

# Anwendung maßgeschneiderter poröser Adsorbentien in Enzymaufreinigungsprozessen

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. Friederike Sander  
geboren am 12.04.1983 in Stadthagen

2011

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Koreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 12.08.2011

### **Erklärung**

Hierdurch erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Diese Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsleistung verwendet.

Hannover, im Juni 2011



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2008 bis Juni 2011 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Mein Dank gebührt an erster Stelle Prof. Dr. Thomas Scheper für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können. Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Dr. Ulrich Sohling und Dr. Kirstin Suck von der Süd-Chemie AG für die gute Zusammenarbeit, die zahlreichen Ratschläge und Tipps zu meiner Arbeit, ihre Hilfe bei meinen Vorträgen sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Dr. Katrin Koehler und Dr. Axel Thiefes von der Sartorius Stedim Biotech GmbH gilt ebenfalls Dank für die gute Zusammenarbeit.

Dr. Sascha Beutel danke ich für die wissenschaftliche Betreuung, das Korrekturlesen diverser Berichte, Präsentationen, Paper, Poster und nicht zuletzt meiner Arbeit und vor allem dafür, dass er mich immer geduldig ertragen hat.

Prof. Dr. Jürgen Caro danke ich für die Bereitschaft, meine Prüfung im Nebenfach abzunehmen.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Förderung meiner Arbeiten im Rahmen des Biokatalyse2021-Projektclusters.

Dem gesamtem AK Scheper gebührt Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Clarissa Baumanis gilt Dank für das Anfertigen der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Andrea Münster, Stefanie Böhm, Julia Stötzner, Britta Seelandt und Clarissa Baumanis danke ich für unser freundschaftliches Verhältnis, zahlreiche zusammen verbrachte Mittags- und Kaffeepausen, für unsere Sektabende und besonders für gemeinsam ertragenden Schreib- und Bewerbungsfrust.

Meinem Bruder Christian danke ich ganz herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und meiner zahlreichen Anschreiben.

Größten Dank muss ich jedoch meinen Eltern aussprechen. Ohne ihre finanzielle Unterstützung wäre mir das Studium der Chemie verwehrt geblieben und diese Arbeit nicht entstanden.



## Inhalt

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung und Aufgabenstellung	3
2 Grundlagen	6
2.1 Tiefenfilterschichten in Proteinaufreinigungsprozessen	6
2.1.1 Einsatz in Klärungsprozessen von Bioreaktoreffluenten	8
2.1.2 Modifizierte Tiefenfilterschichten	11
2.2 Materialien	14
2.2.1 Tonmineralien	14
2.2.2 Hydrotalcite	16
2.2.3 Aluminiumoxid-basierte Materialien	17
3 Enzymadsorption im Modellsystem	19
3.1 Adsorption im statischen System	21
3.1.1 Tonmineralien	21
3.1.2 Hydrotalcite	24
3.1.3 Aluminiumoxid-basierte Materialien	27
3.2 Elution im statischen System	40
3.2.1 Tonmineralien	41
3.2.2 Hydrotalcite	45
3.2.3 Aluminiumoxid-basierte Materialien	47
3.2.4 Zusammenfassung	49
3.3 Adsorption im dynamischen System- gepackte Säulen	50
3.3.1 Pulverförmige Materialien	51
3.3.2 Granulierte Materialien	52
3.3.3 Regenerierbarkeit der granulierten Materialien	55

---

3.3.4	Modifizierte Granulate	56
3.4	Adsorption im dynamischen System-Tiefenfilterschichten	57
3.4.1	Charakterisierung der erhaltenen Filterschichten	58
3.4.2	Dynamische Beladungskapazitäten der Filterschichten	60
3.4.3	Zusammenfassung	66
4	Enzymaufreinigung aus Zellkulturen	68
4.1	Unmodifizierte Materialien	69
4.1.1	Hydrotalcite und Tonminerale	69
4.1.2	Aluminiumoxid-basierte Materialien	72
4.1.3	Zusammenfassung	73
4.2	Modifizierte Materialien zur Lipase- und Esteraseaufreinigung	75
4.2.1	Materialien	75
4.2.2	Aufreinigung in einem statischen Adsorptionssystem	77
4.2.3	Quantifizierung der Aufreinigungen	80
4.2.4	Regenerierbarkeit der Materialien	85
4.2.5	Aufreinigung in einem dynamischen Adsorptionssystem	87
4.2.6	Zusammenfassung	90
4.3	Modifizierte Materialien zum Einsatz in der Metallchelatchromatographie	91
4.3.1	Aufreinigungen in einem statischen System	93
4.3.2	Regenerierbarkeit der Materialien	96
4.3.3	Dynamische Aufreinigungen	97
4.3.4	Zusammenfassung	100
5	Zusammenfassung und Ausblick	101
6	Anhang	107
6.1	Ergänzende Daten	107
6.2	Versuchsdurchführungen	115
6.3	Analytik	122
6.4	Geräte, Materialien und Chemikalien	134
	Literaturverzeichnis	140



## Abkürzungsverzeichnis

Ac	Aceton
ACN	Acetonitril
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Bgl	$\beta$ -Glucanase
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
BSTE	Esterase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>
BTEE	N-Benzoyl-L-tyrosinetyl ester
CAPS	(3-Cyclohexylamino-)1-propansulfonsäure
CHY	$\alpha$ -Chymotrypsin
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al	et altera
EtOH	Ethanol
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
Hex	Hexan
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
His-Tag	Polyhistidin-Schwanz
HT	Hydrotalcit
IDA	Iminodiessigsäure ( <i>Iminodiacetic acid</i> )
IEP	Isoelektrischer Punkt
IMAC	Immobilisierte Metallchelatchromatographie
IsoProp	Isopropanol
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lipase aGTL	Lipase aus <i>Geobacillus thermoleovorans</i>
Lipase aPA	
Lev	Levansucrase aus <i>Lactobacillus reuteri</i>
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

MW	Molekulargewicht, <i>molecular weight</i>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NaPP	Natriumphosphat-Puffer
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
<i>p</i> NPP	<i>para</i> -Nitrophenylpalmitat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Polyethylen
PGA	PenicillinG Amidase
QP Zn	QuadraPure™ Zink
<i>S. carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, <i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Zn(Ri) <sub>2</sub>	Zinkrizinoleat

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene poröse anorganische Adsorbentien als alternative Chromatographiematerialien in Enzymaufreinigungsprozessen getestet. Natürliche Tonminerale und synthetische Aluminiumsilikate besitzen permanente negative Oberflächenladungen und wurden auf ihre Eignung in Kationenaustauschprozessen untersucht. Synthetische Hydrotalcite und Aluminiumoxide wurden auf Grund ihrer permanenten bzw. vom pH-Wert abhängigen Ladung auf ihre Eignung als alternative Anionenaustauscher getestet. Die Materialien wurden zunächst in statischen Versuchen unter Verwendung verschiedener Modellenzyme charakterisiert. Das Problem im Gebrauch pulverförmiger Materialien ist der Übergang in ein dynamisches Adsorptionssystem. Die Pulver lassen sich nur in kleinem Maßstab in chromatographische Säulen packen, da der Druckabfall über den verwendeten Säulenkörper leicht zu hoch wird. Hinzu kommt eine signifikante Quellschwäche natürlicher Tonminerale in wässrigem Medium. Der Übergang in ein dynamisches Adsorptionssystem wurde auf zwei Wegen realisiert. Zum einen wurden die Materialien granuliert, zum anderen als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten eingearbeitet. Es zeigte sich, dass das Einarbeiten in Tiefenfilterschichten eine geeigneterere Methode darstellt, die Pulver in dynamischen Prozessen einzusetzen. Die Materialien wurden zum Teil noch weiter modifiziert um so an spezielle Aufreinigungsprobleme angepasst zu werden. Materialien auf Basis von Fällungskieselsäuren und Tonminerale zeigten eine Eignung zur Aufreinigung von Lipasen und Esterasen aus Zellkulturüberständen und Zelllysaten. In einem Aufreinigungsschritt konnten höhere Aufreinigungs-Effekte als bei Verwendung kommerzieller Materialien erzielt werden. Durch Oberflächenmodifizierungen mit Zinkrizinoleat konnten Enzyme mit His-Affinitätstags aufgereinigt werden.

Schlagerwörter: Tonminerale, Hydrotalcite, Aluminiumoxide, Alumosilikate, Tiefenfilterschichten, Lipasen, Esterasen, Aufreinigung, Metallchelatchromatographie

## **Abstract**

In the present study different porous inorganic adsorbents were tested as alternative chromatographic materials in purification processes of enzymes. Natural clays and synthetic aluminosilicates possess permanent negative surface charges and were determined regarding their ability to be used in cation exchange processes. Because of their permanent and pH-dependent surface charges, synthetic hydrotalcites and aluminas were tested as alternative anion exchange materials. First of all, the materials were characterised in a static adsorption system using model enzymes. The major problem of these powdery adsorbents is the change from a static to a dynamic adsorption system. Powders can only be packed in chromatographic columns in small scale because otherwise the pressure-drop over the column bed would be too high. Furthermore, natural clays show a significant swelling behaviour in aqueous media. The transition to a dynamic adsorption system was realized in two ways. First the materials were used in granulated form, second they were integrated as filter aids into depth filters. It was seen that integrating the materials into depth filters was the better way to use the materials in a dynamic system. Partially the materials were modified to be used within special purification difficulties. Materials based on silica and clays are especially applicable for the purification of lipases and esterases from cell culture supernatants and cell lysis. In one purification step better results were achieved than using commercial materials. Furthermore Zincricinoleat on carrier materials was used for the purification of different enzymes with Histidin-tags.

Key words: clays minerals, hydrotalcites, aluminas, depth filtration, lipases, esterases, purification, IMAC

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Biokatalyse wird vermehrt in industriellen Prozessen eingesetzt. Vorteile sind eine hohe Selektivität, hohe Ausbeuten, eine geringe Anzahl an Nebenprodukten sowie milde Reaktionsbedingungen und eine hohe Enantioselektivität [1, 2]. Eine der größten Herausforderungen bei der Produktion von Biokatalysatoren (i.d.R. Proteine) ist die Senkung der Kosten für den Aufarbeitungsprozess (Downstream process). Dieser kann in Proteinproduktionsprozessen bis zu 80% der Gesamtprozesskosten ausmachen. Für die hohen Kosten sind in erster Linie die zahlreichen Prozessschritte verantwortlich. So muss zunächst in einem Zentrifugations- oder Filtrationsschritt die das Zielenzym enthaltene Kulturbrühe von festen Bestandteilen wie Zellen oder Zelltrümmern befreit werden. Es schließen sich in der Regel mehrere chromatographische Schritte an. [3, 4]. Aus einer Kombination von Filtrations- mit chromatographischen Methoden unter Verwendung geeigneter Adsorbentien und der daraus resultierenden Reduzierung von Arbeitsschritten könnten die Kosten für den Downstream process gesenkt werden. Desweiteren könnte die Verwendung maßgeschneiderter, an die jeweilige Aufreinigungs-Proble adaptierter Materialien die Zahl an chromatographischen Schritten zusätzlich verringern.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen verschiedene anorganische Adsorbentien als alternative Materialien für die Proteinaufreinigung an Enzymmodellen getestet werden. Bei den gängigen chromatographischen Verfahren zur Proteinaufreinigung sind unterschiedliche Wechselwirkungen der stationären Phase mit Proteinmolekülen von Bedeutung. Kationenaustauscher, Anionenaustauscher, hydrophobe Interaktionsmaterialien und Metallchelatmaterialien gehören zu den am häufigsten verwendeten stationären Phasen [5].

Natürliche Tonminerale und synthetische Aluminiumsilikate weisen auf Grund ihrer Struktur negative Oberflächenladungen auf. Durch ihre großen spezifischen Oberflächen zeigen sie zudem hohe Adsorptionskapazitäten für Proteine. Sie könnten daher ladungsbasierte Wechselwirkungen mit Enzymen eingehen und ein Einsatz als stationäre Phase in der Kationenaustauschchromatographie ist denkbar. Synthetische Hydrotalcite weisen auf Grund ihres strukturellen Aufbaus eine

positive Oberflächenladung auf. Synthetische Materialien auf Basis von Aluminiumoxiden besitzen im sauren und neutralen pH-Bereich ebenfalls positive Ladungen in Kombination mit hohen spezifischen Oberflächen und hohen Adsorptionskapazitäten für Proteine. Die Materialien könnten in Anionenaustauschprozessen eingesetzt werden. Gering geladene Tonminerale binden Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen, weshalb eine Verwendung in der hydrophoben Interaktionschromatographie denkbar ist. Die Materialien lassen sich zudem gezielt oberflächenmodifizieren, wodurch sich Einsatzbereiche in weiteren speziellen Aufreinigungsbereichen, wie der immobilisierten Metallchelatchromatographie, eröffnen.

Im Rahmen des BMBF-Biokatalyse 2021 Projektclusters werden unterschiedliche natürliche Tonminerale und synthetische Hydrotalcite der Süd-Chemie AG, Moosburg sowie synthetische Materialien auf Basis von Aluminiumoxiden und Alumosilikaten der Sasol AG, Hamburg zunächst im Modellsystem auf ihre Eignung zur Aufreinigung von Enzymen aus Zellkulturüberständen untersucht. Die Materialien sollen zu diesem Zweck bezüglich ihres Adsorptionsverhaltens gegenüber Modellenzymen verschiedener Eigenschaften charakterisiert werden. Darreichungsformen zum Einsatz in technischen Prozessen müssen entwickelt werden. So sollen die Materialien zum einen in chromatographische Säulen gepackt werden und zum anderen als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten der Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen eingearbeitet werden. Die unter Verwendung von Modellenzymen als geeignet bewerteten Materialien werden dann auf ihre Eignung zur Aufreinigung von Enzymen aus Zellkulturüberständen und Zellaufschlüssen untersucht werden. Desweiteren lassen sich modifizierte Materialien einsetzen, die an bestimmte Aufreinigungsproblematiken angepasst sind. Materialien auf Basis von Silikaten werden bereits erfolgreich zur Immobilisierung von Lipasen eingesetzt [6-11]. Es soll daher untersucht werden, ob sich Silika-basierte Materialien, zum Teil als Mischphasen mit Tonmineralen, auch zur Aufreinigung von Lipasen und Esterasen eignen.

Darüber hinaus werden oberflächenmodifizierte anorganische Materialien auf ihre Eignung in speziellen Aufreinigungsprozessen getestet. Verschiedene, mit Zinkrizinoleat beschichtete Materialien werden auf ihre Verwendbarkeit zur

Aufreinigung von Enzymen mit His-Tags getestet werden. Geträgertes Zinkrizinoleat wurde ursprünglich zur Adsorption von Geruchsstoffen wie Aminen und Schwefelverbindungen entwickelt. Die Adsorption erfolgt jeweils über Bildung von Zink-Komplexen [12]. Eine Adsorption von Proteinen ist daher ebenfalls denkbar. Die Materialien könnten als Alternative zu herkömmlichen Metallchelatomaterialien eingesetzt werden.

## 2 Grundlagen

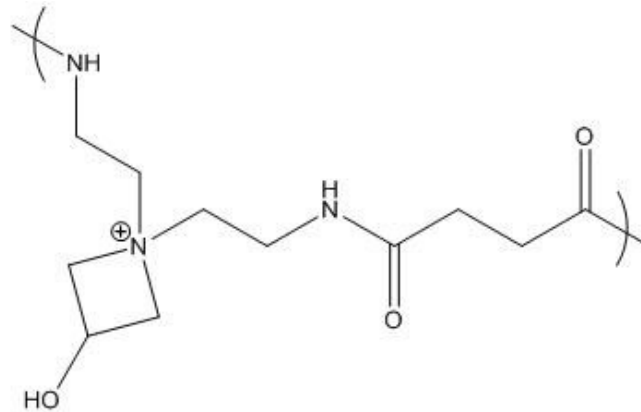
### 2.1 Tiefenfilterschichten in Proteinaufreinigungsprozessen

Tiefenfilterschichten werden im Downstream-Prozess meist zur Klärung von Zellkulturüberständen aus Bioreaktoren verwendet [4, 13-22]. In selteneren Fällen finden sie auch später im Downstream process Anwendung, um die während der Umpufferung entstehende Trübung des Effluenten von Protein A Chromatographiesäulen zu entfernen [23, 24], um nach der chromatographischen Produktaufreinigung letzte Reste von host cell-Proteinen oder DNA adsorptiv zu entfernen [23, 25], oder zur Abreicherung von Viren [25].

Die Klärungsschritte von Zellkulturüberständen und Fermentationsbrühen aus Bioreaktoren sind kritische Stufen in der Produktion biotechnologischer Produkte. Sie haben direkten Einfluss auf die Ausbeute, die Produktzusammensetzung sowie die Reproduzierbarkeit der nachfolgenden Schritte. Tiefenfiltration ist eine Technologie, die gewöhnlich zur Entfernung ganzer Zellen, von Zellbruchstücken und Kolloiden aus Zellkulturen und Fermentationsbrühen verwendet wird [14]. In der Regel ist sie auf Anwendungen beschränkt, in denen das Produkt in den Zellkulturüberstand sekretiert wird [4, 26, 27]. Die Verwendung von Tiefenfiltration hat sich daher besonders in der Klärung von Tierzellkulturüberständen, wie den Kulturen von CHO-Zellen zur Antikörperproduktion etabliert [4, 15, 16, 18, 24, 25]. Tiefenfilterschichten in biopharmazeutischen Anwendungen basieren in der Regel auf einer Cellulosematrix. In diese Matrix werden zusätzlich anorganische Filterhilfsmittel, meistens Kieselgur oder Perlite, eingebettet. Diese Filterhilfsmittel sollen zum einen die Durchlässigkeit der Filterschicht erhöhen und zum anderen eine hohe Filteroberfläche gewährleisten. Verbunden und zusammengehalten werden die einzelnen Bestandteile über ein Bindemittel, meist ein Melamin- oder Epichlorohydrin-Harz [4, 14, 15, 17, 18, 23]. Abbildung 2.1 zeigt Polyaminopolyamid-Epichlorohydrin, ein typisches polymerisches Harz zur Verwendung als Bindemittel in Tiefenfilterschichten [28]. Das Bindemittel erfüllt



zudem noch den Zweck, die Nassfestigkeit des Filters zu erhöhen und dient dazu, über die positiv geladene quaternäre Ammoniumgruppe positive Ladungen in das Filtermaterial einzuführen (siehe Kapitel 2.1.3) [13, 14, 17, 18, 20, 21, 24, 26].



**Abbildung 2.1:** Polyaminopolyamid-Epichlorohydrin als typisches Bindemittel in Tiefenfilterschichten auf Cellulosebasis (adaptiert nach [28]).

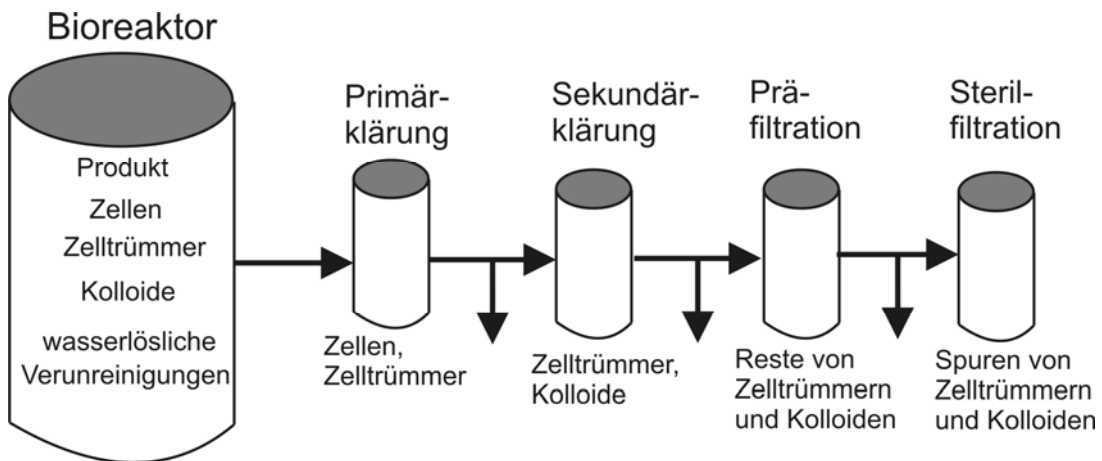
Das resultierende Filtermedium bildet ein feines, dreidimensionales Netzwerk mit großer innerer Oberfläche und großem Porenvolumen [15]. Je nach Art der verwendeten Cellulosefasern erhält man Tiefenfilterschichten mit verschiedenen dichten Strukturen. Die Verwendung von kurzen, harten Fasern führt zu dichten, geschlossenen Filterschichten, die Verwendung längerer, weicherer Fasern zu eher offenen Filterschichten [20, 21]. Seltener werden auch Tiefenfilterschichten auf Basis von Glas- oder Polypropylenfasern verwendet [13, 14, 21, 24, 29, 30]. Diese haben den Vorteil, dass im Gegensatz zu cellulose-basierten Filterschichten kein Ausbluten von Filterhilfsmitteln stattfindet. Allerdings besitzen diese Filter geringere Kapazitäten als cellulose-basierte Tiefenfilter [21, 24]. Dieses Problem betrifft Tiefenfilter, die erst zu einem späteren Zeitpunkt im Downstream process zum Einsatz kommen und den abschließenden Filtrationsschritt darstellen. In Klärungsschritten der Zellkulturüberstände aus Bioreaktoren ist die Verwendung cellulose-basierter Tiefenfilter in der Regel unproblematisch [24]. Allen Tiefenfilterschichten ist gemein, dass sie per Definition nicht nur partikuläre

Anteile an der Oberfläche zurückhalten, sondern der Großteil der abzutrennenden Partikel im Inneren des Filtermediums retentiert wird. Partikel, die kleiner als die Porengrößen des Filters sind können hierbei adsorptiv zurückgehalten werden [14, 18, 20, 23]. Tiefenfilterschichten werden häufig in Form flacher Filterplatten, aus denen Filterstanzlinge gewünschter Größe ausgestanzt werden können, hergestellt. Für industrielle Anwendungen werden sie jedoch meist in Form fertiger Filterkartuschen fabriziert. Die Kartuschen enthalten Filterschichten in unterschiedlichen Aufbauten und Kombinationen. So können z.B. zwei oder mehrere voneinander getrennte Filterschichten in einer Kartusche vorliegen. Durch den eingebauten Zwischenraum soll sich das Fluid nach Durchtritt durch den ersten Filter zunächst im Zwischenraum sammeln, bevor es durch den zweiten Filter tritt. Auf diese Weise sollen sich optimierte Flussbedingungen und erhöhte Lebenszeiten der Filter ergeben. Mehrere Kartuschen können in Gehäusen kombiniert werden [4, 13]. In der Regel werden Tiefenfilterschichten als Einmalmaterialien verwendet [4, 13-15, 17, 18, 24, 25, 31]. Für Anwendungen im Labor- und Technikumsmaßstab werden sie meistens als komplett entsorgbare Einweg-Kartuschen produziert, für Anwendungen im Produktionsmaßstab hingegen zum Einsatz in wiederverwendbaren Edelstahlkartuschen [14, 17].

### **2.1.1 Einsatz in Klärungsprozessen von Bioreaktoreffluenten**

Die Wahl der Technologie für Klärungsprozesse hängt von mehreren Faktoren ab. Sie muss immer auf die Eigenschaften der zu klärenden Kulturbrühe sowie auf die folgenden Aufreinigungsschritte des Downstream process abgestimmt werden [14, 17]. Auch die Art des verwendeten Bioreaktors spielt eine Rolle. Moderne fed-batch- und perfusion-style-Reaktoren produzieren Zellkulturbrühen mit geringeren Zell-Viabilitäten, höheren Zelldichten, stärkeren Trübungen und höheren Konzentrationen an Kolloiden und Polynucleinsäuren als traditionelle batch-Reaktoren [14, 15, 17, 23]. Während für die Klärung von Kulturbrühen aus batch-Reaktoren häufig nur ein einziger Klärungsschritt, bestehend aus Zentrifugation oder Filtration nötig war, wird der Klärungsprozess von Kulturbrühen aus modernen Bioreaktoren meist in 4 Schritte unterteilt: die

Primärklärung, die Sekundärklärung, die Präfiltration und die abschließende Sterilfiltration [14, 17, 23, 27]. Die einzelnen Klärungsschritte sind schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt. Der Gesamtprozess muss hierbei so ausgelegt werden, dass auch hohe Partikeldichten und weite Größenverteilungen der abzutrennenden Partikel praktisch zu handhaben sind [14, 17].



**Abbildung 2.2:** Filtrationsschritte von modernen Bioreaktoreffluenten (adaptiert nach [14]).

### *Primärklärung*

Ziel des primären Klärungsschrittes ist das Abtrennen grober Partikel wie ganzer Zellen oder Zellbruchstücken. Hierbei soll möglichst eine Zerstörung der ganzen Zellen vermieden werden, um das Produkt, das sich in der Kulturbrühe befindet, nicht mit weiteren Proteinen zu verunreinigen [4, 14]. Bis jetzt werden im primären Klärungsschritt meistens Zentrifugen zur Partikelabtrennung genutzt [14, 17, 27]. Zentrifugen haben sich hierbei wegen des geringen Scherstress und den daraus resultierenden geringen Schäden an intakten Zellen, bei gleichzeitiger vollständiger Abtrennung an groben Partikeln, bewährt [14, 23]. Bei der Verwendung von Zentrifugen werden nur Partikel oberhalb einer bestimmten Größe vollständig abgetrennt. Kleinere Partikel müssen daher im sekundären Klärungsschritt entfernt werden [14, 17]. In Kulturbrühen aus Tierzellkultivierungen sind häufig nur geringe Unterschiede in den Dichten von Tierzellen, Zellbruchstücken und den übrigen Bestandteilen der Kulturbrühe vorhanden. Zudem lassen sich in großen Zentrifugen Aerosolbildungen, die eine Abtrennung der Partikel verhindern, nicht vollständig

vermeiden. Bei der Klärung von Tierzellkulturen können daher auch im Schritt der Primärklärung schon Filtrationsschritte zum Einsatz kommen [4]. Hierbei werden in der Regel cross-flow-Filtrationen durchgeführt. Bei kleineren Produktströmen unterhalb von 2000 L können auch hier schon Tiefenfilterschichten zum Einsatz kommen [4, 13-15, 17].

### *Sekundärklärung*

Der Effluent des primären Klärungsschrittes enthält noch kleinere Kontaminanten, wie Kolloide, Lipide, RNA-DNA, restliche Zellen und andere Partikel, die im primären Klärungsschritt nicht entfernt wurden. Ziel des sekundären Klärungsschrittes ist das Abtrennen dieser Verunreinigungen, die im weiteren Verlauf des Downstream process zu Problemen führen können [4, 15, 23]. Üblicherweise besteht die sekundäre Klärung aus mehreren Einzelschritten. Jeder Schritt kann zu Produktverlusten führen. Der Gesamtprozess sollte daher dahingehend ausgelegt werden, dass bei möglichst geringem Produktverlust und möglichst hoher Entfernung an Kontaminanten eine möglichst kleine Anzahl an Prozessschritten verwendet werden muss. In der Regel enthält die Sekundärklärung einen oder mehrere Filtrationsschritte, die Tiefenfilterschichten enthalten. Diese werden so ausgelegt, dass sie im Bereich von 0,2-0,6  $\mu\text{m}$  Partikel durch Größenausschluss entfernen können [14]. Durch die Benutzung von Tiefenfilterschichten mit Adsorbereigenschaften werden zudem weitere Partikel entfernt, die durch Größenausschluss alleine nicht abgetrennt werden können [4, 14, 15, 17, 18, 25].

Während früher mehrere Tiefenfilter unterschiedlicher Offenheiten hintereinandergeschaltet wurden, sind inzwischen leistungsfähigere Tiefenfilterschichten entwickelt worden, um die Anzahl an einzelnen Abschnitten zu verringern. So befinden sich häufig mehrere Schichten, die verschiedene Offenheiten enthalten, innerhalb eines einzelnen Filters. So ist der Filter in Richtung Upstream process offener und wird in Richtung Downstream process immer geschlossener. Auf diese Weise sollen einzelne Filtrationsschritte reduziert werden und durch verbesserte Flusseigenschaften des Fluids durch den Filter

größere Mengen an Partikeln mit breiter Größenverteilung effektiver entfernt werden können [13-15, 17, 23].

#### *Präfiltration und Sterilfiltration*

In allen pharmazeutischen und biotechnologischen Klärungsprozessen ist der letzte Filter ein Sterilfilter [13-15, 17, 21, 24]. Hierbei handelt es sich in der Regel um eine mikroporöse Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm. Um die Lebensdauer dieser teuren Sterilfilter zu erhöhen, wird vor diesem Sterilfilter häufig ein Tiefenfilter als sogenannter Präfilter eingesetzt. Dieser soll eventuelle Reste an Biomaterialien und Kolloiden aus dem Effluent entfernen und dadurch ein vorzeitiges Verblocken des Sterilfilters verhindern [4, 13-15, 20, 23, 24]. Häufig enthalten kommerziell erhältliche Tiefenfilter bereits produktionsgemäß einen abschließenden Sterilfilter [13, 14, 18, 20].

### **2.1.2 Modifizierte Tiefenfilterschichten**

#### *Ladungsmodifizierte Tiefenfilterschichten*

Die meisten in der Natur vorkommenden Kontaminanten, wie Kolloide oder Nucleinsäuren, tragen unter neutralen pH-Bedingungen eine negative Partialladung. Wie in Kapitel 2.1.1 erwähnt, werden Tiefenfilterschichten häufig modifiziert, so dass sie positive Partialladungen an ihrer Oberfläche tragen. Meistens passiert diese Modifikation durch das verwendete Bindemittel oder durch das Einarbeiten weiterer Polymere. Über diese positive Ladung können negativ geladene partikuläre oder auch gelöste Kontaminanten, die kleiner als die Poren des Tiefenfilters sind, adsorptiv zurückgehalten werden [4, 14, 15, 17, 18, 22, 25, 30, 32-34]. Bereits seit den Sechzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts war erkannt worden, dass adsorptive Effekte die Rückhaltung von partikulären Kontaminanten erhöhen können. Ladungsanreicherung wurde auf nahezu die volle Bandbreite von Filtern angewendet, sogar auf die Bereiche der Mikro-, Ultra-, Nanofiltration und Umkehrosmose [21]. Viele Tiefenfilterschichten verfügen zudem über hydrophobe Eigenschaften [16, 18, 20, 23-25, 35]. So wurde für die Adsorption von DNA, Viren und Prionen aus Zellkulturüberständen eine Kombination aus

elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen nachgewiesen [16, 23, 25]. Ebenfalls durch eine Kombination aus elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen konnten host cell-Proteine im sekundären Klärungsschritt entfernt werden. Durch die Abtrennung von host cell-Proteinen aus Überständen von Tierzellkulturen zur Produktion von Antikörpern konnte das Problem der Trübung nach Umpufferung des Eluenten von Protein A-Chromatographiesäulen deutlich vermindert werden [18, 24]. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, den Klärungsprozess dahingehend auszulegen, dass keinerlei Produktadsorption an dem Filter stattfindet [4, 15, 18]. Auch hier erklärt sich das Durchsetzen von Tiefenfilterschichten in Antikörperaufreinigungen. Antikörper besitzen zumeist isoelektrische Punkte im basischen pH-Bereich. Unter Kultivierungsbedingungen liegen sie daher in kationischer Form vor und werden nicht von den positiv geladenen Filterschichten gebunden [24].

Die adsorptive Entfernung von Kontaminanten durch positive Ladungen an der Filteroberfläche ist durch den stöchiometrischen Charakter der Adsorption begrenzt [14, 21]. Mit steigender Beladung des Filters mit Kontaminanten wird das Durchbrechen von Kontaminanten in den Effluenten wahrscheinlicher, bis schließlich sämtliche Oberflächenfunktionalitäten des Filters mit Kontaminanten beladen sind und diese ungehindert in den Effluenten gelangen [13, 18, 21].

#### *Tiefenfilterschichten mit Ionenaustauscheigenschaften*

Die verwendeten Bindemittel führen zwar eine positive Ladung in die Tiefenfilterschicht ein, die zur Adsorption negativ geladener Kontaminanten genutzt wird, allerdings können die dadurch eingeführten aktiven Gruppen nicht nach Kriterien, wie der Affinität für bestimmte Ionen, ausgewählt werden. Die aus der positiven Ladung resultierende Anionenaustauschkapazität der Filter ist eine zusätzliche Eigenschaft des Bindemittels, jedoch weder selektiv noch kontrollierbar, wie im Falle wirklicher Ionenaustauscher. Um die Kapazitäten für negative Kontaminanten sowie die Selektivität gegenüber den abzutrennenden Substanzen zu erhöhen, werden in einigen Fällen auch Ionenaustauschmaterialien in die Tiefenfilterschichten eingearbeitet [20, 36-38]. So wurden Tiefenfilterschichten entwickelt, die verschiedene Ionenaustauschmaterialien als

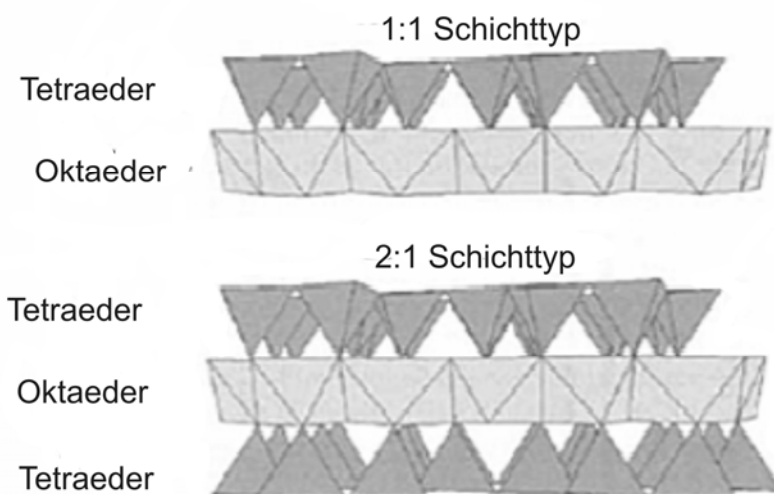
---

Filterhilfsmittel enthalten. Zur Erhöhung der Kapazität gegenüber elektronegativen Kontaminanten wie DNA, host cell-Proteinen, Viren und Endotoxinen wurden bei der Herstellung von Tiefenfilterschichten die herkömmlichen Filterhilfsmittel, wie Perlite, teilweise oder komplett gegen ein als Anionenaustauschmaterial fungierendes Schichtdoppelhydroxid ausgetauscht [37]. Zudem gibt es Forschungsbestrebungen, Tiefenfilterschichten herzustellen, die Ionenaustauscherharze, wie Lewatit-Harze enthalten [20, 38]. Auf diese Weise sollen Tiefenfilterschichten erhalten werden, die ebenfalls über erhöhte, vor allem aber über definierte Adsorptionseigenschaften verfügen [20, 38]. Auf solche Weise zur Adsorption modifizierte Tiefenfilterschichten weisen Analogien zu gepackten Chromatographiesäulen auf. So konnten für die Adsorption von host cell-Proteinen an Tiefenfilterschichten Zusammenhänge zwischen den Parametern und den adsorptiven Eigenschaften gefunden werden, die auch für chromatographische Säulen gelten. Eine Vergrößerung der effektiven Betthöhe durch Kombination mehrerer Filterschichten führt hierbei zu einer Erhöhung der Adsorptionskapazität. Analog zu der Erhöhung der effektiven Betthöhe in chromatographischen Säulen wird die Adsorptionskapazität in stärkerem Maße erhöht als durch das Verhältnis zwischen Adsorptionskapazität und Adsorptionsplätzen erwartet wird. Es wurde jedoch kein Einfluss der verwendeten Flussrate auf die Adsorptionskapazität festgestellt. Ähnlich wie in adsorptiven Membransystemen scheint die Adsorption an Tiefenfilterschichten nicht durch Diffusionsprozesse innerhalb der Poren limitiert zu sein [18]. Entsprechend modifizierte Filterschichten könnten also zusätzlich zu ihrer bisherigen Rolle auch in chromatographischen Prozessen zum Einsatz kommen [18, 36].

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Tonmineralien

Tonmineralien bestehen aus schichtartig aufgebauten Kristallstrukturen, die sich aus abwechselnden Aluminosilikatschichten aufbauen. Bei den Schichten handelt es sich um Si-Tetraederschichten und Mg- oder Al-Oktaederschichten. In den Schichten können Substitutionen von Si und Al gegen niederwertiger geladene Ionen auftreten, was zu negativen Überschussladungen in den Schichten führt, die durch zwischen den Schichten eingelagerte Gegenionen kompensiert werden. Ein fester Einbau dieser Gegenionen in das Kristallgitter ist aufgrund ihres größeren Volumens nicht möglich, weshalb sie leicht gegen andere Kationen ausgetauscht werden können. Je nach Anzahl der oktaedrischen und tetraedrischen Schichten und deren Kombination unterscheidet man Tonmineralien vom 1:1- und solche vom 2:1-Schichttyp. Abbildung 2.3 zeigt den Aufbau der beiden Schichttypen [39].



**Abbildung 2.3:** Strukturmodell der Mineralien vom 1:1- und 2:1-Schichttyp (nach [39]).

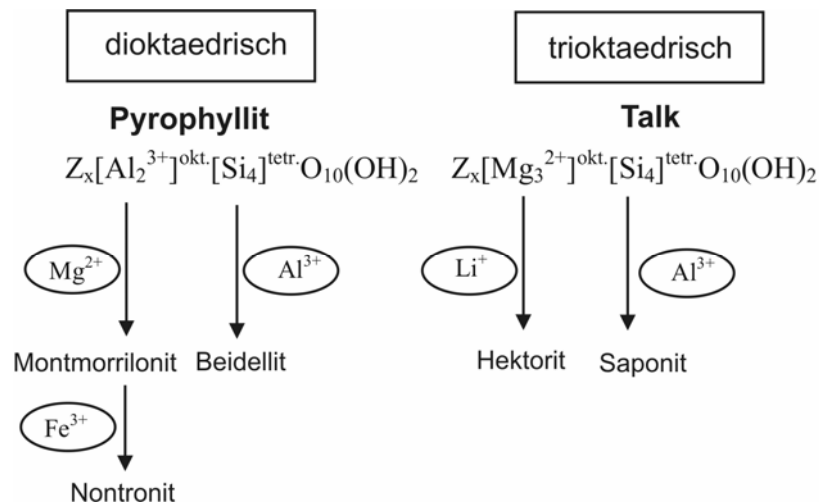
Tonminerale vom 1:1-Schichttyp setzen sich aus einer tetraedrischen und einer daran kondensierten oktaedrischen Schicht zusammen. Sie werden der Gruppe der Serpentine-Kaoline zugeordnet. Bei diesen Tonmineralien treten keine Substitutionen für Si in den Tetraederschichten und nur wenige für Al in den Oktaederschichten auf. Dieser Gruppe der Tonminerale wird daher keine oder kaum



negative Schichtladung zugeordnet. In den Zwischenräumen befinden sich keine Ionen, es kann aber Wasser interkaliert sein [40, 41].

Bei Tonmineralen vom 2:1-Schichttyp liegt jeweils eine Oktaederschicht zwischen zwei tetraedrischen Schichten. Tonminerale von diesem Schichttyp gehören zu den Talk-Pyrophylliten, Smektiten, Vermikuliten und Glimmererden. Diese Gruppen werden durch ihre Schichtladungen voneinander unterschieden. Weiter werden Tonminerale in di- und trioktaedrische Mineralien unterschieden. Bei dioktaedrischen Tonmineralien sind pro Formeleinheit der Tetraederschichten die Oktaederschichten mit jeweils zwei dreiwertigen Kationen besetzt. Von trioktaedrischen Mineralien spricht man, wenn sämtliche Oktaederplätze mit Kationen besetzt sind [39, 42].

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Tonmineralien handelt es sich um smektitische Tonminerale. Smektite weisen Schichtladungen zwischen 0,2-0,6 pro Formeleinheit auf [43]. Abbildung 2.4 zeigt eine Klassifizierung smektitischer Tonminerale, die je nach Art und Ort der auftretenden Substitutionen erfolgt.



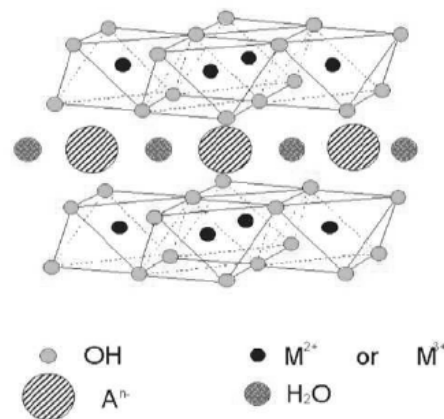
**Abbildung 2.4:** Klassifizierung der smektitischen Tonminerale durch verschiedene Substitutionen in den Oktaeder- und Tetraederschichten von Pyrophylliten und Talken (nach [39]).

Ein Einsatz von Tonmineralen als Chromatographiematerialien stand bisher die Quellfähigkeit der Materialien entgegen, die eine Verwendung als Packungen in chromatographischen Säulen durch zu hohen Gegendruck erschwerte [3].

Inzwischen wurden verschiedene Tone identifiziert, die kein Quellvermögen aufweisen, bzw. wurden Verfahren entwickelt, durch die das problematische Quellverhalten der Tone in wässriger Phase unterbleibt.

### 2.2.2 Hydrotalcite

Hydrotalcite gehören zur Gruppe der Schichtdoppelhydroxide (*layered double hydroxides*, LDH). Hierbei handelt es sich um synthetische Hydroxide mit schichtartiger Kristallstruktur. Ihre Struktur lässt sich von der des Brucits ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) ableiten. Brucit kristallisiert in der hexagonal-dichtesten Kugelpackung, wobei jede zweite Oktaederlücke mit  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen besetzt ist [44-48]. Abbildung 2.5 zeigt schematisch den Aufbau von Hydrotalciten.



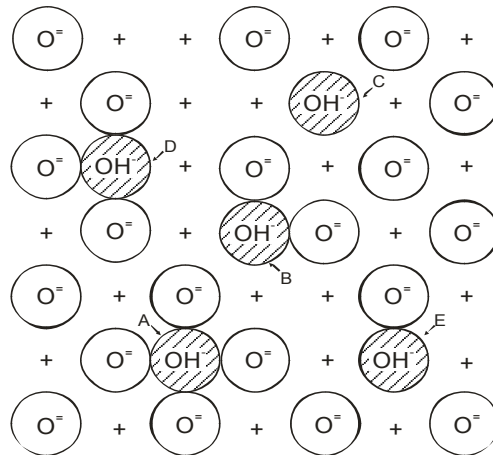
**Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung der Struktur von Hydrotalciten (nach [44]).

Die Besetzung erfolgt so, dass es zur Ausbildung einer Schichtstruktur kommt. Es entsteht jeweils eine Schicht, in der sämtliche Oktaederlücken mit  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen besetzt sind. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer Zwischenschicht, in der die Oktaederlücken vollständig unbesetzt sind [44]. Die zweiwertigen Magnesiumionen können partiell durch dreiwertiges Aluminium ersetzt werden, woraus eine positive Nettoladung der Schichten resultiert. Ein Ladungsausgleich entsteht durch das Einlagern von Anionen in der Zwischenschicht. Zusätzlich wird zwischen den Schichten reversibel Kristallwasser eingelagert. Bei den eingelagerten Anionen kann es sich um Halogene, nichtmetallische Oxoanionen, Oxometallanionen, anionische Komplexe von Übergangsmetallen sowie flüchtige organische Anionen

handeln. Diese Anionen sind nur lose gebunden und können daher in Anionenaustauschprozessen gegen andere Ionen ausgetauscht werden [44-49].

### 2.2.3 Aluminiumoxid-basierte Materialien

Übergangsaluminiumoxide, wie  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  spielen eine große Rolle als Katalysatoren oder Katalysatorträger in der heterogenen Katalyse in einer Reihe von industriellen Anwendungen, hauptsächlich in der Petrochemie [50, 51]. Die Aktivität der Materialien lässt sich durch ihre Struktur erklären [52-55]. Die Herstellung erfolgt meist durch thermische Dehydroxylierung von Aluminium-Hydroxiden, wie z.B. Böhmit ( $\text{AlOOH}$ ) [50, 56-58]. Böhmit kristallisiert in der Lepidokrit-Struktur. Hierbei sind  $\text{AlO}_6$ -Oktaeder zu Doppelschichten angeordnet, die untereinander durch Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft sind [59]. Beim Erhitzen entstehen die Übergangsaluminiumoxide in der Reihenfolge  $\gamma \rightarrow \delta \rightarrow \theta$ , bevor sich schließlich das thermodynamisch stabile, aber katalytisch inaktive  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  bildet. Böhmit unterscheidet sich vom sogenannten Pseudoböhmit durch einen höheren Kristallisationsgrad und einen geringeren Wasseranteil [50, 60]. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  entsteht bei der thermischen Dehydroxylierung von Böhmit als erstes der Übergangsaluminiumoxide. Seine Struktur lässt sich als defekte Spinellstruktur beschreiben, in der die Sauerstoffatome eine kubisch-dichteste Packung bilden [54, 58, 61, 62]. Auch nach vollständiger Dehydroxylierung trägt das Material Hydroxygruppen an seiner Oberfläche. Fehlstellen und Defekte an der Oberfläche führen dazu, dass diese in fünf verschiedenen chemischen Umgebungen existieren, die schematisch in Abbildung 2.6 dargestellt und mit A bis E bezeichnet sind [52, 62]. Obwohl nicht abschließend geklärt ist, welche Oberflächenfunktionalitäten zu der Aktivität des Materials führt, wird angenommen, dass diese Hydroxygruppen als Brönstedt-Säuren sowie koordinativ ungesättigte  $\text{Al}^{3+}$ -Kationen als Lewis-Säuren maßgeblich an der katalytischen Aktivität beteiligt sind [51-53, 62].



**Abbildung 2.6:** Hydroxy-Gruppen an der Oberfläche von  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  in fünf verschiedenen chemischen Umgebungen (als A-E bezeichnet). + symbolisiert Aluminiumionen in der nächst tieferliegenden Schicht (adaptiert nach [52]).

Es handelt sich um poröse Materialien. Eigenschaften wie Porengrößenverteilung, Porenvolumen und spezifische Oberfläche können während des Herstellungsprozesses eingestellt werden [50].

Zum Einsatz in katalytischen Anwendungen werden die Materialien häufig noch modifiziert. Die Modifikation von  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  mit Siliziumdioxid führt zu einer Erhöhung der Azidität der aktiven Oberflächenfunktionalitäten der Materialien. Zum einen kommt es zu isomorphen Substitutionen von  $\text{Al}^{3+}$  gegen  $\text{Si}^{4+}$ -Ionen in tetraedrischen Gitterplätzen, was zu einer erhöhten Lewis-Säure Aktivität führt. Zum anderen kommt es zu der Bildung von verbrückenden Hydroxy-Gruppen, ähnlich derer in Zeolithen, was zu einer erhöhten Brönstedt-Säure Aktivität der Materialien führt [51, 55, 63, 64]. Ein Maximum in Quantität und Säurestärke dieser sich bildenden Funktionalitäten wird bei einer Menge von 40% Siliziumdioxid erreicht [51]. Die Modifikation von  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  geht mit einer Abreicherung von Aluminiumoxid an der Partikeloberfläche einher. Bei einem Anteil von 40% Siliziumdioxid findet sich keinerlei reines Aluminiumoxid mehr an der Oberfläche des Materials. Nur Alumosilikate und reines Siliziumdioxid befinden sich an der Oberfläche der Partikel [51].

### 3 Enzymadsorption im Modellsystem

Tonminerale, Hydrotalcite und Materialien auf Basis von Aluminiumoxiden und -hydroxiden zeigen eine Affinität zur Bindung von Proteinen. Natürliche Tonminerale weisen auf Grund der Substitutionen in den Oktaederschichten eine positive Oberflächenladung auf und können dementsprechend als Kationenaustauschmaterialien für Proteine und andere Biomoleküle fungieren [65-78]. Die Adsorption kann zudem auf weiteren Wechselwirkungen, wie hydrophoben oder Wasserstoffbrückenbindungen beruhen [68, 70-72, 74, 77]. Eine große Oberfläche in Kombination mit einer hohen Porosität resultiert in Adsorptionskapazitäten für Proteine und andere Biomaterialien [67, 69, 70, 72]. Synthetische Hydrotalcite weisen auf Grund ihres strukturellen Aufbaus eine permanente positive Oberflächenladung auf [45, 47]. Sie könnten dementsprechend als stationäre Phase in chromatographischen Anionenaustauschprozessen eingesetzt werden. Auch sie weisen auf Grund ihrer Ladung, ihrer großen Oberflächen und hohen Porositäten Adsorptionskapazitäten für Proteine auf [71, 79-83]. Als Vorteile dieser Materialien sind vor allem ihr geringer Preis in Verbindung mit hohen Adsorptionskapazitäten zu nennen.

Materialien auf Basis von Aluminiumoxiden und -hydroxiden wurden seit Anfang des 20. Jahrhunderts als stationäre Phasen in chromatographischen Aufreinigungsprozessen biologischer Substanzen verwendet, in den Fünfzigerjahren jedoch durch Materialien auf Cellulose- und Dextranbasis verdrängt, die als vielseitiger galten. Seitdem sind sie als Chromatographiematerialien weitgehend in Vergessenheit geraten [62]. Heutzutage finden sie Anwendung im Bereich der heterogenen Katalyse. Bei ihren funktionellen Gruppen handelt es sich um Säure- und Basefunktionalitäten. Auch sie weisen Adsorptionskapazitäten für Proteine auf [58, 62, 84-90]. Sie besitzen ebenfalls permanente oder pH-abhängige Oberflächenladungen und könnten daher ebenfalls in Ionenaustauschprozessen zum Einsatz kommen. Aktuelle Forschungsarbeiten zielen hierbei jedoch weniger auf die chromatographische Aufreinigung oder Immobilisierung von Proteinen ab [87, 89, 90], sondern eher auf unerwünschte Nebenwirkungen in technischen Anwendungen von Metalloxiden

durch Proteinsorption [58, 84-86, 88, 91]. Im Rahmen ihrer katalytischen Verwendung zeichnen sich die Materialien vor allem durch eine hohe Adaptionfähigkeit aus. Eigenschaften wie Porosität, innere Oberfläche und Dichte der funktionellen Gruppen können während des Herstellungsprozesses eingestellt werden. Es ist denkbar, diese Materialien nach geeigneter Charakterisierung ihrer Eigenschaften quasi maßzuschneidern und an die entsprechende Aufreinigungsproblematik anzupassen.

Als Maß für die Oberflächenladung wird im Rahmen dieser Arbeit das Zeta-Potential der Materialien verwendet. Hierbei handelt es sich um das elektrische Potential an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in Suspension [92].

Um die Materialien auf ihre Eignung in Enzymaufreinigungsprozessen zu charakterisieren, wurde zunächst das Adsorptionsverhalten in statischen Adsorptionssystemen untersucht. Hierbei findet eine Inkubation des untersuchten Materials mit der entsprechenden Enzymlösung in einem geschlossenen Reaktionsgefäß statt, wobei es zu einer gleichmäßigen Durchmischung kommt. Hierdurch ist die Kontaktzeit zwischen Adsorbens und Enzym relativ lang und es kann sich das thermodynamische Gleichgewicht der Adsorption einstellen. Im dynamischen Adsorptionssystem hingegen wird die Adsorption im Durchfluss durchgeführt. Das Adsorbens ist hierbei als stationäre Phase immobilisiert und wird von der jeweiligen Enzymlösung durchströmt. Die Kontaktzeit zwischen Material und Enzym ist hierbei relativ gering. Es kann sich nur das kinetische, nicht jedoch das thermodynamische Adsorptionsgleichgewicht einstellen. Dynamische Adsorptionskapazitäten sind in der Regel geringer als statische Adsorptionskapazitäten [93]. Der Übergang vom statischen ins dynamische Adsorptionssystem stellt bei der Verwendung der Materialien ein Problem dar, da die Materialien in pulverförmiger Form vorliegen. Ein großer Teil der Partikel besitzt Durchmesser von weniger als 45  $\mu\text{m}$ . Sie können in dieser Form nicht in chromatographische Säulen gepackt werden. Es wurden daher verschiedene Möglichkeiten zum Einsatz in dynamischen Adsorptionssystemen entwickelt und miteinander verglichen.

### 3.1 Adsorption im statischen System

Eine ausgiebige Charakterisierung der verwendeten Tonminerale und Hydrotalcite hat bereits in der Dissertation von Ralla, 2008 stattgefunden [94]. Es soll daher nur eine kurze Vorstellung der Materialien und ihrer wichtigsten Eigenschaften in Adsorptionsprozessen erfolgen. Die verwendeten Materialien auf Basis von Aluminiumoxid und -hydroxid wurden zum ersten Mal in Proteinaufreinigungsprozessen eingesetzt. Es wurde daher eine eingehende Charakterisierung ihrer Adsorptionseigenschaften durchgeführt.

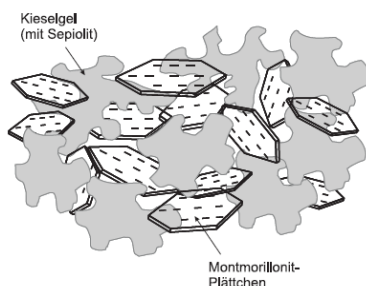
#### 3.1.1 Tonminerale

##### *Verwendete Materialien*

Zwei verschiedene Tonminerale wurden auf ihre Eignung zur Enzymadsorption untersucht.

Das Material EXM 1694 ist ein eher gering geladenes Tonmineral. Es handelt sich um eine Mischphase aus einem Kerolit und einem Saponit. Die relativ geringe Ladung des Materials erklärt sich aus dem Kerolitanteil. Bei Keroliten handelt es sich um Tonminerale, die chemisch zwischen Smektiten und Talk einzuordnen sind und als solche keine Oberflächenladung aufweisen. Das Material verfügt zudem über hydrophobe Eigenschaften und könnte daher als Alternative zu herkömmlichen HIC-Medien eingesetzt werden.

Das Material EXM 1607 ist eine Mischphase aus einem Kerolit und einem Anteil von 40-50% an Nebenmaterialien und amorphem Kieselgel. Die Gesamtkationenaustauschkapazität ist daher als eher gering zu bewerten. Der Montmorillonitanteil weist allerdings eine signifikante Kationenaustauschkapazität auf, wie sie für reine Montmorillonite typisch ist, weswegen eine Eignung als Kationenaustauscher in Aufreinigungsprozessen von Enzymen denkbar ist. Hier liegen teilweise komplett delaminierte Montmorillonitplättchen fest eingebettet in einer amorphen Kieselgelstruktur vor. Das für Tonminerale typische Quellverhalten bleibt dadurch aus. Abbildung 3.1 zeigt ein vorläufiges Strukturmodell des Materials.



**Abbildung 3.1:** Vorläufiges Strukturmodell des Materials EXM 1607 [94].

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Tonminerale und ihre wichtigsten Eigenschaften.

**Tabelle 3.1:** Überblick über die verwendeten Tonminerale und ihre wichtigsten Eigenschaften.

	EXM 1607	EXM 1694
Struktur	Montmorillonit/ Kieselgel	Kerolit/ Saponit
CEC [meq/100g]	52	20-30
Spez. Oberfläche (BET) [m <sup>2</sup> /mg]	190-210	224
Durchschnittsporendurchmesser [nm]	14,2	4,4
Kumulatives Porenvolumen [cm <sup>3</sup> /g]	0,84-0,88	0,248

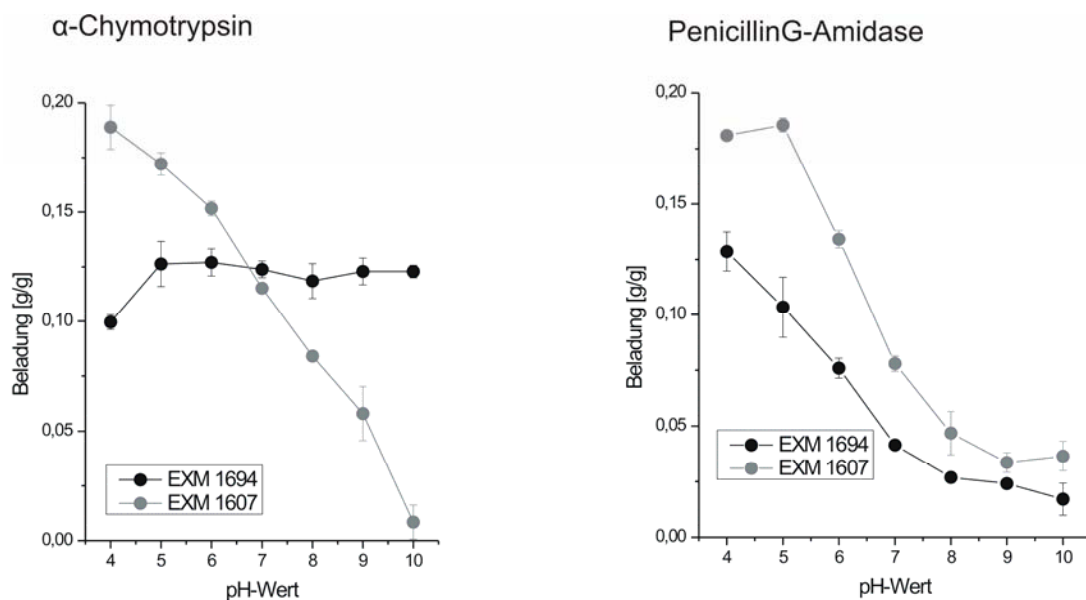
EXM 1607 wurde bereits als geeigneter Kationenaustauscher in Proteinaufreinigungsprozessen charakterisiert [68, 94, 95], EXM 1694 hingegen als Material, das Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen bindet [94]. Um diese Eigenschaften zu verdeutlichen sind im Folgenden die pH-Abhängigkeiten von zwei Modellenzymen an die beiden Tonminerale dargestellt.

#### *pH-Abhängigkeit der Adsorption*

Abbildung 3.2 zeigt die Beladungskapazitäten für die zwei verwendeten Tonminerale in Abhängigkeit vom pH-Wert der zur Adsorption verwendeten



Enzymlösung. Als Modellenzyme wurden  $\alpha$ -Chymotrypsin (MW: 25 kDa, IEP: 8,1-8,6) und PenicillinG-Amidase (MW: 70 kDa, IEP: 6,7-6,8 kDa) verwendet. Die genaue Versuchsdurchführung sowie die verwendeten Puffersysteme sind dem Anhang (Kapitel 6.2.1) zu entnehmen. Die Proteinquantifizierung erfolgte UV-photometrisch (siehe Kapitel 6.3.1), die Beladungskapazitäten ergeben sich aus der Differenz zwischen gemessener und eingesetzter Proteinkonzentration. Die für  $\alpha$ -Chymotrypsin gezeigten Daten an den Materialien EXM 1694 und EXM 1607 sind der Dissertation von Ralla, 2008 entnommen worden [94], die für PenicillinG-Amidase gezeigten Daten entstanden im Rahmen dieser Arbeit.



**Abbildung 3.2:** pH-Wert-abhängige Adsorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin (links) und PenicillinG-Amidase (rechts) an die Tonmineralien EXM 1694 (Kerolit/Saponit-Mischphase) und EXM 1607 (Montmorillonit/ amorphes Kieselgel). Die Adsorption wurde in jeweils 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt. Die Anfangskonzentration an Enzym betrug jeweils 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Im Falle von  $\alpha$ -Chymotrypsin (linke Seite) weist EXM 1607 eine deutliche Abhängigkeit der Beladungskapazität vom verwendeten pH-Wert auf. Entsprechend des erwarteten Kationenaustauschmechanismus weist das Protein an beiden Materialien hohe Adsorptionskapazitäten unterhalb des isoelektrischen Punktes des Enzyms auf. Bei pH-Werten oberhalb des isoelektrischen Punktes

nehmen die Beladungskapazitäten ab und fallen für das Material EXM 1607 sogar bis auf null ab. Im Falle des Materials EXM 1694 hingegen ist keine größere Abhängigkeit der Adsorptionskapazitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin vom pH-Wert zu erkennen. Wie erwartet scheint die Adsorption hier durch alternative Wechselwirkungen, vermutlich hydrophobe, dominiert zu werden. Für das Enzym PenicillinG-Amidase zeigt das Material EXM 1607 ein sehr ähnliches Adsorptionsverhalten wie für  $\alpha$ -Chymotrypsin. Auch hier ist ein Adsorptionsverhalten zu erkennen, das sich durch einen Kationenaustauschmechanismus erklären lässt. PenicillinG-Amidase ist mit einem Molekulargewicht von 70 kDa deutlich größer als das verwendete  $\alpha$ -Chymotrypsin mit einem Molekulargewicht von lediglich 25 kDa. Beide Materialien zeigen dennoch ähnliche Beladungskapazitäten für beide Enzyme. Unterhalb eines gewissen Molekulargewichts scheint die Größe der Enzyme keinen Einfluss auf die Adsorptionskapazität zu haben. Lediglich für die Adsorption von Alkalischer Phosphatase mit einem Molekulargewicht von 140 kDa wurden in der Dissertation von Ralla, 2008 geringere Adsorptionskapazitäten an dem Material EXM 1607 nachgewiesen [94]. Im Gegensatz zu der Adsorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin zeigt die Adsorption von PenicillinG-Amidase an dem Material EXM 1694 ebenfalls eine Abhängigkeit vom verwendeten pH-Wert. Es ist ein deutlicher Abfall der Adsorptionskapazitäten mit steigendem pH-Wert der Adsorptionslösung zu erkennen. Die Adsorption von PenicillinG-Amidase an dem Material scheint zumindest zum Teil durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst zu sein. Die Wechselwirkungen, die zur Adsorption von Enzymen an Tonmineraloberflächen führen, sind vielfältig und es sind jeweils proteinspezifische Besonderheiten zu beachten [3, 68, 94].

### **3.1.2 Hydrotalcite**

#### *Verwendete Materialien*

Zwei synthetische Hydrotalcite wurden auf ihre Eignung zur Enzymaufreinigung getestet. Hydrotalcite weisen permanente positive Oberflächenladungen auf. Ein Einsatz als Anionentauscher ist daher denkbar. Das Material Syntal 696 wurde

ebenfalls bereits eingehend charakterisiert [94, 96]. Die Hydrotalcite Syntal 696 und EXM 1994 besitzen die allgemeine Formel  $[\text{Mg}_{1-x}\text{Al}_x(\text{OH})_2]^{x+} \cdot [(\text{CO}_3)_{x/n}]^{x-} \cdot m \text{H}_2\text{O}$ . Der Unterschied der beiden Materialien liegt in der verschiedenen Schichtladung. Das Material EXM 1994 besitzt einen höheren Aluminium-Anteil als das Material Syntal 696. Da die positive Oberflächenladung von Hydrotalciten durch den Austausch von Aluminiumionen gegen Magnesiumionen entsteht, besitzt das Material mit höherem Aluminiumanteil eine höhere positive Schichtladung. Es soll daher untersucht werden, ob die höhere Schichtladung von EXM 1994 einen Vorteil in Anionenaustauschprozessen darstellt. Die wichtigsten Eigenschaften der beiden Materialien sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Beide Hydrotalcite liegen in der Carbonatform vor. Diese Form ist sehr stabil, da die Carbonat-Ionen sich nur schwer gegen andere Ionen austauschen lassen. Eine Adsorption von Enzymmolekülen ist daher nur an der Oberfläche der Hydrotalcite zu erwarten. Ein Austausch von Carbonationen würde zu einer Interkalation von Enzymmolekülen in die Zwischenschichten führen. Dadurch wäre die Elution der Enzyme erschwert, weswegen eine Interkalation nicht erwünscht ist.

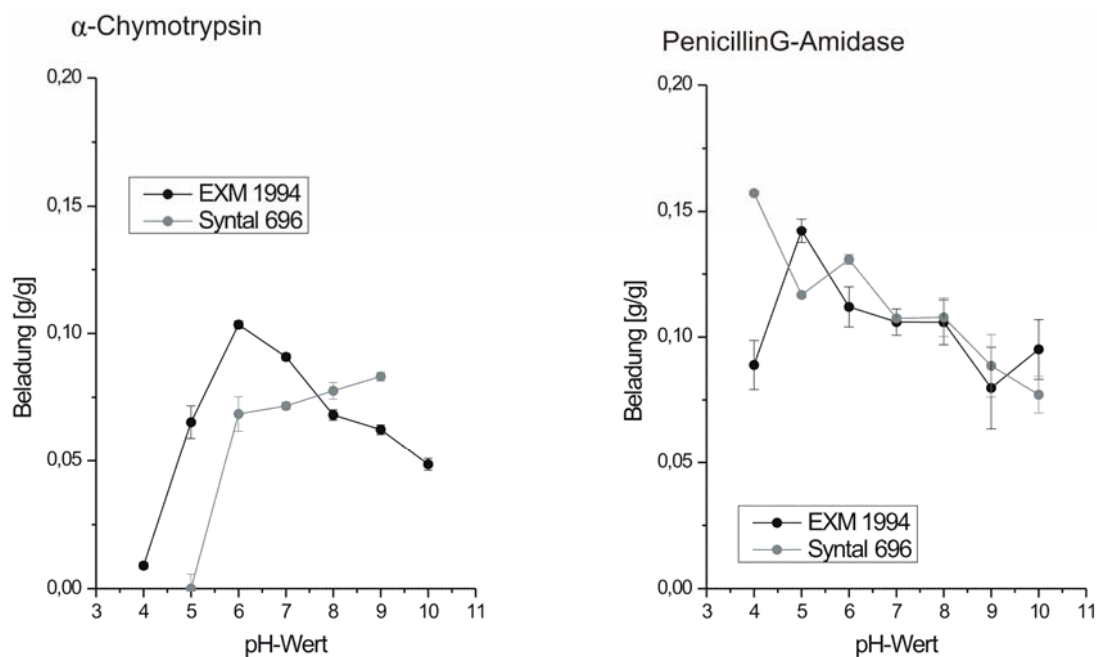
**Tabelle 3.2:** Überblick über die verwendeten Hydrotalcite und ihre wichtigsten Eigenschaften.

	Syntal 696	EXM 1994
Mg/Al-Verhältnis	1,85	0,49
Spez. Oberfläche (BET) [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]	61	150
Durchschnittsporendurchmesser [nm]	24-30	7,5
Kumulatives Porenvolumen [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ]	0,48	0,39

Das Material Syntal 696 wurde bereits als geeignetes Material zur Proteinadsorption in Anionenaustauschprozessen charakterisiert, wobei jedoch proteinspezifische Besonderheiten zu beachten sind, die im Vorfeld evaluiert werden müssen [94, 96].

### *pH-Abhängigkeit der Adsorption*

Auch für die Hydrotalcite Syntal 696 und EXM 1994 wurde die pH-Abhängigkeit der Adsorptionskapazitäten für die Modellenzyme  $\alpha$ -Chymotrypsin und PenicillinG-Amidase bestimmt. Das Vorgehen war analog den Versuchen zur Bestimmung der pH-abhängigen Adsorption an den Tonmineralien. Die genaue Versuchsdurchführung ist wiederum dem Anhang (Kapitel 6.2.1) zu entnehmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Beladungskapazitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an dem Material Syntal 696 sind hierbei wiederum der Dissertation von Ralla, 2008 entnommen worden [94], alle übrigen gezeigten Daten sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden.



**Abbildung 3.3:** pH-Wert-abhängige Adsorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin (links) und PenicillinG-Amidase (rechts) an die Hydrotalcite EXM1994 und Syntal 696. Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt. Die Anfangskonzentration an Enzym betrug 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Im Falle der Adsorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin an das Material EXM 1994 ist zwar eine deutliche Abhängigkeit der Adsorptionskapazitäten über den betrachteten pH-Wert zu erkennen, allerdings folgt dieser nicht dem erwarteten Anionenaustauschmechanismus. Die Adsorptionskapazitäten nehmen zwar

zunächst mit steigendem pH-Wert zu, beginnen ab pH 6 allerdings wieder abzunehmen. Die Adsorption scheint hier durch alternative Wechselwirkungen verursacht zu werden. Obwohl das Material Syntal 696 über eine geringere Schichtladung als das Material EXM 1994 verfügt, scheint die Adsorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin an diesem Material zumindest teilweise durch einen Anionenaustauschmechanismus erklärbar zu sein. Bei pH 5 findet keinerlei Adsorption statt. Mit steigendem pH-Wert nehmen die Adsorptionskapazitäten gemäß der zunehmenden negativen Oberflächenladung des Enzyms zu. Im Falle der Adsorption von PenicillinG-Amidase ist an beiden Materialien eine leichte Abnahme der Adsorptionskapazitäten mit steigendem pH-Wert zu erkennen. Eventuell führen enzymspezifische Eigenschaften zu einer Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die mit zunehmendem pH-Wert der Adsorptionslösung abnehmen. So wurde in vorhergehenden Arbeiten für das glykolysierte Ovalbumin bei steigendem pH-Wert ein Abnehmen der Adsorptionskapazität festgestellt. Auch hier wurde eine Beeinflussung der Adsorption durch Wasserstoffbrückenbindungen vermutet [94]. Obwohl das Material EXM 1994 eine höhere Schichtladung aufweist, ist kein ausgeprägter Zusammenhang zwischen pH-Wert und Adsorptionskapazität gegenüber dem Material Syntal 696 festzustellen. Im Gegenteil weist das Material Syntal 696 sogar ein ausgeprägteres Anionenaustauschverhalten auf. Das Material EXM 1994 wird daher im Folgenden nicht weiter verwendet.

### 3.1.3 Aluminiumoxid-basierte Materialien

#### *Verwendete Materialien*

Es wurden vier verschiedene Materialien auf Basis von Aluminiumoxiden und Aluminiumhydroxiden der Sasol AG, Hamburg getestet. Bei dem Material Puralox<sup>®</sup> KR 160 handelt es sich um ein reines  $\gamma$ -Aluminiumoxid. Als solches verfügt es an seiner Oberfläche über Brönstedtsäure-Funktionalitäten. Der isoelektrische Punkt des Materials liegt bei pH 9. Es könnte daher bei pH-Werten unterhalb von pH 9 als Anionenaustauscher fungieren und analog zu den oben beschriebenen Hydrotalciten verwendet werden. Das Material Pural<sup>®</sup> SB ist ein

Pseudoböhmit, das Material Pural<sup>®</sup> TH 500 ein Böhmit; beide sind Vorläufer in der Synthese von  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Auch Pural<sup>®</sup> SB besitzt einen isoelektrischen Punkt von 9 und könnte daher im neutralen und sauren pH-Bereich als Anionenaustauschmaterial in der Aufreinigung von Proteinen verwendet werden. Bei dem Material Siral<sup>®</sup> 40 handelt es sich um ein synthetisches Aluminiumsilikat. Durch die Modifikation von  $\gamma$ -Aluminiumoxid mit Siliziumdioxid erhält man Materialien mit erhöhter Brönstedt- und Lewissäureaktivität. Das Material Siral<sup>®</sup> 40 besitzt einen Siliziumdioxidanteil von 40% und somit ein Maximum an Lewissäurestärke (siehe Kapitel 2.2.3). Dieses Material hat ein über den gesamten pH-Bereich negatives Zeta-Potential und könnte somit als Kationenaustauscher fungieren. Die Materialien werden in ihrer Funktion als heterogene Katalysatoren in dynamischen Prozessen bereits großtechnisch in granulierter Form eingesetzt. Eine Verwendung in dieser Form als Säulenpackungen in großem Maßstab ist somit denkbar. Eine Übersicht über die verwendeten Materialien und ihre grundlegenden Eigenschaften gibt Tabelle 3.3.

**Tabelle 3.3:** Übersicht über die verwendeten aluminium-basierten Materialien und ihre wichtigsten Eigenschaften.

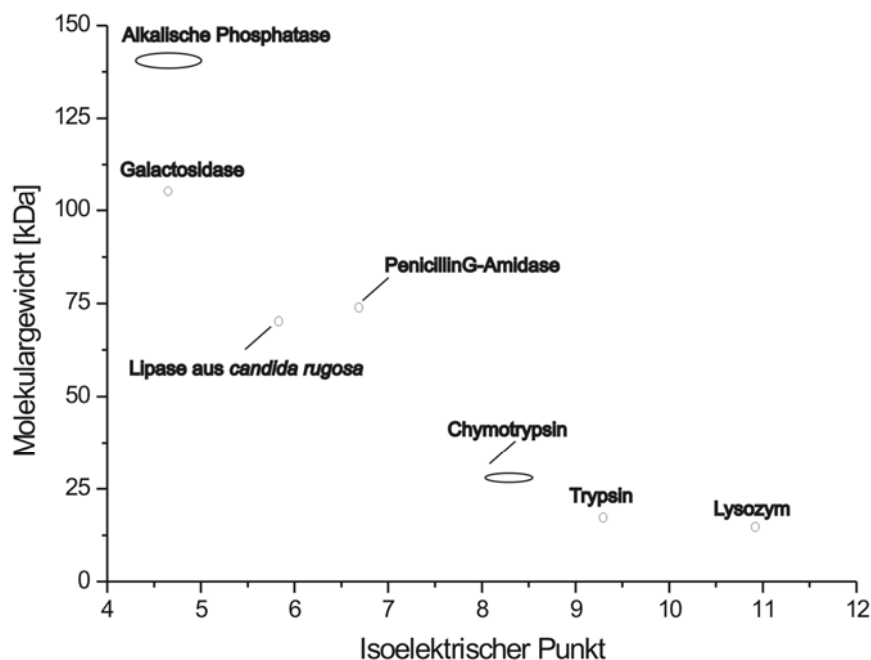
	Puralox <sup>®</sup> KR 160	Siral <sup>®</sup> 40	Pural <sup>®</sup> TH 500	Pural <sup>®</sup> SB
Zuordnung	Aluminium-oxid	Aluminium-silikat	Böhmit	Pseudoböhmit
Spez. Oberfläche (BET) [m <sup>2</sup> /g]	160	520	30	290-295
Kum. Porenvolumen [cm <sup>3</sup> /g]	0,80	0,96	0,12	0,43
Durchschnittsporendurchmesser [nm]	17,2	7,2	15,73	4,98
Zeta-Potential pH 6	+28,6	-18,8	k.a.	+27,7
Zeta-Potential pH 10	-19,4	-25,5	k.a.	-18,0

Alle verwendeten Materialien werden bisher als Katalysatoren bzw. Katalysatorträger in der heterogenen Katalyse eingesetzt und werden hier auf ihre Eignung in Proteinaufreinigungsprozessen getestet. Bisher ist nicht abschließend geklärt, welche Mechanismen die Aktivität der Materialien ausmachen. Es wird vermutet, dass sowohl Fehlstellen im Kristallgitter als auch die erwähnten Säure- und Basefunktionalitäten zu der Reaktivität der Materialien beitragen [63]. Aluminium-basierte Materialien weisen Affinitäten zu Proteinen und anderen Biomolekülen auf [58, 62, 84-90, 97]. Die Adsorption scheint durch die gleichen funktionellen Gruppen wie die Katalysatoraktivität beeinflusst zu werden [62].

#### *pH-Abhängigkeit*

Um herauszufinden, welche Wechselwirkungen die Adsorption von Enzymen an die verwendeten Materialien beeinflussen, wurde zunächst wiederum die pH-Abhängigkeit der Adsorption verschiedener Modellenzyme bestimmt. Hierbei wurden Enzyme mit einem breiten Spektrum an Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten verwendet. Abbildung 3.4 gibt einen Überblick über die verwendeten Modellenzyme und ihre Eigenschaften.

Abbildung 3.5 zeigt exemplarisch die Adsorptionskapazitäten für die Modellenzyme  $\alpha$ -Chymotrypsin (MW: 25 kDa, pI: 8,1-8,6) und  $\beta$ -Galactosidase (MW: 105 kDa, pI: 4,6). Das Vorgehen war analog der in Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 an Tonmineralien und Hydrotalciten durchgeführten Versuche. Die genaue Durchführung ist wiederum dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 6.2.1). Im Falle der Adsorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin zeigen alle vier getesteten Materialien ein ähnliches Adsorptionsverhalten. Bei niedrigen pH-Werten weisen die Materialien nur geringe Adsorptionskapazitäten für das Enzym auf. Im neutralen pH-Bereich nehmen die Adsorptionskapazitäten zunächst zu, um dann bei höheren pH-Werten wiederum abzunehmen. Offensichtlich wird die Adsorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin nicht durch elektrostatische Wechselwirkungen verursacht. Die Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Pural<sup>®</sup> SB besitzen ihren Neutralpunkt bei pH 9. Unterhalb dessen besitzen sie ein positives Zeta-Potential, darüber ein negatives.

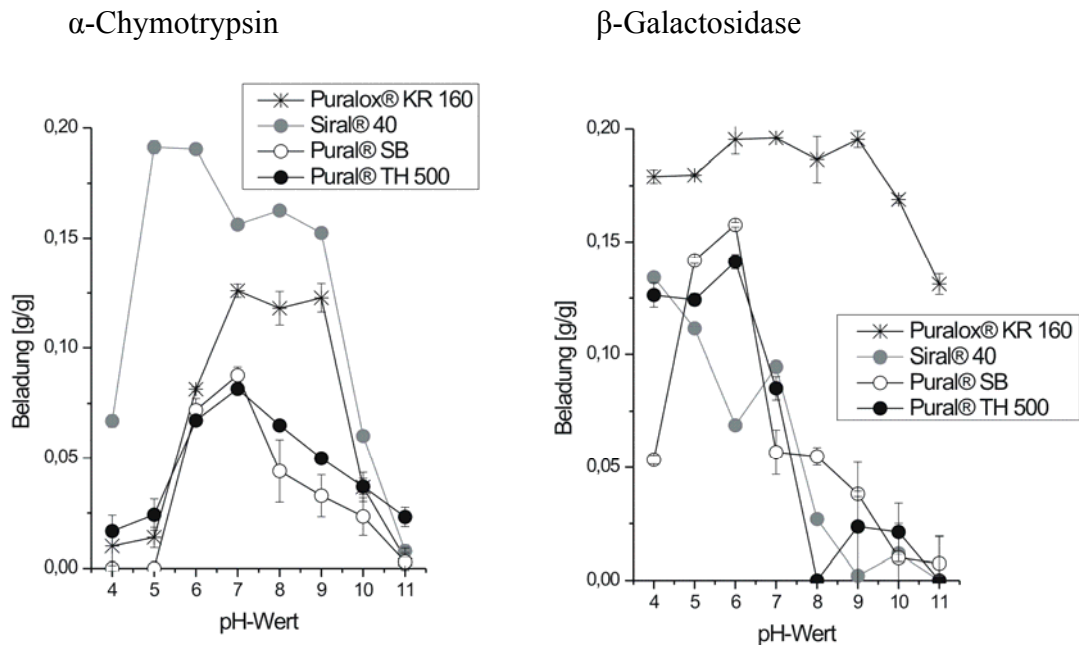


**Abbildung 3.4:** Isoelektrische Punkte und Molekulargewichte der verwendeten Modellenzyme (Lysozym: IEP: 11, MW: 14,3 kDa, Trypsin: IEP: 9,3, MW: 23,3 kDa, Alkalische Phosphatase: IEP: 4,4-5,8, MW: 140 kDa, Lipase aus *candida rugosa*: IEP: 5,8, MW: 67 kDa,  $\alpha$ -Chymotrypsin: IEP: 8,1-8,6, MW: 25 kDa,  $\beta$ -Galactosidase: IEP: 4,6, ME: 540 kDa (Tetramer), PenicillinG-Amidase: IEP: MW: 70 kDa)

Da der isoelektrische Punkt von  $\alpha$ -Chymotrypsin etwa im gleichen Bereich liegt (8,1-8,6), besitzen die Materialien und das Enzym über den gesamten pH-Bereich eine gleichsinnige Ladung. Das Material Siral<sup>®</sup> 40 hingegen weist über den gesamten pH-Bereich ein negatives Zeta-Potential auf. Die Adsorption müsste hier durch einen Kationenaustauschmechanismus beschreibbar sein. Die Adsorption wird offensichtlich durch alternative Wechselwirkungen verursacht. Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase zeigt an den vier untersuchten Materialien ein völlig anderes Adsorptionsverhalten. Die Adsorptionskapazitäten sind im Falle der Materialien Siral<sup>®</sup> 40 und Pural<sup>®</sup> TH 500 zunächst hoch, um dann im neutralen pH-Bereich stark abzufallen. Die Adsorption könnte hier durchaus durch elektrostatische Wechselwirkungen erklärt werden. So sind die Adsorptionskapazitäten für



$\beta$ -Galactosidase bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes des Enzyms hoch, um dann bei pH-Werten oberhalb desselben abzufallen.

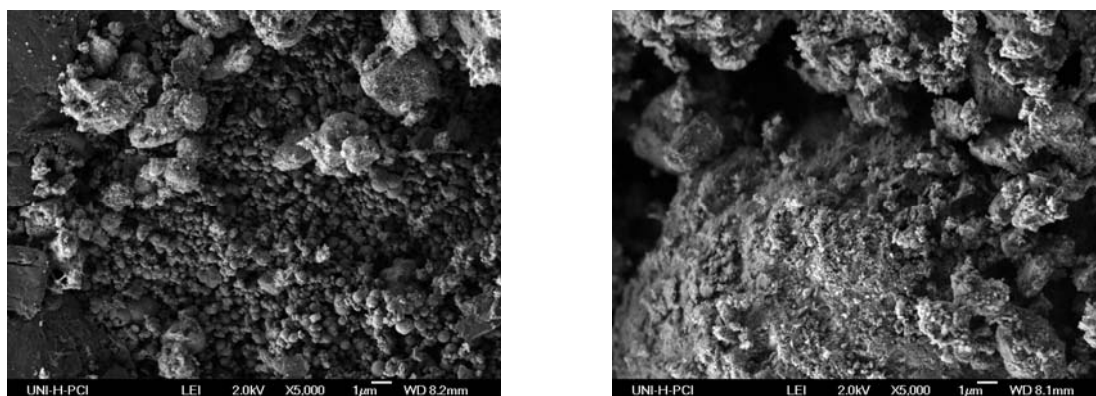


**Abbildung 3.5:** pH-Abhängigkeit der Adsorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin und  $\beta$ -Galactosidase an die Materialien Puralox® KR 160 (Aluminiumoxid), Siral® 40 (Aluminiumsilikat), Pural® SB (Aluminiumhydroxid-Hydrat) und Pural® TH 500 (Böhmit). Die Adsorption erfolgte in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes. Die Anfangskonzentration betrug 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Bei pH-Werten oberhalb von pH 8 fallen die Adsorptionskapazitäten sogar bis auf nahezu null ab. Das Material Pural® SB zeigt bei pH 4 zunächst eine relativ geringe Beladungskapazität von etwa 0,05 g/g. Das Material weist bei niedrigen pH-Werten ein positives Zeta-Potential auf und es wäre zu erwarten, dass keinerlei Bindung des ebenfalls positiv geladenen Enzyms an das Material stattfindet. Die Beladungskapazitäten nehmen bei pH 5 und pH 6 zunächst stark zu. Hier weist das Enzym eine negative Oberflächenladung auf. Die Zunahme der Adsorptionskapazitäten ist hier wahrscheinlich durch eine Zunahme der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Enzym und der positiv geladenen Oberfläche des Materials zu erklären. Ab pH 7 fallen die Adsorptionskapazitäten stetig ab. Bei pH 11 findet keinerlei Adsorption mehr statt.

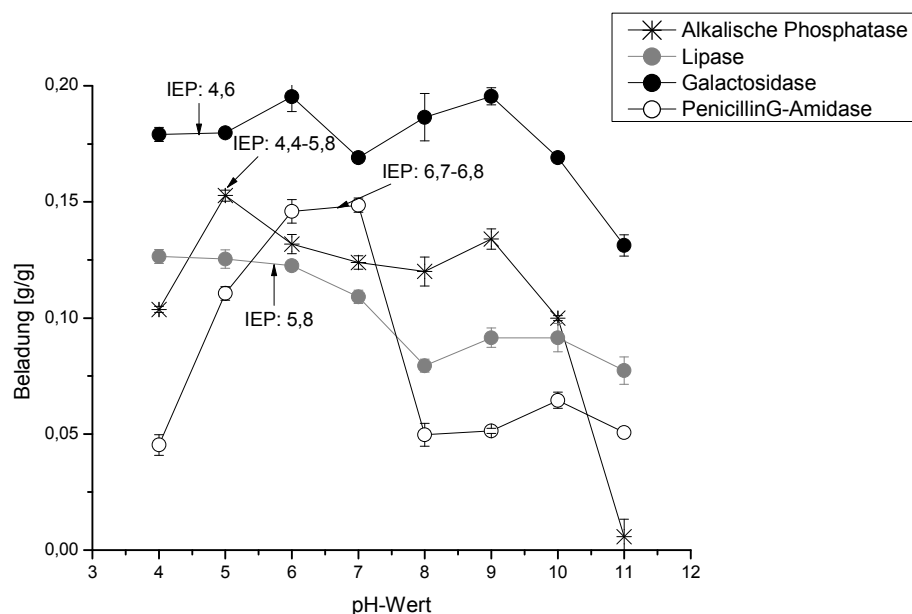
Wahrscheinlich führt das abnehmende Zeta-Potential des Materials zu einer immer geringeren Adsorption des negativ geladenen Enzyms, bis bei hohen pH-Werten schließlich eine Repulsion zwischen Enzym und Oberfläche des Materials stattfindet. Das Material Puralox<sup>®</sup> KR 160 zeigt über den gesamten pH-Bereich eine relativ hohe Beladung mit  $\beta$ -Galactosidase. Lediglich ab pH 9 fallen die Adsorptionskapazitäten leicht ab, liegen bei pH 11 jedoch immer noch bei etwa 0,13 g/g. Die Adsorption scheint hier zum Großteil durch nicht-elektrostatische Wechselwirkungen stattzufinden. Eventuell sind hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen hier die dominierenden Kräfte. Das Adsorptionsverhalten von Enzymen an allen vier getesteten Materialien scheint durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen bestimmt zu werden, die sowohl vom pH-Wert als auch von enzyspezifischen Eigenschaften abhängen. Die Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40 wurden in weiteren Versuchen eingehender charakterisiert. Diese Materialien wiesen sehr hohe Adsorptionskapazitäten für die beiden untersuchten Modellenzyme auf und könnten daher als Chromatographiematerialien zur Enzymaufreinigung geeignet sein.

Abbildung 3.6 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der beiden Materialien in jeweils 5000-facher Vergrößerung. Deutlich ist die größere Oberfläche des Materials Siral<sup>®</sup> 40 im Vergleich zu der von Puralox<sup>®</sup> KR 160 zu erkennen.



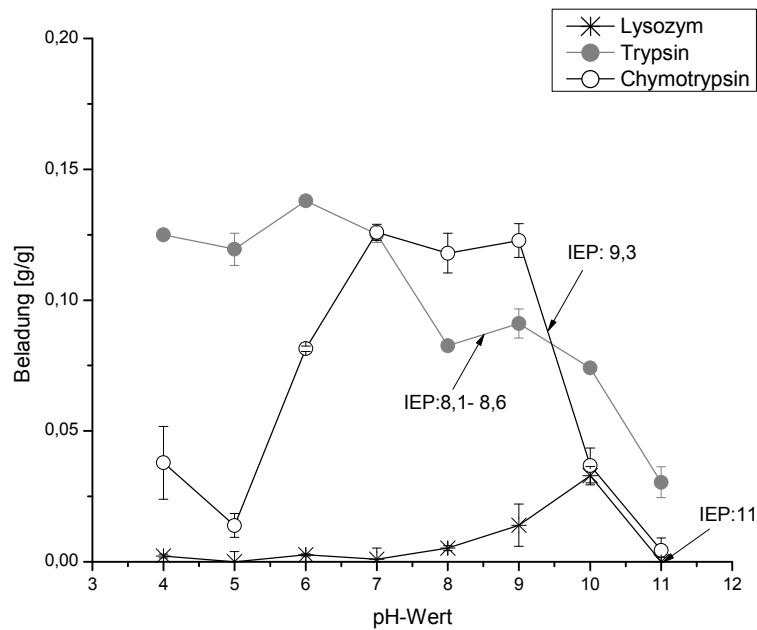
**Abbildung 3.6:** REM-Aufnahmen der Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 (links) und Siral<sup>®</sup> 40 (rechts) (5000fache Vergrößerung).

Anhand weiterer in Abbildung 3.4 dargestellter Modellenzyme wurde das Adsorptionsverhalten der Materialien eingehender untersucht. In Abbildung 3.7 sind die pH-Abhängigkeiten der Adsorptionskapazitäten der Modellenzyme mit einem isoelektrischen Punkt unterhalb von pH 8-9 an dem Material Puralox<sup>®</sup> KR 160 dargestellt. Diese Enzyme könnten bei pH-Werten zwischen ihrem isoelektrischen Punkt und einem pH-Wert von 9, der dem isoelektrischen Punkt des Materials entspricht, durch elektrostatische Wechselwirkungen an das Material gebunden werden. Unterhalb der isoelektrischen Punkte der Enzyme sowie oberhalb von pH 9 müsste eine Repulsion zwischen Enzym und Oberfläche der Materialien stattfinden. Die Enzyme und das Material sind hier jeweils gleichsinnig geladen. Die Adsorption scheint jedoch zum Großteil durch alternative und nicht durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst zu werden.



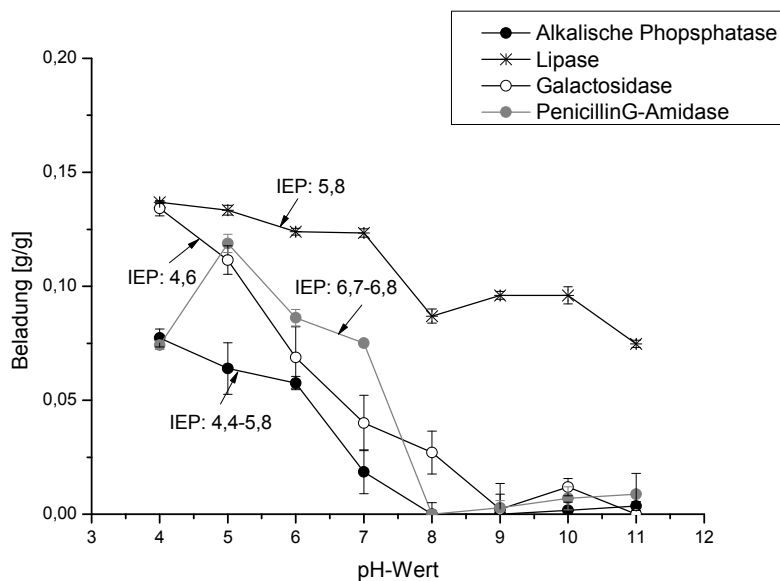
**Abbildung 3.7:** pH-Abhängigkeit der Adsorption der Modellenzyme mit einem isoelektrischen Punkt unterhalb von pH 8-9 an das Material Puralox<sup>®</sup> KR 160. Die Adsorption wurde in 50 mM des entsprechenden Puffers durchgeführt. Die Anfangskonzentration betrug 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Sämtliche Enzyme weisen auch unterhalb ihrer isoelektrischen Punkte Adsorptionskapazitäten auf, die im Bereich zwischen 0,04 g/g für PenicillinG-Amidase und 0,17 g/g für  $\beta$ -Galactosidase liegen. In der Literatur wird für die Adsorption von BSA an Aluminiumoxidoberflächen berichtet, dass die höchsten Adsorptionskapazitäten bei pH-Werten im Bereich des isoelektrischen Punktes des Proteins liegen [84, 85, 97]. Die gefundene Adsorptionskapazität korreliert dennoch mit der Oberflächenladung des Materials. Auch bei pH-Werten ober- und unterhalb der isoelektrischen Punkte wird eine Adsorptionskapazität gefunden [84, 97]. Die Adsorption wird im sauren, neutralen und schwach basischen Bereich durch Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Oxidoberfläche und negativ geladenen Carboxylgruppen des Proteins verursacht. Im stark basischen Bereich kommt es zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hydroxygruppen auf der Metalloxidoberfläche und den Aminogruppen der Proteine [58, 85, 86]. In Abbildung 3.8 sind die pH-Abhängigkeiten der Modellenzyme gezeigt, die einen isoelektrischen Punkt oberhalb von pH 8-9 besitzen. Enzyme und Material sind hier über den gesamten betrachteten pH-Bereich gleichsinnig geladen. Bei einer Adsorption durch elektrostatische Wechselwirkungen müsste es daher zu einer Repulsion und somit zu keinerlei Adsorption kommen. Außer für Lysozym kommt es jedoch für alle Enzyme zu relativ hohen Adsorptionskapazitäten, abhängig vom verwendeten pH-Wert. Die Adsorption von Enzymen an das Material Puralox<sup>®</sup> KR 160 scheint also kaum durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst zu werden. Im Falle von Trypsin ist ein Abfall der Adsorptionskapazitäten mit steigendem pH-Wert zu beobachten. Eventuell findet hier eine Adsorption über Wasserstoffbrückenbindungen statt, die mit geringer werdender Protonierung des Materials abnehmen.



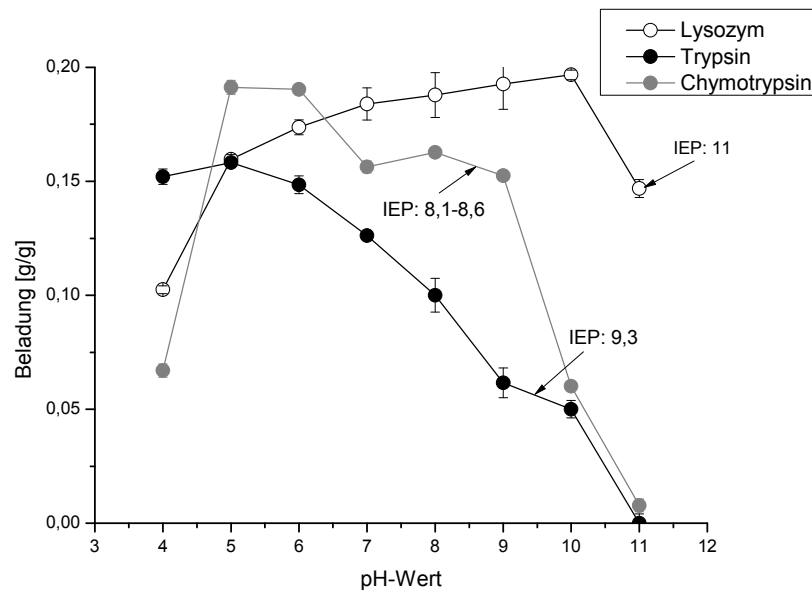
**Abbildung 3.8:** pH-Abhängigkeit der Adsorption der Modellenzyme mit einem isoelektrischen Punkt von pH 8-9 an das Material Puralox<sup>®</sup> KR 160. Die Adsorption wurde in 50 mM des entsprechenden Puffers durchgeführt. Die Anfangskonzentration betrug 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Für das Aluminiumsilikat Siral<sup>®</sup> 40 wurden ebenfalls die Adsorptionskapazitäten für die in Abbildung 3.7 gezeigten Modellenzyme bestimmt. Dieses Material besitzt im Gegensatz zu Puralox<sup>®</sup> KR 160 über den gesamten pH-Bereich ein negatives Zeta-Potential. In Abbildung 3.9 sind zunächst wiederum die Beladungen der Modellenzyme mit einem isoelektrischen Punkt unterhalb von pH 8-9 in Abhängigkeit vom pH-Wert der Adsorption dargestellt. Man sieht für alle Enzyme einen Abfall der Adsorptionskapazitäten mit steigendem pH-Wert. Die Adsorption an das Material Siral<sup>®</sup> 40 könnte durchaus durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst sein. Allerdings scheint der Abfall der Adsorptionskapazitäten weitgehend unabhängig von den isoelektrischen Punkten der Enzyme zu sein.



**Abbildung 3.9:** pH-Abhängigkeiten der Adsorption der Modellenzyme mit einem isoelektrischen Punkt unterhalb von pH 8-9 an das Material Siral<sup>®</sup> 40. Die Adsorption wurde in 50 mM des entsprechenden Puffers durchgeführt. Die Anfangskonzentration betrug 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Alle Enzyme zeigen ab pH 8-9 keinerlei Adsorption an das Material. Lediglich Lipase aus *Candida rugosa* weist auch im basischen pH-Bereich noch Adsorptionskapazitäten von etwa 0,1 g/g auf. Bei Lipasen handelt es sich um hydrophobe Enzyme [98-100]. Es ist daher denkbar, dass ihre Adsorption zum Teil auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Abbildung 3.10 zeigt die pH-Abhängigkeiten der Beladungen der Modellenzyme mit einem isoelektrischen Punkt ab pH 8-9. Für Trypsin lässt sich ein ähnliches Adsorptionsverhalten wie für die in Abbildung 3.8 dargestellten Modellenzyme beobachten. Die Adsorptionskapazität nimmt mit steigendem pH-Wert ab. Auch hier ist jedoch kein Zusammenhang mit dem isoelektrischen Punkt des Enzyms zu erkennen. Im Falle von Lysozym und  $\alpha$ -Chymotrypsin ist mit steigendem pH-Wert zunächst eine Zunahme der Adsorptionskapazitäten zu erkennen. Oberhalb der isoelektrischen Punkte fallen die Adsorptionskapazitäten ab.

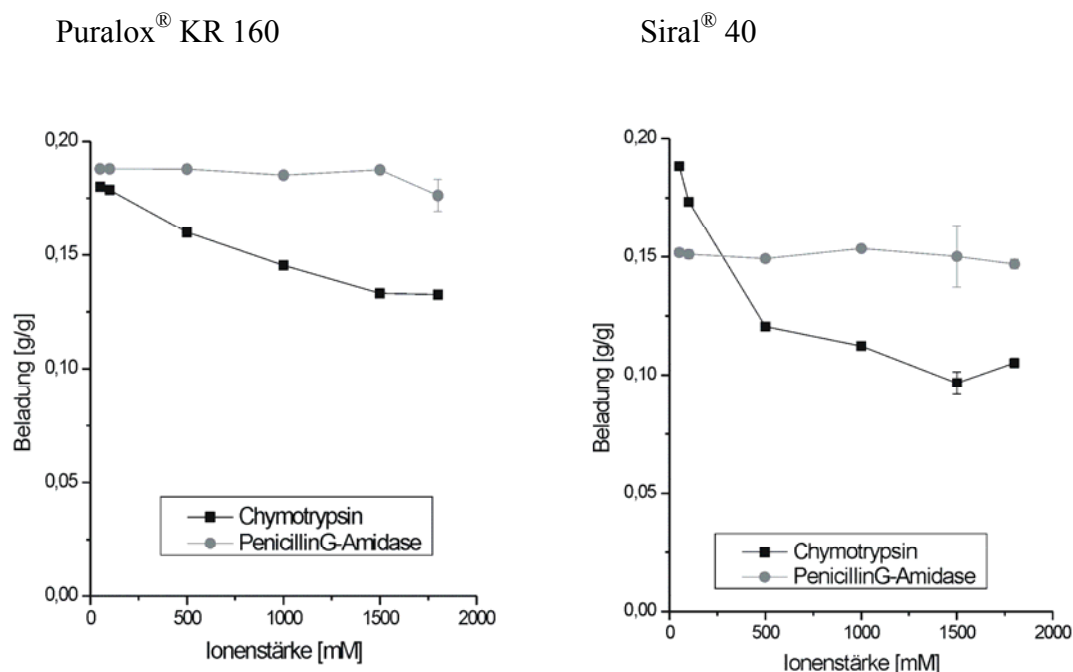


**Abbildung 3.10:** pH-Abhängigkeit der Adsorption der Modellenzyme mit einem isoelektrischen Punkt von pH 8-9 an das Material Siral<sup>®</sup> 40. Die Adsorption wurde in 50 mM des entsprechenden Puffers durchgeführt. Die Anfangskonzentration betrug 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

### *Ionenstärkeabhängigkeiten*

Zellkulturmedien, aus denen Zielenzyme separiert werden sollen, weisen häufig relativ hohe Leitfähigkeiten auf (Zellkulturmedien: 12-15 mS/cm) [101, 102]. Ionenaustauschmaterialien zeigen oft eine starke Abhängigkeit der Adsorptionskapazität von der Ionenstärke. So führt eine hohe Ionenstärke in der Regel zu einer Verringerung der Adsorptionskapazität, da die Salzionen mit den Proteinen um die geladenen Plätze auf der Ionenaustauschmatrix konkurrieren [102, 103]. Das kann zu Problemen in Separationsprozessen von Proteinen führen. Entsalzungs- oder Verdünnungsprozesse sind häufig aufwendig und können Probleme im weiteren Aufreinigungsprozess darstellen [101, 102, 104, 105]. Für die beiden Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40 wurde die Ionenstärkeabhängigkeit der Adsorption der beiden Modellenzyme  $\alpha$ -Chymotrypsin und PenicillinG-Amidase bestimmt. Mit Natriumchlorid wurden im Adsorptionspuffer Ionenstärken zwischen 50 und 1.800 mM eingestellt. Die Adsorption wurde für beide Enzyme in 50 mM MES-Puffer (pH 7) durchgeführt.

Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 6.2.2). Abbildung 3.11 zeigt die gefundenen Ergebnisse.



**Abbildung 3.11:** Ionenstärkeabhängigkeit der Adsorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin und PenicillinG-Amidase an die Materialien Puralox® KR 160 und Siral® 40. Die Adsorption erfolgte in jeweils 50 mM MES-Puffer, pH 7. Durch Zusatz von NaCl wurden Ionenstärken zwischen 50 und 1.800 mM eingestellt (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

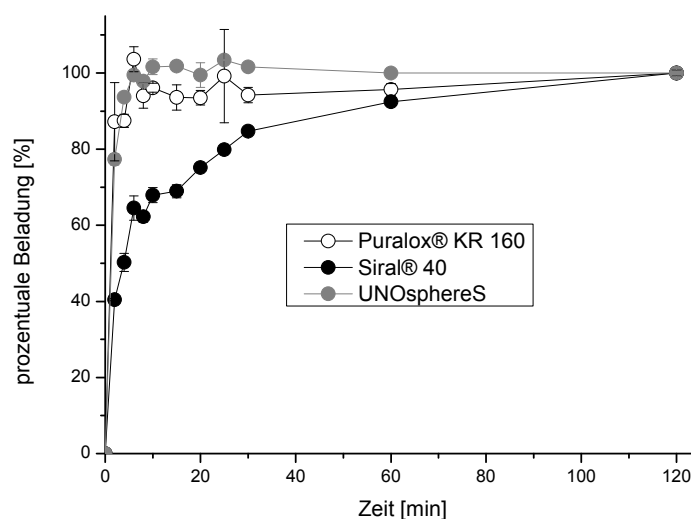
Für Puralox® KR 160 ist im Falle beider Enyme keine größere Abhängigkeit ihrer Beladungskapazitäten von der Ionenstärke zu erkennen. Bei  $\alpha$ -Chymotrypsin ist eine leichte Abnahme mit steigender Ionenstärke gefunden worden. Allerdings wird auch bei einer Ionenstärke von 1.800 mM noch eine Beladung von 0,13 g/g und somit etwa 72% der bei einer Ionenstärke von 50 mM gefundenen Adsorptionskapazität erreicht. Auch für das Material Siral® 40 ist keine Beeinflussung der Adsorption von PenicillinG-Amidase durch die Ionenstärke der Adsorptionslösung zu erkennen. Das Modellenzym  $\alpha$ -Chymotrypsin zeigt wiederum eine Abnahme der Beladung mit steigender Ionenstärke. Die Beladungskapazität liegt hier bei einer Ionenstärke von 1.800 mM Natriumchlorid



bei etwa 0,1 g/g. Die Adsorptionskapazität hat somit um 47% im Vergleich zu der Adsorption bei 50 mM abgenommen.

#### *Zeitabhängigkeit der Adsorption*

Zum Einsatz in der chromatographischen Enzymseparation müssen die Materialien eine schnelle Bindungskinetik aufweisen. Zu diesem Zweck wurde für die beiden Materialien Puralox® KR 160 und Siral® 40 die Zeitabhängigkeit der Adsorption des Modellenzym  $\alpha$ -Chymotrypsin bestimmt. Hierfür wurde die Inkubationszeit der zur Adsorption verwendeten Enzymlösung mit dem jeweiligen Material zwischen 2 und 120 min variiert und im Anschluss aus der Menge an adsorbiertem Enzym die Beladungskapazität des Materials bestimmt. Abbildung 3.12 zeigt die gefundenen Ergebnisse. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Beladungen, bezogen auf die im thermodynamischen Gleichgewicht gefundene Beladungskapazität der Materialien. Vergleichend sind die Ergebnisse für das kommerzielle Kationenaustauschmaterial UNOsphereS der Firma BioRad, UK dargestellt. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 6.2.3).



**Abbildung 3.12:** Adsorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin an die Materialien Puralox® KR 160, Siral® 40 und UNOsphereS in Abhängigkeit von der Zeit. Adsorbiert wurde in 50 mM MES-Puffer, pH 7. Die Inkubationszeit wurde zwischen 2 und 120 min variiert. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Die Versuche wurden für alle drei Materialien in 50 mM MES-Puffer bei pH 7 durchgeführt. Im Falle der Materialien UNOsphereS und Puralox<sup>®</sup> KR 160 läuft die Adsorption sehr schnell ab. Bereits nach 6 min ist die Adsorption an beiden Materialien vollständig. Das Material Siral<sup>®</sup> 40 weist eine etwas langsamere Bindungskinetik auf. Hier sind nach 6 min aber dennoch bereits 64% der endgültigen Adsorptionskapazität erreicht. Nach einer Reaktionszeit von 1 h ist die Adsorption zu 92% abgelaufen. Höchstwahrscheinlich ist durch die größeren Porendurchmesser des Materials Puralox<sup>®</sup> KR 160 im Vergleich zu dem Material Siral<sup>®</sup> 40 eine leichtere Zugänglichkeit des Enzyms in die Poren des Materials gegeben. Das könnte in einer schnelleren Bindungskinetik der Adsorption resultieren.

### **3.2 Elution im statischen System**

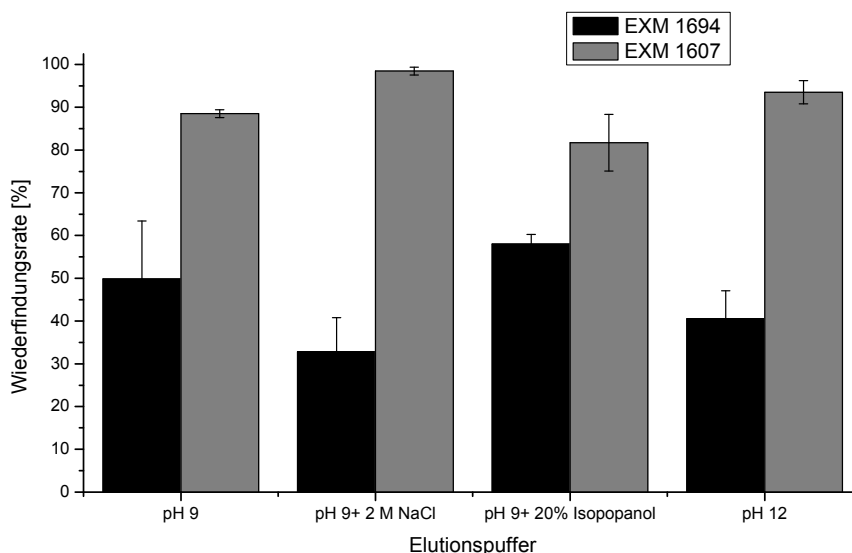
In chromatographischen Prozessen muss die Bindung von Enzymen an die verwendeten Materialien reversibel sein und die Enzyme sollten möglichst ohne einen Verlust an biologischer Aktivität wiedergefunden werden. Die im ersten Teil charakterisierten Materialien wurden daher ebenfalls im statischen System mit Elutionspuffern verschiedener pH-Werte und Additive inkubiert. Im Anschluss wurde die Menge an wiedergefundenem Enzym sowie der Verlust an spezifischer Aktivität bestimmt. Zu diesem Zweck wurde das entsprechende Enzym zunächst wie in Abschnitt 3.1 beschrieben an die Materialien adsorbiert. Es wurde jeweils in 50 mM entsprechenden Adsorptionspuffers mit einer Enzymanfängerkonzentration von 1 mg/mL adsorbiert. Im Anschluss wurde das Material jeweils für 1 h in dem entsprechenden Adsorptionspuffer inkubiert. Auf diese Weise sollte nicht gebundenes Protein ausgewaschen werden. Im Anschluss werden die Materialien mit dem entsprechenden Elutionspuffer inkubiert. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 6.2.4). Im Anschluss wurde die spezifische Aktivität des Enzyms in den Elutionsfraktionen und in der nativen, zur Adsorption verwendeten Enzymlösung, bestimmt. Die nach der Elution

prozentual noch verbliebene spezifische Aktivität wird im Folgenden als Restaktivität des jeweiligen Enzyms bezeichnet.

### 3.2.1 Tonminerale

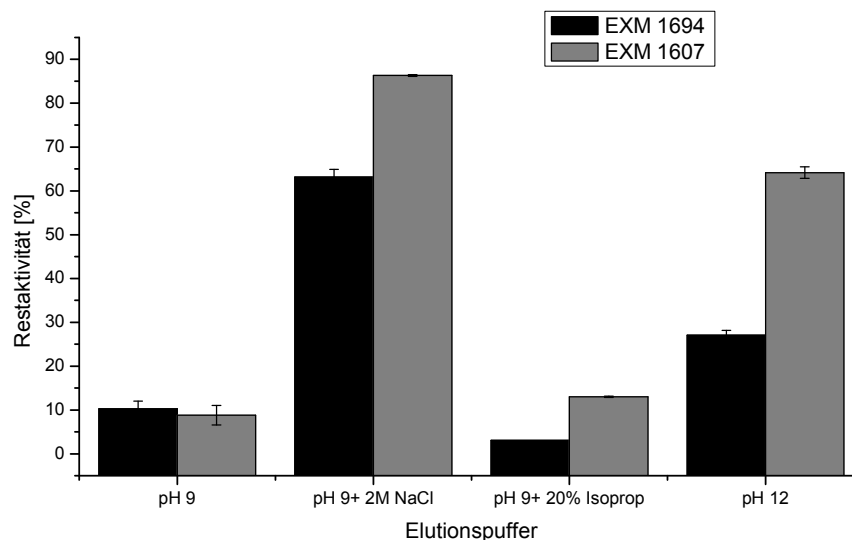
Es wurden wiederum die bereits in Abschnitt 3.1.1 charakterisierten Tonminerale EXM 1607 (Montmorillonit/ amorphes Kieselgel) und EXM 1694 (Kerolit/ Saponit) verwendet. Als Modellenzyme für die Elutionsversuche wurden  $\alpha$ -Chymotrypsin und PenicillinG-Amidase verwendet. Die Bestimmung der Enzymaktivität des  $\alpha$ -Chymotrypsins erfolgte unter Verwendung von N-Benzoyl-L-tyrosinethylester (BTEE) als Substrat. Das Enzym spaltet N-Benzoyl-L-tyrosin ab, dessen Bildung photometrisch bei einer Wellenlänge von 256 nm verfolgt werden kann. Im Falle von PenicillinG-Amidase wurde die Hydrolyse von 6-Nitro-3-Phenylacetamido-Benzoesäure (NIPAB) als Substrat photometrisch bei 400 nm verfolgt. Die genauen Versuchsdurchführungen sind dem Anhang (Kapitel 6.3.3 und 6.3.4) zu entnehmen. In der Literatur wird beschrieben, dass die Elution von Peroxidase von Bentoniten durch pH-Shift bei pH 8 gelang [74], andere Quellen berichten, dass die vollständige Elution von Ovalbumin an dem Material EXM 1607 nur bei extremen pH-Werten im basischen Bereich gelingt [68]. Es wurde daher zum einen ein 100 mM Phosphat-Puffer (pH 12) zur Elution verwendet. Zudem wurde untersucht, ob die Elution unter Verwendung eines milderen Elutionspuffers durchgeführt werden kann. Es wurde daher auch unter Verwendung eines 100 mM Tris-Puffer (pH 9) eluiert. Diesem wurden zusätzlich Additive wie Natriumchlorid und Isopropanol zugesetzt. Durch die Verwendung von Natriumchlorid könnte ein Verdrängungseffekt des elektrostatisch gebundenen Proteins durch Natriumionen erreicht werden. In der Literatur wird von der Elution durch hydrophobe Alkohole berichtet [74], bzw. von einer Abnahme der Adsorptionskapazität von Hämoglobin an einem Bentonit durch Zusatz hydrophober Alkohole zum Adsorptionspuffer [77]. Durch Zusatz von Isopropanol zum Elutionspuffer könnte daher eine Verdrängung hydrophob gebundenen Proteins von der Tonmineraloberfläche erreicht werden. Abbildung 3.13 zeigt die gefundenen Wiederfindungsraten von  $\alpha$ -Chymotrypsin für die beiden Materialien. Im Falle des Materials EXM 1607 konnten unter Verwendung eines Tris-Puffers

mit einem pH-Wert von 9 etwa 89% des adsorbierten Enzyms in der Elutionsfraktion wiedergefunden werden. Ein Zusatz von Natriumchlorid führte hier sogar zu einer vollständigen Wiederfindung des Enzyms. Der Zusatz von 20% Isopropanol führte zu keiner Erhöhung der Wiederfindungsrate, sie liegt mit 82% sogar leicht unter der für den reinen Tris-Puffer gefundenen. Unter Verwendung des Phosphat-Puffers bei pH 12 konnten hier etwa 93% des Enzyms wiedergefunden werden. Ein anderes Elutionsverhalten zeigte das Material EXM 1694. Hier konnten maximal knapp 60% des Enzyms in den Elutionsfraktionen wiedergefunden werden. Die höchsten Wiederfindungsraten wurden nach Elution bei pH 9 und unter Zusatz von Isopropanol gefunden. 40% des Enzyms wurden nach Elution bei pH 12 und lediglich 32% wurden nach Elution unter Hochsalzbedingungen wiedergefunden. Die Ergebnisse stützen die in 3.1 aufgestellte Vermutung, dass die Adsorption an diesem Material zu einem relativ großen Teil durch hydrophobe Wechselwirkungen beeinflusst wird.



**Abbildung 3.13:** Prozentuale Desorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin von den Tonmineralien EXM 1694 und EXM 1607. Adsorbiert wurde in 50 mM Acetat-Puffer, pH 4. Zur Desorption wurde ein 100 mM Phosphat-Puffer, pH 12 und ein 100 mM Tris-Puffer, pH 9, unter Zusatz von Isopropanol und NaCl verwendet (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Abbildung 3.14 zeigt die nach der Elution noch gefundenen Restaktivitäten des verwendeten Modellenzym  $\alpha$ -Chymotrypsin. Sämtliche Elutionen führten zu einem relativ großen Verlust an spezifischer Aktivität des Enzyms. Erstaunlich ist, dass das Enzym in allen Fällen nach Elution bei relativ milden Bedingungen von pH 9 nahezu seine komplette biologische Aktivität verloren hat. Im Gegensatz dazu zeigte es nach Elution bei extremen pH-Bedingungen von pH 12 nach der Elution noch eine Aktivität von etwa 27-64 % gegenüber der zur Adsorption verwendeten Enzymlösung. Das ist verwunderlich in Anbetracht der Tatsache, dass das Enzym sein Aktivitätsmaximum bei pH 8 besitzt und im leicht basischen pH-Bereich daher keine Denaturierung des Enzyms stattfinden sollte [69]. Die höchsten Restaktivitäten wurden nach Elution bei pH 9 unter Zusatz von 2 M Natriumchlorid gefunden. Hohe Ionenstärken haben häufig einen positiven Einfluss auf die Aktivität von Enzymen, da sie durch Entfernen der Hydrathülle die Beweglichkeit der Enzyme in Lösung erhöhen [106-109]. Eventuell begünstigt die fehlende Hydrathülle die Renaturierung des Enzyms nach der Elution, da die geladenen Seitenketten nicht durch Wassermoleküle maskiert sind.

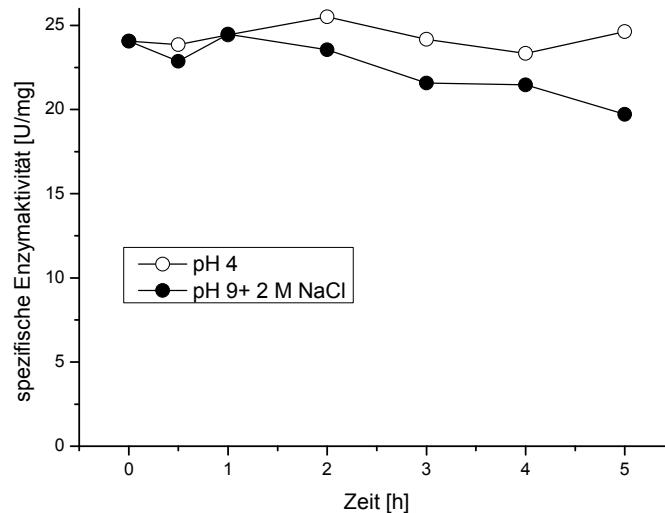


**Abbildung 3.14:** Restaktivitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin nach Elution von den Tonmineralien EXM 1694 und EXM 1607. Die Aktivität wurde prozentual zu der spezifischen Aktivität der nativen, zur Adsorption verwendeten Enzymlösung bestimmt. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Allgemein zeigt das Enzym nach Elution von dem Material EXM 1607 größere Aktivitäten als nach Elution von EXM 1694. Die für PenicillinG-Amidase gefundenen Ergebnisse decken sich mit den gezeigten Ergebnissen. Sie sind im Anhang (Kapitel 6.1.1) einzusehen. Vergleichend wurde wiederum das kommerzielle Kationenaustauschmaterial UNOsphereS eingesetzt. Unter Verwendung des Tris-Puffers (pH 9) mit 2 M Natriumchlorid als Additiv wurden 80% des Enzyms unter vollständigem Erhalt seiner biologischen Aktivität wiedergefunden (Daten nicht gezeigt).

Da Montmorillonite eine hohe Affinität zu Ammoniumionen aufweisen [107, 110-112], wurde das Material EXM 1607 weiteren Versuchen unter Verwendung ammoniumchloridhaltiger Elutionspuffer unterzogen. Bei Verwendung geeigneter Bedingungen konnte hier das gesamte Enzym unter vollständigem Erhalt seiner Aktivität wiedergefunden werden. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt (Kapitel 6.1.2). Auch hier war ein positiver Einfluss der Ionenstärke auf die prozentuale Restaktivität des Enzyms zu erkennen. Um den Einfluss des verwendeten Puffersystems auf den Verlust an Enzymaktivität abschätzen zu können, wurden zwei Enzymlösungen in verschiedenen Puffern über mehrere Stunden hinweg auf ihre Aktivität überprüft. Abbildung 3.15 zeigt die Ergebnisse für eine Enzymlösung in Acetat-Puffer, pH 4 und Tris-Puffer, pH 9 unter Zusatz von 2 M Natriumchlorid. Für beide Enzymlösungen ist kein größerer Verlust an spezifischer Aktivität zu erkennen. Da in den durchgeführten Versuchen jeweils nur für 1h im entsprechenden Adsorptions- und Elutionspuffer inkubiert wird, ist nicht davon auszugehen, dass die Aktivitätsverluste nur durch die verwendeten Puffer verursacht werden. Auch Adsorptionseffekte scheinen hierbei eine Rolle zu spielen. So wird in der Literatur berichtet, dass die Adsorption von Proteinen an Bentoniten unterhalb ihres isoelektrischen Punktes zu einer starken Deformation des Proteins an der Oberfläche des Materials führt. Es kommt zu starken elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Aminosäureketten des Proteins und der negativ geladenen Tonmineraloberfläche. Die Folge ist eine räumliche Ausdehnung des Proteins auf der Oberfläche, wodurch es sogar zu Denaturierungen im Bereich der Sekundärstruktur kommen kann [69, 72]. Obwohl es sich bei  $\alpha$ -Chymotrypsin um ein eher „hartes“ Molekül handelt, konnten entsprechende

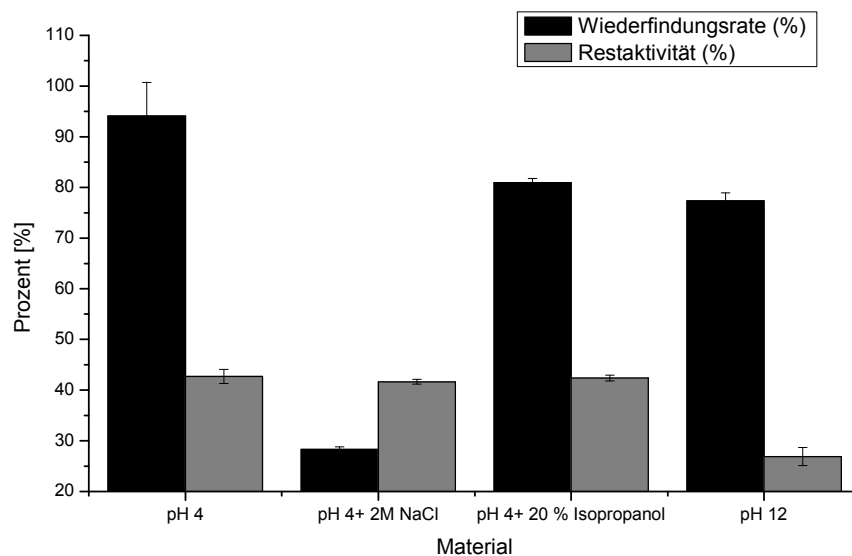
Phänomene bei der Adsorption an Montmorillonit-Oberflächen nachgewiesen werden [69]. Hierdurch kann zwar der Aktivitätsverlust an dem montmorillonit-basierten Material EXM 1607 erklärt werden, nicht jedoch der stärkere Aktivitätsverlust nach Elution von dem niedrig geladenen Material EXM 1694. Für die Adsorption an ungeladenen Talkoberflächen konnte nachgewiesen werden, dass die Adsorption von Proteinen zu keinerlei Denaturierungsvorgängen führte [72].



**Abbildung 3.15:** Spezifische Aktivität des Enzyms Chymotrypsin in 100 mM Acetat-Puffer (pH 4) und 100 mM Tris-Puffer (pH 9)+ 2 M NaCl in Abhängigkeit von der Zeit.

### 3.2.2 Hydrotalcite

Analog den oben durchgeführten Desorptionsversuchen wurde auch der Hydrotalcit Syntal 696 bezüglich der Reversibilität der Adsorption untersucht. Es wurde wiederum  $\alpha$ -Chymotrypsin als Modellenzym verwendet. Adsorbiert wurde hier unter Verwendung eines Tris-Puffers bei pH 9. Eluiert wurde über pH-Shift bei pH 4, unter Zusatz der Additive Natriumchlorid und Isopropanol und unter Verwendung eines Phosphat-Puffers bei pH 12. Hierbei ist zu erwähnen, dass sowohl bei pH 4, als auch durch Verwendung eines Phosphat-Puffers die Hydrotalcitstruktur des Materials irreversibel zerstört wird. Abbildung 3.16 zeigt die Wiederfindungsraten und Restaktivitäten des Enzyms nach Verwendung der jeweiligen Elutionspuffer.



**Abbildung 3.16:** Prozentuale Desorption und Restaktivitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin nach Elution von dem Hydrotalcit Syntal 696. Adsorbiert wurde in 50 mM Tris-Puffer, pH 9. Die Aktivität wurde prozentual zu der spezifischen Aktivität der nativen, zur Adsorption verwendeten Enzymlösung bestimmt. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Die höchsten Wiederfindungsraten von 94% werden unter Verwendung eines 100 mM Acetat-Puffers (pH 4) bestimmt. Eine etwas geringere Wiederfindungsrate von 83% wird bei Verwendung desselben Puffers mit 20% Isopropanol als Additiv gefunden sowie nach Verwendung eines 100 mM Phosphat Puffers bei pH 12 (77%). Geringe Wiederfindungsraten fanden sich nach Verwendung des Acetat-Puffers unter Zusatz von 2 M NaCl als Additiv. Hier wurden lediglich 28% des adsorbierten Enzyms in den Elutionsfraktionen wiedergefunden. Eventuell wird durch den Zusatz von Natriumchlorid eine vollständige Zertsörung der Hydrotalcit-Struktur vermieden. Wie im Falle der Tonmineralien hat das Enzym auch hier einen relativ großen Teil seiner Aktivität verloren. Die Aktivitäten nach der Elution betragen noch höchstens 42%. Erstaunlicherweise ist die Beeinflussung der Enzymaktivität hier nahezu unabhängig von den zugesetzten Additiven Isopropanol und Natriumchlorid. Nach Elution von den Tonmineralien war ein positiver Einfluss der Ionenstärke auf die Restaktivität des Enzyms nach der Elution festgestellt worden (vgl Kapitel 3.2.1). Die Ergebnisse für PenicillinG-Amidase



decken sich wiederum mit den hier gezeigten Daten. Sie sind im Anhang einzusehen (Kapitel 6.1.1).

### 3.2.3 Aluminiumoxid-basierte Materialien

Auch im Falle des reinen  $\gamma$ -Aluminiumoxids Puralox<sup>®</sup> KR 160 sowie des synthetischen Aluminiumsilikats Siral<sup>®</sup> 40 wurde die Reversibilität der Adsorption und der Einfluss auf die spezifische Enzymaktivität untersucht. Als Modellenzyme wurden wiederum  $\alpha$ -Chymotrypsin und PenicillinG-Amidase verwendet. Die Versuchsdurchführung und Proteinanalytik erfolgten analog den in Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Versuchen. Zur Adsorption und zum Waschen wurden jeweils 50 mM MES-Puffer (Puralox<sup>®</sup> KR 160: pH 7, Siral<sup>®</sup> 40: pH 6) verwendet. Es wurden Elutionspuffer verschiedener pH-Werte und unter Zusatz verschiedener Additive eingesetzt. Tabelle 3.5 zeigt eine Auswahl der verwendeten Elutionspuffer und die Wiederfindungsraten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an beiden Materialien.

**Tabelle 3.4:** Überblick über verwendete Elutionspuffer und Wiederfindungsraten von Chymotrypsin an den Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40.

Elutionspuffer	Wiederfindungsrate Puralox <sup>®</sup> KR 160 [%]	Wiederfindungsrate Siral <sup>®</sup> 40 [%]
pH 4	69	13
pH 11	89	86
pH 8 (NaPP)	65	62
pH 7+ 2 M NH <sub>4</sub> Cl	30	-
pH 7+ 2 M NaCl	19	-
pH 6+ 2 M NH <sub>4</sub> Cl	-	46
pH 6+ 2 M NaCl	-	35
pH 7+ 0.5 M EDTA	68	58
0.5 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	73	80
pH 7+ 30% DMSO	4	-
pH 6+ 30% DMSO	-	9

Die höchsten Wiederfindungsraten von 89% (Puralox<sup>®</sup> KR 160), bzw. 86% (Siral<sup>®</sup> 40) wurden hier über pH-Shift bei pH 11 gemessen. Die Elution über einen pH-Shift in den sauren pH-Bereich von pH 4 lieferte hier gemäß der in Abschnitt 3.1.3 bestimmten pH-Abhängigkeit nur für das Material Puralox<sup>®</sup> KR 160 eine relativ hohe Wiederfindungsrate von 69%. Im Falle von Siral<sup>®</sup> 40 wurde hier nur eine geringe prozentuale Wiederfindung von 13% bestimmt. Relativ hohe Wiederfindungsraten liefern auch die Verwendung phosphat- und carbonathaltiger Elutionspuffer und der Zusatz von EDTA zu dem verwendeten Elutionspuffer. Diese Ionen weisen hohe Affinitäten zu Aluminiumoxid-Oberflächen auf und führen daher zu einer Verdrängung des adsorbierten Enzyms [85, 90]. Zusätze von Natriumchlorid und Ammoniumchlorid zu den verwendeten Puffern führen zu einer relativ geringen Elution des Enzyms. Lediglich 19-46% des zuvor adsorbierten Enzyms wurden in den Elutionsfraktionen wiedergefunden. Zu keinerlei Elution führte die Verwendung hydrophober Substanzen wie Glycerin, DMSO oder PEG als Additive. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Literatur, die lediglich elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen als Kräfte zur Adsorption von Proteinen an Aluminiumoxid-Oberflächen nennt [58, 85, 86]. Im Anschluss an die Elution wurde wiederum die spezifische Aktivität des Enzyms prozentual zu der zur Adsorption verwendeten Enzymlösung bestimmt. In allen Fällen wurde das Enzym unter vollständigem Erhalt seiner spezifischen Aktivität wiedergefunden (Daten nicht gezeigt). Die Adsorption an die verwendeten aluminium-basierten Materialien ist offensichtlich schonender als an die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tonminerale und Hydrotalcite. Die für PenicillinG-Amidase gefundenen Ergebnisse sind im Anhang (Kapitel 6.1.1) dargestellt. Hier ist die Elution zum Teil mit einem gravierenden Aktivitätsverlust verbunden. Dieses Enzym reagiert allerdings um einiges empfindlicher auf extreme pH-Werte als das hier gezeigte  $\alpha$ -Chymotrypsin [113].

### 3.2.4 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurden Materialien auf Basis von Tonmineralien, Hydrotalciten, Aluminiumoxiden und -hydroxiden auf ihre Eignung zur Enzymaufreinigung getestet. Hierbei wurde bestätigt, dass im Falle der Tonmineralien und Hydrotalcite elektrostatische Wechselwirkungen maßgeblich an der Adsorption von Enzymen beteiligt sind. Es sind jedoch auch proteinspezifische Eigenschaften zu beachten, die im Vorfeld ermittelt werden müssen. Die Tonmineralien wiesen Beladungskapazitäten von bis zu 0,2 g/g auf, die Hydrotalcite von bis zu 0,16 g/g.

Im Falle der Materialien auf Basis von Aluminiumoxiden und -hydroxiden konnte eine Eignung zur Proteinadsorption festgestellt werden. Hierbei zeigten sich besonders Materialien auf Basis von  $\gamma$ -Aluminiumoxid geeignet. Sie zeigten Beladungskapazitäten für  $\alpha$ -Chymotrypsin im Bereich von 0,12- 0,2 g/g. Sie weisen damit Beladungskapazitäten auf die im Bereich kommerzieller Materialien liegen (Daten nicht gezeigt). Die Adsorption an das Material Puralox<sup>®</sup> KR 160, ein reines Aluminiumoxid, scheint durch zahlreiche Wechselwirkungen beeinflusst zu werden. Im Falle des Materials Siral<sup>®</sup> 40, eine Mischphase aus Siliziumdioxid und Aluminiumoxid, scheinen elektrostatische Wechselwirkungen die Adsorption von Proteinen zu dominieren.

Die Adsorption von Enzymen ist an allen Materialien reversibel. Nach Elution von den Tonmineralien konnten 32- 93% des Modellenzym in den Elutionsfraktionen wiedergefunden werden. Nach Elution von dem Hydrotalcit Syntal 696 konnten 28- 94% des zuvor adsorbierten Enzyms in der Elutionsfraktion wiedergefunden werden. Im Falle der Tonmineralien und Hydrotalcite ist die Adsorption und anschließende Elution mit einem großen Verlust an biologischer Aktivität verbunden. So betragen die Restaktivitäten nach der Elution teilweise lediglich 7% im Falle der Tonmineralien. Positiv wirkte sich jedoch die Verwendung salzhaltiger Elutionspuffer aus. So konnte das Enzym unter Verwendung eines Tris-Puffers (pH 9) unter Zusatz von 2 M Natriumchlorid mit einer Restaktivität von bis zu 87% wiedergefunden werden. Im Falle der Materialien auf Basis von Aluminiumoxid konnten die Enzyme ohne Verlust an biologischer Aktivität in den Elutionsfraktionen wiedergefunden werden. Die höchsten Wiederfindungsraten

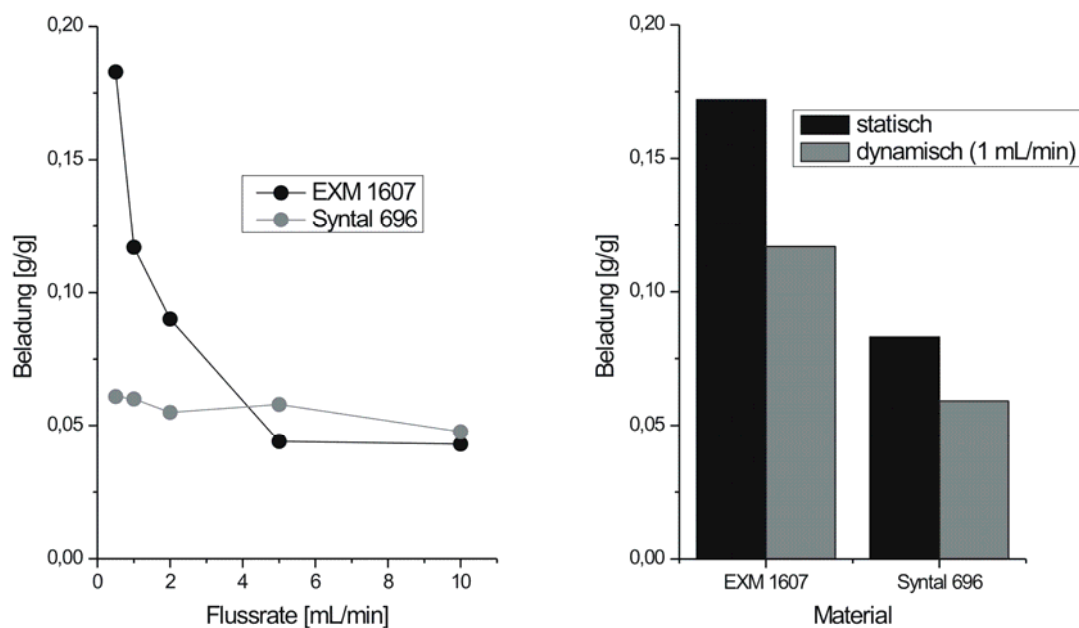
wurden hier über pH-Shift und mit Elutionspuffern gefunden, die komplexierende Agenzien wie Natriumcarbonat oder EDTA enthielten (68-89%). Keine Elution erfolgte unter Verwendung von Elutionspuffern, die hydrophobe Alkohole wie DMSO enthielten.

### **3.3 Adsorption im dynamischen System- gepackte Säulen**

Wie bereits in Abschnitt 3.1 erwähnt, ist der Übergang von einem statischen in ein dynamisches Adsorptionssystem für die charakterisierten Materialien mit einigen Problemen verbunden. Das Tonmineral EXM 1694 weist ein für Tonminerale typisches Quellverhalten auf [3], was den Einsatz in breiten, flachen Chromatographiesäulen unmöglich macht. Ansätze, Tonminerale in Alginat- oder Polymere einzukapseln und auf diese Weise in chromatographische Säulen zu packen, scheiterten an ökonomischen Überlegungen oder einem Verlust an Adsorptionskapazität [73, 74]. Das Material EXM 1607 weist auf Grund seiner Struktur kein solches Quellverhalten auf (siehe Kapitel 3.1.1), allerdings liegt es, ebenso wie die übrigen getesteten Materialien, als pulverförmiges Material vor. Ein großer Teil der Partikel ist kleiner als 45  $\mu\text{m}$ , was das Packen in chromatographische Säulen ebenfalls unmöglich macht, da der Druckabfall über den Säulenkörper anderenfalls zu hoch wäre. Im Falle des Hydrotalcits Syntal 696 und des Tonminerals EXM 1607 wurde durch Absieben eine Einstellung der Partikelgröße erreicht. Auf diese Weise konnte die Teilchengröße auf Partikel von größer als 45  $\mu\text{m}$  eingestellt werden. Die Materialien können in dieser Form in chromatographische Säulen gepackt werden und im Labormaßstab untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.3.1 dargestellt. Für Anwendungen im Technikums- oder Produktionsmaßstab sind die Materialien jedoch auch in dieser Form nicht als Säulenpackungen geeignet, da sie in großem Maßstab weiterhin zu hohen Druckabfällen über die Säulenkörper führen würden. Es wurden daher granulierten Materialien sowie Tiefenfilterschichten mit Adsorbereigenschaften getestet und die Ergebnisse miteinander verglichen.

### 3.3.1 Pulverförmige Materialien

Die auf Partikelgrößen  $>45 \mu\text{m}$  abgeseibten Partikel wurden in dynamischen Adsorptionsversuchen mit  $\alpha$ -Chymotrypsin als Modellenzym beladen. Es wurden jeweils 200 mg der Materialien in eine chromatographische Quarzsäule mit beweglichem Stempel und einem Durchmesser von 15 mm gegeben und mit einer gepufferten Lösung des Enzyms (1 mg/mL) bei verschiedenen Flussraten zwischen 0,5 und 10 mL/min beladen. Es wurde jeweils der pH-Wert zur Adsorption verwendet, der in den pH-abhängigen Beladungsversuchen in Kapitel 3.1 zu den höchsten Beladungskapazitäten geführt hatte (Syntal 696: pH 9, EXM 1607: pH 4). Beladen wurde mit jeweils 50 mL Enzymlösung, im Anschluss wurde mit 50 mL Adsorptionpuffer nicht gebundenes Enzym aus der Säule ausgewaschen. Durch UV-photometrische Proteinquantifizierung wurde die Proteinkonzentration der Durchlaufaktionen und daraus die adsorbierte Enzymmenge bestimmt. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Anhang (Kapitel 6.2.5) zu entnehmen. Abbildung 3.17 zeigt auf der linken Seite die Beladungskapazitäten der zwei Materialien in Abhängigkeit von der verwendeten Flussrate. Auf der rechten Seite sind die bei einer Flussrate von 1 mL/min gefundenen Beladungskapazitäten der beiden Materialien mit  $\alpha$ -Chymotrypsin im Vergleich mit den statischen Beladungskapazitäten dargestellt. Im Gegensatz zu dem Hydrotalcit Syntal 696 weist die Beladung an das Material EXM 1607 eine relativ starke Abhängigkeit von der zur Adsorption verwendeten Flussrate auf. Die Beladungskapazität fällt von 0,18 g/g bei einer Flussrate von 0,5 mL/min auf 0,04 g/g bei einer Flussrate von 10 mL/min ab. Der Verlust an Adsorptionskapazität durch den Übergang in ein dynamisches Adsorptionssystem ist für beide Materialien etwa gleich groß. Im Falle von EXM 1607 beträgt die bei einer Flussrate von 1 mL/min ermittelte Adsorptionskapazität 69% der unter statischen Bedingungen ermittelten. Im Falle von Syntal 696 sind es 71%.



**Abbildung 3.17:** Dynamische Adsorptionskapazitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an den Materialien Syntal 696 und EXM 1694 in Abhängigkeit von der verwendeten Flussrate (links). Dynamische Beladungskapazitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an den Materialien Syntal 696 und EXM 1694 bei einer Flussrate von 1 mL/min im Vergleich zu den in einem statischen Adsorptionssystem ermittelten Adsorptionskapazitäten (rechts).

### 3.3.2 Granulierte Materialien

Die beiden Materialien auf Basis von  $\gamma$ -Aluminiumoxid, Puralox<sup>®</sup> KR 160 (reines  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und Siral<sup>®</sup> 40 (Aluminiumsilikat) werden als Katalysatoren und Katalysatorträger in der heterogenen Katalyse verwendet. Auch hier sind sie als pulverförmige Materialien nicht in Durchflussreaktoren einsetzbar. Sie werden daher in granulierter Form eingesetzt. Im Folgenden soll untersucht werden, ob diese granulierten Materialien in dynamischen Adsorptionsprozessen eingesetzt werden können. Das Granulieren kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, etwa durch Extrusion, Koagulation, Granulierung oder Calcination [50]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Granulate wurden durch Extrusion hergestellt. Extrusion ist die am weitesten verbreitete Methode um Katalysatoren auf der Basis von Böhmit in Granulate zu überführen [50]. Die erhaltenen granulierten Materialien werden im Folgenden als EXM 2070 und EXM 2073 bezeichnet. Sie weisen

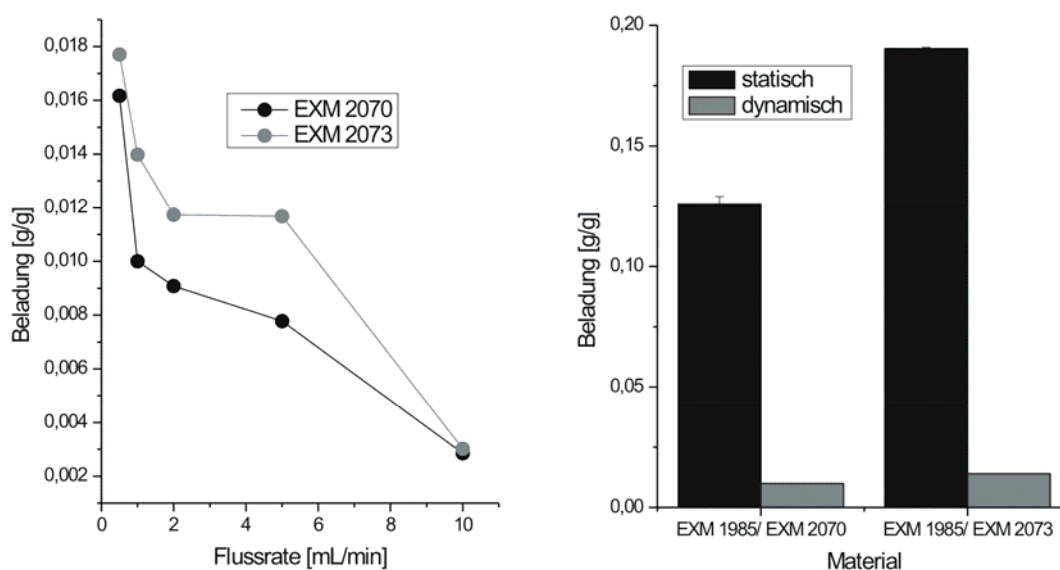
ähnliche Eigenschaften wie die pulverförmigen Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40 auf. Tabelle 3.5 gibt einen Überblick über ihre wichtigsten Eigenschaften.

**Tabelle 3.5:** Übersicht über die verwendeten Granulate und ihre wichtigsten Eigenschaften.

	EXM 2070	EXM 2073
Zuordnung	$\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Mischphase aus $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> und 40% SiO <sub>2</sub>
Spez. Oberfläche (BET) [m <sup>2</sup> /g]	95	175
Partikelgröße	Sphärische Partikel Durchmesser: 1.3 mm	Zylindrische Partikel Länge: 3.5 mm Breite: 1.2 mm

Die Materialien wurden analog Kapitel 3.3.1 in einem dynamischen Adsorptionssystem mit  $\alpha$ -Chymotrypsin als Modellenzym beladen. Es wurden jeweils 3 g der Materialien verwendet. Zur Adsorption wurden wiederum die pH-Werte verwendet, die in den pH-abhängigen Adsorptionsversuchen im Falle der Pulver die höchsten Beladungen ergeben hatten ( $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: pH 7, Mischphase aus  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und 40% SiO<sub>2</sub>: pH 6). Abbildung 3.18 zeigt die gefundenen Beladungskapazitäten in Abhängigkeit von der verwendeten Flussrate und wiederum die in den statischen Versuchen ermittelten Beladungskapazitäten im Vergleich zu den für die granulierten Materialien im dynamischen Adsorptionssystem gefundenen Beladungen. Die dynamischen Kapazitäten wurden wiederum bei einer Flussrate von 1 mL/min ermittelt. Die Beladungskapazitäten liegen deutlich unterhalb der für die Pulver gefundenen (vgl. Kapitel 3.3.1). Offensichtlich führt das Granulieren zu einem Verlust an Adsorptionskapazität. Im Falle der Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 / EXM 2070 beträgt die dynamische Beladungskapazität der granulierten Materialien im dynamischen Adsorptionssystem nur noch 8% der Beladungskapazität der Pulver im statischen Adsorptionssystem. Im Falle der Materialien Siral<sup>®</sup> 40 / EXM 2073 beträgt die dynamische Adsorptionskapazität des Granulats EXM 2073 ebenfalls nur noch 7,3% im Vergleich zu der statischen Beladungskapazität des Pulvers Siral<sup>®</sup> 40.

Hierbei ist auch zu beachten, dass die granulierten Materialien geringere spezifische Oberflächen aufweisen als die pulverförmigen Materialien. So besitzt das Material Puralox<sup>®</sup> KR 160 eine spezifische Oberfläche von 160 m<sup>2</sup>/g, das Material EXM 2070 jedoch lediglich eine Oberfläche von 95 m<sup>2</sup>/g. Für die Materialien Siral<sup>®</sup> 40 und EXM 2073 ist ein Unterschied von 520 m<sup>2</sup>/g im Falle des Pulvers zu 175 m<sup>2</sup>/g im Falle des Granulats gegeben.



**Abbildung 3.18:** Dynamische Adsorptionskapazitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an den granulierten Materialien EXM 2070 (reines  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und EXM 2073 (Aluminiumsilikat) in Abhängigkeit von der Flussrate (links). Dynamische Adsorptionskapazitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an den Materialien EXM 2070 und EXM 2073 bei einer Flussrate von 1 mL/min im Vergleich mit den statischen Adsorptionskapazitäten der pulverförmigen Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40 (rechts).

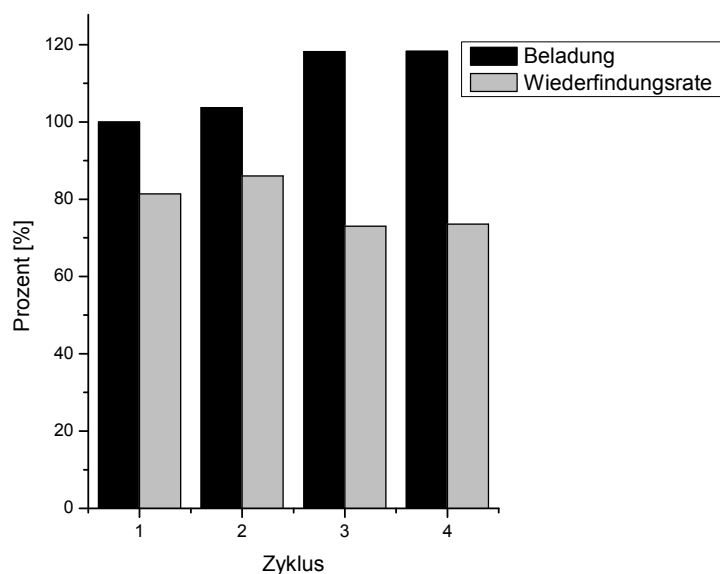
Obwohl der Übergang in ein dynamisches Adsorptionssystem mit einem gravierenden Verlust an Adsorptionskapazität einhergeht, ist das Granulieren pulverförmiger Materialien prinzipiell geeignet, um die Materialien in ein dynamisches Adsorptionssystem zu überführen. Die Säulenvordrücke betragen für die mit 3 g der Materialien befüllten Säulen bei einer Flussrate von 10 mL/min für beide granulierten Materialien 2,2 bar. Für das pulverförmige Material EXM 1607 wurde für eine mit 500 mg beladene Säule gleichen Durchmessers bei einer



Flussrate von 10 mL/min ein Säulenvordruck von etwa 5 bar gefunden. Für das Material PuranitUF, einen quellfähigen Montmorillonit, wurde bereits bei einer Flussrate von 5 mL/min ein Säulenvordruck erreicht, der den maximal zulässigen Betriebsdruck der verwendeten Säule überstieg [94].

### 3.3.3 Regenerierbarkeit der granulierten Materialien

Die granulierten Materialien wurden daher auf ihre Regenerierbarkeit untersucht. Zu diesem Zweck wurden sie in vier aufeinanderfolgenden Adsorptionszyklen benutzt. Als Modellenzym wurde wiederum  $\alpha$ -Chymotrypsin verwendet. Es wurde zunächst, wie oben beschrieben, mit 50 mL gepufferter Enzymlösung (1 mg/mL) beladen, anschließend wurde mit 50 mL Adsorptionspuffer gewaschen und mit 50 mL Elutionspuffer (CAPS-Puffer, pH 11, 100 mM) eluiert. Für alle durchgeführten Schritte wurde eine Flussrate von 1 mg/mL verwendet. Der beschriebene Ablauf wurde viermal in Folge wiederholt. Im Anschluss an jeden Zyklus wurde die Menge an adsorbiertem, aus der Säule gewaschenem und eluiertem Protein bestimmt. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Anhang (Kapitel 6.2.5) zu entnehmen. Die im ersten Zyklus gemessene Beladungskapazität wurde als 100% gesetzt und die für die folgenden drei Zyklen bestimmten Beladungen prozentual dazu berechnet. Die Ergebnisse für die vier aufgenommenen Beladungszyklen sind in Abbildung 3.19 exemplarisch für das reine  $\gamma$ -Aluminiumoxid EXM 2070 dargestellt. Die Ergebnisse für das Aluminiumsilikat EXM 2073 sind im Anhang einzusehen (Kapitel 6.1.3). Im Falle von EXM 2070 lagen die Wiederfindungsraten zwischen 75 und 89%. Das bedeutet, dass 0,3-1,3 mg des Enzyms nach der Elution auf dem Material verblieben. Dennoch wurde keinerlei Verlust an Adsorptionskapazität für die folgenden Beladungszyklen gefunden. Auch für das Material EXM 2073 wurden Wiederfindungsraten zwischen lediglich 74 und 86% ermittelt (siehe Kapitel 6.1.3), was sich jedoch auch hier nicht negativ auf die Kapazitäten der folgenden Beladungsschritte auswirkte.



**Abbildung 3.19:** Prozentuale Beladung und Wiederfindungsraten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an den Materialien EXM 2070. Die Beladung der ersten Adsorption wurde hier jeweils als 100% gesetzt.

### 3.3.4 Modifizierte Granulate

In Abschnitt 3.3.2 konnte gezeigt werden, dass die granulierten Materialien prinzipiell eine gute Eignung als Chromatographiematerialien in gepackten Säulen besitzen. Problem ist lediglich die geringe Beladungskapazität gegenüber den pulverförmigen Materialien in statischen Adsorptionsversuchen. Es wurde daher von der Süd-Chemie AG, Moosburg ein weiteres Granulat auf Basis von  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  bereitgestellt, das Material EXM 2115. Dieses Granulat unterscheidet sich von dem Material EXM 2070 dadurch, dass es bei Makroporen oberhalb von 50 nm eine größere spezifische Oberfläche von  $261 \text{ m}^2/\text{g}$  aufweist. Es besitzt damit sogar eine größere spezifische Oberfläche als das pulverförmige Material Puralox<sup>®</sup> KR 160 ( $160 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Durch die Makroporen soll zudem eine bessere Zugänglichkeit der Oberfläche gewährleistet werden. Die wichtigsten Eigenschaften des Materials sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

**Tabelle 3.6:** Die wichtigsten Eigenschaften des modifizierten Granulats EXM 2115.

	<b>EXM 2115</b>
Zuordnung	$\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Spez. Oberfläche (BET) [m <sup>2</sup> /g]	261
Partikelgröße	Zylindrische Partikel Länge: 3.9 mm Breite: 1.72 mm

Das Material wurde analog der Beladungen in Abschnitt 3.3.2 mit  $\alpha$ -Chymotrypsin als Modellenzym beladen. Die Beladungskapazitäten liegen etwa im Bereich der im Falle des Granulats EXM 2070 gemessenen. Bei kleinen Flussraten liegen die Beladungen für das Material EXM 2070 sogar über den für das Material EXM 2115 ermittelten Werten. Die Ergebnisse sind im Anhang (Kapitel 6.1.4) gezeigt. Die größere Oberfläche des Materials EXM 2115 führte also zu keiner höheren Beladungskapazität gegenüber den in Abschnitt 3.3.2 getesteten Granulaten. Es müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Adsorptionskapazitäten der granulierten Materialien zu erhöhen. Eventuell könnte die Einstellung gleichmäßigerer Partikel zu einer Verbesserung des Adsorptionsverhaltens führen.

### 3.4 Adsorption im dynamischen System-Tiefenfilterschichten

Adsorbentien können als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten eingearbeitet werden. Es gibt hier bereits Forschungsbestrebungen, derart modifizierte Tiefenfilterschichten zu Proteinaufreinigungszwecken im Downstream process einzusetzen (siehe Kapitel 2.1). Die Materialien werden dann während der Filterherstellung direkt in die entsprechende Pulpe eingearbeitet. Die Tiefenfilterschichten werden als Filterplatten hergestellt, aus denen Stanzlinge gewünschten Durchmessers ausgestanzt werden können.

### 3.4.1 Charakterisierung der erhaltenen Filterschichten

Die Materialien EXM 1694, Syntal 696, Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40 wurden von der Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten eingearbeitet. Tabelle 3.8 gibt einen Überblick über die verwendeten Filter, den verarbeiteten Adsorbensanteil ( $\text{g/m}^2$ ) sowie die Dicke der erhaltenen Filterschicht. Es war nicht möglich, Tiefenfilterschichten mit dem Material EXM 1607 als Filterhilfsmittel herzustellen. Die Gründe werden derzeit noch untersucht.

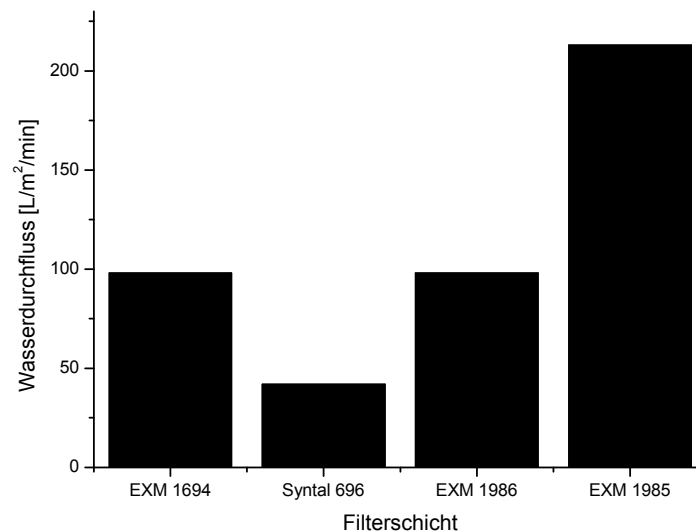
**Tabelle 3.7:** Übersicht über die als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten eingearbeiteten Adsorbentien, den Adsorbensanteil der jeweiligen Filterschicht sowie die resultierende Schichtdicke.

Als Filterhilfsmittel verwendetes Adsorbens	Adsorbensanteil [ $\text{g/m}^2$ ]	Schichtdicke [mm]
EXM 1694 (Tonmineral, Kerolit/ Saponit)	500	3,4
Syntal 696 (Hydrotalcit)	900	4,1
Puralox <sup>®</sup> KR 160 (reines $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ )	900	4,1
Siral <sup>®</sup> 40 ( $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ )	900	3,0

Durch unterschiedliche Vermahlgrade der eingesetzten Cellulosefasern kann man Tiefenfilterschichten verschiedener „Offenheiten“ erhalten (vgl. Kapitel 2.1). Offene Filterschichten haben dementsprechend ein gröberes Netzwerk, große Poren und Kanäle. Sie besitzen höhere Kapazitäten für Partikel, lassen jedoch kleinere Partikel stärker passieren. Um die adsorptive Wirkung der Adsorbentien in den Filterschichten voll ausnutzen zu können, ist es daher sinnvoll, möglichst geschlossene Filterschichten herzustellen. Auf diese Weise werden Diffusionswege möglichst kurz gehalten und eine große aktive Oberfläche gewährleistet. Ein

wichtiges Maß, um die Offenheit der Filter zu bewerten, ist der Wasserdurchfluss bei konstantem Druck ( $\text{L}/\text{m}^2(\text{Filterfläche})/\text{min}$ ). Grob kann man sagen, dass Tiefenfilterschichten mit einem Wasserdurchfluss unterhalb von  $80\text{-}90 \text{ L}/\text{m}^2/\text{min}$  bei einem Differenzdruck von 1 bar als geschlossene Tiefenfilterschichten gelten, während Filterschichten mit einem Wasserdurchfluss von größer als  $800\text{-}1000 \text{ L}/\text{m}^2/\text{min}$  bei einem Differenzdruck von 1 bar als deutlich offen bezeichnet werden können. Der Bereich dazwischen ist graduell einzuordnen.

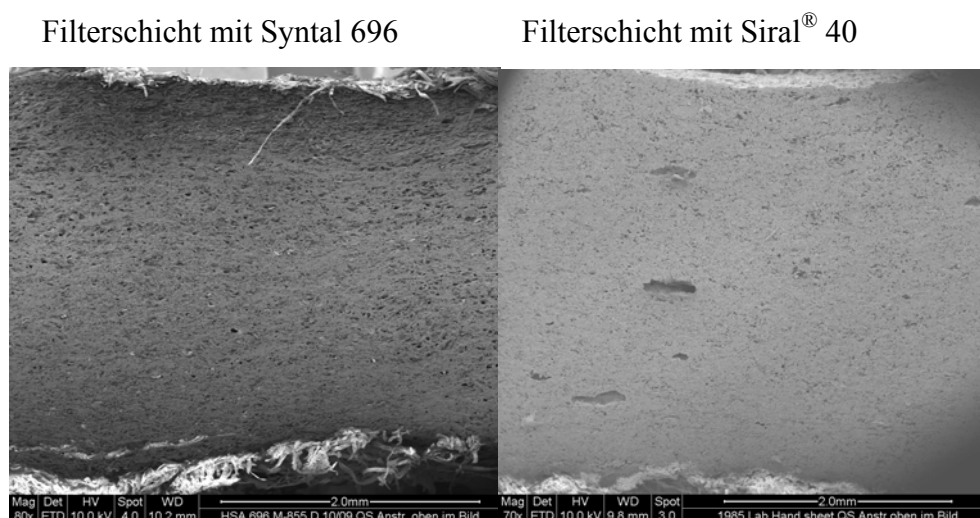
In Abbildung 3.20 ist der für die jeweiligen Filter bestimmte Wasserdurchfluss bei einem Differenzdruck von 1 bar dargestellt.



**Abbildung 3.20:** Wasserdurchfluss für die verschiedenen Tiefenfilterschichten unter Verwendung des jeweiligen Adsorbens als Filterhilfsmittel. Der Wasserdurchfluss wurde bei konstantem Differenzdruck von 1 bar bestimmt.

Die Daten wurden freundlicherweise von der Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen zur Verfügung gestellt. Mit einem Wasserdurchfluss von  $42 \text{ L}/\text{m}^2/\text{min}$  lässt sich per Definition nur die Filterschicht mit Syntal 696 als Filterhilfsmittel als geschlossene Schicht klar einordnen. Die Filterschichten mit den Adsorbentien EXM 1694 und Puralox<sup>®</sup> KR 160 lassen sich mit einem Durchfluss von jeweils  $98 \text{ L}/\text{m}^2/\text{min}$  auch noch als geschlossene Schichten kategorisieren. Die Filterschichten mit dem eingearbeiteten Material Siral<sup>®</sup> 40 befinden sich bei einem

Wasserdurchfluss von  $213 \text{ L/m}^2/\text{min}$  in dem graduellen Übergangsbereich zwischen offenen und geschlossenen Filterschichten. Abbildung 3.21 zeigt im Vergleich rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unter Verwendung von Syntal 696 und Siral<sup>®</sup> 40 als Filterhilfsmittel erhaltenen Filterschichten in jeweils 70-facher Vergrößerung.



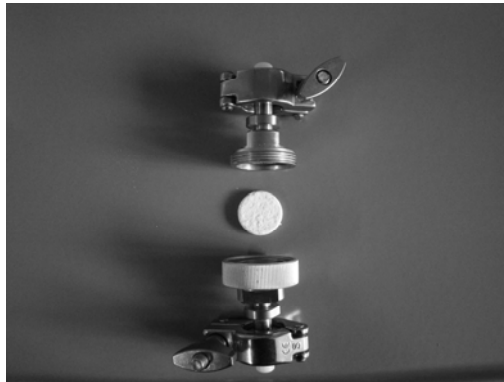
**Abbildung 3.21:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Filterschichten mit Syntal 696 als Filterhilfsmittel (links) und Siral<sup>®</sup> 40 (rechts). Die Vergrößerung beträgt in beiden Fällen 70.

Aufnahmen in weiterer Vergrößerung sowie der übrigen Filterschichten sind im Anhang (Kapitel 6.1.4) dargestellt. Die Bilder wurden freundlicherweise von Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen zur Verfügung gestellt. Erstaunlicherweise erscheint die Filterschicht mit Syntal 696 um einiges poröser und somit offener als die Filterschicht mit Siral<sup>®</sup> 40 als Hilfsmittel. Allerdings weist die Schicht mit Siral<sup>®</sup> 40 einige größere Poren und Unregelmäßigkeiten auf; die Schicht mit Syntal 696 ist wesentlich homogener verteilt. Eventuell wird der hohe Wasserdurchfluss dadurch verursacht.

### 3.4.2 Dynamische Beladungskapazitäten der Filterschichten

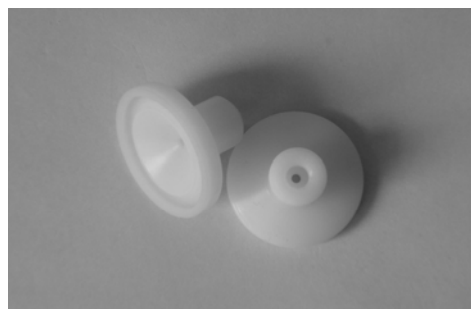
Die Filterschichten wurden in dynamischen Adsorptionsversuchen analog den in Abschnitt 3.2 durchgeführten Versuchen mit  $\alpha$ -Chymotrypsin als Modellenzym

beladen. Zu diesem Zweck wurde in Zusammenarbeit mit der Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen ein Gehäuse entwickelt, das an eine chromatographische Anlage angeschlossen werden kann und die dynamische Beladung der Filter erlaubt. Das Gehäuse ist in Abbildung 3.22 dargestellt.



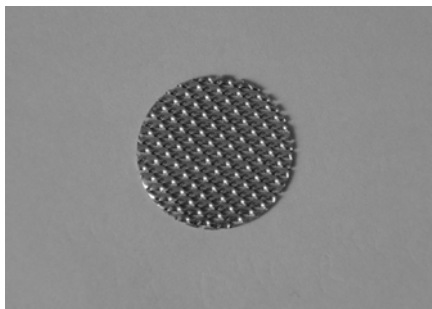
**Abbildung 3.22:** Edelstahlgehäuse für den Einsatz von Tiefenfilterschichten in dynamischen Adsorptionsversuchen.

Die Filterschichten können hier als Stanzlinge mit einem Durchmesser von 24 mm eingesetzt werden und über zwei der in Abbildung 3.23 gezeigten PE-Verschraubungen mit passenden Verschraubungen mit der zu benutzenden Anlage verbunden werden.



**Abbildung 3.23:** PE-Verschraubungen zum Anschluss des Gehäuses an die FPLC-Anlage.

Über die in Abbildung 3.24 gezeigten Spreader, die sich zu beiden Seiten in dem Gehäuse befinden, soll eine gleichmäßige Durchströmung der Filterschichten gewährleistet werden.



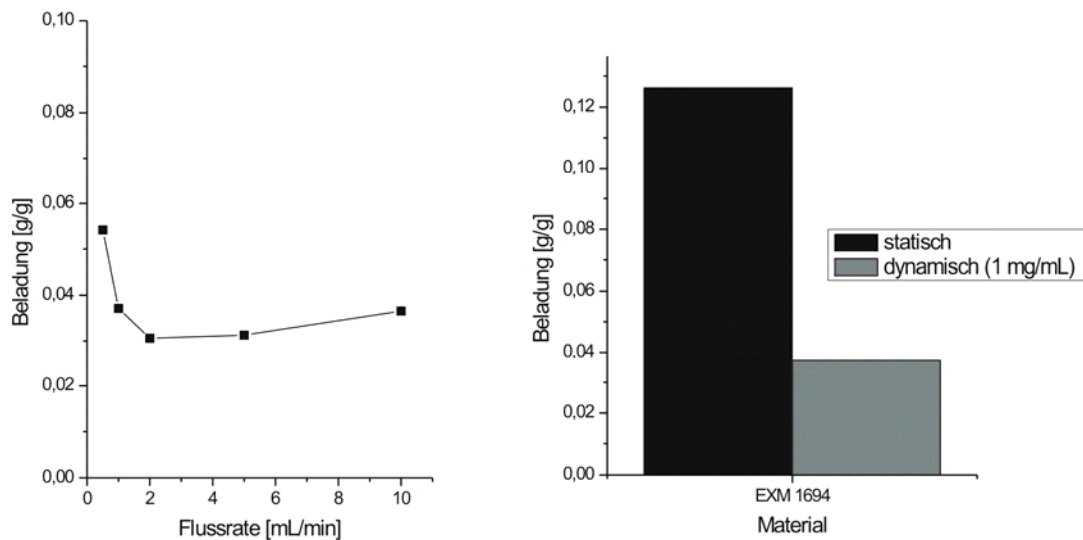
**Abbildung 3.24:** Spreader zur gleichmäßigen Durchströmung des Tiefenfilterstanzlings.

#### *Tiefenfilterschichten mit EXM 1694*

Im Falle von EXM 1694 handelt es sich um ein quellfähiges Material, das nicht in chromatographische Säulen gepackt werden kann. Es würde hierbei zu einem zu hohen Druckabfall über den verwendeten Säulenkörper kommen. Das Einarbeiten in Tiefenfilterschichten könnte daher eine Möglichkeit darstellen, quellfähige Tonminerale in ein dynamisches Adsorptionssystem zu überführen. Um den Druckabfall über die Filter zu untersuchen, wurden Filterstanzlinge in oben beschriebenes Gehäuse eingesetzt und bei verschiedenen Flussraten mit vollentsalztem Wasser als mobile Phase von oben nach unten durchströmt. Bei jeder Flussrate wurde der entsprechende Druck abgelesen. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob die Quellfähigkeit auch hier einen Einfluss auf die Benutzung der Tiefenfilterschichten hat. Nach dreistündiger Benutzung des Filters war ein deutlicher Druckanstieg festzustellen. Dieser Druckanstieg wird vermutlich durch das Aufquellen des Materials in der Filterschicht verursacht. Dennoch liegt der Druck mit 4,8 bar bei einer Flussrate von 10 mL/min im Bereich des nicht-quellfähigen Tonminerals EXM 1607, wenn es als Pulver im kleinen Maßstab (500 mg) in eine chromatographische Säule gepackt wurde (vgl. Kapitel 3.3.2) (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3.25 zeigt die Beladung des Tiefenfilters mit EXM 1694 mit dem Modellenzym  $\alpha$ -Chymotrypsin als Funktion der verwendeten Flussrate. Adsorbiert wurde bei pH 4. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Anhang (Kapitel 6.2.5) zu entnehmen. Die gezeigte Beladung ist auf das reine Filterhilfsmittel bezogen.





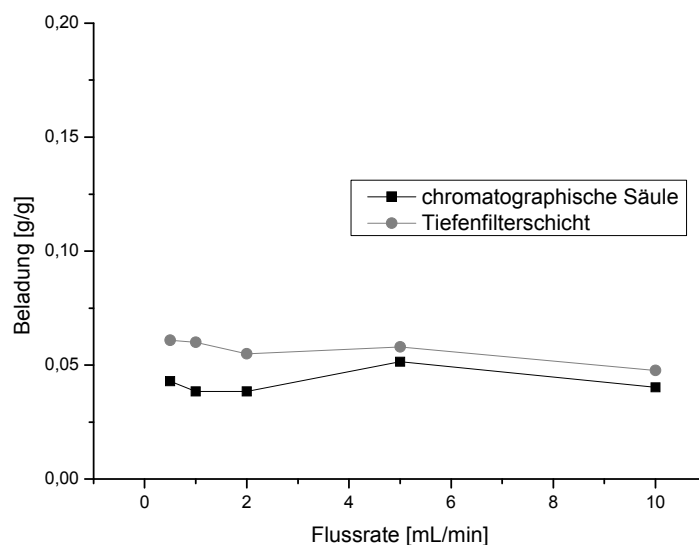
**Abbildung 3.25:** Dynamische Adsorptionskapazitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an dem Material EXM 1694, eingearbeitet als Filterhilfsmittel in einer Tiefenfilterschicht in Abhängigkeit von der verwendeten Flussrate. Die Beladung ist auf das reine Filterhilfsmittel bezogen (links). Dynamische Adsorptionskapazität von  $\alpha$ -Chymotrypsin an dem Material EXM 1694 als Filterhilfsmittel bei einer Flussrate von 1 mL/min im Vergleich mit den statischen Adsorptionskapazitäten des pulverförmigen Materials EXM 1694 (rechts).

Da Tiefenfilterschichten über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen Proteine binden können (vgl. Abschnitt 2.1), wurde unter gleichen Bedingungen  $\alpha$ -Chymotrypsin an eine reine Celluloseschicht gebunden. Es konnte jedoch keinerlei Proteinadsorption gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Sämtliche gefundene Proteinadsorption findet somit nur an dem als Filterhilfsmittel verwendeten Tonmineral statt. Auf der rechten Seite der Abbildung ist wiederum die bei einer Flussrate von 1 mL/min ermittelte Adsorptionskapazität von  $\alpha$ -Chymotrypsin an dem Material EXM 1694 im Vergleich zu der in einem statischen Adsorptionssystem ermittelten Adsorptionskapazität dargestellt. Der Übergang in ein dynamisches Adsorptionssystem ist für das Material mit einem relativ starken Verlust an Adsorptionskapazität im Vergleich zu der in einem statischen Adsorptionssystem verbunden. Bei einer Flussrate von 1 mL/min wurde für das Tonmineral als Filterhilfsmittel in einer Tiefenfilterschicht eine Beladungskapazität von lediglich 29% im Vergleich zu der statischen Adsorptionskapazität des Pulvers gefunden. Es ist denkbar, dass das Einarbeiten

des Materials in die Tiefenfilterschicht zu dem starken Verlust an Adsorptionskapazität führt. Es sind jedoch auch materialspezifische Gründe möglich. Das Einarbeiten quellfähiger Materialien als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten stellt jedoch eine Möglichkeit dar, diese Materialien in ein dynamisches Adsorptionssystem zu überführen.

#### *Tiefenfilterschichten mit Syntal 696*

Analog der Filterschicht mit EXM 1694 als Filterhilfsmittel wurde die dynamische Beladung mit  $\alpha$ -Chymotrypsin für die Tiefenfilterschichten mit eingearbeitetem Syntal 696 bestimmt. Abbildung 3.26 zeigt die Beladung der Tiefenfilterschichten mit Syntal 696 als Funktion der Flussrate. Im Vergleich sind die bereits in Abbildung 3.17 dargestellten Beladungen des Pulvers, gepackt in eine chromatographische Säule, gezeigt.



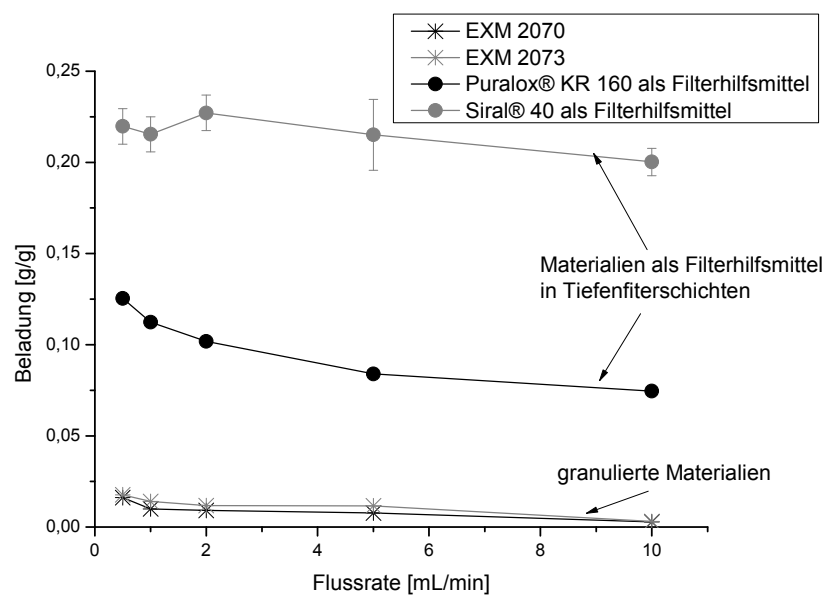
**Abbildung 3.26:** Dynamische Adsorptionskapazitäten von Syntal 696 in Abhängigkeit von der Flussrate. Dargestellt wird zum einen die Beladungen des Pulvers in eine chromatographische Säule gepackt (vgl. Abbildung 3.18), zum anderen als Filterhilfsmittel in eine Tiefenfilterschicht eingearbeitet. Die Beladung ist hierbei auf das reine Filterhilfsmittel bezogen.

Die Adsorption fand unter gleichen Bedingungen (pH 9) statt. Auch hier wurde bei Beladung mit gepufferter Enzymlösung gleichen pH-Werts keine Adsorption an

reine Celluloseschichten gefunden. Das gesamte adsorbierte Enzym bindet somit an den als Filterhilfsmittel verwendeten Hydrotalcit. Das Einarbeiten des Materials in die Tiefenfilterschicht führt zu keinem Verlust an Adsorptionskapazität im Vergleich zu dem pulverförmigen Material, die Adsorptionskapazitäten des Filterhilfsmittels liegen sogar leicht oberhalb der für das Pulver in einer chromatographischen Säule gefundenen.

#### *Tiefenfilterschichten mit Puralox® KR 160 und Siral® 40*

Abbildung 3.27 zeigt die Beladung der Tiefenfilterfilterschichten mit Puralox® KR 160 und Siral® 40 mit  $\alpha$ -Chymotrypsin in Abhängigkeit von der Flussrate. Vergleichend sind die bereits in Abbildung 3.18 gezeigten Beladungen der granulierten Materialien EXM 2070 und EXM 2073 dargestellt. Adsorbiert wurde wiederum bei pH 7 (Puralox® KR 160) und pH 6 (Siral® 40).



**Abbildung 3.27:** Dynamische Adsorptionskapazitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an die Materialien Puralox® KR 160 und Siral® 40 als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten in Abhängigkeit von der verwendeten Flussrate. Als Vergleich sind noch einmal die bereits in Abbildung 3.18 dargestellten Beladungskapazitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an die granulierten Materialien EXM 2070 und EXM 2073 dargestellt.

Die Beladungen für die Tiefenfilterschichten liegen deutlich oberhalb der für die granulierten Materialien bestimmten Beladungskapazitäten. Auch hier wurden bei beiden pH-Werten die Adsorptionskapazitäten der reinen Cellulosefilterschichten für  $\alpha$ -Chymotrypsin bestimmt. Auch hier wurde keinerlei Adsorption des Enzyms an die Filter gefunden.

### 3.4.3 Zusammenfassung

Der Übergang in ein dynamisches Adsorptionssystem konnte für die getesteten Materialien auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Die Materialien EXM 1607 und Syntal 696 konnten auf Partikelgrößen  $>45 \mu\text{m}$  abgesiebt werden und als pulverförmige Materialien in kleinem Maßstab (200 mg) in chromatographische Säulen gepackt werden. Bei einer Flussrate von 1 mL/min betrug die Adsorptionskapazität der Materialien 69-71% der im statischen Adsorptionssystem ermittelten Beladungskapazitäten der beiden Materialien.

Die Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40 auf Basis von Aluminiumoxid werden bisher als Katalysatoren und Katalysatorträger in der heterogenen Katalyse eingesetzt. Auch hier können sie in pulverförmiger Form nicht in Durchflussreaktoren eingesetzt werden. Sie werden zu diesem Zweck granuliert. Die granulierten Partikel weisen Größen zwischen 1 und 3 mm auf. Es sollte untersucht werden, ob sie in dieser granulierten Form auch zur Proteinaufreinigung in gepackten Chromatographiesäulen in größerem Maßstab eingesetzt werden können. Die Granulate zeigten eine gute Eignung als Säulenpackungen. Die Säulenvordrücke betragen für die mit jeweils 3 g der Materialien befüllten Säulen bei einer Flussrate von 10 mL/min lediglich 2,2 bar. Zudem konnten sie in vier aufeinanderfolgenden Adsorptionszyklen ohne Verlust an Adsorptionskapazität eingesetzt werden. Problematisch ist die geringe Adsorptionskapazität der granulierten Materialien im Vergleich zu den Pulvern. So betragen die bei einer Flussrate von 1 mL/min ermittelten Beladungskapazitäten lediglich 7,3-8% im Vergleich zu den für die pulverförmigen Materialien im statischen Adsorptionssystem ermittelten Beladungskapazitäten. Auch ein modifiziertes

Granulat mit größerer Oberfläche und Makroporen führte zu keiner Vergrößerung der Adsorptionskapazität.

Die Materialien EXM 1694, Syntal 696, Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40 konnten als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten eingearbeitet werden. Es war nicht möglich Filterschichten unter Verwendung des Tonminerals EXM 1607 als Filterhilfsmittel herzustellen. Die Gründe werden derzeit noch untersucht. Durch Entwicklung eines speziellen Gehäuses konnten Filterstanzlinge mit einer FPLC-Anlage verbunden und im dynamischen Betrieb eingesetzt werden. Auf diese Weise war es möglich, das quellfähige Tonmineral EXM 1694 in ein dynamisches Adsorptionssystem zu überführen. Außerdem wurden dynamische Adsorptionskapazitäten für die als Filterhilfsmittel verwendeten Adsorbentien ermittelt, die für Syntal 696 im Bereich der Adsorptionskapazitäten des reinen Pulvers lagen und für die Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40 weit über den für die granulierten Materialien gefundenen Adsorptionskapazitäten einzuordnen sind.

## 4 Enzymaufreinigung aus Zellkulturen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kann die Aufreinigung von Enzymen aus den entsprechenden Zellkulturüberständen und Zellaufschlüssen bis zu 80% der Gesamtprozesskosten ausmachen. Die Kosten werden durch teure Chromatographiematerialien, Regenerationsprozesse wie Reinigung und Untersuchungen auf eventuelle mikrobielle Kontaminationen sowie einer großen Anzahl an Prozessschritten verursacht [3]. So erfolgt die chromatographische Aufreinigung von  $\alpha$ -Chymotrypsin beispielsweise über drei Schritte, bestehend aus Gelfiltrations- und Anionenaustauschchromatographie [114, 115].

Materialien auf der Basis von Tonmineralien und Hydrotalciten sind sehr kostengünstig. Die Materialien auf Basis von Aluminiumoxid könnten direkt auf die entsprechende Aufreinigungsproblematik adaptiert werden. Somit könnten eventuell Aufreinigungsschritte eingespart werden, da bereits in einer geringeren Anzahl von Schritten größere Aufreinigungseffekte erzielt werden könnten. In Abschnitt 3.3 war zudem gezeigt worden, dass es möglich war, die Materialien als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten einzuarbeiten. Auf diese Weise könnten durch Kombination von Filtrations- und Aufreinigungsschritten ebenfalls Prozessschritte eingespart werden. In Abschnitt 3 waren die Materialien im Modellsystem als geeignet zur Enzymadsorption charakterisiert worden. In diesem Kapitel wurden die in Abschnitt 3 im Modellsystem charakterisierten Materialien auf ihre Eignung zur Anwendung im Realsystem getestet. Es sollte untersucht werden, inwieweit die Materialien zur Aufreinigung verschiedener Enzyme aus Zellkulturüberständen und -aufschlüssen einsetzbar sind. Zunächst wurden die in Kapitel 3 charakterisierten Materialien eingesetzt. Außerdem wurden weitere modifizierte Materialien zur Anwendung in speziellen Aufreinigungsproblematiken getestet.

## 4.1 Unmodifizierte Materialien

### 4.1.1 Hydrotalcite und Tonmineralien

Im Falle der Tonmineralien EXM 1694 (Saponit/ Kerolit), EXM 1607 (Montmorillonit/ amorphes SiO<sub>2</sub>) und des Hydrotalcits Syntal 696 wurden die Enzyme PenicillinG-Amidase, Levansucrase aus *Lactobacillus reuteri* und Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* zur Aufreinigung verwendet. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die aufzureinigenden Enzyme und ihre Eigenschaften.

**Tabelle 4.1:** Überblick über die zur Aufreinigung aus den entsprechenden Zellkulturüberstände und -aufschlüssen verwendeten Enzyme und ihre Eigenschaften.

	PenicillinG- Amidase	Levansucrase aus <i>Lactobacillus reuteri</i>	Lipase aus <i>Geobacillus thermoleovorans</i>
Molekulargewicht	70 kDa	120 kDa	46 kDa
Isoelektrischer Punkt	6,3-6,7	4,7	6,8

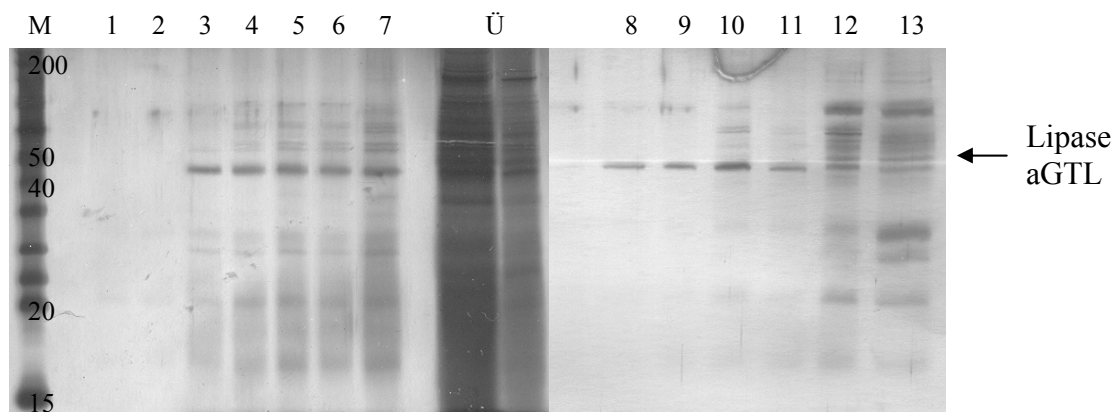
Für die Bereitstellung der entsprechenden Enzyme wurden Schüttelkolbenkultivierungen der produzierenden Mikroorganismen durchgeführt. Die Levansucrase wurde in *Bacillus megaterium* exprimiert, die Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* in *Staphylococcus carnosus*. Zur Produktion von Levansucrase aus *Lactobacillus reuteri* wurde der rekombinante *Bacillus megaterium*-Stamm pRBBm15 (PxylA-SplipA-lev773His) verwendet. Dieser Stamm wurde von PD Karl Friehs, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik, Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt. Der rekombinante Stamm *Staphylococcus carnosus* TM 300 zur Produktion der Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* wurde im Rahmen des BMBF-Biokatalyse2021-Projektclusters von Prof. Dr. Dr. Garbared Antranikian, Institut für Technische Mikrobiologie, Technische Universität Hamburg-Harburg zur Verfügung gestellt. Das Enzym stammt aus der BioKat-Collection. Weitere Informationen sind der homepage des BMBF-Biokatalyse2021-Projektclusters zu entnehmen. Die

verwendeten Kultivierungsbedingungen sind im Anhang (Kapitel 6.2.6 und 6.2.7) einzusehen. Der PenicillinG-Amidase enthaltene Zellaufschluss von *E. coli* wurde bei ASA-Spezialenzyme gekauft. Analog den oben durchgeführten Versuchen im Modellsystem wurden die Materialien zunächst für eine Stunde in dem entsprechenden Adsorptionspuffer equilibriert. Der zur Aufreinigung verwendete Zellkulturüberstand, bzw. -aufschluss wurde mit dem Adsorptionspuffer auf Gesamteinkonzentrationen zwischen 0,25 und 0,33 mg/mL verdünnt. Die Materialien wurden für eine Stunde mit dem gepufferten Zellaufschluss inkubiert. Im Anschluss wurde mit Adsorptionspuffer gewaschen und mit Elutionspuffer eluiert. Die Inkubationszeiten für jeden Schritt betragen eine Stunde. Nach jedem Schritt wurden die Materialien abzentrifugiert und die Überstände aufbewahrt. Die abzentrifugierten Überstände nach dem jeweiligen Arbeitsschritt werden im Folgenden als Adsorptions-, Wasch- und Elutionsfraktionen bezeichnet. Eine Detektion der Proteine in den einzelnen Fraktionen erfolgte gelelektrophoretisch mit anschließender Silberfärbung. Die genauen Versuchsdurchführungen der Aufreinigungen und der anschließenden Proteinanalytik sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 6.2.8, 6.2.10 und 6.3.10).

Ein befriedigender Aufreinigungseffekt wurde lediglich bei der Aufreinigung der Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* mit EXM 1607 erhalten. Abbildung 4.1 zeigt die pH-Abhängigkeit der Adsorption von Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* an dem Material EXM 1607 sowie die Elutionsfraktionen nach Adsorption bei pH 5 und anschließender Elution über pH-Shift bei pH 6-12. Die Bahnen 1-6 kennzeichnen die Adsorptionsfraktionen. Der Zellkulturüberstand wurde auf pH 6-10 gepuffert. Die Bahnen 8-13 kennzeichnen die Elutionsfraktionen. M bezeichnet den aufgetragenen Marker, Ü den unaufgereinigten Zellkulturüberstand (links: unverdünnt, rechts: verdünnt, wie er auf die Materialien aufgegeben wurde). Es ist eine deutliche pH-Abhängigkeit der Adsorption zu sehen. Auch hier folgt die Adsorption einem Kationenaustauschmechanismus. Bei pH-Werten von 4 und 5 (Bahn 1 und 2) unterhalb des isoelektrischen Punktes des Enzyms (pH 5,8) konnte keinerlei Lipase in dem Überstand nach der Adsorption nachgewiesen werden. Offensichtlich wird das Enzym vollständig von dem Material adsorbiert. Bei pH-Werten oberhalb des



isoelektrischen Punktes (pH 6-10, Bahn 3-7) ist eine deutliche Bande bei 46 kDa in den Adsorptionsfraktionen zu erkennen. Das Enzym wird bei diesen pH-Werten oberhalb seines isoelektrischen Punktes nicht mehr von dem Material adsorbiert. Bei pH 8-10 (Bahn 8-13) kann die Lipase in reiner Form in den Elutionsfraktionen wiedergefunden werden. Bei pH 11 und 12 kann die Lipase ebenfalls eluiert werden, allerdings stark verunreinigt mit host cell-Proteinen.



**Abbildung 4.1:** SDS-Page-Gel der Adsorptionsfraktionen des gepufferten Zellkulturüberstands von Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* an das Material EXM 1607 bei pH-Werten von 6-10 (linke Seite, Bahn 1-7), in den mit Ü gekennzeichneten Bahnen ist der Zellkulturüberstand dargestellt (links unverdünnt, rechts 1:4 verdünnt, wie er zur Aufreinigung verwendet wurde) und Elutionsfraktionen nach Adsorption bei pH 5. Die Adsorption wurde bei pH-Werten von 6-12 durchgeführt (rechte Seite, Bahn 8- 13).

Die übrigen Materialien und Enzyme wiesen zwar in den meisten Fällen in pH-abhängigen Adsorptionsversuchen wiederum ein deutliches Ionenaustauschverhalten auf, eine Elution der gebundenen Enzyme konnte jedoch nur bei extremen pH-Werten oder hohen Salzkonzentrationen erreicht werden. In diesem Fall fand die Elution der Zielenzyme jedoch nur in stark verunreinigter Form statt. Hier kam es auch zur Elution zahlreicher ebenfalls gebundener host-cell-Proteine (Daten nicht gezeigt).

Bei Lipasen handelt es sich um Enzyme, die die Bildung und Spaltung von Fettsäureestern an Grenzflächen zwischen hydrophilen und lipophilen Phasen katalysieren [98, 100, 116]. Sie sind zudem durch einen hydrophoben Bereich

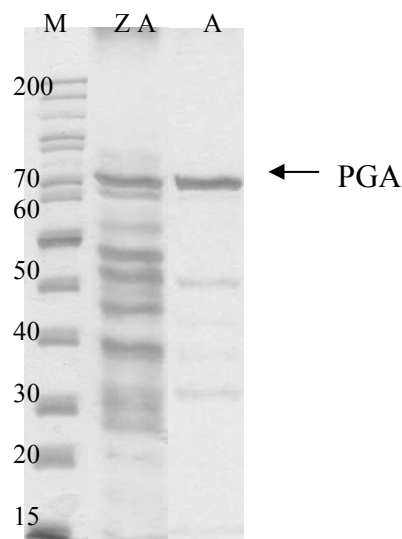
gekennzeichnet, der das aktive Zentrum des Enzyms bedeckt [98-100]. In Abschnitt 3 war gezeigt worden, dass das Material EXM 1607 Proteine zwar zum Großteil über elektrostatische Wechselwirkungen bindet, aber auch hydrophobe Wechselwirkungen die Adsorption beeinflussen. Bei dem Material handelt es sich um eine Mischphase aus einem Montmorillonit und einem amorphen Kieselgel. In der Literatur wird von der Adsorption von Lipasen an Tonmineralien sowohl über hydrophobe Wechselwirkungen [71, 117, 118] als auch über elektrostatische Wechselwirkungen berichtet [119]. Kieselgele weisen eine starke Affinität zu Lipasen auf. So werden Silika-basierte Materialien häufig zur Lipaseimmobilisierung eingesetzt. Die Adsorption erfolgt hier in der Regel ebenfalls über hydrophobe Wechselwirkungen [119, 120]. Zur Aufreinigung von Lipasen werden Fällungskieselsäuren bisher nur selten eingesetzt. Die Elution erfolgt in dem Fall über lipidhaltige Elutionspuffer [121, 122]. Möglicherweise wird das Enzym über eine Kombination aus elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen an das Material EXM 1607 gebunden. Die Bindungen zu der Oberfläche des Materials sind vermutlich weniger stark als im Falle der weniger hydrophoben Enzyme, die über starke elektrostatische Wechselwirkungen an die Materialien gebunden werden (vgl. Kapitel 3). Es ist daher möglich, die Lipase durch pH-Shift in den leicht basischen pH-Bereich zu eluieren. Eine Quantifizierung der durchgeführten Aufreinigung erfolgt in Kapitel 4.2.

#### **4.1.2 Aluminiumoxid-basierte Materialien**

Die beiden Materialien auf Basis von  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  wurden ebenfalls auf ihre Eignung zur Aufreinigung von Enzymen aus Zellkulturüberständen getestet. Zur Aufreinigung wurden wiederum PenicillinG-Amidase (MW: 70 kDa, pI: 6,7-6,8), exprimiert in *E.coli*, und die Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* (MW: 46,2 kDa, pI: 5,8) exprimiert ins *Staphylococcus carnosus*, verwendet. Bei der Aufreinigung von Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* ergab sich das gleiche Problem wie im Falle der Materialien Syntal 696 und EXM 1694 (vgl. Abschnitt 4.1.1). In pH-abhängigen Adsorptionsversuchen wurde gefunden, dass die Materialien ein pH-abhängiges Adsorptionsverhalten zeigen, wie es gemäß der Charakterisierung in Kapitel 3.1.3 zu erwarten ist. So adsorbiert das Material

Puralox<sup>®</sup> KR 160 die Lipase über den pH-Bereich von pH 4 bis 8 komplett. Ab pH 10 findet keinerlei Adsorption mehr statt. Die Elution des Zielenzym ist jedoch nur in verunreinigter Form möglich (Daten nicht gezeigt).

Im Falle der PenicillinG-Amidase fand sich für das Material Puralox<sup>®</sup> KR 160 der höchste Aufreinigungseffekt durch Adsorption sämtlicher host cell-Proteine. So konnten bei Adsorption in Acetat-Puffer bei pH 5 sämtliche Verunreinigungen adsorbiert werden. Abbildung 4.2 zeigt das SDS-Page-Gel der gelelektrophoretisch untersuchten Überstände nach der Adsorption mit anschließender Silberfärbung. Für das Material Siral<sup>®</sup> 40 wurde der höchste Aufreinigungseffekt für PenicillinG-Amidase durch Adsorption bei pH 5 und anschließende Elution bei pH 8 und 9 gefunden. Die Elution gelang jedoch verunreinigt mit zwei host cell-Proteinen. Das SDS-Page-Gel ist dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 6.1.6).



**Abbildung 4.2:** SDS-Page-Gel der Adsorptionsfraktionen des gepufferten Zellkulturüberstands von PenicillinG-Amidase an das Material Puralox<sup>®</sup> KR 160 bei pH 5 (A), in der mit ZA gekennzeichneten Bahn ist der unaufgereinigte Zellaufschluss dargestellt

#### 4.1.3 Zusammenfassung

Die in Kapitel 3 charakterisierten Materialien wurden in diesem Abschnitt zur Aufreinigung von Enzymen aus Zellkulturüberständen und Zellaufschlüssen verwendet. Sie wurden in diesem Abschnitt zunächst in unmodifizierter Form

verwendet. In dieser Form zeigten sie eine prinzipielle Eignung zur Aufreinigung von Enzymen aus Zellkulturüberständen und Zellaufschlüssen. So adsorbieren die Materialien auf Basis von Tonmineralien und Hydrotalciten gemäß ihres Ionenaustauschmechanismus bei pH-Werten ober- und unterhalb der isoelektrischen Punkte der Enzyme, die Elution ist jedoch erschwert. Eine Elution des Zielenzyms erfolgt nur bei extremen Bedingungen, dann jedoch nur unter gleichzeitiger Elution von host cell-Proteinen. Der einzige befriedigende Aufreinigungseffekt wurde bei der Aufreinigung von Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* unter Verwendung des Materials EXM 1607 gefunden. Die Lipase konnte gemäß eines Kationenaustauschmechanismus an das Material gebunden werden und über pH-Shift in den leicht basischen pH-Bereich selektiv von dem Material eluiert werden. Wie zu vermuten ist, wird das Enzym durch eine Kombination von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen an das Material gebunden. Die Bindung ist dadurch vermutlich weniger stark als im Falle einer rein elektrostatischen Bindung. Dadurch könnte die Elution erleichtert sein.

Die Materialien auf Basis von  $\gamma$ -Aluminiumoxid, Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40 zeigen keinerlei Eignung zur Aufreinigung der verwendeten Lipase. Es konnten jedoch Aufreinigungseffekte für PenicillinG-Amidase gefunden werden. Im Falle des reinen  $\gamma$ -Aluminiumoxids Puralox<sup>®</sup> KR 160 konnte ein Aufreinigungseffekt durch Adsorption sämtlicher Verunreinigungen erzielt werden. Im Falle des Aluminiumsilikats Siral<sup>®</sup> 40 konnte durch Adsorption und anschließende Elution über pH-Shift eine Aufreinigung erreicht werden. Das Verhalten der Materialien ist nur schwierig vorherzusagen. Die erforderlichen Aufreinigungsbedingungen müssen daher jeweils im Vorfeld der Aufreinigung ermittelt werden.

## 4.2 Modifizierte Materialien zur Lipase- und Esteraseaufreinigung

### 4.2.1 Materialien

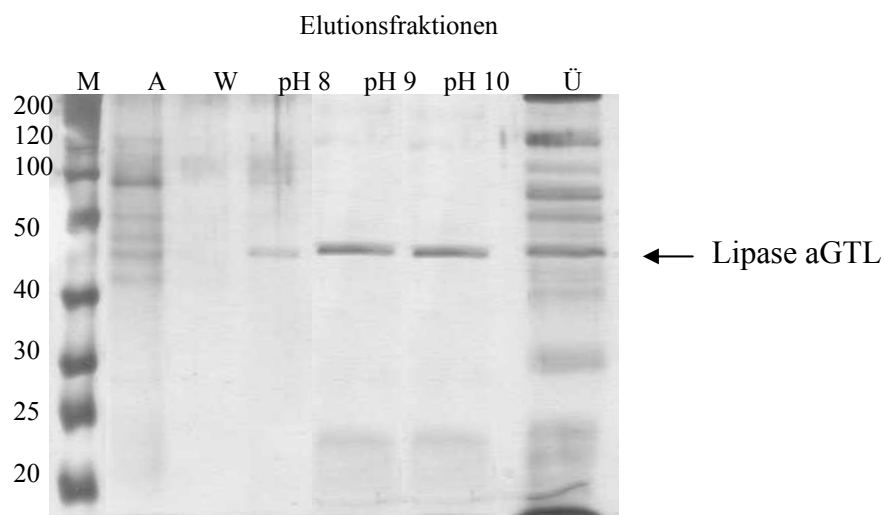
Als einzige funktionierende Aufreinigung konnte in Kapitel 4.1 Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* mit dem Material EXM 1607 aufgereinigt werden. Im Falle der übrigen Materialien war die Elution des Zielenzym jeweils erschwert.

Es wurde eine Kombination aus hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Enzym und Oberfläche des Materials angenommen. Diese Wechselwirkungen sind vermutlich weniger stark als im Falle rein elektrostatischer Wechselwirkungen, so dass eine Elution bereits im schwach basischen pH-Bereich erfolgen kann. Das Vorliegen dieser Wechselwirkungen wurde sowohl in der Hydrophobizität des Enzyms als auch in der Struktur des Materials vermutet. EXM 1607 ist eine Mischphase aus Montmorillonit, vermischt mit einem amorphen Kieselgel. Um zu untersuchen, ob auch andere Materialien auf Basis von Kieselsäuren für die Lipase aus *Geobacillus Thermoleovorans* geeignet sind wurden daher weitere Materialien auf Basis von Fällungskieselsäuren, z.T. als Mischphasen mit verschiedenen Tonmineralien zur Aufreinigung der Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* verwendet. Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die verwendeten Materialien und ihre wichtigsten Eigenschaften. Die Aufreinigungen wurden analog Kapitel 4.1.1 in einem statischen Adsorptionssystem durchgeführt. Es zeigte sich, dass im Falle aller vier Materialien eine Aufreinigung der Lipase möglich war. Auch hier wurde wiederum bei pH 5 adsorbiert und bei pH 8-10 eluiert.

**Tabelle 4.2:** Übersicht über die verwendeten Materialien auf Basis von Fällungskieselsäure zur Aufreinigung von Lipasen und Esterasen und ihre wichtigsten Eigenschaften.

	EXM 1907	EXM 1908	EXM 1910	EXM 1911
Chemische Zusammensetzung	SiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub> / Bentonit 80:20	SiO <sub>2</sub> / Bentonit 50:50	SiO <sub>2</sub> / Bleicherde 50:50
Spezifische Oberfläche (BET) [m <sup>2</sup> /g]	156,6	131,5	85,3	k.a.
Kumulatives Porenvolumen [cm <sup>3</sup> /g]	0,98	0,97	0,61	k.a.
Durchschnittsporendurchmesser [nm]	28,6	28,1	27,6	k.a.

Abbildung 4.5 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretisch untersuchten Adsorptions-, Wasch- und Elutionsfraktionen des Materials EXM 1907 mit anschließender Silberfärbung.



**Abbildung 4.3:** SDS-Page-Gel der Aufreinigung von Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* mit der reinen Fällungskieselsäure EXM 1907. A kennzeichnet die Adsorptionsfraktion, W die Waschfraktion, pH 8, pH 9 und pH 10 die Elutionsfraktionen bei entsprechendem pH-Wert.

Die Aufreinigungen der Lipase mit den übrigen Materialien führte zu dem gleichen Ergebnis. Auch hier konnte die Lipase in reiner Form in den Elutionsfraktionen wiedergefunden werden.

#### 4.2.2 Aufreinigung in einem statischen Adsorptionssystem

Da in Abschnitt 4.2.1 gezeigt werden konnte, dass alle verwendeten Materialien auf Basis von Kieselsäuren EXM 1607 (Montmorillonit/amorphes Kieselgel), EXM 1907 (reine Fällungskieselsäure), EXM 1908 (Fällungskieselsäure/Bentonit, 80:20), EXM 1910 (Fällungskieselsäure/Bentonit 50:50) und EXM 1911 (Fällungskiesel-säure/Bleicherde, 50:50) zur Aufreinigung von Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* gut geeignet sind, sollte des Weiteren untersucht werden, ob sie auch zur Aufreinigung von weiteren Lipasen und Esterasen verwendet werden können.

Bei Esterasen handelt es sich um den Lipasen verwandte Enzyme. Sie ähneln sich in Struktur und katalytischem Mechanismus. Esterasen unterscheiden sich von Lipasen lediglich durch die Kettenlänge der Substrate und durch einen hydrophoben Bereich, der im Falle von Lipasen das aktive Zentrum des Enzyms bedeckt. So katalysieren Lipasen die Bildung und Spaltung von Fettsäureestern mit Kohlenstoffketten  $>10$ , während Esterasen die Bildung und Spaltung von Fettsäureestern mit Kettenlängen  $<10$  Kohlenstoffatomen katalysieren. Esterasen weisen dementsprechend eine geringere Hydrophobizität als die verwandten Lipasen auf [98, 99, 123, 124]. Es wurden drei weitere Modellenzyme zur Aufreinigung mit den Materialien aus Tabelle 4.2 verwendet.

Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die verwendeten Enzyme und ihre Eigenschaften. Die Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* wurde bereits in Abschnitt 4.1 beschrieben. Wie erwähnt wurde der rekombinante Stamm *Staphylococcus carnosus* TM 300 zur Produktion der Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* im Rahmen des BMBF-Projektclusters Biokatalyse2021 von Prof. Dr. Dr. Garbared Antranikian, Institut für Technische Mikrobiologie, Technische Universität Hamburg-Harburg zur Verfügung gestellt. Die

Kultivierungsbedingungen sind dem Anhang (Kapitel 6.2.8) zu entnehmen. Die Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis* und die Esterase BCC70 wurden in *E.coli* exprimiert. Sie wurden ebenfalls im Rahmen des BMBF-Biokatalyse2021-Projektclusters von Prof. Dr. Dr. Garbared Antranikian, Institut für Technische Mikrobiologie, Technische Universität Hamburg-Harburg zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte an der TU Hamburg-Harburg. Die entsprechenden Zellen wurden als Feuchtzellmasse zur Verfügung gestellt. Der Zellaufschluss erfolgte gemäß Kapitel 6.2.6 und 6.2.9. Die drei Enzyme stammen aus der BioKat-Collection des BMBF-Biokatalyse2021-Projektclusters. Nähere Informationen hierzu sind der Homepage des BMBF-Biokatalyse2021-Projektclusters zu entnehmen. Desweiteren wurde Esterase aus *Bacillus stearo-thermophilus* als Modellenzym verwendet. Diese Esterase ist am C-Terminus mit einem His-Tag versehen. Zur Produktion wurde der rekombinante *E.coli*-Stamm *E.coli* K12 pJOE2702 verwendet. Dieser Stamm wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Abteilung Biotechnologie & Enzymkatalyse, Institut für Biochemie, Universität Greifswald, zur Verfügung gestellt. Das Bereitstellen des Enzyms erfolgte durch Schüttelkolbenkultivierung mit anschließendem Zellaufschluss. Das Protokoll für Kultivierung und Zellaufschluss ist dem Anhang (Kapitel 6.2.6) zu entnehmen.

**Tabelle 4.3:** Zur Aufreinigung mit Kieselsäure-basierten Materialien verwendete Lipasen und Esterasen.

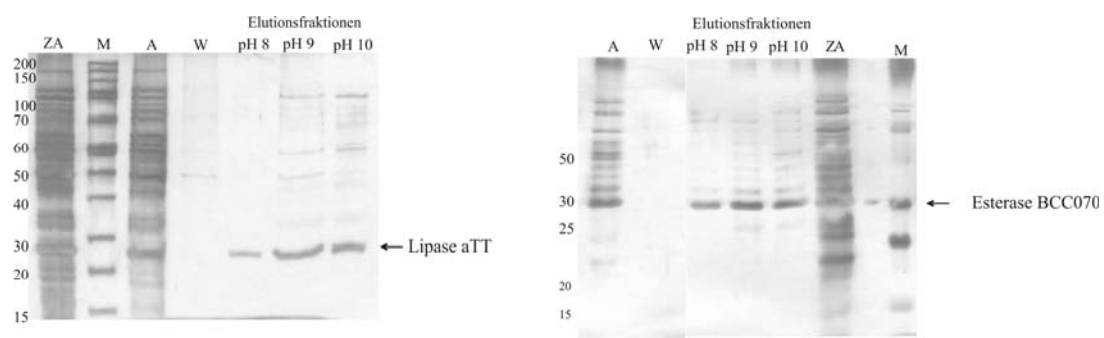
	Lipase aus <i>Geobacillus thermoleovorans</i> (Lipase aGTL)	Lipase aus <i>Thermoanaero- bacter tencongensis</i> (Lipase aTT)	Esterase BCC070	Esterase aus <i>Bacillus Stearo- thermophilus</i> (BSTE)
pI	6,8	5,2	6	5,2
MW [kDa]	46,2	29,1	34,3	29,1

Bei allen verwendeten Enzymen handelt es sich um thermophile Enzyme. Thermophile Enzyme haben in den letzten Jahren ein gesteigertes Interesse in der



Biotechnologie geweckt. Ihr Aktivitätsmaximum liegt bei 50-80 °C [98, 99, 116, 125-128]. Thermophile Lipasen und Esterasen werden in Zukunft eine wichtige Rolle in industriellen Prozessen spielen. Oft ist es von Vorteil, Bioprozesse bei erhöhten Temperaturen durchzuführen. Als Vorteile sind höhere Diffusionsraten, eine erhöhte Löslichkeit von Lipiden und anderen hydrophoben Substanzen im wässrigen Medium und verminderte Anfälligkeit für mikrobielle Kontaminationen zu nennen [98, 125-127, 129].

Die Aufreinigungen wurden zunächst wiederum in einem statischen Adsorptionssystem analog zu den in Kapitel 4.1 beschriebenen Aufreinigungen durchgeführt. Durch pH-abhängige Adsorptionsversuche konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten Enzyme außer Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* (vgl. Abbildung 4.1) an ihrem isoelektrischen Punkt adsorbiert werden konnten (Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis* und Esterase aus *Bacillus stearothermophilus*: pH 5, Esterase BCC070: pH 6; Daten nicht gezeigt). Die Elution erfolgte wiederum über pH-Shift in den leicht basischen pH-Bereich von pH 8-10. Es konnte für alle Enzyme ein deutlicher Aufreinigungseffekt erzielt werden. Abbildung 4.4 zeigt beispielhaft die Aufreinigung von Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis* mit dem Material EXM 1911 und die Aufreinigung von Esterase BCC070 mit EXM 1910.



**Abbildung 4.4:** SDS-Page Gele der Aufreinigungen von Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis* mit dem Material EXM 1911 (links) und Esterase BCC070 mit dem Material EXM 1910 (rechts). Die Adsorption erfolgte im Falle der Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis* bei pH 5 und im Falle der Esterase BCC070 bei pH 6. ZA kennzeichnet den unaufgereinigten Zellaufschluss, A die Adsorptionsfraktionen, W die Waschfraktionen, pH 8-10 die Elutionsfraktionen bei dem jeweiligen pH-Wert.

### 4.2.3 Quantifizierung der Aufreinigungen

Um genauere Aussagen über den erzielten Aufreinigungseffekt machen zu können, wurden die durchgeführten Aufreinigungen quantifiziert. Mittels Bradford-Test kann der Gesamtproteingehalt einer Probe bestimmt werden [130]. Die Aktivität von Lipasen und Esterasen kann über die Spaltung verschiedener Fettsäureester bestimmt werden. Im Falle der Lipasen wurde p-Nitrophenylpalmitat als Substrat verwendet [131], im Falle der Esterasen p-Nitrophenolcaprat [132]. Die Enzyme katalysieren die Abspaltung von p-Nitrophenol. Dessen Entstehung ist an einer Gelbfärbung der Probe zu erkennen. Bei einer Wellenlänge von 410 nm kann diese Absorptionsänderung im sichtbaren Bereich detektiert werden. Die genauen Versuchsdurchführungen des Bradford-Tests und der Aktivitätsassays sind dem Anhang (Kapitel 6.3.2, 6.3.4 und 6.3.5) zu entnehmen. Durch Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration und der Aktivität lässt sich die spezifische Aktivität der jeweiligen Probe, bezogen auf den Gesamtproteingehalt, berechnen. Die durchgeführte Aufreinigung geht einher mit einer Abreicherung von host cell-Proteinen in den Elutionsfraktionen. Die Aufreinigung lässt sich daher durch eine Vergrößerung der spezifischen Aktivität der Elutionsfraktionen im Vergleich zu dem unaufgereinigten Zellkulturüberstand nachweisen. Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der Elutionsfraktionen zu den spezifischen Aktivitäten des unaufgereinigten Zellkulturüberstands bzw. Zellaufschlusses wird im Folgenden als Aufreinigungsfaktor  $F_A$  bezeichnet.

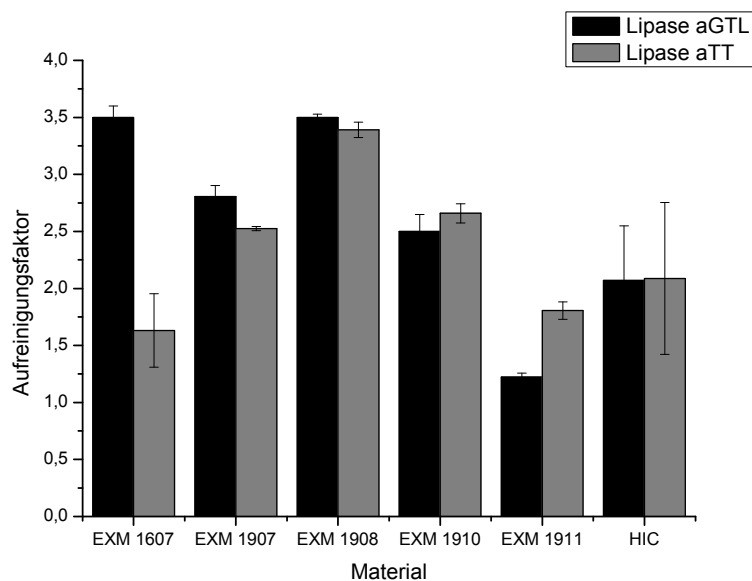
$$F_A = \frac{\text{spez. Aktivität der Elutionsfraktion}}{\text{spez. Aktivität des unaufgereinigten Zellkulturüberstandes / -aufschlusses}}$$

So bedeutet ein Aufreinigungsfaktor von z.B.  $F_A = 5$ , dass in der Elutionsfraktion eine fünfmal so große, auf den Gesamtproteingehalt bezogene, spezifische Aktivität gemessen wurde, wie im unaufgereinigten Zellkulturüberstand/ Zellaufschluss. Da dieser Faktor auch immer von der Zusammensetzung des zur Aufreinigung verwendeten Zellkulturüberstands bzw. Zellaufschlusses abhängt, wurden nur Überstände aus derselben Kultivierung bzw. desselben Zellaufschlusses miteinander verglichen. Weil hier für alle Aufreinigungsschritte dasselbe Volumen

verwendet wurde, kann aus der bestimmten Volumenaktivität Rückschluss über das in der Elutionsfraktion wiedergefundene Enzym gezogen werden. So bedeutet eine in der Elutionsfraktion wiedergefundene Volumenaktivität von 100%, dass das gesamte zuvor adsorbierte Enzym ohne Aktivitätsverlust eluiert wurde.

### *Lipasen*

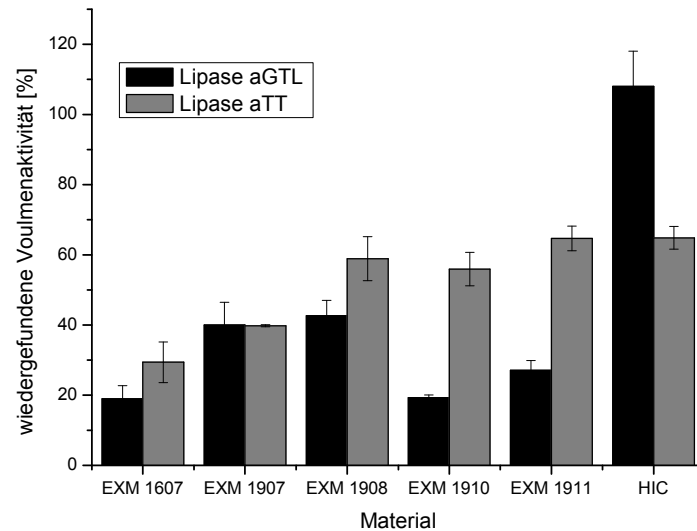
Abbildung 4.5 zeigt die erhaltenen Aufreinigungsfaktoren für die beiden Lipasen. Adsorbiert wurde wiederum in 50 mM Acetat-Puffer, pH 5. Die gezeigten Ergebnisse wurden unter Verwendung eines Tris-Puffers (100 mM) mit einem pH-Wert von 9 als Elutionspuffers gefunden. Vergleichend sind die Ergebnisse für ein kommerzielles HIC-Medium dargestellt. Lipasen und Esterasen werden in der Regel über mehrere Schritte aufgereinigt, die Fällungs- und Chromatographiemethoden einschließen. In den meisten Fällen kommt hydrophobe Interaktionschromatographie als einer der Schritte zum Einsatz [123, 126, 128, 129, 133-135]. Bei dem Material handelt es sich um das Material MacroPrep t-Butyl HIC Support der Firma Biorad, UK. Im Falle dieses Materials wurde unter Verwendung eines 100 mM MES-Puffers, pH 7 unter Zusatz von 1 M Ammoniumsulfat adsorbiert. Der höchste Aufreinigungseffekt ergab sich hierbei durch Elution unter Verwendung eines 100 mM MES-Puffers, pH 7 unter Zusatz von 0,25 M Ammoniumsulfat (Werte in der Abbildung dargestellt). Es konnten für beide Lipasen Aufreinigungsfaktoren von bis zu 3,5 erzielt werden. Es ist keine größere Systematik über den Tonmineral-Anteil der verwendeten Materialien zu erkennen. Der erzielte Aufreinigungseffekt für die beiden Lipasen an den Materialien ist zum Teil auch sehr unterschiedlich. Lediglich das Material EXM 1911 scheint mit einem Aufreinigungsfaktor von  $F_A=1,2$  im Falle der Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* und  $F_A=1,8$  im Falle der Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis* schlechter geeignet zu sein als die übrigen Materialien. Bis auf das Material EXM 1911 wurden für alle Materialien höhere Aufreinigungseffekte als für das kommerzielle HIC-Material erzielt. Es sind vermutlich wiederum proteinspezifische Eigenschaften zu beachten.



**Abbildung 4.5:** Aufreinigungsfaktoren der Lipasen aus *Geobacillus thermoleovorans* (schwarz) und aus *Thermoanaerobacter tencongensis* (grau). In beiden Fällen wurde der Zellaufschluss/-überstand zur Adsorption mit 50 mM Acetat-Puffer auf pH 5 gepuffert. Die Elution erfolgte unter Verwendung eines 100 mM Tris-Puffers, pH 9. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Abbildung 4.6 zeigt die in den Elutionsfraktionen wiedergefundenen Volumenaktivitäten nach Aufreinigung mit dem jeweiligen Material. Die wiedergefundene Volumenaktivität ist im Falle der fällungskieselsäurebasierten Materialien relativ gering, besonders im Falle der Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans*. So wurden in den Elutionsfraktionen lediglich zwischen 19% und 42% der zuvor adsorbierten Volumenaktivität gemessen. Für das kommerzielle HIC-Medium konnte die gesamte zuvor adsorbierte Volumenaktivität in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden. Im Falle der Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis* konnten maximal 64% bestimmt werden, die wiedergefundene Aktivität ist somit genauso hoch wie im Falle des kommerziellen HIC-Materials. Der Verlust an Aktivität kann durch an den Materialien verbliebenes Enzym, das nicht eluiert werden konnte, erklärt werden. Es kann aber auch zu den in Abschnitt 3.2 nachgewiesenen Aktivitätsverlusten kommen. Diese waren jedoch auf die sehr starken elektrostatischen Bindungen zwischen den

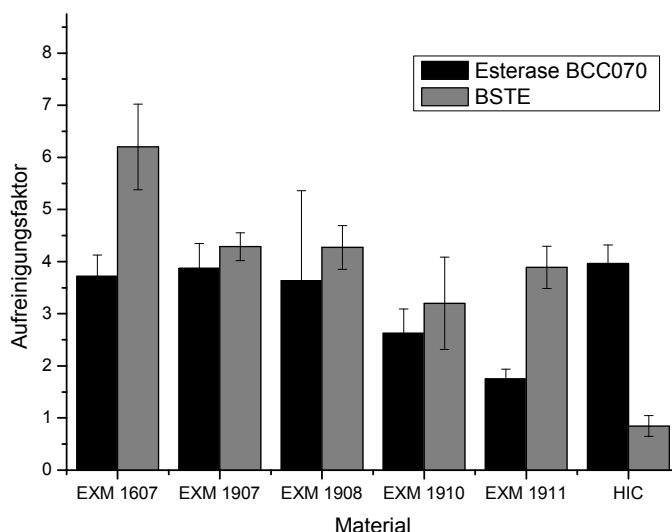
Enzymen und der Oberfläche der Materialien zurückgeführt worden, die hier offensichtlich nicht auftreten (vgl. Kapitel 4.1.3).



**Abbildung 4.6:** In den Elutionsfraktion wiedergefundene Volumenaktivitäten der Lipasen aus *Geobacillus thermoleovorans* (schwarz) und aus *Thermoanaerobacter tencongensis* (grau). In beiden Fällen wurde der Zellaufschluss/-überstand zur Adsorption mit 50 mM Acetat-Puffer auf pH 5 gepuffert. Die Elution erfolgte unter Verwendung eines 100 mM Tris-Puffers, pH 9. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Sandardabweichung).

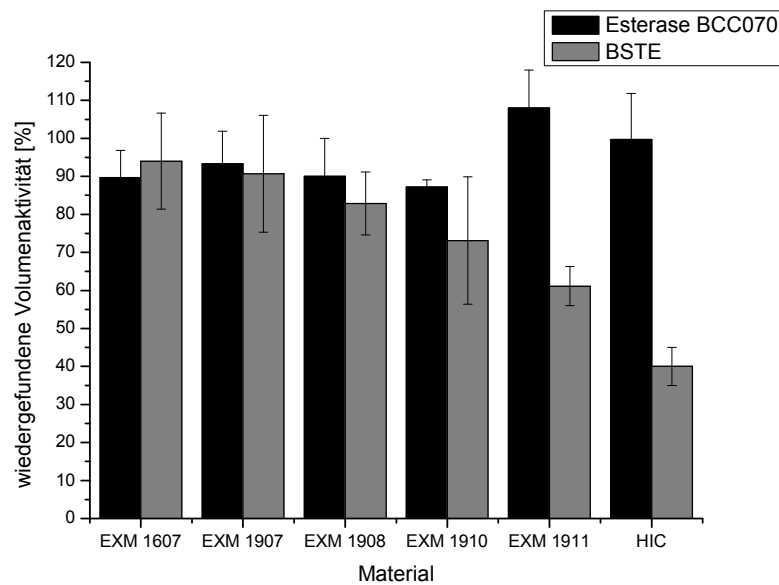
### Esterasen

Abbildung 4.7 zeigt die für die beiden Esterasen bestimmten Aufreinigungsfaktoren.



**Abbildung 4.7:** Aufreinigungsfaktoren der Esterasen BCC070 (schwarz) und aus *Bacillus stearothermophilus* (grau). Im Falle der Esterase BCC070 wurde der Zellaufschluss zur Adsorption mit 50 mM MES-Puffer auf pH 6 gepuffert, im Falle der Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit 50 mM Acetat-Puffer auf pH 5. Die Elution erfolgte unter Verwendung eines 100 mM Tris-Puffers, pH 9. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Für die Esterasen wurden allgemein höhere Aufreinigungsfaktoren als für die Lipasen ermittelt. So konnte die spezifische Aktivität um einen Faktor von bis zu sechs gegenüber dem unaufgereinigten Zellaufschluss erhöht werden. Die höchsten Aufreinigungsfaktoren, besonders nach Aufreinigung mit dem Material EXM 1607 zeigt die Esterase aus *Bacillus stearothermophilus*. Dieses Enzym konnte nicht durch Verwendung des kommerziellen HIC-Materials aufgereinigt werden. Es kam hierbei sogar zu einer Abreicherung der Esterase in den Elutionsfraktionen. Im Falle der Esterase BCC070 zeigten die Materialien EXM 1607, EXM 1907 und EXM 1908 erneut höhere Aufreinigungseffekte als für das kommerzielle HIC-Medium. Abbildung 4.8 zeigt wiederum die in den Elutionsfraktionen wiedergefundenen Volumenaktivitäten.



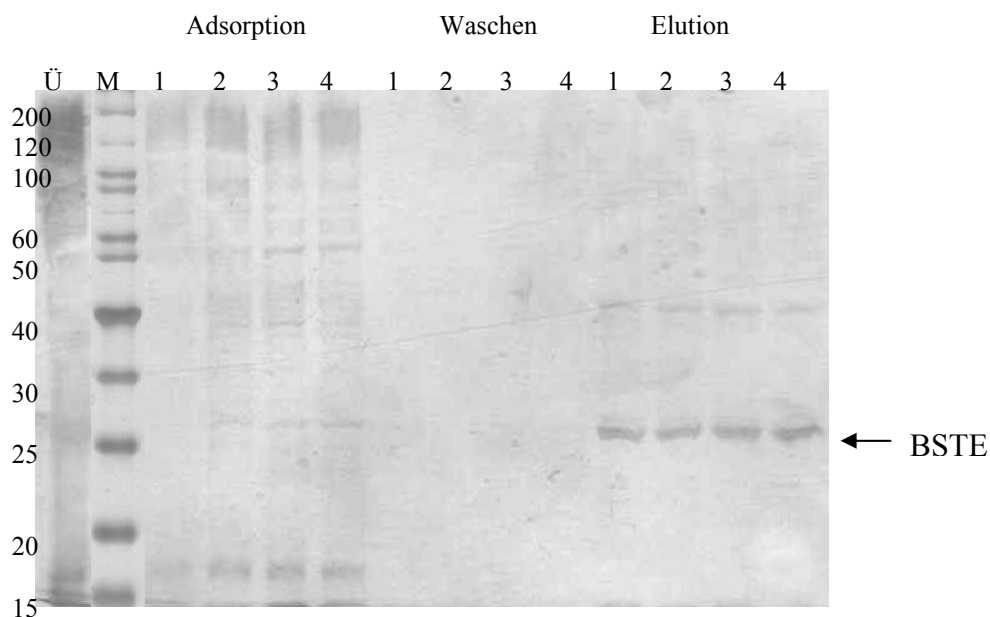
**Abbildung 4.8:** In den Elutionsfraktion wiedergefundene Volumenaktivitäten der Esterasen BCC070 (schwarz) und aus *Bacillus stearothermophilus* (grau). Im Falle der Esterase BCC070 wurde der Zellaufschluss zur Adsorption mit 50 mM MES-Puffer auf pH 6 gepuffert, im Falle der Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit 50 mM Acetat-Puffer auf pH 5. Die Elution erfolgte unter Verwendung eines 100 mM Tris-Puffers, pH 9. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

Im Falle der Esterasen wurden weit größere prozentuale Volumenaktivitäten (89-100%) in den Elutionsfraktionen wiedergefunden als im Falle der Lipasen.

#### 4.2.4 Regenerierbarkeit der Materialien

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass Materialien auf der Basis von Kieselsäuren und Tonmineralien eine Eignung zur Aufreinigung von Lipasen und Esterasen zeigen. Es sollte daher untersucht werden, ob die Materialien regenerierbar sind. Zu diesem Zweck wurden die Materialien in vier aufeinanderfolgenden Aufreinigungen eingesetzt. Nach der Elution wurden sie nach dem Protokoll in Kapitel 6.2.1 equilibriert und im Anschluss erneut zur Aufreinigung eingesetzt. Als aufzureinigendes Enzym wurde Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* verwendet. Abbildung 4.9 zeigt exemplarisch das SDS-Page-Gel der vier Adsorptions-, Wasch- und Elutionszyklen für das Material EXM 1908.

In den gelelektrophoretisch untersuchten Adsorptions-, Wasch- und Elutionsfraktionen der vier durchgeführten Aufreinigungen sind keine Unterschiede zu erkennen.



**Abbildung 4.9:** SDS-Page-Gel der vier Adsorptions-, Wasch- und Elutionszyklen der Aufreinigung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit dem Material EXM 1908.

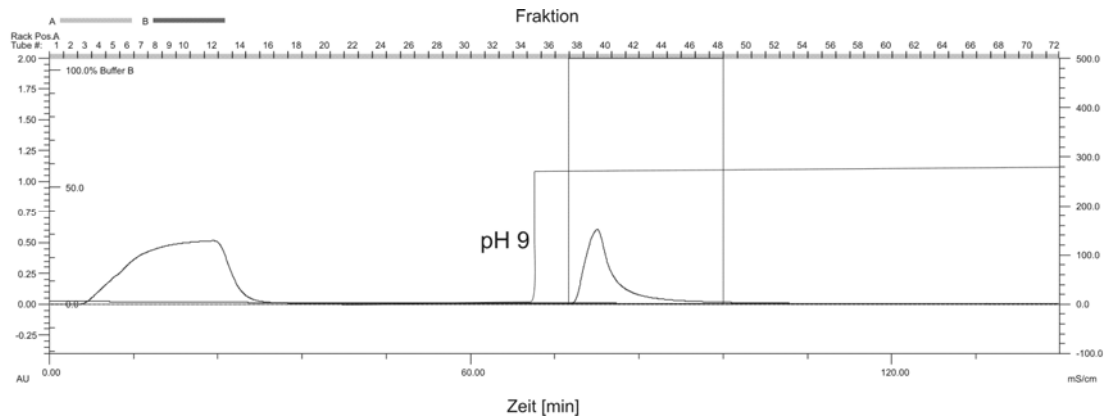
Es wurde daher wiederum jede der durchgeführten Aufreinigungen quantifiziert und die in den Adsorptionsfraktionen adsorbierte Volumenaktivität als Maß für die Adsorptionskapazität bestimmt. Der Wert für die bei der ersten Aufreinigung adsorbierte Volumenaktivität wurde hierbei wiederum 100 % gesetzt und die für die folgenden Aufreinigungen bestimmten Werte prozentual dazu berechnet. Als einziges Material wies das Material EXM 1607 keinerlei Verlust an Adsorptionskapazität und Aufreinigungseffekt in den vier Aufreinigungszyklen auf. Die übrigen Materialien wiesen leichte Verluste an Adsorptionskapazität und Aufreinigungseffekt auf. So fiel im Falle des Materials EXM 1908 der Aufreinigungsfaktor für das Enzym von  $F_A = 5,7$  auf  $F_A = 2,5$  ab. Die adsorbierte Volumenaktivität hatte im vierten Adsorptionsschritt um 16% abgenommen (Daten nicht gezeigt).



#### 4.2.5 Aufreinigung in einem dynamischen Adsorptionssystem

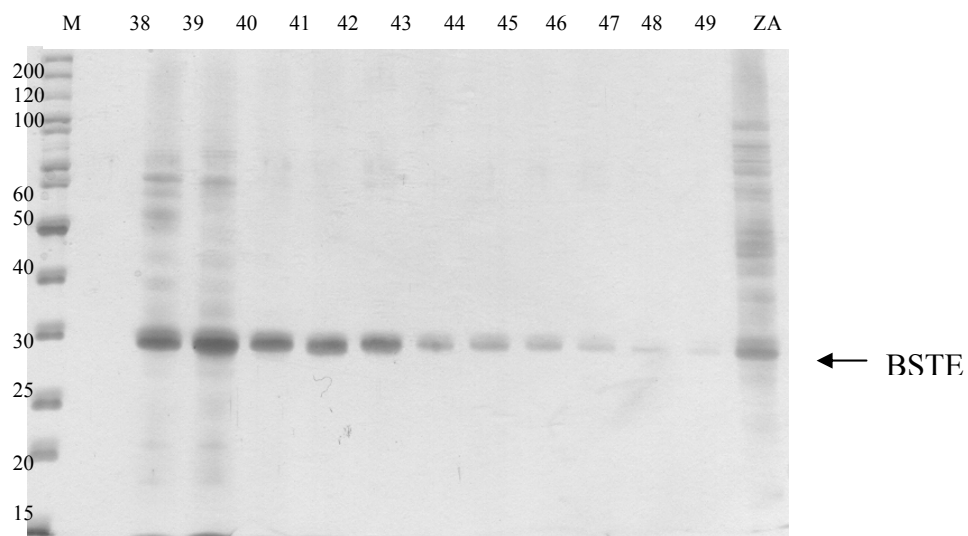
Da die statischen Aufreinigungen zu hohen Aufreinigungseffekten für alle verwendeten Enzyme geführt haben (vgl. Kapitel 4.2.2) wurde auch hier die Möglichkeit untersucht, die Aufreinigungen in ein dynamisches Aufreinigungssystem zu überführen. Da die Aufreinigung der Lipase aGTL mit nur geringen wiedergefundenen Volumenaktivitäten verbunden war, wurde für dieses Enzym auf eine dynamische Aufreinigung verzichtet. Wie in Kapitel 3.3 erläutert, war es nicht möglich, EXM 1607 als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten einzuarbeiten. Anstelle des pulverförmigen Materials EXM 1607 wurde daher das granuliert Material EXMEX 1717 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein natürliches Granulat mit beinahe identischen Eigenschaften wie das Material EXM 1607. Im Falle der in Tabelle 4.2 aufgeführten Materialien EXM 1907 (reine Fällungskieselsäure), EXM 1908 (Fällungskieselsäure/Bentonit 80:20), EXM 1910 (Fällungskieselsäure/Bentonit 50:50), EXM 1911 (Fällungskieselsäure/Bleicherde 50:50) handelt es sich ebenfalls um granuliert Materialien. Wie in Kapitel 3.3 gezeigt, können granuliert Materialien als Packungen in chromatographischen Säulen verwendet werden. Es wurden daher wiederum jeweils 3 g der Materialien in die bereits in Abschnitt 3.2 verwendete Quarzglassäule gefüllt. Das Protokoll zum Befüllen der Säule ist im Anhang (Kapitel 6.2.5) beschrieben. Wie im Falle der statisch durchgeführten Aufreinigungen wurde der Zellaufschluss auf den zur Adsorption verwendeten pH-Wert gepuffert. Die Gesamtproteinkonzentration in dem gepufferten Aufschluss betrug auch hier 0,25-0,33 mg/mL. Im Anschluss wurde mit 50 mL Adsorptionspuffer nicht gebundenes Protein aus der Säule ausgewaschen. Zur Elution hat sich im Falle sämtlicher Enzyme und Materialien ein stufenförmiger pH-Gradient auf pH 9 als geeignet erwiesen. Lineare oder mehrstufige Elutionsgradienten führten zu einer starken Verbreiterung des erhaltenen Elutionspeaks (Daten nicht gezeigt). Sämtliche Schritte wurden bei einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Der Effluent wurde während der gesamten Aufreinigung in Fraktionen von 2 mL aufgefangen. Abbildung 4.10 zeigt exemplarisch das im Falle der Aufreinigung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit dem Material EXMEX 1717 aufgenommene

Chromatogramm. Deutlich ist der Durchbruch nach kompletter Beladung des Säulenmaterials mit Protein zu erkennen. In den Elutionsfraktionen wird das Enzym in einem schmalen Peak eluiert.



**Abbildung 4.10:** Chromatogramm der Aufreinigung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit dem Material EXMEX 1717. Es wurde mit 20 mL verdünntem Zellaufschluss bei pH 5 beladen, danach wurde mit 50 mL Adsorptionspuffer gewaschen und im Anschluss über eine stufenförmige Änderung des pH-Werts auf pH 9 eluiert.

Die markierten Fraktionen (38-48) wurden gelelektrophoretisch mit anschließender Silberfärbung untersucht. Das SDS-Page-Gel ist in Abbildung 4.11 dargestellt.



**Abbildung 4.11:** SDS-Page-Gel der Fraktionen 38-48.

Hier ist ein deutlicher Aufreinigungseffekt gegenüber dem reinen Zellaufschluss zu erkennen (ZA). Auch die dynamischen Aufreinigungen der Enzyme wurden quantifiziert. Zu diesem Zweck wurden die Elutionsfraktionen, in denen das entsprechende Enzym nachzuweisen war (in diesem Fall 38-48), vereinigt und bezüglich der Gesamtproteinkonzentration und Enzymaktivität untersucht. Tabelle 4.3 zeigt die Aufreinigungsfaktoren der dynamischen Aufreinigungen für alle verwendeten Materialien und die drei dynamisch aufgereinigten Enzyme Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis*, Esterase BCC070 und Esterase aus *Bacillus stearothermophilus*.

**Tabelle 4.4:** Dynamische Aufreinigungsfaktoren der Aufreinigungen von Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis*, Esterase BCC070 und Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit den Materialien EXMEX 1717, EXM 1907, EXM 1908, EXM 1910 und EXM 1911. Im Vergleich sind in Klammern die im statischen System bestimmten Aufreinigungsfaktoren angegeben (vgl. Abb. 4.5 und 4.7).

	Lipase aus <i>Thermoanaerobacter tencongensis</i>	Esterase BCC070	Esterase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>
EXMEX 1717 (EXM 1607)	-	2,6 (3,7)	4,2 (7,2)
EXM 1907	2,4 (2,5)	1,8 (3,9)	4,0 (4,3)
EXM 1908	3,0 (3,4)	2,1 (3,6)	3,0 (3,2)
EXM 1910	1,7 (2,7)	2,1 (2,6)	2,6 (3,2)
EXM 1911	1,4 (1,8)	1,5 (1,7)	4,0 (3,8)

Auf die Aufreinigung von Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis* mit dem Material EXMEX 1717 wurde auf Grund der geringen wiedergefundenen Lipaseaktivität nach Aufreinigung mit EXM 1607 verzichtet. Es wird ersichtlich, dass die dynamischen Aufreinigungen nicht zu deutlich schlechteren Aufreinigungsfaktoren führen als die im statischen System durchgeführten. Der relativ hohe Verlust im Falle von EXMEX 1717 ist vermutlich dadurch zu erklären,

dass hier im statischen System, anstelle des pulverförmigen EXM 1607, das granuliert Material EXMEX 1717 verwendet wurde.

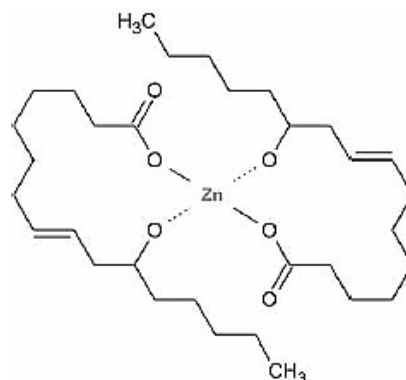
#### **4.2.6 Zusammenfassung**

Da in Kapitel 4.1 eine Eignung des Materials EXM 1607 zur Aufreinigung von Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* festgestellt worden war und es sich hierbei um eine Mischphase aus einem amorphen Kieselgel und einem Montmorillonit handelt, waren weitere Materialien auf der Basis von Kieselsäuren, z.T. als Mischphasen mit Tonmineralien zur Aufreinigung des Enzyms verwendet worden. Alle verwendeten Materialien auf Basis von Kieselsäuren EXM 1907 (reine Fällungskieselsäure), EXM 1908 (Fällungskieselsäure/Bentonit, 80:20), EXM 1910 (Fällungskieselsäure/Bentonit 50:50) und EXM 1911 (Fällungskieselsäure/Bleicherde, 50:50) zeigten eine gute Eignung zur Aufreinigung der Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans*. Die Lipase konnte jeweils bei pH 5 gebunden und durch pH-shift in den leicht basischen pH-Bereich (pH 8-10) von den Materialien eluiert werden. Die Lipase wurde jeweils in reiner Form in den Elutionsfraktionen wiedergefunden.

Die Materialien wurden daher zur Aufreinigung einer weiteren Lipase und zwei Esterasen verwendet. Esterasen sind den Lipasen verwandte Enzyme, weswegen eine Aufreinigung mit den verwendeten Materialien auch hier denkbar schien. Im Falle der Esterasen wurden allgemein höhere Aufreinigungseffekte erzielt als im Falle der aufgereinigten Lipasen. Eine Quantifizierung der Aufreinigungen ergab für die Esterasen Aufreinigungsfaktoren zwischen 2 und 6. Es konnten zwischen 89 und 100% der zuvor adsorbierten Volumenaktivität in den Elutionsfraktionen wiedergefunden. Im Falle der Lipasen konnten Aufreinigungsfaktoren zwischen 1,2 und 3,5 bestimmt werden. Die wiedergefundene Volumenaktivität lag zwischen 19 und 42% der zuvor adsorbierten Volumenaktivität. Bei sämtlichen durchgeführten Aufreinigungen war keine Systematik über den verwendeten Tonmineral-Anteil der Materialien zu erkennen.

### 4.3 Modifizierte Materialien zum Einsatz in der Metallchelatchromatographie

Die immobilisierte Metallchelatchromatographie (IMAC) beruht auf dem Prinzip, dass oberflächengebundene basische Aminosäurereste, vor allem Histidin, spezifisch an freie Koordinationsplätze multivalenter Übergangsmetallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) binden. Bei herkömmlichen IMAC-Materialien ist in der Regel eine metallchelatierende Gruppe, wie Iminodiessigsäure, Nitriloessigsäure oder Tris(carboxymethylen)-Ethylendiamin, am Säulenmaterial immobilisiert. Übergangsmetallionen werden so an die metallchelatierende Gruppe gebunden, dass eine oder mehrere Koordinationsstellen für eine Bindung mit Histidinresten zur Verfügung stehen. Das Einsatzgebiet der Metallchelatchromatographie ist die Aufreinigung rekombinanter Proteine, die mit einem terminalen Polyhistidinrest (His-Tag) versehen wurden [136-138]. Als Alternative zu herkömmlichen IMAC-Materialien wurde im Rahmen dieser Arbeit geträgertes Zinkrizinoleat getestet. Im Falle von Zinkrizinoleat handelt es sich um eine Zinkfettsäure, die in Abbildung 4.12 dargestellt ist [12, 139]. Das Zinkion ist hierbei über Chelatbindungen an die Carbonylgruppen von zwei Rizinoleat-Molekülen koordiniert. Dadurch ergibt sich die gezeigte Ringbindung, die durch die Doppelbindung des Rizinoleat-Moleküls noch begünstigt wird. Die Ringe sind wahrscheinlich flexibel [12]. Das Zink besitzt noch zwei freie Koordinationsstellen. Geträgertes Zinkrizinoleat wurde ursprünglich zur Adsorption belastigender Geruchsstoffe wie Mercaptanen, Aminen und Schwefelwasserstoffen entwickelt. Hierbei erfolgt ein nucleophiler Angriff der Amin- und Thiolgruppen auf das Zinkion. Es bilden sich Koordinationsbindungen die zu einer Adsorption führen [12].



**Abbildung 4.12:** Zinkkrizinoleat als alternatives Medium in der Metallchelatchromatographie, adaptiert nach [12].

Eine solche Bindung ist auch mit Polyhistidinresten oder Thiolgruppen von Proteinen denkbar. Geträgertes Zinkkrizinoleat könnte daher als Material in der Metallchelatchromatographie eingesetzt werden. Zinkkrizinoleat ist ein kostengünstiges Material. In Kombination mit einem preiswerten Trägermaterial könnten die Kosten für Aufreinigungen, die IMAC als Chromatographieschritt enthalten, gesenkt werden. Zum anderen weist Zink keine Toxizität auf [139]. Eine Entsorgung sowie ein Ausbluten von Zink aus der Chromatographiesäule wären somit weniger problematisch als bei der Verwendung  $\text{Co}^{2+}$ - und  $\text{Ni}^{2+}$ -haltiger IMAC-Materialien, die als Humankarzinogene gelten [140]. Die Belegung erfolgt hier in einem Schritt über Physisorption. Die Herstellung ist daher einfacher als im Falle vieler anderer IMAC-Materialien und die Belegung ist für viele Träger denkbar. Als Trägermaterialien wurden EXM 1694 (Süd-Chemie AG, Moosburg), Aluminiumoxid 90, Titandioxid und Kieselgel 60 verwendet. In Vorarbeiten war herausgefunden worden, dass eine prinzipielle Eignung der so erhaltenen Materialien zur Enzymaufreinigung über His-Tage gegeben ist. Als besonders geeignetes Trägermaterial war Aluminiumoxid 90 ermittelt worden. Im Falle der übrigen Trägermaterialien kam es verstärkt zu unspezifischen Proteinadsorptionen, die dazu führten, dass das eluierte Zielprotein Verunreinigungen mit host cell-Proteinen aufwies. Im Rahmen der hier gezeigten Arbeit wurden 5 verschiedene Materialien verwendet. Es handelt sich hier jeweils um Aluminiumoxid 90 mit unterschiedlichen Oberflächenbelegungen an Zinkkrizinoleat von 5, 10, 15, 20 und 30 Gew%.

### 4.3.1 Aufreinigungen in einem statischen System

Die Materialien wurden in statischen Adsorptionsversuchen zur Aufreinigung rekombinanter Enzyme verwendet, die mit einem His-Tag versehen waren. Als Enzyme wurden wiederum die bereits in Abschnitt 4.2 verwendete Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* sowie eine  $\beta$ -Glucanase verwendet. Tabelle 4.5 gibt nochmals einen Überblick über die wichtigsten Eigenschaften der Enzyme.

**Tabelle 4.5:** Zur Aufreinigung über IMAC verwendete Enzyme mit His-Tags.

	Esterase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> (BSTE)	$\beta$ -Glucanase (Bgl)
Molekulargewicht	29	27
Isoelektrischer Punkt	5,2	6,1

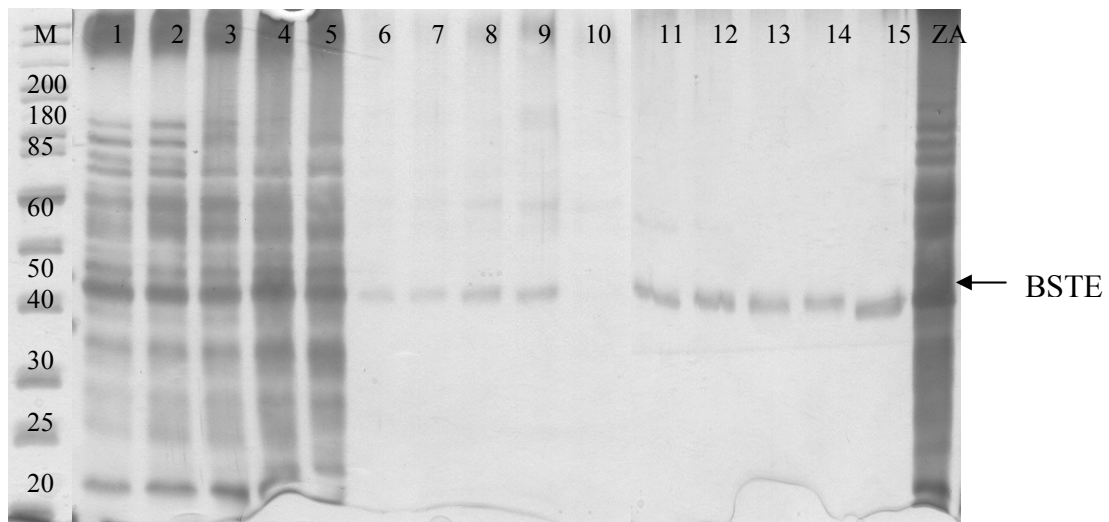
Die Enzyme wurden wiederum durch Schüttelkolbenkultivierungen der entsprechenden Produktionsstämme zur Verfügung gestellt. Zur Produktion der  $\beta$ -Glucanase wurde der rekombinante E.coli Stamm E.coli K 12 JM109 verwendet. Der Stamm wurde freundlicherweise von PD Karl Friehs, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik, Universität Bielefeld, zur Verfügung gestellt. Es wurde der Zellkulturüberstand zur Aufreinigung verwendet. Die Kultivierungsbedingungen sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 6.2.6). Das Vorgehen war analog der in Kapitel 4.2.2 durchgeführten Aufreinigungen. In Vorarbeiten waren bereits die optimalen Bedingungen zur Adsorption und Elution ermittelt worden. Tabelle 4.6 gibt einen Überblick über die optimalen Aufreinigungsbedingungen der mit Zinkrizinoleat beschichteten Materialien.

**Tabelle 4.6:** Übersicht über die als optimal ermittelten Puffersysteme bei der Aufreinigung von Enzymen mit Aluminiumoxid 90, beschichtet mit unterschiedlichen Oberflächenbelegungen an Zinkrizinoleat.

	Verwendetes Puffersystem
Adsorption und Waschen	NaPP (100 mM) pH 8 + 1 M NaCl
Elution	NaPP (50 mM) pH 8 +300 mM NaCl +250 mM Imidazol

Abbildung 4.13 zeigt das SDS-Page-Gel der Adsorptions- (Bahn 1-5), Wasch- (Bahn 6-10) und Elutionsfraktionen (Bahn 11-15) für die Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit den Oberflächenbelegungen von 5-30% Zinkrizinoleat. M kennzeichnet wiederum den aufgetragenen Marker, ZA den unaufgereinigten Zellkulturüberstand, bzw. –aufschluss. Mit steigender Oberflächenbelegung an Zinkrizinoleat sind in den Überständen nach der Adsorption (Bahn 1-5) mehr host cell-Proteine nachzuweisen. Offensichtlich nimmt die unspezifische Adsorption mit steigender Oberflächenbelegung ab. Im Falle aller Materialien konnte die Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* in den Elutionsfraktionen in scheinbar reiner Form nachgewiesen werden. Gleiches wurde für die  $\beta$ -Glucanase gefunden. Das SDS-Page-Gel ist dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 6.1.7). Die Aufreinigungen wurden analog der Aufreinigungen in Kapitel 4.2.2 quantifiziert. Für beide Enzyme wurden die höchsten Aufreinigungseffekte nach Aufreinigung mit einer Oberflächenbelegung von 15% Zn(Ri)<sub>2</sub> gefunden.

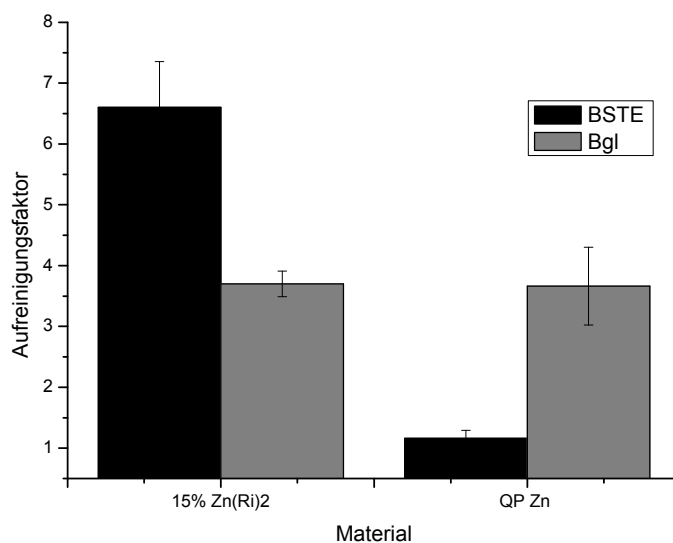




**Abbildung 4.13:** SDS-Page-Gel der Adsorptions- (Bahn 1-5), Wasch- (Bahn 6-10) und Elutionszyklen (Bahn 11-15) der Aufreinigung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit Aluminiumoxid 90 belegt mit 5, 10, 15, 20 und Gew%  $Zn(Ri)_2$  (jeweils von links nach rechts). M kennzeichnet den aufgetragenen Marker, ZA den unaufgereinigten Zellaufschluss.

Abbildung 4.14 zeigt die ermittelten Aufreinigungsfaktoren der Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* und der  $\beta$ -Glucanase nach Aufreinigung mit einer Oberflächenbelegung von 15% Zinkrizinoleat. Im Vergleich sind die Ergebnisse der Aufreinigungen mit einem kommerziellen Material gezeigt, dem Material QuadraPure<sup>TM</sup> mit Zink, bezogen über Sigma Aldrich.

Im Falle der  $\beta$ -Glucanase konnte unter Verwendung des geträgerten Zinkrizinoleats ein ebenso hoher Aufreinigungseffekt wie im Falle des kommerziellen Materials erzielt werden. Im Falle der Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* wurde mit einer Oberflächenbelegung von 15% Zinkrizinoleat ein Aufreinigungseffekt von 6,6 erzielt. Mit dem kommerziellen Material QuadraPure<sup>TM</sup> Zink wurde lediglich ein Aufreinigungsfaktor von 1,2 erzielt. Im Falle aller Aufreinigungen wurde die gesamte zuvor adsorbierte Volumenaktivität der Enzyme in den Elutionsfraktionen wiedergefunden (Daten nicht gezeigt).

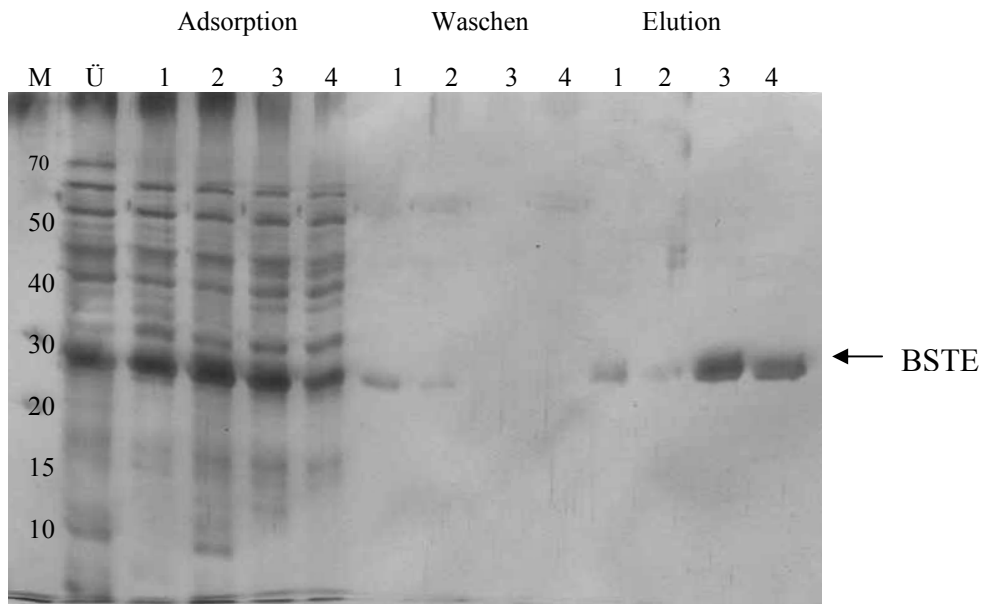


**Abbildung 4.14:** Aufreinigungsfaktoren der Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* (schwarz) und der  $\beta$ -Glucanase (grau) nach Aufreinigung mit Aluminiumoxid 90, belegt mit 15% Zn(Ri)<sub>2</sub>. Zur Adsorption wurde der aufzureinigende Zellaufschluss mit 100 mM NaPP, pH 8+ 1 M NaCl gepuffert. Die Elution erfolgte unter Verwendung eines 50 mM NaPP-Puffers, pH 8+ 300 mM NaCl+ 250 mM Imidazol. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

### 4.3.2 Regenerierbarkeit der Materialien

Die Materialien mit Oberflächenbelegungen von 5% und 30% wurden analog der in Kapitel 4.2 verwendeten Materialien auf ihre Regenerierbarkeit in mehreren aufeinanderfolgenden Aufreinigungszyklen untersucht. Es wurde hierbei analog zu Kapitel 4.2.4 vorgegangen und die Materialien in vier aufeinanderfolgenden Aufreinigungen der Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* eingesetzt. Abbildung 4.15 zeigt exemplarisch das SDS-Page-Gel für die Adsorptions-, Wasch- und Elutionsfraktionen der vier Aufreinigungen mit einer Oberflächenbelegung von 30%. Auch hier wurde wiederum der Aufreinigungsfaktor der vier Aufreinigungen und die Menge an adsorbierter Volumenaktivität als Maß für die Adsorptionskapazität bestimmt. Für die Oberflächenbelegung von 30% Zn(Ri)<sub>2</sub> konnten alle vier Aufreinigungen ohne Verlust an Aufreinigungseffekt und Adsorptionskapazität durchgeführt werden. Bei einer Oberflächenbelegung von 5%

Zn(Ri)<sub>2</sub> ging bei jedem Aufreinigungsschritt Adsorptionskapazität verloren. Im letzten Aufreinigungsschritt fand schließlich keine Adsorption der Esterase mehr statt (Daten nicht gezeigt).

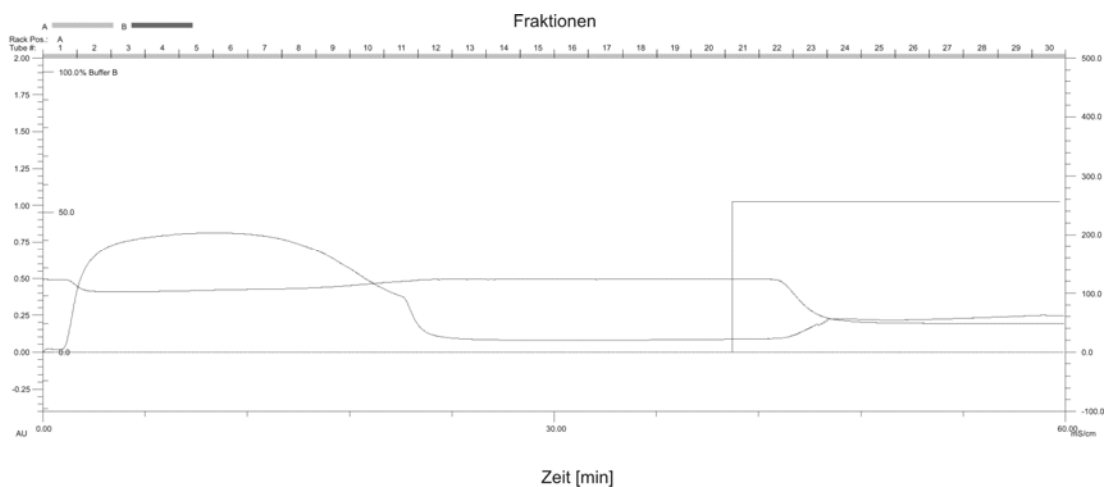


**Abbildung 4.15:** SDS-Page-Gel der vier Adsorptions-, Wasch- und Elutionszyklen der Aufreinigung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit Aluminiumoxid 90, belegt mit 30% Zn(Ri)<sub>2</sub>.

### 4.3.3 Dynamische Aufreinigungen

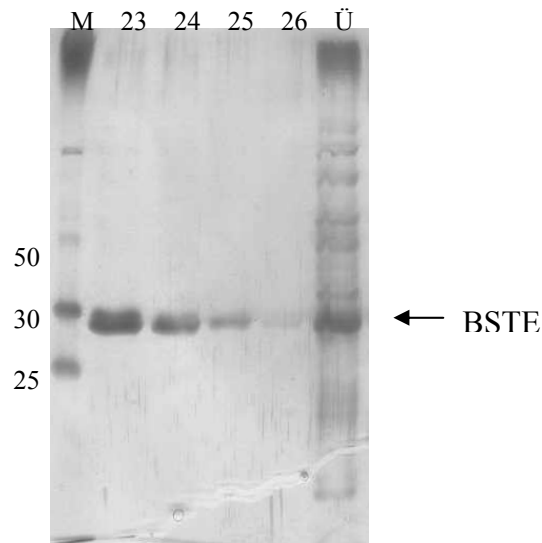
Bei den Materialien handelt es sich um Pulver. Es war dennoch möglich, analog zu Kapitel 3.2 jeweils 3 g in die verwendete Quarzglassäule zu füllen und an eine chromatographische Anlage anzuschließen. Es wurde wiederum mit 20 mL des gepufferten Zellaufschlusses bzw. -überstands beladen. Im Anschluss wurde mit 20 mL Adsorptionspuffer gewaschen und mit 20 mL Elutionspuffer eluiert. Die Flußrate betrug für alle Schritte 1 mL/min. Hierbei hat sich wiederum ein stufenförmiger Elutionsgradient als geeignet erwiesen. Mehrstufige und graduelle Elutionsgradienten führten auch hier zu einer Verbreiterung des Elutionspeaks (Daten nicht gezeigt). Abbildung 4.16 zeigt exemplarisch das während der

Aufreinigung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit 15% Zinkkrizinoleat aufgenommene Chromatogramm. Deutlich ist der Durchbruch nach vollständiger Beladung des Materials zu erkennen. Es ist kein klarer Elutionspeak zu sehen, wie im Falle der Lipase- und Esteraseaufreinigungen in Kapitel 4.2 beobachtet. Imidazol absorbiert Strahlung im ultravioletten Bereich. Dadurch wird der UV-photometrische Proteinnachweis gestört [141, 142].



**Abbildung 4.16:** Chromatogramm der Aufreinigung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit Aluminiumoxid 90 mit 15%  $Zn(Ri)_2$  belegt. Es wurde mit 20 mL gepuffertem Zellaufschluss beladen, im Anschluss wurde mit 20 mL Adsorptionpuffer gewaschen und im Anschluss über eine stufenförmige Änderung des pH-Werts eluiert.

Es wurden sämtliche Elutionsfraktionen gelelektrophoretisch mit anschließender Silberfärbung untersucht. Die Esterase war jedoch nur in den Fraktionen 23-25 nachzuweisen. Abbildung 4.16 zeigt das SDS-Page-Gel der Fraktionen. In den übrigen Fraktionen wurden keine Proteine gefunden.



**Abbildung 4.16:** SDS-Page-Gel der Fraktionen 23-26.

Für die  $\beta$ -Glucanase hat sich ein linearer Elutionsgradient als geeignet erwiesen. Im Falle einer stufenförmigen Änderung auf den Elutionspuffer wurde das Enzym stark verunreinigt in den Elutionsfraktionen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die dynamischen Aufreinigungen der beiden Enzyme wurden für alle verwendeten Materialien analog zu Abschnitt 4.2 quantifiziert. Tabelle 4.7 zeigt die Ergebnisse.

**Tabelle 4.7:** Dynamische Aufreinigungsfaktoren der Aufreinigungen von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit Aluminiumoxid 90, belegt mit 5, 10, 15, 20 und 30 Gew%  $Zn(Ri)_2$ . Im Vergleich sind in Klammern die im statischen System bestimmten Aufreinigungsfaktoren angegeben (vgl. Abb. 4.15 und 4.17).

	Esterase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>	$\beta$ -Glucanase
5% $Zn(Ri)_2$	2,0 (2,9)	2,0 (1,9)
10% $Zn(Ri)_2$	4,2 (3,4)	1,9 (2,3)
15% $Zn(Ri)_2$	6,1 (6,6)	2,9 (3,7)
20% $Zn(Ri)_2$	1,9 (2,2)	2,8 (2,4)
30% $Zn(Ri)_2$	2,5 (3,2)	1,3 (1,7)

Zum Vergleich sind in Klammern die im statischen Adsorptionssystem ermittelten Werte angegeben. Auch hier sind die erzielten Aufreinigungseffekte im statischen System nur unwesentlich schlechter als die in Kapitel 4.3.1 in einem statischen Adsorptionssystem ermittelten. Die Materialien sind als Chromatographiematerialien zur Aufreinigung von Enzymen mit His-Tags geeignet.

#### **4.3.4 Zusammenfassung**

In diesem Abschnitt wurde Zinkrizinoleat als alternatives Medium zur Verwendung in der Metallchelatchromatographie verwendet. Die Zinkfettsäure war auf verschiedene Trägermaterialien aufgebracht. Als besonders geeignetes Material war Aluminiumoxid 90 identifiziert worden. Verschiedene Oberflächenbelegungen von 5-30 Gew% an Zinkrizinoleat wurden auf ihre Eignung von zwei Enzymen aus Zellkulturüberständen und Zellaufschlüssen getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass eine Oberflächenbelegung von 15%  $Zn(Ri)_2$  in beiden Fällen zu den höchsten Aufreinigungseffekten geführt hat. So konnte die Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* um einen Faktor von 6,6 aufgereinigt werden, die  $\beta$ -Glucanase um einen Faktor von 3,7. Die Materialien sind teilweise regenerierbar und können als Säulenpackungen in chromatographischen Säulen eingesetzt werden. Die Aufreinigungseffekte in einem dynamischen Adsorptionssystem sind nicht deutlich schlechter als in einem statischen Adsorptionssystem.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene smektitische Tonminerale, Hydrotalcite und Materialien auf der Basis von Aluminiumoxiden und -hydroxiden auf ihre Eignung in Enzymaufreinigungsprozessen getestet. Eine eingehende Charakterisierung der verwendeten Tonminerale und des Hydrotalcits Syntal 696 hat bereits in vorhergehenden Arbeiten stattgefunden. Es wurden daher nur die wichtigsten Eigenschaften vorgestellt. Das Ziel war eine Charakterisierung adaptionsfähiger Chromatographiematerialien, die als Alternativen zu herkömmlichen Chromatographiematerialien die bei der Aufarbeitung von Enzymen einsetzbar sind. Es fand zunächst eine Charakterisierung der Eigenschaften im statischen Modellsystem statt. Die Materialien konnten auf verschiedenen Wegen in ein dynamisches Modellsystem überführt werden. Im zweiten Teil wurden die Materialien auf ihre Eignung in realen Aufreinigungsprozessen getestet. Ausgehend von den gewonnenen Ergebnissen wurden die Materialien modifiziert. Zudem wurden oberflächenmodifizierte Materialien eingesetzt. Durch Oberflächenmodifizierungen sollte eine Anwendung in weiteren speziellen Aufreinigungsbereichen erschlossen werden. Es wurden Materialien mit verschiedenen Oberflächenbelegungen an Zinkrizinoleat verwendet. In dieser Form sollte eine Untersuchung auf die Eignung als alternative Medien in der immobilisierten Metallchelatchromatographie stattfinden.

### Enzymadsorption im Modellsystem

Zwei smektitische Tonminerale, zwei Hydrotalcite und vier Materialien auf Basis von Aluminiumoxiden und -hydroxiden wurden bezüglich ihres Adsorptionsverhaltens gegenüber Modellenzymen untersucht. Das Tonmineral EXM 1607 ist bereits als geeigneter Kationenaustauscher in Proteinaufreinigungsprozessen charakterisiert worden [3, 68, 94]. Das Material weist permanente negative Oberflächenladungen auf, besitzt eine hohe spezifische Oberfläche und Adsorptionskapazitäten für Proteine. In pH-abhängigen Adsorptionsversuchen konnte die getroffene Annahme bestätigt und ein

Kationenaustauschverhalten für die verwendeten Modellenzyme gefunden werden. So weist das Material im sauren pH-Bereich hohe Adsorptionskapazitäten für die Modellenzyme auf, die bei pH-Werten oberhalb der isoelektrischen Punkte der Enzyme stark abnehmen. Es scheint aber zusätzlich zu alternativen Wechselwirkungen zwischen den Enzymen und der Oberfläche des Materials zu kommen. Hierfür wurden hydrophobe und Wasserstoffbrückenbindungen angenommen. Das niedrig geladene Tonmineral EXM 1694 wies keine oder lediglich leichte pH-Abhängigkeiten in den Adsorptionskapazitäten von Modellenzymen auf. Die Adsorption an dieses Material wird hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen verursacht, weswegen eine Eignung als hydrophobes Chromatographiemedium möglich scheint. Der Hydrotalcit Syntal 696 weist gemäß seiner positiven Oberflächenladung zum Teil ein Anionenaustauschverhalten auf. Das Verhalten scheint zum Teil jedoch auch durch alternative Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen beeinflusst zu werden. Es wurde ein weiterer Hydrotalcit mit höherer Oberflächenladung getestet, das Material EXM 1994. Auch dieser Hydrotalcit wies kein ausgeprägteres Anionenaustauschverhalten auf, so dass er im Laufe der Arbeit nicht weiter verwendet wurde. Desweiteren wurden vier Materialien auf Basis von Aluminiumoxiden und -hydroxiden getestet. Das Aluminiumsilikat Siral<sup>®</sup> 40 besitzt eine permanente negative Oberflächenladung, weshalb im Vorfeld eine Eignung des Materials als Kationentauscher angenommen worden war. Tatsächlich wies das Material in pH-abhängigen Adsorptionsversuchen ein Verhalten auf, das sich durch einen Kationenaustauschmechanismus beschreiben lässt. Auch hier wurden im sauren pH-Bereich hohe Adsorptionskapazitäten für Modellenzyme gefunden, oberhalb der isoelektrischen Punkte hingegen nur geringe Adsorptionskapazitäten. Auch hier scheinen zusätzlich alternative Wechselwirkungen aufzutreten. Das Übergangsaluminiumoxid Puralox<sup>®</sup> KR 160 und der Pseudoböhmit Pural<sup>®</sup> SB weisen pH-abhängige Oberflächenladungen auf. Sie besitzen einen isoelektrischen Punkt von 9 und liegen dementsprechend im sauren und neutralen pH-Bereich in kationischer Form vor. Im Vorfeld war daher eine Eignung als Anionentauscher analog zu den Hydrotalciten angenommen worden. Die Materialien zeigten in pH-abhängigen Adsorptionsversuchen ein stark



vom pH-Wert abhängiges Verhalten. Das Verhalten wird jedoch über eine Vielzahl von Wechselwirkungen beeinflusst und ist nur schwer vorherzusagen. Als besonders geeignet in Enzymaufreinigungsprozessen wurden die Materialien auf Basis von  $\gamma$ -Aluminiumoxid, Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40 bewertet. Die Materialien wiesen hohe Adsorptionskapazitäten für Enzyme auf. Die beiden Materialien wurden daher eingehender charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass sie schnelle Bindungskinetiken aufweisen, die im Bereich eines kommerziellen Materials einzuordnen sind. Auch wiesen sie im Gegensatz zu kommerziellen Ionenaustauschern eine nur geringe Abhängigkeit von der Ionenstärke auf. Dieses Verhalten kann bei der Anwendung zur Enzymaufreinigung aus Realmedien von Vorteil sein, da diese häufig relativ hohe Ionenstärken aufweisen.

Im Falle aller Materialien war die Adsorption reversibel. Von den Tonmineralien konnten die Modellenzyme durch pH-Shift in den stark basischen Bereich eluiert werden. Geringere Wiederfindungsraten wurden durch pH-Shift in den schwächer basischen Bereich gefunden, auch nach Zusatz weiterer Additive. Von dem Material EXM 1607 konnten die Enzyme auch durch ammoniumchloridhaltige Elutionspuffer desorbiert werden. Von dem Hydrotalcit konnten die Enzyme nur durch Zerstörung der Hydrotalcitstruktur desorbiert werden. Nach der Desorption hatten die Enzyme einen großen Teil ihrer Aktivität verloren. Vermutlich sind sehr starke elektrostatische Wechselwirkungen mit den Materialien für den Aktivitätsverlust verantwortlich.

Im Falle der Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) und Siral<sup>®</sup> 40 (Aluminiumsilikat) konnten die Enzyme durch pH-Shift in den stark basischen pH-Bereich und durch Zusatz komplexierender Additive wie EDTA und Natriumcarbonat desorbiert werden. Die Modellenzyme konnten ohne Verlust an biologischer Aktivität eluiert werden.

Für den Übergang in ein dynamisches Adsorptionssystem konnte gezeigt werden, dass die Materialien in granulierter Form prinzipiell eine gute Eignung als Chromatographiematerialien in chromatographischen Säulen zeigen. So wurden nur geringe Säulenvordrücke gefunden und die Materialien sind in mehreren aufeinanderfolgenden Adsorptionszyklen regenerierbar. Problematisch ist allerdings ein hoher Verlust an Adsorptionskapazität verglichen mit den

Adsorptionskapazitäten der pulverförmigen Materialien in einem statischen Adsorptionssystem. Das Einarbeiten der Materialien als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten führte zu weit höheren Adsorptionskapazitäten, die im Bereich der Kapazitäten der pulverförmigen Materialien lagen, die in chromatographische Säulen gepackt worden waren. Es war jedoch nicht möglich, Tiefenfilterschichten unter Verwendung von EXM 1607 als Hilfsmittel herzustellen. Die Gründe hierfür werden derzeit noch untersucht.

### **Enzymaufreinigung aus Zellkulturüberständen und -aufschlüssen**

Die charakterisierten Materialien wurden auf ihre Eignung in realen Prozessen zur Aufreinigung von Enzymen aus Zellkulturüberständen und Zellaufschlüssen untersucht. Im Falle der Tonmineralien und des Hydrotalcits wurde zwar ein pH-abhängiges Adsorptionsverhalten der Enzyme an die Materialien gefunden, wie es nach der Charakterisierung im Modellsystem zu erwarten war, die Elution war jedoch erschwert. Die Enzyme konnten nur unter extremen Bedingungen wiedergefunden werden. Hier fand jedoch ebenfalls eine Elution der adsorbierten host cell-Proteine statt. Ein hoher Aufreinigungseffekt wurde jedoch für Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* mit dem Material EXM 1607 gefunden. Das Enzym konnte bereits im leicht basischen pH-Bereich selektiv von dem Material eluiert werden. Hierfür wurde eine Kombination aus hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen verantwortlich gemacht. EXM 1607 ist eine Mischphase aus einem Montmorillonit und einem amorphen Kieselgel. Kieselsäurebasierte Materialien weisen hohe Affinitäten zu Lipasen auf und sind ein häufig verwendetes Trägermaterial in Immobilisierungsprozessen [6-10]. Die Materialien auf Basis von  $\gamma$ -Aluminiumoxid zeigten eine Eignung zur Aufreinigung von PenicillinG-Amidase. Auch hier war das Verhalten jedoch nur schwer vorherzusagen. Die Bedingungen müssen jeweils im Vorfeld der Aufreinigung ermittelt werden.

Es wurden weitere modifizierte Materialien zur Aufreinigung von Lipasen verwendet. Das Material EXM 1607 hatte einen hohen Aufreinigungseffekt für Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* gezeigt. Es wurden daher zusätzliche Materialien auf Basis von Fällungskieselsäuren verwendet. Diese lagen zum Teil

als Mischphasen mit Bentoniten und Bleicherden in verschiedenen Zusammensetzungen vor. Es wurde sichtbar, dass diese Materialien sowohl im statischen als auch im dynamischen System hohe Aufreinigungseffekte für Lipasen und Esterasen zeigten. So konnten in einem Schritt höhere Aufreinigungseffekte als für kommerzielle Materialien gefunden werden.

Zur Aufreinigung von Enzymen mit His-Tags wurden mit Zinkrizinoleat belegte Trägermaterialien getestet. Da Zinkrizinoleat nicht toxisch und zudem sehr preisgünstig ist, ist ein Einsatz als Alternative zu herkömmlichen Metallchelatchromatographiematerialien denkbar. Als geeignetes Trägermaterial hat sich Aluminiumoxid 90 herausgestellt. Die höchsten Aufreinigungseffekte wurden bei einer Oberflächenbelegung mit 15% Zinkrizinoleat gefunden. Die Materialien sind teilweise regenerierbar. Obwohl es sich bei den Materialien um Pulver handelt, konnten die Materialien in chromatographischen Säulen im dynamischen Betrieb eingesetzt werden und zeigten auch hier hohe Aufreinigungseffekte für die verwendeten Enzyme.

### **Ausblick**

In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit sich die erhaltenen Tiefenfilterschichten in Realprozessen einsetzen lassen. Sie könnten hier als kombinierte Filtrations-/ Aufreinigungsmodule zur direkten Aufreinigung der Zellkulturbrühe eingesetzt werden. Zudem müsste ein Scale-up zunächst in den Technikumsmaßstab stattfinden. Da die Materialien hohe Adsorptionskapazitäten für Enzyme aus Zellkulturbrühen gezeigt haben, die Elution jedoch erschwert ist, ist ein Einsatz als Trägermaterialien zur Enzymimmobilisierung denkbar. So könnten Enzyme in Tiefenfilterschichten mit dem entsprechenden Material als Filterhilfsmittel immobilisiert werden und so unmittelbar im Prozess eingesetzt werden.

Die Materialien könnten weiter oberflächenmodifiziert werden, wodurch weitere funktionelle Gruppen, analog dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zinkrizinoleat, eingeführt werden können. Auch diese Materialien könnten wiederum als Filterhilfsmittel in Tiefenfilterschichten Verwendung finden und die

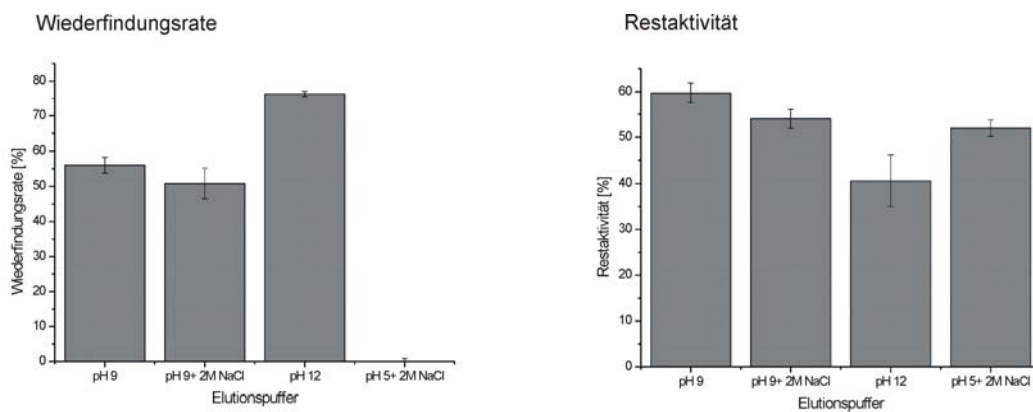
entsprechende Modifikation somit direkt in dem entsprechenden Prozess zum Einsatz kommen.

## 6 Anhang

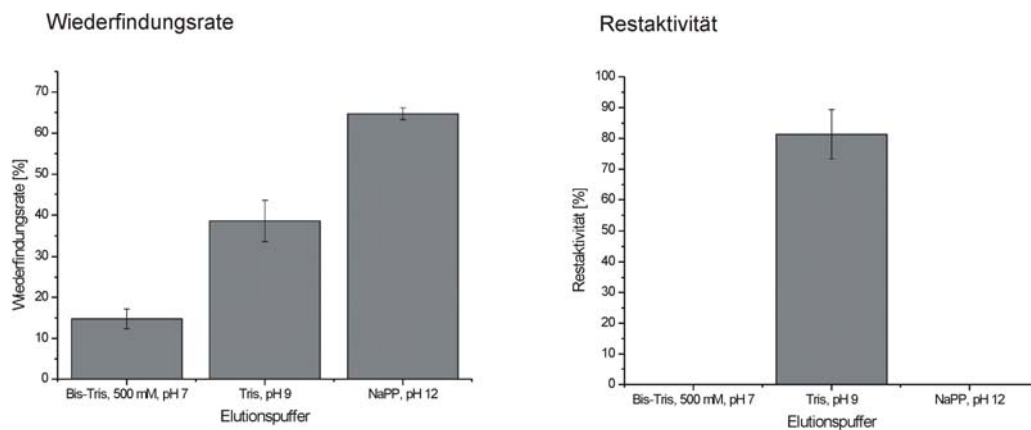
### 6.1 Ergänzende Daten

#### 6.1.1 Elution im statischen System von PenicillinG-Amidase

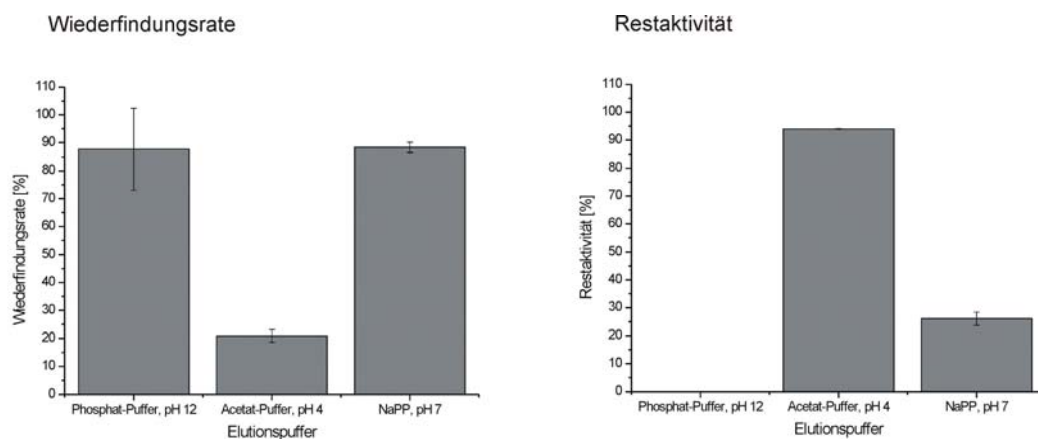
Die Abbildungen 6.1 bis 6.4 zeigen die Ergebnisse statischer Elutionsversuche unter Verwendung von PenicillinG-Amidase als Ergänzung zu Kapitel 3.2. Die Adsorption erfolgte im Falle der Tonmineralien EXM 1607 und EXM 1694 in 50 mM Acetat-Puffer, pH 5 und im Falle der übrigen Materialien in 50 mM MES-Puffer, pH 7.



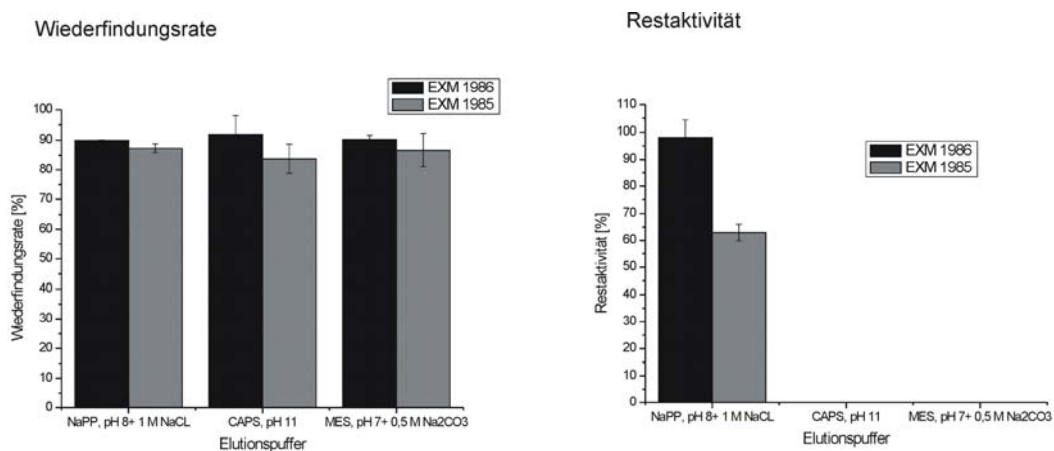
**Abbildung 6.1:** Wiederfindungsraten (links) und Restaktivitäten (rechts) von PenicillinG-Amidase an dem Material EXM 1607.



**Abbildung 6.2:** Wiederfindungsraten (links) und Restaktivitäten (rechts) von PenicillinG-Amidase an dem Material EXM 1694.



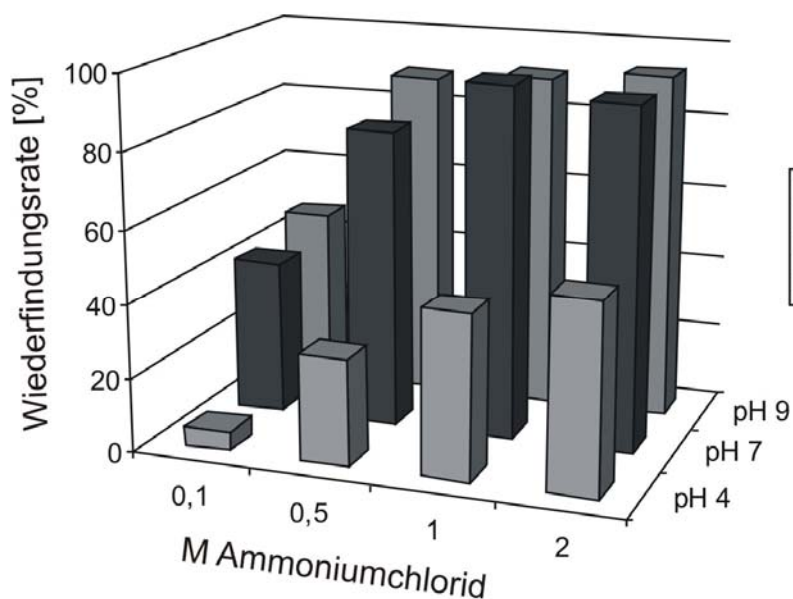
**Abbildung 6.3:** Wiederfindungsraten (links) und Restaktivitäten (links) von PenicillinG-Amidase an dem Material Syntal 696.



**Abbildung 6.4:** Wiederfindungsraten (links) und Restaktivitäten (rechts) von PenicillinG-Amidase an den Materialien Puralox<sup>®</sup> KR 160 und Siral<sup>®</sup> 40.

### 6.1.2 Elution im statischen System unter Verwendung ammoniumchloridhaltiger Elutionspuffer

Abbildung 6.5 zeigt die prozentual desorbierte Menge von  $\alpha$ -Chymotrypsin von dem Material EXM 1607 unter Verwendung verschiedener ammoniumchloridhaltiger Elutionspuffer als Ergänzung zu Abschnitt 3.2.1. Adsorbiert wurde unter Verwendung eines 50 mM Acetat-Puffers mit einem pH-Wert von 4. Zur Elution wurden einem Acetat-Puffer (pH 4), einem MES-Puffer (pH 7) und einem Tris-Puffer (pH 9) verschiedene Molaritäten an Ammoniumchlorid von 0,1 M, 0,5 M, 1 M und 2 M zugesetzt.



**Abbildung 6.5:** Prozentuale Desorption von  $\alpha$ -Chymotrypsin an dem Tonmineral EXM 1607. Adsorbiert wurde in 50 mM Acetat-Puffer, pH 4. Zur Desorption wurden 100 mM des entsprechenden Puffers verwendet. Mit Ammoniumchlorid wurden Molaritäten von 0,1; 0,5; 1 und 2 M eingestellt. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung).

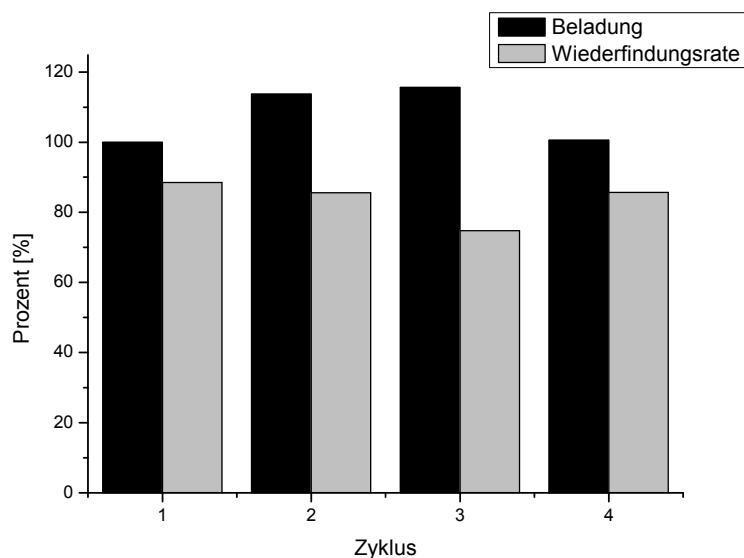
Die nach der Elution bestimmten Restaktivitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin sind in Tabelle 6.1 dargestellt.

**Tabelle 6.1:** Restaktivitäten von  $\alpha$ -Chymotrypsin nach Elution von den Tonmineralien EXM 1607. Die Aktivität wurde prozentual zu der spezifischen Aktivität der nativen, zur Adsorption verwendeten Enzymlösung bestimmt. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung).

	pH 4	pH 7	pH 9
0,1 M	32,0	27,6	30,4
0,5 M	88,7	77,1	73,5
1 M	98,5	73,9	73,3
2 M	89,1	77,8	74,5

### 6.1.3 Regenerationsfähigkeit des Granulats EXM 2073

Abbildung 6.6 zeigt die Adsorptionskapazitäten und Wiederfindungsraten von  $\alpha$ -Chymotrypsin in vier aufeinanderfolgenden Adsorptionszyklen an dem Material EXM 2073 als Ergänzung der Daten in Abschnitt 3.3.3.

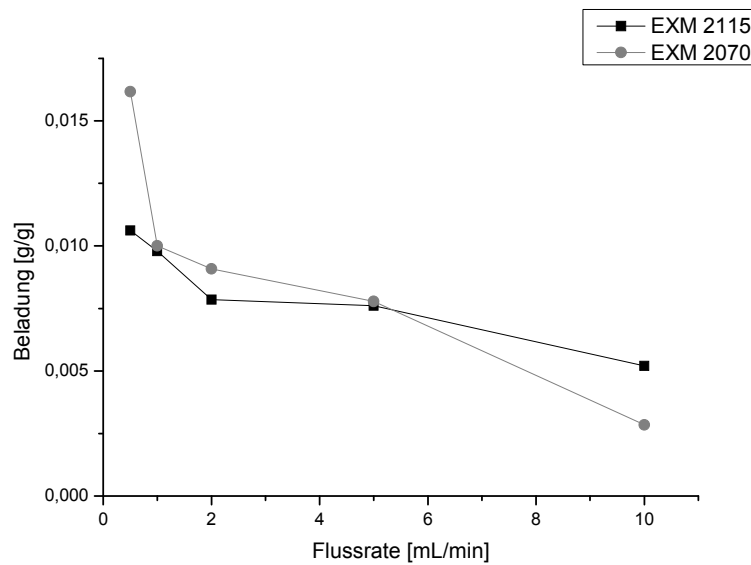


**Abbildung 6.6:** Prozentuale Beladung und Wiederfindungsraten von  $\alpha$ -Chymotrypsin an den Materialien EXM 2073. Die Beladung der ersten Adsorption wurde hier jeweils als 100% gesetzt.



#### 6.1.4 Dynamische Beladungskapazitäten des modifizierten Granulats EXM 2115 mit $\alpha$ -Chymotrypsin

Abbildung 6.7 zeigt die Beladungskapazität des modifizierten Granulats EXM 2115 mit  $\alpha$ -Chymotrypsin als Funktion der Flussrate als Ergänzung zu Abschnitt 3.3.4. Als Vergleich sind die Beladungskapazitäten des Materials EXM 2070 dargestellt.

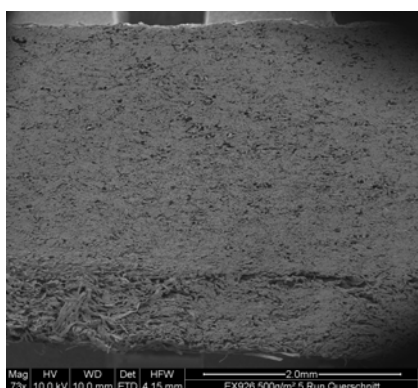


**Abbildung 6.7:** Dynamische Adsorptionskapazitäten von Chymotrypsin an das Granulat EXM 2070 und das modifizierte Granulat EXM 2115 in Abhängigkeit von der verwendeten Flussrate.

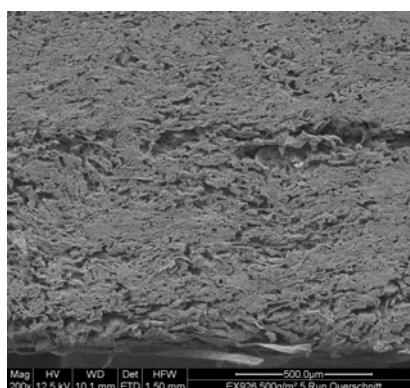
### 6.1.5 REM-Aufnahmen weiterer Tiefenfilterschichten

Die Abbildungen 6.8 und 6.9 zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Tiefenfilterschichten mit EXM 1694 und Puralox<sup>®</sup> KR 160 jeweils in 70- und 200-facher Vergrößerung als Ergänzung der Daten in Abschnitt 3.4.1.

70-fache Vergrößerung

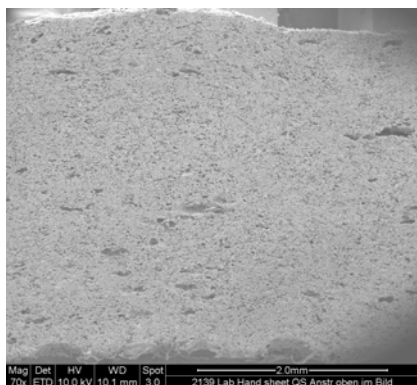


200-fache Vergrößerung

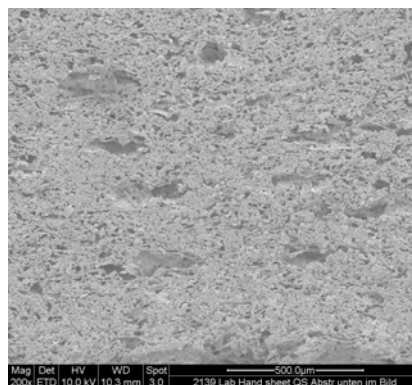


**Abbildung 6.8:** REM-Aufnahmen der Tiefenfilterschicht mit EXM 1694 als Filterhilfsmittel.

70-fache Vergrößerung

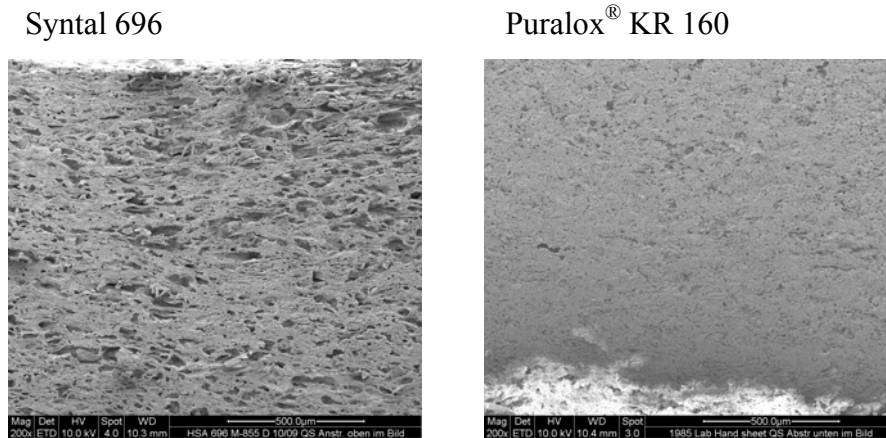


200-fache Vergrößerung



**Abbildung 6.9:** REM-Aufnahmen der Tiefenfilterschicht mit Puralox<sup>®</sup> KR 160 als Filterhilfsmittel.

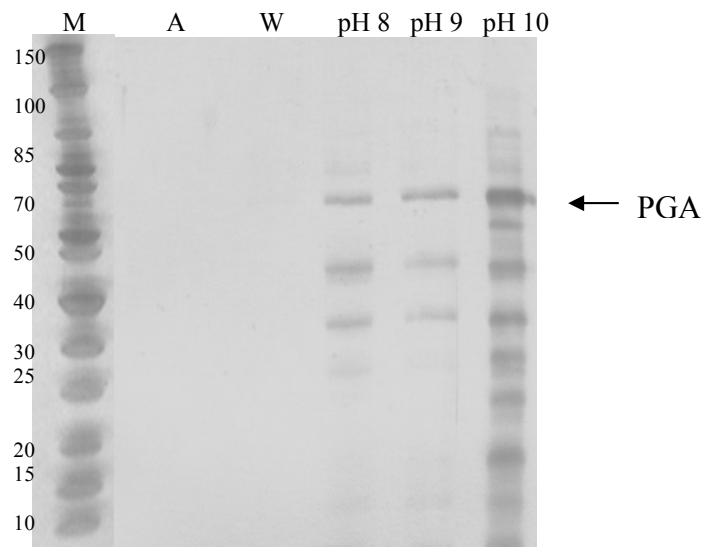
Abbildung 6.10 zeigt die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Tiefenfilterschichten mit Syntal 696 und Siral<sup>®</sup> 40 jeweils in 200-facher Vergrößerung.



**Abbildung 6.10:** REM-Aufnahmen der Tiefenfilterschichten mit Syntal 696 und Siral<sup>®</sup> 40 als Filterhilfsmittel.

### 6.1.6 Aufreinigung von PenicillinG-Amidase mit Siral<sup>®</sup> 40

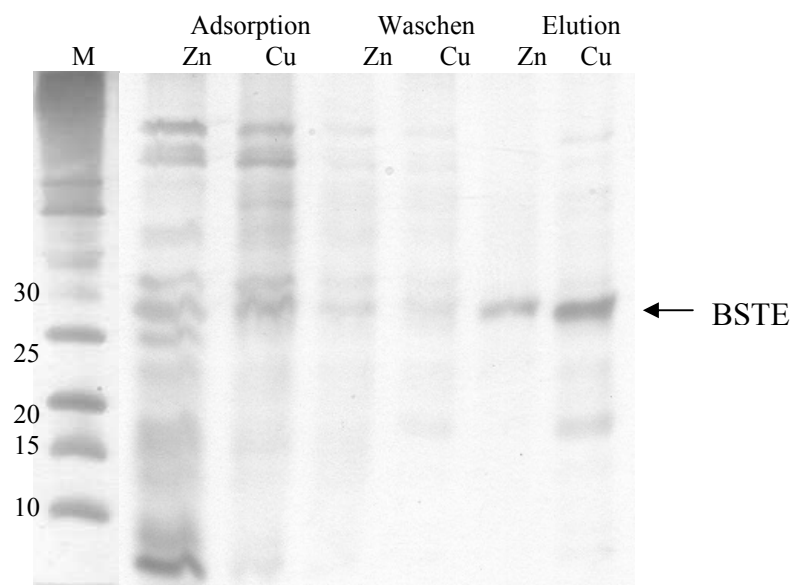
Abbildung 6.11 zeigt die Adsorptions-, Wasch-, und Elutionsfraktionen der Aufreinigung von PenicillinG-Amidase mit Siral<sup>®</sup> 40 als Ergänzung der Daten in Abschnitt 4.1.3.



**Abbildung 6.11:** SDS-Page-Gel der Adsorptionsfraktionen des gepufferten Zellkulturüberstands von PenicillinG-Amidase an das Material Siral<sup>®</sup> 40 bei pH 5 (A), der Waschfraktion (W) und der Elutionsfraktionen bei pH 8-10.

### 6.1.7 Aufreinigung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit QuadraPure™ mit Kupfer und Zink

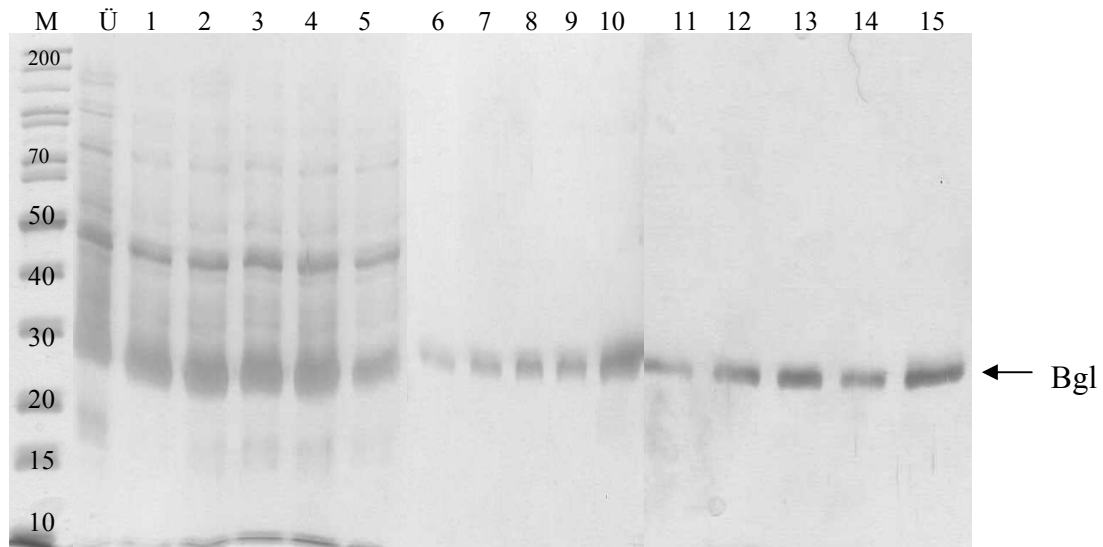
Abbildung 6.12 zeigt die Adsorptions-, Wasch- und Elutionsfraktionen der Aufreinigung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit QuadraPure™ mit Kupfer und Zink als Ergänzung der Daten in Abschnitt 4.3.1.



**Abbildung 6.12:** SDS-Page-Gel der Adsorptions-, Wasch- und Elutionszyklen der Aufreinigung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* mit dem kommerziellen Metallchelatmedium QuadraPure™ mit Kupfer und Zink.

### 6.1.8 Aufreinigung von $\beta$ -Glucanase über geträgertes Zinkkrizinoleat

Abbildung 6.13 zeigt das SDS-Page-Gel der Überstände nach Adsorptions- (Bahn 1-5), Wasch- ( Bahn 6-10) und Elutionsschritten (Bahn 11-15) der Aufreinigung von  $\beta$ -Glucanase mit den verschiedenen Belegungen an Zinkkrizinoleat. M kennzeichnet wiederum den aufgegebenen Marker und Ü den unaufgereinigten Zellkulturüberstand als Ergänzung der Daten in Abschnitt 4.3.1.



**Abbildung 6.13:** SDS-Page-Gel Adsorptions- (Bahn 1-5), Wasch- (Bahn 6-10) und Elutionszyklen (Bahn 11-15) der Aufreinigung von  $\beta$ -Glucanase mit Aluminiumoxid 90 belegt mit 5, 10, 15, 20 und Gew%  $Zn(Ri)_2$  (jeweils von links nach rechts). M kennzeichnet den aufgetragenen Marker, Ü den unaufgereinigten Zellkulturüberstand.

## 6.2 Versuchsdurchführungen

### 6.2.1 pH-Wert-abhängige Enzymadsorption

Es wurden jeweils 25 mg des entsprechenden Adsorbens in 15 mL Falcon-Tubes eingewogen. Zur Equilibrierung gegen den entsprechenden pH-Wert wurde das Material in 5 mL des entsprechenden Puffer (100 mM) suspendiert und für eine Stunde in einem Überkopfschüttler bei 15 rpm behandelt. Nach Zentrifugation (10 min, 4000·g) wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Von dem verwendeten Modellenzym wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/mL in dd H<sub>2</sub>O angesetzt und mit dem entsprechenden Puffer (100 mM) im Verhältnis 1:1 vermischt. Es wurden jeweils 2,5 mL der Enzymstammlösung und 2,5 mL des Puffers verwendet, so dass das zugegebene Gesamtvolumen 5 mL betrug. Die equilibrierten Materialien wurden in der erhaltenen Lösung resuspendiert und für 1 h bei 4 rpm in dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach erneuter Abzentrifugation wurde die im Überstand verbliebene Proteinmenge gegen

Messung einer Standardreihe des entsprechenden Enzyms bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde UV-photometrisch bestimmt. Die Menge an adsorbiertem Enzym ergab sich aus der Differenz zwischen eingesetzter und gemessener Enzymkonzentration. Die Massenbeladung des Adsorbers ergibt sich aus der adsorbierten Enzymmenge und der Masse an verwendetem Material. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Einstellung der pH-Werte wurden die in Tabelle 6.2 aufgeführten Puffersysteme verwendet.

**Tabelle 6.2:** Übersicht über die zur Einstellung der pH-Werte verwendeten Puffersysteme.

pH	Puffer
3	Formiat
4	Acetat
5	Acetat
6	MES
7	MES
8	Tris
9	Tris
10	Ethanolamin
11	CAPS
12	Phosphat

### 6.2.2 Adsorption in Abhängigkeit von der Ionenstärke

Die Adsorption in Abhängigkeit der Ionenstärke erfolgte analog zu der oben beschriebenen Adsorption in Abhängigkeit vom pH-Wert. Zur Adsorption wurde hier jeweils der pH-Wert gewählt, bei welchem das jeweilige Enzym die höchsten Adsorptionskapazitäten gezeigt hatte. Es wurde wiederum eine Stammlösung des entsprechenden Enzyms (2 mg/mL) in ddH<sub>2</sub>O angesetzt, im Verhältnis 1:1 mit dem entsprechenden Puffer vermischt und zur Resuspension der equilibrierten Materialien verwendet. Zur Einstellung der Ionenstärke wurden verschiedene Konzentrationen an NaCl verwendet. Tabelle 6.3 gibt einen Überblick über die

verwendeten NaCl-Konzentrationen und die daraus resultierenden Ionenstärken in dem Puffersystem. Die weitere Durchführung erfolgte analog Abschnitt 6.2.1.

**Tabelle 6.3:** Übersicht über die zur Einstellung der Ionenstärke verwendeten NaCl-Konzentrationen.

NaCl-Konzentration des Puffersystems	Gesamtionenstärke des Puffersystems
50	100
100	150
500	550
1000	1050
1500	1550
1800	1850

### 6.2.3 Adsorption in Abhängigkeit von der Zeit

Zur Untersuchung der Bindungskinetik der Enzymadsorption wurde wiederum analog zu Abschnitt 6.2.1 vorgegangen. Die Bindungszeit wurde hierbei jedoch in Zeitintervallen zwischen 1 und 120 min variiert. Im Anschluss wurde wiederum abzentrifugiert (4000·g, 10 min) und die Überstände wurden gegen Standards bekannter Konzentration UV-photometrisch vermessen.

### 6.2.4 Desorption

Es wurden wiederum jeweils 25 mg des verwendeten Adsorbens in 15 mL-Falcon-Tubes eingewogen und auf den entsprechenden pH-Wert equilibriert. Zur Adsorption wurde eine Stammlösung des entsprechenden Enzyms mit einer Konzentration von 2 mg/mL in ddH<sub>2</sub>O angesetzt und im Verhältnis 1:1 mit dem entsprechenden Puffer (100 mM) vermischt. Die erhaltene Lösung wurde zur Resuspension des equilibrierten Materials verwendet. Das Gesamtvolumen betrug hierbei 5 mL. Nach 1h Inkubationszeit auf einem Überkopfschüttler bei einer Geschwindigkeit von 4 rpm wurde abzentrifugiert (10 min, 4000·g), der Überstand

abpipettiert und zur Bestimmung der Proteinkonzentration aufbewahrt. Der Rückstand wurde in 5 mL des entsprechenden Adsorptionspuffers (50 mM) resuspendiert und wiederum 1h bei 4 rpm auf dem Überkopfschüttler behandelt. Es wurde erneut abzentrifugiert (10 min, 4000·g) und der Überstand zur Bestimmung der Proteinkonzentration aufbewahrt. Zur Desorption wurde der Rückstand in 5 mL Desorptionspuffer resuspendiert und wiederum 1h bei 4 rpm auf dem Überkopfschüttler behandelt. Die Proteinkonzentrationen in den Überständen aller Arbeitsschritte wurden UV-photometrisch gegen Standardreihen bekannter Konzentration des entsprechenden Enzyms quantifiziert. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

### **6.2.5 Adsorption unter dynamischen Bedingungen**

In dynamischen Adsorptionsversuchen wurden die Adsorbentien bzw. Tiefenfilterschichten bei verschiedenen Flussraten mit Modellenzymen beladen. Im Falle der Adsorbentien wurden jeweils 500 mg, bzw. 3 g der Materialien in eine Chromatographiesäule (Durchmesser: 15 mm mit 10  $\mu$  PTFE-Fritten) gefüllt, im Falle der verwendeten Tiefenfilterschichten wurden Stanzlinge (Durchmesser: 24 mm) in ein geeignetes Gehäuse eingesetzt und bei verschiedenen Flussraten beladen. Für die Adsorptionsversuche wurde eine FPLC-Anlage verwendet. Die verwendeten Adsorbentien wurden zunächst in 50 mL Falcon-Tubes eingewogen, im entsprechenden Equilibrierungspuffer (100 mM) suspendiert und für 1 h auf dem Überkopfschüttler bei 15 rpm behandelt. Im Anschluss wurde die Suspension in die mit einem Stempel nach unten verschlossene Säule gefüllt. Das zweite Säulenendstück wurde aufgesetzt und der Stempel handfest angezogen. Die Säule wurde mit der FPLC-Anlage so verbunden, dass sie von der mobilen Phase von unten nach oben durchströmt wurde. Die Säule wurde mit weiteren 50 mL Equilibrierungspuffer bei einer Flussrate von 5 mL/min durchströmt, um letzte Einschlüsse von Luft zu entfernen. Die Tiefenfilterschichten wurden in das verwendete Gehäuse eingesetzt und durch handfestes Aufschrauben des Deckels verschlossen. Das Gehäuse wurde ebenfalls so mit der FPLC-Anlage verbunden, dass es von der mobilen Phase von unten nach oben durchströmt wurde. Die



Tiefenfilterschichten wurden mit 100 mL Equilibrierungspuffer bei einer Flussrate von 5 mL/min equilibriert. Beladen wurde mit jeweils 50, bzw. 100 mL einer Enzymlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL im entsprechenden Adsorptionpuffer (50 mM). Die FPLC-Pumpe wurde hierbei jeweils auf die Flussrate eingeregelt, für die die Adsorptionskapazität bestimmt werden sollte. Der Durchlauf wurde in Fraktionen von jeweils 2 mL aufgefangen. Die Proteinkonzentration im Durchlauf wurde durch UV-photometrische Messung bei 280 nm gegen eine Standardreihe bekannter Konzentration vermessen. Die adsorbierte Enzymmenge ergibt sich hierbei aus der Differenz zwischen eingesetzter und im Durchlauf gemessener Enzymmenge. Die Massenbeladung erhält man durch die Division von adsorbierter Enzymmenge durch die eingesetzte Adsorbermenge, bzw. Menge an Adsorbens im Tiefenfilter.

#### **6.2.6 Schüttelkolbenkultivierung von *E.coli* K12 JM 109 (pET-Bgl-his) und *E.coli* K12 pJOE2702 (Bste-his)**

Zur Produktion von  $\beta$ -Glucanase (pET-Bgl-his) und Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* (Bste-his) wurden die rekombinanten *E.coli* Stämme *E.coli* K12 JM 109 (pET-Bgl-his) und *E.coli* K12 pJOE2702 (Bste-his) verwendet. Der Stamm *E.coli* K12 JM 109 (pET-Bgl-his) wurde von PD Karl Friehs, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik, Universität Bielefeld, der Stamm *E.coli* K12 pJOE2702 (Bste-his) von Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Abteilung Biotechnologie & Enzymkatalyse, Institut für Biochemie, Universität Greifswald, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte jeweils im Schüttelkolben in Luria-Bertani (LB)-Medium. Es wurde zunächst eine Übernacht-Vorkultur angesetzt. Hierfür wurden 20 mL des Mediums in einem 100 mL Schüttelkolben mit Zellen aus einer Stammhaltungsplatte überimpft und mit 100  $\mu$ m/mL Ampicillin bei 120 rpm und 30°C inkubiert. Die Hauptkultur wurde im 500 mL-Schüttelkolben in 100 mL LB-Medium durch Überimpfen mit 1 mL der Vorkultur angesetzt und mit 100  $\mu$ m/mL Ampicillin etwa 2 h bei 120 rpm und 30°C inkubiert, zur optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) 0,5 im Falle des Stammes *E.coli* K12 pJOE2702 (Bste-his) und 0,9 im Falle des *E.coli*-Stammes K12 JM 109 (pET-Bgl-his). Zur Expression von Bste-his

wurde dem Medium L-Rhamnose als Induktor zu einer Endkonzentration von 0,2 % (w/v) zugegeben. Zur Expression von Bgl-his wurde IPTG als Induktor verwendet (Endkonzentration im Medium: 1mM). Die Zellernte erfolgte 4h nach der Induktion für den *E.coli* K12 pJOE2702 (Bste-his)- Stamm und 22h nach der Induktion für den *E.coli*-Stammes K12 JM 109 (pET-Bgl-his) durch abzentrifugieren der Zellen (4°C, 3345·g, 15 min). Da Bgl-his sowohl intra- als auch extrazellulär produziert wird, wurde der abzentrifugierte Zellkulturüberstand um den Faktor 10 aufkonzentriert und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Zellpellets beider Stämme wurden in eisgekühltem Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5) aufgenommen und unter Eiskühlung mit Ultraschall (90W, 10 min, 0,6 s Pulsdauer) aufgeschlossen. Im Anschluss wurde wiederum abzentrifugiert (4°C, 3345·g, 15 min) und der Überstand ebenfalls bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

### **6.2.7 Schüttelkolbenkultivierung von *Bacillus megaterium* pRBBm15 (PxylA-SPlipA-lev773His)**

Zur Produktion von Levansucrase aus *Lactobacillus reuteri* wurde der rekombinante *Bacillus megaterium*-Stamm pRBBm15 (PxylA-SPlipA-lev773His) verwendet. Dieser Stamm wurde von PD Karl Friehs, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik, Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte wiederum im Schüttelkolben in LB-Medium. In einer Übernacht-Vorkultur wurden in einem 100 mL Schüttelkolben 20 mL LB-Medium mit Zellen aus einer Stammhaltungsplatte überimpft und bei 37°C und 130 rpm inkubiert.

Für die Hauptkultur wurden 100 mL LB-Medium mit 1 mL Vorkultur angeimpft und mit 20 µg/mL Tetracyclin bei 37°C und 130 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,4 kultiviert. Es wurde mit 0,5% Xylose induziert. Zusätzlich wurde dem Medium Calciumchlorid zugegeben, so dass die Endkonzentration im Medium 2,5 mM betrug. Es wurde für weitere 22 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (4°C, 3345·g, 15 min). Da das Enzym in das Medium sekretiert wird,

wurde der Zellkulturüberstand um den Faktor 10 aufkonzentriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **6.2.8 Schüttelkolbenkultivierung von *Staphylococcus carnosus* TM300**

Der rekombinante Stamm *Staphylococcus carnosus* TM300 zur Produktion der thermophilen Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* (aGTL) wurde von Prof. Dr. Dr. Garbared Antranikian, Institut für Technische Mikrobiologie, Technische Universität Hamburg-Harburg zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte wiederum im Schüttelkolben in LB-Medium. In einer Übernacht-Vorkultur wurden in einem 100 mL Schüttelkolben 20 mL LB-Medium mit Zellen aus einer Stammhaltungsplatte überimpft und bei 37°C und 120 rpm inkubiert.

Für die Hauptkultur wurden 100 mL LB-Medium mit 1 mL Vorkultur angeimpft und mit 20 µg/mL bei 37°C und 120 rpm bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,4 kultiviert. Es wurde mit 0,5%iger Xylose induziert. Es wurde für weitere 24 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (4°C, 3345·g, 15 min). Da das Enzym in das Medium sekretiert wird wurde der Zellkulturüberstand um den Faktor 10 aufkonzentriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **6.2.9 Zellaufschluss mit einem Microfluidizer**

Zum Zellaufschluss wurden die Zellen im 4-fachen Volumen eines 50 mM NaPP-Puffers, pH 8 suspendiert und so lange gerührt, bis eine gleichmäßige Suspension entstand. Die Presskammer des Microfluidizers wurde von außen mit Eiswasser gekühlt. Der Microfluidizer wurde zunächst viermal mit 100 mL dd H<sub>2</sub>O und im Anschluss mit 20 mL des verwendeten Aufschlusspuffers gespült. Die aufzuschließende Zellsuspension fünfmal wurde bei 650 bar durch den Microfluidizer gepumpt. Das Zellysate wurde abzentrifugiert (4°C, 3345·g, 15 min). Der Überstand wurde sterilfiltriert.

### **6.2.10 Aufreinigung von Enzymen aus Zellkulturüberständen und – aufschließen in einem statischen Adsorptionssystem**

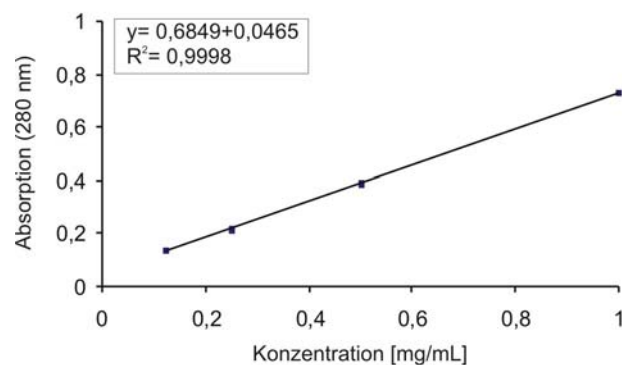
Es wurden jeweils 50 mg des entsprechenden Adsorbens in 2 mL Eppendorf-Gefäße eingewogen. Zur Equilibrierung gegen den entsprechenden pH-Wert wurde das Material in 2 mL des entsprechenden Puffer (100 mM) suspendiert und für eine Stunde in einem Überkopfschüttler bei 15 rpm behandelt. Nach Zentrifugation (10 min, 4000·g) wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Der verwendete Zellkulturüberstand, bzw. Zellaufschluss wurde mit dem entsprechenden Adsorptionspuffer (50 mM) verdünnt, so dass sich Gesamtproteinkonzentrationen zwischen 0,25 und 0,33 mg/mL ergaben. Die equilibrierten Materialien wurden in 1 mL des gepufferten Zellkulturüberstands, bzw. Zellaufschlusses resuspendiert und für 1h bei 4 rpm in dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach erneuter Abzentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und aufbewahrt. Die Materialien wurden in 1 mL des zur Adsorption verwendeten Puffers resuspendiert und erneut für eine Stunde bei 4 rpm inkubiert. Nach Abzentrifugation wurde der abpipettierte Überstand aufbewahrt. Die gewaschenen Materialien wurden in 1 mL Elutionspuffer (100 mM) suspendiert und für eine Stunde bei 4 rpm inkubiert. Nach erneuter Abzentrifugation wurden die abpipettierten Überstände ebenfalls aufbewahrt. Alle Überstände wurden gelelektrophoretisch untersucht (siehe Kapitel 6.3.8). Die verwendeten Puffersysteme sind Tabelle 6.2 zu entnehmen.

## **6.3 Analytik**

### **6.3.1 UV-photometrische Proteinquantifizierung**

Die UV-photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration basiert auf der Messung der UV-Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin (Phenolgruppe, 275 nm), Tryptophan (Indolgruppe, 279 nm) und in geringerem Maße auch Phenylalanin (257 nm) bei 280 nm. Je nach der Aminosäurezusammensetzung des entsprechenden Proteins können Proteinkonzentrationen im Bereich von 20 bis 3000 µg/mL nachgewiesen werden. Zur Bestimmung einer unbekanntem Proteinkonzentration wurde die jeweilige

Probe gegen eine Standardreihe des entsprechenden Proteins bekannter Konzentration bei 280 nm vermessen. Aus dem linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption wurde die unbekannte Proteinkonzentration bestimmt. Als Nachteile der UV-photometrischen Proteinquantifizierung ist die Störung der Messung durch Purin- bzw. Pyrimidinbasen der Nukleinsäuren, welche ebenfalls bei 280 nm absorbieren, zu nennen. Außerdem ist der Anteil an absorbierenden Aminosäuren für jedes Protein unterschiedlich, so dass für die Erstellung der Kalibrationsreihe das Protein in reiner Form vorliegen muss. Abbildung 6.14 zeigt exemplarisch eine Kalibrationsreihe zur Proteinquantifizierung von  $\alpha$ -Chymotrypsin bei pH 8 in 50 mM Tris-Puffer.

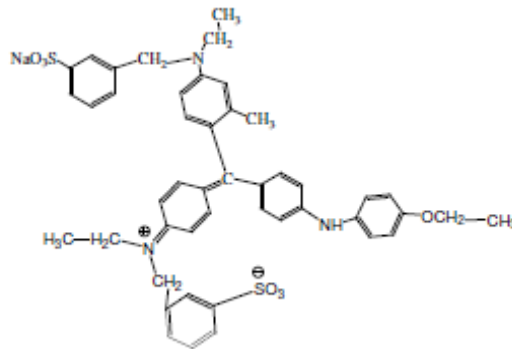


**Abbildung 6.14:** Kalibrationsreihe von  $\alpha$ -Chymotrypsin zur Bestimmung der UV-photometrischen Proteinquantifizierung in 50 mM Tris-Puffer, pH 8.

### 6.3.2 Proteinquantifizierung mittels Bradford-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test beruht auf der Reaktion des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G 250 mit Proteinen. Coomassie-Brilliantblau G 250 ist in Abbildung 6.15 gezeigt. Im sauren Milieu kommt es zu einer Komplexbildung der unprotonierten Sulfonat-Form des Farbstoffs mit kationischen und nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten des Proteins. Es resultiert eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm

zu 595 nm, die optisch durch einen Farbumschlag von braun zu blau wahrzunehmen ist.



**Abbildung 6.15:** Coomassie-Brilliantblau G 250 zur Proteinquantifizierung.

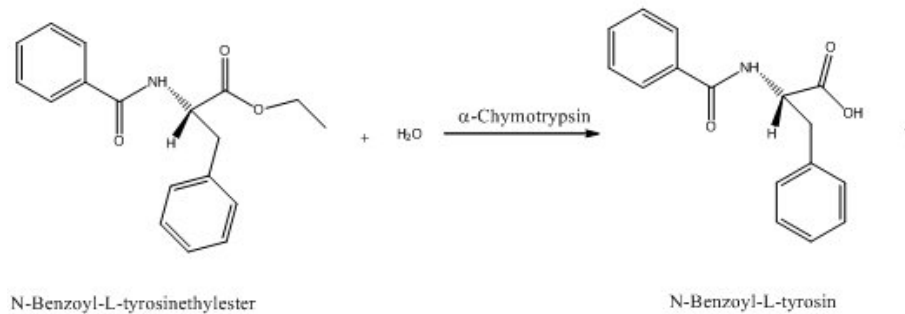
Zur Bestimmung der unbekanntenen Proteinkonzentration wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  der Probe in eine 96-Loch-Platte pipettiert und mit 300  $\mu\text{L}$  Bradford-Reagenz versetzt. Es wurde 10 min inkubiert. Die Absorptionsänderung wurde photometrisch bei 595 nm gegen eine Standardreihe bekannter Konzentration vermessen. Als Standard wurde BSA mit Konzentrationen zwischen 0,125 und 2 mg/mL in 1M NaCl-Lösung verwendet.

Der Vorteil des Bradford-Tests beruht auf seiner hohen Empfindlichkeit. Die Nachweisgrenze liegt zwischen 0,05 und 0,5  $\mu\text{g}$  Protein/mL. Damit ist der Bradford-Test der empfindlichste quantitative Färbe-Assay und zeigt zudem noch eine hohe Toleranz gegenüber Reduktionsmitteln.

### 6.3.3 Aktivitätsbestimmung von $\alpha$ -Chymotrypsin

Die Aktivitätsbestimmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin erfolgte mittels N-Benzoyl-L-tyrosinethylester (BTEE) als Substrat.  $\alpha$ -Chymotrypsin katalysiert dessen Hydrolyse. Die Reaktion ist in Abbildung 6.16 gezeigt. Das entstehende N-Benzoyl-L-Tyrosin absorbiert UV-Strahlung bei 256 nm. Der Ablauf der Reaktion kann daher photometrisch verfolgt werden. Die Messung erfolgte im kontinuierlichen Betrieb in einer Durchflussküvette. Es wurden 10 mL PBS-Puffer

und 10 mL BTEE-Lösung in einem Schnappdeckelglaschen vorgelegt und über eine Peristaltikpumpe ( $v = 15,2 \text{ mL/min}$ ) im Kreislauf durch die Küvette gepumpt. Zum Aufnehmen einer Grundlinie wurde 30 Sekunden die Absorption bei  $\lambda = 256 \text{ nm}$  gemessen. Bei der Messung des nativen Enzyms wurde die Reaktion durch Zugabe von  $20 \text{ }\mu\text{L}$  Enzymlösung in die Vorlage gestartet und die Absorptionsänderung für 10 Minuten verfolgt.



**Abbildung 6.16:** Hydrolytische Spaltung von N-Benzoyl-L-tyrosinethylester, katalysiert durch  $\alpha$ -Chymotrypsin. Die Entstehung des N-Benzoyl-L-tyrosin kann photometrisch bei 256 nm verfolgt werden.

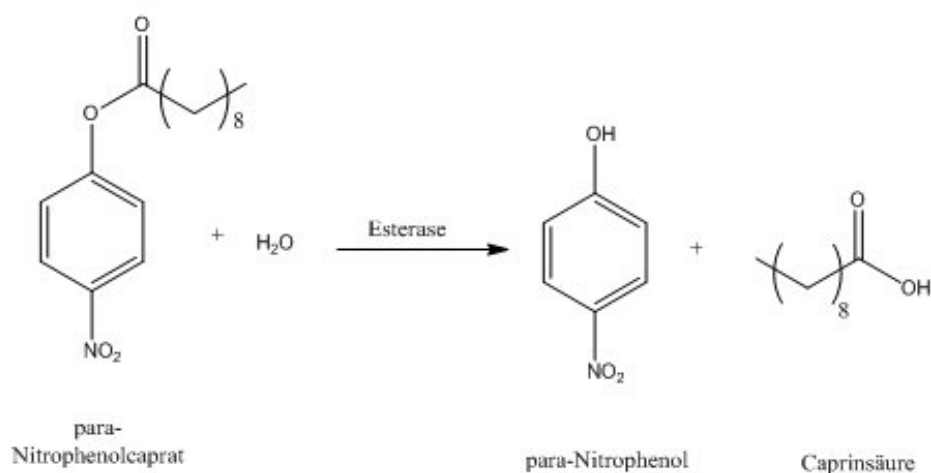
Alle Reagenzien und Bedingungen sind in Tabelle 6.4 aufgeführt.

**Tabelle 6.4:** Reaktionsbedingungen bei der Aktivitätsbestimmung von Chymotrypsin mit BTEE.

<b>Puffer</b>	100 mM PBS, pH 7,4
<b>Substrat-Stammlösung</b>	1 mM BTEE in 100mM PBS-Puffer, pH 7,4
<b>Substrat-Konzentration im Ansatz</b>	0,5 mM
<b>Temperatur</b>	Raumtemperatur
<b>Wellenlänge</b>	256 nm
<b>Molarer Extinktionskoeffizient</b>	964 L/(mol·cm)
<b>Schichtdicke</b>	1 cm
<b>Reaktionsvolumen</b>	20 mL

### 6.3.4 Aktivitätsbestimmung von Esterase BCC070 und Esterase aus *Bacillus stearothermophilus*

Die Aktivitätsbestimmung von Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* und Esterase BCC070 erfolgte mittels p-Nitrophenolcaprat als Substrat. In Abbildung 6.17 ist die durch Esterasen katalysierte Reaktion von p-Nitrophenolcaprat zu p-Nitrophenol gezeigt. Die Freisetzung von p-Nitrophenol kann bei 400 nm photometrisch verfolgt werden. Anhand der linearen Anfangssteigung kann die Enzymaktivität der Esterase bestimmt werden.



**Abbildung 6.17:** Hydrolytische Spaltung von p-Nitrophenolcaprat, katalysiert durch Esterasen. Die Entstehung des p-Nitrophenol kann photometrisch bei 410 nm verfolgt werden.

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Reaktionsbeginn für etwa eine Viertelstunde auf 25°C vortemperiert. Direkt vor Reaktionsbeginn wurden 690 µL Tris-Puffer, 250 µL Triton-Lösung und 10 µL p-Nitrophenolcaprat-Lösung gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL Enzymlösung gestartet und



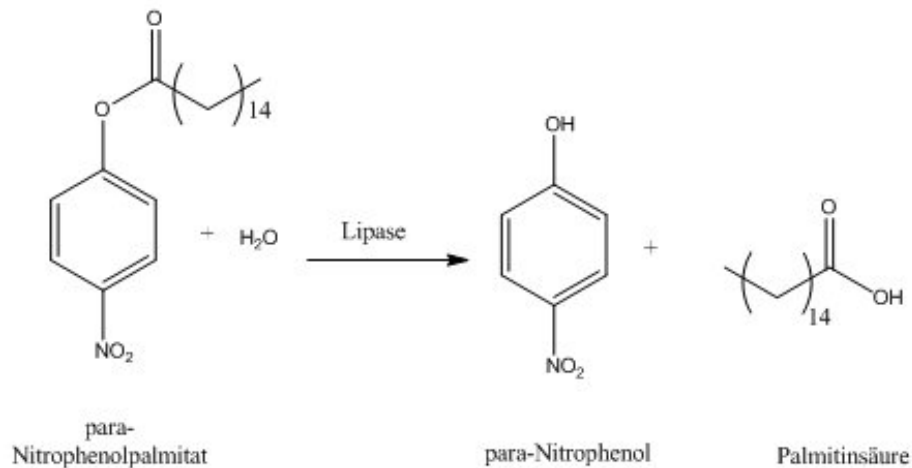
die Absorptionsänderung bei 400 nm für drei Minuten verfolgt. Die verwendeten Reagenzien und Bedingungen sind in Tabelle 6.5 zusammengefasst.

**Tabelle 6.5:** Reaktionsbedingungen bei der Aktivitätsbestimmung von Esterasen mit p-Nitrophenolcaprat.

<b>Puffer</b>	100 mM PBS, pH 7,4
<b>Triton</b>	4 mM Triton X-100 in 10 mM Tris-HCl, pH 8
<b>Substrat-Stammlösung</b>	10 mM p-Nitrophenolcaprat in ACN (HPLC grade)
<b>Substrat-Konzentration im Ansatz</b>	0,1 mM
<b>Temperatur</b>	25 °C
<b>Wellenlänge</b>	400 nm
<b>Molarer Extinktionskoeffizient</b>	16888 L/(cm·mol)
<b>Schichtdicke</b>	1 cm
<b>Reaktionsvolumen</b>	1 mL

### 6.3.5 Aktivitätsbestimmung von Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* und Lipase aus *Thermoanaerobacter tencongensis*

Die Bestimmung der Enzymaktivität von Lipase aus *Geobacillus thermoleovorans* und *Thermoanaerobacter tencongensis* erfolgte mittels der Methode nach Winkler und Stukmann unter Verwendung von *para*-Nitrophenyl-Palmitat (*p*NPP) als Substrat [143]. Im Zuge der enzymatischen Reaktion wird das Substrat in p-Nitrophenol und Palmitat gespalten. Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 6.18 dargestellt. Die Bildung von p-Nitrophenol führt zu einer Gelbfärbung der Reaktionslösung. Die Zunahme der Intensität der Gelbfärbung kann bei 410 nm photometrisch nachgewiesen werden und ist ein Maß für die hydrolytische Aktivität der Lipase.



**Abbildung 6.18:** Hydrolytische Spaltung von p-Nitrophenolpalmitat, katalysiert durch Lipasen. Die Entstehung des p-Nitrophenol kann photometrisch bei 410 nm verfolgt werden.

Zwei Lösungen A und B (siehe Tabelle 6.6) wurden vorbereitet und direkt vor dem Aktivitätstest im Verhältnis 1:9 vereinigt (Lösung C). 950  $\mu\text{L}$  Lösung C wurden vorgelegt und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Enzymlösung gestartet. Es wurde für 15 min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion ist durch Kühlung im Eisbad und Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  einer 25 %-igen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung beendet. Die Proben wurden für 1 min bei 4000·g abzentrifugiert und es wurden jeweils 300  $\mu\text{L}$  in eine 96-Loch Platte überführt, wo photometrisch die Absorption der Proben bei 410 nm gegen eine Blindprobe gemessen wurde.

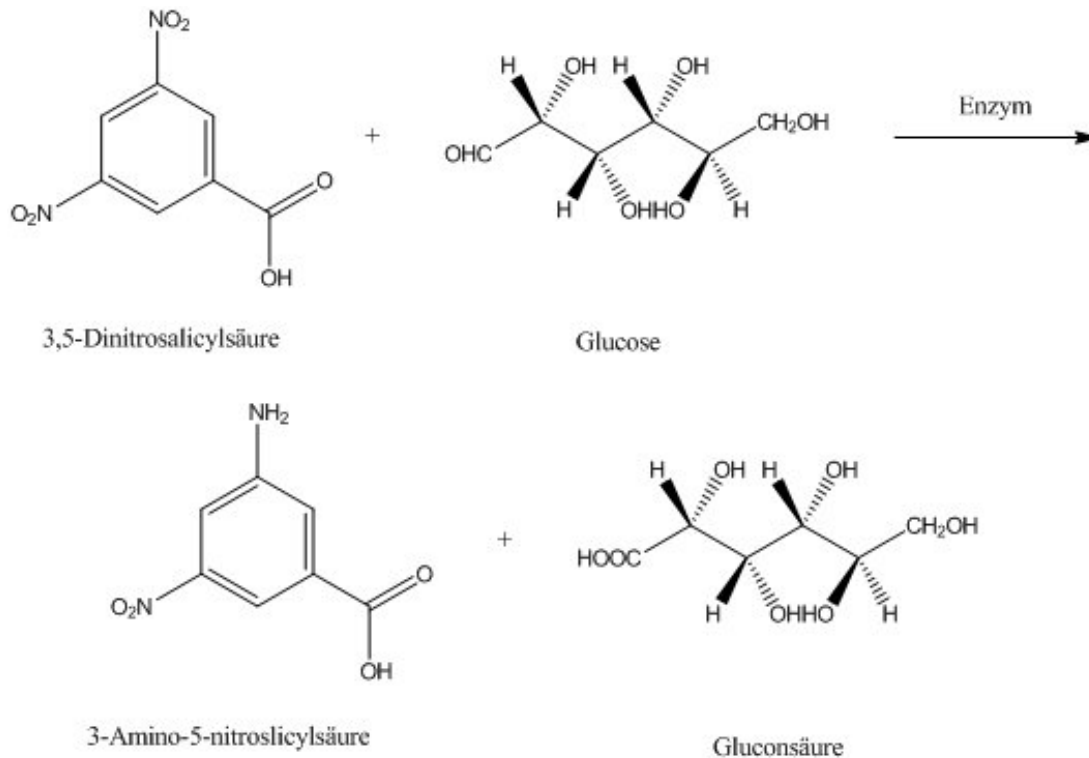
**Tabelle 6.6:** Reaktionsbedingungen bei der Aktivitätsbestimmung von Lipasen mit p-Nitrophenolpalmitat.

<b>Lösung A</b>	3 mg/mL <i>p</i> NPP in 100%-igem Isopropanol (bei 60°C lösen)
<b>Lösung B</b>	1,11 mg/mL in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8 (bei 60°C lösen)
<b>Lösung C</b>	1 Teil Lösung A: 9 Teilen Lösung B
<b>Temperatur</b>	50 °C
<b>Wellenlänge</b>	410 nm

### 6.3.6 Aktivitätsbestimmung von $\beta$ -Glucanase

Der angewandte Enzymaktivitäts-Test von  $\beta$ -Glucanase basiert auf der von Ghose und Miller dargestellten Methode zum Nachweis reduzierender Zucker mittels Dinitrosalicylsäure-Reagenz (DNS-Reagenz) [144, 145].

Als Substrat wurde  $\beta$ -D-Glucan verwendet. Genutzt wird die hydrolytische Aktivität des Enzyms in 1,3- bzw. 1,4- Spaltungen von  $\beta$ -D-Glucanen, um Monosaccharide freizusetzen. Die freigesetzten reduzierenden Zucker können über eine Farbreaktion mit DNS-Reagenz nachgewiesen werden und photometrisch bei 540 nm quantifiziert werden. Eine der beiden Nitro-Gruppen der 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) reagiert mit Glucose, wobei diese zu Gluconsäure oxidiert und die 3,5-Dinitrosalicylsäure zu einer 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert wird. Diese Reaktion wird durch einen Farbumschlag von gelb-orange nach rot-braun sichtbar und kann photometrisch bei 540 nm nachgewiesen werden. Die Reaktion von DNS mit Glucose als reduzierendem Zucker ist in Abbildung 6.19 dargestellt.



**Abbildung 6.19:** Nachweis reduzierender Zucker mittels DNS-Reagenz.

Es wurden jeweils 720  $\mu\text{L}$  Substratlösung vorgelegt und 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Es wurden 80  $\mu\text{L}$  Enzymlösung zugegeben und erneut bei 55°C 10 Minuten lang inkubiert. Nach Zugabe von 1200  $\mu\text{L}$  DNS-Reagenz wurde nochmals für 5 Minuten bei 99°C inkubiert. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden jeweils 300  $\mu\text{L}$  der Probenlösung in eine 96-Loch-Platte überführt und die Absorption bei  $\lambda = 540 \text{ nm}$  gegen eine Blindprobe (anstelle von Enzymlösung waren 80  $\mu\text{L}$  Citrat-Puffer zugegeben worden) sowie eine Kalibrationsreihe vermessen worden. Für die Erstellung der Kalibrationsreihe sind anstelle der Enzymlösung Lösungen unterschiedlicher Glukosekonzentrationen zwischen 0 und 20 mM eingesetzt worden. In Anlehnung an oben beschriebene Reaktionsdurchführung (Reaktionszeit von 10 min) entspricht eine in der zu analysierenden Probenlösung vorhandene Glukosekonzentration von 10 mM einer Volumenaktivität von 16,67 nkat/mL (1 U/mL). Über diese Beziehung und die aufgenommene Kalibrationsreihe können die Volumenaktivitäten von  $\beta$ -Glucanase-haltigen Proben bestimmt werden.

**Tabelle 6.7:** Reaktionsbedingungen bei der Aktivitätsbestimmung von  $\beta$ -Glucanase mit  $\beta$ -D-Glucan.

<b>Puffer</b>	50 mM Citrat-Puffer, pH 6
<b>Substrat-Stammlösung</b>	1 mg/mL $\beta$ -D-Glucan in 50 mM Citrat-Puffer, pH 6
<b>Substrat-Konzentration im Ansatz</b>	0,36 mg/mL
<b>Temperatur</b>	55 °C
<b>Wellenlänge</b>	540 nm

### 6.3.7 Aktivitätsbestimmung von Levansucrase aus *Lactobacilli reuteri*

Analog der Aktivitätsbestimmung von  $\beta$ -Glucanase in Abschnitt 6.3.6 basiert die Bestimmung der Enzymaktivität von Levansucrase auf dem Nachweis reduzierender Zucker mittels 3,5-Dinitrosalicylsäure nach Ghose und Miller [144, 145]. Als Substrat wird in diesem Fall Saccharose verwendet. Durch die hydrolytische Aktivität des Enzyms werden aus der Saccharose Monosaccharide (Glucose und Fructose) freigesetzt. Diese können wiederum mittels DNS-Reagenz nachgewiesen werden.

Es wurden jeweils 1350  $\mu$ L Substratlösung vorgelegt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 150  $\mu$ L Enzymlösung gestartet. Die Proben wurden bei 37°C inkubiert. Beginnend mit einer Nullprobe wurden dem Reaktionsgemisch verteilt über einen Zeitraum von bis zu 120 min je 100  $\mu$ L Proben aus dem Reaktionsgemisch entnommen und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden mit jeweils 100  $\mu$ L DNS-Reagenz versetzt und bei 99°C für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben im Eisbad abgekühlt und mit 1000  $\mu$ L entionisiertem Wasser versetzt. Es wurden jeweils 300  $\mu$ L der Probenlösung in eine 96-Loch-Platte überführt und dort gegen eine Blindprobe und eine Glucose-Kalibrationsreihe photometrisch bei 540 nm vermessen. Zur Erstellung der Kalibrationsreihe sind neben den zu messenden Proben außerdem je 100  $\mu$ L glukosehaltige Proben mit Konzentrationen von 0-2 g/L mit 100  $\mu$ L DNS-Reagenz vermischt worden und dann analog der

übrigen Proben weiterbehandelt worden. Aus der in  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$  angegebenen Steigung der Kalibrationsgerade kann die Aktivität der Levansucrase bestimmt werden. Die so ermittelte Aktivität beschreibt die freigesetzte Menge an Fruktose und Glukose pro Minute. Um eine Vergleichbarkeit zu Literaturwerten zuzulassen, wurde hier mit dem Faktor 0,56 multipliziert. Auf diese Weise wurde per Definition die Einheit Unit für die Enzymaktivität erhalten, die die freigesetzte Menge an Glukose in  $\mu\text{mol}$  pro Minute beschreibt.

**Tabelle 6.8:** Reaktionsbedingungen bei der Aktivitätsbestimmung von Levansucrase mit Saccharose.

<b>Substrat-Stammlösung</b>	1350 $\mu\text{L}$ Saccharose-haltige Reaktionslösung, bestehend aus 375 $\mu\text{L}$ eines 100 mM Natriumacetat-Puffers (pH 5,4), 4,5 $\mu\text{L}$ Natriumazid-Lösung (10 g/L), 102,7 $\mu\text{L}$ Saccharose-Lösung (50% (w/v)) und 823,7 $\mu\text{L}$ eintionisiertem $\text{H}_2\text{O}$
<b>Substrat-Konzentration</b> <b>im Ansatz</b>	0,36 mg/mL
<b>Temperatur</b>	
<b>Wellenlänge</b>	540 nm

### 6.3.8 Gelelektrophorese zur Detektion von Proteinen

Das Prinzip der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) beruht auf der Trennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld. Die Proteine werden zunächst durch Zugabe der Reduktionsmittel Natriumdodecylsulfat (SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanol und Erhitzen auf  $95^\circ\text{C}$  denaturiert und entfaltet. Durch das zugegebene SDS wird zusätzlich die Eigenladung der Proteine maskiert, was dazu führt, dass sich ein relativ konstantes Verhältnis von Ladung zu Masse ergibt. Das  $\beta$ -Mercaptoethanol spaltet eventuell vorhandene Disulfidbrücken. Die Trennung der Proteine hängt

somit nur noch von ihren Molmassen und nicht von ihrer Größe und Form im nativen Zustand ab. Zur Probenvorbereitung wurden die Analyten im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer vermischt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Im Anschluss wurden sie für 3 min bei maximaler Zentrifugenleistung abzentrifugiert.

Zur Herstellung eines 12%igen Polyacrylamid-Gels wurde zunächst das Trenngel angemischt und zwischen die beiden Glasplatten der Gießapparatur pipettiert. Nach 30 Minuten war das Gel auspolymerisiert. Nun wurde das 6%ige Sammelgel angemischt und auf das Trenngel pipettiert. Zur Generierung von Probenaschen wurde während des Auspolymerisierens ein Kamm in das Sammelgel gesteckt. Nach ebenfalls 30 Minuten war das Sammelgel auspolymerisiert. Das Gel konnte nun in der Laufkammer befestigt werden, in die auch der TGS-Laufpuffer eingefüllt wurde. Es wurden je 10-20 µL der vorbereiteten Proben sowie 3 µL eines Proteingrößenmarkers in die Probenaschen eingefüllt. Zunächst wurde eine Spannung von 100 V angelegt, bis sich die Proben in einer dünnen Bande gesammelt hatten. Die Spannung wurde auf 200 V erhöht, bis die Proben am unteren Ende des Gels angelangt waren. Die Elektrophorese wurde beendet. Die Proteine wurden im Anschluss durch eine Silberfärbung visualisiert.

### *Silberfärbung*

Die Visualisierung von Proteinen durch die Silberfärbung basiert auf der Komplexierung von Silberionen durch Aminosäureseitenketten. Die Proteinbanden werden dann durch die Reduktion der Silberionen mit alkalischer Formaldehydlösung sichtbar gemacht.

Das Gel wurde zunächst für 30 Minuten in dem Silberentfärber/-fixierer geschwenkt und im Anschluss zweimal mit entionisiertem Wasser gewaschen. Das Gel wird für 2,5 Minuten in Farmers Reducer geschwenkt und anschließend bis zur vollständigen Entfärbung mit entionisiertem Wasser gewaschen. Das Gel wurde für 30 Minuten in 0,1%iger Silbernitratlösung geschwenkt. Danach wurde zweimal für 30 Sekunden mit entionisiertem Wasser und einmal mit einer 2,5%igen Natriumcarbonatlösung gewaschen. Zum Entwickeln wurde das Gel in 100 mL 2,5%iger Natriumcarbonatlösung, der 500 µL Formaldehyd zugesetzt worden

waren, bis zum Sichtbarwerden von Proteinbanden inkubiert. Zum Stoppen der Färbereaktion wurde das Gel für 10 Minuten in 5%iger Essigsäure geschwenkt.

## 6.4 Geräte, Materialien und Chemikalien

### 6.4.1 Geräte

Analysenwaage Analytic AC 210 S	Sartorius AG, Göttingen
FPLC-System BioLogic DuoFlow	BioRad, UK
Gießapparatur Gelelektrophorese	BioRad, UK
Laufkammer Gelelektrophorese	BioRad, UK
MiniPROTEAN <sup>®</sup> Tetra Cell	
Spannungsquelle Gelelektrophorese	BioRad, UK
Power Pac Bacis power supplies	
pH-Meter HI 221	Hanna Instruments, USA
Rüttelplatte	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Überkopfschüttler	Stuart
Rotator SB3	
UV/Vis Spektrometer	Multiskan Thermo Electron, Dreieich
UV/Vis Spektrometer	
Cary 50 Scan	Varian
Peristaltikpumpe	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge Multifuge 3 S	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3 s	



### 6.4.2 Materialien

96-Loch-Platten, UV-durchlässig	Corning Inc., New York, USA
FPLC-Leersäule mit beweglichem Stempel, 15 x 150 mm	Omnifit, UK
FPLC-Leersäule mit beweglichem Stempel, Küvette, halbmikro	KronLab Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PE-Fritten 10 µm	Omnifit, UK
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	eppendorf
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter, 10µM	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
UV-Küvette, halbmikro, Plastibrand®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland.

### 6.4.3 Chemikalien

Alkalische Phosphatase (Darmschleimhaut, Kalb)	Fluka 79392
α-Chymotrypsin (Darmschleimhaut, Kalb)	Sigma C4129
β-Galactosidase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	Sigma G5160
Lipase ( <i>candida rugosa</i> )	Sigma 62302
Lysozym (Hühnereiweiß)	Fluka 62971
PenicillinG-Amidase	
Protein-Ladder PageRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon- Rot, Deutschland
Trypsin (Darmschleimhaut, Kalb)	Sigma T1005

Alle Salze und Bulkchemikalien zum Ansetzen von Puffern, Lösungen und Medien wurden von den Firmen Sigma, Fluka, Merck und Roth bezogen und entsprachen p.a. Qualität.

#### **6.4.4 Verwendete Lösungen**

##### **Formiat-Puffer (100mM), pH 3**

- 4,603 g Ameisensäure in 900 mL entionisiertem Wasser lösen
- pH-Wert auf pH 2,99 einstellen
- mit entionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen.

##### **Acetat-Puffer (100 mM), pH 4 und 5**

- 6,0 g Essigsäure in 900 mL entionisiertem Wasser lösen
- pH-Wert auf pH 4, bzw. 5 einstellen
- mit entionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen

##### **MES-Puffer (100 mM), pH 6 und 7**

- 19,52 g MES-Säure in 900 mL entionisiertem Wasser lösen
- pH-Wert auf pH 6, bzw. 7 einstellen
- mit entionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen

##### **Phosphat-Puffer (100 mM), pH 7, 7,5 und 8**

- 12 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  in 900 mL entionisiertem Wasser lösen
- pH-Wert auf pH 7, bzw. 8 einstellen
- mit entionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen

##### **Tris-Puffer (100 mM), pH 8 und 9**

- 6,11 g Tris-Base in 900 mL entionisiertem Wasser lösen
- pH-Wert auf pH 7,99, bzw. 9 einstellen
- mit entionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen

**CAPS-Puffer (100 mM), pH 10 und 11**

- 22,13 g CAPS-Säure in 900 mL entionisiertem Wasser lösen
- pH-Wert auf pH 11 einstellen
- mit entionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen

**Phosphat-Puffer (100 mM), pH 12**

- 26,807 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  in 900 mL entionisiertem Wasser lösen
- pH-Wert auf pH 12 einstellen
- mit entionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen

Sämtliche geringer konzentrierte Pufferlösungen wurden durch entsprechendes Verdünnen aus den 100 mM Puffern hergestellt.

Zur Verwendung an der FPLC wurden die Puffer nach der Herstellung sterilfiltriert und für eine halbe Stunde im Ultraschallbad entgast.

**PBS-Puffer (100 mM), pH 7,4**

- 8g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 1,432 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 900 mL entionisiertem Wasser lösen
- pH-Wert auf pH 7,4 einstellen
- mit entionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen

**Bradford-Reagenzlösung zur Proteinquantifizierung**

- 10 mg Coomassie Brilliant Blau G250
- 5 mL Ethanol (95 %)
- 10 mL Phosphorsäure (85 %)
- mit entionisiertem Wasser auf 100 mL auffüllen

**DNS-Reagenzlösung für Enzymaktivitätstests**

- 1 g 3,5-Dinitrosalicylsäure
- 30 g Kalium-Natrium-Tartrat
- 1,6 g NaOH

- mit entionisiertem Wasser auf 100 mL auffüllen

### **LB-Medium**

- 10 g Bacto Pepton
- 10 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- mit entionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen

Der pH-Wert wird auf pH 7,3 eingestellt und die Lösung für 30 Minuten bei 121°C autoklaviert.

### **SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE**

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

### **SDS-Laufpuffer für die SDS-PAGE**

- 0,3 g Tris Base (25 mM)
- 14 g Glycin (192 mM)
- 1 g SDS (0,1 %)
- in 1 L entionisiertem Wasser lösen

Der pH-Wert wird auf pH 8,3 eingestellt.

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

- 400 mL Ethanol, 400 mL entionisiertes Wasser und 80 mL Essigsäure werden miteinander vermischt

**Farmers Reducer für die Silberfärbung**

- Eine Spatelspitze  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  und eine Spatelspitze  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  werden in 100 mL entionisiertem Wasser gelöst.

## Literaturverzeichnis

1. Bommarius, R., *Biocatalysis-Fundamentals and applications*. 2004, Weinheim: Wiley-VCH.
2. Bryjak, J. and A.W. Trochimczuk, *Immobilization of lipase and penicillin acylase on hydrophobic acrylic carriers*. *Enzyme And Microbial Technology*, 2006. **39**(4): p. 573-578.
3. Riechers, D., *Untersuchungen zum Bindungsverhalten biologisch aktiver Substanzen an Bentonite*, in *Institut für Technische Chemie*. 2005, Leibniz Universität: Hannover.
4. R. Singhvi, C.S., C. O'Hara, L. Xie, C. Wang, *Clarification of Animal Cell Culture Process Fluids Using Depth Microfiltration*. *BioPharm*, 1996: p. 35- 41.
5. Boschetti, E., *ADVANCED SORBENTS FOR PREPARATIVE PROTEIN SEPARATION PURPOSES*. *Journal of Chromatography A*, 1994. **658**(2): p. 207-236.
6. Kataoka, S., et al., *Microreactor with mesoporous silica support layer for lipase catalyzed enantioselective transesterification*. *Green Chemistry*. **12**(2): p. 331-337.
7. Nikolic, M.P., V.V. Srdic, and M.G. Antov, *Immobilization of lipase into mesoporous silica particles by physical adsorption*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2009. **27**(4): p. 254-262.
8. Cruz, J.C., P.H. Pfromm, and M.E. Rezac, *Immobilization of Candida antarctica Lipase B on fumed silica*. *Process Biochemistry*, 2009. **44**(1): p. 62-69.
9. Sonnet, P.E., G.P. McNeill, and W. Jun, *LIPASE OF GEOTRICHUM-CANDIDUM IMMOBILIZED ON SILICA-GEL*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1994. **71**(12): p. 1421-1423.
10. Salis, A., et al., *Physical and chemical adsorption of Mucor javanicus lipase on SBA-15 mesoporous silica. Synthesis, structural characterization, and activity performance*. *Langmuir*, 2005. **21**(12): p. 5511-5516.
11. Kramer, M., et al., *Enantioselective transesterification by Candida antarctica Lipase B immobilized on fumed silica*. *Journal of Biotechnology*. **150**(1): p. 80-86.
12. Thie, *Entwicklung und Untersuchung grenzflächenaktiver Zinkrizinoleat-Komplexe zur Adsorption von Schadstoffen aus der Gasphase*, in *Institut für Anorganische Chemie*. 2010, Universität Duisburg-Essen: Duisburg-Essen.
13. Chandler, M.A. and A.L. Zydney, *Clarification of yeast cell suspensions by depth filtration*. *Biotechnology Progress*, 2005. **21**(5): p. 1552-1557.
14. D. Yavorsky, R.B., C. Lambalot, R. Brunkow, *The Clarification of Bioreactor Cell Cultures for Biopharmaceuticals* *Pharmaceutical Technology*, 2003: p. 62- 76.
15. Prashad, M. and K. Tarrach, *Cell clarification of bioreactor offloads*. *Filtration & Separation*, 2006. **43**(7): p. 28-30.

16. Charlton, H.R., J.M. Relton, and N.K.H. Slater, *Characterisation of a generic monoclonal antibody harvesting system for adsorption of DNA by depth filters and various membranes*. *Bioseparation*, 1999. **8**(6): p. 281-291.
17. M. Pailhes, C.L., R. Barloga, *Integration of Centrifuges with Depth Filtration for Optimized Cell Culture Fluid Clarification Processes*. *Bioprocessing Journal*, 2004: p. 55-58.
18. Yigzaw, Y., et al., *Exploitation of the adsorptive properties of depth filters for host cell protein removal during monoclonal antibody purification*. *Biotechnology Progress*, 2006. **22**(1): p. 288-296.
19. Bolton, G.R., et al., *The fiber-coating model of biopharmaceutical depth filtration*. *Aiche Journal*, 2005. **51**(11): p. 2978-2987.
20. van Reis, R. and A. Zydney, *Bioprocess membrane technology*. *Journal Of Membrane Science*, 2007. **297**(1-2): p. 16-50.
21. M. W. Jornitz, T.H.M., *Filtration and Purification in the Biopharmaceutical Industry*  
Second Edition ed. *Drugs and the pharmaceutical sciences*. Vol. 174. 2008: informa healthcare.
22. Peixoto, C., et al., *Downstream processing of triple layered rotavirus like particles*. *Journal Of Biotechnology*, 2007. **127**(3): p. 452-461.
23. Roush, D.J. and Y.F. Lu, *Advances in primary recovery: Centrifugation and membrane technology*. *Biotechnology Progress*, 2008. **24**(3): p. 488-495.
24. Kandula, S., et al., *Design of a filter train for precipitate removal in monoclonal antibody downstream processing*. *Biotechnology And Applied Biochemistry*, 2009. **54**: p. 149-155.
25. Zhou, J.X., et al., *Viral clearance using disposable systems in monoclonal antibody commercial downstream processing*. *Biotechnology And Bioengineering*, 2008. **100**(3): p. 488-496.
26. Leung, W.W.F., *Centrifugal separation in biotechnology*. 2008 American Filtration & Separations Society Conference, 2008: p. 10 pp.-10 pp.
27. Wang, A., R. Lewus, and A.S. Rathore, *Comparison of different options for harvest of a therapeutic protein product from high cell density yeast fermentation broth*. *Biotechnology And Bioengineering*, 2006. **94**(1): p. 91-104.
28. Crisp, R., *Wet-Strengthening of Paper in Neutral pH Papermaking Condition*. 2nd ed. *Application of wet-end chemistry*, ed. O.A. Thorn. 2009, Heidelberg, London, New York: Springer. 147-169.
29. Kalbfuss, B., et al., *Harvesting and concentration of human influenza A virus produced in serum-free mammalian cell culture for the production of vaccines*. *Biotechnology And Bioengineering*, 2007. **97**(1): p. 73-85.
30. Nayak, D.P., S. Lehmann, and U. Reichl, *Downstream processing of MDCK cell-derived equine influenza virus*. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 2005. **823**(2): p. 75-81.
31. Charlton, H.R., J.M. Relton, and N.K.H. Slater, *Filter life after cell death: Impact of viable, non-viable apoptotic and necrotic mammalian cells on depth filter blinding*. *Food And Bioproducts Processing*, 2000. **78**(C3): p. 133-138.

32. Van Holten, R.W. and S.M. Autenrieth, *Evaluation of depth filtration to remove prion challenge from an immune globulin preparation*. Vox Sanguinis, 2003. **85**(1): p. 20-24.
33. Siwak, M., et al., *Process for removing protein aggregates and virus from protein solution involves passing solution through adsorptive depth filters, and charged/surface modified microporous membranes in normal flow; and then through ultrafiltration membrane*.
34. Savage, M., W. Hinskens, and W. Hinsken, *Removing viruses from aqueous solutions of proteins, e.g. drugs - by passing solution through structured depth filter having positively charged filter element, allowing retention of biological activity of protein*. p. 798003-B1:.
35. van Reis, R. and A. Zydney, *Bioprocess membrane technology (vol 297, pg 16, 2007)*. Journal Of Membrane Science, 2007. **302**(1-2): p. 271-271.
36. Lösch, P., *Sorptive deep bed filtration by the application of embedded ion exchangers in cellulose filter sheets*. in review.
37. Koehler, K., K. Tarrach, and A. Thiefes, *Depth filter layer, useful e.g. in a filtration device to remove contaminants e.g. nucleic acid from target products e.g. antibody, comprises a cellulose fiber, an inorganic layered double hydroxide, and an organic wet strength additive*.
38. Banert, P., *Einsatz von Tiefenfilterschichten in der sorptiven Trenntechnik*. Chemie Ingenieur Technik, 2006. **78**(9): p. 1394-1395.
39. F. Bergaya, B.T., G. Lagaly, *Handbook of Clay Science*. 2006: Elsevier.
40. J. Sanz, J.R., *J. Mol. Evol.*, 1996. **43**: p. 39.
41. Bujdak, J. and B.M. Rode, *The effect of smectite composition on the catalysis of peptide bond formation*. Journal Of Molecular Evolution, 1996. **43**(4): p. 326-333.
42. E. Castro, J.M., *Int. J. Quantum Chem.*, 1998. **103**: p. 550
43. Fripiat, J.J. and Cruzcump.Mi, *Clays As Catalysts For Natural Processes*. Annual Review Of Earth And Planetary Sciences, 1974. **2**: p. 239-256.
44. Bauer, J., *Synthese und Charakterisierung von schichtartigen Doppelhydroxiden (LDHs) unter besonderer Berücksichtigung von Hydrocalumiten und Hybridmaterialien mit organischen Farbstoffen*. 2003, Leibniz Universität: Hannover.
45. Burzlaff, A., et al., *Flow cytometry: Interesting tool for studying binding behavior of DNA on inorganic layered double hydroxide (LDH)*. Cytometry Part A, 2004. **62A**(1): p. 65-69.
46. Choy, J.H., et al., *Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications*. Applied Clay Science, 2007. **36**(1-3): p. 122-132.
47. Burzlaff, P.A., *DNA-Bindungsstudien an Hydrotalcit*. 2005, Leibniz Universität: Hannover.
48. Choy, J.H., et al., *Layered double hydroxide as an efficient drug reservoir for folate derivatives*. Biomaterials, 2004. **25**(15): p. 3059-3064.
49. Miyata, S., *Anion-Exchange Properties Of Hydrotalcite-Like Compounds*. Clays And Clay Minerals, 1983. **31**(4): p. 305-311.
50. Euzen, R., Krokidis, Toulhoat, Loarer, Jilivet, Froidefond, ed. *Handbook of porous solids*. ed. K. Schüth, Sing, Weitkamp. Vol. 3. 2002, Wiley-VCH: Weinheim.



51. Daniell, W., et al., *Enhanced surface acidity in mixed alumina-silicas: a low-temperature FTIR study*. Applied Catalysis A-General, 2000. **196**(2): p. 247-260.
52. Peri, J.B., *A model for the surface of gamma-alumina*. The Journal of Physical Chemistry, 1964. **69**(1): p. 220-230.
53. Peri, J.B., *Infrared Study of Adsorption of Ammonia on Dry gamma-Alumina* The Journal of Physical Chemistry, 1964. **69**(1): p. 231-239.
54. Peri, J.B., *Infrared and Gravimetric Study of the surface Hydration of gamma-alumina*. The Journal of Physiyal Chemistry, 1964. **69**(1): p. 211-219.
55. Glazneva, T.S., N.S. Kotsarenko, and E.A. Paukshtis, *Surface acidity and basicity of oxide catalysts: From aqueous suspensions to in situ measurements*. Kinetics And Catalysis, 2008. **49**(6): p. 859-867.
56. P. Bai, P.W., X.S. Zhao, *Cation-anion double hydrolysis derived mesoporous gamma-alumina as an envirometally friendly and efficient aldol reaction catalyst* Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**: p. 1554-1563.
57. A. Boumaza, L.F., J. Ledion, G. Sattonay, J.B: Brubach, P. Berthet, A.M. Huntz, P. Roy, R. Tetot, *Transition alumina phases induced by heat treatment of boehmite: An X-ray diffraction and infared spectroscopy study*. Journal of Solid State Chemistry, 2009. **182**: p. 1171-1176
58. A.R. Garcia, R.B.d.B., A. Fidalgo, L. M. Ilharco, *Interaction of L-Alanine with Alumina as Studied by Vibrational Spectroscopy*. Langmuir, 2007. **23**: p. 10164-10175.
59. Okrusch, M., *Mineralogie: Eine spezielle Einführung in die Mineralogie, Petrochemie und Lagerstättenkunde*. Vol. 8. 2009, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
60. A. F. Hollemann.
61. Hoangvan, C., Compagno.Pa, and S.J. Teichner, *New Platinum Catalyst Using An Amorphous Alumina Support .I. Preparation And Composition Of Catalyst*. Bulletin De La Societe Chimique De France Partie I- Physicochimie Des Systemes Liquides Electrochimie Catalyse Genie Chimique, 1974(7-8): p. 1226-1228.
62. Fleming, G., *Selective Adsorption Processes*. Alumina Chemicals, ed. Hart. 2006, Westerville, Ohio: Wiley-VCH.
63. Belik, E.V., et al., *Study of Acidity of the Modified Alumosilicate Sorbents Prepared by the Method of Destructive Epitaxial Precipitation*. Russian Journal Of Applied Chemistry, 2009. **82**(1): p. 166-168.
64. Chizallet, C. and P. Raybaud, *Pseudo-Bridging Silanols as Versatile Bronsted Acid Sites of Amorphous Aluminosilicate Surfaces*. Angewandte Chemie-International Edition, 2009. **48**(16): p. 2891-2893.
65. Gougeon, W.D., et al., *Polypeptide adsorption on a synthetic montmorillonite: A combined solid-state NMR spectroscopy, X-ray diffraction, thermal analysis and N-2 adsorption study*. European Journal Of Inorganic Chemistry, 2003(7): p. 1366-1372.

66. Erhardt, F.A. and H.J. Jordening, *Immobilization of dextranase from Chaetomium erraticum*. Journal Of Biotechnology, 2007. **131**(4): p. 440-447.
67. Sanjay, G. and S. Sugunan, *Acid activated montmorillonite: an efficient immobilization support for improving reusability, storage stability and operational stability of enzymes*. Journal Of Porous Materials, 2008. **15**(3): p. 359-367.
68. Ralla, K., et al., *Adsorption and separation of proteins by a smectitic clay mineral*. Bioprocess And Biosystems Engineering. **33**(7): p. 847-861.
69. Baron, M.H., et al., *Chymotrypsin adsorption on montmorillonite: Enzymatic activity and kinetic FTIR structural analysis*. Journal Of Colloid And Interface Science, 1999. **214**(2): p. 319-332.
70. Aquino, A.J.A., et al., *Adsorption of organic substances on broken clay surfaces: A quantum chemical study*. Journal Of Computational Chemistry, 2003. **24**(15): p. 1853-1863.
71. Rahman, M.B.A., et al., *Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from Candida rugosa as biocatalyst for effective esterification*. Applied Clay Science, 2005. **29**(2): p. 111-116.
72. Servagent-Noinville, S., et al., *Conformational changes of bovine serum albumin induced by adsorption on different clay surfaces: FTIR analysis*. Journal Of Colloid And Interface Science, 2000. **221**(2): p. 273-283.
73. Dauner, C., A. Borchert, and K. Buchholz, *Development Of An Adsorbent For Work-Up Of Proteins*. Chemie Ingenieur Technik, 1986. **58**(6): p. 491-493.
74. Buttersack, C., et al., *Enzyme-Production From Sugar-Beets*. Zuckerindustrie, 1994. **119**(4): p. 284-291.
75. Tietjen, T. and R.G. Wetzel, *Extracellular enzyme-clay mineral complexes: Enzyme adsorption, alteration of enzyme activity, and protection from photodegradation*. Aquatic Ecology, 2003. **37**(4): p. 331-339.
76. Sinegani, A.A.S., G. Emtiazi, and H. Shariatmadari, *Sorption and immobilization of cellulase on silicate clay minerals*. Journal Of Colloid And Interface Science, 2005. **290**(1): p. 39-44.
77. Bajpai, A.K. and R. Sachdeva, *Study on the adsorption of hemoglobin onto bentonite clay surfaces*. Journal Of Applied Polymer Science, 2002. **85**(8): p. 1607-1618.
78. Gopinath, S. and S. Sugunan, *Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity*. Applied Clay Science, 2007. **35**(1-2): p. 67-75.
79. Geraud, E., et al., *Spongy gel-like layered double hydroxide-alkaline phosphatase nanohybrid as a biosensing material*. Chemical Communications, 2008(13): p. 1554-1556.
80. Shi, W.Y., et al., *Calcined layered double hydroxides as a "biomolecular vessel" for bromelain: Immobilization, storage and release*. Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2007. **47**(1-2): p. 58-65.
81. Yagiz, F., D. Kazan, and A.N. Akin, *Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites*. Chemical Engineering Journal, 2007. **134**(1-3): p. 262-267.

82. Knezevic, Z., L. Mojovic, and B. Adnadjevic, *Palm oil hydrolysis by lipase from Candida cylindracea immobilized on zeolite type Y*. Enzyme And Microbial Technology, 1998. **22**(4): p. 275-280.
83. Ren, J.L., et al., *Some factors affecting the immobilization of penicillin G acylase on calcined layered double hydroxides*. Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2001. **16**(2): p. 65-71.
84. Fukuzaki, S., H. Urano, and K. Nagata, *Adsorption of bovine serum albumin onto metal oxide surfaces*. Journal Of Fermentation And Bioengineering, 1996. **81**(2): p. 163-167.
85. H. Urano, S.F., *Influence of Anionic Compounds on Adsorption Behaviour of Bovine Serum Albumin at Oxide-Water Interfaces*. Journal Of Fermentation And Bioengineering, 1997. **83**(3): p. 261-266.
86. C. P. Sharma, M.C.S., *Albumin Adsorption on to aluminium oxide and polyurethane surfaces*. Biomaterials, 1990. **11**: p. 255-257.
87. Monash, P., A. Majhi, and G. Pugazhenth, *Separation of bovine serum albumin (BSA) using gamma-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-clay composite ultrafiltration membrane*. Journal Of Chemical Technology And Biotechnology. **85**(4): p. 545-554.
88. K. Rezwani, L.P.M., M. Rezwani, J. Vörös, M. Textor, L. J. Gauckler, *Bovine Serum Albumin Adsorption onto colloidal Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Particles: A new Model Based on Zeta Potential and UV-Vis-Measurements*. Langmuir, 2004. **20**: p. 10055-10061.
89. Thomsen, M.S. and B. Nidetzky, *Microfluidic reactor for continuous flow biotransformations with immobilized enzymes: The example of lactose hydrolysis by a hyperthermophilic beta-glycoside hydrolase*. Engineering In Life Sciences, 2008. **8**(1): p. 40-48.
90. Tepper, F., L. Kaledin, and T. Kaledin, *Non-Woven Electrostatic Media for Chromatographic Separation of Biological Particles*. Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2009. **32**(5): p. 607-627.
91. Cloud, A.N., et al., *Protein adsorption on low temperature alpha alumina films for surgical instruments*. Surface & Coatings Technology, 2008. **203**(5-7): p. 913-917.
92. Atkins, *Physikalische Chemie*, ed. W. VCH. Vol. 3. 2001, Weinheim.
93. Sander, *Synthese schichtsilikathaltiger Polymerdisks zur Aufreinigung oberflächenaktiver Substanzen*, in *Institut für Technische Chemie*. 2008, Leibniz Universität: Hannover.
94. Ralla, *Untersuchungen zur Anwendung anorganischer Adsorbentien für die Separation biologisch aktiver Substanzen*, in *Institut für Technische Chemie*. 2008, Leibniz Universität: Hannover.
95. Sohling, U., et al., *Natural mixture of silica and smectite as a new clayey material for industrial applications*. Clay Minerals, 2009. **44**(4): p. 525-537.
96. Ralla, S., *Adsorption and Separation by a synthetic Hydrotalcite*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, in review.
97. Bozgeyik, K. and T. Kopac, *Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Metal Oxides: Adsorption Equilibrium and Kinetics onto Alumina and Zirconia*. International Journal Of Chemical Reactor Engineering. **8**.
98. Soliman, N.A., et al., *Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from Geobacillus thermoleovorans YN*

- isolated from desert soil in Egypt*. *Process Biochemistry*, 2007. **42**(7): p. 1090-1100.
99. Ateslier, Z.B.B. and K. Metin, *Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic Bacillus sp.* *Enzyme And Microbial Technology*, 2006. **38**(5): p. 628-635.
  100. Park, I.H., et al., *Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Cold-Adapted Lipase Produced by Acinetobacter baumannii BD5*. *Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 2009. **19**(2): p. 128-135.
  101. Necina, R., K. Amatschek, and A. Jungbauer, *Capture of human monoclonal antibodies from cell culture supernatant by ion exchange media exhibiting high charge density*. *Biotechnology And Bioengineering*, 1998. **60**(6): p. 689-698.
  102. Ralla, K., et al., *Application of conjoint liquid chromatography with monolithic disks for the simultaneous determination of immunoglobulin G and other proteins present in a cell culture medium*. *Journal Of Chromatography A*, 2009. **1216**(13): p. 2671-2675.
  103. Ljunglof, A., et al., *Ion exchange chromatography of antibody fragments*. *Biotechnology And Bioengineering*, 2007. **96**(3): p. 515-524.
  104. Johansson, B.L., et al., *Preparation and characterization of prototypes for multi-modal separation media aimed for capture of negatively charged biomolecules at high salt conditions*. *Journal Of Chromatography A*, 2003. **1016**(1): p. 21-33.
  105. Johansson, B.L., et al., *Preparation and characterization of prototypes for multi-modal separation aimed for capture of positively charged biomolecules at high-salt conditions*. *Journal Of Chromatography A*, 2003. **1016**(1): p. 35-49.
  106. Salis, A., M. Monduzzi, and B.W. Ninham, *Hofmeister Effects in Enzymatic Activity, Colloid Stability and pH Measurements: Ion-Dependent Specificity of Intermolecular Forces*, in *Nanoparticles And Nanodevices In Biological Applications - The Infn Lectures - Vol I*. 2009, Springer-Verlag Berlin: Berlin. p. 159-194.
  107. Bauduin, P., et al., *The influence of structure and composition of a reverse SDS microemulsion on enzymatic activities and electrical conductivities*. *Journal Of Colloid And Interface Science*, 2005. **292**(1): p. 244-254.
  108. Eppler, R.K., et al., *Biocatalyst activity in nonaqueous environments correlates with centisecond-range protein motions*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 2008. **105**(41): p. 15672-15677.
  109. Viparelli, P., et al., *Effect of quaternary ammonium salts on the hydrolysis of N-glutaryl-L-phenylalanine catalysed by alpha-chymotrypsin*. *Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2004. **28**(2-3): p. 101-110.
  110. Moraes, R.P., et al., *Influence of the Type of Quaternary Ammonium Salt Used in the Organic Treatment of Montmorillonite on the Properties of Poly(Styrene-co-Butyl Acrylate)/Layered Silicate Nanocomposites Prepared by In Situ Miniemulsion Polymerization*. *Journal Of Applied Polymer Science*. **119**(6): p. 3658-3669.
  111. de Paiva, L.B., A.R. Morales, and F.R. Valenzuela Díaz. *Organoclays: Properties, preparation and applications*. 2008; 1-2:[8]. Available from:

112. Saltati, K. and A. Sari, *Sorption capacity and thermodynamic properties of natural Turkish (Resadiye) bentonite for the removal of ammonium ions from aqueous solution*. Adsorption Science & Technology, 2006. **24**(9): p. 749-760.
113. Lindsay, C.D. and R.H. Pain, *Refolding And Assembly Of Penicillin Acylase, An Enzyme Composed Of 2 Polypeptide-Chains That Result From Proteolytic Activation*. Biochemistry, 1991. **30**(37): p. 9034-9040.
114. Heu, M.S., H.R. Kim, and J.H. Pyeun, *COMPARISON OF TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN FROM THE VISCERA OF ANCHOVY, ENGRAULIS-JAPONICA*. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 1995. **112**(3): p. 557-567.
115. Klomkiao, S., H. Kishimura, and S. Benjakul, *Trypsin from the Pyloric Ceca of Pectoral Rattail (Coryphaenoides pectoralis): Purification and Characterization*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(15): p. 7097-7103.
116. Kambourova, M., et al., *Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic Bacillus stearothermophilus MC 7*. Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2003. **22**(5-6): p. 307-313.
117. Tziaila, A.A., et al., *Effective immobilization of Candida antarctica lipase B in organic-modified clays: application for the epoxidation of terpenes*. Materials Science & Engineering: B (Advanced Functional Solid-State Materials), 2009. **165**(3): p. 173-177.
118. Kamiya, T., et al., *Immobilization of lipase on organic-modified clay compounds and their catalytic properties*. Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **62**(1): p. 122-122.
119. Katiyar, A., et al., *Investigation of the mechanism of protein adsorption on ordered mesoporous silica using flow microcalorimetry*. Journal of Chromatography A. **1217**(10): p. 1583-1588.
120. Laszlo, J.A., M. Jackson, and R.M. Blanco, *Active-site titration analysis of surface influences on immobilized Candida antarctica lipase B activity*. Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **69**(1-2): p. 60-65.
121. Moulin, A., et al., *PURIFICATION OF A LIPASE FROM THE LATEX OF EUPHORBIA-CHARACIAS USING AN APOLAR SOLVENT-EXTRACTION METHOD*. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences, 1992. **314**(8): p. 337-342.
122. Moulin, A., M. Teissere, and C. Bernard, *LIPASES OF THE EUPHORBIAEAE FAMILY - PURIFICATION OF A LIPASE FROM EUPHORBIA-CHARACIAS LATEX AND STRUCTURE-FUNCTION-RELATIONSHIPS WITH THE B-CHAIN OF RICIN*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(24): p. 11328-11332.
123. Royter, M., et al., *Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus SOL1 and Caldanaerobacter subterraneus subsp tengcongensis*. Extremophiles, 2009. **13**(5): p. 769-783.
124. Ewis, H.E., A.T. Abdelal, and C.D. Lu, *Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from Geobacillus stearothermophilus*. Gene, 2004. **329**: p. 187-195.

125. Becker, P., et al., *Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile Bacillus sp. IHI-91 on olive oil*. Applied Microbiology And Biotechnology, 1997. **48**(2): p. 184-190.
126. Wood, A.N.P., R. Fernandezlafuente, and D.A. Cowan, *Purification And Partial Characterization Of A Novel Thermophilic Carboxylesterase With High Mesophilic Specific Activity*. Enzyme And Microbial Technology, 1995. **17**(9): p. 816-825.
127. Pai, C.K., et al., *Prediction of optimum reaction conditions for the thermo-tolerant acetylxylnan esterase from Neocallimastix patriciarum using the response surface methodology*. Journal Of Chemical Technology And Biotechnology. **85**(5): p. 628-633.
128. Kim, H.K., S.Y. Park, and T.K. Oh, *Purification and partial characterization of thermostable carboxyl esterase from Bacillus stearothermophilus L1*. Journal Of Microbiology And Biotechnology, 1997. **7**(1): p. 37-42.
129. Kademi, A., et al., *Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile Bacillus circulans*. Applied Microbiology And Biotechnology, 2000. **54**(2): p. 173-179.
130. Lopez-Miranda, S., et al., *Effect of ripening on protein content and enzymatic activity of Crimson Seedless table grape*. Food Chemistry. **127**(2): p. 481-486.
131. Uyanik, A., N. Sen, and M. Yilmaz, *Improvement of catalytic activity of lipase from Candida rugosa via sol-gel encapsulation in the presence of calix(aza)crown*. Bioresource Technology. **102**(6): p. 4313-4318.
132. Terahara, T., et al., *Direct cloning and expression of putative esterase genes from environmental DNA*. Enzyme And Microbial Technology. **47**(1-2): p. 17-23.
133. Cui, W., et al., *Purification and characterization of an intracellular carboxylesterase from Arthrobacter viscosus NRRL B-1973*. Enzyme And Microbial Technology, 1999. **24**(3-4): p. 200-208.
134. Chungool, W., et al., *Production, purification, and characterization of acetyl esterase from Streptomyces sp PC22 and its action in cooperation with xylanolytic enzymes on xylan degradation*. World Journal Of Microbiology & Biotechnology, 2008. **24**(4): p. 549-556.
135. Palekar, A.A., P.T. Vasudevan, and S. Yan, *Purification of lipase: A review*. Biocatalysis and Biotransformation, 2000. **18**(3): p. 177-200.
136. Kagedal, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*. Second ed. Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods and Applications, ed. R. Janson. 1998, New York: Wiley VCH.
137. Gutierrez, R., E.M.M. del Valle, and M.A. Galan, *Immobilized metal-ion affinity chromatography: Status and trends*. Separation and Purification Reviews, 2007. **36**(1): p. 71-111.
138. de Goes, L.C., E.A. Miranda, and S.M.A. Bueno, *Interaction of histidine-tagged human proinsulin with immobilized nickel ion: Effect of chelating ligand and thermodynamics analysis*. Colloids and Surfaces a- Physicochemical and Engineering Aspects. **369**(1-3): p. 176-185.

139. Rudolph-Linke, *Zinksalze von Fett- und Carbonsäuren als geruchslöschende Verbindungen*, in *Institut für Anorganisch Chemie*. 1997, Gerhard-Mercator-Universität-Gesamthochschule: Duisburg.
140. Hayes, R.B., *The carcinogenicity of metals in humans*. *Cancer Causes & Control*, 1997. **8**(3): p. 371-385.
141. Beck, W. and H. Engelhardt, *CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF ORGANIC AND INORGANIC CATIONS WITH INDIRECT UV DETECTION*. *Chromatographia*, 1992. **33**(7-8): p. 313-316.
142. Wu, N., et al., *SPECIATION OF ALUMINUM USING CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS WITH INDIRECT UV DETECTION*. *Journal of Chromatography*, 1993. **635**(2): p. 307-312.
143. Winkler, U.K. and M. Stuckmann, *GLYCOGEN, HYALURONATE, AND SOME OTHER POLYSACCHARIDES GREATLY ENHANCE THE FORMATION OF EXOLIPASE BY SERRATIA-MARCESCENS*. *Journal of Bacteriology*, 1979. **138**(3): p. 663-670.
144. Ghose, T.K., *MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES*. *Pure and Applied Chemistry*, 1987. **59**(2): p. 257-268.
145. Miller, G.L., *USE OF DINITROSALICYLIC ACID REAGENT FOR DETERMINATION OF REDUCING SUGAR*. *Analytical Chemistry*, 1959. **31**(3): p. 426-428.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Friederike Sander
Geburtsdatum	12.04.1983
Geburtsort	Stadthagen
Familienstand	ledig

### Schulische Ausbildung

1989- 1992	Grundschule an der Bergkette in Stadthagen
1992- 1994	Orientierungsstufe in Stadthagen
1994- 2002	Wilhelm-Busch-Gymnasium Stadthagen
2002	Abschluss mit dem Abitur

### Hochschulausbildung

2002- 2008	Studium an der Leibniz Universität Hannover
07/2007- 01/2008	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover. Thema: Synthese schichtsilikathaltiger Polymerdisks zur Aufreinigung oberflächenaktiver Substanzen
Seit 04/2008	Promotionsstudium an der Leibniz Universität Hannover unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

### Beruflicher Werdegang

02/04- 08/04	Studentische Hilfskraft am Institut für Maschinenelemente, Konstruktionstechnik und Tribologie der Leibniz Universität Hannover
04/2008- 03/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover



## Veröffentlichungen

### Artikel:

K. Ralla, F. Sander, U. Sohling, K. Suck, C. Kasper, F. Ruf, T. Scheper: Adsorption and Separation of proteins by a synthetic hydrotalcite, in review.

### Mündliche Präsentationen:

F. Sander, S. Beutel, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, K. Koehler, A. Thiefes, T. Scheper: Characterisation of New Alumina-Based Chromatography Materials for Enzyme Purification, 5<sup>th</sup> International Congress on Biocatalysis 2010, Hamburg.

F. Sander, K. Ralla, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, T. Scheper: Application of inorganic adsorbents as ion exchangers for protein purification, 28. Dechema-Jahrestagung der Biotechnologen 2010, Aachen.

### Posterpräsentationen:

F. Sander, S. Beutel, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, T. Scheper: Anwendung von Aluminiumoxiden zur Enzymseparation, BMBF-Biokatalyse2021 Workshop 2009, Kiel.

F. Sander, S. Beutel, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, K. Koehler, A. Thiefes, T. Scheper: Application of inorganic adsorbents for enzyme purification, 28. Dechema-Jahrestagung der Biotechnologen 2010, Aachen.