgt eine effizientere Bindung der 70 kDa großen Penicillin G Amidase an den Anionenaustauscher und die im Durchfluss nachweisbare Proteinmenge sinkt (vgl. Abb. 6). Eine fast vollständige Bindung des Enzyms wird durch Adsorption bei pH 10 erreicht. Dieses Adsorptionsverhalten entspricht den Erwartungen: Im Bereich von pH 9 und pH 10 geht die negativ geladene Penicillin G Amidase elektrostatische

der Penicillin G Amidase. Eine separate Enzymelution kann sowohl über einen NaCl-Gradienten bei konstantem pH-Wert, als auch über einen pH-abhängigen Salzgradienten nicht erzielt werden. Unter diesen Bedingungen wird lediglich eine schwache Trennung des Zielenzym von anderen Proteinen erzielt werden. Die reinste Penicillin G Amidase Fraktion wird durch Elution bei pH 6 mit 200 mM NaCl erhalten (vgl. Abb. 7, Fraktion 3).

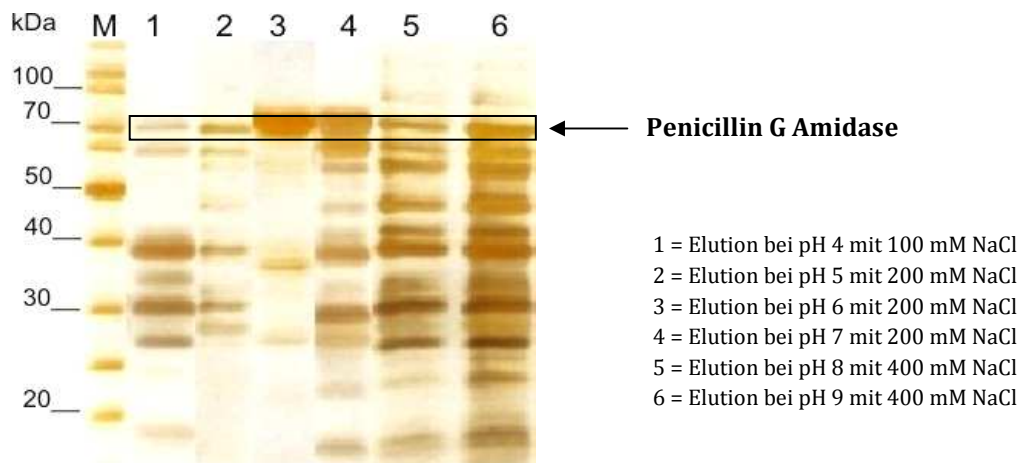


Abb. 7: SDS-PAGE-Gel ausgewählter Elutionsfraktionen bei verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Die Q-Membran wird deshalb aufgrund der geringen Selektivität in Bezug auf die Adsorption der Penicillin G Amidase als ungeeignet für die Enzymisolierung aus dem Zelllysats bewertet.

Kationenaustauscher-Membran (S-Membran)

Zur Aufreinigung der Penicillin G Amidase über einen Kationenaustauscher wurden starke Kationenaustauscher-Membranen mit Sulfonsäure-Liganden auf ihren inneren Porenoberflächen (S-Membran) charakterisiert. Die Untersuchung der optimalen Bindungsbedingung im pH-Bereich von pH 3-8 machte deutlich, dass mit sinkendem pH-Wert eine effizientere Bindung der Penicillin G Amidase an die S-Membran stattfindet. Nah am pI-Wert ist die Penicillin G Amidase (pI = 8,5) nur schwach positiv geladen, entsprechend sind die elektrostatischen Wechselwirkungen zur negativ geladenen Membran geringer als bei niedrigeren pH-Werten. Während bei pH 6-8 hauptsächlich die Penicillin G Amidase an die Membran bindet und die weiteren Proteine des Zelllysats nahezu vollständig in den Durchlauf fraktionen nachweisbar sind, kommt es dagegen bei pH 5 und niedrigeren pH-Werten zu einer vollständigen Bindung des Zelllysats an die S-Membran (vgl. Abb. 8).

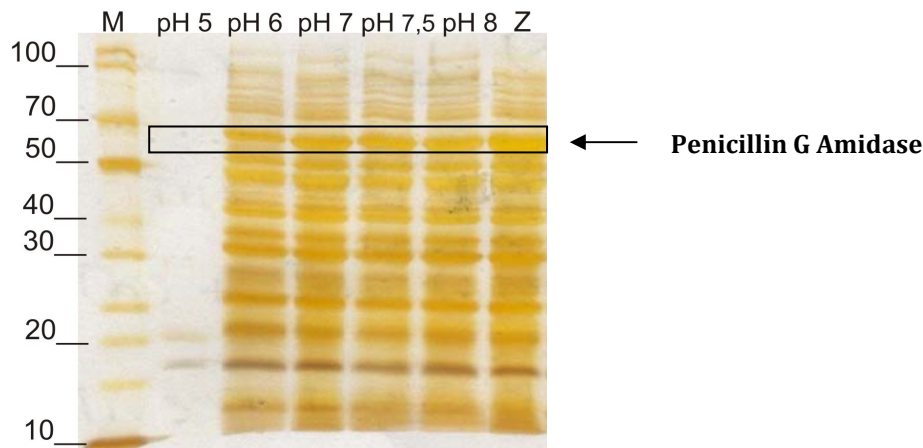


Abb. 8: SDS-PAGE-Gel der Durchlaufaktionen nach Beladung der S-Membran mit Zellysate. M = Proteinmarker, Z = Zellysate vor der Beladung. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Auch bei einer Adsorption der Penicillin G Amidase aus dem Zellysate bei pH 5 wäre eine gezielte, spezifische Elution des gebundenen Enzyms notwendig, um eine Trennleistung zu erzielen. Ein entsprechendes Screening machte jedoch deutlich, dass es nicht möglich ist die Penicillin G Amidase durch eine spezifische Elution zu separieren (Daten nicht gezeigt). Unabhängig vom pH-Wert und Ionenstärke des Elutionspuffers konnte keine Trennung der Penicillin G Amidase von den Proteinen, die ebenfalls an der Membran gebunden haben, erreicht werden.

Um eine Isolierung der Penicillin G Amidase aus dem Zellysate zu gewährleisten ist daher eine Bindung des Zielenzyms unter den Bedingungen notwendig, bei denen hauptsächlich eine Adsorption der Penicillin G Amidase erfolgt, ohne dass weitere Proteine des Zellysats vollständig an die Membran binden. Entsprechend den zuvor gewonnenen Erkenntnissen ist daher eine Adsorption bei pH 6 am sinnvollsten. Unter diesen Bedingungen bindet die Penicillin G Amidase zwar nicht vollständig an die Membran, allerdings nimmt die Bindungseffizienz mit steigendem pH-Wert weiter ab.

Die bestmögliche Elution der gebundenen Penicillin G Amidase wurde durch einen steigenden NaCl-Gradienten (0,05 – 1 M) bei gleichzeitiger Variation des pH-Wertes (pH 3-8) nach Adsorption der Penicillin G Amidase bei pH 6 ermittelt. Die in Abb. 9 gezeigten Elutionsfraktionen bestätigen die zuvor gewonnene Erkenntnis, dass bei einer Adsorption der Penicillin G Amidase bei pH 6 kaum Proteine unspezifisch an die Membran adsorbieren. Entsprechend wenige Proteinbanden lassen sich über die SDS-PAGE in den Elutionsfraktionen visualisieren. Während die Elutionsfraktionen der Penicillin G Amidase bei pH 8 und pH 7 mit wenigen unspezifisch gebundenen Proteinen aus dem Zellysate verunreinigt sind, ist anhand des SDS-PAGE-Gels davon auszugehen, dass durch Elution bei pH 6 mit 50 mM NaCl die

Fraktion der Penicillin G Amidase nahezu frei von weiteren Proteinen ist (vgl. Abb. 9, Fraktion 7).

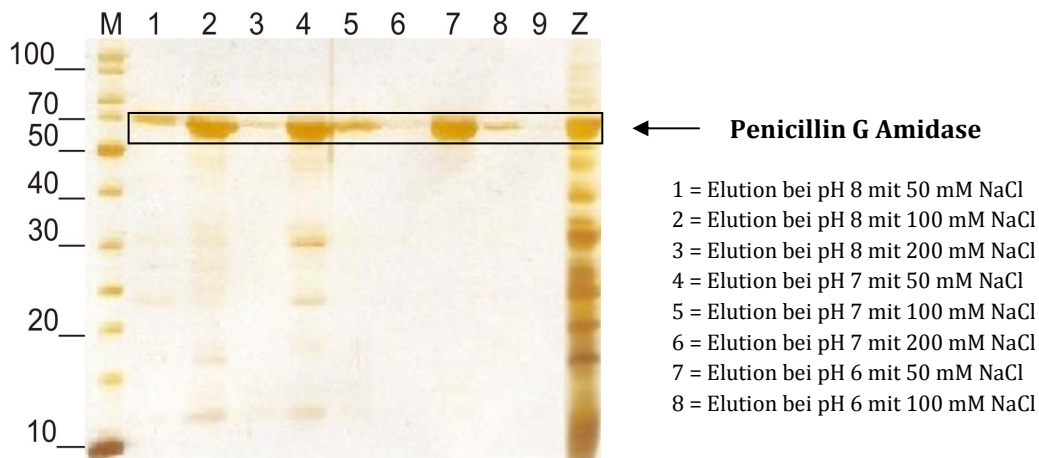


Abb. 9: Elution der Penicillin G Amidase von der S-Membran. Die Adsorption erfolgte aus dem Zellysate bei pH 6 (Z). Anschließend erfolgte die Elution mittels verschiedener Elutionspuffer unterschiedlicher pH-Werte und NaCl-Konzentrationen. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Diese Ergebnisse stellen eine Grundlage zur Isolierung der Penicillin G Amidase dar. In nur einem Schritt wird durch Beladung der S-Membran mit dem auf pH 6 eingestelltem Zellysate und einer anschließenden Elution des gebundenen Enzyms bei gleichbleibendem pH-Wert mit 50 mM NaCl die qualitativ reine Penicillin G Amidase, d. h. ohne weitere auf dem SDS-PAGE-Gel nachweisbare Proteine, erhalten. Aus diesem Grund wurden für nachfolgende Versuche ausschließlich Membranen dieser Funktionalität (Sulfonsäure) verwendet.

S-Membran auf doppelporöser Membranbasis

Die Bindungskapazität und Membranpermeabilität sind entscheidende Leistungsparameter der Adsorbermembranen. Um Membranadsorber effektiver zu gestalten, wird stetig versucht, die Bindungskapazitäten der Membran zu steigern. Eine Möglichkeit höhere Bindungskapazitäten zu erzielen, ist ein erhöhter Pflopfgrad. Untersuchungen zur Bindungskapazität der Membranen in Abhängigkeit des Pflopfgrades zeigten, dass mit zunehmendem Pflopfgrad die Bindungskapazitäten deutlich gesteigert werden können. Allerdings nimmt gleichzeitig die Permeabilität der gepflopferten Membran erheblich ab¹¹². Ein neuer Ansatz der Firma Sartorius Stedim Biotech, Göttingen zur Erreichung höherer Bindungskapazitäten bei gleichzeitig hoher Membranpermeabilität basiert auf der Ausbildung einer sekundären Porenstruktur innerhalb der Membranmatrix. Ultraporen in der Membranmatrix, die die spezifische Oberfläche der

Adsorbermembran vergrößern, sollen höhere Bindungskapazitäten ermöglichen. Der strukturelle Unterschied dieser sogenannten doppelporösen Membran zur klassischen gefropften Membran ist in Abb. 10 schematisch dargestellt.

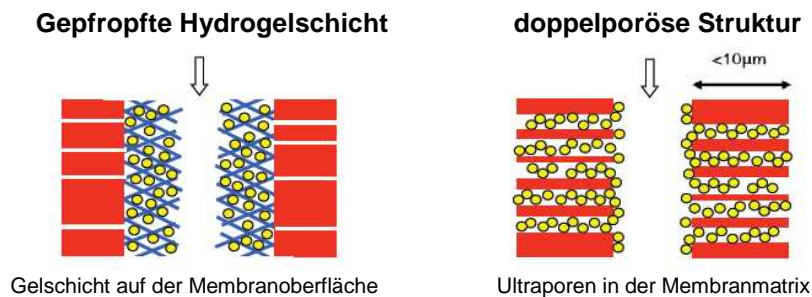


Abb. 10: Schematischer Vergleich der Membranmodifikationen gefropft und doppelporös.

Abb. 11 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der S-Membran basierend auf den Membranmodifikationen gefropft und doppelporös. Diese beiden Membranen weisen deutlich erkennbare Unterschiede hinsichtlich ihrer Porenoberfläche auf. Die Porenstruktur der gefropften S-Membran geht unverkennbar aus der entsprechenden REM-Aufnahme hervor. Ebenso ist die Hydrogelschicht, welche die Poren auskleidet, erkennbar (s. Abb. 11, rechts).

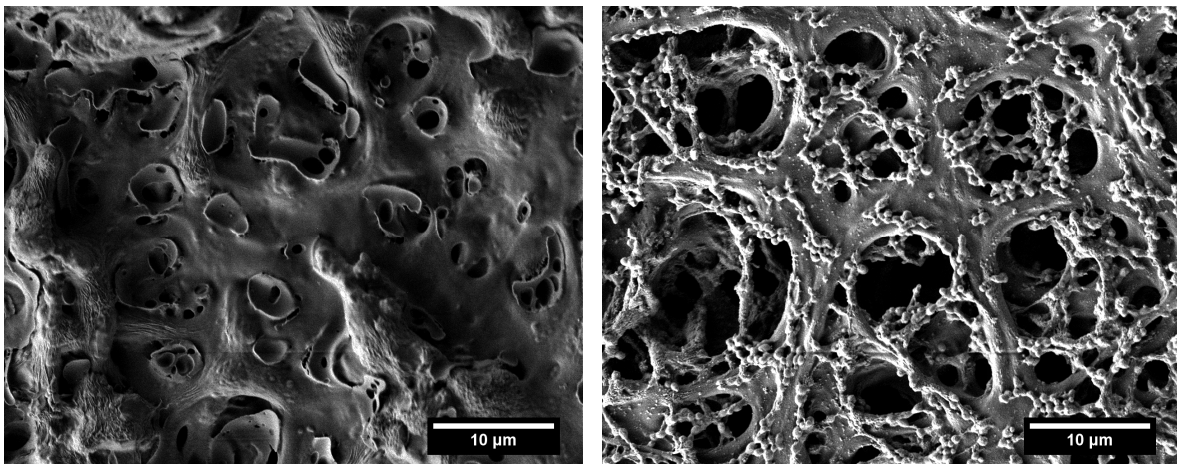


Abb. 11: REM-Aufnahmen der S-Membran mit unterschiedlicher Membranmodifikation in 2500-facher Vergrößerung. Links: doppelporöse S-Membran, rechts: gefropfte S-Membran.

Im Vergleich dazu weist die doppelporöse Membran nicht diese offene Porenstruktur, wie sie bei der gefropften Membran erkennbar ist, auf (s. Abb. 11, links). Die entsprechende REM-Aufnahme zeigt, dass die Poren ausgefüllt sind. Dies scheint die sekundäre Porenstruktur innerhalb der Membranmatrix zu sein. Ebenso ist anhand der rasterelektronen-

mikroskopischen Aufnahmen deutlich zu erkennen, dass die Adsorbermembran auf doppelporöser Membranbasis im Vergleich zur gefropften Membran eine größere Oberfläche aufweist.

Als Alternative zur klassischen S-Membran wurde die S-Membran auf doppelporöser Membranbasis hinsichtlich der Aufreinigung der Penicillin G Amidase charakterisiert. Das Screening der Bindungs- und Elutionsbedingungen zeigte, dass die neue Membranstruktur keine Unterschiede bezüglich Bindungseffizienz und Selektivität zur gefropften Membranmodifikation aufweist (Daten nicht gezeigt). Eine optimale Enzymisolierung mit der doppelporösen S-Membran wird, im Einklang mit der Aufreinigungsstrategie für die gefropfte S-Membran, durch Adsorption des Zellysats bei pH 6 und Elution der Penicillin G Amidase bei pH 6 mit 50 mM NaCl erzielt.

Im Hinblick auf eine höhere Produktausbeute bei der Isolierung der Penicillin G Amidase aus dem Zellysats wurden Untersuchungen zur Bindungskapazität dieser neuen, doppelporösen Membranmodifikation vergleichend zur gefropften Membran durchgeführt. Ebenso wurde das Durchbruchverhalten beider Adsorbermembranen analysiert. Entsprechende Untersuchungen erfolgten mittels der Zentrifugeneinheiten Vivapure 5,4. Diese bestehen im Gegensatz zu den Vivawell-8-strips nicht aus nebeneinander angeordneten Adsorbereinheiten, sondern aus einzelnen kleinen Adsorbern die in eine Laborzentrifuge eingesetzt werden können (vgl. hierzu Anhang, Abschnitt 6.2.1). Zur Aufnahme von Durchbruchkurven wurden die Adsorber 30-mal mit je 0,5 mL einer reinen Penicillin G Amidase-Lösung (1 mg/mL Enzym in 25 mM KPP, pH 6) beladen und der Enzymgehalt in den jeweiligen Durchlaufraktionen durch Messung der Absorption bei 280 nm (vgl. Abschnitt 6.3.2.1) bestimmt. Durch Auftragung des Durchsatzvolumens gegen die Enzymkonzentration in der Durchlaufraktion zu diesem Zeitpunkt (C) bezogen auf die Ausgangskonzentration (C_0) wird die entsprechende Durchbruchkurve erhalten. Der Vergleich der Durchbruchkurven in Abb. 12 zeigt ein sehr unterschiedliches Verhalten der beiden Membranen. Die Penicillin G Amidase wird bei Adsorption an die doppelporöse S-Membran für längere Zeit von der Membran zurückgehalten. Der vollständige Durchbruch tritt erst bei höherem Auftragsvolumen ein, während der Durchbruch bei der gefropften Membran schnell erfolgt. Dagegen zeigt die Durchbruchkurve der gefropften Membran eine höhere Steigung, als die Durchbruchkurve der doppelporösen Membran. Obwohl bei letzterer erst nach einem Durchsatzvolumen von ca. 12 mL Enzymlösung ein vollständiger Durchbruch erreicht wird, ist bis dahin schon viel Zielprodukt verloren gegangen. Bei einer hohen Steigung der Durchbruchkurve, wie es bei der gefropften Membran der Fall ist, führt erst ein vollständiger Durchbruch zu hohen Produktverlusten. Eine hohe Steigung der Durchbruchkurve macht die Membran in Bezug auf eine Proteinabtrennung bzw. –

isolierung effizienter, weil eine höhere Auflösung möglich ist. Hinsichtlich dieses Verhaltens wäre die gefropfte Membranmodifikation der doppelporösen vorzuziehen.

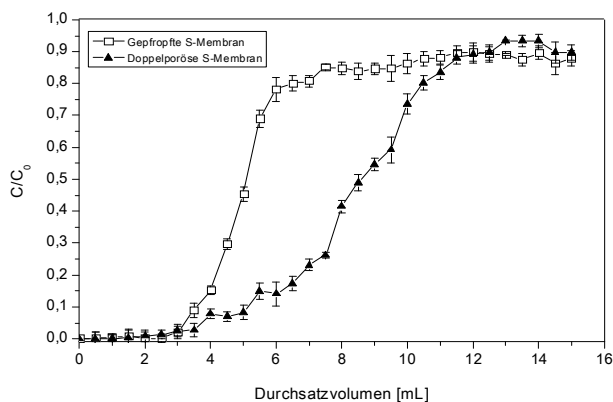


Abb. 12: Durchbruchkurven der gefropften und doppelporösen S-Membran im Mikrolitermaßstab.

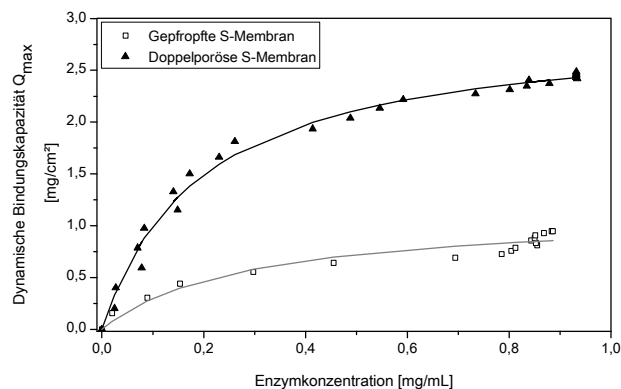


Abb. 13: Adsorptionsisotherme für die gefropfte und doppelporöse S-Membran.

Die Bindungskapazitäten der gefropften und doppelporösen S-Membran wurden anhand von Adsorptionsisothermen bestimmt. Bei Zentrifugation der Enzymlösung in den Vivapure 5,4 – Einheiten wird ein Fluss der Enzymlösung durch die Membranlagen bewirkt. Aus diesem Grund wird die Bindungskapazität der Adsorbermembranen, die anhand der Vivapure 5,4 – Einheiten bestimmt wird, im Rahmen dieser Arbeit als maximale dynamische Bindungskapazität Q_{\max} definiert. Die Membranen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Penicillin G Amidase bis zum vollständigen Durchbruch beladen. Dabei wurde die Kontaktzeit zwischen der Enzymlösung und der Adsorbermembran durch eine unveränderte Zentrifugalgeschwindigkeit (1200 g) und Zentrifugalzeit (3 min) konstant gehalten. Die aus den Elutionen ermittelte maximal gebundene Penicillin G Amidase-Menge wurde gegen die eingesetzte Enzymkonzentration aufgetragen. Ausgehend von der erhaltenen Adsorptionsisotherme lässt sich die maximale dynamische Bindungskapazität Q_{\max} auf Grundlage der Funktion einer Langmuir-Isotherme berechnen. Die zugrundeliegende Vorgehensweise und Gleichungen sind in Abschnitt 6.3.4 beschrieben. Die maximale dynamische Bindungskapazitäten der gefropften S-Membran beträgt demzufolge $Q_{\max} = 0,97 \text{ mg/cm}^2$. Wie Abb. 13 deutlich macht, konnten für die S-Membran auf doppelporöser Membranbasis höhere dynamische Bindungskapazitäten nachgewiesen werden. Die dynamische Bindungskapazität der S-Membran wird durch die Einbringung der sekundären Porenstruktur um das 2,5-fache auf $Q_{\max} = 2,48 \text{ mg/cm}^2$ gesteigert. In Bezug auf Restaktivität und Wiederfindungsrate wurden keine signifikanten Unterschiede der Membranen festgestellt. Die Bestimmung der Enzymaktivität der Penicillin G Amidase erfolgte dabei mittels des NIPAB-Tests (vgl. Abschnitt 6.3.1.1). 97 % der gebundenen Penicillin

G Amidase konnten wieder von der doppelporösen Membran eluiert werden, wobei die Restaktivität bei 82 % lag. In Tab. 2 sind die Ergebnisse für die beiden Membranmodifikationen gegenübergestellt.

Tab. 2: Vergleich der gewonnenen Ergebnisse für die gefropfte und doppelporöse Membranmodifikation.

	S-Membran gefropft	S-Membran doppelporös
Dynamische Bindungskapazität Q_{\max}	0,97 mg/cm ²	2,48 mg/cm ²
Restaktivität	81 %	83 %
Wiederfindungsrate	98 %	97 %

Salztolerante Anionenaustauscher-Membran

Die klassischen Liganden Q und S der Ionenaustauscher-Membranen sind gegenüber hohen Salzkonzentrationen sehr empfindlich. Zu hohe Salzkonzentrationen vermindern die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Zielprotein, wodurch die Adsorptionseffizienz herabgesetzt wird. Dementsprechend sollte unter Verwendung dieser Membranadsorber in Gegenwart moderater Salzkonzentrationen (50 – 150 mM) gearbeitet werden ^{8, 113}.

Salztolerante Membranadsorber binden Zielproteine bei viel höheren Salzkonzentrationen als die klassischen Ionenaustauscher-Membranen. Sie sind speziell entwickelt worden, um Proteinisolierungen aus Fermentationsbrühen oder Ionenaustauscher-Eluaten ohne vorherige Verdünnung und Umpufferung zu ermöglichen. Die salztoleranten Ionenaustauscher-Membranen besitzen das Potential, Enzyme in Anwesenheit erhöhter Salzkonzentrationen, die häufig in Fermentationsbrühen vorherrschen, zu adsorbieren.

Salztolerante Anionenaustauscher-Membranen von Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen tragen als funktionelle Gruppe primäre Amin-Liganden und basieren auf eine doppelporöse Membranmodifikation. Vorversuche haben gezeigt, dass primäre Amine in Anwesenheit von multivalenten Puffern, wie Phosphat oder Citrat, beeinflusst werden, indem die Bindung abnimmt (Daten nicht gezeigt). Beim Screening der optimalen Bindungs- und Elutionsbedingungen für die Isolierung der Penicillin G Amidase aus dem Zellysate konnten diese Erkenntnisse bestätigt werden. Der Einfluss der Puffervalenz auf eine erfolgreiche Enzymbindung konnte jedoch nicht zur Trennung der Penicillin G Amidase ausgenutzt werden. Wie bei der Q-Membran geht die Adsorption der Penicillin G Amidase mit der Bindung weiterer Proteine aus dem Zellysate einher. Zwar binden bei einer Adsorption aus einem multivalenten

Puffer heraus weniger Proteine unspezifisch an die Membran als bei einer Bindung aus einem monovalenten Puffer, aber dennoch konnte keine Trennung von den ebenfalls bindenden Proteinen erreicht werden.

Salztolerante Kationenaustauscher-Membran (Mixed-mode Membran)

Negativ geladene, salztolerante Membranen basieren auf eine gepfropfte Membranbasis und tragen Sulfonsäure-Gruppen in ihren inneren Porenoberflächen. Die hohe Salztoleranz dieser Membranen wurde durch die Einbringung hydrophober Substituenten in die Membranstruktur erreicht. Entsprechend ihrer Funktionalität werden diese salztoleranten Membranen im Weiteren „Mixed-mode Membran“ genannt.

Da die Puffervalenz bei der Proteinbindung an den salztoleranten Anionenaustauscher großen Einfluss zeigte, wurde die pH-Abhängigkeit der Penicillin G Amidase-Adsorption an die Membran unter Verwendung multivalenter (Citrat, KPP, Na_2CO_3) und monovalenter Puffer (Acetat, MES, Tris) untersucht. Hierzu wurden Vivapure 5,4-Einheiten von Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen verwendet, da entsprechende Vivawell-8-strips mit der Mixed-mode Membran kommerziell nicht verfügbar sind. Die Penicillin G Amidase ($\text{pI} = 8,5$) wurde bei pH 5-9 mit einer Ionenstärke von 100 mM aus dem Zellysate heraus an die Membran gebunden und anschließend bei gleichbleibendem pH-Wert mit steigender NaCl-Konzentration (0,05 – 2,0 M NaCl) eluiert. Auf diese Weise war es möglich, anhand der Elutionsfraktionen Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten zu schließen. In Abb. 14 sind die Elutionsfraktionen auf einem SDS-PAGE-Gel dargestellt.

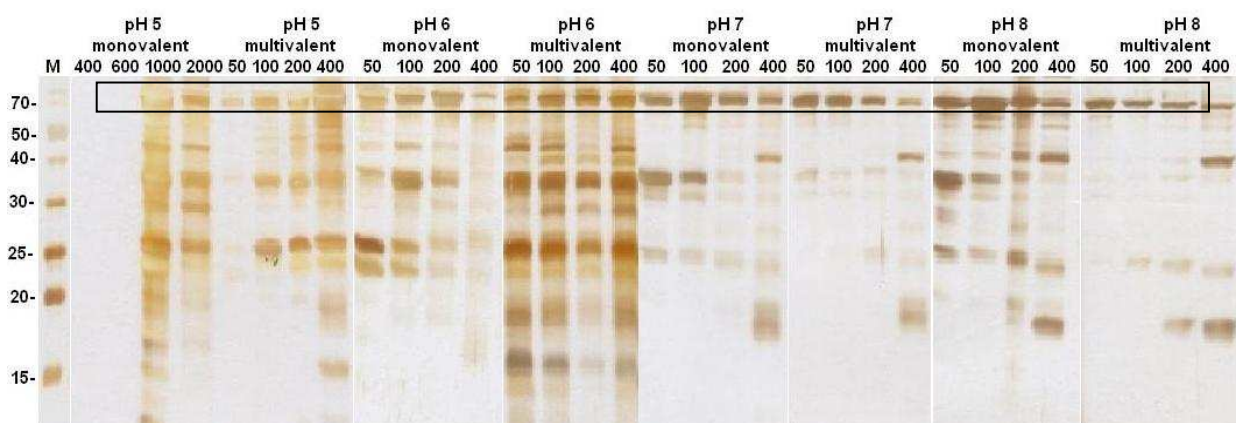


Abb. 14: SDS-PAGE-Gel ausgewählter Elutionsfraktionen der Mixed-mode Membran. Die Elution der Penicillin G Amidase erfolgte bei verschiedenen pH-Werten mit steigender Ionenstärke in Abhängigkeit mono- und multivalenter Elutionspuffer.

Unabhängig von der Puffervalenz erfolgt mit sinkendem pH-Wert eine zunehmende Bindung weiterer Proteine aus dem Zellysate. Dementsprechend werden in den Elutionsfraktionen bei pH 5-6 zusammen mit der Penicillin G Amidase sehr viele unspezifisch gebundene Proteine nachgewiesen. Dagegen erfolgt bei pH 7-8 hauptsächlich die Elution der Penicillin G Amidase. In diesem pH-Bereich dominiert die Adsorption der Penicillin G Amidase an die Membran, gegenüber der unspezifischen Protein-Adsorption. Bei Adsorption der Penicillin G Amidase bei pH-Werten niedriger pH 7 nimmt die Bindung weiterer Proteine an die Membran stark zu, so dass keine Separation des Zielenzym erreicht werden kann (vgl. Abb. 14).

Bei der Elution im pH-Bereich zwischen pH 7-8 lässt sich ein Einfluss der mono- und multivalenten Puffer auf die Elution beobachten. Durch Elution mit einem monovalenten Puffer werden mehr unspezifisch gebundene Proteine zusammen mit der Penicillin G Amidase eluiert, als es bei Verwendung multivalenter Elutionspuffer der Fall ist. Dementsprechend wird durch eine Elution mit monovalenten Puffern ein schwächerer Trenneffekt erzielt. Unter Verwendung eines multivalenten Elutionspuffers kann die Penicillin G Amidase bei pH 7 und pH 8 schon bei niedrigen Ionenstärken (50 mM) nahezu frei von anderen Proteinen eluiert werden.

Beim Vergleich des Bindungsverhaltens der klassischen S-Membran mit dem Bindungs- und Elutionsverhalten der salztoleranten Mixed-mode Membran lässt sich beobachten, dass eine effiziente Isolierung der Penicillin G Amidase an der Mixed-mode Membran bei höheren pH-Werten erfolgt. Während Adsorption und Elution des Enzyms für die S-Membran bei pH 6 erfolgen, werden mit der Mixed-mode Membran bei pH 7 und pH 8 die höchsten Selektivitäten erzielt. Neben elektrostatischen Wechselwirkungen bindet die Penicillin G Amidase ebenfalls über hydrophobe Wechselwirkungen an die hydrophoben Gruppen auf der Mixed-mode Membran, wodurch das Bindungs- und Elutionsverhalten möglicherweise entsprechend beeinflusst wird. Die NaCl-Konzentration, die zur Elution der Penicillin G Amidase benötigt wird, ist dagegen bei beiden Membranen gleich. Obwohl in Gegenwart von Salzkonzentrationen zwischen 50-200 mM NaCl die höchsten Bindungskapazitäten der Mixed-Mode Membran erreicht werden, adsorbiert die Penicillin G Amidase bereits durch Zugabe von 50 mM NaCl.

Entsprechend den vorherigen Vorgehensweisen wurde die dynamische Bindungskapazität der Mixed-mode Membran bestimmt. Da bei pH 7 und pH 8 ähnlich hohe Selektivitäten der Penicillin G Amidase erreicht werden, erfolgte die Bestimmung von Q_{\max} vergleichend für eine Bindung der reinen Penicillin G Amidase-Lösung bei pH 7 und pH 8 an die Membran. Bei pH 7 liegt maximale dynamische Bindungskapazität für die Bindung der Penicillin G Amidase an die Mixed-mode Membran bei $Q_{\max} = 1,65 \text{ mg/cm}^2$, während bei pH 8 $Q_{\max} = 1,54 \text{ mg/cm}^2$ beträgt. Bei pH 7 wird also eine minimal höhere Kapazität erzielt. Für beide pH-Werte werden gleiche Restaktivitäten zwischen 85-87 % gemessen.

Fazit

Zur Isolierung der Penicillin G Amidase aus dem Zelllysats über Ionenaustauscher-Membranen wurden unterschiedliche Membranfunktionalitäten in einem Hochdurchsatz-Screening charakterisiert. Über Anionenaustauscher-Membranen war keine Trennung der Penicillin G Amidase von weiteren Proteinen des Zelllysats möglich. Kationenaustauscher-Membranen zeigten dagegen höhere Selektivitäten bei der Aufreinigung von Penicillin G Amidase. Unabhängig von der Membranmodifikation und Salztoleranz der Kationenaustauscher-Membran konnte das Zielenzym nahezu frei von weiteren Proteinen isoliert werden. In Abb. 15 sind die maximalen dynamischen Bindungskapazitäten der untersuchten Kationenaustauscher-Membranen gegenüber gestellt. Zur Bindung der Penicillin G Amidase an die salztoleranten Mixed-mode Membranen wurden Ionenstärken von 100 mM eingesetzt, wogegen die Adsorption des Enzyms an die anderen zwei Membranen bei einer Ionenstärke von 25 mM erfolgte.

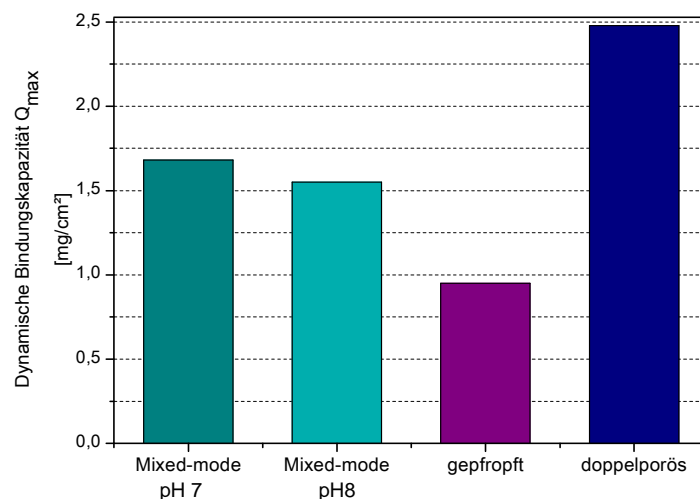


Abb. 15: Vergleich der dynamischen Bindungskapazitäten Q_{max} verschiedener Kationenaustauscher-Membranen.

Die salztolerante Mixed-mode Membran zeigt höhere dynamische Bindungskapazitäten ($Q_{max} = 1,65 \text{ mg/cm}^2$) auf, als die klassische S-Membran. Beide Membranen basieren auf der gefropften Membranmodifikation ($Q_{max} = 0,97 \text{ mg/cm}^2$). Während die Adsorption der Penicillin G Amidase an die S-Membran über elektrostatische Wechselwirkungen erfolgt, führen bei der Mixed-mode Membran zusätzlich hydrophoben Wechselwirkungen zur Enzymadsorption. Möglicherweise wird die Kapazität der Membran durch diesen synergetischen Effekt der Wechselwirkungen positiv beeinflusst. Dennoch kommen diese dynamischen Bindungskapazitäten nicht an die Kapazität der doppelporösen S-Membran heran.

Durch Einbringung einer sekundären Porenstruktur innerhalb der Membranmatrix wird im Fall der Kationenaustauscher-Membran die mit Abstand höchste dynamische Bindungskapazität $Q_{\max} = 2,48 \text{ mg/cm}^2$ erreicht. Ein Vergleich des Durchbruchverhaltens der gepropften und doppelporösen S-Membran veranschaulichte, dass aufgrund der höheren Steigung die Durchbruchkurve der gepropften Membran aufzeigt, diese Membran hinsichtlich einer Proteinisolierung effizienter erscheint. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die klassische S-Membran im Milliliter-Maßstab weiter charakterisiert und die ermittelten optimalen Aufreinigungsbedingungen auf diesen Maßstab übertragen.

4.1.2. Übertragung der Screening-Ergebnisse auf den Milliliter-Maßstab

Zur Charakterisierung von Adsorber-Membranen im Milliliter-Maßstab und zur Ermittlung von entsprechenden Membranadsorberkenndaten ist von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen ein spezielles Testmodul entwickelt worden. Das sogenannte LP 15-Modul besteht aus einem verschraubbaren Edelstahldurchflussgehäuse in das Testmembranen eingespannt werden können. Hierzu werden Testmembranen mit einem Durchmesser von 3 cm aus Membran-Sheets ausgestanzt und drei-lagig in das Modul eingesetzt. Die gesamte Membranfläche im LP 15-Modul beträgt somit 15 cm^2 . Das Adsorbersystem kann an Chromatographie-Anlagen angeschlossen werden. Eine detaillierte Beschreibung und Gebrauchsanweisung des Moduls ist im Anhang unter Abschnitt 6.2.2 beschrieben.

Bevor die beim Screening ermittelten optimalen Bindungs- und Elutionsbedingungen zur Aufreinigung der Penicillin G Amidase über die S-Membran auf eine Membranfläche von 15 cm^2 übertragen wurden, sollte zur näheren Charakterisierung der S-Membran zunächst Untersuchungen zur dynamischen Bindungskapazitäten der S-Membran in diesem Maßstab durchgeführt werden.

Ausgehend von einer Penicillin G Amidase-Standardlösung (1 mg/mL Enzym in 25 mM KPP, pH 6) wurden Durchbruchkurven aufgenommen. Hierzu wurde das LP 15-Modul an die FPLC (BioLogic AVR7-3, BIO-RAD Laboratories GmbH, München) angeschlossen und die Membranen im Modul mit 20 mL der Standardlösung bei einer Flussrate von 1 mL/min beladen. Währenddessen wurden Durchlaufaktionen aufgefangen und die Enzymkonzentration in diesen durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Abb. 16 zeigt die aus dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung erhaltene Durchbruchkurve. Um einen Produktverlust während der Aufreinigung zu minimieren, werden Chromatographie-Materialien in der industriellen Anwendung nur soweit beladen, bis ein 10 %iger Durchbruch erreicht ist. Vor diesem Hintergrund werden bei der Bestimmung der Adsorberkenndaten im Rahmen dieser

Arbeit sowohl die dynamischen Bindungskapazitäten 10 % (Kapazität bei 10 %igem Durchbruch, $Q_{10\%}$), als auch die dynamischen Bindungskapazitäten 100 % (Kapazität bei vollständigem Durchbruch, Q_{\max}) berechnet.

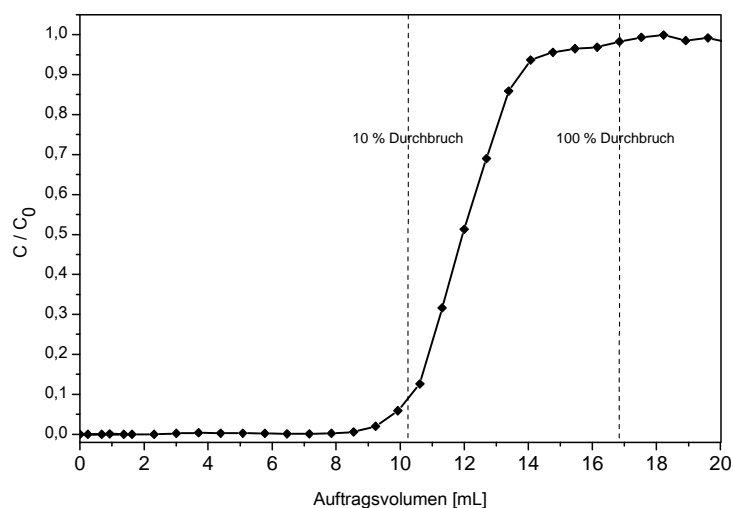


Abb. 16: Durchbruchkurve der Beladung der S-Membran mit Penicillin G Amidase.

Ausgehend von diesen Daten der ermittelten Adsorptionsisothermen konnten auf Basis der Langmuir-Isotherme die Bindungskapazitäten berechnet werden. Nach vollständigem Durchbruch beträgt die maximale Bindungskapazität für die Bindung der Penicillin G Amidase $Q_{\max} = 0,95 \text{ mg/cm}^2$. Dieser Wert steht im Einklang mit dem im Mikroliter-Maßstab berechneten Wert $Q_{\max} = 0,97 \text{ mg/cm}^2$. Die Bindungskapazität 10 % für dieses System beträgt $Q_{10\%} = 0,69 \text{ mg/cm}^2$. Die Ausbeute und Restaktivitäten für eine Isolierung der Penicillin G Amidase über die S-Membran wurden ebenfalls mit der reinen Enzymlösung bestimmt. Die Bestimmung der Enzymaktivität der Penicillin G Amidase erfolgte dabei mittels des NIPAB-Tests (vgl. Abschnitt 6.3.1.1). Alle Daten zur Aufreinigung der Penicillin G Amidase über die S-Membran sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Optimale Aufreinigungsbedingungen der Penicillin G Amidase über die S-Membran.

Membran/ Ligand	Bindungs- bedingung	Elutions- bedingung	Ausbeute [%]	Restaktivität [%]	Dyn. Bindungs- kapazität $Q_{10\%}$ [mg/cm^2]	Dyn. Bindungs- kapazität Q_{\max} [mg/cm^2]
Starker Kationen- austauscher/ Sulfonsäure	25 mM KPP, pH 6	25 mM KPP, 50 mM NaCl, pH 6	97	83	0,69	0,95

Abhängigkeit der dynamischen Bindungskapazität von der Flussrate

Mit dem Testmodul LP 15 wurde die Abhängigkeit der dynamischen Bindungskapazität der S-Membran von der Flussrate näher untersucht. Die S-Membran wurde bei unterschiedlichen Flussraten (0,2 – 5,0 mL/min) mit jeweils 18 mL Standard-Enzymlösung (1 mL/mL in KPP, pH 6) bis zum vollständigem Durchbruch beladen. Die Elution erfolgte dagegen konstant mit einer Flussrate von 1 mL/min. Während dieses Prozesses wurden 2 mL Fraktionen aufgefangen und diese hinsichtlich der Proteinkonzentration und der Enzymaktivität untersucht. Die Proteinkonzentration in den jeweiligen Fraktionen wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm, wie im Anhang unter Abschnitt 6.3.2.1 beschrieben, bestimmt. Die Aktivität der Penicillin G Amidase wurde mittels des NIPAB-Tests bestimmt. Die genaue Vorgehensweise ist in Abschnitt 6.3.1.1 geschildert. In Abb. 17 sind die gebundenen und eluierten Enzymmengen in Abhängigkeit der Flussrate dargestellt.

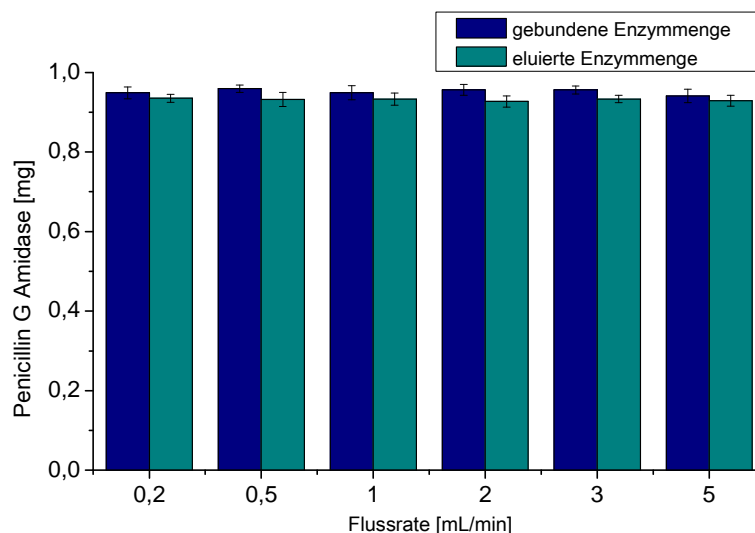


Abb. 17: Gebundene und eluierte Enzymmengen an die S-Membran in Abhängigkeit von der Flussrate.

Es ist ersichtlich, dass keine signifikanten Beladungsunterschiede festgestellt werden können. Von jeweils 18 mg angebotener Penicillin G Amidase konnten im Mittel 14,3 mg Enzym an die Membran gebunden werden; dies entspricht einem $Q_{\max} = 0,93 \text{ mg/cm}^2$. Im Bereich der getesteten Flussraten von 0,2 – 5,0 mL/min ist die dynamische Bindungskapazität konstant. Die gewonnenen Daten untermauern den großen Vorteil der Membranadsorbentechnologie gegenüber herkömmlicher Chromatographie-Materialien: ihre flussraten-unabhängige dynamische Bindungskapazität⁷. Ebenso zeigt Abb. 17 eine gleichbleibende Elutionseffizienz der Membranadsorber. Bei allen Membranbeladungen konnten 98 % der gebundenen Enzyme wieder von der Membran eluiert werden. Die eluierten Enzyme wiesen im

Mittel noch eine Restaktivität von 80 % auf (vgl. Abb. 18). Im Einklang mit der konstanten Elutionseffizienz wurde kein signifikanter Unterschied in den Restaktivitäten beobachtet, was Abb. 18 deutlich macht.

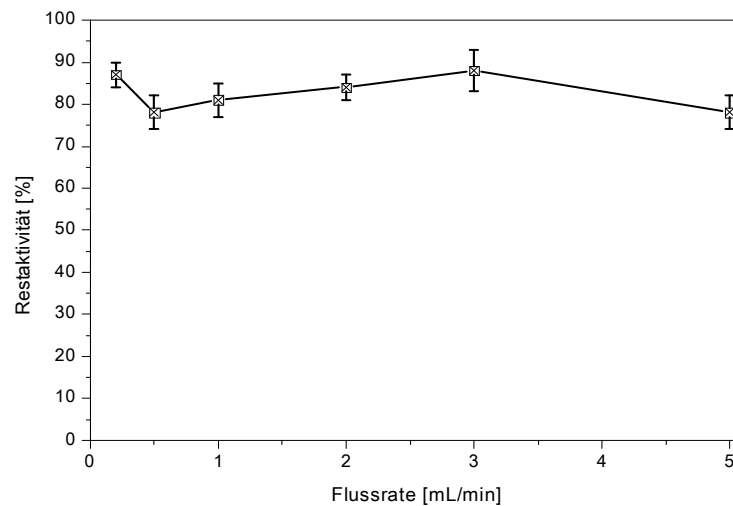


Abb. 18: Restaktivität der Penicillin G Amidase nach der Aufreinigung über die S-Membran im LP 15-Modul bei unterschiedlicher Flussrate.

Isolierung der Penicillin G Amidase aus dem Zellysat mit dem LP 15

Nach Bestimmung der verschiedenen Kenndaten bzgl. der Aufreinigung der Penicillin G Amidase über die S-Membran, wurden schließlich die im Screening ermittelte Aufreinigungsbedingungen auf den Milliliter-Maßstab übertragen und wichtige Daten wie Aktivität, Enzymausbeute und Wiederfindungsrate für dies Aufreinigungsverfahren berechnet. Hierzu wurden die Membranen im LP 15-Modul zunächst mit Bindungspuffer (25 mM KPP, pH 6) equilibriert und anschließend mit 8 mL Zellysat, eingestellt auf pH 6, bei einer Flussrate von 1 mL/min beladen. Nach einem Waschschriff mit Bindungspuffer erfolgte die Elution der gebundenen Penicillin G Amidase bei pH 6 und 50 mM NaCl ebenfalls mit einer Flussrate von 1 mL/min. Während des Aufreinigungsprozesses wurden Fraktionen zu 2 mL gesammelt und die Enzymaktivität und Proteinkonzentration in den jeweiligen Fraktionen bestimmt. Abb. 19 zeigt das Chromatogramm der Aufreinigung und das SDS-PAGE-Gel in Abb. 20 zeigt die aufgetragenen Fraktionen, der im Chromatogramm dargestellten Fraktionsschnittgrenzen.

Die Erkenntnisse aus dem Membran-Screening ließen sich 1:1 auf die größere Membranfläche übertragen, ohne das neue Bindungs- oder Elutionsstrategien entwickelt werden mussten. Die Penicillin G Amidase bindet unter den gewählten Bedingungen (pH 6) an die S-Membran, ohne dass eine Vielzahl weitere Zellysatproteine unspezifisch binden. Die spezifische Elution des

Enzyms erfolgt über einen Dreistufengradienten bei pH 6 mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen mit einem Elutionsvolumen von 5 mL je Elutionsstufe.

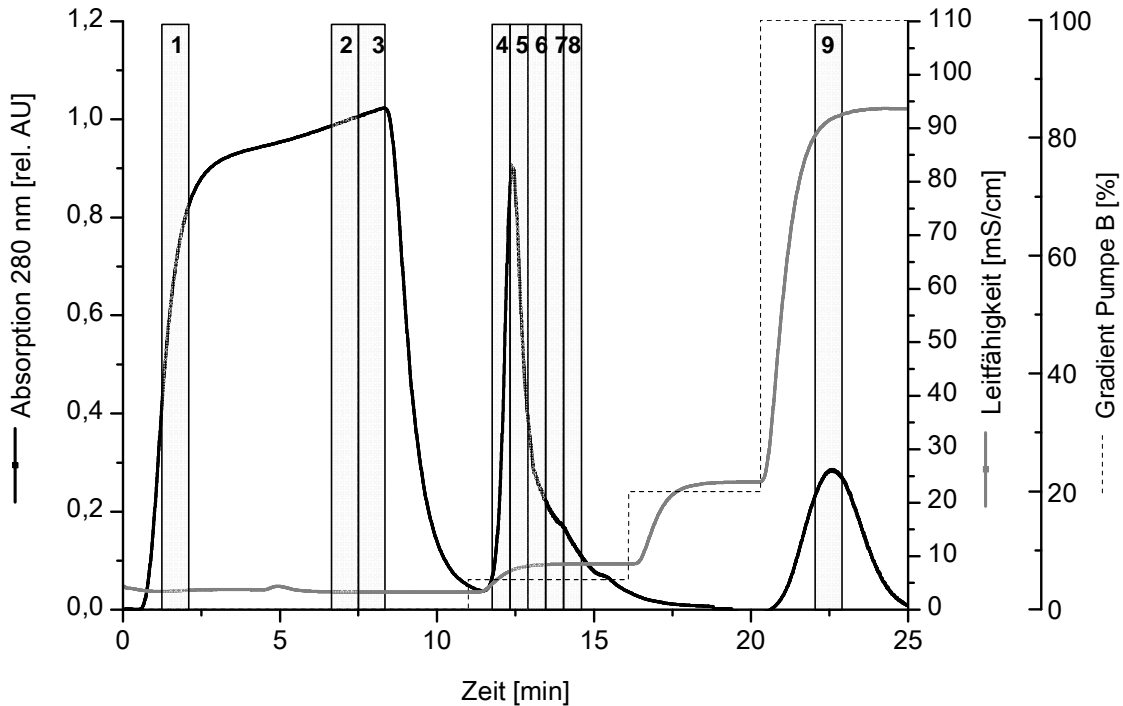


Abb. 19: Chromatogram der Aufreinigung von Penicillin G Amidase über die S-Membran im LP 15. Flussrate: 1 mL/min, Probe: 8 mL Zellysate, eingestellt auf pH 6. Das Auswaschen der restlichen Probe erfolgte bei pH 6 (Puffer A: 25 mM KPP), die anschließende Elution bei pH 6 (Puffer B: 25 mM KPP, 1 M NaCl) über einen Stufengradienten mit je 5 mL Elutionsvolumen. Stufe 1: 5 % Puffer B (50 mM NaCl), Stufe 2: 20 % Puffer B (200 mM NaCl) und Stufe 3: 100 % Puffer B (1 M NaCl).

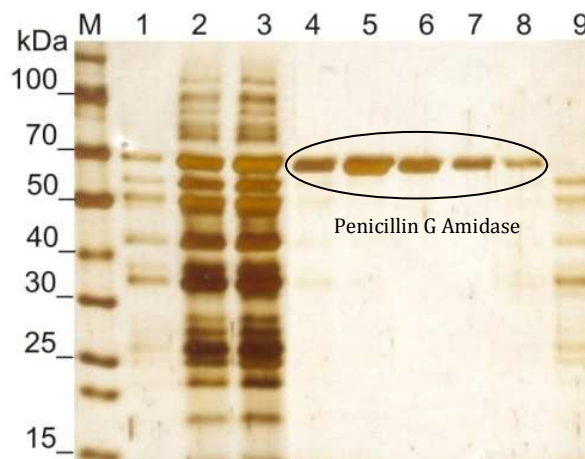


Abb. 20: SDS-PAGE der Fraktionen der Penicillin G Amidase-Aufreinigung aus dem Zellysate. Bahnen 1-3 Durchlaufaktionen während der Membranbeladung mit Zellysate, Bahnen 4-8 Elution der Penicillin G Amidase bei pH 6 mit 50 mM NaCl, Bahn 9 Elution bei pH 6 mit 1 M NaCl zur Entfernung aller noch auf der Membran befindlichen Komponenten. (12 %iges Gel nach Silberfärbung)

Die Elutionsfraktionen der jeweiligen Elutionsstufen wurden vereinigt und die Enzymaktivität und Proteinkonzentration gemessen. Ausgehend von diesen Daten wurde eine Bilanz der Aufreinigung erstellt. Aus dem Vergleich der spezifischen Aktivität vor und nach der Aufreinigung ergibt sich der Reinigungsfaktor. Der Reinigungsfaktor für die Aufreinigung der Penicillin G Amidase unter den gewählten Bedingungen beträgt 101,3. Durch Elution der Penicillin G Amidase mit 5 mL Elutionsvolumen in der ersten Elutionsstufe (5 % Puffer B, 50 mM NaCl) wurde eine Konzentrierung des Zielenzym um den Faktor 4 erreicht. Die wichtigsten Kenndaten der Penicillin G Amidase-Isolierung aus dem Zellysate über den starken Kationenaustauscher-Membranadsorber sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Bilanz der Aufreinigung von Penicillin G Amidase über die S-Membran.

Reinigungsschritt	Proteingehalt [mg/mL]	Volumenaktivität [U/mL]	spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor
Zellysate	72,96	3,59	0,05	1
1. Elutionsstufe S-Membran	2,79	13,87	4,97	101,3

4.1.3. Zusammenfassung

Auf Basis der Ionenaustausch-Chromatographie konnte ein geeignetes Aufreinigungsverfahren zur Isolierung des Modellenzym Penicillin G Amidase entwickelt werden. Nachdem eine Aufreinigung des Enzyms über Anionenaustauscher-Membranen nicht zum Ziel führte, zeigten entsprechende Kationenaustauscher-Membranen eine hohe Selektivität und Trennleistung bzgl. der Enzymisolierung aus dem Zellysate. Es konnte gezeigt werden, dass die durch Screenings im Mikroliter-Maßstab gewonnenen Aufreinigungsbedingungen leicht auf den Milliliter-Maßstab unter Verwendung einer Membranfläche von 15 cm² übertragbar sind. Nach Bindung der Penicillin G Amidase bei pH 6 aus dem Zellysate, lässt sich das gebundene Zielenzym über einen Stufengradienten in reiner Form mit 50 mM NaCl bei pH 6 eluieren. Auf diese Weise wird in nur einem Schritt ein Aufreinigungsfaktor von 101,3 erzielt. Weitere an der Membran gebundene Proteine können anschließend durch höhere Salzkonzentrationen separat eluiert werden. Beispielhaft für Proteinaufreinigung über Membranadsorber konnte anhand der Aufreinigung der Penicillin G Amidase über die S-Membran gezeigt werden, dass die dynamischen Bindungskapazitäten der Adsorber im untersuchten Bereich flussraten-unabhängig sind. Ebenso zeigten sie reproduzierbare Elutionseffizienz auf.

4.2. Aufreinigung der Cellulase Cel5A über Affinitätschromatographie

Cellulasen gehören zur Enzymklasse der Glucosidasen, eine Untergruppe der Hydrolasen. Sie sind in der Lage β -1,4-glykosidische Bindungen zu hydrolysieren und auf diese Weise den Abbau von Cellulose zu katalysieren. Dieser Eigenschaft entsprechend sind die Hauptanwendungsgebiete cellulolytischer Enzyme in der Waschmittel- und Textil-, sowie in der Lebensmittel- und Papier- und Bioenergieindustrie.

Alle Enzyme, die in der Lage sind Cellulose abzubauen, werden unter den Oberbegriff Cellulase zusammengefasst. Je nach Reaktionstyp, den sie katalysieren, lassen sie sich in die drei Haupttypen Endoglucanasen, Exoglucanasen und β -Glucosidasen einteilen. Endoglucanasen (E.C. 3.2.1.4) werden auch als endo- β -1,4-Glucanasen bezeichnet, da sie die Endo-Spaltung β -1,4-D-glykosidischer Bindungen katalysieren und so Cellulose unter Bildung von Oligosacchariden unterschiedlicher Länge hydrolysieren. Bevorzugt werden die amorphen Regionen der Cellulose, Lichenin oder Getreide- β -D-Glycanen unter Bildung reduzierender und nicht reduzierender Enden gespalten. Exoglucanasen (E.C. 3.2.1.91), auch Cellobiohydrolasen genannt, spalten vom nicht reduzierenden Ende Cellobiose ab. Dieses Disaccharid wird durch β -Glucosidasen (E.C. 3.2.1.21) zu Glucose hydrolysiert^{3, 114}. Abb. 21 sind die typischen Reaktionen dieser Cellulase-Typen schematisch dargestellt.

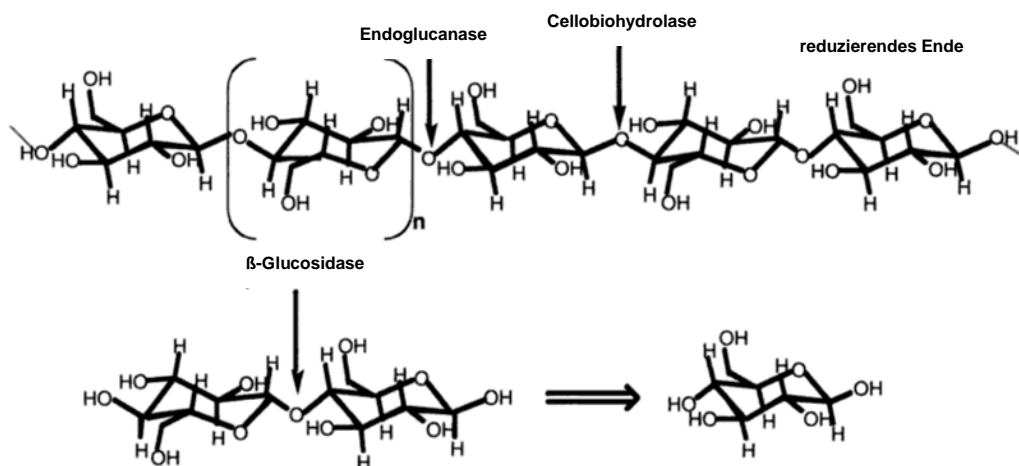


Abb. 21: Celluloseabbau-Reaktionen durch Endoglucanasen, Cellobiohydrolasen und β -Glucosidasen.³

Die Cellulase Cel5A dient in dieser Arbeit aufgrund ihres His-Tags als Modellenzym für eine Enzymbaufreinigung über Affinitätsmembranen. Spezielle Membranadsorber der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen zur Aufreinigung von Proteinen über die Metallchelate-Chromatographie basieren auf Membranen die mit Iminodiessigsäure-Gruppen

(IDA-Membran) funktionalisiert sind. Diese biospezifischen Liganden bilden mit Übergangsmetallionen stabile Komplexe an die das His-tag Protein über zwei Imidazolgruppen binden kann. Eine Elution des gebundenen Zielproteins wird durch eine kompetitive Verdrängung mit Imidazol bewirkt. Ein vergleichbarer Komplexbildner ist Nitrilotriessigsäure (NTA), die ebenfalls als Chelatligand Anwendung bei der Metallchelate-Chromatographie findet.

4.2.1. Screening der Bindungs- und Elutionsbedingungen

Zur Entwicklung eines geeigneten Aufreinigungsverfahrens für die Isolierung der Cellulase Cel5A wurden nicht wie zuvor bei der Penicillin G Amidase unterschiedliche biospezifische Liganden zur Enzymaufreinigung untersucht, sondern die Funktionalisierung der IDA-Membran mit unterschiedlichen Übergangsmetallionen hinsichtlich ihrer Aufreinigungseffizienz charakterisiert. Das Screening erfolgte im Mikroliter-Maßstab mit entsprechenden Vivawell-IDA-8-strips (vgl. Abschnitt 6.2.1).

Gepfropfte IDA-Membran

Zur Isolierung der Cellulase Cel5A aus dem Zelllysat wurden die vier Metallionen Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} auf ihrer Bindungseffizienz getestet. Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Enzymadsorption erfolgte die Bindung der Cellulase bei pH 6 und pH 8. Das vom Hersteller empfohlene Versuchsprotokoll sieht eine Bindung des Zielproteins aus dem Bindungspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl) bei pH 8 vor (vgl. Abschnitt 6.2.1). Der Zellaufschluss der Cellulase erfolgt hingegen bei pH 6, da das pH-Aktivitätsoptimum dieser Cellulase im pH-Bereich von pH 4,5 - 6, 5 liegt (vgl. Abschnitt 6.1.2, Abb. 65). Aus diesem Grunde wurde zu Cellulase zunächst vergleichend bei diesen pH-Werten gebunden¹¹⁵. Die Vivawell-IDA-8-strips wurden hierzu nach dem Standardprotokoll, wie in Abschnitt 6.2.1 beschrieben, mit den jeweiligen Metallionen funktionalisiert. Darauf folgte die zweifache Beladung der Membranen mit der Enzymprobe. Nach zwei Waschsritten mit dem entsprechenden Bindungspuffer wurde die Elution der gebundenen Proteine über einen ansteigenden Imidazol-Gradienten (50 mM – 250 mM Imidazol in 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, pH 8) hervorgerufen. Die Visualisierung der Bindungseffizienz erfolgte über SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung. Bei einer Adsorption der Cellulase Cel5A bei pH 8 binden nur geringe Mengen des Zielenzyms an die Membran. Hingegen ist eine starke Adsorption weiterer Proteine aus dem Zelllysat an die Membran zu beobachten. Im Vergleich dazu ermöglicht die Beladung der Membran bei pH 6 eine selektivere Aufreinigung der Cellulase Cel5A. Unabhängig vom Übergangsmetallion binden bei pH 6 größere Mengen des Zielenzyms an die Membran, während die unspezifische Bindung

weiterer Proteine geringer ist als bei pH 8. In Abb. 22 und Abb. 23 sind exemplarisch die SDS-Gele der einzelnen Aufreinigungsfractionen über die Ni²⁺-IDA-Membranen bei pH 6 und pH 8 dargestellt.

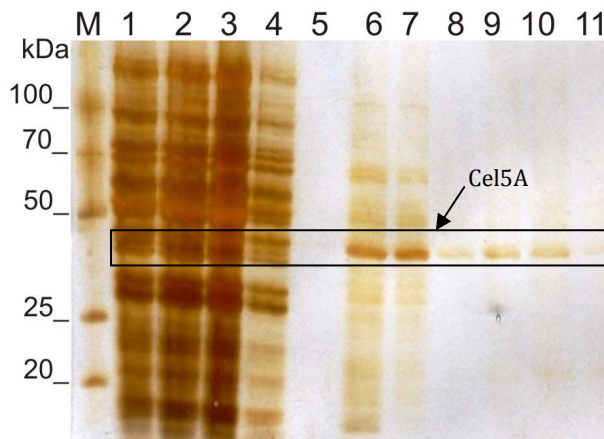


Abb. 22: SDS-PAGE der Aufreinigung von Cellulase Cel5A aus dem Zelllysate über Ni²⁺-IDA-Membranen bei pH 6. Bahnen 1-3 Durchlaufaktionen, Bahnen 4-5 Waschfraktionen bei pH 6, Bahnen 6-11 Elutionsfraktionen mit ansteigendem Imidazol-Gradienten: 6-7 = 50 mM, 8 = 100 mM, 9 = 150 mM, 10 = 200 mM, 11 = 250 mM Imidazol.

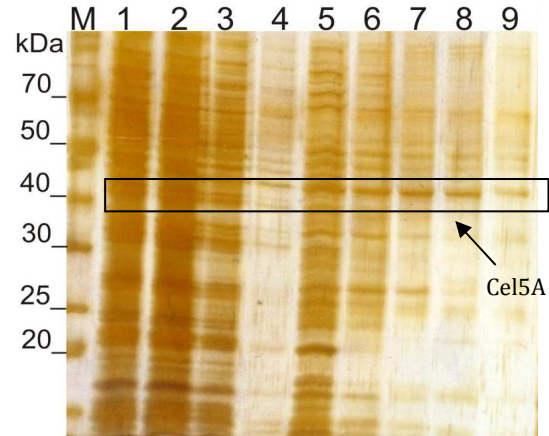


Abb. 23: SDS-PAGE der Aufreinigung von Cellulase Cel5A aus dem Zelllysate über Ni²⁺-IDA-Membranen bei pH 8. Bahnen 1-2 Durchlaufaktionen, Bahnen 3-4 Waschfraktionen bei pH 8, Bahnen 5-9 Elutionsfraktionen mit ansteigendem Imidazol-Gradienten: 5 = 50 mM, 6 = 100 mM, 7 = 150 mM, 8 = 200 mM, 9 = 250 mM Imidazol.

Es ist zu erkennen, dass bei einer Adsorption des Zelllysates bei pH 8 keine Separation der Cellulase von unspezifisch bindenden Proteinen erreicht wird (vgl. Abb. 23). Erfolgt die Bindung des Zelllysates hingegen bei pH 6, scheint nach weiterer Optimierung der Bindungs- und Elutionsbedingungen eine erfolgreiche Separation der Cellulase Cel5A möglich (vgl. Abb. 22). Bei der Aufreinigung über die anderen Metallionen wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Optimierung der Bindungsbedingung

Bei einem Screening der Elutionsbedingungen (pH 5-8) wurde deutlich, dass es bei pH-Werten niedriger pH 8 nicht möglich ist, die Cellulase über kompetitive Wechselwirkungen mit Imidazol von der Membran zu desorbieren. Demzufolge wurden weitere Bindungsbedingungen getestet, um eine effektivere Isolierung des Zielenzym zu gewährleisten. Für die nachfolgenden Versuche erfolgte die Adsorption der Cellulase jeweils bei pH 6, während die Elution bei pH 8 durchgeführt wurde.

Um die Bindung der Cellulase Cel5A an die mit Übergangsmetallionen beladene IDA-Membran selektiver zu gestalten, war es das Ziel, die Cellulase in Gegenwart einer definierten Menge Imidazol an die Membran zu adsorbieren. Auf diese Weise sollten unspezifische Bindungen verhindert werden. Zur Ermittlung der höchstmöglichen Imidazol-Konzentration, die zur

Bindung eingesetzt werden kann, ohne dass die Adsorption des Zielenzym beeinflusst wird, wurden die IDA-Membranen nach Funktionalisierung mit den Übergangsmetallionen dreimal mit einer Cellulase-Standardlösung (1 mg/mL in 50 mM NaAc, pH 6) beladen. Anschließend erfolgte die Elution mit unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen (5-50 mM). Auf diese Weise sollte festgestellt werden, welche Imidazol-Konzentration notwendig ist, um die Cellulase Cel5A von der Membran zu eluieren. Die Enzymmengen in den einzelnen Elutionsfraktionen wurden mittels UV-Messung bei 280 nm bestimmt (vgl. Abschnitt 6.3.2.1). Die reine Cellulase Cel5A wurde für die Aufreinigungsversuche im Rahmen dieser Arbeit von der TUHH zur Verfügung gestellt.

Abb. 24 zeigt die Enzymkonzentrationen in den jeweiligen Elutionsfraktionen in Abhängigkeit von der Membran-Funktionalisierung.

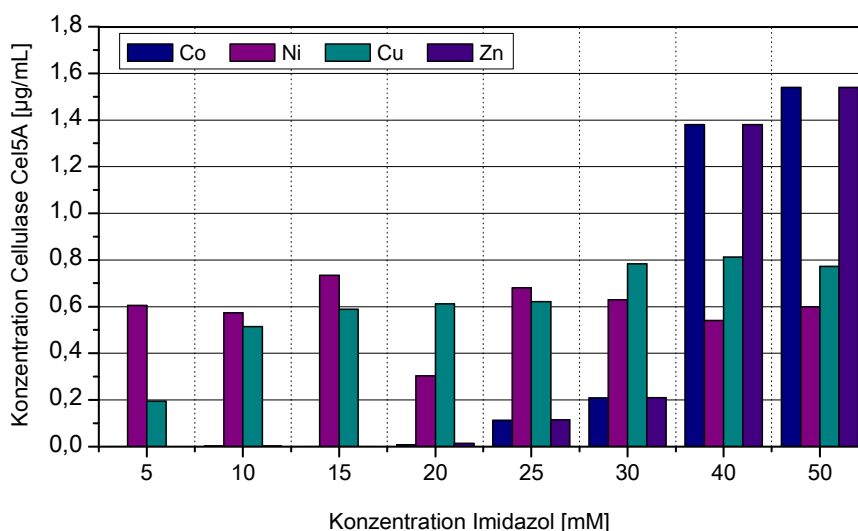


Abb. 24: Cellulase-Konzentration in den einzelnen Elutionsfraktionen in Abhängigkeit des Übergangsmetallions nach Bindung an der IDA-Membran.

Die mit Ni^{2+} - und Cu^{2+} funktionalisierten Membranen weisen ein gleiches Verhalten auf. Bereits mit einer geringen Konzentration von 5 mM Imidazol desorbiert die Cellulase Cel5A von der Membran. Zur Elution des Enzyms von der Co^{2+} oder Zn^{2+} -Membran sind hingegen höhere Imidazol-Konzentrationen notwendig. Erst bei einer Konzentration von 25 mM Imidazol wird eine minimale Cellulase-Menge eluiert. Mit steigender Imidazol-Konzentration nimmt die Elutionsmenge erwartungsgemäß zu, so dass mit 40 mM Imidazol die Cellulase fast vollständig von der Membran eluiert werden kann. Zur vollständigen Elution der Cellulase von einer Ni^{2+} - oder Cu^{2+} -Membran sind dagegen höhere Konzentrationen als 50 mM Imidazol notwendig.

Entsprechend diesen Ergebnissen sollte eine Adsorption der Cellulase Cel5A an die Co^{2+} und Zn^{2+} -Membran bei pH 6 und 20 mM Imidazol möglich sein. Eine Adsorption der Cellulase an eine Ni^{2+} - oder Cu^{2+} -Membranen ist mit Imidazol im Zellysate jedoch nicht empfehlenswert, da bereits 5 mM Imidazol ausreichen, um die Cellulase von diesen Membranen zu eluieren (vgl. Abb. 24).

Abb. 25 zeigt den Aufreinigungserfolg der Isolierung von Cellulase Cel5A aus dem Zellysate unter den zuvor bestimmten Bindungsbedingungen.

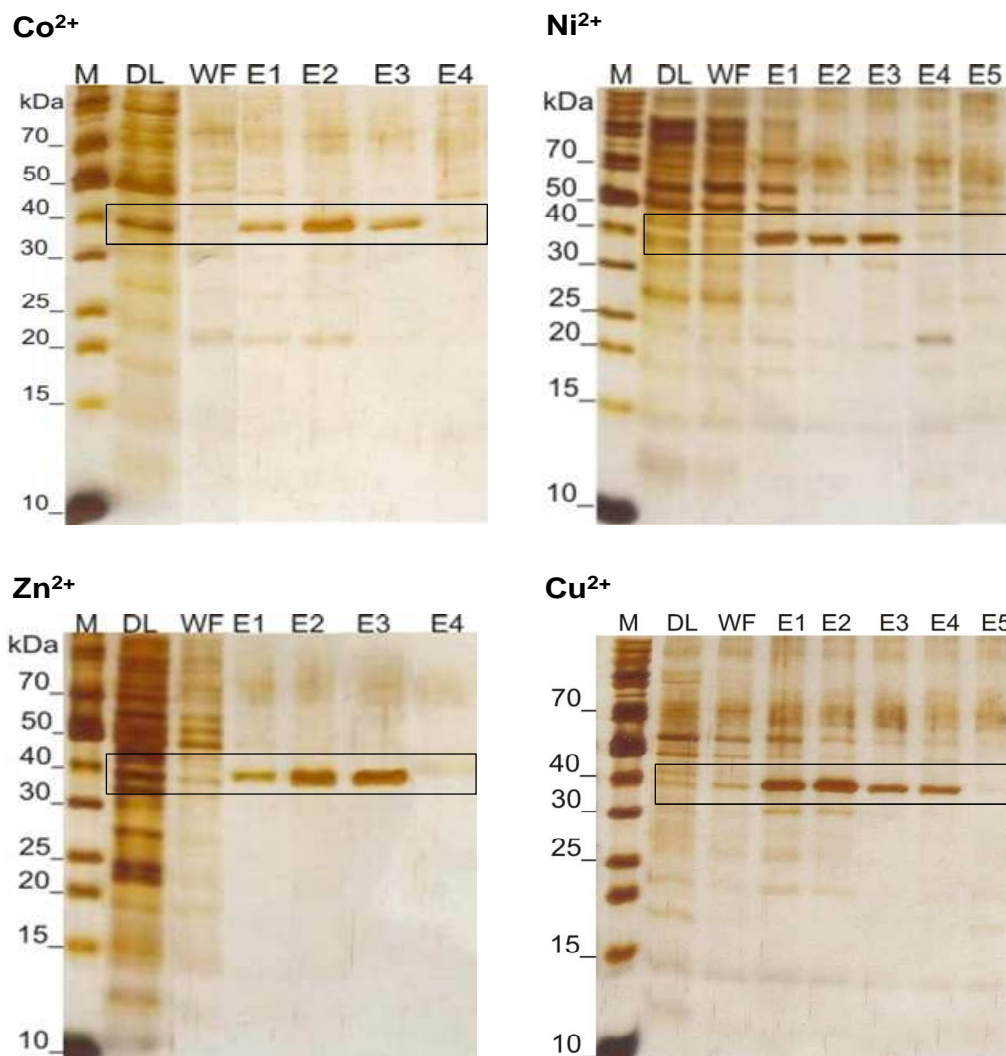


Abb. 25: SDS-PAGE-Gele nach Isolierung der Cellulase Cel5A über vier verschiedenen funktionalisierte IDA-Membranen. Die Adsorption erfolgte aus dem Zellysate bei pH 6. Bei Co^{2+} und Zn^{2+} in Gegenwart 20 mM Imidazol. Anschließend erfolgte die Elution bei pH 8 über einen Imidazolgradienten. DL=Durchlauf, WF= Waschfraktion, E1-E4 für Co^{2+} und Zn^{2+} : 50 mM, 75 mM, 100 mM und 200 mM Imidazol, E1-E5 für Ni^{2+} und Cu^{2+} : 20 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM und 200 mM Imidazol. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Die Adsorption der Cellulase Cel5A an die Co^{2+} und Zn^{2+} -Membran erfolgte durch Zugabe von 20 mM Imidazol zum Zellysate. Die Beladung der Ni^{2+} - und Cu^{2+} -Membranen wurde hingegen ohne Imidazol-Zugabe durchgeführt. Über einen ansteigenden Imidazolgradienten (20-200 mM Imidazol) wurde die Elution hervorgerufen. Abb. 25 verdeutlicht, dass eine Isolierung der Cellulase Cel5A über alle vier Übergangsmetallionen möglich ist. Auch wenn durch eine Aufreinigung der Cellulase über die Co^{2+} und Zn^{2+} -Membran Elutionsfraktionen nahezu frei von weiteren Proteinen erhalten werden, wird aber dennoch deutlich, dass auch über eine Ni^{2+} - und Cu^{2+} -Membran eine Trennung erreicht wird und eine Anreicherung des Zielenzym über diese Membranen möglich ist. Bei einer Isolierung der Cellulase Cel5A über die mit Zn^{2+} oder Co^{2+} funktionalisierte Membran ist jedoch eine selektivere Aufreinigung möglich. Durch Bindung des Zielenzym aus dem Zellysate mit 20 mM Imidazol werden unspezifische Bindungen weiterer im Zellysate vorhandener Proteine minimiert, wodurch reinere Elutionsfraktionen erzielt werden.

Bestimmung der dynamischen Bindungskapazitäten

Nach Charakterisierung der Selektivität der verschiedenen funktionalisierten IDA-Membranen hinsichtlich der Cellulase-Isolierung aus dem Zellysate, wurden mit einer reinen Cellulase-Lösung die dynamischen Bindungskapazitäten Q_{\max} für die jeweiligen Membranen im Mikroliter-Maßstab bestimmt. Ebenso erfolgte eine Untersuchung des Einfluss dieser Aufreinigungsstrategie auf die Enzymaktivität.

Die Durchführung der Versuche erfolgte mit den Vivapure 5,4-Einheiten. Nach Funktionalisierung der IDA-Membranen mit den jeweiligen Metallionen wurden die Membranen 10-mal mit je 0,5 mL einer 1 mg/mL Enzymlösung (1 mg/mL Cel5A in 50 mM NaAc, pH 6) beladen. Nach einem Waschschrift erfolgte Elution viermal mit je 0,5 mL Elutionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol). Durch Absorptionsmessung der einzelnen Fraktionen bei 280 nm wurden die gebundenen und eluierten Cellulase-Mengen bestimmt. Die dynamische Bindungskapazität Q_{\max} bezogen auf die Membranfläche von 5,4 cm^2 für die jeweilige IDA-Membran wurde ausgehend von der gebundenen Enzymmenge berechnet. In Abb. 26 sind die ermittelten dynamischen Bindungskapazitäten Q_{\max} für die Adsorption der reinen Cellulase an die mit Übergangsmetallionen funktionalisierte IDA-Membran dargestellt.

Die Aufreinigung der Cellulase über die Zn^{2+} - und Co^{2+} -Membran zeigte zuvor die höchsten Selektivitäten auf. Die Bindungskapazitäten dieser Membranen unterscheiden sich hingegen deutlich. Bei der Enzymbindung an die Co^{2+} -Membran wird eine dynamische Bindungskapazität von 0,4 mg/cm^2 erreicht. Im Vergleich dazu binden an der Zn^{2+} -Membran 0,54 mg/cm^2 Cellulase Cel5A. Die Bindungskapazitäten der Ni^{2+} - und Cu^{2+} -Membran liegen mit 0,56 mg/cm^2 für die Cu^{2+} -Membran und 0,53 mg/cm^2 für die Ni^{2+} -Membran im Bereich der Zn^{2+} -Membran.

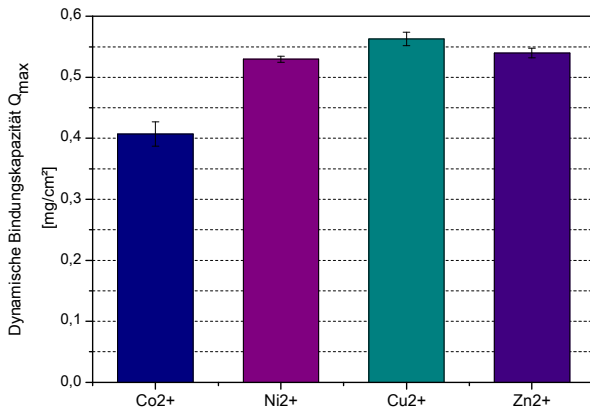


Abb. 26: Dynamische Bindungskapazität Q_{\max} der IDA-Membran funktionalisiert mit verschiedenen Übergangsmetallionen.

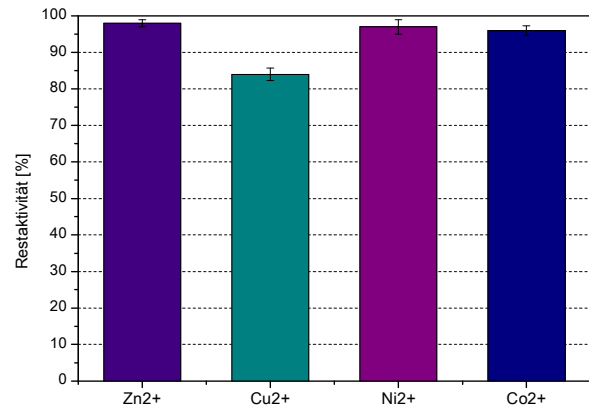


Abb. 27: Restaktivität der Cellulase Cel5A nach der Aufreinigung über die IDA-Membran in Abhängigkeit vom funktionalisiertem Metallion.

Die Enzymaktivität der Cellulase Cel5A lässt sich mit dem DNS-Test nach Ghose und Miller bestimmen. Eine ausführliche Versuchsdurchführung ist im Anhang unter Abschnitt 6.3.1.2 beschrieben. Die Enzymaktivität in den Elutionsfraktionen wurde bestimmt und diese in Bezug zur Ausgangsaktivität (26,3 U/mg) gesetzt. Die Restaktivitäten der Cellulase nach Elution von der unterschiedlich funktionalisierten IDA-Membran sind in Abb. 27 dargestellt. Mit Ausnahme von Cu²⁺ wird bei der Aufreinigung der Cellulase Cel5A über die IDA-Membran die Enzymaktivität nicht signifikant herabgesetzt. Nach Isolierung des Enzym über die Co²⁺, Ni²⁺ oder Zn²⁺-Membran werden Restaktivitäten um die 95 % erzielt. Dagegen besitzt die Cellulase nach einer Aufreinigung über die Cu²⁺-Membran eine Restaktivität von 84 %.

Doppelporöse IDA-Membran

Die doppelporöse IDA-Membran stellt eine Alternative zur klassischen IDA-Membran dar. Diese Membran ist gerade im Hinblick auf eine mögliche gesteigerte Bindungskapazität interessant für die Aufreinigung der Cellulase Cel5A. Die doppelporöse Membran zeigt bzgl. ihres Bindungs- und Elutionsverhaltens keine Unterschiede zur gepfropften Membranmodifikation auf (Daten nicht gezeigt). Entsprechend wird durch Funktionalisierung der Membran mit Zn²⁺-Ionen die beste Aufreinigung erzielt.

Zum Vergleich der beiden Membranmodifikationen hinsichtlich ihrer maximalen dynamischen Bindungskapazität wurden die IDA-Membranen der Vivapure 5,4 – Einheiten mit Zn²⁺ funktionalisiert. Anschließend erfolgte die Beladung der Membranen mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen bis zum vollständigen Durchbruch. Die an der jeweiligen Membran gebundene Cellulase-Menge ergibt sich aus der Differenz der Cel5A-Konzentration vor und nach der Beladung durch Zentrifugation, bezogen auf die Membranfläche von 5,4 cm². Durch

Auftragung der gebundenen Enzymmenge gegen die Enzymkonzentration wird die Adsorptionsisotherme der entsprechenden IDA-Membran erhalten. Diese sind für die gefropfte und doppelporöse IDA-Membran in Abb. 28 dargestellt.

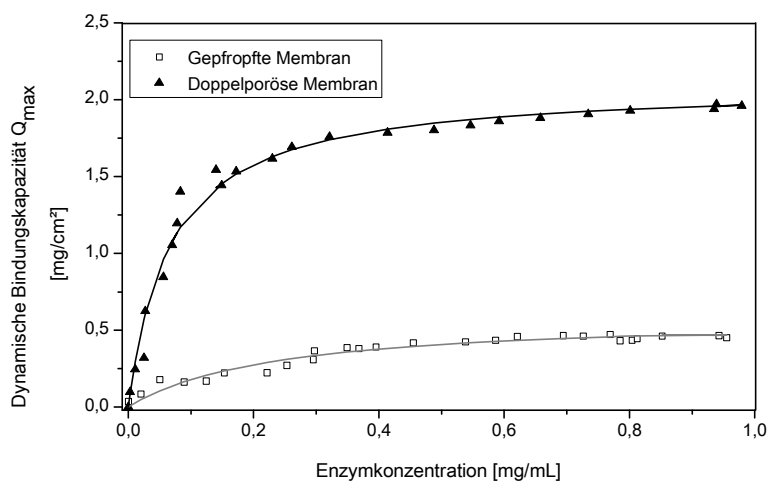


Abb. 28: Adsorptionsisotherme für die gefropfte und doppelporöse IDA-Membran.

Ein Vergleich der beiden Adsorptionsisothermen zeigt die erhöhte Bindungskapazität der doppelporösen IDA-Membran. Die dynamische Bindungskapazität der IDA-Membran wird durch die Einbringung der sekundären Porenstruktur um das 3,6-fache von $Q_{max} = 0,54 \text{ mg/cm}^2$ auf $Q_{max} = 1,97 \text{ mg/cm}^2$ erhöht. Unabhängig von der Membranmodifikation lag die Restaktivität der Cellulase Cel5A bei 98 %.

Tab. 5: Ergebnisse für die gefropfte und doppelporöse IDA-Membran im Vergleich.

	IDA-Membran gefropft	IDA-Membran doppelporös
Dynamische Bindungskapazität 100 %	0,54 mg/cm ²	1,97 mg/cm ²
Restaktivität	98 %	98 %
Wiederfindungsrate	99 %	96 %

Fazit

Zusammenfassend lassen die Screening-Ergebnisse den Schluss zu, dass eine Isolierung der Cellulase Cel5A über eine mit Zn^{2+} funktionalisierte Membran am erfolgreichsten ist. Unter den ermittelten Bindungs- und Elutionsbedingungen zeigt diese Membran die höchste Selektivität (vgl. Abb. 25). Bei einer Aufreinigung über die Co^{2+} -Membran wird eine ähnlich selektive

Anreicherung der Cellulase erreicht. Im Vergleich dazu weist die Zn^{2+} -Membran jedoch eine höhere Bindungskapazität auf (vgl. Abb. 26). Die doppelporöse IDA-Membran zeigte eine vergleichbar hohe Selektivität hinsichtlich der Isolierung des entsprechenden Zielenzym aus dem Zellysate über die mit Zn^{2+} funktionalisierte Membran. Unter Verwendung der doppelporösen IDA-Membran konnte die maximale Bindungskapazität um das 3,6-fache gesteigert werden.

4.2.2. Untersuchungen zur Membranintegrität

Die Cellulase Cel5A ist speziell im Hinblick auf einen enzymatischen Verdau der Membran ein interessantes Modellenzym. Die mikroporösen Membranen der Membranadsorber bestehen aus quervernetzter, vliesverstärkter regenerierter Cellulose. Bei der Isolierung der Cellulase Cel5A über diese Membranen besteht die Möglichkeit, dass die amorphen Celluloseregionen der Membran von diesem Enzym hydrolysiert werden. Hierdurch können Schäden in der Oberflächen- und Porenstruktur verursacht werden, was sich nachteilig auf die Bindungskapazität und die Lebensdauer der Membran auswirken kann. Aus diesem Grunde lag neben der Ermittlung der optimalen Aufreinigungsstrategie für die Isolierung des Enzyms aus dem Zellysate über die IDA-Membran ein weiteres Augenmerk auf die Membranintegrität nach der Aufreinigung.

Zur Untersuchung der Membranintegrität nach der Aufreinigung wurden Adsorbermembran mit Cellulase-Lösung behandelt und anschließend rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von den Membranen gemacht. Membran-Stanzlinge der gepfropften IDA-Membran wurden mit einem Durchmesser von 1 cm^2 aus einem Membran-Sheet ausgestanzt und mit je 1 mL der Enzymlösung (2 mg/mL in 50 mM NaAc-Puffer, pH 6, 200 U/mL) überschichtet. Die überschichteten Membranen wurden über unterschiedliche Zeiträume (0 h, 1 h, 6 h und 24 h) bei 70 °C inkubiert. Bei den hier gewählten Bedingungen (pH 6, 70 °C) besitzt die Cellulase Cel5A ihr Aktivitätsoptimum (vgl. Abb. 65). Nach der Inkubationszeit wurde die Membran zweimal mit dem NaAc-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Ethanol-Wassergemisch (70:30) getrocknet. Mit dem bloßen Auge waren auch nach einer Inkubationszeit von 24 h keine Beeinträchtigungen der Cellulase-Membran zu erkennen. Die mittlere Porengröße der makroporösen Adsorbermembranen beträgt 3 – 5 μm . Eine Schädigung dieser Porenstruktur kann mit unbewaffnetem Auge nicht festgestellt werden. Auch lichtmikroskopische Aufnahmen lassen keine eindeutigen Schlüsse zu. Der Einfluss der Cellulase auf die Porenstruktur der Membranen wurde daher mit Hilfe rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen analysiert. Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der

IDA-Membran vor und nach 24-stündiger Inkubation mit der Cellulase-Lösung ist in Abb. 29 gezeigt. Die REM-Aufnahmen in 2.500-facher Vergrößerung zeigen die poröse Struktur der gepfropften IDA-Membran. Eine Veränderung in der Porenstruktur auch nach einer Behandlung mit der Cellulase über 24 h kann nicht festgestellt werden. Weitere REM-Aufnahmen der IDA-Membranen vor der Inkubation in verschiedenen Vergrößerungen sind im Anhang (Abschnitt 6.4.1) dargestellt. Hier sind ebenso die REM-Aufnahmen der Membranen nach einer Inkubationszeit von 1 h und 6 h gezeigt.

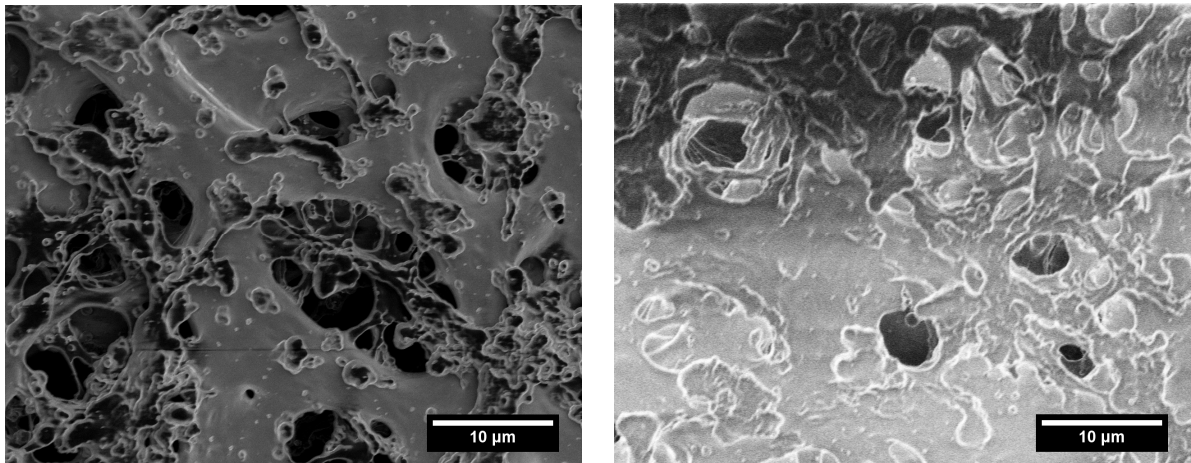


Abb. 29: REM-Aufnahme der IDA-Membran in 2500-facher Vergrößerung. Links: vor der Cellulase-Behandlung, rechts: nach 24 h Inkubation mit Cellulase Cel5A.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Porenstruktur der Adsorbermembran durch die Cellulase Cel5A nicht angegriffen wird. Auch nach einer Inkubationszeit von 24 h unter den Bedingungen bei der die Cellulase ihr Aktivitätsoptimum aufzeigt, ist kein Abbau der Membranstruktur durch die Cellulase zu beobachten. Die Cellulase Cel5A besitzt keine kohlenhydratbindende Domäne. Aus diesem Grunde ist sie nicht in der Lage unlösliche Cellulose abzubauen. Lediglich wasserlösliche Cellulosederivate, wie z.B. Carboxymethylcellulosen und β -Glucane können von dieser Cellulase abgebaut werden¹¹⁶. Dementsprechend zeigt sie keinen reaktiven Einfluss auf die Cellulose-Membran. Eine Aufreinigung dieser Cellulase Cel5A über Membranadsorber erfolgt daher ohne Auswirkungen auf die Membranintegrität.

Nachfolgend wurden Untersuchungen angestellt, ob Cellulasen, die eine kohlenhydratbindende Domäne aufweisen, in der Lage sind, die Cellulose-Membran abzubauen. Hierzu wurde die Adsorbermembran neben der Cellulase Cel5A vergleichend mit der Cellulase Cel5 behandelt. Diese Cellulase Cel5 wurde aus einer Metagenom-Datenbank basierend auf Bodenproben der

Azoren erhalten. Das Bakterium aus dem die Cellulase stammt, ist nicht bekannt¹¹⁶. Die Cellulasen Cel5 und Cel5A unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Im Gegensatz zur Cellulase Cel5A besitzt die Cellulase Cel5 eine kohlenhydratbindende Domäne und baut unlösliche Cellulose ab¹¹⁶. Zur Charakterisierung dieser Substratspezifität in Bezug auf die Cellulose-Membran wurden Stanzlinge der gepfropften IDA-Membran mit einem Durchmesser von 3 cm ausgestochen und diese mit den entsprechenden Cellulase-Lösungen behandelt. Die Membran-Stanzlinge wurden mit je 3 mL der entsprechenden Enzymlösung (100 U/mL in 50 mM NaAc, pH6) überschichtet und für 24 h bei 70 °C inkubiert (vgl. Abb. 30). Der Einfluss der Cellulasen auf die poröse Adsorbermembran wurde anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen untersucht.

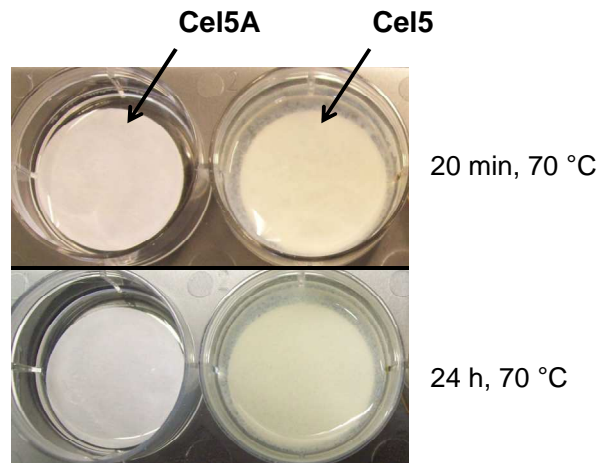


Abb. 30: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Reaktivität verschiedener Cellulasen auf die Cellulose-Membran.

Abb. 30 zeigt die mit den Cellulase-Lösungen überschichteten Membran-Stanzlinge. Bereits nach 20 min ist eine Trübung der Cel5-Lösung zu erkennen. Die Cellulase Cel5 löst schon nach kurzer Zeit kleine Faserpartikel von der Cellulose-Membran ab, die mit dem bloßen Auge zu beobachten sind. Die Enzymlösungen der Cellulase Cel5A über den Membranstanzlingen zeigt, wie in den Untersuchungen zuvor, keine Veränderung zur Ausgangslösung. Nach einer Inkubationszeit von 24 h ist eine noch stärkere Trübung der Cel5-Lösung zu sehen. Die Ablösung feiner Membranfasern durch die Cellulase Cel5 nach nur 20 min ließ vermuten, dass nach einer Inkubationszeit von 24 h die Membran möglicherweise vollständig von der Cellulase zersetzt worden ist. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden. Nach 24 h sind an dem Membran-Stanzling selbst keine optischen Veränderungen hinsichtlich der Membranstruktur zu erkennen. Beim Vergleich mit den anderen Stanzlingen lassen sich keine Unterschiede bzgl. Größe und Beschaffenheit der Membran beobachten.

Um Aussagen bzgl. der Auswirkungen auf die Porenstruktur der Membran treffen zu können, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt. In Abb. 31 sind die REM-Aufnahmen der IDA-Membran nach der 24-stündigen Behandlung mit der Cellulase Cel5A (links) und im Vergleich dazu nach Behandlung mit der aggressiveren Cellulase Cel5 (rechts) dargestellt.

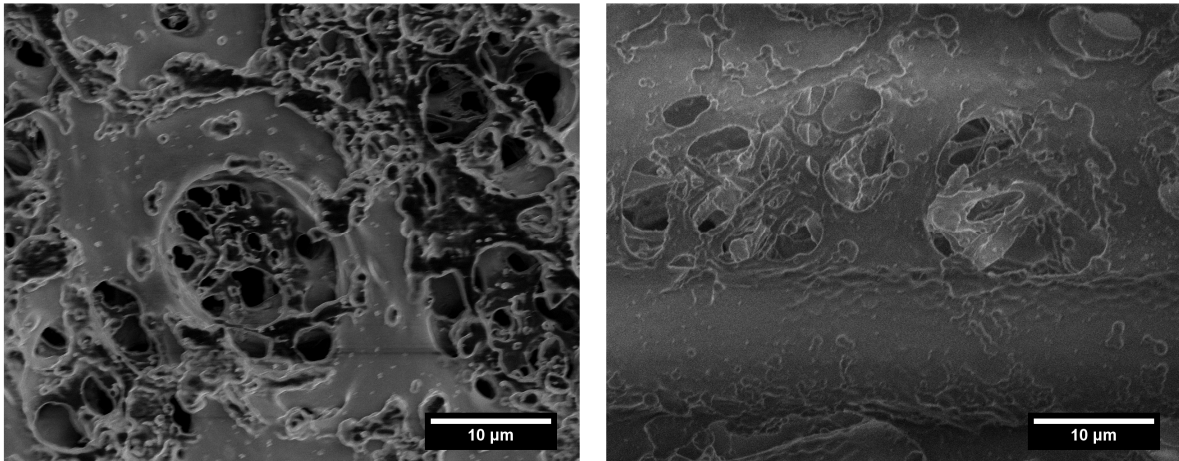


Abb. 31: REM-Aufnahmen der IDA-Membran nach der 24-stündigen Inkubation mit Cellulase-Lösung in 2500-facher Vergrößerung. Links: Cellulase Cel5A, rechts Cellulase Cel5.

Die linke REM-Aufnahme zeigt die intakten Poren der makroporösen Membran in 2.500-facher Vergrößerung. Wie in vorherigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, zeigt die Cellulase Cel5A keine Reaktivität gegenüber der Cellulose-Membran und die Porenstruktur bleibt unberührt. Nach der Behandlung der Adsorbermembran mit der Cellulase Cel5 sind die Membranporen nur noch in Umrissen zu erkennen. Es scheint so, als ob die erste Schicht der Poren abgetragen wurde, während tiefere Poren noch unversehrt geblieben sind.

Fazit

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass es möglich ist Cellulasen über Membranadsorber aufzureinigen, ohne die Porenstruktur mikroporöser Cellulose-Membran zu beschädigen. Besitzt die aufzureinigende Cellulase jedoch eine kohlenhydratbindende Domäne, zeigt sie eine erhöhte Reaktivität gegenüber unlöslicher Cellulose, so dass eine Beeinträchtigung der Membran nicht ausgeschlossen werden kann. Bei Behandlung der Adsorbermembran mit der Cellulase Cel5 lösten sich Cellulosefasern von der Membran ab. Dazu sollte angemerkt werden, dass Versuche in dieser Arbeit hinsichtlich der Membranintegrität unter den Bedingungen des pH- und Temperatur-Aktivitätsoptimums der Cellulase durchgeführt wurden. Industrielle Aufreinigungsprozesse hingegen werden im Allgemeinen bei RT durchgeführt. Gerade die

Enzymaktivität thermophiler Cellulasen ist unter diesen Bedingungen sehr niedrig, so dass wahrscheinlich kein Angriff der Cellulasen auf die Cellulose Membran zu beobachten sein wird.

4.2.3. Übertragung der Ergebnisse auf eine Membranfläche von 15 cm²

Nachdem sichergestellt wurde, dass die Cellulose-Membran bei Aufreinigung der Cellulase Cel5A nicht von dieser angegriffen wird, wurde die im Screening optimierten Aufreinigungsbedingungen auf das LP 15-Modul übertragen. Die Bindung der Cellulase an die Zn²⁺-Membran erfolgte dabei bei pH 6 mit 20 mM Imidazol. Die Elution der gebundenen Cellulase wurde mit Imidazolkonzentration ab 50 mM erzielt. Vor der Isolierung der Cellulase Cel5A aus dem Zellysate in diesem Maßstab wurden ausgehend von der Cellulase Cel5A-Standardlösung die dynamischen Bindungskapazitäten, sowie die Ausbeute und Restaktivität der Cellulase berechnet. Die Vorgehensweise war dabei die gleiche, wie zuvor bei der Bestimmung der Bindungskapazität für die S-Membran mit einer Penicillin G Amidase-Lösung (vgl. Abschnitt 4.1.2). Die maximale dynamische Bindungskapazität der IDA-Membran beträgt $Q_{\max} = 0,54 \text{ mg/cm}^2$. Für die dynamische Bindungskapazität 10 % wurde ein Wert von $Q_{10\%} = 0,11 \text{ mg/cm}^2$ berechnet. Die Werte für Q_{\max} und $Q_{10\%}$ sind im Vergleich zur Kapazität der S-Membran deutlich geringer. Die gepfropfte S-Membran besitzt eine fast doppelt so hohe maximale dynamische Bindungskapazität. Tab. 6 fasst die optimalen Aufreinigungsbedingungen für die Isolierung der Cellulase über die mit Zn²⁺ funktionalisierte IDA-Membran zusammen.

Tab. 6: Optimale Aufreinigungsbedingungen der Cellulase Cel5A über die IDA-Membran.

Membran/ Ligand	Bindungs- bedingung	Elutions- bedingung	Ausbeute [%]	Restaktivität [%]	Dyn. Bindungs- kapazität $Q_{10\%}$ [mg/cm ²]	Dyn. Bindungs- kapazität Q_{\max} [mg/cm ²]
gepfropft / IDA, Zn ²⁺	50 mM NaAc, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 6	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH 8	94	98	0,11	0,54

Nachdem alle wichtigen Aufreinigungsparameter zur Isolierung der Cellulase Cel5A bestimmt wurden, erfolgte als nächstes die Aufreinigung der Cellulase Cel5A aus dem Zellysate mit einer Membranfläche von 15 cm². Hierbei war es vor allem wichtig, die Elutionbedingungen aus dem Mikroliter-Maßstab anzupassen. Hierzu wurden die Membranen im LP 15-Modul zunächst durch Beladung mit 20 mL 0,5 M ZnSO₄-Lsg. funktionalisiert. Nach anschließender Equilibrierung der Membranen mit dem Bindungspuffer (50 mM NaAc, 500 mM NaCl, 20 mM

Imidazol, pH 6) erfolgte die Beladung mit 10 mL Zellysate bei einer Flussrate mit 1 mL/min. Das Zellysate wurde zuvor mit 20 mM Imidazol versetzt. Nach einem Waschschrift mit 10 mL Bindungspuffer (Flussrate: 2 mL/min) folgte die Elution der gebundenen Cellulase Cel5A über einen Imidazolgradienten bei pH 8 (50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, pH 8). Hierbei erwies sich eine Elution über einen linearen Gradienten von 20-200 mM Imidazol mit einem Elutionsvolumen von 10 mL als am besten. Das Chromatogramm der Aufreinigung ist in Abb. 32 dargestellt. Im Chromatogramm sind ausgewählte Fraktionsschnittgrenzen markiert. Diese Fraktionen wurden zur Visualisierung der Aufreinigungsperformance auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Das entsprechende silbergefärbte SDS-Gel ist in Abb. 33 zeigt.

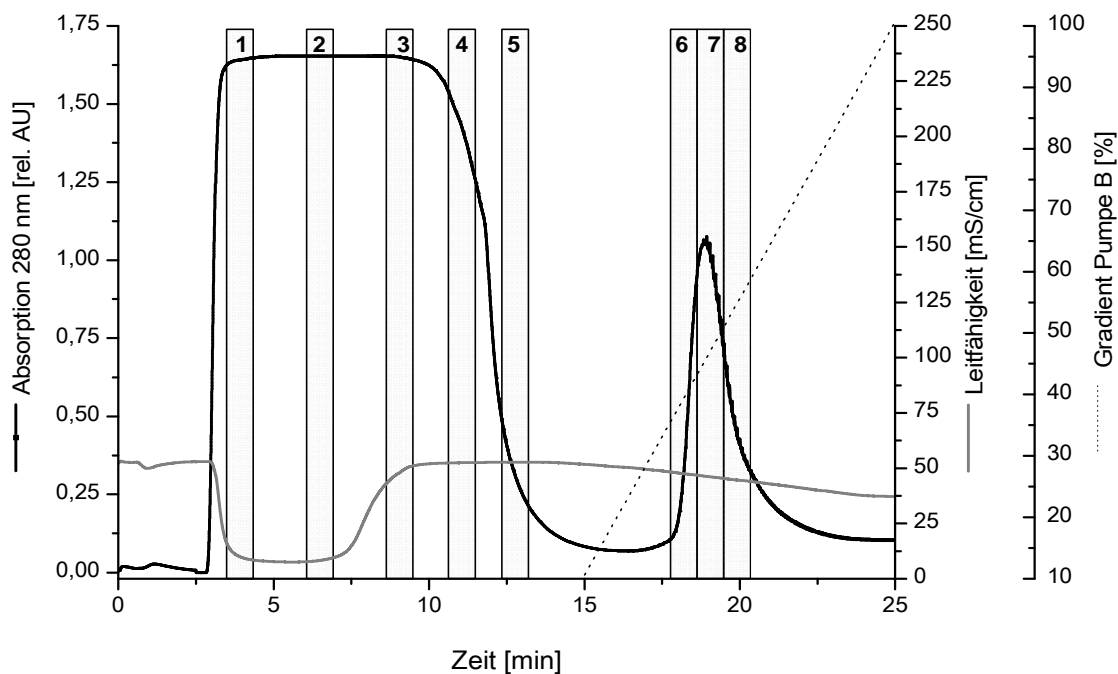


Abb. 32: Chromatogramm der Aufreinigung von Cellulase Cel5A über die mit Zn^{2+} funktionalisierte IDA-Membran im LP 15. Flussrate: 1 mL/min, Probe: 10 mL Zellysate, eingestellt auf pH 6+20 mM Imidazol. Das Auswaschen der restlichen Probe erfolgte mit 10 mL Bindungspuffer (Puffer A: 25 mM NaAc, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 6), die anschließende Elution wurde bei pH 8 (Puffer B: 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH 8) über einen linearen Imidazolgradienten (0 % Puffer B → 100 % Puffer B) mit einem Elutionsvolumen von 10 mL durchgeführt.

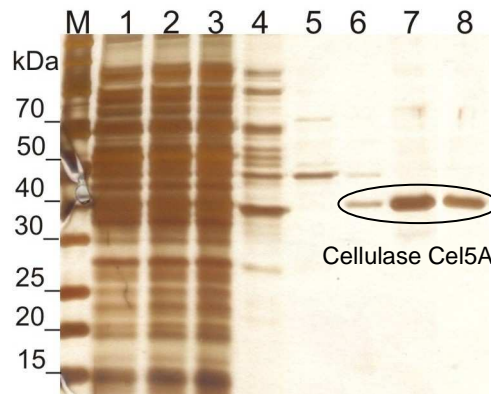


Abb. 33: SDS-PAGE der Chromatographie-Fractionen von der Aufreinigung der Cellulase Cel5A über die Zn^{2+} -IDA-Membran. Bahnen 1-3 Durchlaufractionen während der Membranbeladung mit Zellysate, Bahnen 4+5 Waschraktionen, Bahnen 7+8 Elutionsfractionen. (12%iges SDS-Gel nach Silberfärbung)

Die einzelnen Elutionsfractionen wurden auf eine Enzymaktivität hin untersucht und ausgehend von den Ergebnissen alle Fractionen, die eine Cellulase-Aktivität zeigten, vereinigt. Anschließend wurde der Proteingehalt mittels Bradford (s. Abschnitt 6.3.2.2) und die Enzymaktivität mit dem DNS-Test (s. Abschnitt 6.3.1.2) in der vereinigten Fraction bestimmt. Anhand der gewonnenen Daten war es möglich eine Bilanz der Aufreinigung aufstellen. Diese ist in Tab. 7 dargestellt. Die Cellulase Cel5A konnte mit einem Reinigungsfaktor von 4,3 über die Phenyl-Membran aus dem Zellysate isoliert werden.

Tab. 7: Bilanz der Aufreinigung von Cellulase Cel5A über die IDA-Membran.

Reinigungsschritt	Proteingehalt (mg/mL)	Volumenaktivität (U/mL)	spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungsfaktor
Zellysate	48,53	2.243,29	46,22	1
IDA-Membran	2,22	438,85	197,68	4,3

4.2.4. Zusammenfassung

Die Charakterisierung der IDA-Membran im Mikroliter-Maßstab zeigte, dass diese Membran zur Aufreinigung des Modellenzym Cellulase Cel5A geeignet ist. Hierbei kristallisierte sich heraus, dass eine Funktionalisierung der IDA-Membran mit Zn^{2+} -Ionen hinsichtlich der Selektivität und Bindungskapazität zur effizientesten Isolierung der Cellulase führt. Die doppelporöse Membran zeigte vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der optimalen Aufreinigungsbedingungen. Es konnte demonstriert werden, dass mit der IDA-Membran auf doppelporöser Membranbasis mit $Q_{max} = 1,97 \text{ mg/cm}^2$ eine 3,6-mal so hohe maximale dynamische Bindungskapazität erzielt wird,

als unter Verwendung der gefropften IDA-Membran ($Q_{\max} = 0,54 \text{ mg/cm}^2$). Obwohl die Membranadsorber aus Cellulose-Membranen bestehen ist es möglich eine Cellulase über diese Adsorber aufzureinigen. Da das Modellenzym keine kohlenhydratbindende Domäne besitzt, ist sie nicht in der Lage die unlösliche Cellulase-Membran abzubauen. Entsprechend werden keine Beeinträchtigungen der Porenstruktur nach einer Aufreinigung des Enzyms beobachtet. Somit konnte ein geeignetes Verfahren zur Isolierung der Cellulase Cel5A über Metallchelator-Membranadsorber entwickelt werden. Eine Übertragung der Aufreinigungsbedingungen vom Mikroliter-Maßstab in den Milliliter-Maßstab auf eine Membranfläche von 15 cm^2 war dabei problemlos möglich. Nach Adsorption des Zielenzyms aus dem Zellysate bei pH 6 mit 20 mM Imidazol, kann die gebundene Cellulase Cel5A über einen linearen Imidazolgradienten fast ohne andere Proteine mit einer Restaktivität von 98 % und einem Reinigungsfaktor von 4,3 von der Zn^{2+} -Membran isoliert werden.

4.3. Isolierung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand

Lipasen (E.C.3.1.1.3) gehören zur Enzymklasse der grenzflächenaktiven Serin-Hydrolasen, die die Carboxylesterbindung in langkettigen Triacylglyceriden hydrolytisch spalten. Im Gegensatz zu Esterasen, die kurzkettige Carbonsäuren (Kettenlänge < 12 C-Atome) als Substrate bevorzugen, zeigen Lipasen höchste Aktivitäten gegenüber Triacylglyceriden (Kettenlänge > 12 C-Atome) ¹¹⁷. Des Weiteren zeichnen sich Lipasen durch ihre hohe Stereo- und Regioselektivität aus. Aufgrund dieser Eigenschaften werden sie u.a. als Biokatalysatoren in der pharmakologischen Wirkstoffproduktion von Antitumorwirkstoffen Epothilon A und B eingesetzt. Ebenso finden Lipasen Anwendung in der Waschmittel-, Lebensmittel-, Kosmetik-, Papier- und Lederindustrie ^{118, 119}. Industrielle Prozesse vieler Anwendungsfelder erfordern hohe Temperaturen im Bereich von 70-90 °C. Die Modifikation und Synthese hochviskoser, langkettiger Fettsäureester oder die enzymatische Interesterifikation von Hartfetten sind nur einige Beispiele. Kommerzielle, mesophile Enzyme stoßen bei diesen hohen Prozessanforderungen an ihre Grenzen. Die hohen Temperaturen führen zu Aktivitätsverlusten und vermindern die Lebensdauer dieser Enzyme. Aus diesen Gründen wird gegenwärtig vermehrt nach Lipasen aus extremophilen Mikroorganismen gesucht, die ein Aktivitätsoptimum größer 60 °C besitzen. Diese Enzyme sind aufgrund ihrer Herkunft an raue Umweltbedingungen angepasst und daher diesen hohen Prozessanforderungen gewachsen. Die als Modellenzym für die Klasse der Hydrolasen ausgewählte Lipase aGTL aus *Geobacillus thermoleovorans* ist eine thermostabile Lipase, die in der Lage ist, hochviskose Fettsäureester umzusetzen. Heiße Ölbohrlöcher und heiße Quellen sind die Lebensräume der *Geobacillen*.

Entsprechend sind die thermostabilen Lipasen dieser Gattung alkaliphil und weisen Temperaturoptima zwischen 60 - 75 °C auf^{120,121}.

Die Lipase aGTL wird vom mesophilen Wirtsorganismus *S. carnosus* in den Kulturüberstand sekretiert. Aus diesem Grund eignet sich dieses Modellsystem zur direkten Aufreinigung des Zielenzym aus zellhaltiger Fermentationsbrühe. Im Hinblick auf eine effiziente Proteinaufreinigung wurde ein auf der Membranadsorbertechnologie basierendes Modul entwickelt, welches die Prozessschritte Zellabtrennung, Produktisolierung, Reinigung und Aufkonzentrierung kombiniert und auf diese Weise die direkte Proteinaufreinigung aus zellhaltiger Fermentationsbrühe in nur einem Schritt ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein derartiges partikelgängiges Adsorbermodul zur Isolierung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand charakterisiert. Ein Vorteil der Membranadsorber gegenüber Chromatographiesäulen ist, dass das Zielprodukt auch aus gering konzentrierten Lösungen erfolgreich isoliert werden kann und Aufkonzentrierungsschritte vor dem Einsatz der Membranadsorber wegfallen. Um dennoch aussagekräftige Untersuchungen zur direkten Isolierung der Lipase aGTL aus dem zellhaltigen Kulturüberstand machen zu können, war es zunächst das Ziel die sekretorische Lipase-Produktion im rekombinanten Produktionsstamm zu optimieren. Ebenso war es wichtig, eine effiziente Aufreinigungsstrategie hinsichtlich einer Aufreinigung der Lipase aGTL aus geklärtem Kulturüberstand zu finden, bevor eine Charakterisierung der Aufreinigung aus zellhaltigem Kulturüberstand erfolgte. Vor diesem Hintergrund wurden nach Optimierung der Lipase aGTL-Produktion zwei Membranfunktionalitäten auf ihre Eignung zur Aufreinigung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand charakterisiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammenfassend dargestellt.

4.3.1. Charakterisierung und Optimierung der Lipase aGTL-Produktion

Im Rahmen der Dissertation von Brundiek wurde nach geeigneten Sekretionssystemen zur Gewinnung thermostabiler Lipasen in Gram-positiven Wirtssystemen gesucht. Hierbei gelang es, die Expression der Lipase aGTL mit ihrem authentischen Signalpeptid in *Staphylococcus carnosus* TM300 (*S. carnosus*) zu etablieren¹²². Untersuchungen zur Proteingewinnung im Rahmen der Diplomarbeit von S. Özmen¹²³ zeigten, dass die Lipase aGTL hauptsächlich in den Kulturüberstand sekretiert wird. Jedoch verbleibt ein Drittel der Lipase in der Zelle (vgl. Abb. 34). Im Überstand (ÜS) beträgt die Enzymaktivität 2,52 U/mL, während im Gesamtzell-extrakt (GS) eine Enzymaktivität von 1,23 U/mL gemessen wird. Entsprechende Untersuchungen nach Klonierung des aGTL-Gens in den Produktionsstamm zeigten

vergleichbare Enzymaktivitäten im Kulturüberstand. Im Gegensatz dazu konnte im Gesamtzellextrakt jedoch nur eine Aktivität von 0,3 U/mL nachgewiesen werden ¹²².

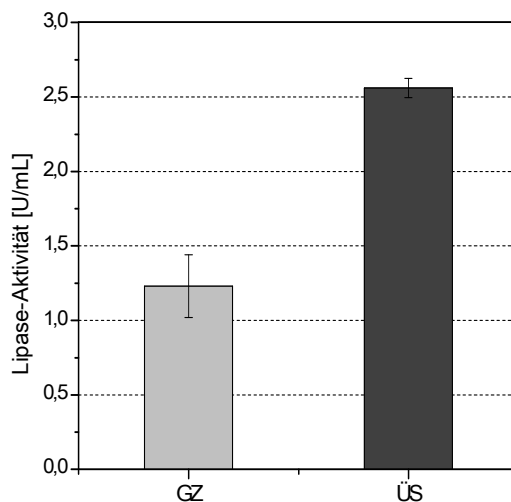


Abb. 34: Enzymaktivität der Lipase aGTL im Kulturüberstand (ÜS) und Gesamtzellextrakt (GS) nach der Produktion in *S. carnosus*.

Um das Enzym in ausreichender Qualität und relevanten Mengen produzieren zu können, ist es notwendig die Lipase aGTL-Produktion näher zu charakterisieren und zu optimieren. Im Rahmen der Diplomarbeit von S. Özmen wurde der Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf die Enzymausbeute und -aktivität untersucht ¹²³. Hinsichtlich der Kultivierung im Schüttelkolben gibt es eine Reihe von Faktoren, die die rekombinante Proteinproduktion in Mikroorganismen beeinflussen. Eine Optimierung und Charakterisierung der Lipase-Produktion beinhaltet nicht nur die Auswahl der Inhaltsstoffe des Kulturmediums, sondern auch die Kultivierungstemperatur, die Schüttelgeschwindigkeit und die Konzentration des Induktors. Diese Parameter bestimmen in der Summe die Produktausbeute und -aktivität. Zur Optimierung der Enzymausbeute wurde die Kultivierung des *S. carnosus* im Schüttelkolben durchgeführt und nacheinander bestimmte Kulturparameter variiert (vgl. Tab. 8).

Tab. 8: Kultivierungsparameter der Kultivierung von *S. carnosus* zur Optimierung der Produktivität.

	Variablen
Kulturmedium	LB-Medium, BHIS-Medium, CgXII-Medium
Kultivierungstemperatur	30 °C, 37 °C, 40 °C
Schüttelgeschwindigkeit	130 rpm, 150 rpm, 170 rpm
Xylose-Konzentration	0,00 %, 0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, 1,00 %, 1,25 %
Kultivierungsdauer	9 - 48 h

Im Folgenden soll der Einfluss der einzelnen Kulturparameter auf die Produktion der Lipase aGTL näher betrachtet werden.

Kultivierung in verschiedenen Kulturmedien

Produktionsstämme werden in verschiedenen Nährmedien gezüchtet. Nährmedien weisen unterschiedliche Inhaltsstoffe auf, die sich positiv auf das Wachstum bestimmter Organismen auswirken. Das LB-Medium ist ein komplexes Nährmedium welches u.a. Hefeextrakt enthält. Dies dient als Stickstoff- und Vitaminquelle für die Zellen und führt oftmals zu höheren Wachstumsraten und gesteigerten Produktivitäten. CgXII ist ein synthetisches Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Dagegen dient Sorbitol im BHIS-Medium als Kohlenstoffquelle. Der Einfluss des Nährmediums auf das Zellwachstum von *S. carnosus* und die Lipase aGTL-Ausbeute wurde durch Kultivierung des Produktionsstammes im Schüttelkolben untersucht. Hierbei wurden das LB-Medium, BHIS-Medium und CgXII-Medium verwendet. Die Kultivierungen wurden mit je 100 mL Kulturmedium bei 37 °C mit jeweils 15 µg/mL Chloramphenicol durchgeführt. Die weiteren Kultivierungsbedingungen wurden analog zu den in Abschnitt 6.1.3 beschriebenen Durchführungen eingestellt. Das Zellwachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Zur Bestimmung der Enzymaktivität und der Gesamtproteinkonzentration erfolgte eine stündliche Probenahme. Die Enzymaktivität der Lipase aGTL wurde durch Umsetzung von *p*-Nitrophenyl-Palmitat (*p*-NPP-Test) bestimmt (s. Abschnitt 6.3.1.3) und die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode ermittelt (vgl. Abschnitt 6.3.2.2). Abb. 35 zeigt den Einfluss des Kulturmediums auf das Zellwachstum und die Lipase aGTL-Produktion, welche anhand der Enzymaktivität beurteilt werden kann.

Diese Kultivierungen veranschaulichen, dass die Wahl des Kulturmediums essentiell für die Enzymproduktion ist. Bei der Kultivierung des *S. carnosus* im CgXII-Medium wird kein signifikantes Zellwachstum beobachtet. Nach einer Kultivierungszeit von 8,5 h wird lediglich eine $OD_{600} = 1,9$ rel. AU erzielt. Die Tatsache, dass auch nach Induktion der Enzymexpression kein Anstieg der Enzymaktivität im Kulturmedium erfolgt, zeigt, dass im CgXII-Medium keine Produktbildung erfolgt. Bei der Kultivierung des *S. carnosus* im LB- oder BHIS-Medium lässt sich ein ganz anderes Wachstumsverhalten erkennen. Nach Induktion der Enzymexpression wird bei beiden Kulturen ein Übergang von der Lag-Phase in die exponentielle Wachstumsphase deutlich, wobei beide Kultivierungen ein ähnliches Wachstumsverhalten aufzeigen. Ein unterschiedlicher Einfluss des Nährmediums zeigt sich bei diesen beiden Kultivierung anhand der Enzymaktivität. Obwohl mit dem BHIS-Medium ein minimal besseres Zellwachstum erzielt wird, kann im LB-Medium eine gesteigerte Enzymproduktion festgestellt werden. Hier ist die Produktivität bei einer finalen Enzymaktivität von 2,52 U/mL bedeutend höher als die

Lipase aGTL-Ausbeute im BHIS-Medium (1,54 U/mL). Ebenso ist die Gesamtproteinkonzentration im Kulturüberstand des LB-Mediums doppelt so groß wie im BHIS-Medium. Ausgehend von diesem Ergebnis wurden die nachfolgenden Kultivierungen im LB-Medium durchgeführt.

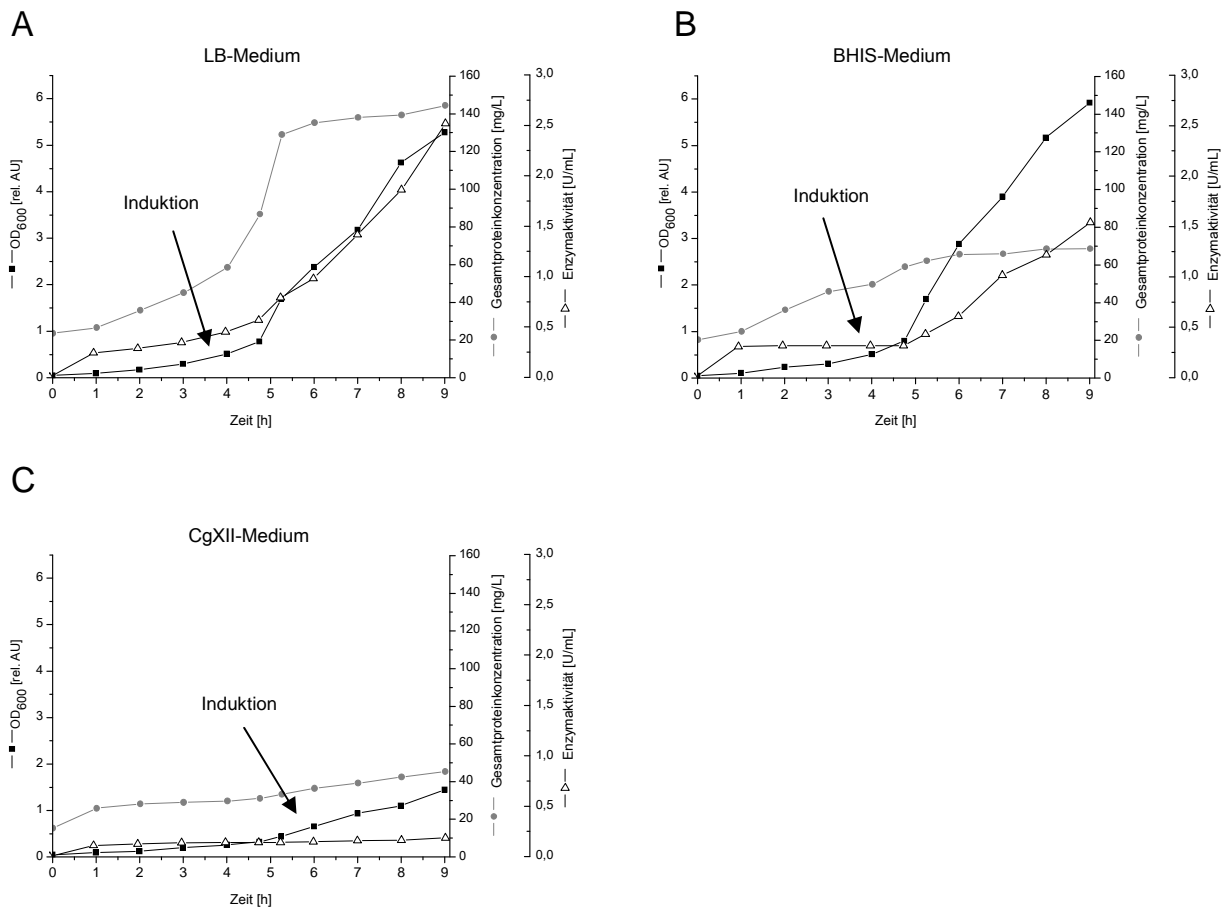


Abb. 35: Einfluss des Kulturmediums auf das Wachstum und die Produktivität des *S. carnosus*.

Einfluss der Kultivierungstemperatur

Eine weitere wichtige Prozessvariable ist die Kultivierungstemperatur. Sowohl das Wachstum als auch die Stoffwechsellistung des Produktionsorganismus hängen von der Temperatur ab. Mit steigender Kultivierungstemperatur nimmt die Wachstumsrate zu, bis sie schließlich in ein Temperaturoptimum mündet. In den folgenden Kultivierungen sollte das Temperaturoptimum für die Lipase aGTL-Produktion im *S. carnosus* ermittelt werden. Hierzu wurden Kultivierungen im Schüttelkolben mit 100 mL LB-Medium bei drei verschiedenen Temperaturen (30 °C, 37 °C und 40 °C) durchgeführt. Alle weiteren Kultivierungsbedingungen sind unter Abschnitt 6.1.3 beschrieben. Die Abhängigkeit des Zellwachstums und der Produktbildung von der

Kultivierungstemperatur sind in Abb. 36 gezeigt. Hier wird deutlich, dass das Zellwachstum und die Produktbildung unterschiedlich von der Temperatur beeinflusst werden. Während die Wachstumsrate bei 40 °C mit einer $OD_{600} = 5,81$ rel. AU am Ende der Kultivierung am höchsten ist, erweist sich keine Kultivierungstemperatur von 37 °C hinsichtlich der Gesamtproteinmenge und Lipase-Aktivität am besten. Die Enzymaktivität beträgt hier am Ende der Kultivierung 2,52 U/mL. Bei 40 °C wird eine finale Aktivität von 1,37 U/mL erzielt. Bei höheren Temperaturen kann es zur Bildung sogenannter Inclusion Bodies kommen, ein unlösliches Produktaggregat in den Zellen. Hierdurch wird der Anteil an löslichem Protein vermindert, so dass im Kulturüberstand eine geringere Produktaktivität nachgewiesen wird. Bei erhöhten Kultivierungstemperaturen könnte auch die Lipase-Produktion inhibiert worden sein ¹²⁴.

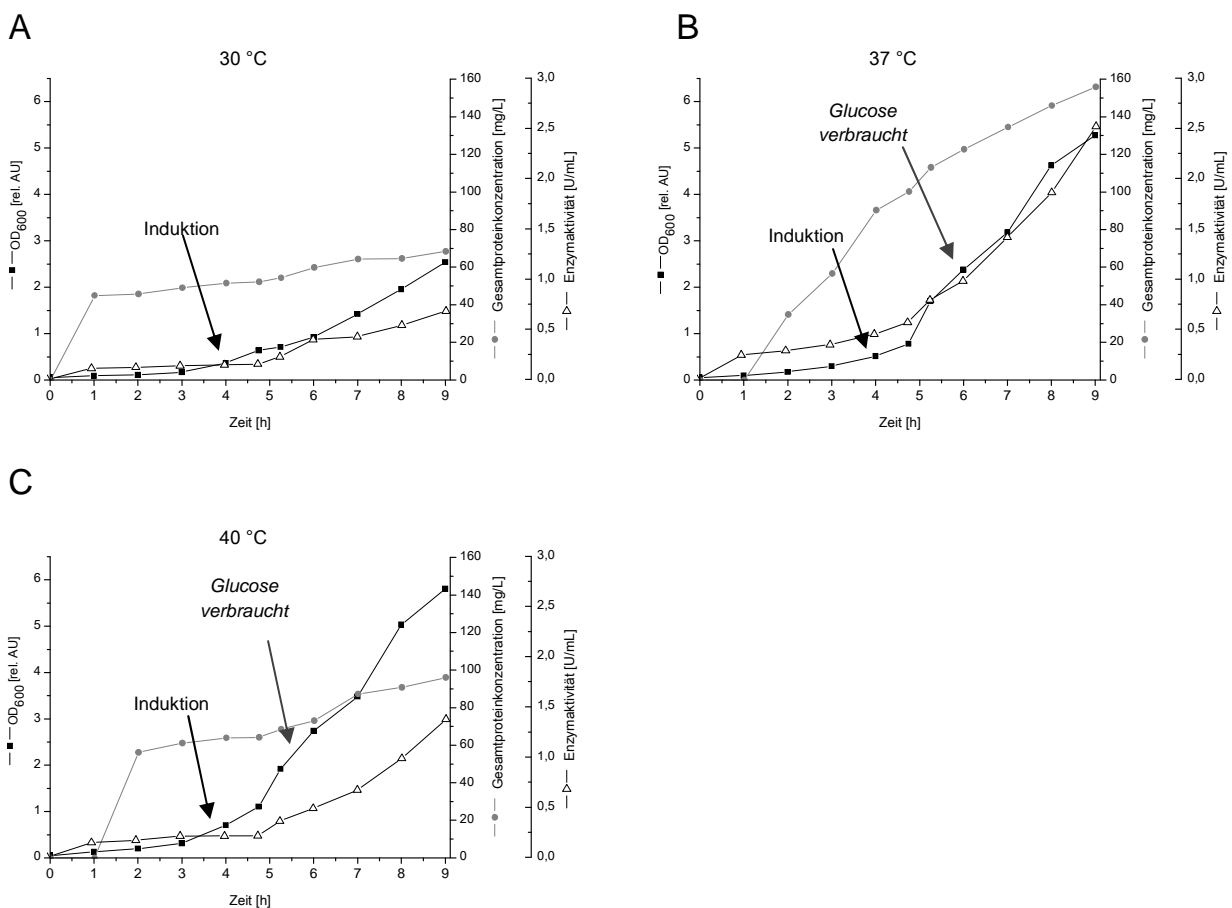


Abb. 36: Kultivierung von *S. carnosus* im LB-Medium bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen.

Bei genauer Betrachtung der Wachstumskurven bei 37 °C und 40 °C lassen sich zwei getrennte exponentielle Wachstumsphasen erkennen. *S. carnosus* zeigt im LB-Medium, welches sowohl Glucose als auch Lactose enthält, ein diaxisches Wachstumsverhalten. Nach ca. 6 h ist die Glucose im Medium verbraucht und es tritt eine Wachstumsverzögerung ein (vgl. Abb. 36).

Nach kurzer Zeit geht das Wachstum unter Lactoseverbrauch weiter, worauf ein gesteigertes Wachstum folgt. Die Lactoseverwertung führt zu einer gesteigerten Produktivität. Zeitgleich mit dem Anstieg der zweiten exponentiellen Phase nimmt die Enzymaktivität im Kulturüberstand zu. Dies ist gerade bei einer Kultivierungstemperatur von 40 °C deutlich zu beobachten (vgl. Abb. 36, Diagramm C). Möglicherweise wird die Lipase-Expression von der Glucose gehemmt, so dass erst in Abwesenheit von Glucose eine Lipaseproduktion erfolgen kann.

Dementsprechend dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Optimierungsschritte ausgehend von einer Kultivierung des *S. carnosus* im LB-Medium bei 37 °C durchgeführt.

Variation der Schüttelgeschwindigkeit

Ein wichtiges Kriterium bei einer Kultivierung ist die Sauerstoffversorgung der Zellen. Um eine Sauerstoffversorgung während der Kultivierung zu gewährleisten, werden Kulturen im Schüttelkolben kontinuierlich geschüttelt. In Fermentern erfolgt die Sauerstoffzufuhr durch Rühren der Fermentationskulturen. Im Allgemeinen wird durch Zunahme der Schüttelgeschwindigkeit die Sauerstoffversorgung im Kultivierungsgefäß verbessert, wodurch Wachstumsrate, Produktausbeute und -aktivität gesteigert werden können. Der Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit auf die Lipase aGTL-Produktion wurde durch Kultivierungen des Produktionsstammes bei unterschiedlichen Schüttelgeschwindigkeiten charakterisiert. Die Kultivierungen wurden entsprechend der im Abschnitt 6.1.3 beschriebenen Durchführung umgesetzt, wobei Schüttelgeschwindigkeiten von 130 rpm, 150 rpm und 170 rpm eingestellt wurden. Die Kultivierungsdaten der drei Kultivierungen bei unterschiedlicher Schüttelgeschwindigkeit sind in den Diagrammen der Abb. 37 zusammengefasst.

Wie vermutet wurde, nimmt mit steigender Schüttelgeschwindigkeit die Wachstumsrate zu. Allerdings wird dies erst während des Zellwachstums in der exponentiellen Phase deutlich. Ebenso wird durch erhöhte Schüttelgeschwindigkeit die Gesamtproteinkonzentration im Medium gesteigert. Im Gegensatz dazu wirkt sich eine steigende Schüttelgeschwindigkeit negativ auf die Produktbildung aus. Die produzierte Lipase-Menge nimmt mit steigender Schüttelgeschwindigkeit deutlich ab. Während bei 130 rpm eine Aktivität von 2,42 U/mL erreicht wird, liegt die Enzymaktivität nach der Kultivierung mit 150 rpm bei 1,81 U/mL und bei einer Kultivierung bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 170 rpm lediglich bei 1,56 U/mL.

Durch eine hohe Schüttelgeschwindigkeit wird die Sauerstoffzufuhr verbessert. Dies führt zu steigenden Wachstumsraten, was sich hier am Beispiel des *S. carnosus* zeigt. Allerdings führt eine steigende Schüttelgeschwindigkeit gleichzeitig zu erhöhtem Scherstress und entstehenden Oberflächenkräften an der Gas/Flüssigkeit Grenzfläche^{124, 125}. Diese bewirken eine Enzym-inaktivierung, die schließlich zur Abnahme der Lipase aGTL-Aktivität im Kulturüberstand

führen. Um solche Inaktivierungen zu vermeiden, ist es sehr wichtig vor einer Enzymproduktion durch Mikroorganismen die geeignete Schüttel- bzw. Rührgeschwindigkeit für die Fermentation zu ermitteln. Für die Kultivierung des *S. carnosus* im Schüttelkolben führt eine Schüttelgeschwindigkeit von 130 rpm zur effektivsten Lipase aGTL-Produktion.

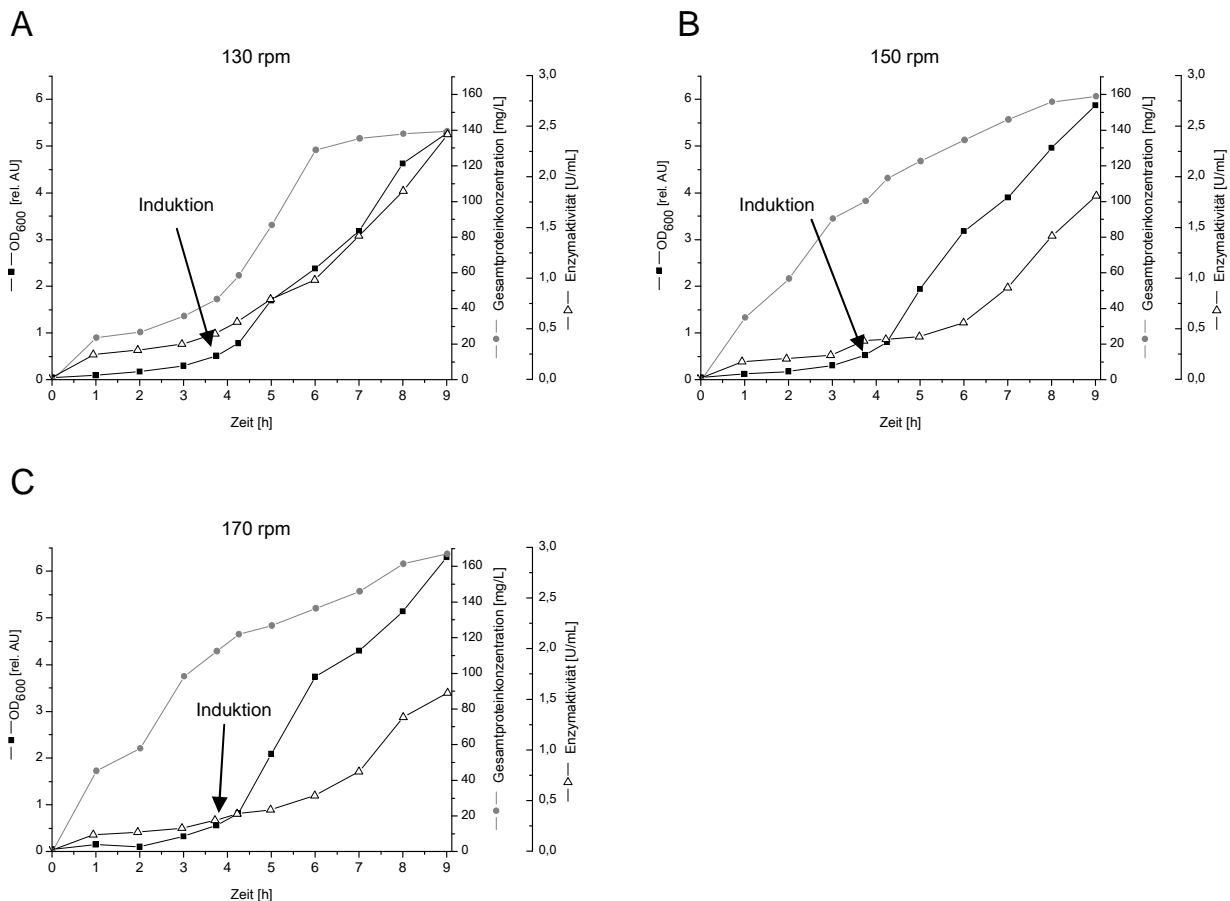


Abb. 37: Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit auf das Wachstum von *S. carnosus* und die Lipase-Produktivität.

Einfluss der Xylose-Konzentration auf das Zellwachstum und die Lipase aGTL-Produktion

Die Expression der Lipase aGTL in *S. carnosus* erfolgt unter Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promoters. Durch Zugabe von Xylose nach Erreichen einer OD₆₀₀ = 0,6 rel. AU wird der Promotor induziert und die Lipase aGTL-Expression ermöglicht¹²². Hierbei ist es wichtig nicht zu viel Xylose zuzugeben. Eine zu hohe Induktorkonzentration wirkt sich häufig wachstumshemmend auf die Zellen aus. Deswegen wurde im Folgenden der Einfluss der Xylose-Konzentration auf die Produktbildung untersucht. Der Produktionsstamm *S. carnosus* wurde unter den zuvor ermittelten optimalen Kultivierungsbedingungen (LB-Medium, 37 °C, 130 rpm) kultiviert und die Lipase aGTL-Produktion bei einer OD₆₀₀ = 0,6 rel. AU durch Zugabe

unterschiedliche Xylose-Konzentrationen (vgl. Tab. 8) induziert. Die genaue Kultivierungsdurchführung ist in Abschnitt 6.1.3 beschrieben. Durch Zugabe des Induktors wird das Zellwachstum des *S. carnosus* verlangsamt (Daten nicht gezeigt).

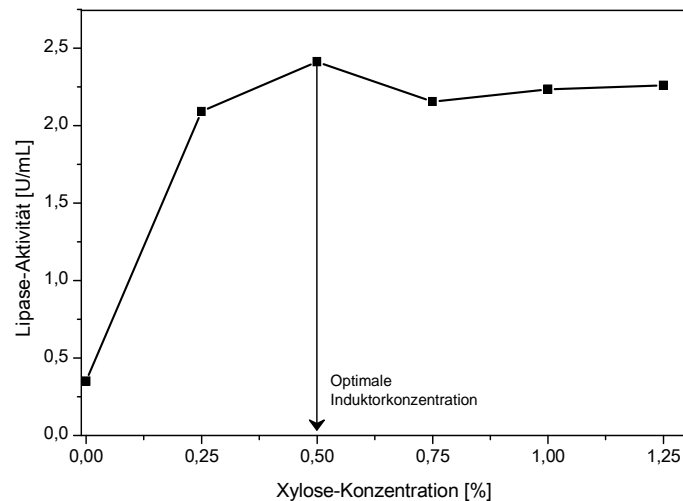


Abb. 38: Abhängigkeit der Lipase-Aktivität von der Induktorkonzentration.

Der Induktor regt die Zellen zur Enzymproduktion an, wodurch das Wachstum eingeschränkt wird. Mit steigender Xylose-Konzentration werden mehr Zellen zur Produktbildung angeregt, so dass die Wachstumsrate mit zunehmender Induktor-Konzentration sinkt. Diese Beobachtungen deuten auf einen wachstumshemmenden Einfluss der Xylose hin. Die Lipase aGTL-Produktion nimmt zunächst mit steigender Xylose-Konzentration zu, während bei Induktionen mit Konzentrationen $> 0,5\%$ Xylose eine Abnahme der Produktbildung zu erkennen ist. Dennoch ist der Unterschied hinsichtlich der erhaltenen Lipase-Aktivitäten gering. Die Abhängigkeit der Lipase aGTL-Aktivität von der Xylose-Konzentration ist in Abb. 38 dargestellt. Bei Induktion der Genexpression mit $0,5\%$ Xylose wird die höchste Lipase aGTL-Aktivität ($2,41\text{ U/mL}$) und somit die beste Lipase-Produktion erzielt.

Kultivierungsdauer

Durch Variation bestimmter Kulturparameter in den vorangegangenen Kultivierungen wurde ihr Einfluss auf die Lipase aGTL-Produktion in *S. carnosus* charakterisiert und auf diese Weise die Enzymproduktion optimiert. Alle für diese Untersuchungen durchgeführten Kultivierungen wurden nach einer Kultivierungsdauer von 9 h beendet. Die Wachstumskurven in Abb. 35 - Abb. 37 zeigen, dass sich das Zellwachstum zu diesem Zeitpunkt noch in der exponentiellen Phase befindet. Durch längere Kultivierungszeiten werden vermutlich noch höhere Zelldichten und

bessere Produktausbeuten erzielt. Nach 9-stündiger Kultivierungszeit liegen die erzielten Enzymaktivitäten im Kulturüberstand bei ca. 2,5 U/mL. Diese Enzymproduktivität ist gerade im Hinblick auf eine industrielle Anwendung der Lipase aGTL zu gering. Zur Verbesserung der Produktausbeute wurde bei der nachfolgenden Kultivierung die Kultivierungszeit von 9 h auf 57 h ausgedehnt. Hierdurch sollten Erkenntnisse über die notwendige Kultivierungsdauer gewonnen werden. Die Durchführung der Kultivierung ist Abschnitt 6.1.3 zu entnehmen, wobei die Kultivierungszeit 57 h betrug. Abb. 39 zeigt die Wachstumskurve dieser Kultivierung. Ebenso sind in diesem Diagramm der Verlauf der Gesamtproteinkonzentration und der Enzymaktivität über den gesamten Kultivierungszeitraum dargestellt.

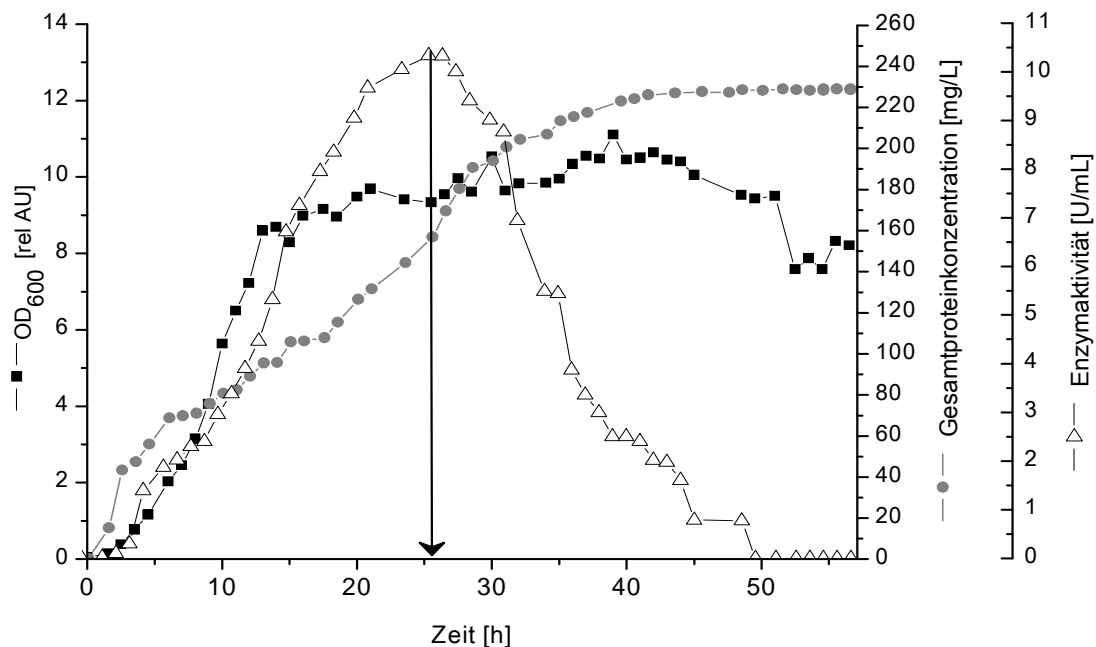


Abb. 39: Kultivierung von *S. carnosus* im Schüttelkolben über eine Kultivierungszeit von 57 h.

Das Diagramm veranschaulicht sehr deutlich, dass man sich nach einer Kultivierungsdauer von 9 h am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase befindet. Erst nach 16 h wird die stationäre Phase bei einer $OD_{600} = 9$ rel. AU erreicht. Die maximale Zelldichte wird nach einer Kultivierungsdauer von 30 h erzielt ($OD_{600} = 10,5$ rel. AU). Auch in der stationären Phase nimmt die Gesamtproteinkonzentration weiter zu. Diese mündet nach 45-stündiger Kultivierung schließlich in eine Sättigung, wobei die Gesamtproteinkonzentration zu diesem Zeitpunkt ebenso wie am Ende der Kultivierung $229 \mu\text{g/mL}$ beträgt. Während die Gesamtproteinkonzentration in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit über einen Kultivierungszeitraum von 57 h durch eine Sättigungskurve beschrieben werden kann, zeigt die Enzymaktivität ein Optimum auf. Die maximale Lipase aGTL-Aktivität ($10,34 \text{ U/mL}$) wird nach einer

Kultivierungszeit von 27 h (siehe Pfeil in Abb. 39) erreicht. Bei weiterer Kultivierung nimmt die Lipase-Aktivität im Überstand wieder ab.

Fazit

Durch unterschiedliche Kultivierungen von *S. carnosus* im Schüttelkolben bei Variation verschiedener Kultivierungsparameter konnte die Lipase aGTL-Produktion erfolgreich optimiert werden. Es wurde deutlich, dass sowohl das Nährmedium aber auch die richtige Kultivierungstemperatur und Schüttelgeschwindigkeit für eine optimale Produktivität wichtig sind. Durch Ausdehnung der Kultivierungszeit von 9 h auf 27 h konnte die Lipase aGTL-Produktion schließlich um das Vierfache von 2,52 U/mL auf 10,43 U/mL gesteigert werden. In Tab. 9 sind die optimalen Kultivierungsparameter noch einmal zusammengefasst.

Tab. 9: Zusammenfassung der optimalen Kultivierungsbedingungen.

	Optimale Kultivierungsbedingung
Kulturmedium	LB-Medium
Kultivierungstemperatur	37 °C
Schüttelgeschwindigkeit	130 rpm
Xylose-Konzentration	0,50 %
Kultivierungsdauer	26 h

Die produzierten Enzymmengen sind für eine industrielle Enzymproduktion allerdings noch zu gering. Hierzu wäre es notwendig die für die Schüttelkolben-Kultivierungen angepassten Kultivierungsbedingungen auf eine Reaktorkultivierung im Technikumsmaßstab zu übertragen und dann zu optimieren.

4.3.2. Aufreinigung der Lipase aGTL über Hydrophobe Interaktionschromatographie

Lipasen sind hydrophobe Enzyme. Diese Eigenschaft kann man sich bei ihrer Aufreinigung über Hydrophoben Interaktionschromatographie zu Nutze machen. Das einzige Membranadsorber-Modul für die Hydrophobe Interaktionschromatographie der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen basiert auf Adsorbermembranen, die Phenyl-Liganden auf ihren inneren Porenoberflächen tragen. Die Phenyl-Membran wurde im Folgenden zur Aufreinigung der Lipase aGTL getestet.

4.3.2.1. Screening der Bindungs- und Elutionsbedingungen

In einem Hochdurchsatz-Screening im Mikroliter-Maßstab wurde die Selektivität der Phenyl-Membran untersucht. Vivawell-8-strips mit Phenyl-Membranen sind nicht kommerziell erhältlich. Aus diesem Grund wurde das Screening mit den Zentrifugen-Einheiten Vivapure 5,4-Einheiten durchgeführt. Die Adsorption erfolgt bei der Hydrophoben Interaktionschromatographie in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Bei hohen Salzkonzentrationen wird die Hydrathülle, die die hydrophoben Gruppen auf der Proteinoberfläche umgibt, zerstört und die hydrophoben Gruppen können ungehindert mit der stationären Phase wechselwirken. Entsprechend der Hofmeister Serie wird im Allgemeinen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als Salzkomponente zur Adsorption eingesetzt. Zur Bestimmung der optimalen Bindungsbedingungen für die Adsorption der Lipase aGTL an die Membran wurde das Enzym aus dem Überstand in Gegenwart unterschiedlicher $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen (0-1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) an die Phenyl-Membran gebunden. Hierzu wurde die Membran zunächst mit je 0,5 mL Bindungspuffer (50 mM KPP, pH 7) equilibriert. Anschließend erfolgte die Enzymadsorption durch Beladung der Membran mit zweimal je 0,5 mL Kulturüberstand (pH 7,2), der mit unterschiedlichen Konzentrationen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt wurde. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 6.2.1 beschrieben. Die Selektivität der Isolierung wurde über SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung nachgewiesen.

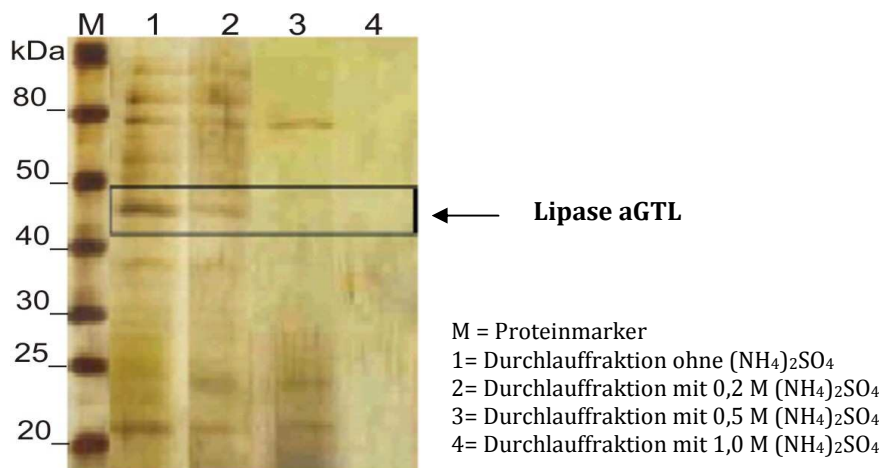


Abb. 40: SDS-PAGE-Gel der Durchlauffractionen nach Beladung der Phenyl-Membran mit dem Kulturüberstand. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

In Abb. 40 sind exemplarisch einige Durchlauffractionen dargestellt, wobei der Einfluss der Salzkonzentration auf die Lipase aGTL Adsorption erkennbar ist.

Wird die Membran mit dem direkten Überstand, also ohne Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, beladen, erfolgt keine Enzymadsorption. Die 46 kDa große Lipase aGTL ist in der Durchlauffraktion

nachweisbar (vgl. Abb. 40, Bande 1). Mit steigender $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration wird die Lipase effizienter an die Membran gebunden. Dabei kommt es mit zunehmender Ionenstärke im Überstand aber vermehrt zu unspezifischen Bindungen weiterer Proteine an die Membran. In Gegenwart 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erfolgt schließlich eine vollständige Bindung aller Proteine aus dem Kulturüberstand (vgl. Abb. 40, Bande 4).

Da hohe Salzkonzentrationen die Adsorption von Proteinen an die hydrophobe Membran fördern, wird ihre Elution im Allgemeinen durch reduzierte Salzkonzentration bewirkt. Die in diesem Screening gebundene Lipase aGTL wurde über einen abfallenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten (0,75 M, 0,5 M, 0,3 M, 0,2 M, 0,1 M und 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) hervorgerufen. Dabei erfolgte die 1. Elution immer mit der nächst niedrigeren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration in Bezug auf die erfolgte Adsorption.

Anhand der Elutionsfraktionen konnte gezeigt werden, dass eine Beladung der Phenyl-Membran mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen von 0,2 M und geringer im Kulturüberstand zu keiner Adsorption der Lipase aGTL führt. In den entsprechenden Elutionsfraktionen war anhand des SDS-PAGE-Gels keine Lipase aGTL nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die Ionenstärke im Kulturüberstand ist scheinbar zu gering, um die ausgebildete Hydrathülle aufzubrechen. Daher kann keine Wechselwirkung mit den hydrophoben Phenyl-Gruppen erfolgen. Wird die Lipase dagegen in Gegenwart höherer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen an die Membran gebunden, erfolgt eine Adsorption. Über einen absteigenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten ist es möglich die Lipase aGTL separat von anderen Proteinen zu eluieren. Abb. 41 zeigt ausgewählte Elutionsfraktionen auf einem SDS-PAGE-Gel nach Adsorption der Lipase aGTL mit 1,0 M und 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Kulturüberstand.

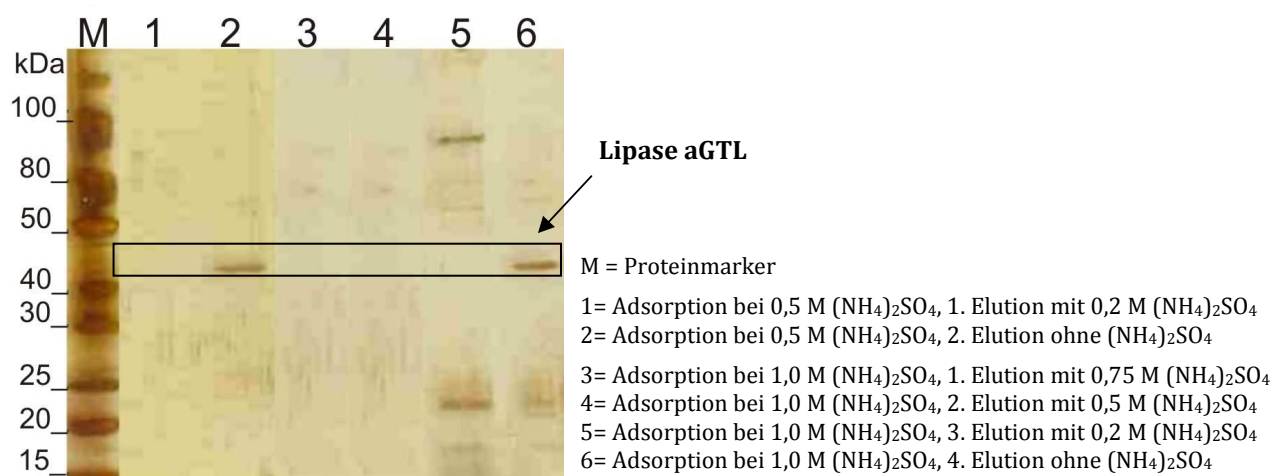


Abb. 41: SDS-PAGE-Gel der Elutionsfraktionen nach Beladung der Phenyl-Membran mit unterschiedlichen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen im Kulturüberstand. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Durch Adsorption mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kann sichergestellt werden, dass eine spezifische Enzymbindung an die Membran erfolgt. Alle weiteren Proteine binden unter diesen Bedingungen nicht an die Membran, sondern bleiben im Überstand zurück. Entsprechend dieser Tatsache wird bei einer ersten Elution mit 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ keine Desorption bewirkt (Abb. 41, Bande 1). Erfolgt die Elution aber ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Elutionspuffer, so wird die Lipase fast ohne weitere Proteine von der Phenyl-Membran desorbiert (Bande 2). Bei einer Enzymadsorption mit 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Kulturüberstand binden neben der Lipase aGTL weitere Proteine unspezifisch an die Membran. Abb. 41 zeigt, dass diese unspezifisch gebundenen Proteine separat von der Membran eluiert werden können. Bei Elution mit Salzkonzentrationen von 0,75 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wird keine Elution bewirkt (Abb. 41, Bande 3 und 4). Bei geringeren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen eluieren zunächst unspezifisch gebundenen Proteine separat von der Membran (Abb. 41, Bande 5). Anschließend kann die Lipase aGTL in Abwesenheit von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ annähernd frei von weiteren Proteinen eluiert werden (Abb. 41, Bande 5).

Die Aufreinigung der Lipase aGTL über die Phenyl-Membran zeigt, dass die Ionenstärke bei einer Proteinisolierung über Hydrophobe Interaktionschromatographie einen großen Einfluss auf den Aufreinigungserfolg hat. Ist die Salzkonzentration im Kulturüberstand zu niedrig, erfolgt keine Enzymadsorption. Dagegen binden neben dem Zielenzym weitere Proteine unspezifisch an die Membran, wenn die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration im Kulturüberstand zu hoch ist. Eine effiziente Aufreinigungsstrategie ergibt sich bei Bindung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Unter diesen Bedingungen bindet die Lipase aGTL vollständig an die Phenyl-Membran, während die restlichen Proteine im Überstand zurück bleiben. Auf diese Weise können höhere Bindungskapazitäten erzielt werden, da unspezifisch bindende Proteine keine Bindungsstellen blockieren. Die Elution der gebundenen Lipase aGTL wird in Abwesenheit von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bewirkt. Durch Elution mit dem Elutionspuffer bei pH 7 wird die Lipase aGTL ausgehend von der SDS-PAGE nahezu frei von weiteren Proteinen von der Phenyl-Membran desorbiert.

Diese Erkenntnisse sollen nachfolgend auf einen größeren Maßstab übertragen werden.

4.3.2.2. Aufreinigung der Lipase aGTL im Milliliter-Maßstab

Bestimmung der dynamischen Bindungskapazität

Zur Bestimmung der dynamischen Bindungskapazität wurden jeweils drei Phenyl-Membranen im LP 15-Modul mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen bis zum vollständigen

Durchbruch an der FPLC (BioLogic AVR7-3, BIO-RAD Laboratories GmbH, München) beladen. Die Adsorption der Lipase aGTL erfolgte aus dem Kulturüberstand bei pH 7 mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Anschließend wurde die Elution ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50 mM KPP, pH 7) durchgeführt. Während der Beladung und der Elution wurden Fraktionen zu 2 mL aufgefangen und die Proteinkonzentration mittels Bradford (s. Abschnitt 6.3.2.2) sowie die Enzymaktivität mit *p*-NPP (s. Abschnitt 6.3.1.3) bestimmt. Anhand dieser Daten konnte entsprechend der vorangegangenen Vorgehensweisen (vgl. Abschnitt 4.1.2 und 4.2.2) die maximale dynamische Bindungskapazität der Phenyl-Membran bestimmt werden. Dabei wurde vorausgesetzt, dass ausschließlich eine Lipase-Adsorption an die Membran erfolgt. Die dynamische Bindungskapazität 100 % der Phenylmembran beträgt $Q_{\text{max}} = 0,87 \text{ mg/cm}^2$. Bei 10 %igem Durchbruch ergibt sich eine Kapazität von $Q_{\text{max}} = 0,61 \text{ mg/cm}^2$.

Tab. 10: Optimale Aufreinigungsbedingungen zur Isolierung der Lipase aGTL über die Phenyl-Membran aus dem Kulturüberstand.

Membran/ Ligand	Bindungs- bedingung	Elutions- bedingung	Ausbeute [%]	Restaktivität [%]	Dyn. Bindungs- kapazität $Q_{10\%}$ [mg/cm^2]	Dyn. Bindungs- kapazität Q_{max} [mg/cm^2]
doppelporös / Phenyl	pH 7, 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50 mM KPP, pH 7	89	95	0,61	0,87

Aufreinigung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand

Zur Übertragung der zuvor ermittelten Aufreinigungsbedingungen auf eine größere Membranfläche wurden drei Phenyl-Membranen mit einem Durchmesser von 3 cm in das LP 15-Modul eingespannt und dieses an die FPLC angeschlossen. Nach Equilibrierung mit Bindungspuffer (50 mM KPP, 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7) wurde die Membranen mit 15 mL Kulturüberstand bei einer Flussrate von 1 mL/min beladen. Hierfür wurde der Kulturüberstand mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt. Nach einem Waschschrift mit 10 mL Bindungspuffer (Flussrate: 2 mL/min) zur Entfernung ungebundener Proteine erfolgte die Elution über einen Zweistufengradienten. Zur Elution möglicher unspezifisch gebundener Proteine wurde die erste Elution mit 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durchgeführt. Anschließend erfolgte die zweite Elutionsstufe ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zur Elution der Lipase aGTL. Es wurde ein Elutionsvolumen von 13 mL je Elutionsstufe eingesetzt. Das Chromatogramm der Aufreinigung ist in Abb. 42 dargestellt. Unter den gegebenen Voraussetzungen war es nicht möglich die Lipase aGTL von der Membran zu eluieren. Im Chromatogramm ist kein Elutionspeak zu erkennen. Eine einfache Übertragung der im Screening gewonnen Erkenntnisse war hier also nicht möglich. Aktivitätsmessungen der Durchlaufaktionen während der Beladung ließen aber auf eine erfolgreiche Bindung der

Lipase aGTL an die Membran schließen. Nach der Aufreinigung wurden die drei Phenyl-Membranen aus dem LP 15-Modul ausgeschraubt und mit der Lösung C, die zur Messung der Enzymaktivität mit *p*-NPP dient, überschichtet (vgl. Abschnitt 6.3.2). Die Lösung färbt sich sofort gelb (Daten nicht gezeigt). Die so nachgewiesene hohe Enzymaktivität demonstriert, dass die Lipase aGTL noch auf der Membran gebunden war und unter den gegebenen Bedingungen nicht von der Membran eluiert werden konnte.

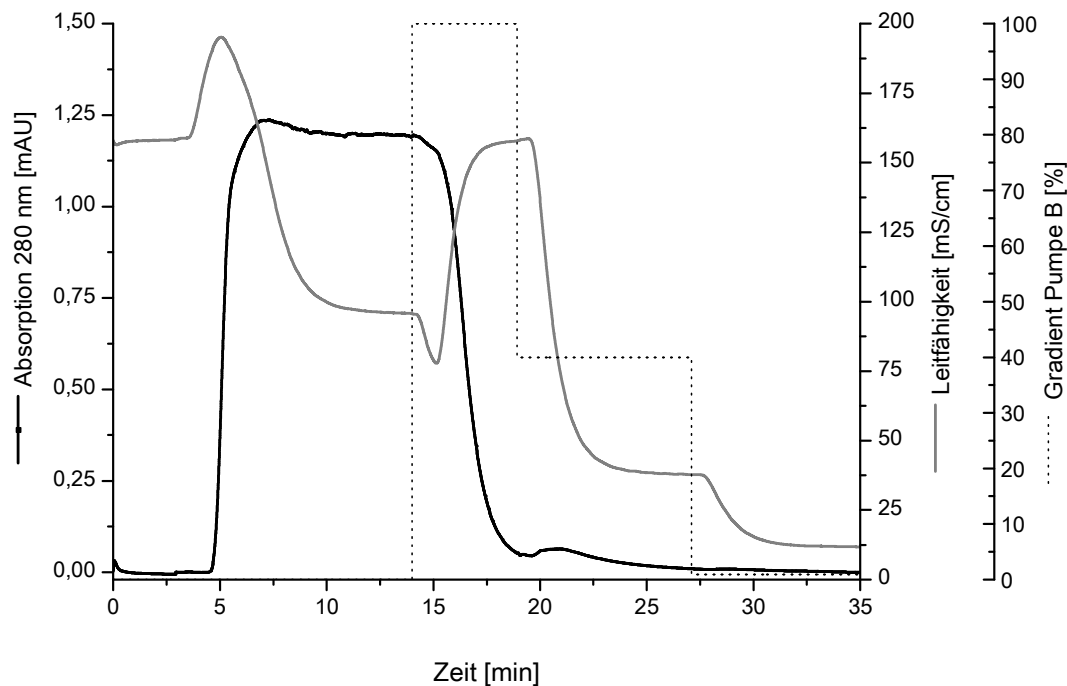


Abb. 42: Aufreinigung der Lipase aGTL über die HIC-Phenyl-Membran im LP 15. Flussrate: 1 mL/min, Probe: 15 mL Kulturüberstand mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nach der Beladung wurde der restliche Kulturüberstand mit 5 mL Bindungspuffer (Puffer B: 50 mM KPP, 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7). Anschließend erfolgte die Elution über einen Zweistufigen Gradient (Puffer A: 50 mM KPP, pH 7): 1. Stufe: 60 % Puffer A/40 % Puffer B (0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 2. Stufe: 100 % Puffer A (ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Um eine effiziente Isolierung der Lipase mit dem LP 15-Modul zu erzielen, wurden verschiedene Elutionsgradienten getestet (Daten nicht gezeigt). Aber auch über einen linearen Gradienten ($0,2 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow 0,0 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) oder durch Änderung des pH-Werts im Elutionspuffer wurde keine Enzymelution erreicht.

4.3.2.3. Optimierung der Lipaseelution

Möglicherweise bindet die Lipase aGTL so stark an die Membran, dass sie in Gegenwart wässriger Puffersysteme nicht von der Membran desorbiert werden kann. Aufgrund der hohen Polarität von Wasser sind die hydrophoben Effekte in wässrigen Lösungen sehr hoch, so dass

hydrophoben Wechselwirkungen gefördert werden. Chaotrope Salze aber auch organische Lösungsmittel besitzen die Eigenschaft hydrophobe Effekte zu verringern. Mit zunehmender Chaotropie werden hydrophobe Wechselwirkungen gemindert. Vor diesem Hintergrund werden Agentien, wie Methanol oder Ethylenglykol, bei der Elution in der Hydrophoben Interaktionschromatographie eingesetzt⁶⁵. Tsumoto et al. zeigten, dass die Aminosäure Arginin die Proteinelution von einer hydrophoben Matrix verbessert. Arginin besitzt eine Guanidin-Funktionalität in der Seitenkette, die möglicherweise die hydrophoben Wechselwirkungen beeinflusst. Arginin liegt im neutralen pH-Bereich als Kation vor. Die Guanidinium-Kationen der Aminosäure sind chaotrop und mindern daher vermutlich die hydrophoben Wechselwirkungen^{126, 127}.

Zur Optimierung der Lipaseelution von der Phenyl-Membran wurde der Einfluss von Methanol (2 % - 20 %), Ethylenglykol (5 % - 25 %), Triton-X-100 (0,2 % - 2 %) und Arginin (100-1.000 mM) auf die Enzymelution untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden Mengen zum Elutionspuffer (50 mM KPP, pH 7) gegeben und die Elution der Lipase aGTL jeweils mit steigender Konzentration durchgeführt. Die Adsorption des Enzyms erfolgte zuvor aus dem Überstand mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die entsprechenden Untersuchungen wurden im Mikroliter-Maßstab mit den Vivapure 5,4-Einheiten durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und auf diese Weise der Elutionserfolg und die Selektivität der Elution beurteilt (vgl. Abb. 43).

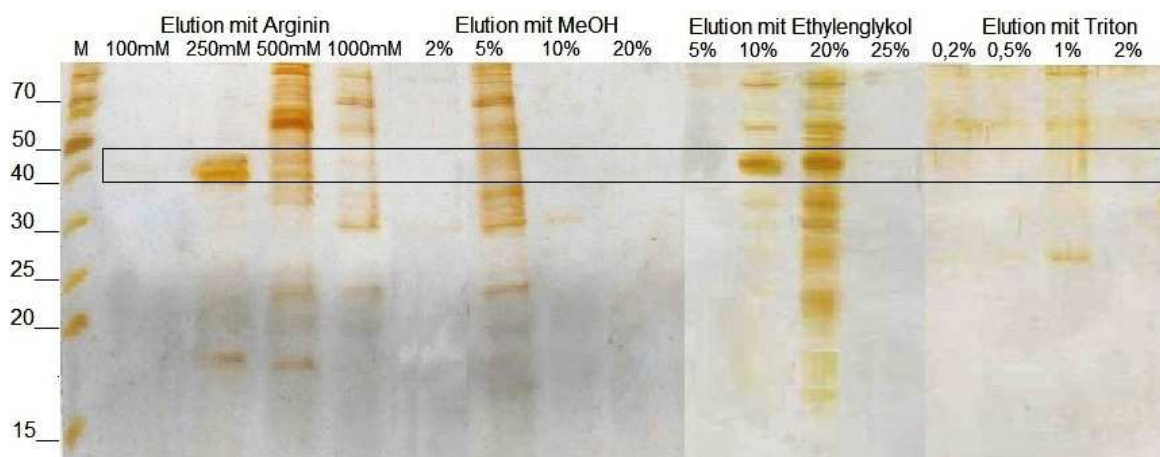


Abb. 43: Screening der Elutionsbedingungen zur Elution der Lipase aGTL von der HIC-Phenyl-Membran durch Zugabe verschiedener Detergenzien. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Triton-X-100 und Methanol bewirkten keine Elution der Lipase aGTL. Der Einsatz von Ethylenglykol und Arginin führte dagegen zum Erfolg. Während durch 10 % Ethylenglykol im Elutionspuffer hauptsächlich die Lipase aGTL von der Membran desorbiert, werden bei

Verwendung der doppelten Ethylenglykol-Menge zahlreiche andere Proteine zusammen mit der Lipase aGTL von der Membran eluiert.

Eine Elution der Lipase aGTL mit Arginin führte ebenfalls zum Ziel und erscheint im Vergleich zur Elution mit Ethylenglykol selektiver. Die Lipase wird mit 250 mM Arginin fast ohne Verunreinigung von der Membran eluiert. Bei doppelter Arginin-Konzentration erfolgt die Elution weiterer an der Membran gebundener Proteine. Die Elutionsfraktion enthält ausgehend von den Aktivitätsmessungen allerdings keine Lipase mehr (Daten nicht gezeigt).

Anwendung der Ergebnisse auf den Milliliter-Maßstab

Da ausgehend vom SDS-PAGE-Gel in Abb. 43 eine selektivere Elution der Lipase aGTL mit Arginin erreicht wird, als mit Ethylenglykol, wurde die Enzymelution mittels Ethylenglykol nicht weiter verfolgt. Stattdessen sollte die Lipase aGTL-Aufreinigung über die Phenyl-Membran mit Elution durch Arginin im Milliliter-Maßstab weiter optimiert werden.

Hierzu wurden 10 mL Kulturüberstand mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei einer Flussrate von 1 mL/min auf die Membranen im LP-15 Modul gegeben. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Proteine mit 8 mL Bindungspuffer (25 mM KPP, pH 7, Flussrate: 2 mL/min) erfolgte die Elution mit Arginin im Elutionspuffer. Die Elution wurde über einen linearen Gradienten durchgeführt, wobei die Arginin-Konzentration über ein Elutionsvolumen von 20 mL langsam auf eine Endkonzentration von 1 M Arginin (Puffer B) anstieg. Hierdurch war es möglich die Lipase aGTL von der Phenyl-Membran zu eluieren. Allerdings war auf diese Weise keine gute Trennung von anderen Proteinen möglich (Daten nicht gezeigt). Testungen unterschiedlicher Stufengradienten führten zu dem Ergebniss, dass eine optimale Trennung durch einen Zweistufengradienten mit je 8 mL Elutionsvolumen pro Stufe erzielt wird. Hierbei wird in der ersten Stufe die Elution der Lipase aGTL durch 250 mM Arginin hervorgerufen. Anschließend werden durch 400 mM Arginin weitere an der Membran gebundene Proteine eluiert. Dieser Stufengradient ist vergleichbar mit den einzelnen Elutionsschritten im Mikroliter-Maßstab, bei dem die gleichen Ergebnisse erzielt wurden. In Abb. 44 ist das Chromatogramm der optimierten Aufreinigung mit den entsprechenden Fraktionsschnittgrenzen dargestellt. Das SDS-PAGE-Gel in Abb. 45 zeigt die im Chromatogramm hervorgehobenen Fraktionen der Lipase-Aufreinigung.

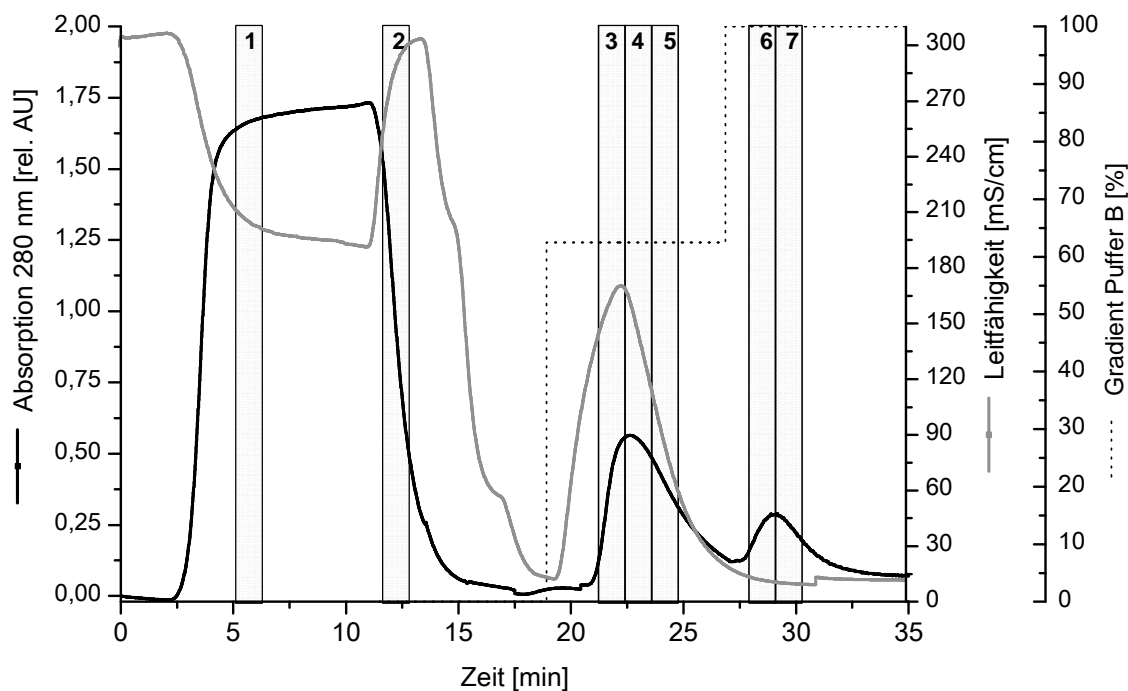


Abb. 44: Aufreinigung der Lipase aGTL über die Phenyl-Membran im LP 15. Flussrate: 1 mL/min, Probe: 10 mL Kulturüberstand, pH 7 mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Das Auswaschen des restlichen Kulturüberstands erfolgt mit 9 mL Puffer A (50 mM KPP, pH 7). Anschließend wurde die Elution über einen Zweistufengradienten mit Arginin bei pH 8 (Puffer B: 50 mM KPP, 400 mM Arginin, pH 8) durchgeführt. 1. Stufe: 62,5 % Puffer B, 8 mL (250 mM Arginin), 2. Stufe: 100 % Puffer B, 8 mL (400 mM Arginin).

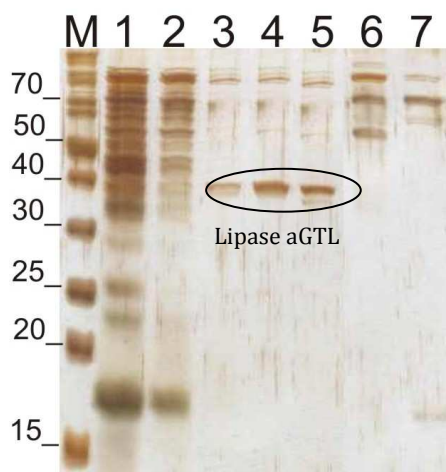


Abb. 45: SDS-PAGE der Aufreinigungsfractionen nach Isolierung der Lipase aGTL über die Phenyl-Membran. Bande 1+2: Durchlaufractionen während der Membranbeladung, Bande 3-5 Elution der Lipase aGTL mit 250 mM Arginin, Bande 6+7: Elution weiterer Proteine mit 400 mM Arginin. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Bei dieser optimierten Aufreinigungsstrategie dient nach Beladung der Phenyl-Membran mit Kulturüberstand ein Waschschrift mit 50 mM KPP, pH 7 zur Entfernung des restlichen Kulturüberstands. Ebenso werden hier Proteine, die ebenfalls an die Membran gebunden

haben, ausgewaschen (vgl. Abb. 45, Fraktion 2). Dieser Waschschrift entspricht der am Anfang verwendeten Elutionsbedingung, mit der es schließlich nicht möglich war, die Lipase aGTL ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ von der Membran zu eluieren (vgl. Abschnitt 4.3.2.2). Der plötzliche Anstieg der Leitfähigkeit zu Beginn des Waschschriftes und die anschließend sinkende Leitfähigkeit macht deutlich, dass durch den Waschschrift das restliche $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ von der Phenyl-Membran gewaschen wird (s. Abb. 44). Anschließend erfolgte die Elution über einen Arginin-Gradienten. Die Lipase aGTL wird dabei durch 250 mM Arginin während der 1. Elutionsstufe fast frei von weiteren Proteinen von der Phenyl-Membran eluiert. Alle Elutionsfraktionen wurden auf eine nachweisbare Enzymaktivität hin untersucht. Die Lipase aGTL konnte im ersten Elutionsschritt mit einer Restaktivität von 92 % desorbiert werden. In den Fraktionen der 2. Elutionsstufe wurde keine Enzymaktivität nachgewiesen. Die Lipase aGTL eluiert demzufolge in der 1. Elutionsstufe vollständig von der Membran. Ebenso zeigten die drei Membranen nach Ausbau aus dem LP 15-Modul keine Lipase-Aktivität.

Alle Lipase-haltigen Elutionsfraktionen wurden im Anschluss der Isolierung vereinigt und die Volumenaktivität mit *p*-NPP (s. Abschnitt 6.3.1.3) und der Proteingehalt nach Bradford (s. Abschnitt 6.3.2.2) bestimmt. Die aus diesen Daten ermittelte Aufreinigungsbilanz ist in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Bilanzierung der Aufreinigung der Lipase aGTL über die Phenyl-Membran.

Reinigungsschritt	Proteingehalt (mg/mL)	Volumenaktivität (U/mL)	spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungsfaktor
Kulturüberstand	23,12	10,94	0,47	1
Phenyl-Membran	1,61	2,45	1,52	3,2

4.3.2.4. Zusammenfassung

Bei einer Proteinaufreinigung über Hydrophobe Interaktionschromatographie erfolgt die Adsorption des Zielproteins im Allgemeinen in Gegenwart von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die anschließende Elution wird durch Herabsetzen der Ionenstärke durchgeführt. In einem Hochdurchsatz-Screening im Mikroliter-Maßstab konnten die optimalen Bindungs- und Elutionsbedingungen für die Isolierung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand über Phenyl-Membranen ermittelt werden. Dabei führte die Adsorption der Lipase mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zum Erfolg. Die Elution der gebundenen Lipase aGTL konnte anschließend ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erreicht werden. Eine Übertragung dieser Aufreinigungsbedingungen auf den Milliliter-Maßstab war allerdings nicht möglich. Nach erfolgreicher Adsorption der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand bei pH 7 mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, konnte diese durch Verringerung der Ionenstärke nicht von der Phenyl-

Membran eluiert werden. Positiv wirkte sich jedoch die Zugabe von Ethylenglykol oder Arginin zum Elutionspuffer (50 mM KPP, pH 7) aus. So konnte im Mikroliter-Maßstab die Lipase mit 10 % Ethylenglykol oder 250 mM Arginin im Elutionspuffer von der Membran eluiert werden. Der Einsatz von Arginin führte dabei zu einer selektiveren Trennung der Lipase von weiteren Proteinen. Keine Elution erfolgte unter Verwendung von Elutionspuffern mit Methanol oder Triton-X-100. Im Falle der Elution mit Arginin konnte ein optimales Aufreinigungsverfahren für die Lipase aGTL entwickelt werden. Nach Adsorption des Kulturüberstandes mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, wird die Elution über einen Zweistufengradienten hervorgerufen. Während die Lipase im ersten Elutionsschritt mit 250 mM Arginin desorbiert, erfolgt anschließend die Elution weiterer an der Membran gebundener Proteine mit 400 mM Arginin im Elutionspuffer. Auf diese Weise konnte die Lipase aGTL mit einem Reinigungsfaktor von 3 erfolgreich unter Erhalt der biologischen Aktivität aus dem Kulturüberstand isoliert werden.

4.3.3. Aufreinigung der Lipase aGTL über die Mixed-mode Membran

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der salztoleranten Mixed-mode Membran wurde diese als Alternative zur klassischen hydrophoben Membran (Phenyl-Membran) im Hinblick auf die Isolierung der Lipase aGTL näher charakterisiert.

4.3.3.1. Screening im Mikroliter-Maßstab

Das Bindungs- und Elutionsverhalten der Lipase aGTL wurde im Mikroliter-Maßstab mit den Vivapure 5,4-Einheiten untersucht und die Selektivität der Aufreinigung mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Die Lipase aGTL hat einen $pI = 6,77$. Dementsprechend sollte die effiziente Adsorption des Enzyms bei pH-Werten niedriger pH 6 erfolgen. Die Lipase aGTL wurde bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 5-8) aus dem Zellysate an die Membran gebunden. Um genaue Aussagen bzgl. der Bindungseffizienz treffen zu können, wurde die Enzymaktivität in den Durchlaufaktionen nach der Membranbeladung gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 46 dargestellt. Eine optimale Bindung der Lipase aGTL erfolgt bei pH 5. Unter dieser Bedingung adsorbiert die Lipase aGTL bei der ersten Beladung vollständig an die Membran. Entsprechend ist in der ersten Durchlaufaktion (DL 1) fast keine Enzymaktivität nachzuweisen. Im darauffolgenden Beladungsschritt adsorbiert weniger Enzym an die Membran, aber dennoch wird eine größere Menge gebunden, als es bei höheren pH-Werten der Fall ist. Den Erwartungen entsprechend, liegen die anderen Bindungs-pH-Werte zu nah am isoelektrischen Punkt der Lipase aGTL. Sie sind nicht negativ genug geladen, um elektrostatische Wechselwirkungen mit den positiv geladenen Sulfonsäure-Gruppen eingehen zu können. Dieses

Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Bindung der Lipase aGTL von elektrostatischen Wechselwirkungen und nicht von hydrophoben Wechselwirkungen dominiert wird.

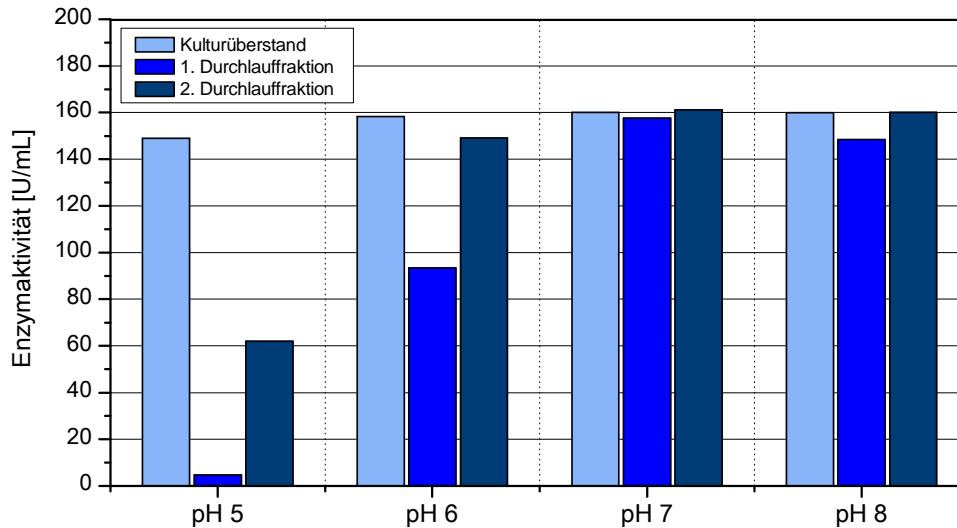


Abb. 46: Enzymaktivität der Lipase aGTL in den Durchlauf fraktionen nach Beladung der Mixed-mode Membran mit Kulturüberstand bei verschiedenen pH-Werten. Die Vivapure 5,4-Einheiten wurden zweimal mit je 0,5 mL Kulturüberstand beladen und anschließend die Enzymaktivität in den Durchlauf fraktionen mittels *p*-NPP bestimmt.

Da multivalente und monovalente Puffer ein unterschiedliches Elutionsverhalten bei der Elution der Penicillin G Amidase bewirkten, wurde beim Screening nach der geeigneten Elutionsbedingung der Einfluss der Puffervalenz auf die Lipase aGTL untersucht. Zur Ermittlung der pH-Abhängigkeit der Elution wurde diese durch multivalente Puffer (25 mM KPP) und monovalente Puffer (25 mM MES, 25 mM Tris) hervorgerufen. Die Membranen wurden mit dem Kulturüberstand bei pH 5 beladen. Anschließend erfolgte die Elution über einen ansteigenden NaCl-Gradienten (0–100 mM) im pH-Bereich von pH 6–8. Die Elutionsfraktionen auf dem SDS-PAGE-Gel sind in Abb. 47 dargestellt.

Unabhängig von der Puffervalenz erfolgt die Elution der Lipase bei pH 7 und pH 8 bereits im ersten Elutionsschritt ohne Zugabe von NaCl. Eine Trennung wird auf diese Weise allerdings nicht erzielt. Zusammen mit der Lipase eluieren sämtliche Proteine die an die Membran gebunden haben. Dies Ergebnis zeigt, dass ein pH-Shift von pH 5 (Bindungs-pH-Wert) auf pH 7 oder pH 8 eine Elution gebundener Protein von der Mixed-mode Membran bewirkt. Dabei zeigen multivalente oder monovalente Puffer keinen signifikanten Einfluss auf das Elutionsverhalten.

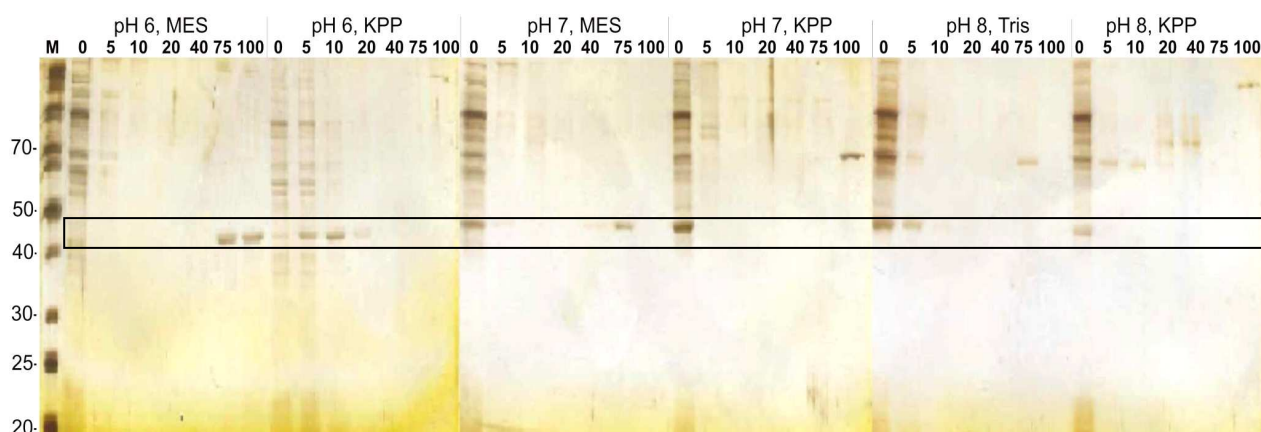


Abb. 47: SDS-PAGE-Gel unterschiedlicher Elutionsfraktionen der Mixed-Mode Membran. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Dieser Einfluss wird dagegen bei einer Elution bei pH 6 deutlich. Unter Verwendung eines multivalenten Elutionspuffers (25 mM KPP) desorbiert die Lipase aGTL bereits mit 5 mM NaCl zusammen mit weiteren Proteinen. Durch entsprechende Elution mit einem monovalenten Puffer (25 mM MES) kann die Lipase aGTL hingegen separat von der Mixed-mode Membran eluiert werden. In einem ersten Elutionsschritt ohne NaCl eluieren andere an der Membran gebundenen Proteine vollständig. Eine Lipaseelution wird anschließend ab einer NaCl-Konzentration von 75 mM erreicht (vgl. Abb. 47). Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen für die einzelnen Elutionsfraktionen sind in Abb. 48 dargestellt.

Diese Daten untermauern die Ergebnisse, die aus dem SDS-Gel gezogen werden konnten. Unabhängig von der Art des Elutionspuffers werden bei pH 7 und pH 8 im ersten Elutionsschritt ohne Zugabe von NaCl die höchsten Enzymmengen von der Membran eluiert. Die größte Lipase-Ausbeute wird dabei durch Elution mit dem Tris-Puffer bei pH 8 erzielt. Die Aktivität der Lipase aGTL in der 1. Elutionsfraktion bei pH 8 im Tris-Puffer ist höher als die Enzymaktivität in der Ausgangslösung. Dies zeigt, dass die Lipase aGTL durch eine derartige Elution angereichert werden kann. Da eine direkte Elution unter diesen Bedingungen allerdings keine Trennung der Lipase aGTL von anderen Proteinen bewirkt (vgl. Abb. 47), bietet sich eine Elution über pH-shift an. Nach Bindung der Lipase aGTL bei pH 5 könnten in einem ersten Elutionsschritt mit einem MES-Puffer bei pH 6 zusätzlich an der Membran gebundene Proteine entfernt werden. Bei einer anschließenden Elution mit einem Tris-Puffer bei pH 8 sollte dann eine separate Elution der Lipase aGTL erfolgen. Eine Alternative stellt die Elution der Lipase mit dem monovalenten MES-Puffer bei pH 6 dar. Über einen ansteigenden NaCl-Gradienten kann die Lipase aGTL separat von der Membran desorbiert werden. Entsprechende Testungen wurden nachfolgend mit dem LP 15-Modul durchgeführt.

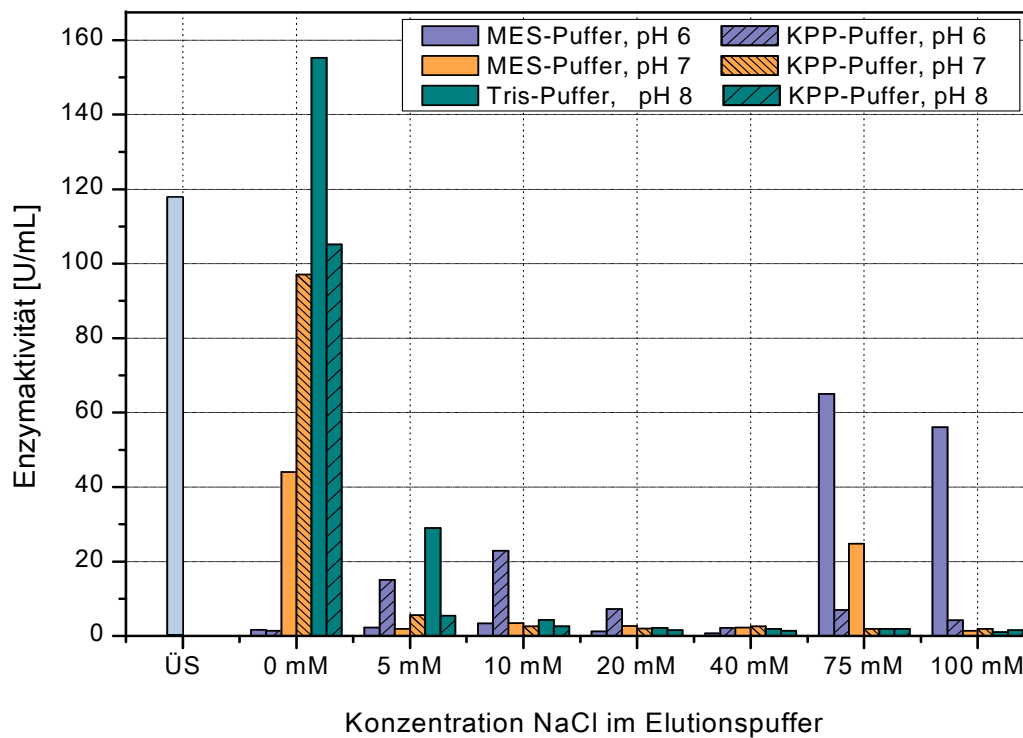


Abb. 48: Enzymaktivität der Lipase aGTL in jeweiligen Elutionsfraktionen. Nach Bindung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand bei pH 5, erfolgte die Elution bei unterschiedlichen pH-Werten nach Beladung der Mixed-mode Membran mit Kulturüberstand bei verschiedenen pH-Werten. Die Vivapure 5,4-Einheiten wurden zweimal mit je 0,5 mL Kulturüberstand beladen.

4.3.3.2. Isolierung der Lipase aGTL über die Mixed-mode Membran mit dem LP15-Modul

Nach dem Screening der Bindungs- und Elutionsbedingungen im Mikroliter-Maßstab wurde die Elution der Lipase aGTL von der Mixed-mode Membran im LP 15 Modul weiter optimiert. Hierzu wurden drei Membranstanzlinge der Mixed-mode Membran mit einem Durchmesser von 3 cm in das Modul eingelegt und dieses an die FPLC (BioLogic AVR7-3, BIO-RAD Laboratories GmbH, München) angeschlossen. Nach der Equilibrierung der Membranen bei pH 5 (25 mM NaAc-Puffer, pH 5) wurden 12 mL Kulturüberstand (1 mL/min) auf die Membran aufgetragen. Der Kulturüberstand wurde hierfür auf pH 5 eingestellt. Anschließend wurden in einem Waschschrift mit 6 mL Bindungspuffer (25 mM NaAc-Puffer, pH 5, Flussrate: 2 mL/min) ungebundene Proteine entfernt. Zur Optimierung der Elution, wurden verschiedene Elutionsvarianten getestet. Erste Elutionsversuche bei pH 6 mit dem monovalenten MES-Puffer führten weder über einen linearen Gradienten (0-100 mM NaCl) noch über verschiedene Stufengradienten zur erfolgreichen Trennung der Lipase aGTL von anderen Proteinen (Daten

nicht gezeigt). Eine erfolgreiche Isolierung der Lipase aGTL gelang schließlich durch eine Elution über pH-shift. Mit Hilfe eines Dreistufengradienten (Stufe 1: 25 mM MES, pH 6, Stufe 2: 25 mM MES, 50 mM NaCl, pH 6, 3. Stufe: 25 mM Tris, pH 8) kann die Lipase separat von anderen Proteinen von der Mixed-mode Membran eluiert werden. Auf diese Weise konnte die Lipase aGTL mit einer Ausbeute von 93 % und einer Restaktivität von 98 % von der Membran desorbiert werden. Die maximale dynamische Bindungskapazität beträgt dabei $Q_{\max} = 1,86 \text{ mg/cm}^2$. Tab. 12 fasst Aufreinigungsbedingungen und Ergebnisse für die Isolierung der Lipase aGTL über die Mixed-mode Membran zusammen.

Tab. 12: Aufreinigungsstrategie zur Isolierung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand über die Mixed-mode Membran.

Membran/ Ligand	Bindungs- bedingung	Elutions- bedingung	Ausbeute [%]	Restaktivität [%]	Dyn. Bindungs- kapazität $Q_{10\%}$ [mg/cm ²]	Dyn. Bindungs- kapazität Q_{\max} [mg/cm ²]
gepfropft / Mixed-mode	pH 5	25 mM Tris, pH 8	93	98	1,35	1,86

Das Chromatogramm der Aufreinigung ist in Abb. 49 gezeigt. Ausgewählte Fraktionen der im Chromatogramm eingezeichneten Fraktionschnittgrenzen wurden zur Untersuchung des Aufreinigungserfolgs auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Das entsprechende Gel nach Silberfärbung ist in Abb. 50 dargestellt.

Im ersten Elutionsschritt bei pH 6 ohne NaCl werden weitere an der Membran gebundene Proteine von der Membran eluiert (vgl. Abb. 50, Fraktion 3). Im zweiten Elutionsschritt bei pH 6 mit 50 mM NaCl erfolgt dagegen keine weitere Elution anderer Proteine. Im Chromatogramm ist kein Peak zu sehen. Nach diesen beiden Elutionsschritten zur Entfernung unerwünschter Proteine erfolgte die Elution der Lipase aGTL mit 8 mL Tris-Puffer, pH 8. Das Chromatogramm zeigt einen sehr schmalen und hohen Elutionspeak an entsprechender Stelle. Anhand des SDS-PAGE-Gels konnte gezeigt werden, dass die Lipase aGTL hier separat nahezu ohne weitere Proteine von der Membran eluiert.

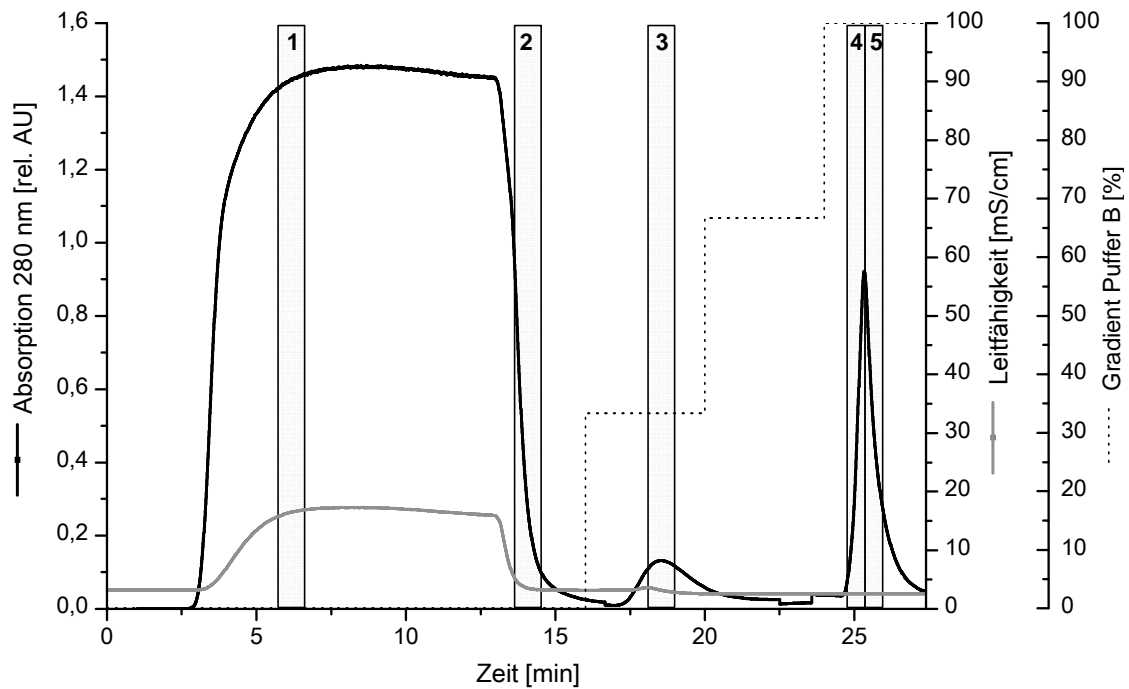


Abb. 49: Chromatogramm der Aufreinigung der Lipase aGTL über die Mixed-mode Membran. Flussrate: 1 mL/min, Probe: 12 mL Kulturüberstand pH 5. Der Waschschritt erfolgte bei gleichem pH-Wert mit 8 mL Bindungspuffer (25 mM NaAc, pH 5; Flussrate: 2 mL/min). Anschließend wurde die Elution über einen Dreistufengradienten mit je 4 mL Elutionsvolumen pro Stufe durchgeführt (Stufe 1: 25 mM MES, pH 6, Stufe 2: 25 mM MES, 50 mM NaCl, pH 6, 3. Stufe: 25 mM Tris, pH 8).

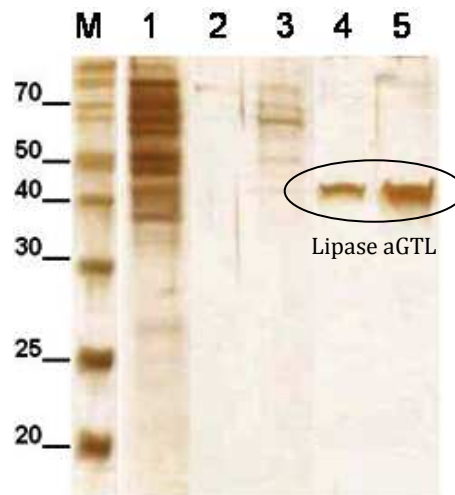


Abb. 50: SDS-PAGE-Gel ausgewählter Fraktionen der Aufreinigung von Lipase aGTL über die Mixed-mode Membran. Bande 1: Durchlaufraction, Bande 2: Waschfraction, Bande 3: 1. Elutionsfraction bei pH 6, Bande 4+5: 3. Elution bei pH 8. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Eine Bilanzierung der Aufreinigung ist in Tab. 51 zusammenfassend dargestellt. Bei der Isolierung der Lipase aGTL über die Mixed-mode Membran wird ein Reinigungsfaktor von 6

erzieht. Dieser Reinigungsfaktor ist doppelt so hoch wie der bei der Isolierung des Enzyms über die Phenyl-Membran.

Tab. 13: Bilanz zur Aufreinigung der Lipase aGTL über die Mixed-mode Membran aus dem Kulturüberstand.

Reinigungsschritt	Proteingehalt (mg)	Volumenaktivität (U/mL)	spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungsfaktor
Zellysat	19,06	16,77	0,88	1
3. Elutionsstufe Mixed-Mode Membran	7,23	49,6	6,86	7,8

4.3.4. Direkte Isolierung der Lipase aGTL über ein partikelgängiges Membranadsorber-Modul

Ein neu entwickeltes partikelgängiges Membranadsorber-Modul der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen ermöglicht eine direkte Produktisolierung aus zellhaltigen Fermentationsbrühen und Kulturüberständen. Das Ziel ist eine Reduzierung der Anzahl an Aufarbeitungsschritten in einem Aufreinigungsprozess, um Prozesszeit und -kosten zu senken und die Produktivität zu steigern. Bevor in einem Aufreinigungsprozess ein chromatographischer Reinigungsschritt eingesetzt werden kann, müssen die Zellen abgetrennt und der zellfreie Kulturüberstand gegebenenfalls aufkonzentriert werden. Durch Verwendung des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls sollen Partikelabtrennung und Reinigung, Produktisolierung und Aufkonzentrierung kombiniert werden und durch nur einen Prozessschritt erfolgen. Derartige Ansätze werden in der industriellen Proteinproduktion schon lange verfolgt und in der Literatur sind viele derartige Verfahren beschrieben. Ein auf dieser Überlegung basierendes Trennverfahren, welches die Aufarbeitung von partikelgängigen Medien erlaubt und eine direkte Produktisolierung ermöglicht, ist die Expanded Bed Adsorption (EBA). Bei diesem Verfahren wird das Chromatographie-Bett kontinuierlich von unten angeströmt, wodurch sich dieses ausdehnt und der Abstand zwischen den Adsorberpartikeln vergrößert. Hierdurch wird ermöglicht, dass Partikel, wie Zellen und Zelltrümmer, durch die Säule treten können.

Das neuartige partikelgängige Modul auf Basis der Membranadsorbertechnologie ist ein Wickelmodul, wobei die Adsorbermembran zusammen mit einem Abstandshalter um einen inneren Kern aufgewickelt ist (vgl. Abb. 51 links). Der Abstandshalter bewirkt die Ausbildung von Strömungskanälen, durch die die Partikelgängigkeit des Moduls sowie der Stofftransfer

zwischen Medium und Membran gewährleistet wird. Je dünner der Abstandhalter, der zwischen den Membranwicklungen liegt, desto effizienter ist die Wechselwirkung zwischen Zielprotein und Adsorbermembran, da das Medium auf diese Weise in einem ausreichend geringen Abstand an der Membran vorbeigeleitet wird.

Das Prinzip des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls ist in Abb. 51 schematisch dargestellt. Ein entscheidender Unterschied dieses Moduls zu den klassischen Membranadsorber-Wickelmodulen ist, dass es wie eine EBA-Säule von unten angeströmt wird. Zudem wird die Adsorbermembran in den Modulen nicht von dem partikelhaltigem Medium durchströmt, sondern es findet eine tangentielle Überströmung der Membran statt, wodurch die Partikelgängigkeit gewährleistet wird. Während die Zellen und Zelltrümmer die Membran dabei ungehindert passieren, bindet das Zielprotein an die Adsorbermembran. Aufgrund der Membranüberströmung wird der Stofftransport zu den funktionellen Gruppen der Membran von der Diffusion gegenüber der Konvektion dominiert.

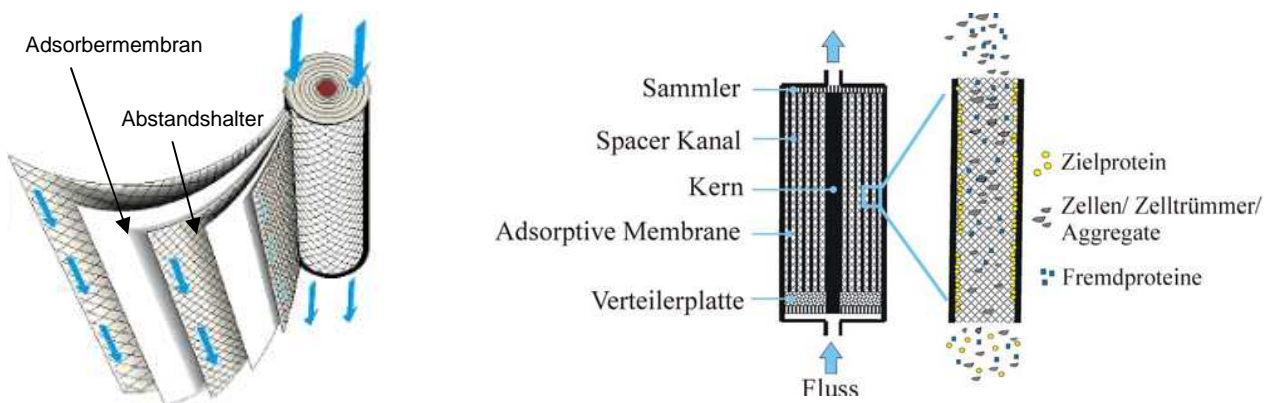


Abb. 51: Aufbau Prinzip des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls (Schematische Darstellungen der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH).

Untersuchungen zur Proteinanreicherung im Rahmen der Dissertation von A. Pastor¹¹² zeigten, dass durch ein einmaliges Überströmen der Membran im Durchlaufverfahren nur ein Teil des Zielproteins adsorbiert wird, da die Kontaktzeit zwischen Medium und Adsorbermembran zu gering ist. Durch Reduzierung des Volumenstroms kann die Adsorptionseffizienz verbessert werden. Die Produktivität des Prozesses wird dadurch jedoch vermindert. Bewährt hat sich daher eine Beladung des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls im Rezirkulationsverfahren. Hier wird das Medium solange im Kreis gepumpt, bis die gewünschte Anreicherung des Zielproteins erreicht ist. So können Produktivität und Adsorptionseffizienz bei vergleichbar hohen Volumenströmen gesteigert werden. Zur Elution des Zielproteins eignet sich dagegen das

Durchlaufverfahren besser¹¹². Eine schematische Darstellung der beiden Verfahren ist in Abb. 52 dargestellt.

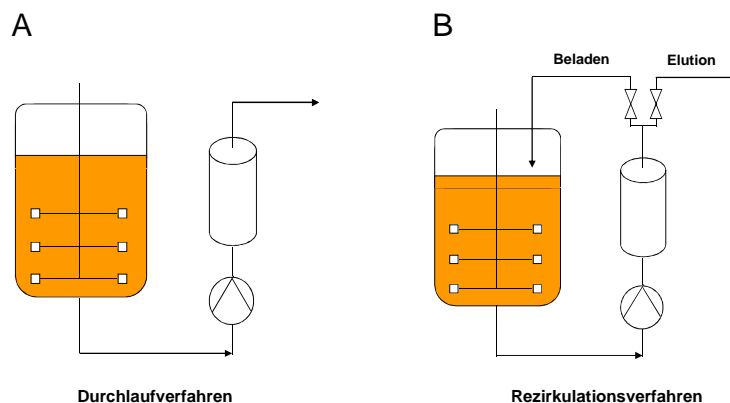


Abb. 52: Unterschiedliche Verfahren zur Beladung des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls.

4.3.4.1. Isolierung der Lipase aGTL aus zellfreiem Kulturüberstand

Zur Charakterisierung des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls im Hinblick auf eine Isolierung der Lipase aGTL aus zellhaltigem Kulturüberstand, wurden zunächst Aufreinigungsversuche der Lipase aGTL aus zellfreiem Kulturüberstand durchgeführt. In Anlehnung an die Ergebnisse der vorrausgegangenen Versuche, zur Untersuchung der Selektivität und Aufreinigungseffizienz zweier verschiedener funktionalisierter Membranen, wurden von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen partikelgängige Adsorber-Module mit einem Membranvolumen von 2,5 mL auf Basis der Mixed-mode Membran aufgebaut. Ein solches Direct-Modul ist in Abb. 53 gezeigt. Bei der Sicht von oben auf das Direct-Modul ist der Modul-Kern, um den die Mixed-mode Membran gewickelt ist, zu erkennen. Die wichtigsten Kenndaten des Moduls sind in Tab. 14 zusammengefasst.

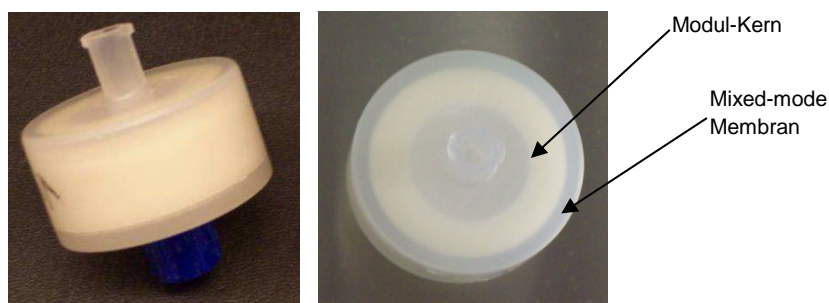


Abb. 53: Direct-Modul mit einem Membranvolumen von 2,5 mL. Links: das Modul von der Seite, rechts: das Modul von oben.

Tab. 14: Kenndaten des in dieser Arbeit verwendeten Direct-Moduls auf Basis der Mixed-mode Membran.

Direct Modul	Kenngrößen
Membran	Mixed-mode Membran
Membrancharge	T308
Membranzvolumen	2,5 mL
Membranfläche	125 cm ²
Membranzlänge	114 cm
Membranzbreite	0,11 cm
Abstandshalter	Vlies
Dicke des Abstandshalters	0,24 mm

Diese Direct-Module wurden anhand des Bindungs- und Elutionsverhaltens der Lipase aGTL nachfolgend charakterisiert. Zur Produktion der Lipase aGTL wurde der Produktionsstamm *S. carnosus* unter den in Abschnitt 6.1.3 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Nach einer Kultivierungsdauer von 27 h wurde eine End-OD₆₀₀ = 10,54 rel. AU erreicht. Die Gesamtprotein-konzentration im Kulturüberstand betrug 143 mg/L. Die Enzymaktivität im Kulturüberstand lag bei 10,3 U/mL. Nach Abtrennung der Zellen wurde das Direct-Modul im Rezirkulationsverfahren aus einer gerührten Vorlage für 120 min mit dem Lipase aGTL-haltigen Kulturüberstand bei 30 mL/min beladen (vgl. Abb. 52). Während der Rezirkulation wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration und Enzymaktivität in definierten Zeitabständen je 300 µL Probe aus der Vorlage genommen. Das Auswaschen ungebundener Proteine sowie die Elution der gebundenen Lipase aGTL wurde im Durchlaufverfahren an der FPLC (BioLogic AVR7-3, BIO-RAD Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Eine detaillierte Versuchsdurchführung ist im Anhang unter Abschnitt 6.2.3 beschrieben. Die Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen wurde mit dem Bradford-Test bestimmt (vgl. Abschnitt 6.3.2.2). Die Messung der Lipase aGTL-Aktivität erfolgte mit dem *p*-NPP-Test (vgl. Abschnitt 6.3.1.3). Abb. 54 zeigt die Proteinanreicherung in der Vorlage über einen Zeitraum von 120 min. Die Werte sind als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung angegeben. Nach einer Rezirkulationszeit von 120 min wird keine signifikante Proteinanreicherung mehr beobachtet. Lediglich 4,52 mg Lipase aGTL konnten unter diesen Bedingungen an die Membran gebunden werden.

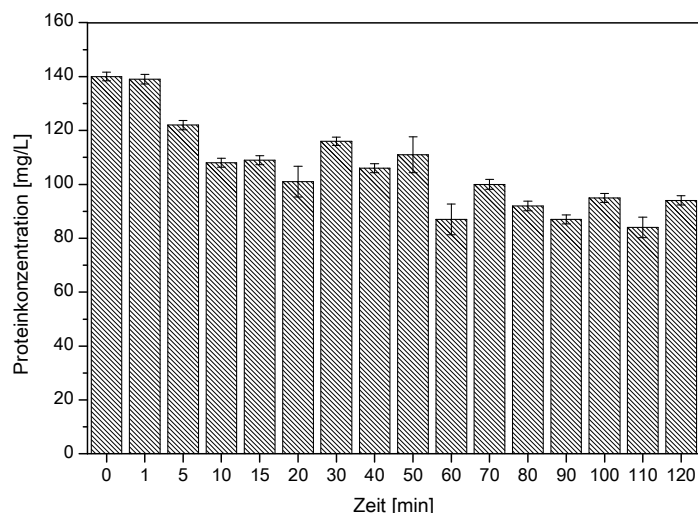


Abb. 54: Proteinabreicherung während der Beladung des Direct-Moduls mit nicht konzentriertem Kulturüberstand bei 30 mL/min über einen Zeitraum von 120 min.

Das partikelgängige Membranadsorber-Modul soll gerade auch in Hinblick auf eine Produktisolierung und -anreicherung aus gering konzentrierten Lösungen dienen. Eine effiziente Lipase-Abreicherung aus einem gering konzentrierten Kulturüberstand (Gesamtproteinmenge: 140 mg/L, Enzymaktivität: 10,3 U/mL) konnte unter diesen Voraussetzungen jedoch nicht erreicht werden. Dies kann zum einen aus der zu geringen Lipase aGTL-Konzentration im Kulturüberstand resultieren, zum anderen hat die Flussrate während der Rezirkulation möglicherweise einen Einfluss auf die Effizienz der Proteinabreicherung.

Für die nachfolgenden Versuche wurde der Kulturüberstand mit der Vivaflow 50-Einheit 10-fach aufkonzentriert. Anschließend wurde das Direct-Modul mit dem konzentrierten Kulturüberstand bei unterschiedlichen Flussraten (3 mL/min, 30 mL/min und 60 mL/min) im Rezirkulationsverfahren beladen. Die Rezirkulationsdauer betrug dabei wie zuvor 120 min. Die Versuchsdurchführung entsprach der vorherigen. Die Versuchsbedingungen sind zur Übersicht noch einmal in Tab. 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Versuchsbedingungen für die Isolierung der Lipase aGTL aus zellfreiem Kulturüberstand.

Direct-Modul	Versuchsbedingung
Vorlage	100 mL zellfreier Kulturüberstand
Beladungszeitraum	120 min
Flussrate	3 mL/min, 30 mL/min, 60 mL/min,
Volumen Waschschrift/Flussrate	5 mL / 5 mL/min
Elutionsvolumen/Flussrate	1 mL/min

In Abb. 55 ist die Abnahme der Gesamtproteinkonzentration während der Beladung des Direct-Moduls bei einer Flussrate von 30 mL/min vergleichend aus dem verdünnten und konzentrierten Kulturüberstand dargestellt.

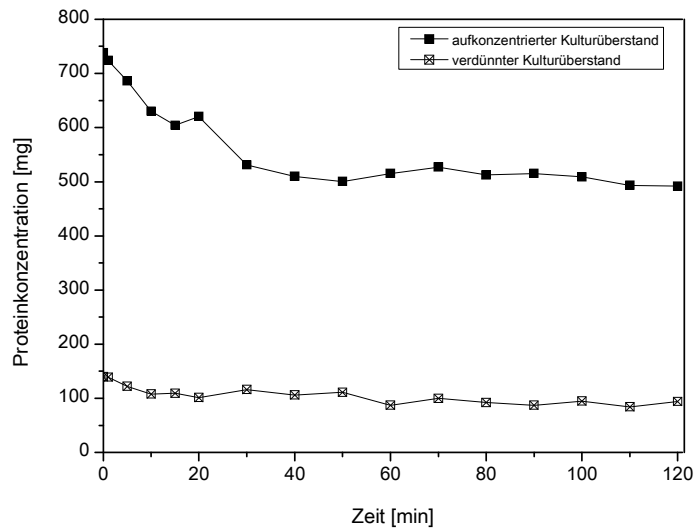


Abb. 55: Vergleich der Proteinabreicherung während der Beladung des Direct-Moduls in Abhängigkeit der Ausgangskonzentration im Kulturüberstand.

Bei Rezirkulation des konzentrierten Kulturüberstands zeigt sich ein anderes Bindungsverhalten als zuvor. Hier ist anfangs eine kontinuierliche Abnahme der Proteinmenge während der Beladung zu beobachten. Dies wird bei einer Aufreinigung der Lipase aGTL aus verdünntem Kulturüberstand nicht beobachtet. Im verdünnten Kulturüberstand ist die Lipase aGTL-Konzentration zu gering, um in signifikanten Mengen an die Membran zu binden. Wird die Adsorption der Lipase aGTL nach Langmuir beschrieben, bedeutet dies, dass man sich bei Adsorption der Lipase aGTL aus verdünntem Kulturüberstand am Anfang der Adsorptionsisotherme befindet. Die angebotene Lipase aGTL-Menge im Verhältnis zur Membranfläche ist zu gering, um eine effiziente Enzymadsorption zu beobachten. Durch Konzentrierung des Kulturüberstands wird die Lipase aGTL-Menge im Kulturüberstand angereichert. Das angebotene Masse-Fläche-Verhältnis ist dadurch höher, wodurch eine deutlich bessere Adsorptionseffizienz erreicht wird.

In Abb. 56 ist die Abnahme der Gesamtproteinmenge aus konzentriertem Kulturüberstand in Abhängigkeit der Flussrate dargestellt. Abb. 57 zeigt ergänzend die Änderung der Enzymaktivität im Kulturüberstand während der Rezirkulation bei unterschiedlichen Flussraten. Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung angegeben. Unabhängig von der Flussrate wird in den ersten 40 min der Rezirkulation die größte

Lipase aGTL-Menge an die Mixed-mode Membran gebunden. Anschließend wird keine signifikante Proteinanreicherung mehr erreicht (vgl. Abb. 56).

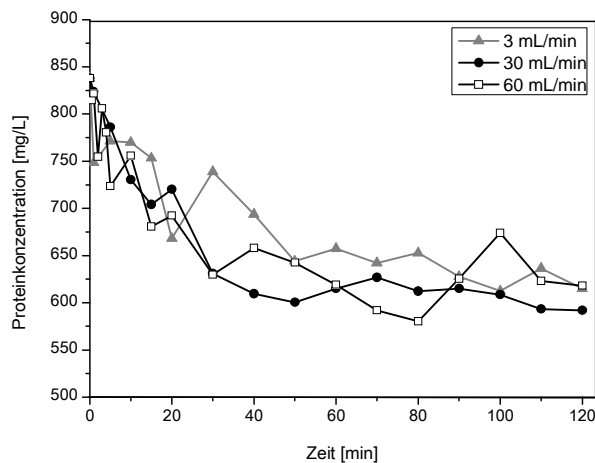


Abb. 56: Abnahme der Proteinkonzentration im Kulturüberstand während der Direct-Modul Beladung bei unterschiedlichen Flussraten.

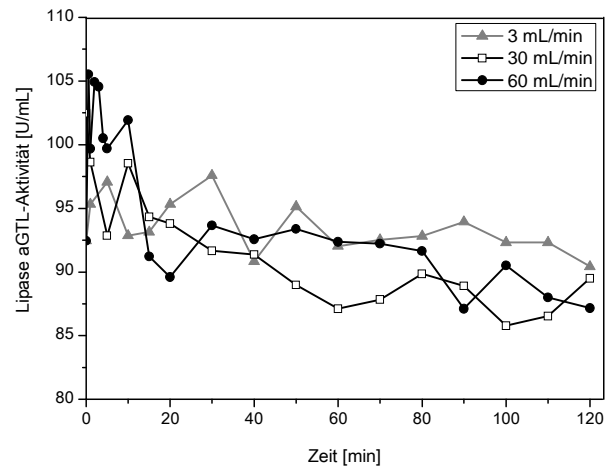


Abb. 57: Abnahme der Lipase aGTL-Aktivität im Kulturüberstand während der Direct-Modul Beladung bei unterschiedlichen Flussraten.

Die effektivste Enzymadsorption erfolgt bei einer Rezirkulation mit einer Flussrate von 30 mL/min. Hier werden in den ersten 40 min der Rezirkulation 93 % der insgesamt bindenden Enzyme gebunden. Sowohl niedrigere als auch höhere Flussarten führen zu einer Abnahme der Bindungsmenge. Während bei Rezirkulation mit einer Flussrate von 60 mL/min nach 40 min 84 % der Proteinmenge, die nach 120min Rezirkulation gebunden werden kann, bindet, wird bei einer Beladung des Moduls mit 3 mL/min lediglich ein prozentualer Anteil von 71 % der Gesamtbindungsmenge in diesem Zeitraum. Die in Abb. 57 gezeigte Abnahme der Enzymaktivität während der Rezirkulation untermauert diese Ergebnisse. Bei Rezirkulation des 100 mL Kulturüberstands bei einer Flussrate von 3 mL/min wird über einen Zeitraum von 40 min der Kulturüberstand nur einmal vollständig durch das Direct-Modul gepumpt. Dennoch werden bereits 70 % gebunden. Der Kulturüberstand wird in geringer Geschwindigkeit an der Membran vorbeigeleitet, so dass eine hohe Adsorptionseffizienz erzielt wird. Bei einer Beladung des Direct-Moduls mit einer Flussrate von 30 mL/min wird diese Bindungseffizienz bereits nach einer Rezirkulation von 15 min erreicht. Allerdings wurde die Vorlage zu diesem Zeitpunkt bereits 4,5-mal durch das Modul gepumpt. Um hohe Raum-Zeit-Ausbeuten zu erzielen, sind hohe Flussraten zu wählen womit die notwendige Anzahl der Passagen zur Erlangung der maximalen Bindungskapazität schneller erreicht wird.

Die Elution der gebundenen Lipase aGTL erfolgte, wie bereits erwähnt, im Durchlaufmodus an der FPLC (BioLogic AVR7-3, BIO-RAD Laboratories GmbH, München). Zunächst wurde das

Elutionsverhalten des Moduls bei zwei unterschiedlichen Flussraten, 1 mL/min und 8 mL/min, charakterisiert. Nach Auswaschen des restlichen Kulturüberstandes mit 25 mL Bindungspuffer bei einer Flussrate von 5 mL/min erfolgte die Elution über einen Dreistufengradienten. Diese Elutionsmethode wurde zuvor in Abschnitt 4.3.3.2 für das LP 15-Modul optimiert. Das Elutionsvolumen der ersten Stufe betrug 7 mL, während für die beiden nächsten Elutionsstufen jeweils 16 mL Elutionspuffer eingesetzt wurde. Eine genaue Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 6.2.3 beschrieben. Abb. 58 zeigt das Chromatogramm für die Elution der Lipase aGTL bei einer Flussrate von 1 mL/min. Zur Visualisierung des Aufreinigungserfolgs wurden einzelne Elutionsfraktionen entsprechend der im Chromatogramm gekennzeichneten Fraktionsschnittgrenzen auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches in Abb. 59 dargestellt ist.

Im Vergleich zur Aufreinigung der Lipase aGTL über die Mixed-mode Membran im LP 15-Modul, zeigt das partikelgängige Membranadsorber-Modul ein etwas anderes Elutionsverhalten. Bei Elution der Proteine von den Mixed-mode Membranen im LP 15-Modul zeigte sich, dass die unspezifisch gebundenen Proteine im 1. Elutionsschritt bereits vollständig von der Membran eluieren. Die Lipase aGTL-Elution erfolgte dabei einzig bei pH 8 während der dritten Elutionsstufe.

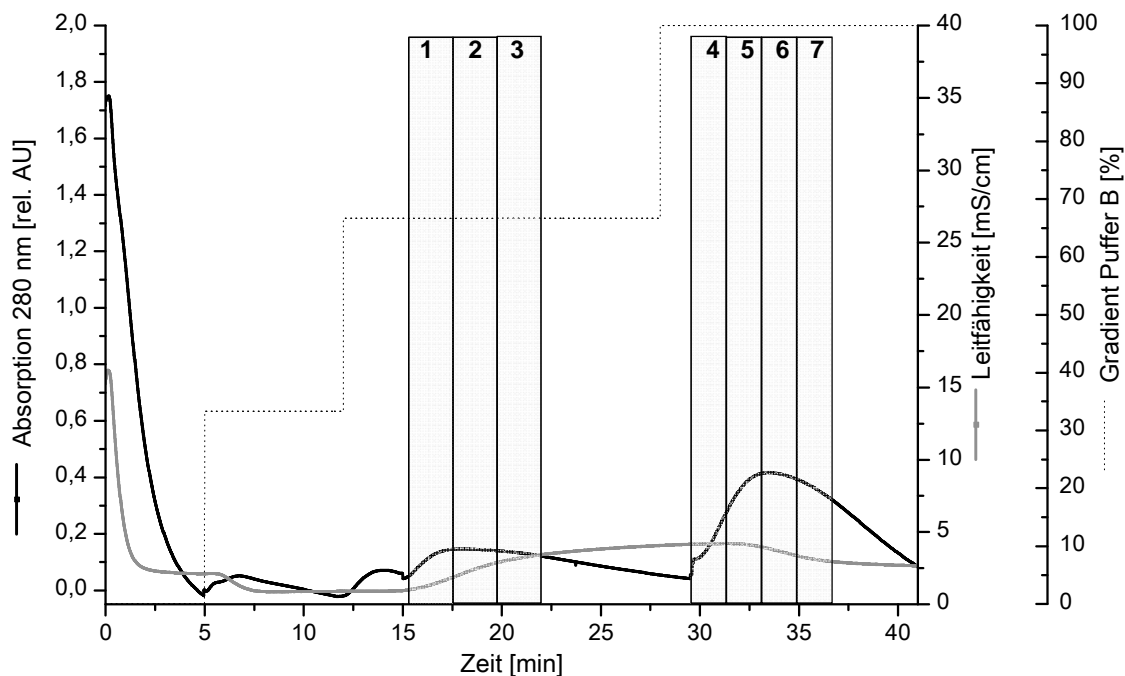


Abb. 58: Aufreinigung der Lipase aGTL aus zellfreiem Kulturüberstand mit dem partikelgängigen Direct-Modul. Das Chromatogramm zeigt die Wasch- und Elutionsschritte im Durchflussverfahren an der FPLC. Waschen des Moduls mit 25 mL Bindungspuffer (25 mM NaAc, pH 5, Flussrate: 5 mL/min). Anschließende Elution mit einer Flussrate von 1 mL/min über einen Dreistufengradienten (Stufe 1: 25 mM MES, pH 6, 7 mL; Stufe 2: 25 mM MES, 50 mM NaCl, pH 6, 16 mL, 3. Stufe: 25 mM Tris, pH 8, 16 mL).

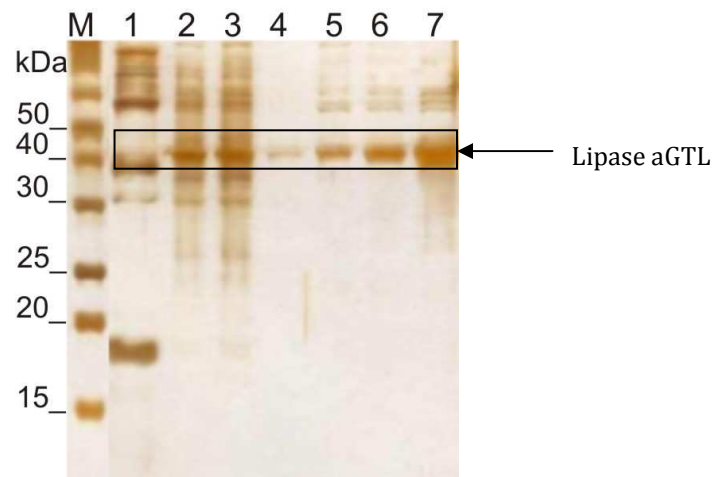


Abb. 59: SDS-PAGE-Gel ausgewählter Elutionsfraktionen entsprechend der Fraktionsschnittgrenzen im Chromatogramm. Bande 1-3: 2. Elutionsfraktion bei pH6 mit 50 mM NaCl, Bande 4-7: 3. Elutionsfraktion bei pH 8. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Im Gegensatz dazu konnte bei der Elution des partikelgängigen Moduls in allen drei Elutionsstufen eine Lipase-Aktivität nachgewiesen werden (vgl. Tab. 16). Für die 1. Elutionsstufe mit pH 6 zeigt das Chromatogramm nur einen sehr kleinen und breiten Peak. Entsprechende Proteine konnten über eine SDS-PAGE nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei der 2. Elution wird ein sehr breiter Elutionpeak erhalten. Hier eluieren hauptsächlich andere Proteine von der Membran, wobei die Lipase-Menge in den Elutionsfraktionen im Verlauf der Elution zunimmt (vgl. Abb. 59 und Tab. 16). Wie zuvor beim LP 15-Modul auch, erfolgt die vorwiegende Lipase-Elution schließlich in der letzten Elutionsstufe bei pH 8.

Das Chromatogramm der Elution zeigt sowohl bei der Elution der Verunreinigungen in den ersten beiden Elutionsschritten als auch bei der Enzymdesorption im dritten Elutionsschritt sehr breite Elutionspeaks. Hierdurch vergrößert sich das Elutionsvolumen und die Konzentration des Zielproteins in der Elutionsfraktion nimmt ab. Bereits bei der Beladung des Direct-Moduls im Rezirkulationsverfahren zeigte sich, dass höhere Flussraten effizienter sind. Daher wurde die Elution im folgendem bei einer Flussrate von 8 mL/min durchgeführt. In Abb. 60 ist beispielhaft ein Chromatogramm für die Elution der Lipase aGTL bei einer Flussrate von 8 mL/min gezeigt. Abb. 61 zeigt die entsprechenden Elutionsfraktionen auf dem SDS-PAGE-Gel. Die Beladung der Membran erfolgte dabei wie zuvor im Rezirkulationsverfahren über 120 min bei 30 mL/min. Anschließend wurde der restliche Kulturüberstand mit 35 mL Bindungspuffer bei einer Flussrate von 5 mL/min ausgewaschen. Die Elution wurde anschließend mit je 4 mL Elutionsvolumen pro Stufe durchgeführt.

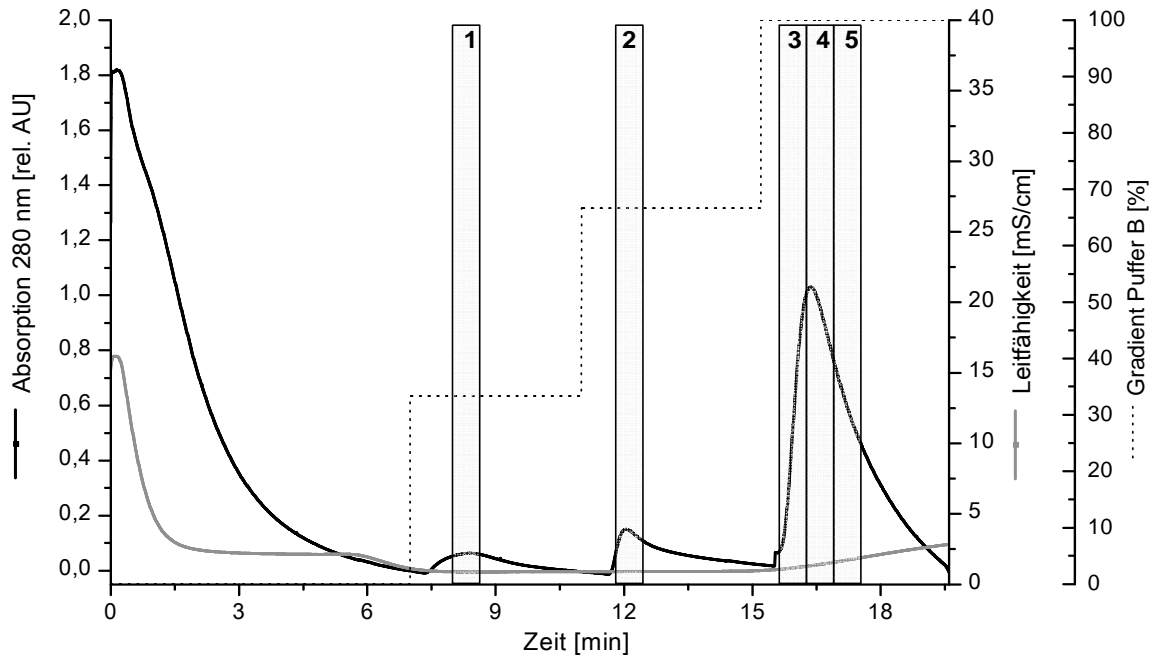


Abb. 60: Isolierung der Lipase aGTL aus zellfreiem Kulturüberstand mit dem partikelgängigen Direct-Modul. Das Chromatogramm zeigt die Wasch- und Elutionsschritte im Durchflussverfahren an der FPLC. Waschen des Moduls mit 35 mL Bindungspuffer (25 mM NaAc, pH 5, Flussrate: 5 mL/min). Anschließende Elution mit einer Flussrate von 8 mL/min über einen Dreistufengradienten mit je 4 mL Elutionsvolumen (Stufe 1: 25 mM MES, pH 6, Stufe 2: 25 mM MES, 50 mM NaCl, pH 6, 3. Stufe: 25 mM Tris, pH 8).

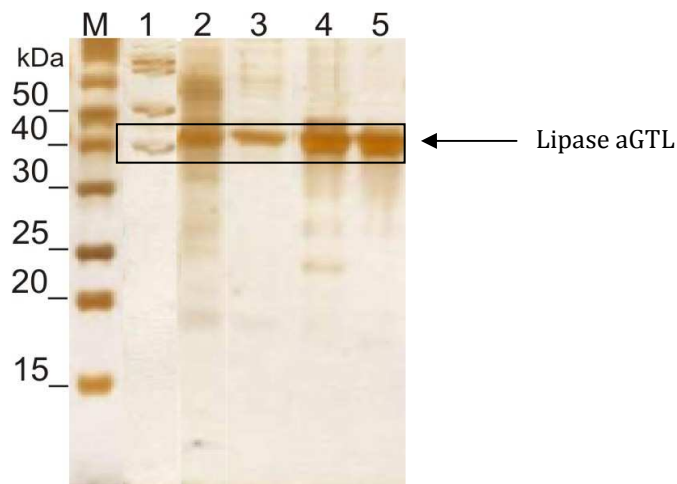


Abb. 61: SDS-PAGE-Gel der Elutionsfraktionen entsprechend der Fraktionsschnittgrenzen im Chromatogramm bei Elution mit 8 mL/min. Bande 1: 1. Elutionsfraktion bei pH 6, Bande 2: 2. Elutionsfraktion bei pH 6 mit 50 mM NaCl, Bande 3-4: 3. Elutionsfraktion bei pH 8. (12%iges Gel nach Silberfärbung)

Durch Elution mit einer Flussrate von 8 mL/min wird das gleiche Elutionsverhalten die zuvor bei 1 mL/min festgestellt. Allerdings führt die Steigerung der Flussrate zur scharfen und hohen Elutionspeaks (vgl. Abb. 60) Auf diese Weise wird das benötigte Elutionsvolumen verringert und das Zielenzym aufkonzentrierter erhalten.

Nach beiden Elutionsvarianten wurden die Elutionsfraktionen der einzelnen Elutionsstufen vereinigt und die Proteinkonzentration sowie die Enzymaktivität in den gepoolten Elutionsfraktionen bestimmt. In Tab. 16 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tab. 16: Aufreinigung der Lipase aGTL aus zellfreiem Kulturüberstand. Übersicht der Ergebnisse.

Flussrate	Elutionsstufe	Proteingehalt	Volumenaktivität	Spez. Aktivität
		[mg/mL]	[U/mL]	[U/mg]
1mL/min	1	2,2	--	--
1mL/min	2	8,5	111,6	13,2
1mL/min	3	12,8	705,7	55,0
8mL/min	1	7,4	--	--
8mL/min	2	8,6	331,1	38,5
8mL/min	3	55,4	3.595,5	64,9

Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer Elution der Lipase aGTL bei hoher Flussrate eine höhere spez. Aktivität des Zielenzym erreicht wird. Eine hohe Flussrate resultiert in eine bessere Auflösung der Elution, wodurch geringere Elutionsvolumina benötigt werden und eine konzentrierte Elution des Zielproduktes erfolgt. Das Lipase-Elutionspeak im Chromatogramm zeigt ein leichtes Tailing. Möglicherweise lässt sich die Elution durch noch höhere Flussraten, weiter optimieren. Vergleichbare Flussraten wie bei der Beladung im Rezirkulationsmodus mit 30 mL/min konnten an der verwendeten FPLC jedoch nicht eingestellt werden.

4.3.4.2. Isolierung der Lipase aGTL aus zellhaltigem Kulturüberstand

Die unzureichende Partikelgängigkeit des Adsorber-Moduls war lange Zeit ein Problem dieser Technologie. Testungen zur Aufreinigung eines Antikörpers aus dem zellhaltigem Überstand zeigten, dass 75 % der Zellen in dem Adsorber-Modul zurückgehalten werden. Die Abnahme der Zellzahl während der Beladung resultierte dabei auf einen mechanischen Zellrückhalt aufgrund der Konstruktion aus Abstandshalter und Adsorbermembran. Ist der Abstandshalter zwischen den Membranwicklungen zu dünn, wird die Partikelgängigkeit des Moduls beeinträchtigt. Zudem erfolgt eine Proteinanreicherung umso schneller je dünner der Abstandshalter ist. Aus diesem Grund sollte die Dicke des Abstandhalters so gewählt werden, dass eine gute Partikelgängigkeit des Moduls bei gleichzeitig schneller Proteinanreicherung sichergestellt ist. Entsprechende Erkenntnisse wurden im Rahmen der Dissertation von A.

Pastor¹¹² gewonnen und ausgehend hiervon die Dicken des Abstandhalters den Anwendungsgebieten des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls angepasst. Hierbei bewährte sich ein Abstandshalter aus Vlies mit einer Dicke von 0,24 mm. Dieser Spacer wurde daher auch in den in dieser Arbeit verwendeten Direct-Modulen mit der Mixed-mode Membran genutzt (vgl. Tab. 14). Nach einer erfolgreichen Aufreinigung der Lipase aGTL aus zellfreiem Kulturüberstand sollte aufbauend aus diesen Versuchen nachfolgend die Aufreinigung der Lipase aGTL aus zellhaltigem Kulturüberstand charakterisiert werden. Aufgrund der zuvor geschriebenen unzureichenden Partikelgängigkeit der Direct-Module zur Beginn ihrer Entwicklung, wurde zunächst das Augenmerk auf den Zellrückhalt während der Isolierung der Lipase aGTL gelegt. Nach erfolgreicher Produktion der Lipase aGTL im Produktionsorganismus *S. carnosus* wird am Ende der Kultivierung im Mittel eine $OD_{600} = 10$ rel. AU erreicht. Aus diesem Grund wurde für die Versuche auf Zellrückhalt 100 mL Kulturmedium auf eine $OD_{600} = 10$ rel. AU eingestellt und über einen Zeitraum von 120 min mit 30 mL/min im Kreis durch das Direct-Modul gepumpt. Währenddessen wurde zu definierten Zeitpunkten 150 μ L Probe aus der zellhaltigen Vorlage genommen und die OD_{600} gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 62 dargestellt.

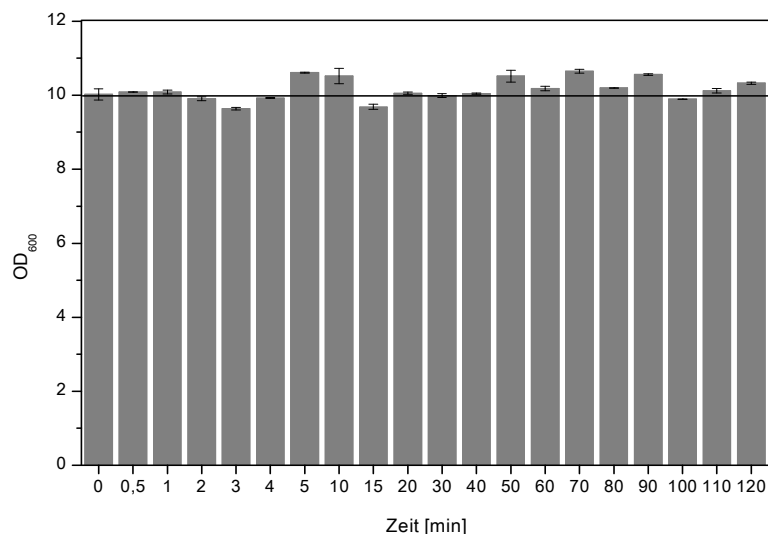


Abb. 62: Untersuchungen zum Zellrückhalt während der Beladung des Direct-Moduls.

Während der gesamten Rezirkulationszeit wird keine Abnahme der OD_{600} beobachtet. Der Abstand zwischen der Adsorbermembran und dem Abstandshalter ist groß genug, um die Zellen nicht in dem Modul zurückzuhalten. Auf diese Weise wird eine Partikelgängigkeit des Membranadsorber-Moduls gewährleistet.

Eine anschließende Aufreinigung der Lipase aGTL aus zellhaltigem Kulturüberstand erfolgte entsprechend der Aufreinigung aus zellfreiem Kulturüberstand. Nach der Kultivierung wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugation abgetrennt und der Kulturüberstand auf eine Anfangsaktivität von 22,1 U/mL aufkonzentriert. Anschließend wurden die Zellen im konzentrierten Kulturüberstand resuspendiert, so dass eine Start-OD₆₀₀ = 10 rel. AU erhalten wurde. Auf diese Weise wurden ideale Ausgangsbedingungen für die Isolierung der Lipase aGTL geschaffen. 100 mL des zellhaltigen Kulturüberstands wurden bei 30 mL/min für 120 min rezirkuliert. Im Gegensatz zu den vorherigen Aufreinigungen aus zellfreiem Kulturüberstand, erfolgte der anschließende Waschschrift nicht an der FPLC, sondern im Durchlaufverfahren mit der Schlaupumpe. In diesem Schritt muss der restliche Kulturüberstand aus dem Direct-Modul gewaschen werden. Die Zellen können eine Verblockung der feinen Schläuche an der FPLC verursachen. Es wurden Fraktionen zu 5 mL aufgefangen und die OD₆₀₀ in diesen Fraktionen gemessen, um sicher zu stellen, dass das Direct-Modul nach dem Waschen frei von Zellen ist. Die anschließende Elution wurde dann an der FPLC über den Dreistufiggradienten bei einer Flussrate von 8 mL/min durchgeführt. Das Chromatogramm dieser Elution ist in Abb. 63 dargestellt.

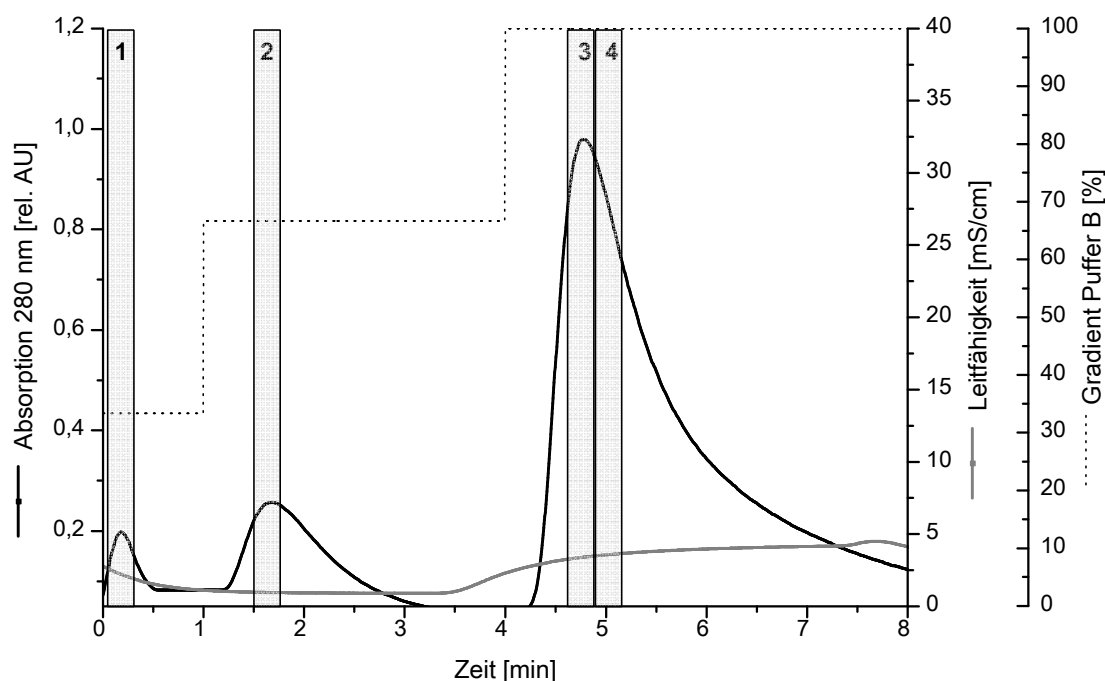


Abb. 63: Aufreinigung der Lipase aGTL aus zellhaltigem Kulturüberstand mit dem partikelgängigen Direct-Modul. Das Chromatogramm zeigt die Elutionsschritte im Durchflussverfahren über einen Dreistufiggradienten an der FPLC bei 8 mL/min (Stufe 1: 25 mM MES, pH 6, 8 mL; Stufe 2: 25 mM MES, 50 mM NaCl, pH 6, 24 mL; 3. Stufe: 25 mM Tris, pH 8, 32 mL).

Der Elutionspeak der Lipase aGTL im dritten Elutionsschritt zeigt ein leichtes Tailing, welches zuvor nicht beobachtet wurde. Wie Abb. 64 und Tab. 17 verdeutlichen hat dieses Tailing aber keine Auswirkungen auf den Aufreinigungserfolg.

Abb. 64 zeigt die Elutionsfraktionen aufgetragen auf ein SDS-PAGE-Gel nach anschließender Silberfärbung. Ebenso ist ein Zymogramm der SDS-PAGE gezeigt. Das Zymogramm weist die Lipase-Aktivität in einem SDS-Gel nach. Die Aktivitätsfärbung basiert hierbei auf der Hydrolyse von Naphthylacetat zu α -Naphthol und Essigsäure. Das entstandene α -Naphthol bildet mit dem Diazoniumsalz Fast Red TR einen unlöslichen, roten Azofarbstoff. Eine genaue Versuchsdurchführung ist im Anhang unter Abschnitt 6.3.3.2 beschrieben.

Das Zymogramm verdeutlicht, dass die Lipase vorwiegend im dritten Elutionsschritt bei pH 8 von der Membran eluiert wird, während in der ersten Elutionsfraktion keine Lipase-Aktivität nachweisbar ist (vgl. Zymogramm, Bande 1).

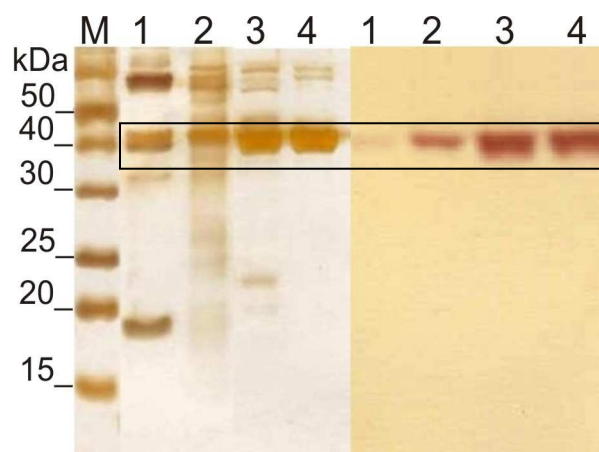


Abb. 64: SDS-PAGE-Gel der Elutionsfraktionen der Aufreinigung der Lipase aGTL aus zellhaltigem Kulturüberstand. Links: 12%iges Gel nach Silberfärbung und rechts: Zymogramm mit Fast Red RT.

Wie zuvor bei der Isolierung der Lipase aGTL aus zellfreiem Überstand wird die Lipase aGTL auch bei einer direkten Aufreinigung aus zellhaltigem Kulturüberstand mit hoher Selektivität gewonnen. Die Zellen haben dementsprechend keinen Einfluss auf den Aufreinigungserfolg eines Proteins bei einer direkten Isolierung des Proteins aus zellhaltigem Kulturüberstand. In Tab. 17 sind die Daten dieser Aufreinigung zusammengefasst. Unabhängig von der Partikelhaltigkeit des Kulturüberstands werden mit ca. 61 U/mg vergleichbare spezifische Aktivitäten nach der Isolierung der Lipase aGTL mit dem Direct-Modul erhalten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine direkte Isolierung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand möglich ist. Eine Partikelgängigkeit des Moduls ist dabei gewährleistet, ohne dass Effizienz und Selektivität der Enzymisolierung beeinträchtigt wird.

Tab. 17: Aufreinigung der Lipase aGTL aus zellhaltigem Kulturüberstand.

Elutionsstufe	Proteingehalt	Volumenaktivität	Spez. Aktivität
	[mg]	[U]	[U/mg]
1	4,6	3,7	0,79
2	2,2	66,22	30,1
3	14,5	883,7	61,0

4.3.4.3. Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurde ein Aufreinigungsverfahren zur direkten Isolierung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand entwickelt. Dazu wurde ein partikelgängiges Membranadsorber-Modul basierend auf der Mixed-mode Membran verwendet.

Zur Charakterisierung des Einflusses der Zellen auf die Aufreinigungsperformance, erfolgte die Aufreinigung der Lipase aGTL vergleichend aus zellfreiem und zellhaltigem Kulturüberstand. Es ist festgestellt worden, dass eine direkte Adsorption der Lipase aus dem zellfreien Kulturüberstand bei pH 5 im Rezirkulationsmodus zur keiner signifikanten Abnahme der Lipase-Konzentration im Überstand führt, da die Enzymkonzentration im Überstand zu gering ist. Positiv zeigte sich hingegen eine vorangehende Aufkonzentrierung des Kulturüberstandes um den Faktor 10. Unter dieser Bedingung binden bei einer Flussrate von 30 mL/min nach 40-minütiger Rezirkulationszeit 93 % der insgesamt bindenden Enzymmenge. Zur Desorption der gebundenen Enzyme bewährte sich eine Elution im Durchlaufverfahren bei einer Flussrate von 8 mL/min. Über pH-shift mit einem Dreistufengradienten war es möglich die Lipase aGTL in fast reiner Form zu eluieren. Dabei wurde die Lipase vorwiegend im dritten Elutionsschritt bei pH 8 mit einer spez. Aktivität von 64,9 U/mg desorbiert. Eine vergleichbare spez. Aktivität wurde bei der vergleichbaren Aufreinigung der Lipase aGTL aus konzentriertem, zellhaltigem Überstand erzielt. Die Lipase aGTL konnte mit gleicher Effizienz und Selektivität aus dem zellhaltigem Kulturüberstand isoliert, wie es bei der Isolierung aus zellfreiem Überstand der Fall war. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Zellen keinen Einfluss auf die Aufreinigungsperformance ausüben. Entsprechend wurde während der Beladung des Direct-Moduls mit zellhaltigem Kulturüberstand keine Abnahme der optischen Dichte beobachtet. Es bleibt jedoch anzumerken, dass stets eine Konzentrierung des Kulturüberstands nötig war, um eine erfolgreiche Adsorption der Lipase aGTL zu garantieren. Eine wirklich direkte Aufreinigung der Lipase aGTL kann daher nur gewährleistet werden, wenn größere Mengen Lipase aGTL in den Kulturüberstand sekretiert werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Der Einsatz von Enzymen in industriellen Prozessen wird gegenwärtig immer bedeutungsvoller. Ihre Substrat- und Regiospezifität sowie die Enantioselektivität machen Enzyme in ökonomischer und ökologischer Sicht zunehmend interessanter. Aufgrund der heutzutage zugänglichen gentechnischen und molekularbiologische Methoden zur zielgerechten Optimierung von Enzymen, ist ihr Potential als Biokatalysatoren noch bei weitem nicht voll ausgeschöpft. Angesichts dessen steigt das Interesse an effizienten Aufreinigungsprozessen zur Isolierung biotechnologisch hergestellter Enzyme und es besteht die Notwendigkeit in neue Aufreinigungsmethoden zu investieren.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit Aufreinigungsverfahren zur Isolierung von Enzyme unterschiedlicher Enzymklassen aus Zellysaten und Fermentationsbrühen auf Basis der Membranadsorbentechnologie entwickelt. Membranadsorber der Firma Sartorius Stedim Biotech, Göttingen wurden im Hinblick auf eine schnelle und effiziente Enzymisolierung untersucht, wobei unterschiedliche Membranfunktionalität getestet wurden. Penicillin G Amidase, Cellulase Cel5A und Lipase aGTL wurden dabei als Modellenzyme für die technisch relevanten Enzymklassen Amidasen, Esterasen und Hydrolasen ausgewählt. Diese wurden unter Ausnutzung ihrer physikochemischen und biologischen Eigenschaften jeweils über eine spezielle Chromatographie-Art aufgereinigt. Neben den entsprechenden ionischen, hydrophoben oder Affinitäts-Wechselwirkungen wurden auch Aspekte wie die Salztoleranz der Adsorber-membranen und die Abhängigkeit der dynamischen Bindungskapazität von der Membranmodifikation mit in die Untersuchungen einbezogen. Auf diese Weise konnte für jedes Modellenzym ein optimierter Aufreinigungsprozess entwickelt werden, bei dem das Zielenzym in wenigen Schritten fast rein von weiteren Proteinen abgetrennt wurde.

Im Folgenden werden die Aufreinigungserfolge für jedes Enzym zusammengefasst und ein Ausblick für weiterführende Untersuchungen gegeben.

Penicillin G Amidase

Die Penicillin G Amidase wurde über Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung unterschiedlicher Ionenaustauscher-Membranadsorber aus dem Zellysate isoliert. In Hochdurchsatz-Screenings im Mikroliter-Maßstab wurden die Bindungs- und Elutionsbedingungen des Enzyms zunächst an einen starken Anionenaustauscher (Q-Membran) und an einen starken Kationenaustauscher (S-Membran) untersucht. Die pH-Abhängigkeit der

Adsorption wurde charakterisiert und die Aufreinigungseffizienz anhand der Selektivität bewertet. Die Penicillin G Amidase konnte erfolgreich an beide Ionenaustauscher-Membranen adsorbiert werden. Aufgrund einhergehender Bindungen von weiteren Proteinen aus dem Zellysate an den starken Anionenaustauscher, war es nicht möglich, hinsichtlich der Penicillin G Amidase eine Trennleistung über die Q-Membran zu erzielen. Mit dem Kationenaustauscher wurde dagegen eine sehr hohe Selektivität erzielt. Bei Adsorption der Penicillin G Amidase bei pH 6 an die S-Membran erfolgt hauptsächlich die Adsorption des Zielenzym an die Membran. Nur wenige weitere Proteine aus dem Zellysate binden, die durch eine separate Elution abgetrennt werden können. Die Elution der Penicillin G Amidase erfolgt bei gleichbleibendem pH-Wert mit 50 mM NaCl. Bei höheren Ionenstärken desorbieren weitere an der Membran gebundene Proteine. Salztolerante Kationenaustauscher-Membranen zeigten sich ebenfalls verwendbar für eine selektive Aufreinigung der Penicillin G Amidase aus dem Zellysate. Während die Enzymadsorptionen an die klassischen Adsorbermembranen bei sehr geringen Ionenstärken von 25 mM erfolgten, konnte gezeigt werden, dass im Fall der salztoleranten Mixed-mode Membran problemlos Ionenstärken von 100 mM eingesetzt werden können. Dabei wies die Mixed-mode Membran eine höhere maximale Bindungskapazität ($Q_{\max} = 1,67 \text{ mg/cm}^2$) auf, als die klassische S-Membran, dessen maximale Bindungskapazität $Q_{\max} = 0,97 \text{ mg/cm}^2$ betrug. Die Bindungskapazität ist ein Maß für die Leistungsfähigkeit einer adsorptiven Membran. Es wird gegenwärtig stetig geforscht, um die Bindungskapazitäten der Adsorbermembran zu steigern und damit entsprechend die Membranadsorber effizienter zu machen. Ein Ansatz, der dabei verfolgt wird, ist der Einsatz einer Membran auf doppelporöser statt auf gefropfter Membranbasis. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindungskapazität der S-Membran auf doppelporöser Membranbasis vergleichend zur Bindungskapazität der gefropften S-Membran bestimmt. Die doppelporöse S-Membran zeichnet sich durch eine 2,5-fach höhere Kapazität aus. 2,48 mg/cm^2 Penicillin G Amidase konnten unter Verwendung dieser Membran gebunden werden. Die entsprechenden Durchbruchkurven der Membranen zeigten, dass die gefropfte S-Membran hinsichtlich einer Proteinabtrennung bzw. -isolierung effizienter ist, als die doppelporöse Membran. Die Durchbruchkurve der gefropften S-Membran weist eine höhere Steigung auf (s. Abb. 12), wodurch eine höhere Auflösung bei der Proteinabtrennung möglich ist. Nicht zuletzt aus diesem Grund wurde die gefropfte S-Membran als Standard-Membran für die Aufreinigung der Penicillin G Amidase gewählt.

Die im Screening ermittelten Aufreinigungsbedingungen zur Isolation der Penicillin G Amidase über die klassische S-Membran konnten erfolgreich auf eine Membranfläche von 15 cm^2 übertragen werden. Die optimierte Elutionsstrategie basierte dabei auf einem Dreistufengradienten mit 50 mM, 200 mM und 1 M NaCl, wobei die Penicillin G Amidase

entsprechend der Screening-Daten im ersten Elutionsschritt mit einer Restaktivität von 83 % eluierte. Auf diese Weise wurde ein Reinigungsfaktor von 101,3 erzielt (vgl. Tab. 4). Die maximale dynamische Bindungskapazität der S-Membran betrug $Q_{\max} = 0,95 \text{ mg/cm}^2$.

In weiterführenden Arbeiten wäre es sinnvoll die Membranadsorber auf doppelporöser Membranbasis hinsichtlich ihres Durchbruchverhaltens näher zu charakterisieren und zu optimieren. Aufgrund der deutlich höheren Kapazität dieser Membran ist sie im Hinblick auf eine effizientere Aufreinigung der Penicillin G Amidase sehr interessant und sollte auch speziell für die Isolierung der Penicillin G Amidase weiter charakterisiert werden. Zudem wäre ein nächster Schritt in zukünftigen Arbeiten die Aufreinigung der Penicillin G Amidase auf größere Maßstäbe zu übertragen, wobei Membranflächen bis zu 1.000 cm^2 angestrebt werden sollten. Voraussetzung hierfür wäre allerdings eine entsprechende Produktion der Penicillin G Amidase in *E-coli* im Technikumsmaßstab.

Cellulase Cel5A

Die Cellulase Cel5A trägt einen His-tag und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit über die Metallchelate-Chromatographie aus dem Zellysate isoliert. Entsprechende Membranadsorber der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, die für diese Arbeiten verwendet wurden basieren auf Membranen, die mit Iminodiessigsäure funktionalisiert sind (IDA-Membran). Zur Aufreinigung der Cellulase Cel5A über diese Chromatographie-Art wurden die Metallionen Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} auf ihrer Bindungseffizienz hin untersucht. Unabhängig von verwendeten Metallion wurde festgestellt, dass eine Adsorption des Enzyms bei pH 6 am effektivsten erfolgt. Eine Elution wurde dagegen bei pH 8 als am geeignetsten empfunden. Untersuchungen zur optimalen Bindungsbedingung zeigten, dass die Cellulase in Gegenwart von 20 mM Imidazol an die mit Co^{2+} oder Zn^{2+} funktionalisierte IDA-Membran gebunden werden kann, so dass eine Bindung weiterer Proteine an die Membran vermieden wird. Für die Ni^{2+} und Cu^{2+} Membran gelang dies nicht. Auf diese Weise wurde die effizienteste Aufreinigungsstrategie zur Isolierung der Cellulase Cel5A aus dem Zellysate über die Zn^{2+} -Membran erzielt. Dies Ergebnis war im Labormaßstab reproduzierbar: Bei Adsorption des Zielenzym mit 20 mM Imidazol im Zellysate bindet nur die Cellulase Cel5A über ihren His-Tag an die IDA-Membran und kann über einen linearen Imidazolgradienten mit einem Reinigungsfaktor von 4,1 von der Membran eluiert werden (vgl. Tab. 7).

Ebenso wie bei der S-Membran war auch bei der IDA-Membran eine Steigerung der Bindungskapazität durch Verwendung der entsprechenden doppelporösen Membran möglich. Für die Adsorption der Cellulase Cel5A konnte die Bindungskapazität von $Q_{\max} = 0,54 \text{ mg/cm}^2$ um das 3,6-fache auf $Q_{\max} = 1,97 \text{ mg/cm}^2$ gesteigert werden. Aufgrund der sehr geringen

Kapazität der gepfropften IDA-Membran sollte der Ansatz der doppelporösen IDA-Membran in Zukunft weiter verfolgt werden. Die IMAC-Chromatographie ist speziell im Hinblick auf eine Aufreinigung therapeutischer oder diagnostischer Proteine interessant. Dementsprechend sollte die Kapazitätsoptimierung der IDA-Membran weiter verfolgt werden.

Eine Untersuchung der Membranintegrität nach Aufreinigung der Cellulase Cel5A über die aus Cellulose bestehenden Adsorbermembranen zeigten keinen enzymatischen Verdau der Membran. In rasterelektronischen Aufnahmen war auch nach einer Behandlung der Membran mit der Cellulase über einen Zeitraum von 24 h keine Änderungen der Porenstruktur zu erkennen. Da dieses Modellenzym keine kohlenhydratbindende Domäne besitzt ist sie nicht in der Lage unlösliche Cellulose abzubauen. Cellulasen, die diese Domäne aufweisen, bauen dagegen unlösliche Cellulose ab. Entsprechende Untersuchungen mit einer Cellulase Cel5 zeigten, dass dieses Enzym Cellulosefasern von der Membran ablöst.

Lipase aGTL

Die Lipase aGTL ist das einzige der in dieser Arbeit verwendeten Modellenzyme, welches in den Überstand sekretiert wird. Genau vor diesem Hintergrund wurde die Lipase aGTL in diesen Arbeiten einbezogen. Für dieses Modellenzym wurde im Rahmen dieser Arbeit ein vollständiger Produktionsprozess des Enzyms von der Kultivierung bis zur direkten Isolierung aus dem zellhaltigen Kulturüberstand mit einem partikelgängigen Membranadsorbermodul entwickelt. Durch Integration mehrerer Prozessschritte in einen Prozessschritt werden Aufreinigungsverfahren effizienter und kostengünstiger gestaltet. Eine ausreichende Sekretion des Zielenzym in den Kulturüberstand ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche direkte Enzymisolierung. Daher wurde die Lipase aGTL-Produktion im rekombinanten Produktionsstamm *Staphylococcus carnosus* im Vorfeld näher untersucht. Durch Optimierung und Charakterisierung der Kulturparameter Nährmedium, Kultivierungstemperatur, Schüttelgeschwindigkeit, Induktorkonzentration und Kultivierungszeit wurde die Lipase aGTL-Produktion im *Staphylococcus carnosus* erfolgreich optimiert. Nach einer Kultivierungszeit von 27 h wird mit 10,34 U/mL die maximale Lipase aGTL-Aktivität erreicht. Vor der Optimierung wurden Enzymaktivitäten von 2,5 U/mL erzielt, so dass eine Produktivitätssteigerung um den Faktor 4 erreicht werden konnte.

Im Anschluss wurden zwei Membranfunktionalitäten auf ihre Eignung zur Isolierung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand untersucht. Für die Aufreinigung der Lipase über hydrophobe Wechselwirkungen an eine Phenyl-Membran wurde im Mikroliter-Maßstab die optimalen Bindungs- und Elutionsbedingungen an die Membran bestimmt. Dabei wurde

festgestellt, dass die Lipase in Gegenwart von 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ an die Membran adsorbiert und in Abwesenheit von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wieder eluiert werden kann. Eine anschließende Aufreinigung im Milliliter-Maßstab war nicht erfolgreich. Die Lipase aGTL konnte hier nicht wieder von der Membran eluiert werden. Nach weiterer Optimierung der Elutionsbedingungen gelang die Elution der Lipase aGTL mit 250 mM Arginin.

Als Alternative zur Phenyl-Membran wurden Bindungsbedingungen der Lipase aGTL an eine Mixed-mode Membran bestimmt. Diese Membran ist eine salztolerante Kationenaustauscher-Membran, wobei die Salztoleranz durch Einbringung hydrophober Gruppen erreicht wurde. Die optimale Bindungsbedingung der Lipase an die Membran wurde durch Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Adsorption bestimmt. Bei pH 5 wurde die effektivste Adsorption beobachtet. Bei anschließender Bestimmung der optimalen Elutionsbedingung zeigte sich, dass eine separate Elution der Lipase aGTL sowohl mit einem monovalenten Puffer bei pH 6 und einem ansteigenden NaCl-Gradienten möglich ist, als auch über pH-shift. Eine Elution über pH-shift konnte schließlich im Labormaßstab optimiert werden. Bei einer ersten Elution mit einem monovalenten Puffer bei pH 6 werden zunächst weitere an der Membran gebundene Proteine vollständig von der Membran eluiert. Im Anschluss erfolgt die Lipase Elution bei pH 8. Auf diese Weise war es möglich die Lipase in hohen Ausbeuten und hoher Reinheit von der Mixed-mode Membran zu eluieren. Die dynamische Bindungskapazität betrug $Q_{\max} = 1,86 \text{ mg/cm}^2$. Ein Vergleich dieser Aufreinigungsstrategie zur Aufreinigung der Lipase aGTL über die Phenyl-Membran zeigt, dass mit der Mixed-mode Membran höhere Reinigungsfaktoren erzielt werden. Für die Aufreinigung der Lipase über die Phenyl-Membran liegt der Reinigungsfaktor bei 3, während für die Isolierung des Enzyms über die Mixed-mode Membran ein Reinigungsfaktor von 6 erreicht wird.

Entsprechend dieser Ergebnisse wurden Direct-Module mit der Mixed-mode Membran aufgebaut. Im Hinblick auf eine schnelle und effiziente Isolierung der Lipase aGTL aus dem Kulturüberstand wurden vergleichend Isolierungen der Lipase aGTL aus zellfreiem und zellhaltigem Kulturüberstand durchgeführt. Während der Beladung des Direct-Moduls mit zellhaltigem Kulturüberstand wurde durch Messungen der optischen Dichte die Partikelgängigkeit des Moduls untersucht. Die optische Dichte blieb über den gesamten Beladungszeitraum konstant. Damit konnte ein Zellrückhalt in dem Modul ausgeschlossen werden. Ebenso wurde deutlich, dass die Anwesenheit der Zellen während der Lipase aGTL-Isolierung keinen Einfluss auf die Aufreinigungseffizienz hat. Unabhängig von der Partikelhaltigkeit des Kulturüberstands während der Enzymisolierung werden gleiche spezifische Aktivitäten der Lipase aGTL nach der Isolierung mit dem Direct Modul erhalten. Diese lagen bei ca. 60 U/mg. Zur erfolgreichen Adsorption der Lipase aGTL aus dem

Kulturüberstand war es allerdings notwendig diesem um den Faktor 10 aufzukonzentrieren. Eine direkte Aufreinigung des Enzyms aus dem verdünnten Kulturüberstand war aufgrund der zu geringen Enzymkonzentration nicht möglich.

Die Aufreinigung der Lipase aGTL über partikelgängige Membranadsorbmodule zeigt großes Potential. Ziel zukünftiger Arbeiten sollte eine Übertragung und Optimierung der Schüttelkolben-Kultivierung des *Staphylococcus carnosus* auf größere Fermenter-Kultivierungen sein. Nach erfolgreichem scale-up der Lipase aGTL-Isolierung über das Direct-Modul, kann dieses direkt einer Fermenterkultivierung nach geschaltet werden. Bevor entsprechende scale-up Versuche in zukünftigen Arbeiten durchgeführt werden, sollten zunächst Versuche zur Lebensdauer des Moduls angestellt werden.

6. Anhang

6.1. Bakterienstämme

6.1.2. *E.coli* 5K pHM12 (Penicillin G Amidase)

Der Stamm *E. coli* 5KpHM12 wurde erstmals 1980 beschrieben. Die Gene des Plasmids pHM12 kodieren für die intrazelluläre Bildung des Enzyms Penicillin G Amidase (EC-Nr. 3.5.1.11) [20]. Im Vergleich zum Wildtyp *E. coli* ATCC 11105 weist der *E. coli* Stamm 5KpHM12 mit Tetracyclin-Resistenz eine 45-fach höhere Penicillin G Amidase-Aktivität auf ¹²⁸.

Kultivierung im Schüttelkolben

Aus den Gefrierkulturen wurden Übernacht-Vorkulturen im 100 mL Schüttelkolben angesetzt: 20 mL LB-Medium, Tetracyclin (10 µg/mL) und 100 µL Gefrierkultur.

Mit 1 mL dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur angeimpft. 100 mL LB-Medium mit den entsprechenden Zusätzen (vgl. Abschnitt 6.1.6) wurden im 500 mL-Schüttelkolben vorgelegt und mit Tetracyclin (10 µg/mL) versetzt. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 5,5 und 6,0 bei 30 °C und 130 rpm inkubiert. Alle Kultivierungsarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Zellaufschluss

Nach der Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation für 30 min bei 4000 *g* bei 4 °C geerntet. Die Zellpellets aus 50 mL Kulturbrühe wurden in 10 mL NPP resuspendiert und somit um den Faktor 5 aufkonzentriert. Zum Erhalt der biologischen Aktivität ist es besonders wichtig, dass während des gesamten Aufschluss-Prozesses die Proben gekühlt werden. Vor dem Aufschluss wurde die Zellsuspension daher für 30 min bei 4 °C eingekühlt. Der Aufschluss erfolgte anschließend in 5 mL-Fractionen mittels Ultraschall (90 W, 0,6 s Pulsdauer) unter Eiskühlung für 4 x 30 Sekunden mit jeweils einer 60 sekundigen Pause zum Abkühlen der Probe. Im Anschluss wurden die so erhaltenen Zellrohextrakte bei 4 °C abzentrifugiert (17000 *g*, 25 min).

6.1.3. *E.coli* (Cellulase Cel5A)

Der *E. coli*-Stamm M15 zur Produktion der Cellulase Cel5A wurde von der TUHH zur Verfügung gestellt. Das Gen cel5A der Cellulase Cel5A aus *Fervidobacterium gondwanense* wurde mit einer Ampicillinresistenz in *E. coli* M15 kloniert. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur und dem pH-Wert sind in Abb. 65 dargestellt.

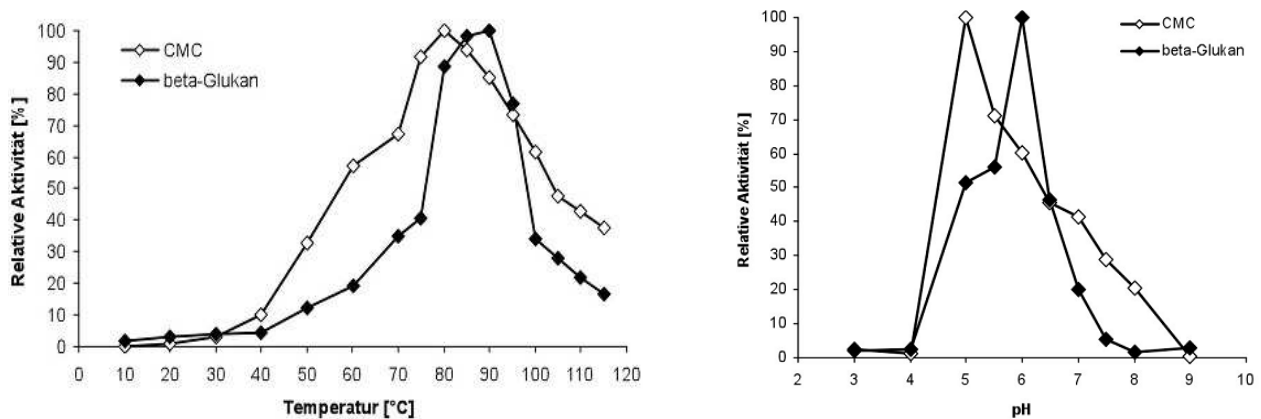


Abb. 65: Abhängigkeit der Enzymaktivität der Cellulase Cel5A von der Temperatur (links) und dem pH-Wert (rechts).¹¹⁶

Kultivierung im Schüttelkolben

Zunächst wurde eine Übernacht-Vorkultur angesetzt: 20 mL LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) wurden mit 100 µL Gefrierkultur angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 mL Kulturmedium mit 100 µg/mL Ampicillin im 500 mL Schüttelkolben mit 1 mL Vorkultur angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 angezogen und mit IPTG (1 mM Endkonzentration) die Proteinexpression induziert. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation (25 min, 4000 g) geerntet.

Zellaufschluss

Nach Resuspension der Zellen in 50 mM NaAc-Puffer, pH 6 wurden diese in 5 mL Fraktionen (Zellen aus 50 mL Kulturbrühe) mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte unter Eiskühlung für 2 x 4 min bei einem 50% Intervall. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 4 °C abzentrifugiert (17000 g, 25 min).

6.1.4. Staphylococcus carnosus (Lipase aGTL)

Der Organismus *Staphylococcus carnosus* (*S.carnosus*), welcher die thermostabile Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* (GTL) produziert, wurde von der Universität Greiswald zur Verfügung gestellt. Zur Expression der Lipase aGTL in einem heterologen Host-Organismus wie *S.carnosus* wurde die Lipase GTL mit ihrem authentischen Signalpeptid (aGTL) in den pXR100 Vektor umklontiert und mit der Ribosomenbindestelle der Lipase aus *S.hyicus* versehen. Bei dem Signalpeptid der Lipase GTL handelt es sich um eine typische Sec-abhängige Signalsequenz und daher eine Sekretion in *S.carnosus* vermittelt. Der *S.carnosus* Wildtyp Stamm TM300 wurde schließlich nach Sequenzierung der Genfusion mit dem neu entstandenen Vektor pXR-aGTL

transformiert. Der neu transformierte Wirtssystem besitzt eine plasmidkodierte Chloramphenicol-Resistenz und sekretiert die Lipase aGTL in den Kulturüberstand ¹²².

Kultivierung im Schüttelkolben

Zur Produktion der Lipase aGTL wurden der *S.carnosus* in 500 mL- oder 1000 mL-Schüttelkolben kultiviert.

Für eine Vorkultur wurden 20 mL LB-Medium mit 15 µg/mL Chloramphenicol versetzt und mit 100 µL Gefrierkultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 130 rpm über Nacht inkubiert. Soweit nicht anders aufgeführt, wurden 100 mL oder 300 mL Hauptkultur (versetzt mit 15 µg/mL Chlor-amphenicol) mit der Vorkultur auf eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0,06 angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 - 0,8 wurde mit 0,5 %-ige Xylose induziert und für weitere 24 h inkubiert. Nach Beenden der Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 4000 g abgetrennt und der Lipasehaltige Kulturüberstand mit der Vivaflow 50-Einheit aufkonzentriert.

6.1.5. Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD₆₀₀) der Zellsuspension wird als Extinktion gegen eine 0,9 %-ige NaCl-Lösung bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem gemessen. Vor der Messung wird die Kulturprobe mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt, so dass die Messung im Bereich zwischen 0,05 und 0,8 liegt, um gemäß dem Lambert-Beer'schen Strahlungsintensitätsgesetz einen linearen Zusammenhang zwischen gemessener Extinktion und vorliegender Zellkonzentration zu Grunde legen zu können. Um Verdünnungsfehler zu minimieren, werden jeweils drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

6.1.6. Gefrierkulturen

Für die Langzeitlagerung der Stämme werden Gefrierkulturen angelegt. Dafür werden 100 mL LB-Medium mit doppelter Antibiotikakonzentration (Tetracyclin: 20 mg/L, Ampicillin: 150 mg/L) in einem 500 mL-Schüttelkolben mit 2 Schikanen mit 1000 µL Zellkultur angeimpft und 6 h bei 37 °C und 130 rpm im Brutschrank bis zu einer OD₆₀₀ von 4 inkubiert. Anschließend werden jeweils 10 mL dieser Kultur mit 10 mL Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert. Alle Kultivierungsarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

6.1.7. Verwendete Medien

LB-Medium

10 g/L Bacto-Trypton

5 g/L Hefeextrakt

10 g/L NaCl

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

Die Lösung wird anschließend für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Zusätze für E. coli 5K pHM12 (pro Liter:)

Thiamin · HCl 10 mg

Glycin 100 mg

Glucose 1000 mg

BHIS-Medium

37,0 g/L Brain Heart Infusion (BHI)

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,2 eingestellt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

CgXII-Medium

15,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5,0 g/L Harnstoff

3,92 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

4,87 g/L $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1,0 g/L NaCl

1,0 mL Spurensalzlösung (s.u.)

Mit d H₂O auf 1 L auffüllen und den pH-Wert auf 7,0 einstellen.

Für 20 min bei 121 °C autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren werden die unten stehenden Substanzen zugegeben

Zusätze nach dem Autoklavieren:

1 mL CaCl₂-Lösung 1 % (w/v)

1 mL Biotin-Lösung 0,02 % (w/v)

1 mL Thiamin-Lösung 1 % (w/v)

1 mL Natrium-3,4dihydroxybenzoat 3 % (w/v)

40 mL Glukose-Lösung 50 % (w/v)

Spurensalzlösung :

1000 mg FeSO₄·7H₂O

1000 mg MgSO₄·7H₂O

100 mg ZnSO₄·7H₂O

20mg CuSO₄

2 mg NiCl₂·6H₂O

In 100 mL dH₂O lösen

6.2. Versuchsdurchführungen

6.2.2. Hochdurchsatz-Screening

Zur Ermittlung der Bindungsselektivität und Bestimmung geeigneter Bindungs- und elutionsbedingungen wurden Zentrifugaleinheiten (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) verschiedener Membranen verwendet (vgl. Abb. 66).

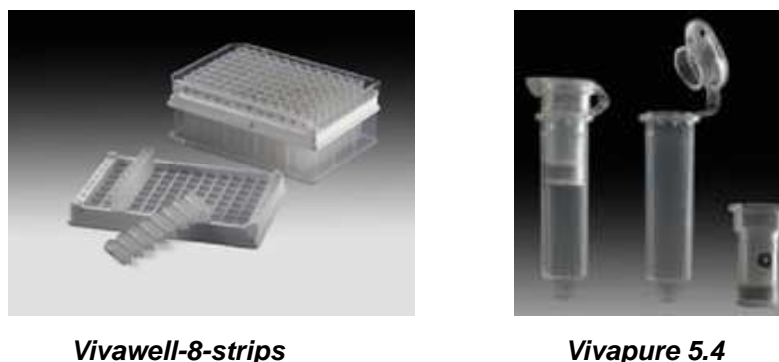


Abb. 66: Membranadsorber-Zentrifugaleinheiten zur Proteinaufreinigung im Mikroliter-Maßstab.

Abhängig von der Membranfunktionalität wurden nachfolgende Bindungs- und Elutionpuffer verwendet:

Vivawell 8-strips Q und S (15-lagig)

Q: starker Anionenaustauscher

S: starker Kationenaustauscher

Bindungspuffer

Tab. 18: Bindungspuffer für Ionenaustauscher-Membranen.

Ionenaustauscher-Membranen			Salztolerante Kationenaustauscher-Membranen	
pH-Wert	Bindungspuffer Anionenaustauscher	Bindungspuffer Kationenaustauscher	Monovalente Bindungspuffer	Multivalente Bindungspuffer
pH 4	25 mM NaAc	---	---	---
pH 5	25 mM NaAc	---	---	---
pH 6	25 mM KPP	25 mM KPP	100 mM MES	100 mM KPP
pH 7	25 mM KPP	25 mM KPP	100 mM MES	100 mM KPP
pH 8	---	25 mM Tris	100 mM Tris	100 mM KPP
pH 9	---	25 mM Tris	100 mM Tris	100 mM Na ₂ CO ₃
pH 10	---	25 mM Na ₂ CO ₃	100 mM CAPS	100 mM Na ₂ CO ₃

Elutionspuffer = Bindungspuffer + NaCl

Empfehlung: alle Bindungspuffer + 1 M NaCl
und durch verdünnen mit Bindungspuffer auf gewünschte Konzentration
einstellen.

Vivqwell-8-strips IDA (15-lagig)

Verwendete Puffer und Lösungen:

Equilibrierungspuffer: 100 mM NaAc, 500 mM NaCl, pH 4,5
Bindungs-/Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 8
Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 0 - 200 mM Imidazol, pH 8
und 50 mM NaAc, 500 mM NaCl, 0 - 200 mM Imidazol, pH 6

Metall-Salz-Lösungen:

Ni²⁺: 0,5 M Nickelsulfat (NiSO₄· 6 H₂O) in Equilibrierungspuffer
Co²⁺: 0,5 M Cobaltchlorid (CoCl₂· 6 H₂O) in Equilibrierungspuffer
Cu²⁺: 0,5 M Kupfersulfat (CuSO₄· 5 H₂O) in Equilibrierungspuffer
Zn²⁺: 0,5 M Zinksulfat (ZnSO₄· 7 H₂O) in Equilibrierungspuffer

Vivapure 5,4 Phenyl (10-lagig)

Verwendete Puffer und Lösungen:

Bindungs-/Waschpuffer: 50 mM KPP, pH 7 + verschiedene Konzentrationen an (NH₄)₂SO₄
Elutionspuffer: 50 mM KPP, pH 7

Die Durchführung des Screenings beruht unabhängig vom Membran-Typ auf dem gleichen Prinzip. Die IDA-Membranen müssen zur Aufreinigung des His-Tag Enzyms zuvor mit Metallionen beladen werden. Dieser Schritt entfällt bei einer Aufreinigung über Ionenaustauscher- und Phenyl-Membran.

Beladen der IDA-Membran mit Metall-Ionen

- Equilibrieren der Membran mit 300 µL Equilibrierungspuffer, 3 min zentrifugieren bei 1200 g
- Beladung der Membran zweimal mit je 300 µL Metalllösung, 3 min bei 1200 g zentrifugieren

- Zur Entfernung ungebundener Metallionen die Membran zweimal mit 300 μL des Equilibrierungspuffers waschen; 3 min bei 1200 g zentrifugieren

Durchführung der Aufreinigung (für alle Membranen):

- Equilibrieren der Membran der jeweiligen Zentrifugeneinheit zweimal mit 300 μL bzw. 500 μL des jeweiligen Bindungspuffers; 3 min bei 1200 g zentrifugieren
- Zur Enzymbeladung dreimal je 300 μL bzw. 500 μL der Probe auf die Membran geben und 1200 g , 3 min zentrifugieren.
- Zur Entfernung ungebundene Proteine die Membran zweimal mit 300 μL bzw. 500 μL des entsprechenden Bindungspuffers waschen; 3 min bei 1200 g zentrifugieren.
- Die Elution des Enzyms erfolgt durch die aufeinanderfolgende Aufgabe der verschiedenen Elutionspuffer; 3 min bei 1200 g zentrifugieren

Bei Verwendung der Ionenaustauscher- und IDA-Membran werden nachfolgend Elutionspuffer mit steigender Ionenstärke aufpipettiert. Bei Elution der Phenyl-Membran werden Elutionspuffer mit abnehmender Ionenstärke verwendet.

6.2.3. Versuchsdurchführung LP 15-Modul

Nach der Bestimmung der optimalen Bindungs- und Elutionsbedingungen im Mikrolitermaßstab wurden die Aufreinigungsstrategien auf eine größere Membranfläche übertragen. Hierzu wurde das von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH entwickelte Testmodul LP15 verwendet. Dieses Modul wurde eigens zur Testung unterschiedlicher Membranmodifikationen entwickelt. Es basiert auf ein verschraubbares Edelstahlgehäuse in das Membran-Stanzlinge eingesetzt werden können. Das Edelstahlgehäuse setzt sich aus zwei Edelstahlingen zusammen. In den Hohlräumen der Ringe wird ein Plastikgehäuse aus Polysulfon eingesetzt (vgl. Abb. 67, links). Dieses Plastikgehäuse besitzt Luer-Anschlüsse zum Anschluss des Testmoduls an eine Chromatographie-Anlage.

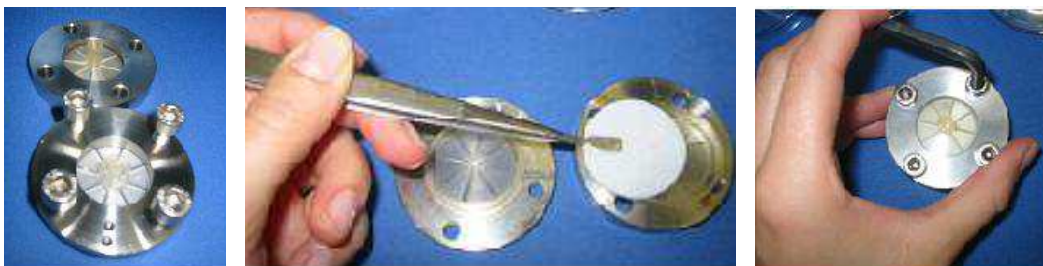


Abb. 67: Einsetzen der Adsorbermembranen in das LP 15-Modul.

Einsetzen der Adsorbermembranen in das LP15-Modul

Es werden drei Membran-Stanzlinge mit einem Durchmesser von je 3 cm (Membranfläche pro Stanzling: 5 cm²) aus einem Membran-Sheet ausgestanzt. Ein Membran-Stanzling wird mit dem entsprechenden Bindungspuffer angefeuchtet und auf einen Teil des Plastikgehäuses, welches in den Edelstahlring eingesetzt ist, gelegt (vgl. Abb. 67, Mitte). Um Luftblasen zwischen den Membranlagen zu vermeiden wird der Stanzling vollständig mit Puffer überspült, bevor der zweite Membran-Stanzling aufgelegt wird. In gleicherweise wird dann der dritte Stanzling aufgelegt. Es sollte immer darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen zwischen den Membranlagen bilden.

Wenn die gewünschte Anzahl Membranlagen eingelegt ist, wird das obere Plastikgehäuse und der obere Edelstahlring aufgesetzt und die vier Schrauben fest angezogen (vgl. Abb. 67, rechts).

Versuchsdurchführung

Nachdem die Adsorbermembranen eingesetzt worden sind, kann das LP 15-Modul an eine Chromatographie-Anlage angeschlossen werden und bis zu einer konstanten Basislinie mit entsprechendem Bindungspuffer gespült werden. Anschließend kann mit der Enzymaufreinigung begonnen werden:

- Beladung der Membran mit Enzymlösung oder Kulturüberstand bei einer Flussrate von 1 mL/min
- Auswaschen der restlichen Lösung mit Bindungspuffer bei 2 mL/min
- Elution der gebundenen Proteine mit entsprechendem Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1 mL/min

Nach jeder Versuchsdurchführung wurden drei neue Membran-Stanzlinge in das Modul eingesetzt.

6.2.4. Versuchsdurchführung zur direkten Aufreinigung der Lipase aGLT mit dem partikelgängigen Direct-Modul

Alle Aufreinigungen mit dem partikelgängigen Direct-Modul auf Basis der Mixed-mode Membran wurden entsprechend nachfolgender Versuchsdurchführung behandelt. Änderungen dieser Versuchsdurchführung werden explizit im experimentellen Teil dieser Arbeit an entsprechender Stelle erwähnt.

Verwendete Puffer:

Bindungs- und Waschpuffer: 25 mM NaAc, pH 5,0

1. Elutionspuffer: 25 mM MES, pH 6,0
2. Elutionspuffer: 25 mM MES, 50 mM NaCl, pH 6,0
3. Elutionspuffer: 25 mM Tris, pH 8,0

Durchführung:

- Das Equilibrieren und Beladen der Mixed-mode Membran erfolgte im Durchlaufverfahren mittels einer Schlaupumpe
- Zur Equilibrierung und Entlüftung des Direct-Moduls wurden 30 mL Bindungspuffer mit einer Flussrate von 50 mL/min durch das Modul gepumpt. Durch ein pulsartiges Öffnen und Schließen des Pumpschlauchs oberhalb des Moduls wurden Blasen im inneren der Einheit entfernt.
- Die Beladung der Membran wurde im Rezirkulationsverfahren bei einer Flussrate von 30 mL/min durchgeführt. 100 mL Kulturüberstand wurden aus einer gerührten Vorlage über 120 min im Kreis gepumpt. Zur Vermeidung einer Verdünnung der Vorlage mit Bindungspuffer wurden zu Beginn der Beladung ein Vorlaufvolumen von 7 mL separat aufgefangen und verworfen. Anschließend wurde die Beladung im Rezirkulationsverfahren fortgeführt. Das Volumen des Vorlaufs wurde in Vorversuchen bei der Bestimmung des Totvolumens der Versuchsanlage ermittelt. Während der Rezirkulation erfolgte eine Probenahme von 300 µL zu, Zeitpunkt 0, nach 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min und dann alle weiteren 10 min bis 120 min.
- Im Anschluss an die Beladung wurde das Direct-Modul aus der Versuchsanlage ausgebaut und an die FPLC angeschlossen. Das Waschen der Membran zur Entfernung von Kulturüberstand-Rückständen und die Elution wurden an der FPLC im Durchlaufverfahren durchgeführt. Es wurden dabei Fraktionen zu je 2 mL aufgefangen. Bei den Aufreinigungen aus zellhaltigem Kulturüberstand wurde das Waschen des Moduls nicht an der FPLC

durchgeführt sondern mit der Schlauchpumpe, um eine Verblockung der Chromatographie-Anlage zu vermeiden. In diesem Fall wurden während des Waschvorgangs Fraktionen zu je 5 mL aufgefangen.

- Das Waschen erfolgte mit 25 mL Bindungspuffer bei einer Flussrate von 5 mL/min.
- Die Elution der gebundenen Lipase aGTL erfolgte über einen Dreistufengradienten bei 8 mL/min:
 - Stufe 1: 8 mL MES-Puffer (25mM, pH 6)
 - Stufe 2: 8 mL MES-Puffer (25 mM, pH 6 + 50 mM NaCl)
 - Stufe 3: 8 mL Tris-Puffer (25 mM, pH 8)
- Nach Versuchsende wurde das Direct-Modul zur Regeneration mit 20 mL Bindungspuffer bei einer Flussrate von 5 mL/min gespült. Zur Lagerung der Module erfolgte ein Waschen der Einheit mit 30 mL Spülpuffer. Anschließend wurde das Modul bei -20 °C gelagert.

Probenanalyse:

- Quantifizierung der Gesamtproteinkonzentration in den aufgefangenen Fraktionen mittels Bradford-Test (siehe Abschnitt 6.)
- Messung der Enzymaktivität mit *p*-NPP (vgl. Abschnitt 6.)
- Untersuchung auf Zellrückhalt durch Bestimmung der optischen Dichte (siehe Abschnitt 6.)

6.3. Standardanalyseverfahren

6.3.2. Assays zur Aktivitätsbestimmungen

6.3.2.1. Messung der Enzymaktivität von Penicillin G Amidase (NIPAB-Test)

Die Aktivität der Penicillin G Amidase lässt sich photometrisch durch Hydrolyse von 6-Nitro-3-Phenyl-acetamidobenzensäure (NIPAB) bestimmen¹²⁹. Die Penicillin G Amidase katalysiert die Hydrolyse von NIPAB zu Phenyllessigsäure und 5-Amino-2-nitrobenzoesäure (vgl. Abb. 68). Das entstandene Chromophor 5-Amino-2-nitrobenzoesäure adsorbiert bei 405 nm. Auf diese Weise lässt es sich photometrisch nachweisen.

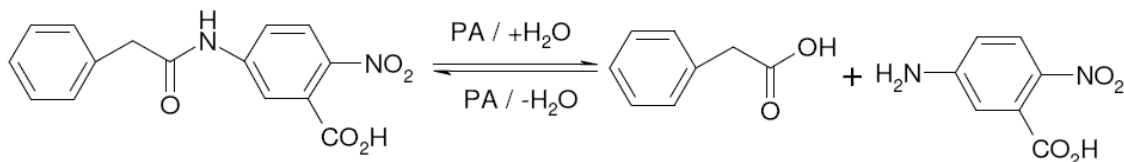


Abb. 68: Hydrolyse von 6-Nitro-3-phenylacetamidobenzoesäure (NIPAB) durch Penicillin G Amidase zu Phenyllessigsäure und 5-Amino-2-nitrobenzoesäure.

Durchführung:

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte in 1,5 mL Einmalküvetten. Als Referenz dient eine Mischung aus 1000 μ L NPP (50 mM NPP, pH 7,5) und 500 μ L NIPAB-Lsg (1,802 mg/mL in NPP). Durch Zugabe von 100 μ L Enzymlösung zu einer Lösung aus 900 μ L NPP und 500 μ L NIPAB-Lsg wird die Reaktion gestartet und die Extinktionsänderung bei 405 nm über einen Zeitraum von fünf Minuten verfolgt. Über die Steigung ($\Delta E/\text{min}$), welche durch Auftragung der gemessenen Extinktion gegen die Zeit erhalten wird, lässt sich die vorliegende Enzymaktivität unter Verwendung folgender Formel

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V_{\text{Küvette}}}{\epsilon \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}}$$

berechnen.

In Abb. 69 ist beispielhaft eine Auftragung der gemessenen Absorption bei 405 nm gegen die Reaktionszeit dargestellt.

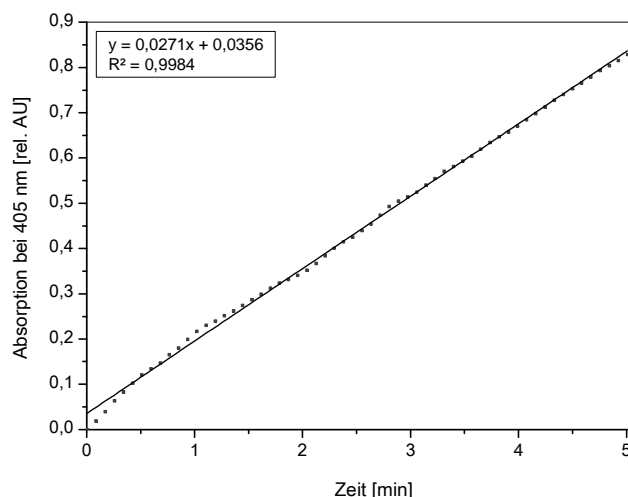


Abb. 69: Messung der Enzymaktivität von Penicillin G Amidase mittels NIPBA-Test. Auftragung der gemessenen Absorption bei 405 nm während der katalytischen Hydrolyse von NIPAB gegen die Reaktionszeit.

6.3.2.2. Dinitrosalicylsäure-Assay (DNS-Test)

Mit Hilfe von Dinitrosalicylsäure lassen sich nach der Methode von Ghose und Miller reduzierende Zuckerenenden nachweisen¹³⁰. Auf diese Weisen können nach Einwirken von Cellulase auf z.B. Polysaccharide entstandene Zuckerreste nachgewiesen werden.

Reaktionsansatz:

250 μ L β -Glucan (1% in H_2O)
 100 μ L 250 mM NaAc-Puffer, pH 6,0
 100 μ L H_2O

DNS-Lösung:

5g 3,5-Dinitrosalicylsäure
 50mL 2M NaOH
 150g K-Na-Tartrat
 ad 500mL H_2O

K-Na-Tartrat wird in H_2O gelöst und anschließend NaOH zugeben. Anschließend wird die 3,5-Dinitrosalicylsäure zugegeben und über Nacht gerührt. Die DNS-Lösung muss lichtgeschützt gelagert werden.

Zur Durchführung des DNS-Tests wird der Reaktionsansatz der Reaktionsansatz 5 min bei 90 °C vorinkubiert. Anschließend werden 50 μ L verdünnte Enzymlösung (z.B. 1:500) zugegeben und die Reaktionslösung für weitere 10 min bei 90 °C inkubiert. Durch Zugabe von 500 μ L DNS-Lösung wird die Reaktion gestoppt. Durch ein anschließendes Aufkochen der Proben für 5 min bei 96 °C wird DNS durch die reduzierenden Enden der Zuckermoleküle zu Amino-nitrosalicylsäure reduziert, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden kann.

Als Referenz dient ein Reaktionsansatz ohne zugegebene Enzymlösung. Dieser wird wie die entsprechenden Proben behandelt und nach dem Aufkochen der Proben werden 50 µL Enzymlösung zugegeben.

Die Proben werden bei 546 nm vermessen und über folgende Formel lässt sich aus der gemessenen Extinktion die Enzymaktivität berechnen:

$$\frac{\text{Extinktion} \cdot \text{Verdünnungsfaktor (Enzymlösung)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor (Reaktionsansatz)}}{\text{Steigung (Standardkurve)} \cdot \text{Inkubationszeit (min)}} = \text{Aktivität [U/mL]}$$

Durch die Aufnahme einer Kalibrationsgerade mit Glucose in verschiedenen Konzentrationen (0,5 – 5 mM) wird ein Zusammenhang zwischen der Absorption und der Aktivitätskonzentration der Enzymproben in U/mL hergestellt. Die Messung der einzelnen Standardkonzentrationen entspricht der oben beschriebenen Vorgehensweise. Abb. 70 zeigt beispielhaft eine Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Enzymaktivität.

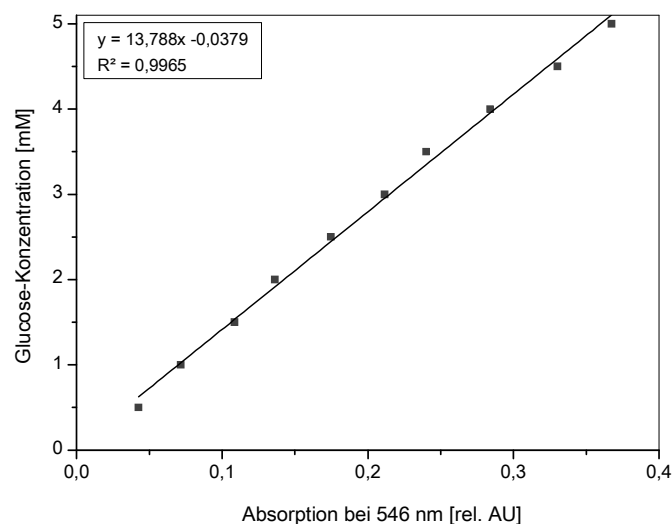


Abb. 70: Beispiel einer Kalibrationsgerade für Glucose zur Bestimmung der Enzymaktivität von Cellulase Cel5A.

6.3.2.3. *para*-Nitrophenylpalmitat-Test (pNPP-Test)

Die Lipase-Aktivität lässt sich photometrisch mit *para*-Nitrophenyl-Palmitat (pNPP) nach der Methode von Winkler und Struckmann bestimmen¹³¹. Die Lipase katalysiert die Hydrolyse von *para*-Nitrophenylpalmitat zu Palmitinsäure und *para*-Nitrophenolat. Letzteres lässt sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 410 nm messen.

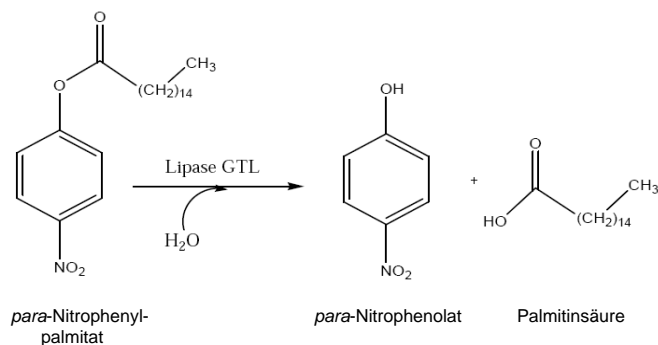


Abb. 71: Hydrolyse von *para*-Nitrophenylpalmitat zu *para*-Nitrophenolat und Palmitinsäure

Zur Bestimmung der Lipaseaktivität werden zwei Stammlösungen (Lösung A und Lösung B) hergestellt. Diese werden kurz vor der Messung zu Lösung C vereinigt. 950 μL Lösung C werden auf 60 °C erhitzt und die Reaktion durch Zugabe von 50 μL Enzymlösung gestartet. Der Reaktionsansatz wird für 15 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Kühlung auf Eis und Zugabe von 100 μL 25%igen Na_2CO_3 -Lösung gestoppt. Die Proben wurden für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und dann die Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm gemessen. Die Enzymaktivität ergibt sich dann nach folgender Berechnung:

$$\text{Enzymaktivität} \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{1}{d \cdot e} \cdot \frac{V_{\text{Küvette}}}{V_{\text{Probe}}} \cdot F$$

ΔE = Differenz der Absorption

Δt = Differenz der Zeit

d = Breite der Küvette

e = molare Extinktionskoeffizient (cm^2/mol)

hier: $e = 12\,750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei pH 8.0

1 Unit Enzymaktivität wird als die Enzymmenge definiert, die 1 μmol *para*-Nitrophenol pro Minute freisetzt.

Lösung A 30 mg pNPP in 10 mL Isopropanol (100 °C), bei 60°C lösen

Lösung B 100 mg Gum Arabicum in 90 ml Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0), bei 60°C lösen

Lösung C 1 Teil Lösung A und 9 Teile Lösung B werden direkt vor der Aktivitätsbestimmung vereinigt

6.3.3. Assays zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen

6.3.3.1. UV-photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen können durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm photometrisch quantifiziert werden. Diese Quantifizierung basiert auf die UV-Adsorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin (Phenolgruppe, 275 nm), Tryptophan (Indolgruppe, 279 nm) und in geringerem Maße auch Phenylalanin (257 nm) bei dieser Wellenlänge. Entsprechend ist das Absorptionsmaximum bei 280 nm linear zur Proteinkonzentration. Je nach Aminosäure-Zusammensetzung können Konzentrationen zwischen 20 und 3000 µg/mL Protein nachgewiesen werden. Zur Bestimmung einer unbekanntem Proteinkonzentration wurden Proben bekannter Konzentration bei 280 nm gemessen und eine Kalibrationsreihe erstellt. Über die erhaltene Geradengleichung lässt sich die unbekannte Proteinkonzentration berechnen. Da der Anteil aromatischer Aminosäuren von Protein zu Protein unterschiedlich ist, muss für jede Quantifizierung immer das entsprechend reine Protein zur Herstellung der Kalibrationsreihe vorliegen.

Für eine Doppelbestimmung werden je zweimal 250 µL Probe, sowie 250 µL der Standardkonzentrationen in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 280 nm gemessen. In Abb. 72 ist exemplarisch eine Kalibrationsgerade zu UV-photometrischen Quantifizierung von Cellulase Cel5A dargestellt.

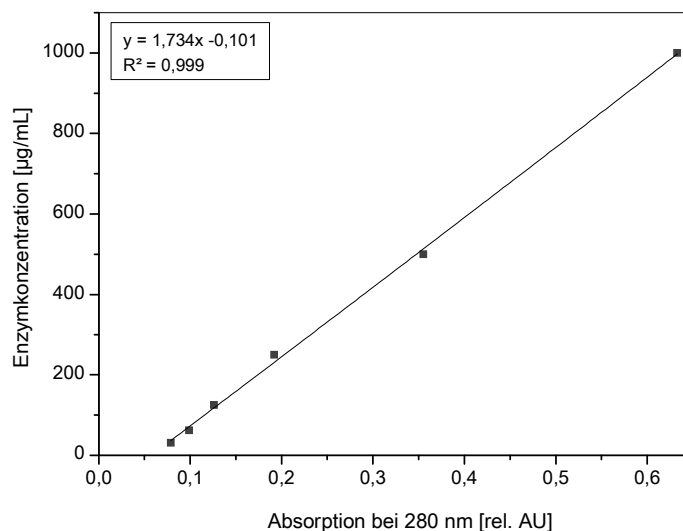


Abb. 72: UV-photometrische Bestimmung der Cellulase Cel5A-Aktivität. Beispiel einer Kalibrationsgerade für Cellulase Cel5A.

6.3.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford¹³² basiert auf eine Einlagerung des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau in die Proteinstruktur. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm bis zu 595 nm, was photometrisch gemessen werden kann.

Bradford-Reagenzlösung

10 mg Coomassie Brilliant Blau G250

5 mL Ethanol (95 %)

10 mL Phosphorsäure (85 %)

mit entionisiertem H₂O auf 100 mL auffüllen

Durchführung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration werden 10 µL der zu untersuchenden Probe, sowie 10 µL jeder Standard-Konzentration in eine 96-Lochplatte pipettiert und anschließend mit jeweils 300 µL Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wird die Absorption bei 595 nm vermessen.

Für die Erstellung der Kalibrationskurve ist jeweils mit BSA als Standard gearbeitet worden. In Abb. 73 ist exemplarisch eine Kalibrationskurve zur Proteinbestimmung mittels des Bradford-Tests dargestellt.

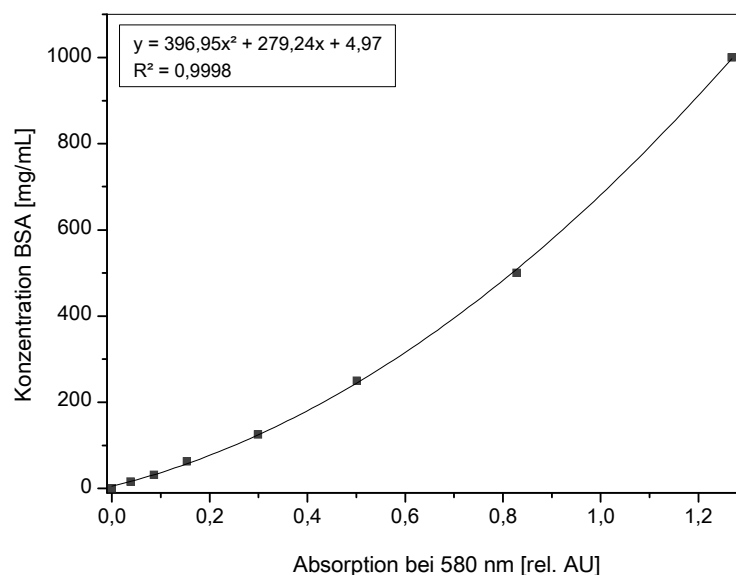


Abb. 73: Beispiel einer Kalibrationskurve zur Proteinbestimmung nach Bradford.

6.3.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) -Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Eigenladungen der Proteine werden dabei mit SDS maskiert, sodass sich eine konstante Ladungsverteilung ergibt. Auf diese Weise bewegen sich die Proteine nur abhängig von ihrer Masse und dem Vernetzungsgrad des Gels im elektrischen Feld. Als Trennmedium wird bei dieser Elektrophorese ein Gel auf Polyacrylamid-Basis verwendet.

Die zu analysierenden Proben werden mit einem Überschuss SDS versetzt und auf 95°C erhitzt, wodurch Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgebrochen werden. Durch vorherige Zugabe von reduzierend wirkendem 2-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken gespalten und so das Protein irreversibel denaturiert.

Die Proben werden 1:1 mit SDS-Probenpuffer vermischt, bei 95°C für 5 min erhitzt und anschließend 3 Minuten bei 4000 g zentrifugiert.

SDS-Probenpuffer:

20 mM Tris-HCl
2 mM EDTA (Natrium-Salz)
5 % SDS
0,02 % Bromphenolblau
in 90 mL dH₂O

SDS-Laufpuffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS
pH 8,3
in 1 L dH₂O

Zur Herstellung eines 12 %igen Polyacrylamid-Gels wurde zunächst das Trenngel angemischt und zwischen die beiden Glasplatten der Gießapparatur pipettiert. Anschließend wurde das Sammelgel (6 %ig) gemischt und das auspolymerisierte Trenngel damit überschichtet. Zur Generierung von Taschen im Gel wurde unmittelbar nach Einfüllen des Sammelgels ein Kamm hineingesteckt.

Trenngel (für 2 Gele):

3 mL Rothiphorese-Lsg (37,5:1)
2,80 mL Tris (1,5 M) pH 8,8
100 µL SDS (1 %ig)
3,2 mL ddH₂O
20 µL TEMED
20 µL APS

Sammelgel(für 2 Gele):

750 µL Rothiphorese-Lsg (37,5:1)
630 µL Tris (1,5 M) pH 6,8
300 µL SDS (1 %ig)
3,877 mL ddH₂O
10 µL TEMED
10 µL APS

Das vorbereitete Gel wurde in der Laufkammer befestigt und der TGS-Laufpuffer eingefüllt. Die vorbereiteten Proben (je 10-20 μL) sowie ein Proteingrößenmarker (2 μL) wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Zunächst wurde eine Spannung von 100 V angelegt, bis sich die Proben in einer dünnen Bande gesammelt haben. Anschließend wurde die Gleichspannung auf 200 V erhöht, bis die Elektrophorese beendet ist.

6.3.4.1. Silberfärbung

Die Silberfärbung basiert auf der Komplexbildung von Silberionen durch Aminosäureseitenketten. Die Proteinbanden werden durch Reduktion der Silberionen mit alkalischer Formaldehydlösung sichtbar gemacht. Für die Silberfärbung wurden die folgenden Reagenzien verwendet:

Entfärber/Fixierer:

400 mL EtOH, 400 mL ddH₂O, 80 mL CH₃COOH

Farmers Reducer:

1 Spatelspitze K₃[Fe(CN)₆], 1 Spatelspitze Na₂S₂O₃ in 100 mL ddH₂O

0,1 %ige Silbernitrat-Lsg.

2,5 %ige Natriumcarbonat-Lsg.

5 %ige Essigsäure

36,5 %ige Formaldehyd-Lösung.

Das Gel wurde für 30 Minuten in dem Entfärber/Fixierer geschwenkt und anschließend zweimal mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 2 Minuten in *Farmers Reducer* geschwenkt und dann bis zur vollständigen Entfärbung mehrmals mit ddH₂O gewaschen. Im Folgenden wurde das Gel für 30 Minuten in einer 0,1%igen Silbernitrat-Lösung inkubiert. Es wurde zweimal für jeweils 30 Sekunden mit ddH₂O und anschließend kurz in 2,5%iger Natriumcarbonat-Lsg. gewaschen. Zum Entwickeln wurde das Gel in einer Lösung aus 100 mL 2,5%iger Natriumcarbonat-Lsg. und 400 μL Formaldehyd-Lsg. inkubiert bis deutliche Banden sichtbar werden. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde das Gel für 10 Minuten in 5 %iger Essigsäure geschwenkt.

6.3.4.2. Aktivitätsfärbung (Zymogramm)

Mit Hilfe von Zymogrammen lassen sich Enzymaktivitäten auf SDS-PAGE-Gelen nachweisen. Die Lipase-Aktivitätsfärbung im Rahmen dieser Arbeit basierte dabei auf die von der Lipase katalysierte Hydrolyse von Naphthylacetat zu α -Naphthol, welches mit Fast Red TR zu einem unlöslichen Farbstoff reagiert. Dieser ist dann auf dem SDS-PAGE-Gelen sichtbar¹³³.

Durchführung

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel mindestens 2 Stunden in der Renaturierungslösung inkubiert. Dabei wurde das SDS aus dem Gel ausgewaschen, wobei die Renaturierung der Proteine stattfand. Nach zwei kurzen Waschschritten mit dH₂O erfolgte eine Inkubation des Gels mit einem Gemisch der Lösungen A und B zu gleichen Volumenanteilen für 20 min. Bereiche auf dem Gel, welche gegenüber dem in Lösung A befindlichen α -Naphthylacetat hydrolytisch aktive Material und Enzyme enthielten, wurden als rot - braune Banden sichtbar. Zur Fixierung der Gele wurde 10 min in 10 % (v/v) Glycerin inkubiert.

Renaturierungslösung: 100 mM Tris/HCl pH 7.5, 0,5 % (v/v) Triton-X-100

Lösung A: 100 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 % (v/v) Aceton, 0,04 % (w/v) α -Naphthylacetat

Lösung B: 100 mM Tris/HCl pH 7.5, 0,1 % (w/v) Fast Red TR

6.3.5. Bestimmung der Adsorptionsisothermen nach Langmuir

Zum Vergleich unterschiedlicher Membranmodifikationen wurden Adsorptionsisothermen aufgenommen und anhand dieser die maximalen Bindungskapazitäten auf Grundlage der Langmuir-Isotherme bestimmt.

Hierzu wurden die Membranen bis zum vollständigen Durchbruch mit Enzymlösungen unterschiedlicher Konzentration beladen. Ausgehend von der Enzymkonzentration in den Durchlauffraktionen wurde die maximal gebundene Enzymmenge berechnet und gegen die eingesetzte Enzymkonzentration aufgetragen.

Die Massentransferrate von der flüssigen Phase (Enzymlösung) auf die feste Phase (Adsorbermembran) kann bei einer Langmuir-Isotherme durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{dQ}{dt} = k_1 \cdot C (Q_{\max} - Q) - k_2 \cdot Q$$

C: Enzymkonzentration in der Beladungslösung [mg/mL]

Q: Beladung der Adsorbermembran [mg/cm²]

Q_{max}: maximale Bindungskapazität [mg/cm²]

k₁ / k₂: Geschwindigkeitskonstanten

Der Ansatz geht davon aus, dass die Adsorptionsrate des Zielproteins proportional zur Konzentration C des Zielproteins in der mobilen Phase, einer Geschwindigkeitskonstante k_1 und der Zahl der auf der Oberfläche verfügbaren freien Bindungsplätze ($Q_{\max} - Q$) ist.

Im Gleichgewicht gilt:

$$Q = \frac{Q_{\max} \cdot C}{K_{diss} + C} \quad \text{mit} \quad K_{diss} = \frac{k_1}{k_2}$$

K_{diss} : Dissoziationskonstante [mol/L]

Durch eine graphische Auftragung von $1/Q$ gegen $1/C$ können die maximale Bindungskapazität Q_{\max} und die Dissoziationskonstante K_{diss} berechnet werden.

6.3.6. Berechnung der Ausbeute, Wiederfindungsrate und des Reinigungsfaktors

Produktausbeute [%]: Prozentualer Anteil der eluierten Enzymmenge von der angebotenen Enzymmenge.

$$Ausbeute [\%] = \frac{n_{Elution}}{n_{angeboten}} \cdot 100 \quad \text{bzw.} \quad Ausbeute [\%] = \frac{U_{nach\ Aufreinigung}}{U_{vor\ Aufreinigung}} \cdot 100$$

Wiederfindungsrate [%]: Prozentualer Anteil der insgesamt gefundenen Enzymmenge zu angebotenen Enzymmenge.

$$Wiederfindungsrate [\%] = \frac{\sum n_{Durchlauf} + n_{Wasch} + n_{Elution}}{n_{angeboten}} \cdot 100$$

Spez. Aktivität [U/mg]: Verhältnis der Gesamtzymaktivität zur Gesamtproteinmenge.

$$spez. \text{ Aktivität } [U / mg] = \frac{Gesamtzymaktivität [U]}{Gesamtproteinmenge [mg]}$$

Der **Reinigungsfaktor** ergibt sich aus dem Vergleich der spezifischen Aktivität vor und nach der Aufreinigung.

6.4. Weitere Ergebnisse

6.4.2. REM-Aufnahmen zur Untersuchung der Membranintegrität

In Abb. 74. sind REM-Aufnahmen der IDA-Membran in verschiedenen Vergrößerungen gezeigt.

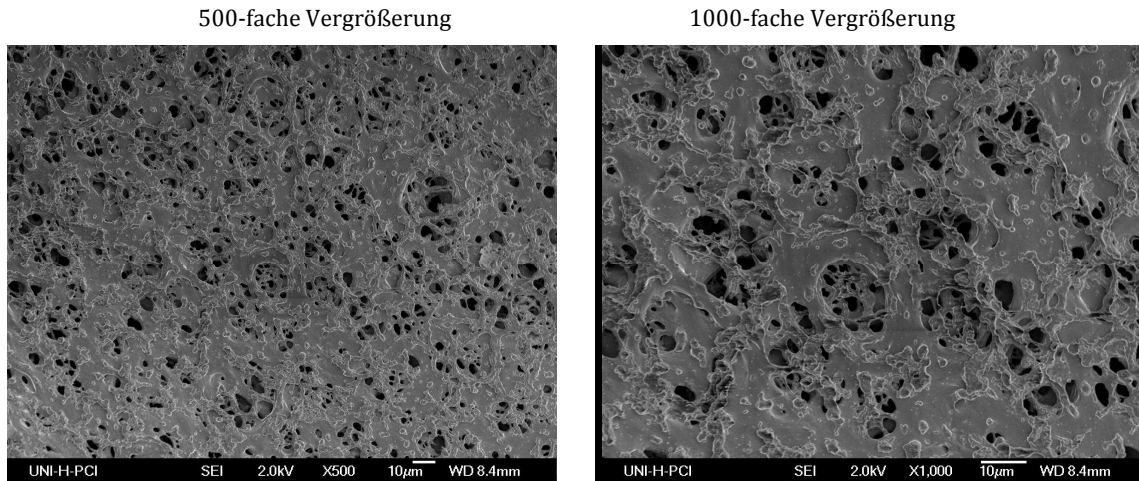


Abb. 74: REM-Aufnahmen der IDA-Membran in verschiedenen Vergrößerungen.

Abb. 75. zeigt die REM-Aufnahmen der IDA-Membran nach Behandlung mit der Cellulase für 1 Stunde.

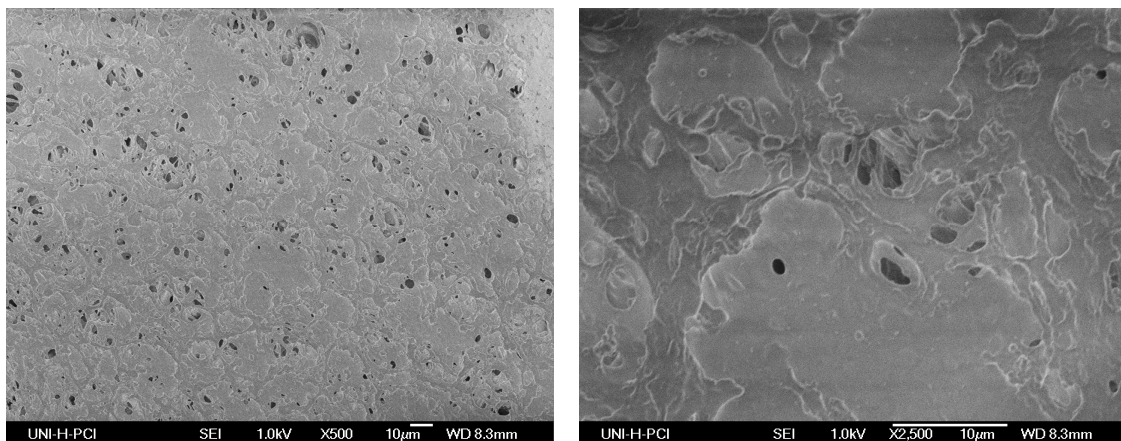


Abb. 75: REM-Aufnahmen der IDA-Membran nach 1h Inkubation mit der Cellulase Cel5A

REM-Aufnahmen der IDA-Membran nach Behandlung mit der Cellulase für 6 Stunden.

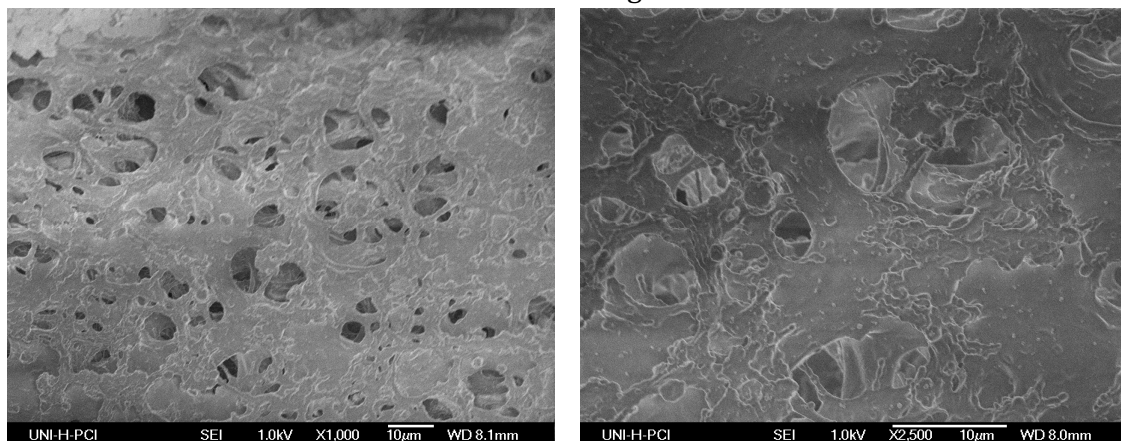


Abb. 76: REM-Aufnahmen der IDA-Membran nach 6h Inkubation mit der Cellulase Cel5A

6.5. Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte

6.5.2. Chemikalien

Alle hier aufgeführten Reagenzien und Chemikalien hatten, falls nicht anders angegeben, den kommerziell höchsterhältlichen Reinheitsgrad.

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Brain Heart Infusion	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CAPS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Cellulase Cel5A	Technische Universität Hamburg-Harburg
Cellulase Cel5	Technische Universität Hamburg-Harburg
Cellulase aus <i>Aspergillus niger</i>	Technische Universität Hamburg-Harburg
Calciumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Chloramphenicol	Fluka Analytical, Exeter
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3,5-Dinitrosalicylsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Merck, KGaA, Darmstadt
Ethylenglykol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fast Red TR	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
β -Glucan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Glycerin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Gummi Arabicum	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Harnstoff	Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt

Hefeextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HCl (36%)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Imidazol	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumhexacyanoferrat III	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumsulphatheptahydrat	AppliChem, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
α -Naphthylacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaOH	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natrimacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NIPAB	OCI, Leibniz Universität Hannover
Penicillin G Amidase	ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel
p-NPP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinmarker	Fermentas, St. Leon-Rot
Rothiphorese-Lsg (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Silbernitratt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sorbitol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

6.5.3. Materialien

Verbrauchsmaterial

96-Lochplatte	Sarstedt, Nümbrecht
96-Lochplatte (UV)	Corning GmbH, Life Sciences, Wiesbaden
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nümbrecht
Reagiergefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht
Vivaspin 20 (10 kDa, 30 kDa)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Vivaflow 50 (10 kDa)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

Hersteller

Membranadsorber

Alle in dieser Arbeit verwendeten Membranen und Adsorber-Module wurden von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen zur Verfügung gestellt. Diese sind in Tab. 19 aufgelistet.

Tab. 19: Verwendete Membranen und Adsorbermodule

Modul	Basismembran	Ligand	Charge	Musternummer
Vivawell-8-strips	gepfropft	Q	nicht bekannt	nicht bekannt
	gepfropft	S	nicht bekannt	nicht bekannt
	gepfropft	IDA	nicht bekannt	nicht bekannt
Vivapure 5.4				
	gepfropft	Q	0703393 08M	3314
	gepfropft	S	0801173 05M	3311
	doppelporös	S	T738Endo207.469	3315
	gepfropft	IDA	9901963 32B	3313
	doppelporös	IDA	T738Endo207.469	3316
	doppelporös	Phenyl	0800593 13A	3312
	doppelporös	Prim. Amin	--	3436
	gepfropft	Mixed-mode	--	3437
LP 15 / Membran-sheet				
	gepfropft	Q	0703393 08M	3308
	gepfropft	S	0801173 05M	3309
	gepfropft	IDA	9901963 32B	3310
	doppelporös	Phenyl	0800593 13A	--
	gepfropft	Mixed-mode	--	3437
Direct-Modul				
	gepfropft	Mixed-mode	--	3524

6.5.4. Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Analytic AC 210 S	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav „Systec V-150“	Systec GmbH, Wettengel
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Eppendorf Research Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
FPLC BioLogic AVR7-3	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Gelelektrophoreseapparatur	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Magnetrührer „IKAMAG® RCT“	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
pH-Elektrode	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Photometer „UVIKON 922“	Kontron Instruments, Echingen/München
Spektrophotometer „Multiskan“	Thermolabsystem, Langenselbold, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	BANDELIN electronis GmbH, Berlin
Ultraschallsonde	Sartorius AG, Göttingen
Vortex-Mixer Typ 1719	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen
YSI 2700 SELECT	Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA
Zentrifuge Multifuge 3s	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415R, gekühlt	Eppendorf AG, Hamburg

6.6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BHIS	Brain-Heart-Infusion-Kulturmedium mit Sorbitol
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAPS	3-Cyclohexylaminopropan-1-sulfonsäure (engl. N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid)
CgXII	definiertes Kulturmedium
DNS	Dinitrosalicylsäure
EBA	Expanded Bed Adsorption
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EtOH	Ethanol
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GRAS	<i>generally regarded as safe</i>
GTL	Geobacillus thermoleovorans Lipase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie (engl. hydrophobic interaction chromatography)
His-Tag	Aminosäuresequenz mit sechs aufeinander folgenden Histidiningruppen
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
IDA	Iminodiessigsäure (engl. Iminodiacetic acid)
IMAC	Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl. Immobilized metal-ion affinity chromatography)
kDA	Kilo Dalton
konz.	Konzentration
K-Na-Tartrat	Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat
KPP	Kaliumphosphat-Puffer
L	Liter

LB	Lysogeny broth
M	molar
max	maximal
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure (engl. 2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid)
min	Minute
NaAc	Natriumacetat
NIPAB	6-Nitro-3-Phenyl-acetamidobenzensäure
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	millimolar
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
n	Stoffmenge
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
PAGE	Polyacralamid Gelelektrophorese
pI	Isoelektrischer Punkt
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -Nitrophenyl-Palmitat
®	registriert
RC	regenerierte Cellulose
RT	Raumperatur
s	Sekunde
<i>S. carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
t	Zeit
TEMED	Tetramethylenethylendiamin
TGS	Tris-Glycine-SDS
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
UV	Ultraviolett

7. Literaturverzeichnis

1. Patel RN. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. *Advanced Synthesis & Catalysis*. Aug 2001;343(6-7):527-546.
2. Aehle W. *Enzymes in industry : production and applications*. 2., completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.
3. Antranikian G. *Angewandte Mikrobiologie*. Berlin: Springer; 2006.
4. Whitehurst RJ. *Enzymes in food technology*. Wiley.
5. Buchholz K, Kasche V. *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*. Weinheim: WILEY-VCH; 1997.
6. Bhut BV, Christensen KA, Husson SM. Membrane chromatography: Protein purification from E. coli lysate using newly designed and commercial anion-exchange stationary phases. *Journal of Chromatography A*. Jul 23 2010;1217(30):4946-4957.
7. Ghosh R. Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *Journal of Chromatography A*. Apr 5 2002;952(1-2):13-27.
8. Riordan W, Heilmann S, Brorson K, Seshadri K, He Y, Etzel M. Design of Salt-Tolerant Membrane Adsorbers for Viral Clearance. *Biotechnology and Bioengineering*. Aug 1 2009;103(5):920-929.
9. Osterath B, Rao N, Lütz S, Liese A. Technische Anwendung von Enzymen. *Chemie in unserer Zeit*. 2007;41(4):324-334.
10. Illanes A. *Enzyme Biocatalysis Principles and Applications*. Springer Science + Business Media B.V., 2008
11. Yildiz H, Akyilmaz E, Dinckaya E. Catalase immobilization in cellulose acetate beads and determination of its hydrogen peroxide decomposition level by using a catalase biosensor. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology*. 2004;32(3):443-452.
12. Underkofler LA, Barton RR, Rennert SS. Production of Microbial Enzymes and Their Applications. *Applied Microbiology*. 1958;6(3):212-221.
13. Leisola M, Jokela J, Pastinen O, Turunen O, Schoemaker H. Industrial use of enzymes: UNESCO Encyclopedia of Life Support Systems; 2001.
14. Braun M, Teichert, O. & Zweck, A. . Biokatalyse in der industriellen Produktion - Fakten und Potenziale zur weißen Biotechnologie 2006. Located at: *Zukünftige Technologien Nr. 57*
15. Chaplin MF, Bucke C. *Enzyme technology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1990.
16. Hanson RL, Goldberg S, Goswami A, Tully TP, Patel RN. Purification and cloning of a ketoreductase used for the preparation of chiral alcohols. *Advanced Synthesis & Catalysis*. Jun 2005;347(7-8):1073-1080.

17. Patel RK, Dodia MS, Joshi RH, Singh SP. Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Process Biochemistry*. Sep 2006;41(9):2002-2009.
18. Saha BC. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*. Oct 29 2004;39(12):1871-1876.
19. Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT. *Biocatalysts and enzyme technology*. 1st English ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.
20. Singh RS, Dhaliwal R, Puri M. Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. May 2007;17(5):733-738.
21. Samhaber WM. Dia- und Ultrafiltration-Stofftrennverfahren in der chemischen Industrie. *Chemie Ingenieur Technik*. 1987;59(11):844-850.
22. Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Jul 2006;45(2):144-158.
23. Becker NT, Braunstein EL, Gros EH, Fewkes R, Heng H, inventors. Methode zur Produktion kristalliner Cellulase, 1996.
24. Becker T, Virgil BL, inventors. Verfahren zur Kristallisation von Subtilisin, 1989.
25. Rancke-Masen A, Laustsen A, inventors. Verfahren zur Proteinaufreinigung aus einer proteinhaltigen Lösung, 1997.
26. Park DH, Lee HJ, Lee EK. Crystallization of alkaline protease as a means of purification process. *Korean Journal of Chemical Engineering*. Jan 1997;14(1):64-68.
27. Judge RA, Johns MR, White ET. Protein-Purification by Bulk Crystallization - the Recovery of Ovalbumin. *Biotechnology and Bioengineering*. Nov 20 1995;48(4):316-323.
28. Heng MH, Becker NT, Braunstein EL, Fewkes RC, Gros H. A novel process for bulk crystallization of cellulase. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. Mar 24 1996;211:177-BIOT.
29. Logtenberg EHP, Meersman F, Rubens P, Heremans K, Frank J. Influence of pressure on the crystallisation and dissolution of protein crystals. *High Pressure Research*. 2000;19(1-6):675-680.
30. Visuri K, Kaipainen E, Kivimaki J, Niemi H, Leisola M, Palosaari S. A New Method for Protein Crystallization Using High-Pressure. *Bio-Technology*. Jun 1990;8(6):547-549.
31. Gros H. The importance of temperature and pH in the bulk crystallization of enzymes. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. Mar 24 1996;211:114-BIOT.
32. Becker T, Virgil B, Lawlis J, inventors. Subtilisin Crystallization Process, 1991.
33. Boys CWG, Hill DJ, Stockley PG, Woodward JR. Crystallization of Alcohol Oxidase from *Pichia-Pastoris*. *Journal of Molecular Biology*. Jul 5 1989;208(1):211-212.

34. Janssen FW, Ruelius HW. Alcohol Oxidase a Flavoprotein from Several Basidiomycetes Species - Crystallization by Fractional Precipitation with Polyethylene Glycol. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1968;151(2):330-338.
35. Collet A. Separation and purification of enantiomers by crystallisation methods. *Enantiomer*. 1999;4(3-4):157-172.
36. Lorenz H, Perlberg A, Sapoundjiev D, Elsner MP, Seidel-Morgenstern A. Crystallization of enantiomers. *Chemical Engineering and Processing*. Oct 2006;45(10):863-873.
37. Wang YL, Chen AM. Enantioenrichment by crystallization. *Organic Process Research & Development*. Mar-Apr 2008;12(2):282-290.
38. Gros EH, Cunefare JL, inventors. Crystalline protease and methode for producing same, 2001.
39. Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H. Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*. Apr 2009;44(4):471-476.
40. Bezerra RP, Borbal FKSL, Moreira KA, Lima JL, Porto ALF, Chaves AC. Extraction of amylase from fermentation broth in poly (ethylene glycol) salt aqueous two-phase system. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Jul 2006;49(4):547-555.
41. Tanuja S, Srinivas ND, Rao KSMSR, Gowthaman MK. Aqueous two-phase extraction for downstream processing of amyloglucosidase. *Process Biochemistry*. Nov 1997;32(8):635-641.
42. Chaves AC, Silveira E, Bezerra RP, et al. Influence of partition parameters on a recombinant antigen of *Schistosoma mansoni* expressed on E-coli using poly(ethylene glycol)-hydroxypropyl starch aqueous two-phase system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Oct 2002;18(7):645-648.
43. Oliveira LA, Sarubbo LA, Porto ALF, Campos-Takaki GM, Tambourgi EB. Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and cashew-nut tree gum. *Process Biochemistry*. Dec 31 2002;38(5):693-699.
44. Tubio G, Nerli B, Pico G. Partitioning features of bovine trypsin and alpha-chymotrypsin in polyethyleneglycol- sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Jun 1 2007;852(1-2):244-249.
45. Pericin DM, Madarev-Popovic SZ, Radulovic-Popovic LM. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology. *Biotechnol Lett*. Jan 2009;31(1):43-47.
46. Spelzini D, Farruggia B, Pico G. Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate: chymosin and pepsin. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Jul 5 2005;821(1):60-66.

47. Liu CL, Nikas YJ, Blankschtein D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnology and Bioengineering*. Oct 20 1996;52(2):185-192.
48. Hilhorst R, Fijneman P, Heering D, et al. Protein Extraction Using Reversed Micelles. *Pure and Applied Chemistry*. Nov 1992;64(11):1765-1770.
49. Goto M, Kondo K, Nakashio F. Protein Extraction by Reversed Micelles Using New Surfactants. *Solvent Extraction 1990, Pts a and B*. 1992;7:1845-1850, 1923.
50. Chang QL, Chen JY. Liquid-liquid reversed micellar extraction for isolating enzymes: Studies on the purification of alpha-amylase. *Process Biochemistry*. May 1996;31(4):371-375.
51. Shin YO, Weber ME, Vera JH. Comparison of two methods to recover lysozyme from reverse micellar phases. *Separation Science and Technology*. 2003;38(8):1733-1748.
52. Rangel-Yagui CO, Lam H, Kamei DT, Wang DIC, Pessoa A, Blankstein D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. *Biotechnology and Bioengineering*. May 20 2003;82(4):445-456.
53. Fayer MD, Levinger NE. Analysis of Water in Confined Geometries and at Interfaces. *Annual Review of Analytical Chemistry, Vol 3*. 2010;3:89-107.
54. Anspach FB, Curbelo D, Hartmann R, Garke G, Deckwer WD. Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *Journal of Chromatography A*. Dec 31 1999;865(1-2):129-144.
55. Pai A, Gondkar S, Sundaram S, Lali A. Expanded bed adsorption on supermacroporous cross-linked cellulose matrix. *Bioseparation*. 1998;8(1-5):131-138.
56. Toledo AL, Severo JB, Souza RR, Campos ES, Santana JCC, Tambourgi EB. Purification by expanded bed adsorption and characterization of an alpha-amylases FORILASE NTL (R) from *A-niger*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Feb 1 2007;846(1-2):51-56.
57. Fritz U. *Isolierung und Aufreinigung des Enzyms Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus Saccharomyces cerevisiae mit der Expanded-Bed-Adsorption*. Als Ms. vervielfältigt. ed. Geesthacht: GKSS-Forschungszentrum Geesthacht; 1999.
58. Hutchinson MH, Chase HA. Intensified process for the purification of an enzyme from inclusion bodies using integrated expanded bed adsorption and refolding. *Biotechnology Progress*. Aug 2006;22(4):1187-1193.
59. Smith MP, Bulmer MA, Hjorth R, Titchener-Hooker NJ. Hydrophobic interaction ligand selection and scale-up of an expanded bed separation of an intracellular enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chromatography A*. Aug 30 2002;968(1-2):121-128.
60. Shanmugam S, Sathishkumar T. *Enzyme Technology*. New Delhi; 2009.
61. Bankar SB, Bule MV, Singhal RS, Ananthanarayan L. Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*. Jul-Aug 2009;27(4):489-501.

62. Liu J, Xia WS. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulase. *Biochemical Engineering Journal*. May 1 2006;30(1):82-87.
63. Bruton CJ. Large-scale purification of enzymes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Jan 26 1983;300(1100):249-261.
64. Harrison RG, NetLibrary Inc. Protein purification process engineering. *Bioprocess technology v. 18*. New York: M. Dekker; 1994.
65. Gupta A, Roy I, Khare SK, Bisaria VS, Gupta MN. One-step purification of xylanase from *Melanocarpus albomyces* and ethylene glycol as a novel soluble additive for enhancing its thermal stability. *Biotechnology Letters*. Dec 2002;24(23):2005-2009.
66. Coulon D, Cabanne C, Fitton V, Noubhani AM, Saint-Christophe E, Santarelli X. Penicillin acylase purification with the aid of hydrophobic charge induction chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Aug 25 2004;808(1):111-115.
67. Lee KW, Bae HA, Shin GS, Lee YH. Purification and catalytic properties of novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* sp ES-1 for hydrolysis of (S)-ketoprofen ethyl ester. *Enzyme and Microbial Technology*. Feb 1 2006;38(3-4):443-448.
68. Headon DR, Walsh G. The industrial production of enzymes. *Biotechnol Adv*. 1994;12(4):635-646.
69. Castan A, Enfors SO. Characteristics of a DO-controlled fed-batch culture of *Escherichia coli*. *Bioprocess Engineering*. Jun 2000;22(6):509-515.
70. Melling J, Atkinson A. Nuclease Treatment of Broken Bacterial Suspensions for Removal of Highly Polymerized Nucleic-Acids. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*. 1972;22(6):739-744.
71. Taylor BL, Utter MF. Removal of Nucleic-Acids from Microbial Extracts by Precipitation with Lysozyme. *Analytical Biochemistry*. 1974;62(2):588-591.
72. Dissing U, Mattiasson B. Integrated removal of nucleic acids and recovery of LDH from homogenate of beef heart by affinity precipitation. *Bioseparation*. 1998;7(4-5):221-229.
73. Cordes RM, Sims WB, Glatz CE. Precipitation of Nucleic-Acids with Poly(Ethyleneimine). *Biotechnology Progress*. Jul-Aug 1990;6(4):283-285.
74. Singh A, Sanger HL. Fractionation of Total Plant Nucleic-Acids and Removal of Polysaccharides from Them with Cetyltrimethylammonium Bromide. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*. 1977;358(3):309-309.
75. Jaykus LA, DeLeon R, Sobsey MD. Development of a molecular method for the detection of enteric viruses in oysters. *Journal of Food Protection*. Dec 1995;58(12):1357-1362.
76. Burgess RR. A New Method for Large Scale Purification of *Escherichia Coli* Deoxyribonucleic Acid-Dependent Ribonucleic Acid Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*. 1969;244(22):6160-6169.

77. Chan WK, Rha CK. Selective Adsorption Desorption of Nucleic-Acids on Submicron-Sized Polymeric Particles. *Biotechnology and Bioengineering*. Apr 5 1989;33(9):1205-1209.
78. Kim CW, Christopher CW, Rha C. Removal of endotoxins and nucleic acids using submicron-sized polymeric particles. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Jun 1996;6(3):189-193.
79. Melissis S, Labrou NE, Clonis YD. One-step purification of Taq DNA polymerase using nucleotide-mimetic affinity chromatography. *Biotechnol J*. Jan 2007;2(1):121-132.
80. Mendu DR, Ratnam BVV, Purnima A, Ayyanna C. Affinity chromatography of alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*. Dec 1 2005;37(7):712-717.
81. Clonis YD. Large-Scale Affinity-Chromatography. *Bio-Technology*. Dec 1987;5(12):1290-1293.
82. Denizli A, Piskin E. Dye-ligand affinity systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. Oct 30 2001;49(1-3):391-416.
83. Schneider K, Pinkwart M, Jochim K. Purification of hydrogenases by affinity chromatography on Procion Red-agarose. *Biochem J*. Aug 1 1983;213(2):391-398.
84. Subramanian S. Dye-Ligand Affinity-Chromatography - the Interaction of Cibacron Blue F3ga with Proteins and Enzymes. *Crc Critical Reviews in Biochemistry*. 1984;16(2):169-205.
85. Koch C, Borg L, Skjodt K, Houen G. Affinity chromatography of serine proteases on the triazine dye ligand Cibacron Blue F3G-A. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Oct 23 1998;718(1):41-46.
86. Labrou NE, Karagouni A, Clonis YD. Biomimetic-Dye Affinity Adsorbents for Enzyme-Purification - Application to the One-Step Purification of *Candida Boidinii* Formate Dehydrogenase. *Biotechnology and Bioengineering*. Nov 5 1995;48(3):278-288.
87. Zheng HB, Chen J, Su LL, et al. One-step purification and immobilization of his-tagged GL-7-ACA acylase. *Enzyme and Microbial Technology*. Sep 3 2007;41(4):474-479.
88. Mrabet NT. One-step purification of actinoplanes-missouriensis D-xylose isomerase by high-performance immobilized copper-affinity chromatography-functional-analysis of surface histidine-residues by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*. Mar 1992;31(10):2690-2702.
89. Todorova-Balvay D, Stoilova I, Gargova S, Vijayalakshmi MA. An efficient two step purification and molecular characterization of beta-galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Molecular Recognition*. Jul-Aug 2006;19(4):299-304.
90. Bahar T, Tuncel A. Concanavalin A carrying reactive beads for yeast invertase purification. *Reactive & Functional Polymers*. 2004;61(2):203-210.

91. Bahar T, Tuncel A. Concanavalin a attached poly(p-chloromethylstyrene) beads for glycoenzyme separation. *Journal of Applied Polymer Science*. May 15 2004;92(4):2116-2124.
92. Greenwell P, Younes M, Rughooputh S. Purification and analysis of DNases of *Tritrichomonas foetus*: Evidence that these enzymes are glycoproteins. *International Journal for Parasitology*. Jun 2008;38(7):749-756.
93. Hage DS. Affinity chromatography: A review of clinical applications. *Clinical Chemistry*. May 1999;45(5):593-615.
94. Ehle H, Horn A. Immunoaffinity chromatography of enzymes. *Bioseparation*. 1990;1(2):97-110.
95. Thompson NE, Aronson DB, Burgess RR. Purification of Eukaryotic Rna Polymerase-Ii by Immunoaffinity Chromatography - Elution of Active Enzyme with Protein Stabilizing Agents from a Polyol-Responsive Monoclonal-Antibody. *Journal of Biological Chemistry*. Apr 25 1990;265(12):7069-7077.
96. Gottschalk U, Fischer-Fruehholz S, Reif O. Membrane Adsorbers: A cutting-Edge Process Technology at the Threshold. *BioProcess Int*. 2004.
97. Faber R, Demmer W, Horl HH, Nussbaumer D. Microporous membrane adsorbers: basic concepts and recent developments. *Desalination*. Nov 20 2006;199(1-3):553-554.
98. Weiss AR, Henricksen G, Demmer W, Horl HH, Wunn E, Nubbaumer D. New Microporous Membrane Adsorbers for Rapid Purification and Concentration of Proteins. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. Mar 13 1994;207:133-BTEC.
99. Phillips M, Cormier J, Ferrence J, et al. Performance of a membrane adsorber for trace impurity removal in biotechnology manufacturing. *Journal of Chromatography A*. Jun 17 2005;1078(1-2):74-82.
100. Karger A, Bettin B, Granzow H, Mettenleiter TC. Simple and rapid purification of alphaherpesviruses by chromatography on a cation exchange membrane. *Journal of Virological Methods*. Feb 1998;70(2):219-224.
101. Zhou JX, Solamo F, Hong T, Shearer M, Tressel T. Viral clearance using disposable systems in monoclonal antibody commercial downstream processing. *Biotechnology and Bioengineering*. Jun 15 2008;100(3):488-496.
102. Boi C. Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibody purification. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Mar 15 2007;848(1):19-27.
103. Tsuneda S, Shinano H, Saito K, Furusaki S, Sugo T. Binding of Lysozyme onto a Cation-Exchange Microporous Membrane Containing Tentacle-Type Grafted Polymer Branches. *Biotechnology Progress*. Jan-Feb 1994;10(1):76-81.

104. Brüning GM. *Charakterisierung der zellbezogenen Enzymproduktion prokaryontischer Systeme innerhalb unterschiedlicher Wachstumsphasen* [Dissertation]. Hannover: Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover; 2009.
105. Arroyo M, de la Mata I, Acebal C, Castillon MP. Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Jan 2003;60(5):507-514.
106. Aguilar O, Albiter V, Serrano-Carreón L, Rito-Palomares M. Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase processes for the partial purification of penicillin acylase produced by *E. coli*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. May 1 2006;835(1-2):77-83.
107. Iyer PV, Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*. Oct 2008;43(10):1019-1032.
108. Ljubijankić G, Gvozdenović J, Sevo M, Degraffi G. High-level secretory expression of penicillin amidase from *Providencia rettgeri* in *Saccharomyces cerevisiae*: Purification and characterization. *Biotechnology Progress*. Mar-Apr 2002;18(2):330-336.
109. Kokpinar O, Harkensee D, Kasper C, et al. Innovative modular membrane adsorber system for high-throughput downstream screening for protein purification. *Biotechnology Progress*. Aug 2006;22(4):1215-1219.
110. Kökpinar Ö, Walter J-G, Anton F, et al. Membranadsorbersysteme in der Proteinaufreinigung: Screening-Möglichkeiten. *Chemie Ingenieur Technik*. 2008;6(80).
111. Gebauer KH, Thommes J, Kula MR. Breakthrough performance of high-capacity membrane adsorbers in protein chromatography. *Chemical Engineering Science*. Feb 1997;52(3):405-419.
112. Pastor A. *Membranadsorber-Modul zur Aufarbeitung ungeklärter Bioprozessmedien* [Dissertation]. Hannover: Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover; 2010.
113. Riordan WT, Heilmann SM, Brorson K, Seshadri K, Etzel MR. Salt Tolerant Membrane Adsorbers for Robust Impurity Clearance. *Biotechnology Progress*. Nov-Dec 2009;25(6):1695-1702.
114. Bommarius AS, Riebel B. *Biocatalysis: fundamentals and applications*. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.
115. Sieg J. *Aufreinigung der Cellulase Cel5A über IDA-Membranadsorber* [Bachelorarbeit]. Hannover, Leibniz Universität Hannover; 2010.
116. Klippel B. [Laufende Dissertation]. Hamburg: Institut für Technische Mikrobiologie, Technische Universität Hamburg-Harburg; 2011.
117. Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. Sep 1998;16(9):396-403.

118. Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Jun 2004;64(6):763-781.
119. Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. Aug 2002;13(4):390-397.
120. Cho AR, Yoo SK, Kim EJ. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Fems Microbiology Letters*. May 15 2000;186(2):235-238.
121. Kim MH, Kim HK, Lee JK, Park SY, Oh TK. Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: High-level production, purification, and calcium-dependent thermostability. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. Feb 2000;64(2):280-286.
122. Brundiek H. *Etablierung und Optimierung der sekretorischen Gewinnung von thermostabilen Lipasen in Gram-positiven Bakterien* [Dissertation]. Düsseldorf: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2007.
123. Özmen S., *Vergleichende Optimierung und Charakterisierung thermostabiler Lipase-Produktion in Corynebacterium glutamicum und Staphylococcus carnosus* [Diplomarbeit], Hannover: Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover; 2008.
124. Yang XH, Wang BW, Cui FN, Tan TW. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*. May 2005;40(6):2095-2103.
125. Falk MPF, Sanders EA, Deckwer WD. Studies on the Production of Lipase from Recombinant *Staphylococcus-Carnosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Apr 1991;35(1):10-13.
126. Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo JS, Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnology Progress*. Sep-Oct 2004;20(5):1301-1308.
127. Tsumoto K, Ejima D, Nagase K, Arakawa T. Arginine improves protein elution in hydrophobic interaction chromatography - The cases of human interleukin-6 and activin-A. *Journal of Chromatography A*. Jun 22 2007;1154(1-2):81-86.
128. Mayer H, Jaakkola P, Collins J, Segner A, Wagner F. Cloning of the Penicillin-G Acylase Gene of *Escherichia-Coli* Atcc11105 on Multicopy Plasmids. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*. 1979;360(8):1035-1035.
129. Kasche V, Haufler U, Markowsky D, Melnyk S, Zeich A, Galunsky B. Penicillin Amidase from *Escherichia-Coli* - Enzyme Heterogeneity and Stability. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Jun 15 1987;501:97-102.
130. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426-428.

- 131.** Winkler UK, Stuckmann M. Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia-Marcescens*. *Journal of Bacteriology*. 1979;138(3):663-670.
- 132.** Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. May 7 1976;72:248-254.
- 133.** Higerd TB, Spizizen J. Isolation of 2 Acetyl Esterases from Extracts of *Bacillus-Subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 1973;114(3):1184-1192.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Andrea Münster
Geburtstag 04.11.1982
Geburtsort: Haselünne
Nationalität deutsch

Schulbildung

1989-1993 Grundschule Lengerich
1993-1995 Orientierungsstufe Lengerich
1995-2002 Gymnasium Leoninum Handrup; Leistungskurse: Mathe, Biologie
Abschluss: Abitur

Studium

2001-2006 Studium zur Dipl. Chemikerin, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Thema der Diplomarbeit: Einsatz der Membranadsorbertechnik zur Aufreinigung
von Antikörpern aus Zellkulturüberständen
2008-2011 Promotion am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität
Hannover

Publikationen

Vorträge

Application of membrane adsorber for the separation of enzymes

13th Aachener Membran Kolloquium, Aachen, Deutschland, 27.-28.10.2010

Veröffentlichungen

Isolation and purification of blood group antigens using immuno-affinity chromatography on short monolithic columns

Journal of Chromatography A, 2010

A. Münster, O. Hiller, D. Grüger, R. Blasczyk, C. Kasper

Application of membrane adsorber for the separation of enzymes

Book of paper, 13th Aachener Membran Kolloquium, 2010

A. Münster, A. Pastor, L. Villain, S. Beutel, T. Scheper

Membranadsorbersysteme in der Proteinaufreinigung: Screening-Möglichkeiten

Chemie-Ingenieur-Technik, 2008

Ö. Kökpınar, J.-G. Walter, F. Anton, A. Münster, C. Kasper, F. Stahl, T. Scheper

Posterpräsentationen

Einsatz der Membranadsorbertechnologie zur Aufreinigung der Cellulase Cel5A

28. Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, **21.-23.09.2010**

A. Münster, L. Villain, A. Pastor, S. Beutel, T. Scheper

Enzyme purification using membrane adsorber technology

5th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, **29.08.-02.09.2010**

A. Münster, L. Villain, A. Pastor, S. Beutel, T. Scheper

Anwendung der Membranadsorbertechnologie zur Aufarbeitung und Isolierung von Enzymen

27. Jahrestagung der Biotechnologen, Mannheim, **08.-10.09.2009**

A. Münster, A. Pastor, S. Beutel, T. Scheper

Einsatz der Membranadsorbertechnologie zur Enzymaufreinigung

BIOKATALYSE2021-Kompetenz-Workshop, Lübeck, 26.06.2009

A. Münster, A. Pastor, S. Beutel, T. Scheper