

Neue Applikationen der Enzymaufreinigung

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation von

Sarah Schreiber, M. Sc.
geboren am 25.11.1987 in Hamburg

2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 17.11.2017

*In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten
vor unseren Augen erstreckt.*

Sir Isaac Newton
(1642 - 1726)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen haben. An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis zu promovieren und für die Bereitstellung eines spannenden Themas. Außerdem gilt mein Dank Prof. Dr. Ursula Rinas für die Übernahme des Korreferats sowie PD Dr. Ulrich Krings für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Sascha Beutel für die kompetente Betreuung und seine wertvollen Ratschläge während meiner Zeit am Institut für Technische Chemie bedanken. Vielen Dank für die Möglichkeiten auf zahlreiche Konferenzen zu fahren und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Allen Mitgliedern der AG Beutel danke ich für die tolle Atmosphäre und die Unterstützung.

Auch bei Caro und Wolfgang bedanke ich mich für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Herzlich danke ich Ulrike Dreschel, Cornelia Alic, Friedbert Gellermann und ganz besonders Martina Weiß und Thorleif Hentrop für ihre großartige Unterstützung beim Aufbau meiner Anlage.

Bei meiner Masterandin Chantal Brämer sowie meinen Bachelorandinnen Funmilola Heinen und Insa Haacke bedanke ich mich für ihr wissenschaftliches Engagement und die Unterstützung bei Teilprojekten meiner Arbeit. Chanti, dir wünsche ich alles Gute für deine Promotion.

Danke auch an Caro, Daniel, Anne und Kathrin, ihr habt mich so herzlich aufgenommen, dass ich mich in Hannover gleich wie Zuhause gefühlt habe. Es war eine unvergessliche Zeit mit euch! Dem Büro 163 danke ich für die konspirativen Gespräche im Arbeitsalltag. Außerdem sind noch einige Personen zu nennen, die meine Zeit am TCI bereichert haben: Pia, Ingo, Thore, Maren und Lena. Aber auch allen anderen TCILern gilt mein Dank für tolle 3 Jahre!

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir in jeglicher Hinsicht den Rücken gestärkt und an meinen Weg geglaubt haben. Danken möchte ich auch meinem Verlobten Tobias für seine Geduld und seinen Optimismus. Am Ende wird manchmal doch alles gut!

Abstract

White biotechnology uses natural processes to provide environmentally-friendly and economical alternatives to conventional chemical processes. Enzymes are used as catalysts in various reactions. The fields of application range from chemical industry, through food industry to pharmaceutical industry. Enzymes can be produced in microorganisms. In order to produce sufficiently pure enzyme for large-scale applications, the focus of this work lies on the purification of the proteins.

This work describes two different applications of enzyme purification. In the first sub-project, within the scope of sustainable biocatalysis, novel techniques to reuse enzymes were investigated in order to obtain economical processes. The focus lay on testing novel carrier materials, which are suitable to bind a large amount of enzymes and lead to high stability and activity of the enzyme. Therefore, depth filters were coated with various polyelectrolytes by layer-by-layer (LbL) technology. The optimal coatings of the depth filters were determined by means of the binding capacity and enzyme activity. As model enzyme, one of the most used biocatalysts *Candida antarctica* lipase B (CalB) was used. Various influencing factors such as ionic strength, pH value and temperature were examined. The long-term stability and the multiple usability of loaded depth filters were evaluated. After successful characterization, the depth filters were used for direct capture, the binding of enzyme from culture supernatant.

In the second sub-project of this work, a compact purification plant was developed to purify CalB in a continuous manner. Therefore, a periodic counter-current chromatography system was established. After the system was characterized, the purification was tested in long-term operation using various model proteins, CalB, Lysozyme and Bovine Serum Albumin (BSA).

Keywords: enzymes, biocatalysis, depth filter, protein purification, periodic counter-current chromatography

Zusammenfassung

Die weiße Biotechnologie nutzt natürliche Prozesse, um umweltfreundliche und ökonomische Alternativen zu konventionellen chemischen Prozessen zu bieten. Dabei kommen Enzyme zum Einsatz, die als Katalysatoren bei verschiedenen Reaktionen beteiligt sind. Die Anwendungsgebiete reichen dabei von der chemischen Industrie über die Lebensmittelindustrie bis hin zur pharmazeutischen Industrie. Mit Hilfe von Mikroorganismen können Enzyme hergestellt werden. Um für großtechnische Anwendungen ausreichend reines Enzym zu produzieren, liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Aufreinigung der Proteine, da bei diesem Prozessschritt die meisten Kosten anfallen.

Diese Arbeit beschreibt zwei verschiedene Applikationen der Enzymaufreinigung. Im ersten Teilprojekt sollen in Hinblick auf nachhaltige Biokatalyse Möglichkeiten gefunden werden, Enzyme mehrfach zu verwenden, um die Wirtschaftlichkeit der Prozesse zu steigern. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Testung neuartiger Trägermaterialien, die besonders gut geeignet sind, eine große Menge Enzym bei hoher Stabilität und Aktivität der Enzyme zu binden. Dafür wurden Tiefenfilter mit der Layer-by-Layer (LbL)-Technologie mit verschiedenen Polyelektrolyten beschichtet. Anhand der Bindungskapazität und der Enzymaktivität wurde die optimale Beschichtung der Filter bestimmt. Als Modellenzym diente einer der meistgenutzten Biokatalysatoren, die *Candida antarctica* lipase B (CalB). Anschließend wurden verschiedene Einflussfaktoren, wie die Ionenstärke, der pH-Wert und die Temperatur, untersucht. Auch die Langzeitstabilität und die Mehrfachverwendbarkeit beladener Tiefenfilter wurden evaluiert. Nach erfolgreicher Charakterisierung wurden die Filter beim Direct Capture, dem Binden von Enzym direkt aus Kulturüberstand, eingesetzt.

Im zweiten Teilprojekt soll eine kompakte Aufreinigungsanlage entwickelt werden, um CalB kontinuierlich aufzureinigen. Dafür wird eine Periodic Counter-Current Chromatographie-Anlage aufgebaut. Nach erfolgter Charakterisierung der Anlage wird die Aufreinigung anhand verschiedener Modellproteine, CalB, Lysozym und Bovines Serum Albumin (BSA), im Langzeitbetrieb getestet.

Schlagwörter: Enzyme, Biokatalyse, Tiefenfilter, Proteinaufreinigung, Periodic Counter-Current Chromatographie

Publikationsliste

Fachartikel

S. Schreiber (100 %), A. Thiefes, U. Schuldt, L. Dähne, T. Scheper, S. Beutel, New application of depth filters for the immobilization of *Candida antarctica* lipase B, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2017**

I. de Vries, **S. Schreiber** (30 %), D. Boßmann, Z. Hellmann, J. Kopatz, H. Neumann, S. Beutel, T. Scheper, Single-use membrane adsorbers for endotoxin removal and purification of endogenous polysialic acid from *Escherichia coli* K1, *Biotechnology Reports*, **accepted**

C. Brämer, **S. Schreiber** (40 %), T. Scheper, S. Beutel, Continuous purification of *Candida antarctica* lipase B with 3-membrane adsorber periodic counter-current chromatography, **in progress**

Vorträge

S. Schreiber, T. Scheper, S. Beutel, Purification of lipase CalB with parallelly operated membrane adsorber, *17th European Congress on Biotechnology*, Krakow, Poland, **2016**

S. Schreiber, T. Scheper, S. Beutel, Aufreinigung der Lipase CalB mit parallel betriebenen Membranadsorbern, *ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen*, Aachen, Deutschland, **2016**

S. Schreiber, C. Brämer, T. Scheper, S. Beutel, Integrated continuous purification of model proteins with three-column periodic counter-current chromatography, *13th International PhD Seminar on Chromatographic Separation Science*, Trifels, Deutschland, **2017**

S. Schreiber, C. Brämer, T. Scheper, S. Beutel, Three-column periodic counter-current chromatography - Purification of model proteins, *Himmelfahrtstagung 2017: Models for Developing and Optimising Biotech Production*, Neu-Ulm, Deutschland, **2017**

Posterbeiträge

S. Schreiber, P. Jonczyk, A. Thiefes, U. Schuldt, L. Dähne, T. Scheper, S. Beutel, New application of depth filters for the immobilization of lipase, *7th International Congress on Biocatalysis*, Hamburg, Deutschland, **2014**

S. Schreiber, T. Scheper, S. Beutel, Membrane ion exchange chromatography for purification of *Candida Antarctica* lipase B, *8th International Congress on Biocatalysis*, Hamburg, Deutschland, **2016**

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Zusammenfassung	II
Publikationsliste	III
Nomenklatur	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	2
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Tiefenfilter für die diskontinuierliche Enzymaufreinigung	3
2.1.1 Anwendungsgebiete von Tiefenfiltern	3
2.1.2 Modifizierung der Filter mit der Layer-by-Layer-Technologie	5
2.2 Kontinuierliches Downstream Processing	7
2.2.1 Continuous Annular Chromatography (CAC)	8
2.2.2 Simulated Moving Bed (SMB) Chromatographie	10
2.2.3 Periodic Counter-Current (PCC) Chromatographie	11
2.2.3.1 Membranadsorber	16
2.3 Verwendete Modellproteine	17
2.3.1 <i>Candida antarctica</i> lipase B (CalB)	17
2.3.2 Lysozym	21
2.3.3 <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	21
3 Untersuchung von modifizierten Tiefenfiltern zur Enzymaufreinigung	24
3.1 Verwendung von modifizierten Tiefenfilterschichten	25
3.2 Aufreinigung der <i>Candida antarctica</i> lipase B mit Tiefenfiltern	28
3.2.1 Einfluss verschiedener Immobilisierungskonditionen	29
3.2.2 Langzeitstabilität bei verschiedenen Lagerbedingungen	31

3.2.3	Haltbarkeit von Trägermaterialien	33
3.3	Aufreinigung von CalB aus <i>E.-coli</i> -Lysat	35
3.4	Fazit	36
4	Periodic Counter-Current Chromatographie	38
4.1	Etablierung einer PCC-Einheit	38
4.1.1	State of the Art	38
4.1.2	Planung und Aufbau der Versuchsanlage	39
4.1.3	Automatisierung der Anlage	44
4.1.4	Charakterisierung der PCC	47
4.1.4.1	Bestimmung der Integrationszeit	48
4.1.4.2	Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze	49
4.1.5	Fazit	51
4.2	Validierung der PCC-Einheit für die Trennung von BSA und Lysozym	52
4.2.1	Methodenentwicklung zur Trennung von BSA und Lysozym	52
4.2.1.1	Bindungsexperiment	53
4.2.1.2	Kapazitätsbestimmung	54
4.2.1.3	Bestimmung der Doppeldurchbruchskurve	55
4.2.2	Transfer auf die PCC-Anlage	57
4.2.3	Fazit	62
4.3	Aufreinigung von CalB mit der PCC-Einheit	64
4.3.1	Methodenentwicklung	64
4.3.1.1	Bindungsexperimente	65
4.3.1.2	Kapazitätsbestimmung	68
4.3.1.3	Bestimmung der Doppeldurchbruchskurve	69
4.3.2	Transfer auf die PCC-Anlage	70
4.3.3	Fazit	74
5	Zusammenfassung und Ausblick	76
A	Materialien	81
A.1	Chemikalien	81
A.2	Verbrauchsmaterialien	83
A.3	Kulturmedien, Puffer, Reagenzlösungen	84
A.4	Biomoleküle, Vektoren, Zellen	88

B Methoden	90
B.1 Enzymimmobilisierung	90
B.1.1 Enzymaktivitätsassay mit <i>p</i> -NPA	90
B.2 Proteinanalytik	91
B.2.1 SDS-PAGE	91
B.2.2 Färbemethoden der SDS-PAGE Gele	92
B.2.2.1 Coomassie Färbung	92
B.2.2.2 Silberfärbung	92
B.2.3 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford	92
B.3 Chromatographie	93
B.3.1 Ionenaustauschchromatographie	93
B.3.2 PCC-Einheit	94
B.4 Proteinexpression	96
B.4.1 Transformation mittels Hitzeschock-Methode	96
B.4.2 Glycerin-Stammkultur	97
B.4.3 Kultivierung im Schüttelkolben	97
B.4.4 Zellaufschluss mittels Ultraschall	98
C Ergänzende Daten	99
C.1 Programmablauf Modulare PCC	99
C.2 Programmablauf BSA	102
C.3 Programmablauf CalB	108
D Mitarbeit an Experimenten	115
Abbildungsverzeichnis	120
Tabellenverzeichnis	122
Literaturverzeichnis	135
Lebenslauf	136

Nomenklatur

AEX	Anion Exchange Chromatography
Asp	Asparagin
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BFM	Biofeuchtmasse
BSA	Bovine Serum Albumin
CAC	Continuous Annular Chromatography
CalB	<i>Candida antarctica</i> lipase B
CEX	Cation Exchange Chromatography
DB	Dynamische Bindungskapazität
DB ₁₀	Dynamische Bindungskapazität bei 10 % des Durchbruchs
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSP	Downstream Processing
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	Food and Drug Administration
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HCDC	High Cell-Density Culture
HCP	Host Cell Proteins
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
His	Histidin
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
LbL	Layer-by-Layer
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MA	Membranadsorber
mAb	Monoklonale Antikörper
OD	Optische Dichte
PAH	Polyallylamin-Hydrochlorid

PAT	Process Analytical Tool
PCC	Periodic Counter-Current Chromatography
PEI	Polyethylenimin
pI	Isoelektrischer Punkt
<i>p</i> -NP	<i>para</i> -Nitrophenol
<i>p</i> -NPA	<i>para</i> -Nitrophenolacetat
PSS	Poly(Natrium-4-styrolsulfonat)
QbD	Quality by Design
REM	Rasterelektronenmikroskop
RP	Reversed Phase
rpm	Revolutions per Minute
sc1	Switching Condition 1
sc2	Switching Condition 2
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEC	Size Exclusion Chromatography
Ser	Serin
SMB	Simulated Moving Bed
SOC-Medium	Super Optimal Broth with Catabolite Repression Medium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	True Moving Bed
USP	Upstream Processing
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

Enzyme sind aus unserem Alltag nicht mehr wegzudenken und kommen bei zahlreichen Produkten während der Herstellung und Verarbeitung zum Einsatz. Enzyme sind meistens Proteine und dienen als Katalysator biochemischer Reaktionen; daher werden sie auch als Biokatalysatoren bezeichnet. In der Enzym-Datenbank BRENDA sind 77.000 Enzyme aus mehr als 30.000 verschiedenen Organismen hinterlegt.

Das Haupteinsatzgebiet von Enzymen liegt bei den technischen Anwendungen, vor allem in der Textil- und chemischen Industrie. Sie werden als Zusatz bei Waschmitteln eingesetzt, um Flecken auch bei niedrigen Temperaturen leichter zu entfernen. Beim Gerben von Leder helfen Enzyme, das Leder weicher zu machen. Dadurch kann im späteren Prozess der Wasserverbrauch reduziert werden. Aber auch in der Lebensmittelindustrie werden Enzyme eingesetzt, zum Beispiel bei der Herstellung von Bier, um die Stärke leichter in Zucker und dann in Alkohol umzuwandeln, oder in Teigwaren, damit diese lockerer und haltbarer werden. Weitere Einsatzgebiete von Enzymen sind die Futtermittelproduktion, die Herstellung von Biokraftstoffen oder die Herstellung von Pharmazeutika (z. B. Vitamin B₂). Der Einsatz von Enzymen hat sowohl ökologische als auch ökonomische Vorteile, da oftmals Rohstoffe, Zeit und Energie eingespart werden können.

Die moderne Biotechnologie ermöglicht die Produktion zahlreicher Enzyme in Mikroorganismen sowie die gezielte Herstellung maßgeschneiderter und optimierter Enzyme für bestimmte Anwendungszwecke. Die Aufreinigung von Enzymen zum hochreinen Produkt ist oftmals kompliziert und kann bis zu 80 % der gesamten Produktionskosten ausmachen. Besonders für großtechnische Prozesse, in denen Enzyme zum Einsatz kommen, müssen die Kosten für die Biokatalysatoren gering sein. Daher bietet die Aufreinigung das größte Optimierungspotenzial.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, durch neue methodische Ansätze konventionelle Aufreinigungsmaterialien für die Enzymaufreinigung zu optimieren. Für beide Ansätze dient das industriell relevante, dennoch anspruchsvoll aufzureinigende Enzym *Candida antarctica* lipase B (CalB), anhand dessen die grundlegende Machbarkeit der zwei grundsätzlich unterschiedlichen Verfahren belegt werden soll.

Zum einen werden beschichtete Tiefenfilter, die in der Regel zur Klärung von Zellkulturbrühe gedacht sind, als Trägermaterialien verwendet. Mit dieser Methode ist es nicht nur möglich, Enzyme zu binden und Umsatzreaktionen durchzuführen, sondern auch Enzyme direkt aus dem Kulturüberstand zu gewinnen. Die Tiefenfilter werden mit der Layer-by-Layer (LbL)-Technologie mit verschiedenen anionischen und kationischen Polymeren beschichtet. Die verschiedenen Beschichtungen werden hinsichtlich der Bindungskapazität und der resultierenden Aktivität der gebundenen CalB bewertet. Es werden verschiedene Einflussfaktoren wie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke des Puffersystems untersucht. Des Weiteren werden die Langzeitstabilität und die Mehrfachverwendbarkeit mit Enzymen beladener Tiefenfilter evaluiert. Um den praktischen Einsatz im Bereich der Produktisolierung zu testen, soll CalB direkt aus Kulturbrühe aufgereinigt werden, um anschließend katalytische Umsatzreaktionen durchzuführen.

Weiterhin soll die Kapazitätsausschöpfung chromatographischer Materialien/Medien durch eine intelligente Anlagensteuerung optimiert werden. Dafür werden Membranadsorber-Einheiten seriell und zyklisch angeordnet, um das Prinzip der Periodic Counter-Current (PCC) Chromatographie umzusetzen. Diese Anlage funktioniert vollautomatisch und dient der kontinuierlichen Aufreinigung biotechnologisch hergestellter Proteine. Zunächst soll die Anlage anhand der Aufreinigung eines binären Gemisches aus BSA und Lysozym getestet werden. Nach erfolgreicher Testung der Anlage anhand dieser einfachen Aufreinigungsaufgabe soll im nächsten Schritt CalB kontinuierlich aus *E.-coli*-Lysat aufgereinigt werden. Im Langzeitbetrieb wird getestet, ob die Anlage sich für die Aufreinigung eines realen Trennungproblems eignet.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Tiefenfilter für die diskontinuierliche Enzymaufreinigung

Um den industriellen Bedarf an Biokatalysatoren zu decken, können Enzyme durch Aufreinigung in hochreiner Form gewonnen oder durch Immobilisierung an eine Trägermatrix für die mehrfache Wiederverwendung gebunden werden. Für beide Methoden sind die Eigenschaften der Enzyme sowie der Trägermaterialien von Bedeutung. Um eine Bindung an das Trägermaterial zu gewährleisten, müssen die ionischen und adsorptiven Eigenschaften sowie die Größe des Enzyms berücksichtigt werden. Die schnelle Entwicklung in den Materialwissenschaften ermöglicht den Zugang zu neuen Trägermaterialien mit verschiedenen Eigenschaften [1]. Die Trägermaterialien können aus synthetisch-organischen Polymeren, Biopolymeren oder anorganischen Polymeren bestehen [2]. Zusätzlich können die Oberflächen modifiziert werden, um ein größeres Portfolio an Trägern zu erstellen.

2.1.1 Anwendungsgebiete von Tiefenfiltern

Tiefenfilter werden häufig bei der Herstellung von Biopharmazeutika eingesetzt, um Partikel (z. B. ganze Zellen, Zelltrümmer, Kolloide und Kontaminanten) aus der Flüssigphase zu entfernen. Sie bestehen meist aus Verbundwerkstoffen (Zellulose und Kieselerde) [3, 4, 5]. Tiefenfilter haben eine nominelle Abscheiderate von 10 - 50 μm und können mehr als 98 % der Schwebstoffe/Feststoffe aus dem Prozess entfernen [6, 7, 8, 9].

In Abbildung 2.1 ist der Trennmechanismus von Tiefenfiltern dargestellt. Die Partikel werden über Einschluss und/oder Adsorption abgetrennt [10].

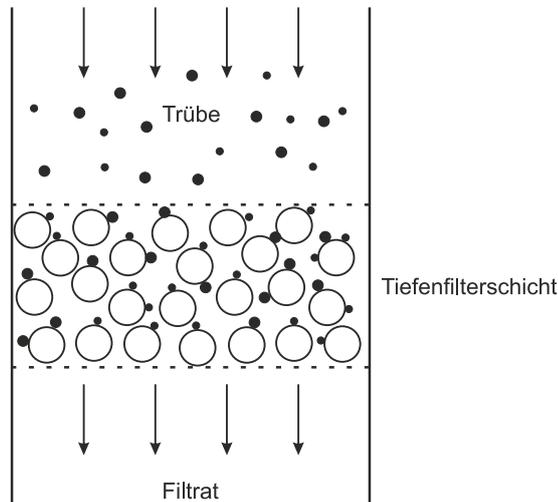


Abbildung 2.1: Schematische Abbildung des Prinzips der Tiefenfiltration, adaptiert nach [10].

In Abbildung 2.2 ist eine Rasterelektronenmikroskop (REM) Aufnahme eines Tiefenfilterquerschnitts gezeigt. Die Zellulosefasern bilden eine Matrix, in der das Filterhilfsmittel (Kieselgur) eingeschlossen ist. Die beiden Komponenten bilden eine hochporöse Struktur mit einer Vielzahl miteinander verbundener Strömungskanäle [11].

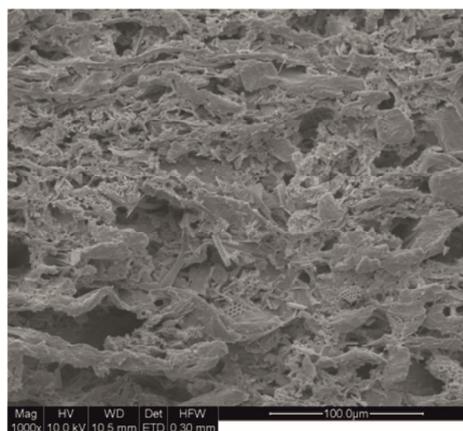


Abbildung 2.2: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme eines Tiefenfilterquerschnitts. Das Filterhilfsmittel (Kieselgur) ist in den Maschen der Zellulosefasern eingeschlossen [11].

Die Tiefenfilter werden in einem klassischen Nassverfahren hergestellt. Dabei wird eine Zellosuspension mit dem Filterhilfsmittel und einem polymeren Bindemittel vermischt. Das Gemisch wird auf ein Netz aufgetragen, entwässert und im Ofen getrocknet. Das Bindemittel reagiert bei erhöhten Temperaturen mit der Zellulose, dadurch wird die Festigkeit bei Nässe erhöht [11].

Tiefenfilter werden unter anderem bei der Aufreinigung monoklonaler Antikörper (mAb) eingesetzt, um Verunreinigung (HCP: Host Cell Proteins) adsorptiv zu entfernen [7]. Tiefenfiltration ist eine effektive und kostengünstige Methode, um große Prozessvolumina oder HCDC-Medien (High Cell-Density Culture) zu prozessieren [3]. Heutzutage werden Oberflächenmodifikationen immer interessanter, weil die Membranentwicklung zeitaufwändig, komplex und kostenintensiv ist. Dabei können bereits etablierte Membranen modifiziert werden, um unerwünschte Interaktionen zu minimieren oder um erwünschte Wechselwirkungen (Adsorption, Affinität, ionische Wechselwirkungen) zu erzielen [12].

2.1.2 Modifizierung der Filter mit der Layer-by-Layer-Technologie

Mitte der 1930er Jahre wurde die LB-Technik, die Übertragung von unlöslichen Monolayern von der Wasseroberfläche auf feste Träger, von Langmuir und Blodgett vorgestellt [13]. Seitdem ist das Interesse an ultradünnen Filmen, besonders im Bereich der Materialwissenschaften, gestiegen. Neben den klassischen Materialien (Metalle und anorganische Verbindungen) werden auch organische Verbindungen, Polymere und biologische Komponenten verwendet [14]. In den 1990er Jahren stellten Decher *et. al.* eine Methode zur Herstellung ultradünner organischer Filme vor, die durch die alternierende Adsorption von Polykationen und Polyanionen gebildet werden [14, 15, 16]. In Abbildung 2.3 ist schematisch die Layer-by-Layer (LbL)-Technologie dargestellt. Sie nutzt den elektrostatischen Zug von Polyelektrolyten aus. Daher können geladene Polyanionen an eine positiv geladene Oberfläche adsorbieren, bis diese gesättigt ist. Nach einem Waschschrift, um ungebundene Polyelektrolyte zu entfernen, können Polykationen an den vorherigen Layer adsorbieren.

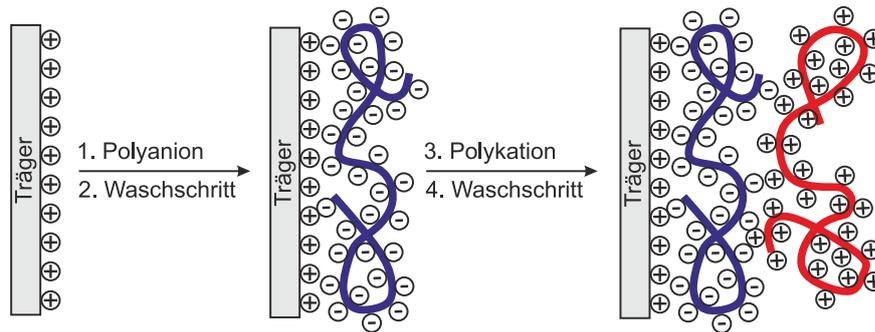


Abbildung 2.3: Vereinfachte Abbildung der Layer-by-Layer-Technologie. Schritte 1 und 3 repräsentieren die zwei Adsorptionsschritte. Zuerst wird der Träger mit Polyanionen (blau), danach mit Polykationen (rot) beladen. Schritte 2 und 4 sind Waschschrte, um ungebundene Ionen zu entfernen. In Wirklichkeit sind die Schichten mehr miteinander verwoben [17, 18], adaptiert nach [14].

Durch die schichtweise Anordnung der Polyelektrolyte wird das Konstrukt stabilisiert und robuster [12]. Diese Methode kann auch umgekehrt (mit Polykation startend) durchgeführt werden und so oft wie gewünscht wiederholt werden. Dabei ist es auch möglich, verschiedene geladene Komponenten, wie Polyelektrolyte, Nukleinsäuren, Polysaccharide, Proteine oder Nanopartikel, miteinander zu kombinieren [17]. Die produzierten Schichten haben dabei Dicken von 1 - 5 nm. Es konnte gezeigt werden, dass in die Polyelektrolytschichten eingelagerte Antikörper weiterhin ihre antigene Aktivität aufrechterhielten, wenn nicht mehr als vier Schichten darüber lagen [19].

Die Auswahl der Trägermaterialien wird hauptsächlich von der nachfolgenden Analytik (zur Überprüfung der Beschichtung) dominiert. So kommen Glas, Quarz, Siliciumscheiben oder mit Gold beschichtete Träger als Materialien zum Einsatz [20]. Aber auch andere Trägermaterialien wie Polymere, Metalle oder Membranen können funktionalisiert werden [21]. Die LbL-Technologie kann für unterschiedliche Anwendungen, wie Immobilisierung, Immunosensing oder als Multienzym-Biokatalysator, genutzt werden [17]. Mit alternierenden Schichten von anti-Immunglobulin G (anti-IgG) und Polystyrolsulfonat (PSS) konnte ein biologisch aktiver Multilayer aufgebaut werden, um IgG zu binden [22]. Auch Proteine können an die Polyelektrolyte eines Multilayers, die auf einer Siliciumdioxidoberfläche aufgebaut wurden, immobilisiert werden [23].

2.2 Kontinuierliches Downstream Processing

Seit mehr als 75 Jahren werden kontinuierliche Prozesse in der Industrie und in der Akademia erforscht, um eine Alternative zu diskontinuierlichen Prozessen (Batch: Satzbetrieb oder Fed-Batch: Zulaufbetrieb) zu schaffen [24]. Kontinuierliche Produktion wird in Bereichen wie Stahlguss, Petrochemie, Chemie, Lebensmittel- und Pharmaindustrie genutzt. In der biotechnologischen Produktion (insbesondere von Therapeutika) sind kontinuierliche Prozesse noch nicht weit verbreitet [25, 26]. In Tabelle 2.1 sind Vor- und Nachteile kontinuierlicher biopharmazeutischer Prozesse dargestellt. Generell aber gilt: Die Art des Produktionsprozess hängt vom jeweiligen Produkt ab.

Tabelle 2.1: Vor- und Nachteile von kontinuierlichen Prozessen

Vorteile	Nachteile
Kostensparnis [25, 27, 28]	Mangel an Homogenität [24]
<ul style="list-style-type: none"> • Produktion in kleinerem Maßstab • geringerer Platzbedarf • Pufferersparnis 	<ul style="list-style-type: none"> • Nährstoffmangel • Zellakkumulation
höhere Automatisierung [25]	keine kurzfristige Flexibilität [24]
<ul style="list-style-type: none"> • niedrigere Arbeitskosten 	
Produktion von instabilen Pharmazeutika [25, 27]	Sterilität [24]
<ul style="list-style-type: none"> • keine Inkubationszeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Aufrechterhaltung im Langzeitbetrieb
Verbesserte Qualität [25, 27, 28]	bessere Kontrolle [27]
<ul style="list-style-type: none"> • weniger biologischer Stress • keine Inkubationszeiten • weniger Degradation • kompatibel mit PAT und QbD 	<ul style="list-style-type: none"> • offline-Analytik nach jedem Prozessschritt

* PAT: Process Analytical Technology, QbD: Quality by Design

Die Herstellung von biotechnologischen Produkten wird in das Upstream Processing (USP) und das Downstream Processing (DSP) unterteilt. Als USP bezeichnet man die Fermentation von Mikroorganismen oder Zellen und alle vorbereitenden Maßnahmen. Seit Jahrzehnten wird kontinuierlich in Perfusionsreaktoren produziert [26, 29]. Mit steigenden Produkttitern und Qualitätsansprüchen an das finale Produkt entfallen 50 - 80 % der gesamten Produktionskosten auf das Downstream Processing [30]. Das DSP umfasst alle Prozessschritte von der Ernte bis zum final aufgereinigten Produkt [31]. Dieser Engpass der Produktionskette erfordert neue optimierte Techniken. Chromatographie scheint die Methode der Wahl zu sein, wenn biologische Wirkstoffe aus z. B. Fermentationsbrühen aufgereinigt werden müssen. Da mit chromatographischen Techniken nahezu jedes Trennproblem lösbar ist, stellen kontinuierliche Chromatographiesysteme eine attraktive und leistungsstarke Option dar [32], die unter anderem auch ökonomische Vorteile wie reduzierten Pufferverbrauch, gesteigerte Kapazitätsausnutzung und kleinere Säulenvolumen zur Folge hat [33].

Im Folgenden werden die drei bekanntesten kontinuierlichen Chromatographie-Methoden Continuous Annular Chromatography (CAC), Simulated Moving Bed (SMB) Chromatographie und Periodic Counter-Current (PCC) Chromatographie vorgestellt.

2.2.1 Continuous Annular Chromatography (CAC)

Die Continuous Annular Chromatography (CAC) wurde 1949 das erste Mal beschrieben [34] und gilt als wirklich kontinuierliche Aufreinigung, die eine Auftrennung von Vielkomponenten-Mixturen (bis zu fünf Substanzen) ermöglicht [35]. Abbildung 2.4 zeigt eine schematische Darstellung der CAC. Dabei bilden zwei konzentrische Zylinder einen ringförmigen Hohlzylinder, in dem sich die stationäre Phase befindet, die vertikal um die zentrale Achse rotiert. Der Feed wird an einer festen Stelle in die annulare Lücke eingeführt, wohingegen der Puffer über das gesamte System verteilt aufgetragen wird. Durch die Rotation bilden sich helikale Komponentenbanden die in verschiedene Produktströme verschiedener Elutionswinkel aufgetrennt werden, so dass die aufgetrennten Komponenten an einer festen Stelle am Auslass aufgefangen werden können [35, 36, 26, 31, 37, 32].

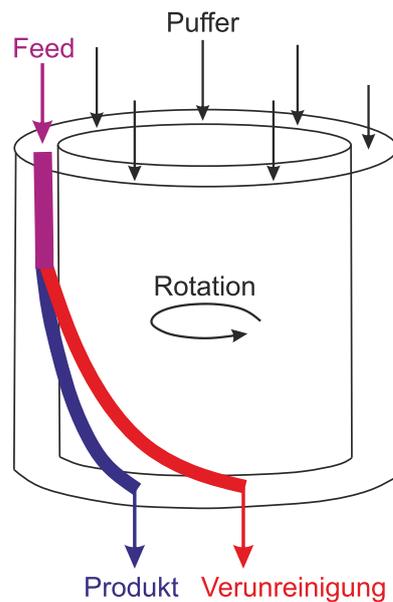


Abbildung 2.4: Schematische Abbildung der Continuous Annular Chromatography (CAC), adaptiert nach [36].

Mit der CAC können alle herkömmlichen Elutionsmethoden (isokratische Elution, Gradientenelution und Displacement Elution) [32], aber auch verschiedene chromatographische Techniken (IEX: Ion Exchange Chromatography, SEC: Size Exclusion Chromatography, RP: Reversed Phase und Mixed Mode) genutzt werden [37]. Mit der CAC war es zum ersten Mal möglich, die Ionenaustauschchromatographie (IEX) kontinuierlich zu nutzen. Mit der Preparative Continuous Annular Chromatography (P-CAC) gelang es der Firma Prior Separation Technology GmbH (Österreich), diese Technik für den Prozessmaßstab zu adaptieren. Die P-CAC kann in jeder Phase des Downstream Processing (vom Capture Step bis hin zum Polishing) angewendet werden [32]. Mit der CAC kann eine Vielzahl verschiedener Biomoleküle aufgereinigt werden, wie Zucker [38, 39, 40, 41, 42], Aminosäuren [43, 44, 45], Nukleinsäuren [46] und Proteine [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53]. Dennoch hat die Methode einige Nachteile: Die schwierige einheitliche Säulenpackung sowie die gleichmäßige Strömungsverteilung und die daraus resultierenden reproduzierbaren Ergebnisse [36].

2.2.2 Simulated Moving Bed (SMB) Chromatographie

Die Simulated Moving Bed (SMB) Chromatographie ist eine quasi-kontinuierliche Aufreinigungsmethode und beruht auf dem Prinzip der True Moving Bed (TMB) Chromatographie. Bei der TMB bewegt sich im Gegensatz zu der herkömmlichen Säulenchromatographie die stationäre Phase in entgegengesetzter Richtung zur mobilen Phase [54]. Nachteile der TMB sind die Realisierung der Gegenstrombewegung der mobilen und stationären Phase und einhergehend mit der Bewegung verursachte Probleme, die durch den Abrieb und das Mischen entstehen [55]. 1961 stellten Broughton und Gerhold von der Universal Oil Products Company (USA) eine Lösung für die praktische Umsetzung der TMB vor, die Simulated Moving Bed [56]. Im SMB-Verfahren können herkömmliche Chromatographiesäulen verwendet werden. Um die kontinuierliche Gegenstrombewegung der Festphase diskontinuierlich zu simulieren, werden die Einlass- und Auslassöffnungen der Einheit periodisch in Richtung des Fluidstroms geschaltet [31, 55, 57, 36].

In Abbildung 2.5 ist eine schematische Darstellung einer 4-Zonen TMB dargestellt. Die festen Ein- und Auslässe unterteilen die feste Phase in vier Zonen [54]. Zu Beginn wird der Feed (zu trennende binäre Mischung aus Produkt und Verunreinigung) zwischen Zone 4 und 1 aufgegeben. Zwischen diesen Zonen findet die Trennung der Komponenten statt. Beide Komponenten wandern durch Zone 1, die stärker absorbierende Komponente (blau: das Produkt) soll möglichst vollständig absorbieren, sodass diese mit der festen Phase in Zone 4 transportiert werden kann. In Zone 4 findet eine komplette Desorption der schwächer bindenden Komponente (gelb: Verunreinigung) statt, sodass diese mit der mobilen Phase zurück in Zone 1 transportiert wird. Die Verunreinigung kann zwischen Zone 1 und 2 aus dem System geführt werden. Die stärker absorbierende Komponente (Produkt) kann zwischen Zone 3 und 4 in reiner Form gewonnen werden. Die Zonen 2 und 3 sind als Regenerationszonen anzusehen [54, 36]. Die hier beschriebene Wanderung der festen Phase kann auch virtuell durch eine intelligente Ventilschaltung und sukzessive Wanderung der Positionen von Zulauf respektive Ablauf simuliert werden. Im Verlauf der Schaltung durchläuft so jede Säule jede der vier dargestellten Zonen.

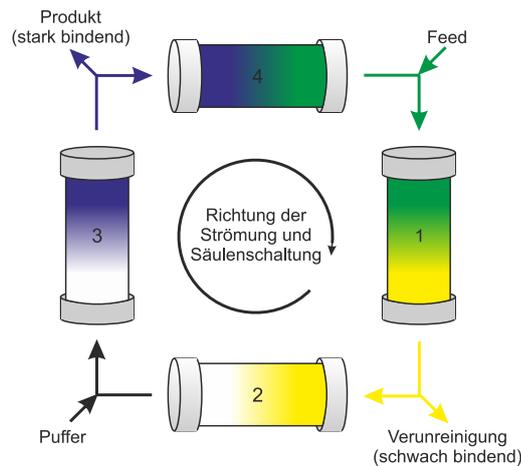


Abbildung 2.5: Schematische Abbildung der 4-Zonen True Moving Bed (TMB) Chromatographie, adaptiert nach [36].

Als Vorteile der SMB sind zu nennen: Die Reduktion des Pufferverbrauchs sowie die hohe Produktivität und Reinheit [58]. Allerdings wurde die SMB entwickelt, um binäre Mixturen aufzureinigen. So wurde sie bis in die 1990er hauptsächlich in der Petrochemie und der Zuckeraufreinigung eingesetzt [56, 58, 59]. Die SMB kommt auch zum Einsatz in der Trennung von Enantiomeren [60], zum Entsalzen mittels Size Exclusion Chromatography (SEC) [61] oder zur Auftrennung von Proteinen [62, 63, 64, 65]. Im Jahr 2002 wurde von der FDA (Food and Drug Administration, Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde) das Medikament Lexapro (Single Enantiomer Drug) zugelassen, das mit einer SMB produziert wird [57].

2.2.3 Periodic Counter-Current (PCC) Chromatographie

Bei der Periodic Counter-Current (PCC) Chromatographie wird das Gegenstromprinzip durch das Umschalten mehrerer Festbett-Säulen in periodischen Intervallen simuliert. Diese Methode ist wie die SMB eine pseudo-kontinuierliche Aufreinigung [66]. Der erste Multi-Column Prozess wurde in den 1920er Jahren durchgeführt (Merry Ground Installation, USA). Aber erst um die 1970er Jahre wurden die Grundlagen für die Periodic Counter-Current Bewegung, bei der die Säulenposition zyklisch geschaltet wird, vorgestellt [67]. 2011 patentierte GE Healthcare Bio-Sciences (Schweden) eine PCC-Anlage [68], die mit 3 oder 4 Säulen (3C-PCC oder 4C-PCC) betrieben werden kann und kommerziell erhältlich ist.

Bei der PCC Chromatographie wird der klassische Ablauf eines Chromatographielaufs (beladen, waschen, eluieren, regenerieren) mit mehreren Säulen gleichzeitig und periodisch durchgeführt. Dabei sind die Säulen seriell und zyklisch verschaltet, um den Durchbruch einer Säule und die Waschfraktion auf einer weiteren Säule aufzufangen. Bei der PCC werden die Säulen anstatt bis zur dynamischen Bindungskapazität wie in der Batch-Chromatographie bis zur statischen Bindungskapazität beladen. Dabei wird die Column Switching Strategie (Kontrollstrategie) angewendet, die in Abbildung 2.6 anhand einer exemplarischen Durchbruchskurve verdeutlicht ist. Pro Säule werden zwei automatisierte Switching Conditions festgelegt, wobei die erste Bedingung (sc1) mit dem anfänglichen Produktdurchbruch zusammenhängt, während die zweite Bedingung (sc2) mit der Säulensättigung zusammenfällt. In der Abbildung 2.6 ist die Strategie anhand der UV-Absorptionsdifferenz zwischen dem Feed und dem Säulenausgang gezeigt. Nicht bindende Verunreinigungen brechen sofort durch, und das charakteristische Plateau der Verunreinigung wird detektiert. Wenn allmählich die Säule mit dem Produkt gesättigt wird, bricht das Produkt durch, was zu einer Erhöhung des UV-Signals am Ausgang führt. Ab dem Punkt, an dem ein vorgegebener Schwellenwert (sc1) überschritten wird, wird der Durchbruch auf die zweite Säule weitergeleitet. Wenn die erste Säule nahezu mit dem Produkt gesättigt ist und der zweite vorgegebene Schwellenwert (sc2) erreicht wird, wird die Beladung der ersten Säule gestoppt und ausschließlich die zweite Säule beladen. Anhand der Switching Conditions lässt sich vorher ein definierter Produktverlust kalkulieren [25].

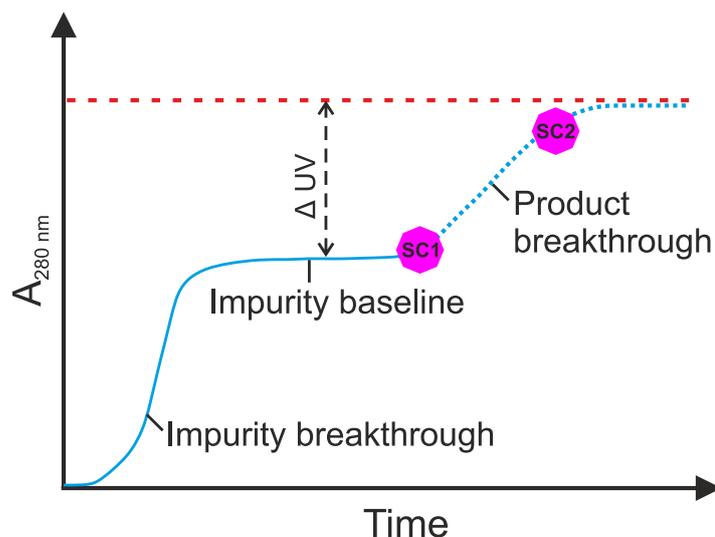


Abbildung 2.6: Column Switching Strategie der PCC, adaptiert nach [25, 33].

In Abbildung 2.7 ist schematisch ein Zyklus einer 3C-PCC dargestellt. Säule 1 wird bis zum Erreichen der ersten Switching Condition (sc1) beladen. Dann wird der Durchbruch auf Säule 2 geladen, um Produktverluste zu minimieren. Bei Erreichen der zweiten Switching Condition (sc2) wird die Beladung gestoppt, Säule 1 gewaschen, eluiert und regeneriert. In Schritt 4 wird der Durchbruch von Säule 2 auf Säule 3 geleitet. Anschließend wird Säule 2 gewaschen, eluiert und regeneriert. Im sechsten Schritt des Zyklus wird der Durchbruch nach Erreichen der sc1 auf Säule 1 geleitet. Ein Zyklus der PCC ist das Beladen, die Elution und die Regeneration aller drei Säulen. Der nächste Zyklus startet erneut mit Schritt 1.

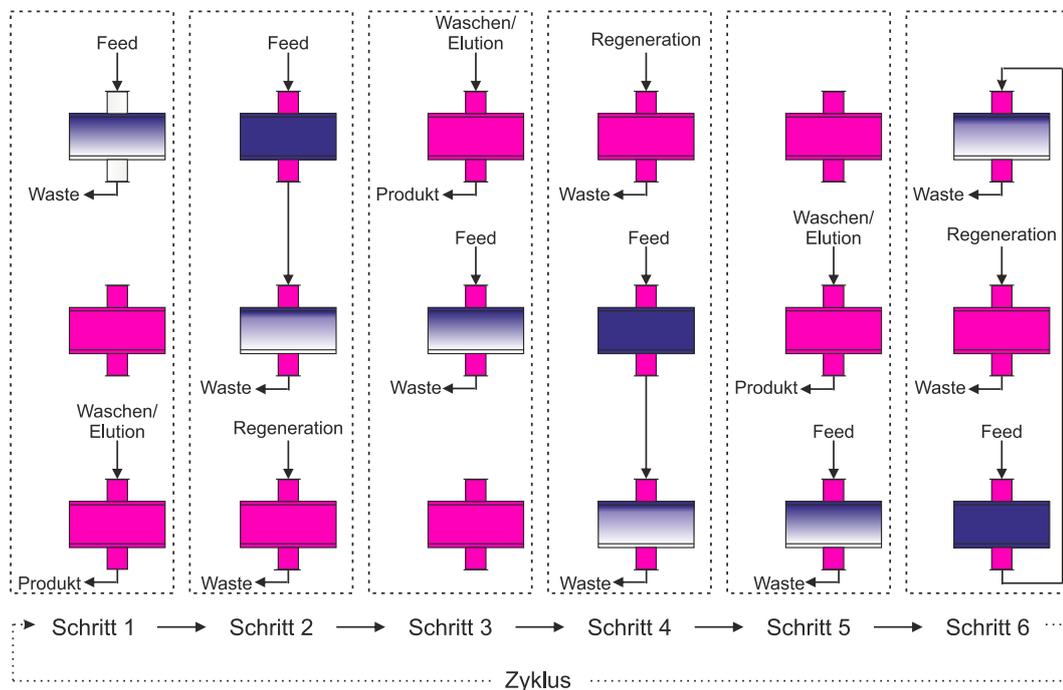


Abbildung 2.7: Schematische Abbildung einer 3C-PCC (3 Säulen PCC), adaptiert nach [25].

Generell müssen bei der PCC folgende Kriterien beachtet werden:

1. Switching Condition 1 (sc1): ist eine prozessspezifische Größe, die den Produktdurchbruch mit einem vordefinierten Verlust angibt.
2. Switching Condition 2 (sc2): ist eine prozessspezifische Größe, die die festgelegte Sättigung der Säule definiert.
3. Sc2 muss so gewählt werden, dass es nicht zum Produktdurchbruch auf nachfolgenden Säulen kommt [33].

4. Die Regenerationszeit muss kleiner als die Beladungszeit sein.
5. Die Anzahl der verwendeten Säulen ist prozessspezifisch und abhängig von der Durchbruchskurve und dem Desorptionsprozess des Produktes [69].
6. Das verwendete Analysensystem muss die Detektierbarkeit des Produkts gewährleisten [25].

Die Periodic Counter-Current Chromatographie bietet viele Vorteile gegenüber der Batch-Chromatographie. Dennoch sind in Tabelle 2.2 auch bestehende Nachteile aufgeführt. Die PCC findet vor allem Anwendung bei der Aufreinigung monoklonaler Antikörper. Generell können aber alle Trägermaterialien, die auch für die Batch-Chromatographie eingesetzt werden, in der PCC genutzt werden, um verschiedene Aufreinigungsstrategien zu gewährleisten.

Tabelle 2.2: Übersicht von Vor- und Nachteilen sowie Anwendungsbeispielen der PCC

Vorteile	Nachteile	Anwendung/Produktion
Gesteigerte Produktivität [36, 70]	Höhere Anschaffungskosten [70]	Rekombinante Enzyme [33]
Effektivere Nutzung des Chromatographiematerials [33, 70, 71]	Schwierige Large-scale Implementierung [25]	Monoklonale Antikörper (mAb) [25, 33, 66, 71, 72, 73]
Kleinere Anlagen/geringere Stellfläche [33]	Längere Verweilzeiten [74, 75]	Hormone [76]
Kleinere Säulenvolumina [33]		Instabile Proteine [33]
Größerer Durchsatz mit kürzeren Prozesszeiten [25, 31, 33]		Wasseraufbereitung (Entfernung von Ionen und Verunreinigungen) [66]
Reduzierter Pufferverbrauch [33, 70]		Bovine Serum Albumin (BSA) [77]
Geringere Kosten [71]		
Behördliche Befürwortung (FDA)[78]		

2.2.3.1 Membranadsorber

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine PCC-Einheit etabliert werden, die anstatt mit konventionell gepackten Säulen mit Membranadsorbern betrieben wird. Die Membranchromatographie hat sich als vielversprechende Alternative zur konventionellen Säulen-Chromatographie zur Reinigung biologischer Moleküle entwickelt [79]. Die Anwendungen reichen dabei von Protein-/Peptidaufreinigung, DNA- und Virenentfernung, Virenaufreinigung bis hin zur Endotoxinanreicherung, wobei mit ca. 45 % die Aufreinigung von Proteinen und Peptiden im Fokus steht [80]. Schon Mitte der 1990er Jahre kamen die ersten membranbasierten Ionenaustauscher auf den Markt [81] und werden sowohl im Labor- als auch Produktionsmaßstab genutzt [82, 83, 84, 85, 86]. Die FDA hat 2001 einen pharmazeutischen Produktionsprozess zugelassen, in dem Membrananionenaustauscher der Firma Sartorius AG (Deutschland) zum Einsatz kommen [80].

Membranadsorber bieten im Vergleich zu konventionellen Chromatographiematerialien (Beads, Harze oder Gele) einige Vorteile. Durch die Eliminierung der Poren und Funktionalisierung mit Liganden an der Membranoberfläche ist der Massentransport zu den Bindungsstellen maßgeblich auf Konvektion zurückzuführen und nicht auf Porendiffusion [84]. Dies führt zu einem schnelleren Bindungsverhalten der Moleküle. Deshalb können höhere Flussraten genutzt werden, und die Prozesszeit kann somit reduziert werden. Generell ist die Kapazität bei Membranadsorbern unabhängig von der Flussrate und ermöglicht somit höhere Durchsätze [87], was insbesondere für gering-konzentrierte Produktströme interessant ist. Des Weiteren weisen Membranadsorber eine hohe mechanische Stabilität und eine starke Salz- und pH-Toleranz auf [88]. Da die Kapazität abhängig von der Membranoberfläche ist, können Prozesse einfach vom Labormaßstab in den Produktionsmaßstab (Up-Scale) und umgekehrt (Down-Scale) übertragen werden [89]. Membranadsorber können mit verschiedenen Liganden funktionalisiert werden, je nach gewünschter Auftrennungsmethode sind starke und schwache Ionenaustauschermembranen, Affinitätsmembranen (Protein A, IMAC) und Hydrophobe Interaktionsmembranen (HIC) erhältlich [81].

2.3 Verwendete Modellproteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Modellproteine eingesetzt. Die Untersuchung der modifizierten Tiefenfilter wurde mit *Candida antarctica* lipase B (CalB) durchgeführt. Das binäre Modellsystem aus den Proteinen Bovine Serum Albumin (BSA) und Lysozym diente der Validierung der PCC-Anlage, um anschließend die erworbenen Kenntnisse auf die reale Trennaufgabe von CalB aus *E.-coli*-Lysat zu übertragen.

2.3.1 *Candida antarctica* lipase B (CalB)

Candida antarctica lipase B (CalB) (EC 3.1.1.3) gehört zu der Familie der Serinhydrolasen und besteht aus 317 Aminosäuren, die zu einem 33 kDa großen Polypeptid verknüpft sind. CalB ist ein globuläres Protein (30 Å x 40 Å x 50 Å) und weist, wie für Hydrolasen typisch, eine α,β -Faltung auf (Abbildung 2.8) [90].

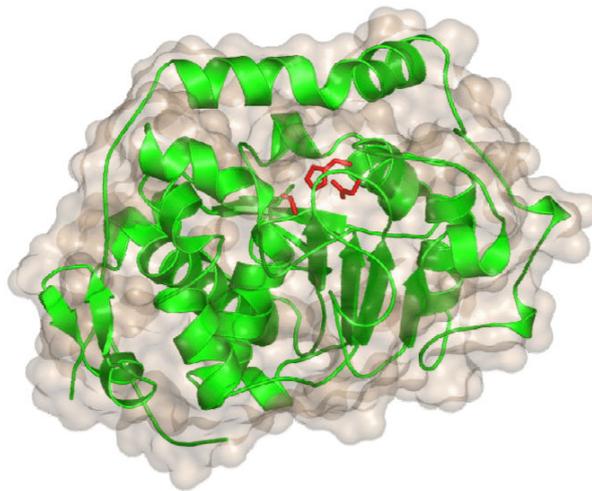


Abbildung 2.8: Dreidimensionale Struktur der *Candida antarctica* lipase B (CalB). Die Sekundärstrukturen (α -Helices und β -Faltblätter) sind in grün, und die katalytische Triade (Ser105, Asp187, His224) ist in rot dargestellt [91].

Dieses Faltungsmuster besteht aus sieben β -Faltblättern, die von zehn α -Helices umgeben sind. Die katalytische Triade besteht aus den Aminosäuren Serin (Ser105), Asparagin (Asp187) und Histidin (His224). CalB besitzt kein Deckel (Lid), somit ist das aktive Zentrum frei zugänglich. Da außerdem keine Oberflächenaktivierung vorgenommen werden muss, wird CalB in der Industrie oft verwendet [90].

Weitere vorteilhafte Eigenschaften von CalB sind unter anderem das breite Substratspektrum (Triacylglyceride, Ester, Amide und Thiole), die hohe pH- und Temperaturstabilität (bis 60 °C) sowie die Aktivität in wässrigen und organischen Lösemitteln [92]. Der theoretische isoelektrische Punkt (pI) von CalB liegt bei pH 6. Allerdings ist in Abbildung 2.9 zu sehen, dass CalB in einem breiten Bereich (pH 5 - pH 8) ungeladen vorliegt. Damit lässt sich auch die pH-Stabilität von pH 3 - pH 10 erklären. Zurückzuführen ist das auf die besondere Verteilung der Aminosäuren im Enzym. CalB besitzt im Bereich von pH 5 - pH 8 keine titrierbaren Seitenketten. Deshalb ändert sich die Gesamtladung nicht, und die Nettoladung ist null. Dadurch, dass nur ein Histidin im aktiven Zentrum vorliegt, kommt es zu einer pKa-Verschiebung von pH 6,3 zu pH 8, und die Lipase CalB wird zusätzlich stabilisiert [93].

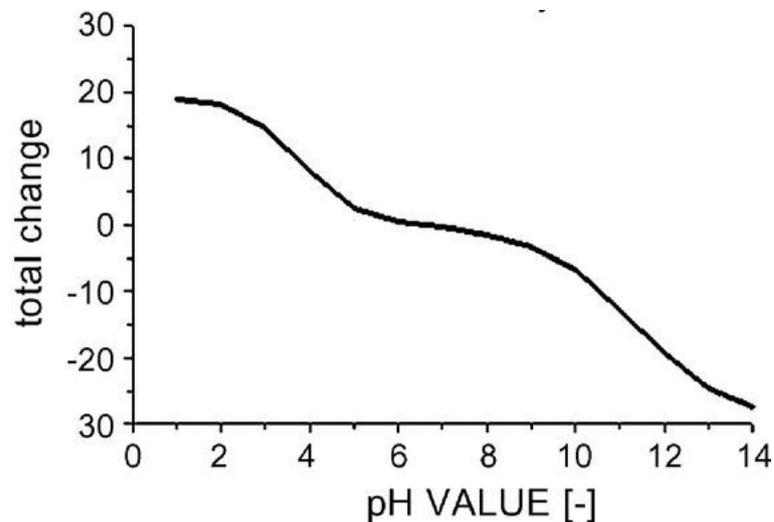


Abbildung 2.9: Verlauf der berechneten Nettoladung von CalB in Abhängigkeit des pH-Wertes [91].

CalB ist eine der meistgenutzten Lipasen der Biokatalyse [94] und eignet sich für eine Vielzahl industriell relevanter Veresterungs- und Umesterungsreaktionen. CalB findet Anwendung in der Waschmittelindustrie zur Entfernung von Fettflecken oder auch in der Lebensmittelindustrie zur Entfernung des strengen Aromas aus Schafs- und Ziegenmilchprodukten [95, 96] und in der Herstellung von L-Menthol oder Fruchtestern [97]. In der pharmazeutischen Industrie wird CalB in der Synthese von 1,3-funktionalisierten Indan-Derivaten eingesetzt, die als Bestandteil von HIV-1-Proteaseinhibitoren und als Polyamidderivat für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen dienen [98].

CalB ist kommerziell von verschiedenen Herstellern (c-Lecta GmbH (Deutschland), Sigma Aldrich (USA), Fermenta Biotech Limited (Indien)) sowohl in reiner Form als auch als Immobilisat erhältlich. Die chromatographische Aufreinigung erweist sich aufgrund des breiten pI-Bereichs als schwierig, sodass bisher keine optimale One-Step Strategie entwickelt werden konnte. Verschiedene Aufreinigungsstrategien sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Hauptsächlich wurde die Trennung anhand der Ladung (IEX) verwendet. In diesem Fall muss außerhalb des pI-Bereiches ($< \text{pH } 5$ und $> \text{pH } 8$) gearbeitet werden.

Tabelle 2.3: Übersicht von publizierten One-Step Aufreinigungsstrategien von CalB

Method	Details	Nachteile	Quelle
AEX	<ul style="list-style-type: none"> • Kommerzielle CalB • Bindung bei pH 8,5 • Elution mit 1 M NaCl • Aufreinigungsfaktor: 1,38 • Wiederfindung: 47,3 % 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Ausbeute 	[99]
B-AC	<ul style="list-style-type: none"> • CalB aus <i>P. pastoris</i> GS115 • Bindung bei pH 7 • Elution bei pH 3 • Reinheit: 91 % • Wiederfindung: 73 % • Ausbeute: 87 % 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Kapazität 	[100]
CEX	<ul style="list-style-type: none"> • CalB aus <i>P. pastoris</i> X-33 • Bindung bei pH 3 • Elution bei pH 5,5 • Aufreinigungsfaktor: 1,5 • Ausbeute: 53 % 	<ul style="list-style-type: none"> • Niedriger pH 	[93]
HIC	<ul style="list-style-type: none"> • CalB aus <i>E. coli</i> • Bindung bei pH 8 (Hochsalzbedingung) • Elution bis 0 M Ammoniumacetat • Aufreinigungsfaktor: 1,29 • Wiederfindung: 23 % 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Wiederfindung 	[101]

* AEX: Anionenaustauschchromatographie, B-AC: Biomimetische Affinitätschromatographie, HIC: Hydrophobe Interaktionschromatographie, CEX: Kationenaustauschchromatographie

2.3.2 Lysozym

Lysozym (3.2.1.17) gehört zu den Glykosidasen und ist ein verbreitet vorkommendes Enzym. Lysozym kommt in Wirbeltieren (Organen, Geweben, Sekreten), aber auch in Wirbellosen, Bakterien, Bakteriophagen und Pflanzen vor. Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 14,3 kDa und einen pI von pH 11,35. Das Enzym ist stabil bei höheren Temperaturen und einem breiten pH-Bereich (pH 6 - pH 9), wobei das Aktivitätsmaximum bei pH 6,2 liegt. Lysozym ist ein bakteriolytisches Enzym und findet Anwendung beim Zellaufschluss von grampositiven Bakterien, da Lysozym die Peptidoglykanschicht hydrolysieren kann [102, 103]. Durch das vielfältige Wissen über das Enzym Lysozym wird es häufig als Modellprotein eingesetzt.

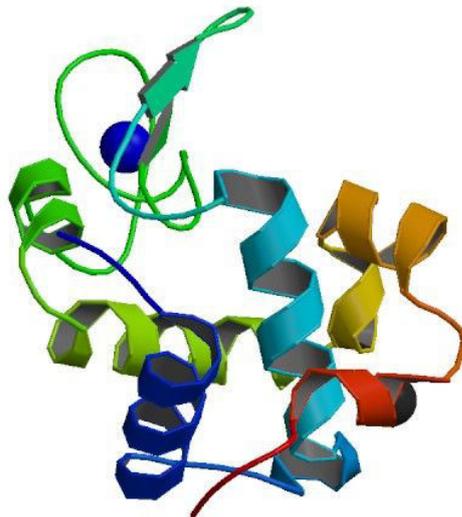


Abbildung 2.10: Dreidimensionale Struktur von Lysozym (PDB ID: 4YOP) [104].

2.3.3 Bovine Serum Albumin (BSA)

Serum Albumine (SA) gehören zu der Gruppe der globulären Proteine und sind ein Hauptbestandteil des Blutplasmas von Säugetieren. SA sind multifunktionelle Proteine mit einer hohen Kapazität Liganden (Wasser, Kationen, Fettsäuren, Hormone, Pharmazeutika uvm.) zu binden [105].

Das Bovine Serum Albumin (BSA) besteht aus 583 Aminosäuren, die über 17 Cysteinreste quervernetzt sind und ein Molekulargewicht von 66,4 kDa ergeben. Die Aminosäurekette besteht aus drei homologen, strukturell unterschiedlichen Domänen (I, II, III), die herzförmig angeordnet sind (Abbildung 2.11). BSA hat einen pI von pH 4,7. Durch den geringen Anteil an den unpolaren Aminosäuren (Isoleucin, Methionin und Tryptophan) sowie an der polaren Aminosäure Glycin und den hohen Anteil an ionischen Aminosäuren wie Glutaminsäure und Lysin hat BSA eine hohe negative Nettoladung bei einem neutralen pH-Wert [105, 106, 107].



Abbildung 2.11: Dreidimensionale Struktur von BSA (PDB ID: 3V03) [108].

BSA ist gut charakterisiert und wird auch wegen seiner Eigenschaften (gute Löslichkeit bis 40 g/L, hohe Stabilität, Stabilisator für labile Enzyme) und der geringen Kosten als Standardprotein für biochemische Anwendungen verwendet [109].

BSA und Lysozym eignen sich aufgrund ihrer stark differenzierenden Merkmale (pI und Molekulargewicht) ideal als Modellsubstanzen für ein einfaches binäres Trennproblem. Abbildung 2.12 zeigt die Titrationskurven von BSA und Lysozym sowie die isoelektrischen Punkte (pI), bei denen Proteine ungeladen vorliegen. Mit Hilfe dieser Grafik können Vorüberlegungen für die Methodenentwicklung einer Aufreinigungsstrategie getroffen werden.

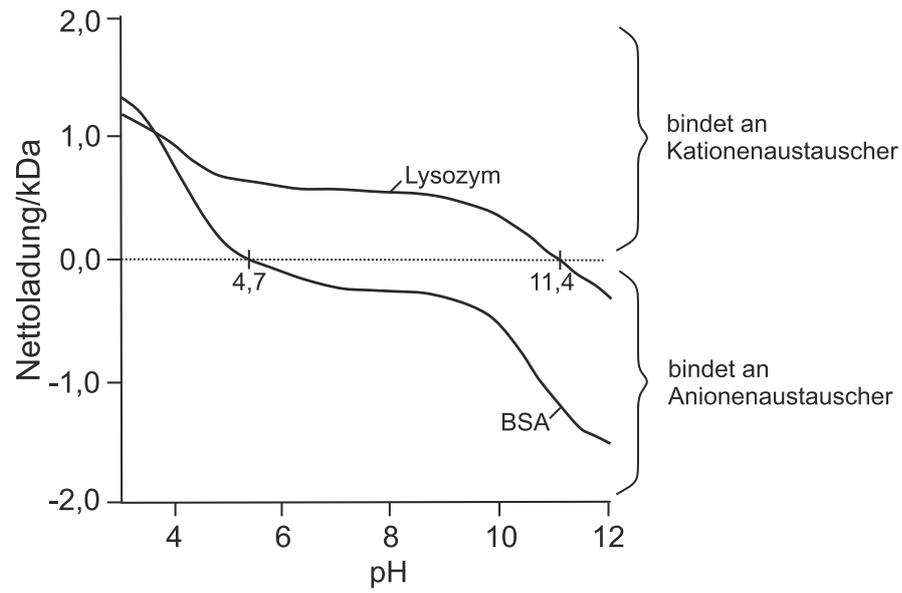


Abbildung 2.12: Titrationskurve von BSA und Lysozym, adaptiert nach [110].

3 Untersuchung von modifizierten Tiefenfiltern zur Enzymaufreinigung

In diesem Kapitel werden konventionelle Tiefenfilter beschichtet und hinsichtlich ihres Potenzials zur spezifischen Bindung von Enzymen untersucht, sodass sie über ihre Klärungsfunktion hinaus für die chromatographische Aufreinigung verwendet werden können. Nach der erfolgten Bindung des Enzyms sollen katalytische Umsetzungen durchgeführt werden. Die verschiedenen Filter unterscheiden sich aufgrund ihrer Polyelektrolytbeschichtung, die mit der Layer-by-Layer-Technologie aufgebracht wurde. Dabei wird die beste Beschichtung hinsichtlich der Bindungskapazität des Modellenzym CalB und der Enzymaktivität (Umsatzverhalten) bestimmt. Untersucht werden verschiedene Konditionen wie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke des Puffersystems. Des Weiteren werden die Langzeitstabilität bei verschiedenen Lagerbedingungen sowie das Verhalten bei mehrfachen Umsetzungsreaktionen evaluiert. Außerdem wird die Haltbarkeit der Trägermaterialien untersucht. Nach Bestimmung der optimalen Beschichtung wird das Modellprotein CalB aus *E.-coli*-Lysat aufgereinigt, um seinen praktischen Einsatz im Bereich der Produktisolierung zu testen.

3.1 Verwendung von modifizierten Tiefenfilterschichten

Konventionelle, zellulosebasierte Tiefenfilterscheiben mit einem Durchmesser von 142 mm und einer Fläche von ca. 160 cm² wurden von der Sartorius Stedim Biotech GmbH (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Weitere Spezifikationen der verwendeten Tiefenfilter (Typ D) sind 0,4 µm nominale Abscheiderate, eine Dicke von 3,9 mm, 49 % w/w Gehalt an Filterhilfsmittel und mittlerer Wasserdurchfluss von 60 L/m²/min bei Δp 100 kPa. Die BET-Oberfläche (Brunauer-Emmett-Teller) beträgt 454,9 m².

Die Oberfläche des Standard-Tiefenfilters Typ D wurde von Surflay Nanotec GmbH (Deutschland) mit der Layer-by-Layer-Technologie modifiziert, die auf der Aufbringung von Polyelektrolyt-Multilayern auf geladenen Oberflächen basiert. Die verschiedenen Beschichtungen sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 3.1 aufgeführt [11]. Die Wechselwirkungen zwischen der Lipase CalB und den Filtern können entweder auf kovalenter Bindung oder Physisorption und/oder ionischen Wechselwirkungen basieren, ausgehend von der gewählten Beschichtung. An Tiefenfilter, die mit Polyethylenimin (PEI), Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH) oder Poly(Natrium-4-styrolsulfonat) (PSS) beschichtet wurden, kann CalB aufgrund von Physisorption und/oder ionischen Wechselwirkungen binden. Des Weiteren wurden mit PEI- oder PAH-beschichtete Träger mit Glutaraldehyd aktiviert. Es ist bekannt, dass durch diese Vernetzung die mechanische und thermische Stabilität von Enzymen verbessert wird. An diese beschichteten Tiefenfilter kann CalB kovalent binden. Nach der Modifikation der Tiefenfilter wurden Stanzlinge mit einem Durchmesser von 25 mm mit einer Oberfläche von 490 mm² und einer BET-Oberfläche von 13,93 m² vorbereitet. Die Stanzlinge wurden für Applikationstests und Screenings im analytischen Maßstab verwendet.

Tabelle 3.1: Übersicht der Eigenschaften der verschiedenen modifizierten Tiefenfilter [11]

Beschichtung	Polyelektrolytmenge [mg/g Filter]	Oberflächen- ladung	Interaktion
PEI	18,6	kationisch	Physisorption, ionisch
PAH	9,6	kationisch	Physisorption, ionisch
PSS	17,2	anionisch	Physisorption, ionisch
PAH/PSS	9,6/22,3	anionisch	Physisorption, ionisch
PAH/PSS/PAH	9,6/22,3/11,3	kationisch	Physisorption, ionisch
PEI/PSS/PEI	18,6/32,1/17,3	kationisch	Physisorption, ionisch
PEI aktiviert mit Glutaraldehyd	-	kationisch	kovalent
PAH aktiviert mit Glutaraldehyd	-	kationisch	kovalent

PEI: Polyethylenimin, PAH: Polyallylamin-Hydrochlorid, PSS: Poly(Natrium-4-styrolsulfonat)

In Abbildung 3.1 ist eine konfokale Fluoreszenzaufnahme sowie die dazugehörige Transmissionsaufnahme gezeigt. Das fluoreszierende, kationische PEI bindet an den Standard-Tiefenfilter Typ D, sowohl an die Oberfläche der Zellulosefasern als auch an die kleinen Teilchen des Filterhilfsmittels Kieselgur.

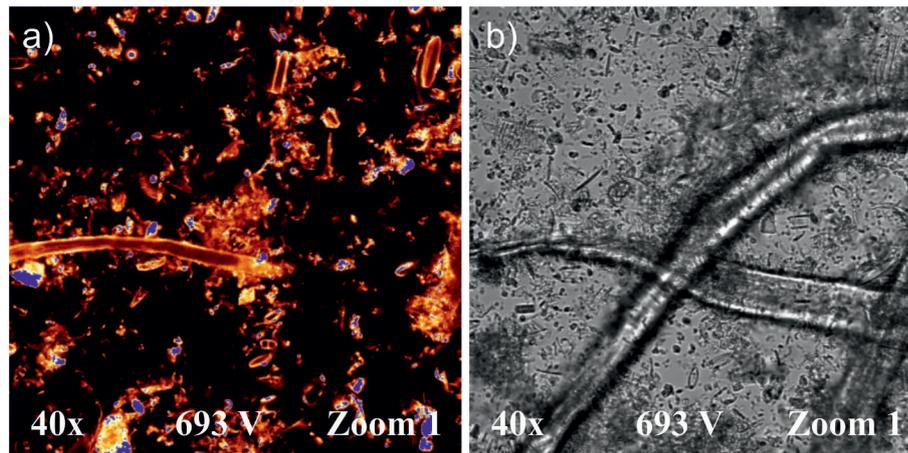


Abbildung 3.1: (a) Konfokale Fluoreszenzaufnahme von fluoreszierendem Polyethylenimin. Das PEI ist an die Komponenten (Kieselgur und Zellulose) des Standardfilters Typ D gebunden. Die großen Fasern stellen die Zellulose dar, und die kleinen Teilchen sind Kieselgur. (b) Identisches Bild wie (a) als Transmissionsaufnahme. Die Bilder (a und b) wurden mit einem Zoom von 40 x aufgenommen und haben eine Größe von $250 \times 250 \mu\text{m}$ [11].

Um die verschiedenen Beschichtungen zu testen, wurden die Filter in einen speziell angefertigten Halter gespannt und im Durchfluss mit der Enzymlösung durchströmt. Der Aufbau, bestehend aus einer Mischkammer, einer Peristaltikpumpe, dem Halter mit Tiefenfilter und einer UV/Vis-Messkammer, ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Die Messkammer, bestehend aus einer Durchfluss-Quarzglasküvette (1 cm Schichtdicke) und einem Cary 50 UV-Visible Spectrophotometer von Variant (USA) wurde genutzt, um die Abreicherung des Enzyms aus der Lösung bei einer Wellenlänge von 280 nm Online zu verfolgen. Um ein weiteres Beurteilungskriterium bei der Bewertung der Beschichtungen zu haben, wurde nach erfolgter Absorption, ein *para*-Nitrophenolacetat (*p*-NPA) Aktivitätsassay durchgeführt (vgl. Anhang B.1.1). Dafür wurde der gleiche Aufbau verwendet, allerdings mit einer Durchfluss-Quarzglasküvette mit 0,1 cm Schichtdicke, und das entstehende Produkt der Reaktion wurde bei 405 nm vermessen.

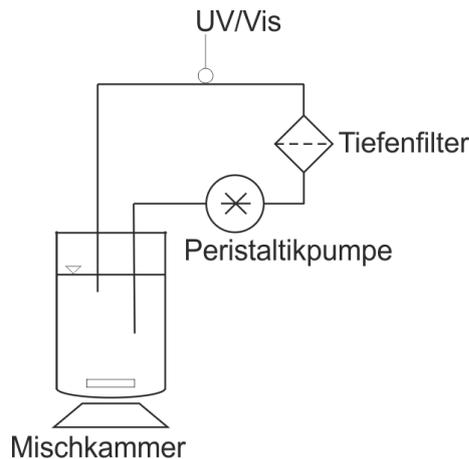


Abbildung 3.2: Schema des Versuchsaufbaus zur Durchströmung der Tiefenfilter mit UV/Vis-Messstelle zur Verfolgung der Proteinkonzentration sowie des Aktivitätsnachweises von CalB [11].

3.2 Aufreinigung der *Candida antarctica* lipase B mit Tiefenfiltern

Für die nachfolgenden Versuche wurde lyophilisierte rekombinante Lipase B (Handelsname CalB lyo, 5.000 U/g) von c-Lecta GmbH (Deutschland) verwendet. Die Lipase aus *C. antarctica* wurde durch mikrobielle Fermentation mit *Pichia pastoris* hergestellt. Standardproteinlösungen mit einer CalB-Konzentration von 0,83 mg/mL wurden in dem gewünschten Puffersystem hergestellt. Die Tiefenfilter wurden zunächst in dem zu testenden Puffer equilibriert. Anschließend wurden die Filter in die Halter eingespannt und mit 20 mL der Standardproteinlösung mit einer Flussrate von 0,81 mL/min durchströmt, bis keine Absorptionsänderung mehr detektierbar war. Währenddessen wurden in regelmäßigen Abständen Offline-Proben für die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford gesammelt (vgl. Anhang B.2.3). Der Aktivitätsnachweis der gebundenen Lipase wurde ebenfalls im dynamischen System für 15 min durchgeführt.

3.2.1 Einfluss verschiedener Immobilisierungskonditionen

Zur Bewertung der verschiedenen Beschichtungen wurden die Filter mit Standardproteinlösung durchströmt. Die Pufferbedingungen variierten hinsichtlich der Eigenschaften der beschichteten Tiefenfilter. Für die kationisch beschichteten Tiefenfilter wurde 20 mM MES-Puffer mit pH 7 und für die anionische Beschichtung 20 mM Acetatpuffer mit pH 4 verwendet. Die kovalente Bindung der CalB an die Glutaraldehyd-aktivierten Träger wurde mit 20 mM Tris bei pH 8 durchgeführt. Die Auswahl der Puffersysteme erfolgte hinsichtlich der genannten pI-Region von CalB. Wenn $pI > pH$, ist CalB negativ geladen und kann an kationische Oberflächen binden. Wenn $pI < pH$, dann ist CalB positiv geladen und kann an anionische Oberflächen binden. Wegen des breiten isoelektrischen Bereichs weicht der gewählte pH-Wert mehr als 1 pH-Einheit zum pI von CalB ab.

Die Bindungskapazität von CalB bei den verschiedenen Filtertypen ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Kapazität (berechnet auf Basis der BET-Oberfläche) variiert zwischen 0,35 - 1,00 mg/m², wobei mit den anionischen Beschichtungen (PSS und PAH/PSS) die besten Ergebnisse erzielt wurden. Das schwächste Bindungsverhalten wurde auf dem nicht beschichteten Standardfilter Typ D und durch Physisorption und ionische Wechselwirkungen auf kationischen Oberflächen erhalten. Ebenfalls in Abbildung 3.3 ist die spezifische Aktivität in Units pro Gramm gebundenes Enzym angegeben. Die höchste Aktivität weist die PAH/PSS-Beschichtung mit $122,82 \pm 8,37$ U/g gebundenes Enzym auf. Für die weiteren Versuche wurden Tiefenfilter mit einer PAH/PSS-Beschichtung verwendet, da mit dieser Beschichtung sowohl die höchste Bindungskapazität als auch die höchste Aktivität erzielt werden kann.

Ein Zusammenhang zwischen der Menge an beschichtetem Polyelektrolyt und der Menge an gebundenem Enzym kann nicht beschrieben werden. Die berechnete Flächenbedeckung auf Basis der BET-Oberfläche variiert zwischen 0,1 - 0,34 % und basiert auf dem Langmuir-Absorptionsmodell. Daher kann erwartet werden, dass CalB in einer einzigen Schicht und nicht in Multilayern bindet. Eine Diffusionsbeschränkung des Enzymsubstrats kann daher ausgeschlossen werden.

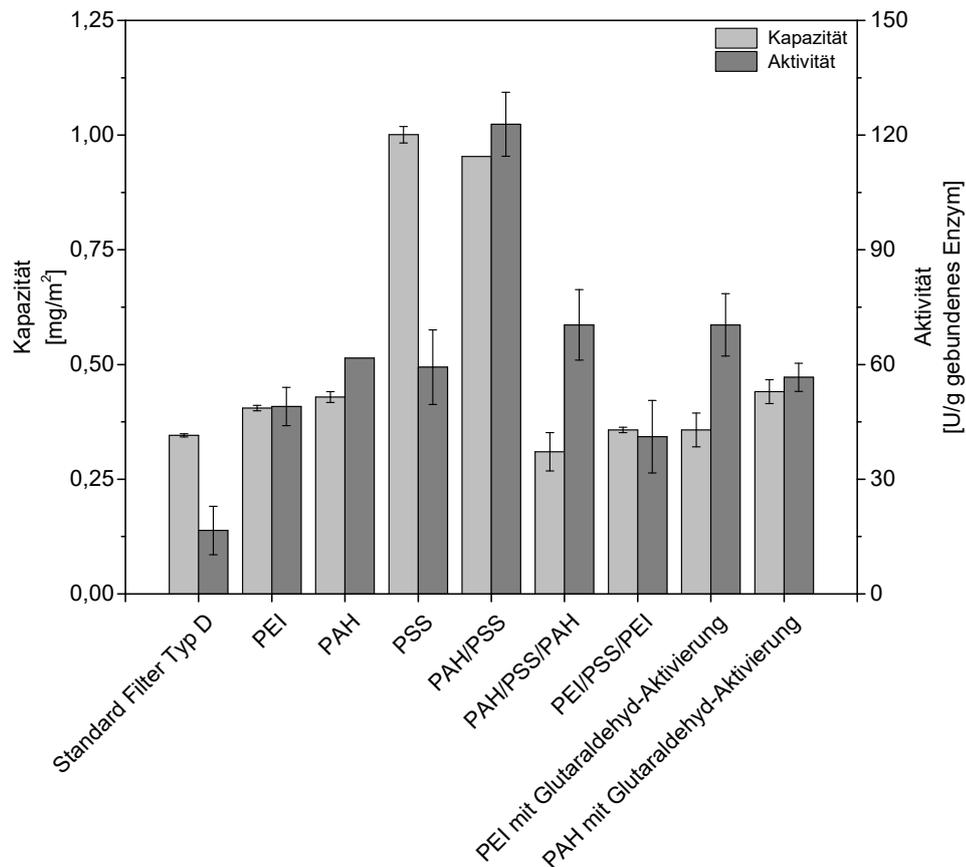


Abbildung 3.3: Vergleich des unbeschichteten Tiefenfilters Typ D mit verschiedenen Polyelektrolyt-beschichteten Filtern anhand der Bindungskapazität und der spezifischen Aktivität [11].

Der Einfluss der Ionenstärke bei der Bindung von CalB an den anionischen PAH/PSS-beschichteten Tiefenfilter wurde untersucht. Dafür wurde Acetatpuffer mit pH 4 mit fünf verschiedenen Ionenstärken zwischen 10 mM und 200 mM als Bindungspuffer verwendet. Die Ionenstärke soll eine ausreichende Pufferkapazität gewährleisten, um eine Präzipitation von CalB zu verhindern. In Abbildung 3.4 sind die Bindungskapazitäten und die Aktivitäten dargestellt. Bis zu einer Molarität von 100 mM sind kaum ersichtliche Unterschiede in der Kapazität zu erkennen. Bei höheren Molaritäten (200 mM) nimmt die Bindungskapazität drastisch ab (ca. 30 %). Bezüglich der spezifischen Aktivität wurden die besten Ergebnisse bei einer Ionenstärke von 20 mM erzielt. Eine Erhöhung der Ionenstärke führt zu einer Abnahme der Aktivität um fast 50 %. Zusammenfassend führt eine niedrige Ionenstärke von 20 mM zu der höchsten Kapazität und

spezifischen Aktivität. Schon Bastitida *et. al.* zeigte, dass die Adsorption von Lipasen bei geringen Ionenstärken ein gangbarer Weg zur Aufreinigung der meisten Lipasen ist [11].

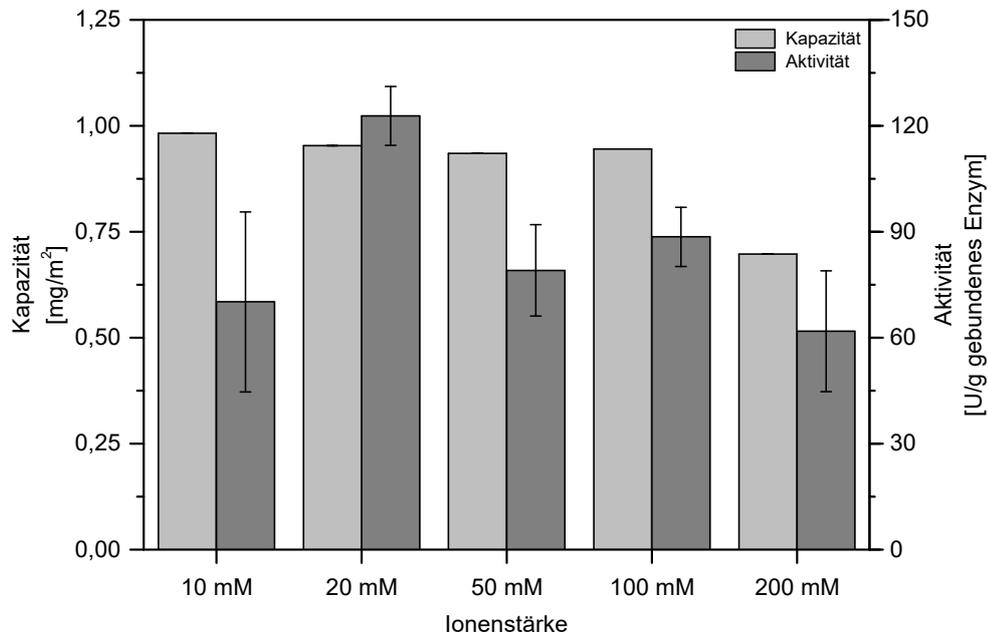


Abbildung 3.4: Einfluss der Ionenstärke (10 mM - 200 mM) auf die Bindungskapazität und die spezifische Aktivität [11].

3.2.2 Langzeitstabilität bei verschiedenen Lagerbedingungen

Nach erfolgter Beladung von CalB auf PAH/PSS-beschichtete Tiefenfilter wurden die Filter in 20 mM Acetatpuffer mit pH 4 bei 4 °C oder Raumtemperatur (RT) gelagert. Zusätzlich wurden Filter nach erfolgter Beladung bei 30 °C für 24 h getrocknet und dann bei Raumtemperatur gelagert. Die Beladungskapazität betrug bei allen Filtern 0,95 mg/m². Die Enzymaktivität wurde 1 Tag, 3 Tage, 1 Woche und 4 Wochen nach Beladung/Trocknung mit dem *p*-NPA Assay analysiert. Darüber hinaus wurden die Lagerlösungen auf den Gesamtproteingehalt mittels Bradford-Assay untersucht, um desorbierende Proteine zu detektieren.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.5 zeigen, dass die spezifische Aktivität signifikant kleiner ist, wenn die Filter getrocknet werden. Über die Zeitspanne von 4 Wochen ist der Aktivitätsverlust am geringsten, wenn die Filter in Puffer bei 4 °C gelagert werden. Die Halbwertszeit ist die Zeit, nachdem die Hälfte der anfänglichen Enzymaktivität verloren geht. Sie wurde auf Grundlage der Daten über einen Zeitraum von 28 Tagen berechnet:

- Lagerung in Puffer (4 °C): **108 Tage**
- Lagerung in Puffer (RT): **39 Tage**
- Lagerung nach Trocknung: **50 Tage**

Leaching-Effekte desorbierender Proteine konnten mittels Bradford-Assay nicht detektiert werden.

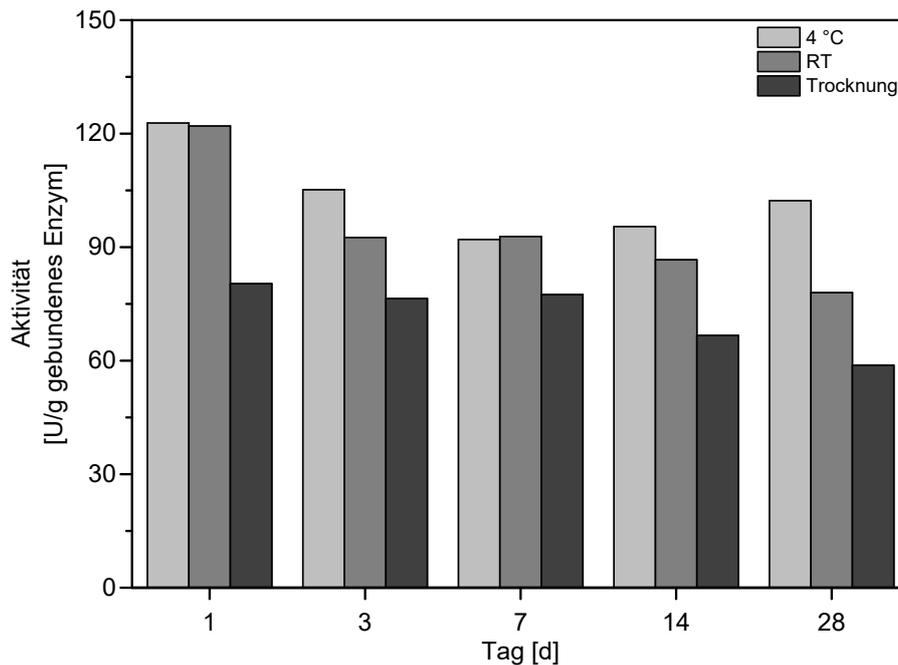


Abbildung 3.5: Vergleich der spezifischen Aktivität über 28 Tage nach Lagerung der beladenen Tiefenfilter in Puffer bei 4 °C, bei Raumtemperatur (RT) oder nach Trocknung [11].

Des Weiteren wurde die Mehrfachverwendbarkeit von beladenen Filtern mittels Aktivitätsbestimmung erprobt. Hierbei wurde untersucht, ob wiederholte Reaktionen zu einem Aktivitätsverlust führen. Die Beladungskapazität betrug bei allen Filtern $0,95 \text{ mg/m}^2$. In Abbildung 3.6 ist zu sehen, dass es zu einer Abnahme der Aktivität um 39,5 % bei 3-facher Verwendung kommt. Bei 4-facher Verwendung geht nach Berechnung 50 % der Anfangsaktivität verloren.

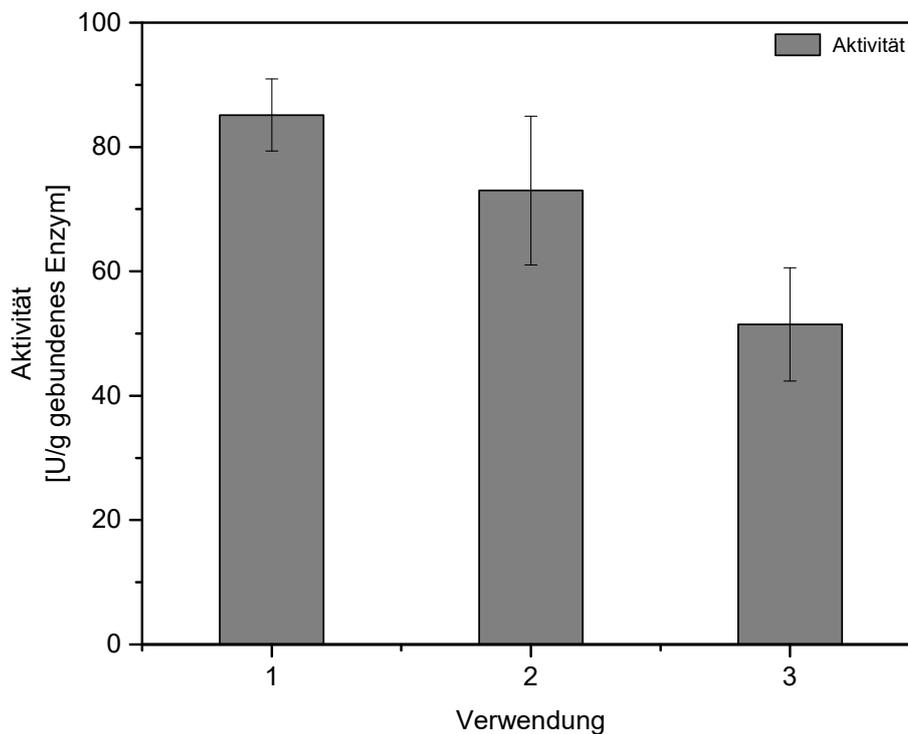


Abbildung 3.6: Auswirkung von Mehrfachverwendbarkeit der Tiefenfilter auf die spezifische Aktivität.

3.2.3 Haltbarkeit von Trägermaterialien

Da die beschichteten Filter, mit denen eine kovalente Bindung zur CalB erzielt werden kann, nur eine begrenzte Haltbarkeit aufweisen, wurden neu gefertigte und bereits ein Jahr alte Tiefenfilter miteinander verglichen. Die Beladung erfolgte mit 20 mM MES Puffer bei pH 8. Als Qualitätsmerkmal wurde die Bindungskapazität sowie die

spezifische Aktivität ermittelt, die in Abbildung 3.7 dargestellt sind. Sowohl die PEI-beschichteten und mit Glutaraldehyd-aktivierten als auch die PAH-beschichteten und mit Glutaraldehyd-aktivierten Tiefenfilter können nach einem Jahr deutlich weniger CalB binden. So kommt es zu Kapazitätsverlusten von 10,87 % bei den aktivierten PAH- und zu 20 % bei den aktivierten PEI-Filtern. Auch die spezifische Aktivität ist bei den neu produzierten Filtern höher. Dabei fällt auf, dass mit 8,37 % Aktivitätsverlust die aktivierte PAH-Beschichtung robuster ist als die aktivierte PEI-Beschichtung (42,32 %).

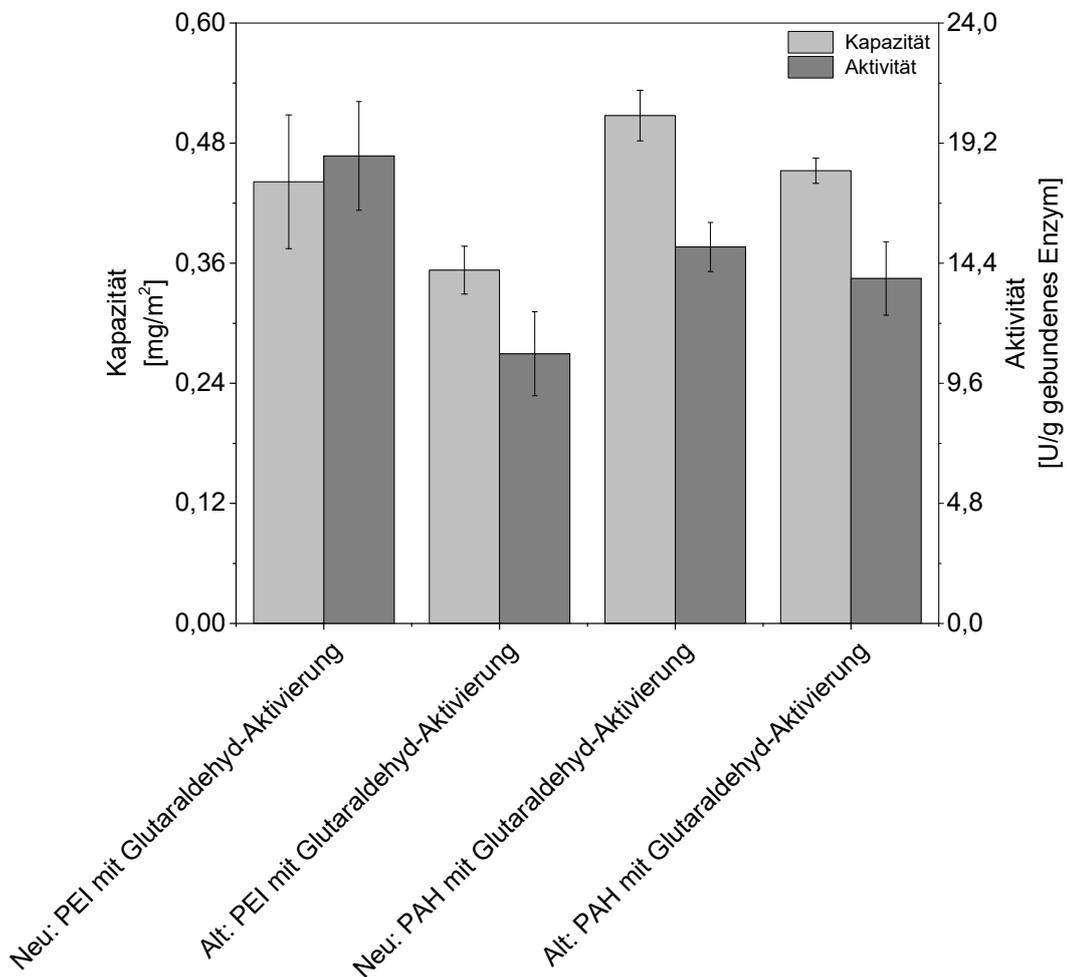


Abbildung 3.7: Alterung der mit Glutaraldehyd-aktivierten Polyelektrolytbeschichtungen und der Einfluss auf die Bindungskapazität und die spezifische Aktivität.

3.3 Aufreinigung von CalB aus *E.-coli*-Lysat

Nach den Versuchen mit der Standardproteinlösung wurden die Tiefenfilter, die in der Regel zur Klärung von Zellkulturbrühe gedacht sind, eingesetzt, um CalB direkt aus *E.-coli*-Lysat zu binden (Direct Capture).

Jeweils 20 mL Kulturbrühe wurde die gleiche Menge CalB zugefügt, wie bei den Versuchen mit Puffer ($c = 0,83 \text{ mg/mL}$), da die Proteinexpression in *E. coli* kein lösliches Protein, sondern hauptsächlich Inclusion Bodies lieferte. Vor jedem Bindungsversuch wurde die optische Dichte (OD) bestimmt. Die Bindungsbedingung der Lösungen lag bei pH 4, damit CalB an die PAH/PSS-beschichteten Tiefenfilter binden kann. Die Ergebnisse in Abbildung 3.8 zeigen die Bindungskapazität sowie die spezifische Aktivität der aufgeschlossenen Kulturbrühe (*) und des zellfreien Überstandes. Die Bindungskapazität schwankt um einen Mittelwert von $0,82 \text{ mg/m}^2$. Im Vergleich zur Bindungskapazität mit Standardprotein ist diese um etwa 15 % niedriger. Das Direct Capture war erfolgreich bei einem niedrigen Gehalt an Biomasse ($\text{OD}_{600} = 2$). Mit Erhöhung der Biomassekonzentration wurden die Filter während der Immobilisierung verblockt, und es konnte keine Aktivitätsmessung durchgeführt werden. Die Gesamtproteinbestimmung der gesammelten Offline-Proben zeigten, dass kein Protein an die modifizierten Tiefenfilter binden konnte.

Vergleicht man die ermittelten Werte der spezifischen Aktivität des zellfreien Überstands, kann festgestellt werden, dass die Aktivität mit steigender Biomassekonzentration sinkt. Denn mit steigender Biomassekonzentration steigt gleichermaßen die Konzentration an Wirtsproteinen (Host Cell Proteins, HCP), die mit der CalB um die Bindungsstellen an den Tiefenfiltern konkurrieren. Die höchste Aktivität konnte bei einer durchschnittlichen Biomassekonzentration ($\text{OD}_{600} = 5$) erreicht werden.

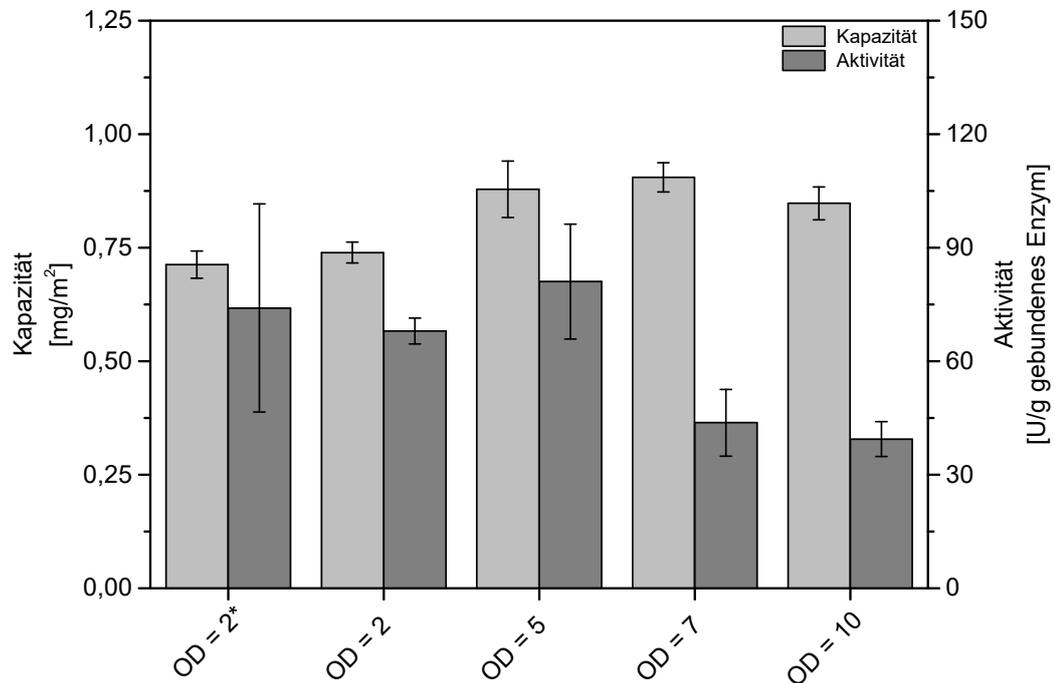


Abbildung 3.8: Vergleich der Bindungskapazität und der spezifischen Aktivität von CalB aus aufgeschlossenem Zelllysats (*) und zellfreiem Überstand. Die optische Dichte (OD) wurde vor dem Ultraschall-Zellaufschluss bestimmt [11].

3.4 Fazit

Die innovative Kombination unterschiedlicher Polyelektrolytbeschichtungen (PEI, PAH, PSS, Glutaraldehyd), die mittels Layer-by-Layer-Technologie auf Tiefenfilter aufgebracht wurden, bietet eine neue Applikation der Enzymreinigung. Besonders für industriell relevante Enzyme ist die Bindung an Tiefenfilter und die damit entstandene Möglichkeit, katalytische Reaktionen im Durchfluss durchzuführen, interessant. Die verschieden beschichteten Tiefenfilter wurden anhand der Fähigkeit, *Candida antarctica* lipase B zu binden, und der daraus resultierenden spezifischen Aktivität der Lipase, charakterisiert. Die anionischen PAH/PSS-beschichteten Tiefenfilter konnten, bei einer niedrigen Ionenstärke von 20 mM Acetatpuffer mit pH 4, die meiste CalB mit der daraus resultierenden höchsten Aktivität binden. Die Ionenstärke der Puffer-

systeme hatte nur bei höheren Molaritäten (200 mM) einen negativen Einfluss auf die Bindungskapazität. Die PAH/PSS-beschichteten Tiefenfilter wurden hinsichtlich der Langzeitstabilität bei verschiedenen Lagerbedingungen untersucht. Dabei führt die Lagerung in Puffer bei 4 °C zur geringsten Abnahme der spezifischen Aktivität. Die Halbwertszeit dieser Lagermethode liegt bei 108 Tagen. Trusek-Holownia und Noworyta zeigten, dass Lipasen aus *C. antarctica*, die an/in Membranen gebunden sind, eine Halbwertszeit zwischen 15 Stunden und 10 Tagen, abhängig von den verwendeten Membranen (Polyamid, Polypropylen, Zellulose), haben. Die höchste Halbwertszeit konnte mit Polypropylen-Membranen und die niedrigste mit Zellulose-Membranen erreicht werden [112]. Mit der PAH/PSS-Beschichtung konnte im Vergleich dazu eine 10,8-fach längere Halbwertszeit erreicht werden. Des Weiteren wurde die Mehrfachverwendbarkeit von beladenen Tiefenfiltern untersucht. Nach 4-fachem Gebrauch ist die spezifische Aktivität um 50 % gesunken. Die Lipase wird durch die Bindung an die Tiefenfilter stabilisiert und kann durch die Bindung an eine Matrix mehrfach genutzt werden. Darüber hinaus können Synthesen durch die Entfernung des Biokatalysators zügig gestoppt werden. Das verhindert, dass das Hauptprodukt mit dem Enzym kontaminiert wird. Das Direct Capture, das Binden von CalB aus zellfreiem Überstand, konnte erfolgreich mit PAH/PSS-beschichteten Tiefenfiltern durchgeführt werden. Diese Technik ist eine zeitsparende und günstige Methode, produzierte Enzyme für katalytische Umsetzungen schnell aufzureinigen und gleichzeitig die Vorteile der Bindung an einen Träger zu nutzen. Die Haltbarkeit von Trägermaterialien wurde bei den Glutaraldehyd-aktivierten Tiefenfiltern untersucht. Dabei wurden neue Filter mit einem Jahr alte Filter verglichen. Wie vermutet, weisen diese Filtertypen nur eine begrenzte Haltbarkeit auf. Die Bindungskapazität und die Enzymaktivität nahmen drastisch ab. Die aktivierte PAH-Beschichtung ist mit ca. 10 % Kapazitäts- und ca. 9 % Aktivitätsverlust die robustere Beschichtung. Aufgrund der Vielfalt der beschichteten Tiefenfilter ist ein breiter Einsatz für die industrielle Nutzung möglich. Die Kosten- und Zeitersparnis durch die Lipase-Isolation macht diese Anwendung für großtechnische Biokatalysen und biotechnologische Anwendungen interessant [113].

4 Periodic Counter-Current Chromatographie

In diesem Kapitel wird die Etablierung einer Periodic Counter-Current Chromatographie beschrieben. Die PCC soll einen konventionellen Einsatz der Chromatographie durch periodische Verwendung seriell, zyklisch angeordneter Membranadsorber-Einheiten ermöglichen. Anstelle von konventionellen, partikelbasierten Chromatographiesäulen werden in dieser Anlage Membranadsorber genutzt. Die verfahrenstechnische Installation der einzelnen Komponenten und die damit zusammenhängende Automatisierung werden erläutert. Die Anlage wird charakterisiert und eine grundlegende Testung und Validierung anhand der Trennung von BSA und Lysozym durchgeführt. Danach wird die PCC-Anlage für die Trennung von dem Enzym CalB aus *E.-coli*-Lysat verwendet.

4.1 Etablierung einer PCC-Einheit

4.1.1 State of the Art

Das Unternehmen GE Healthcare Bio-Sciences (Schweden) meldete am 8. Mai 2011 ein Patent (US 7,901,581 B2) an, das eine semi-kontinuierliche chromatographische Methode ist, welche auf der SMB beruht [68]. Die Erfinder M. Bryntesson, M. Hall und K. Lacki stellen ein Verfahren vor, in dem mindestens drei in Reihe geschaltete Adsorbentien für das Binden der Zielkomponente genutzt werden. Diese Periodic Counter-Current Chromatographie, wurde bereits in Kapitel 2.2.3 vorgestellt. GE Healthcare bietet ein

kommerziell erhältliches System, die Äkta pcc für kontinuierliche Chromatographie, an. Das im Labormaßstab betriebene System auf Plattform der Äkta avant kann je nach Konfiguration mit 3 Säulen (3C-PCC) oder 4 Säulen (4C-PCC) betrieben werden. Das Äkta pcc System kann mit Flussraten bis zu 75 mL/min betrieben werden und bietet für jede Säule UV-Detektoren (280 nm Festwellenlänge) an. Außerdem werden der Druck, die Konduktivität und der pH-Wert detektiert. Auch für den Produktionsmaßstab bietet GE Healthcare geeignete Systeme an. Die Prozesssteuerung wird mit der Systemsteuerungssoftware Unicorn durchgeführt.

Die Vorteile, ein eigenes PCC-System aufzubauen, sind primär die Kosteneinsparungen. Das im Folgenden erläuterte Set-up kostet 10 % des kommerziellen Systems. Des Weiteren kann auf Komponenten verzichtet werden, die für die Fragestellung irrelevant sind, wie die pH-Wert- und Konduktivitätsdetektion. Andere Komponenten, wie die Spektrometer und die Lichtquelle, können UV/Vis-Bereiche scannen und nicht nur bei einer Festwellenlänge messen. Das in dieser Arbeit aufgebaute System mit 3 Säulen ist handlich und somit portabel und kann außerdem einfach modifiziert werden, z. B. für den Gebrauch von 4 Säulen. Da die aufgebaute PCC-Einheit nicht für kommerzielle Zwecke eingesetzt wird, steht diese nicht in Konflikt mit dem oben genannten Patent.

4.1.2 Planung und Aufbau der Versuchsanlage

In Abbildung 4.1 ist die Verschaltung der PCC-Anlage gezeigt, um das Konzept einer PCC-Einheit zu realisieren. Links sind die Reservoirs des Feeds und der Puffer (A1 und B1), die über die Pumpe (P1) ins System eingespeist werden. Über die Mischkammer können die Puffer gemischt werden, um beispielsweise verschiedene Elutionsprofile zu realisieren. Die Ventile ermöglichen die Umsetzung des Prinzips der PCC. Die Ventile E1 bis E6 werden für die Phasen Equilibrierung, Waschen und Elution genutzt, die direkt zum Fraktionssammler führen. Die Ventile F1 bis F8 sind für die Beladung mit dem Feedstrom zuständig. Lediglich die Ventile M1 bis M7 kommen während des Prozesses sowohl in Kontakt mit dem Feed als auch mit den Puffern. Dieser komplexe Aufbau erlaubt einerseits die Beladung eines einzelnen Membranadsorbers, andererseits auch die Beladung der Membranadsorber in Reihe. Die Ventile F7 und F8 ermöglichen hierbei den zyklischen Betrieb, der Grundlage der Periodic Counter-Current Chromatographie.

Der Aufbau besteht aus drei Membranadsorbern mit je einem nachfolgendem UV/Vis-Detektor, die maßgeblich für die Umschaltbedingungen der Ventile verantwortlich sind.

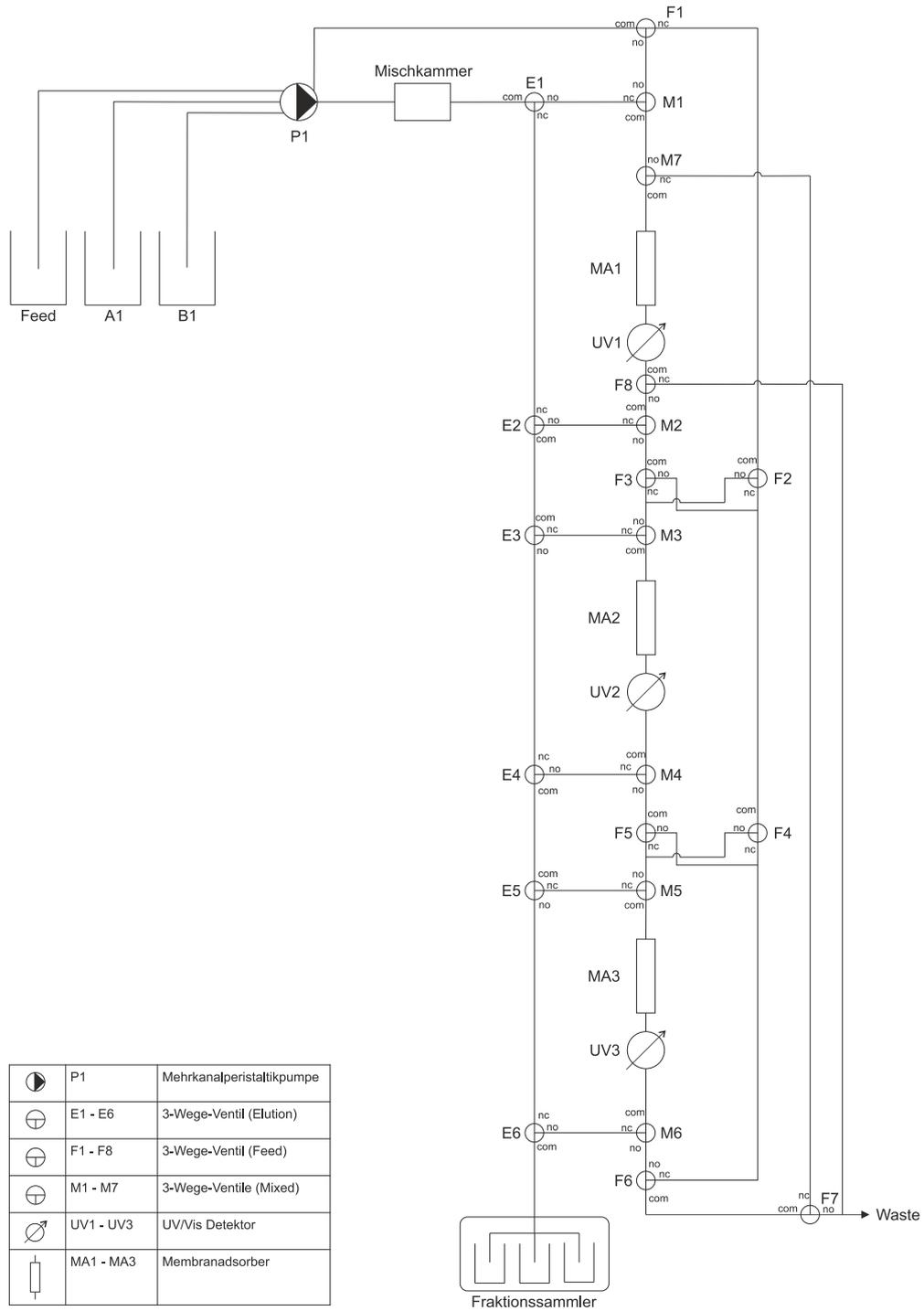
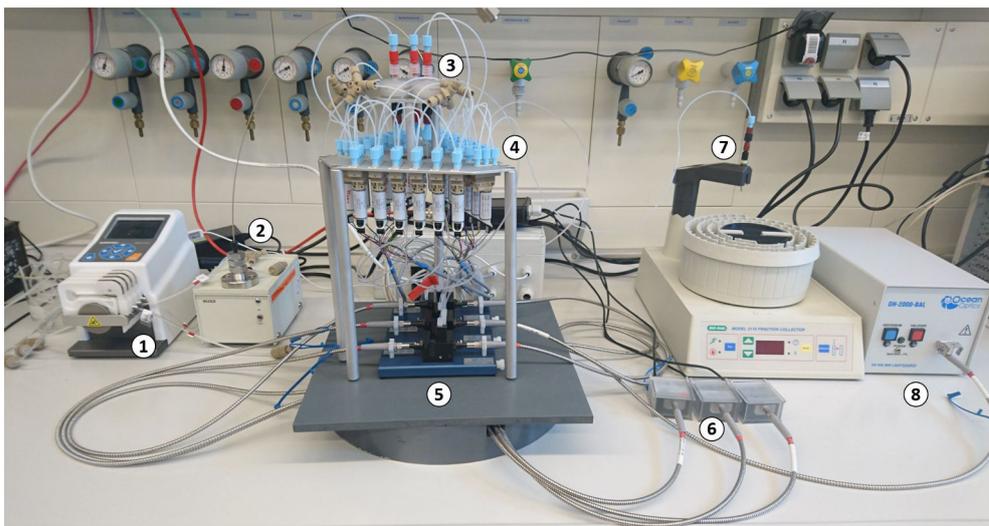


Abbildung 4.1: Schaltplan der PCC-Anlage.

Abbildung 4.2 zeigt ein Foto der PCC-Anlage, bestehend aus einer peristaltischen Mehrkanalpumpe mit vier Kanälen von Ismatec (Deutschland). Die Kanäle können separat angesteuert werden, um den Feed, den Laufpuffer (A1) und den Elutionspuffer (B1) zu fördern. Die maximale Pumprate ist abhängig vom verwendeten Pumpschlauch. In dieser Konfiguration werden Pumpschläuche mit einem Innendurchmesser (iD) von 1,22 mm verwendet, die eine maximale Pumprate von 8,6 mL/min ermöglichen. Die Pumprate, die maximal pro Kanal mit diesem Pumpentyp erreicht werden kann, ist 35 mL/min. In der Mischkammer von Hitachi (Japan) können die Puffer für die Elution gemischt werden. In der Mitte der Abbildung sind in einem Gestell die 21 3-Wege-Magnetventile von The Lee Company (USA) verbaut sowie drei Membranadsorber Sartobind[®] von Sartorius (Deutschland), die anstelle von gepackten Säulen verwendet werden. Die verwendeten Membranadsorber bestehen aus 15 gewickelten Schichten mit einer Gesamtfläche von je 75 cm² und einem Totvolumen von 2,1 mL. In der Mitte der Abbildung befinden sich drei Durchfluss-Quarzglasküvetten von Hellma Analytics (Deutschland) mit einer Schichtdicke von 10 mm, die zur UV-Messung dienen. Die Schichtdicke ist dazu geeignet, niedrigkonzentrierte Proteinlösungen bis zu einer Absorption von 1,5 rel. Absorptionseinheiten (AU) bei einer Wellenlänge von 280 nm zu messen (Lambert-Beer'sches Gesetz). Neben den Durchflussküvetten befinden sich drei Spektrometer sowie die Deuterium-/Halogenlichtquelle, mit der Wellenlängen von 230 nm - 2.500 nm erzeugt werden können.



- 1 Pumpe
- 2 Mischkammer
- 3 Membranadsorber
- 4 Ventile
- 5 Durchflussküvetten
- 6 UV-Spektrometer
- 7 Fraktionssammler
- 8 Lichtquelle

Abbildung 4.2: Konfiguration der PCC-Anlage mit Peristaltikpumpe, Mischkammer, Durchfluss-Quarzglasküvetten, Membranadsorber, 3-Wege-Ventile, UV-Spektrometer, Deuterium/Halogen-Lichtquelle und Fraktionssammler.

Der Aufbau der Lichtquelle mit den Lichtleitern und den Spektrometern ist in Abbildung 4.3 gezeigt. Die STS-UV Spektrometer von Ocean Optics (USA) decken den Messbereich von 190-650 nm ab. Das Gerät bietet neben einer kompakten Bauweise (40 x 42 x 24 mm) den Vorteil, dass es einfach und schnell zu verwenden ist (Plug and Play). Des Weiteren sind die Messungen thermisch über einen weiten Temperaturbereich stabil. Bei den folgenden Versuchen werden die aromatischen Seitenketten (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) von Proteinen bei 280 nm detektiert, weshalb nur die Deuteriumlampe als Lichtquelle verwendet wird. Der Fraktionssammler von Bio-Rad (USA) ermöglicht das Sammeln von Proben bis zu einem Volumen von je 5 mL. Die Pumpe, die Ventile, die Spektrometer und der Fraktionssammler werden über ein Steuerprogramm bedient (vgl. Kapitel 4.1.3).

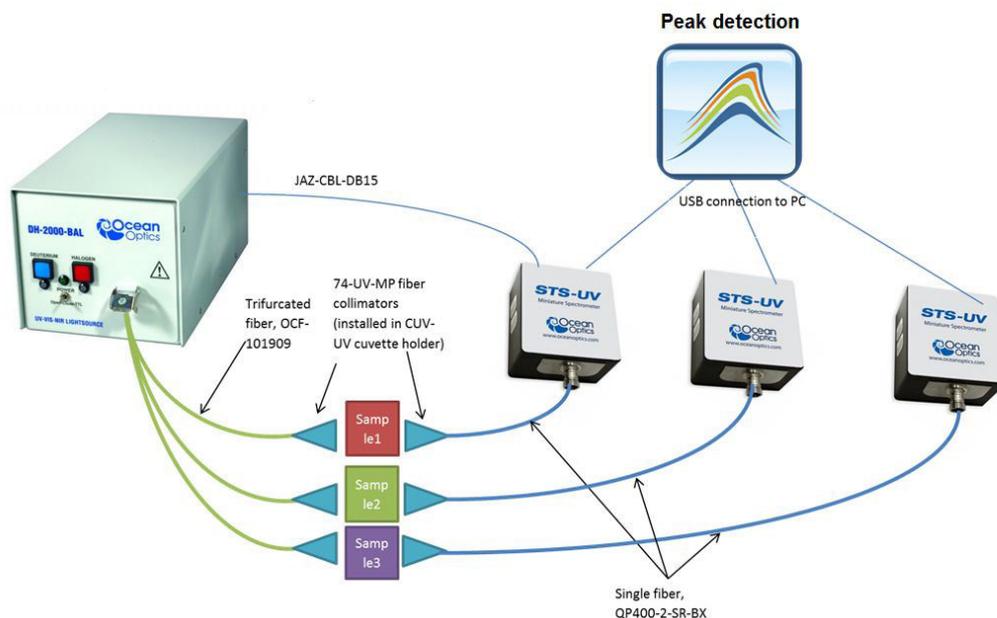


Abbildung 4.3: Aufbau der UV/Vis Detektion mit den Lichtleitern, den drei Spektrometern und der Lichtquelle von Ocean Optics.

In Tabelle 4.1 sind die verwendeten Bauteile, die Anzahl bzw. Länge sowie das Totvolumen aufgeführt. Das Gesamttotvolumen der PCC beträgt 22 mL. Das Totvolumen von der UV-Messung in den Durchflussküvetten bis zum Fraktionssammler beträgt für alle drei Messstellen 3 mL, wodurch die Beprobung durch den Fraktionssammler vereinfacht wird. Diese Verzögerung von der UV-Messung bis zur Fraktionierung wurde in dem Steuerprogramm hinterlegt.

Tabelle 4.1: Übersicht der verbauten Komponenten der PCC

Komponente	Hersteller	Anzahl/Länge	Gesamtvolumen
Pumpe Reglo ICC	Ismatec (Deutschland)	1	-
Pumpschläuche iD 1,22 mm	Saint-Gobain Performance Plastics (Frankreich)	3	1,4 mL
Schläuche iD 0,8 mm	Bohlender GmbH (Deutschland)	12 m	6 mL
Schläuche iD 1,1 mm	Bohlender GmbH (Deutschland)	2,96 m	2,8 mL
Dynamischer Mischer GT0387	Hitachi (Japan)	1	0,5 mL
Membranadsorber Sartobind® Q MA75	Sartorius Stedim GmbH (Deutschland)	3	6,3 mL
Durchflussküvette (d = 10 mm)	Hellma Analytics (Deutschland)	3	1,2 mL
3-Wege-Magnetventil	The Lee Company (USA)	21	3,8 mL
Küvettenhalter	Ocean Optics (USA)	3	-
Spektrometer STS-UV	Ocean Optics (USA)	3	-
Lichtquelle DH-2000-BAL	Ocean Optics (USA)	1	-
Fraktionssammler Model 2110	Bio-Rad (USA)	1	-
Totvolumen gesamt:			22 mL

4.1.3 Automatisierung der Anlage

Die Kommunikation der verschiedenen Teile der Anlage erfolgt über ein TCP/IP-Netzwerk und Modbus-Protokolle. Dabei besteht der zentrale Bestandteil der Kommunikation aus zwei Modbus-Servern. Der eine Modbus-Server ist für die Ansteuerung der Spektrometer zuständig und läuft auf einem Raspberry Pi Computer. Der zweite Modbus-Server übernimmt die Ventilansteuerung und die Steuerung des Fraktionssammlers und läuft auf dem Feldbuskoppler. Die gesamte Kommunikation der Programme bzw. der Geräte wird über das pythonTM-Skript (Client) geregelt, welches auf dem Linux Mini Computer ODROID C1+ läuft. In Tabelle 4.2 sind die einzelnen Komponenten und deren Beschreibung aufgelistet.

Tabelle 4.2: Bauteileliste der Steuereinheit

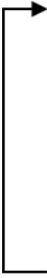
Komponente	Beschreibung	Hersteller
Raspberry Pi 2 Model B	Linux Mini Computer/ Einplatinencomputer	Raspberry Pi Foundation
Feldbuskoppler 750-352	Ansteuerung der IO-Module	WAGO
16 Kanal DO 750-1504	16 Kanal Ausgangsmodul	WAGO
8/8 Kanal DO/DI 750-1506	8 Kanal Ausgang/ 8 Kanal Eingangsmodul	WAGO
ODROID C1+	Linux Mini Computer/ Einplatinencomputer	Hardkernel
MDR-60-24	Stromversorgung 24 V	Mean Well
MDR-10-5	Stromversorgung 5 V	Mean Well

Mithilfe der Programmiersprache pythonTM wurde ein Steuer-Skript (vgl. Anhang C.1) geschrieben, das auf dem Linux Rechner läuft. In diesem Skript sind die einzelnen Komponenten (Ventile, Pumpe, Spektrometer und Fraktionssammler) eingebunden, um diese für den automatisierten Betrieb anzusteuern. Die ausgelesenen Messwerte rechnet das Programm in die Absorption um. Neben dem Hauptskript gibt es ein Skript, das den grundsätzlichen Ablauf des Prinzips der PCC steuert. Das Skript ist in verschiedene Blöcke unterteilt, die parallel oder in Abhängigkeit voneinander ablaufen. In der Programmstruktur werden zunächst die verschiedenen Phasen (Beladung, Waschen, Elution und Regeneration) definiert. Dabei werden die benötigten Ventileinstellungen und die Pumpraten der einzelnen Kanäle festgelegt. Diese Phasen werden dann so kombiniert, dass ein automatisierter kontinuierlicher Ablauf der Aufreinigung gewährleistet ist. Des Weiteren werden auch die Switching Conditions (sc1 und sc2) festgelegt, die als Kriterium dienen, in die nächste Phase zu gelangen. Diese Switching Conditions beruhen dabei auf der UV-Messung der Spektrometer bei 280 nm und den übermittelten Daten.

Grundsätzlich besteht dieser Ablauf aus folgenden Phasen:

0. Initialisierung aller Komponenten: alle Geräte werden zurückgesetzt und neu gestartet

- Beladung Membranadsorber 1 (MA1) bis $sc1_{MA1}$
- Beladung MA1 und MA2 bis $sc2_{MA1}$

- 
1. Beladung MA2 bis $sc1_{MA2}$ + Waschen und Elution von MA1
 2. Beladung MA2 und MA3 bis $sc2_{MA2}$ + Elution und Equilibrierung von MA1
 3. Beladung MA3 bis $sc1_{MA3}$ + Waschen und Elution von MA2
 4. Beladung MA3 und MA1 bis $sc2_{MA3}$ + Elution und Equilibrierung von MA2
 5. Beladung MA1 bis $sc1_{MA1}$ + Waschen und Elution von MA3
 6. Beladung MA1 und MA2 bis $sc2_{MA1}$ + Elution und Equilibrierung von MA3

Die Phase 0 wird nur zu Beginn ausgeführt. Wenn Phase 6 durchlaufen wurde, ist ein Zyklus beendet, und der nächste Zyklus wird in Phase 1 gestartet.

Die Visualisierung der Anlage wurde mit Hilfe der Software ProfiLab-Expert 4.0 von Abacom (Deutschland) erstellt. So können die Hardwaregeräte (Pumpe, Spektrometer, Ventile) über eine Bedienoberfläche manuell gesteuert werden. Die Signale werden dabei simultan erfasst, verarbeitet und ausgegeben.

In Abbildung 4.4 ist die Bedienoberfläche (Anlagenbild), sowohl für die manuelle Schaltung der Ventile als auch der Zustandsanzeige im automatisierten Betrieb, gezeigt. Wenn die Ventile geschaltet sind (Symbol leuchtet grün), ist das Ventil in der Stellung n.c. (normally closed). Wenn das Symbol grau ist, ist das Ventil in der Stellung n.o. (normally opened); dies sind die beiden möglichen Ventilstellungen der 3-Wege-Ventile.

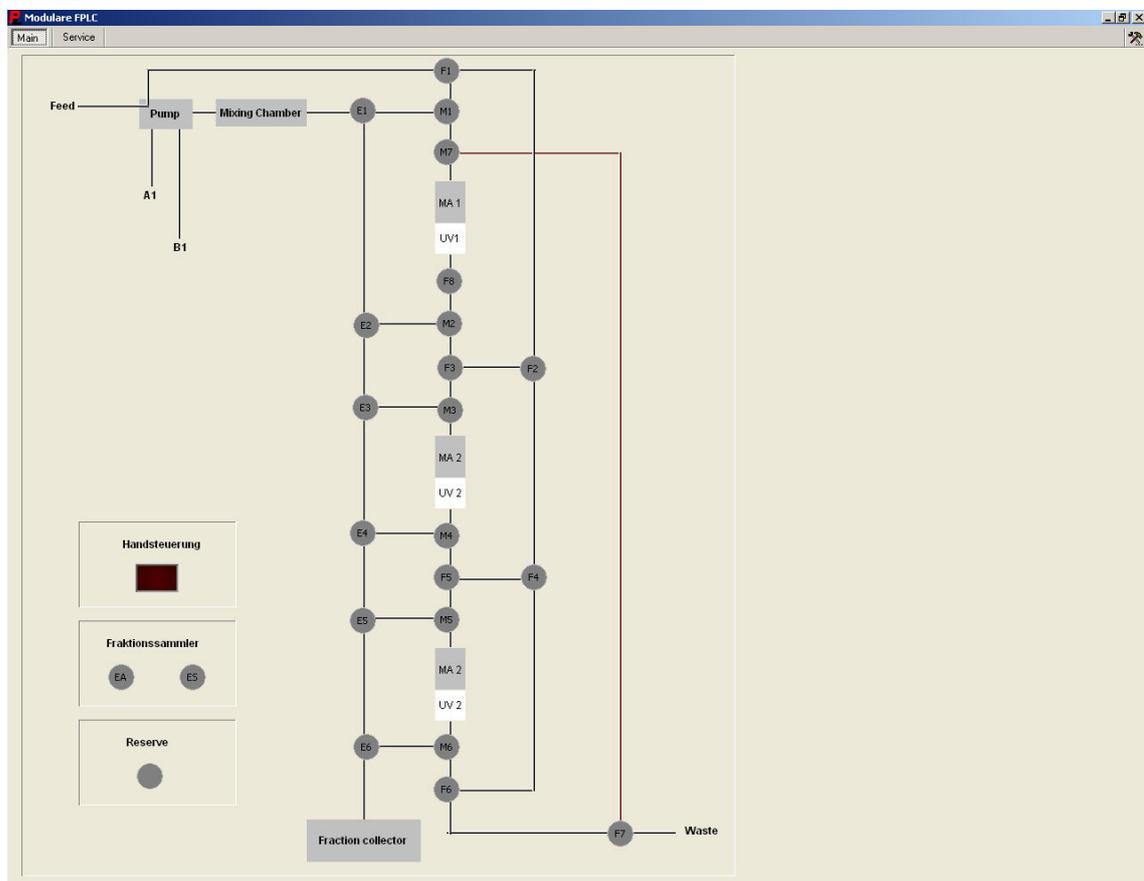


Abbildung 4.4: Manuelle Bedienoberfläche zur Schaltung der Ventile, erstellt mit ProfiLab-Expert 4.0.

Die Bedienoberfläche der Spektrometer, die in diesem Fall bei 280 nm messen, ist in Abbildung 4.5 gezeigt. Oben werden die gesetzte Integrationszeit sowie ein Zähler

der einzelnen Messungen gezeigt. Darunter sind die drei Spektrometer aufgeführt. Da die verwendeten Spektrometer auch bei Dunkelheit ein Sensorsignal (Rauschen) ausgeben, muss dieser Wert von den Messwerten subtrahiert werden. Dafür muss einmalig vor Messbeginn für jedes Spektrometer der Dark-Button geklickt werden. Des Weiteren kann über diese Oberfläche eine Referenz mit Wasser oder Puffer (Blank) gesetzt werden. Darunter werden die aktuellen Absorptionsmesswerte gezeigt, die mithilfe des ProfiSignal Programms in eine Messdatenbank aufgenommen werden. Die Messwerte werden dabei sowohl in eine Tabelle geschrieben als auch graphisch zur online-Verfolgung dargestellt. Die Messdaten können nach erfolgten Versuchen ausgelesen und analysiert werden.

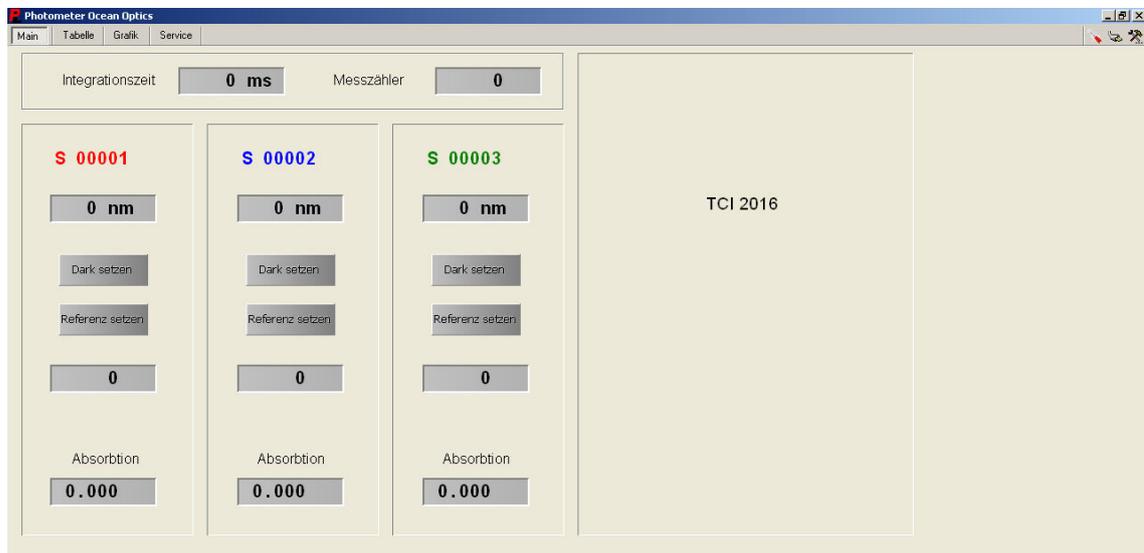


Abbildung 4.5: Manuelle Bedienoberfläche zum Festlegen des Dark- und des Referenzwertes, erstellt mit ProfiLab-Expert 4.0.

4.1.4 Charakterisierung der PCC

Um das Prinzip der PCC erfolgreich durchführen zu können, muss die Detektierbarkeit der Standardproteine mit dem Messsystem gewährleistet sein. Dazu müssen zunächst die Integrationszeit sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Spektrometer bestimmt werden. So kann sichergestellt werden, dass im linearen Bereich des Detektors gemessen wird, um eine Übersteuerung zu vermeiden.

4.1.4.1 Bestimmung der Integrationszeit

Die Integrationszeiten der STS-UV Spektrometer können zwischen $10 \mu\text{s}$ - 10s variiert werden. Die Integrationszeit bestimmt, wie schnell die Spektren auf Absorptionsänderungen reagieren können. Je kleiner die Integrationszeit, desto schneller können Änderungen erfasst werden, aber desto geringer ist auch die Messgenauigkeit. Das hat verrauschte Spektren zur Folge. Bei längeren Integrationszeiten können hingegen kleine Schwankungen der Absorption nicht erfasst werden. Das führt zu weniger Rauschen und Messausreißern. Um die optimale Integrationszeit zu bestimmen, wird das Standardprotein BSA in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10 g/L variiert. Die Integrationszeiten werden im Bereich von 50 ms - 400 ms für die verschiedenen Proteinkonzentrationen untersucht. Die Messergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Der lineare Messbereich der UV-Messung bei 280 nm endet bei $2,5 \text{ g/L}$ BSA. Die Messpunkte der verschiedenen Integrationszeiten variieren um maximal 8% .

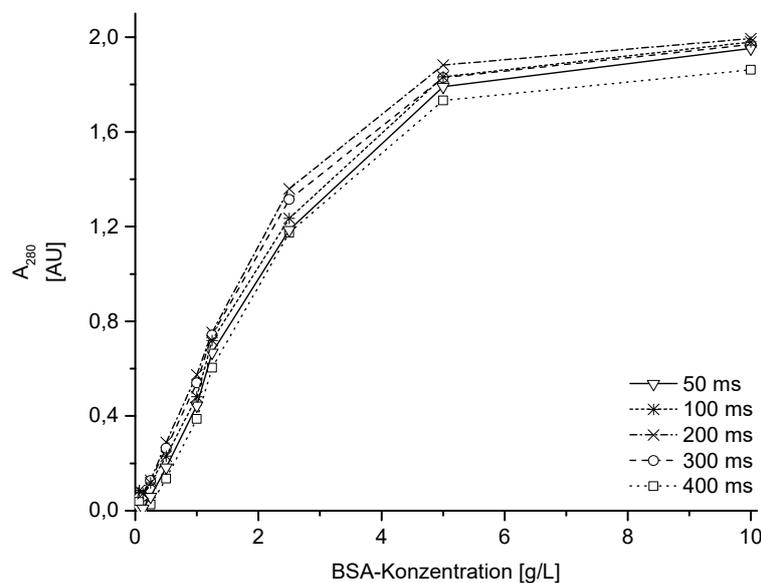


Abbildung 4.6: Untersuchung unterschiedlicher Integrationszeiten von $50 - 400 \text{ ms}$ bei der Messung verschiedener BSA-Konzentrationen bei einer Wellenlänge von 280 nm [114].

Bei Betrachtung des linearen Bereichs (vgl. Abbildung 4.7) und insbesondere des niedrig konzentrierten Bereichs liefert die Integrationszeit von 200 ms die höchste Sensitivität. Die niedrigsten Konzentrationen (0,0625 g/L und 0,125 g/L) können mit den anderen Integrationszeiten nicht richtig abgebildet werden, sodass für weitere Versuche 200 ms Integrationszeit gewählt wurde, da diese Zeit die beste Auflösung und Empfindlichkeit auch im gering konzentrierten Bereich liefert.

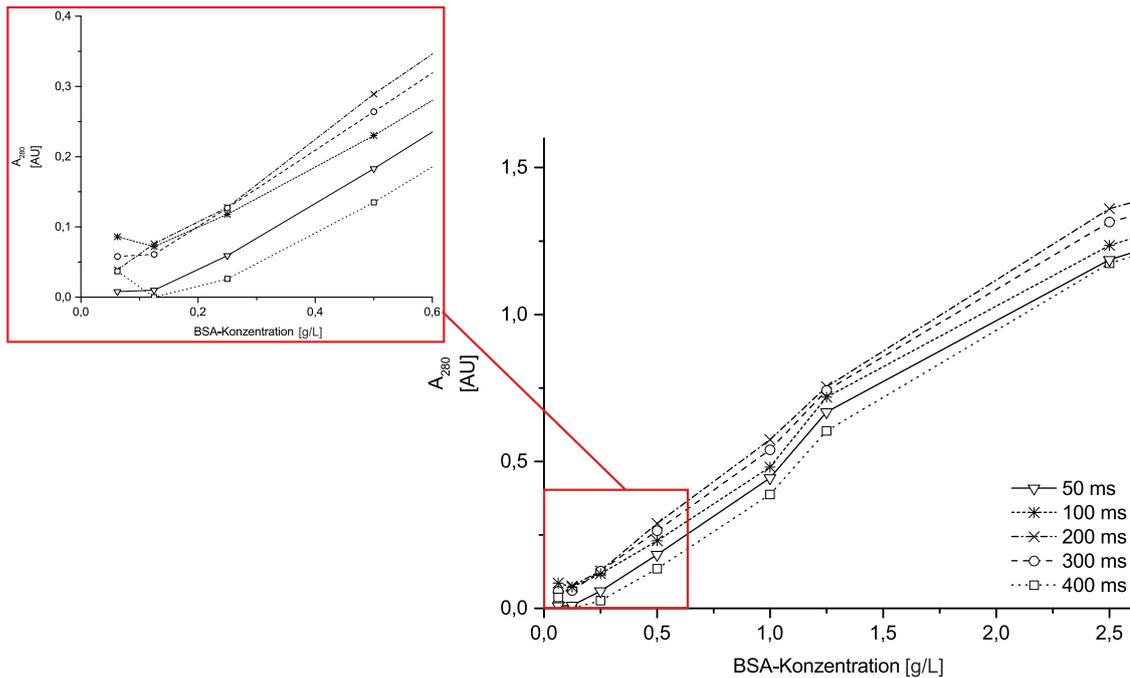


Abbildung 4.7: Darstellung des linearen Messbereichs der verschiedenen Integrationszeiten sowie Zoom des niedrig konzentrierten Proteingehalts [114].

4.1.4.2 Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

In den Qualitätsrichtlinien der ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) wird die Validierung von analytischen Verfahren beschrieben. Die Nachweisgrenze (LOD: limit of detection) und die Bestimmungsgrenze (LOQ: limit of quantification) können anhand der Kalibrationsgeraden bestimmt werden. In Abbildung 4.8 sind die Kalibrationsgeraden für alle drei Spektrometer für die Proteine BSA, Lysozym und CalB gezeigt.

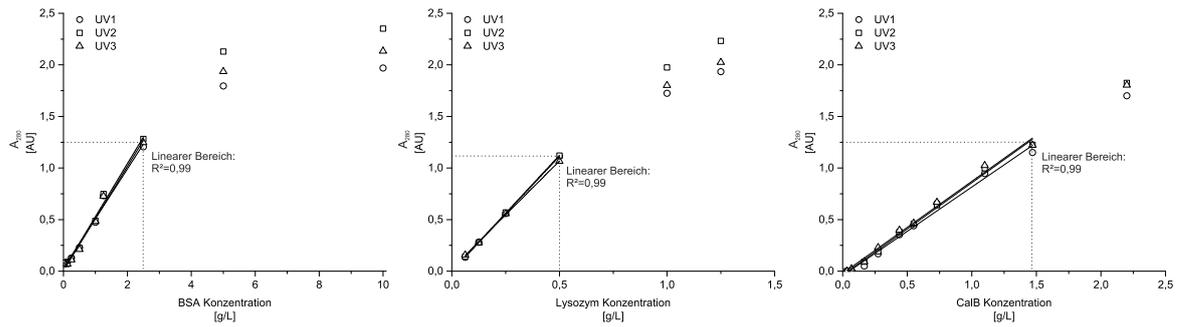


Abbildung 4.8: Kalibrationsgeraden aller drei Spektrometer für die Standardproteine BSA, Lysozym und CalB. Anhand des linearen Bereichs werden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen berechnet [114].

Aus den Messungen im linearen Bereich können die Qualitätsmerkmale LOD und LOQ berechnet werden, die in Tabelle 4.3 zusammengefasst sind.

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \text{Standardabweichung der niedrigsten Konzentration}}{\text{Steigung der Kalibrationsgeraden}} \quad (4.1)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \text{Standardabweichung der niedrigsten Konzentration}}{\text{Steigung der Kalibrationsgeraden}} \quad (4.2)$$

Tabelle 4.3: Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) der Standardproteine BSA, Lysozym und CalB für die UV-Messung bei 280 nm mit den STS-UV Spektrometern der PCC-Anlage

Grenze	BSA [g/L]	Lysozym [g/L]	CalB [g/L]
LOD	0,101	0,012	0,047
LOQ	0,305	0,035	0,143

4.1.5 Fazit

In diesem Abschnitt wurde die verfahrenstechnische Installation der 3C-PCC-Anlage mit Membranadsorbern beschrieben. Die Kommunikation der einzelnen Komponenten der Anlage (Ventile, Spektrometer, Pumpe und Fraktionssammler) läuft über ein Modbus-Server. Mit einem pythonTM-Skript können diese Komponenten gesteuert werden. Für den automatisierten Ablauf des Prinzips der PCC wurde ein gesondertes pythonTM-Skript geschrieben, das die einzelnen Phasen der Aufreinigung steuert. Mit Hilfe der Software ProfiLab Expert wurde eine Bedienoberfläche für den manuellen Betrieb erstellt.

Nach erfolgter Inbetriebnahme der Anlage wurde die optimale Integrationszeit der Spektrometer bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die höchste Sensitivität bei der Messung verschiedener BSA-Konzentrationen (0,0625 g/L - 10 g/L) konnte mit einer Integrationszeit von 200 ms erzielt werden. Bei Betrachtung der Kalibrationskurven der drei Standardproteine BSA, Lysozym und CalB konnten die linearen Messbereiche definiert werden. Anhand des linearen Messbereichs konnte für alle Proteine die Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet werden.

4.2 Validierung der PCC-Einheit für die Trennung von BSA und Lysozym

In diesem Abschnitt wird die Validierung mit Hilfe der Trennung einer BSA-Lysozym-Mischung gezeigt. Beide Proteine sind kommerziell erhältlich und durch ihre Eigenschaften (vgl. Kapitel 2.3) eignen sie sich für erste Versuche an der PCC-Anlage. Bei dem binären Gemisch stellt BSA das Produkt und Lysozym die Verunreinigung dar. Zunächst wird auf die Methodenentwicklung eingegangen und anschließend die Übertragung der Aufreinigungsstrategie auf die PCC-Anlage beschrieben.

4.2.1 Methodenentwicklung zur Trennung von BSA und Lysozym

Mithilfe der Titrationskurven von BSA und Lysozym, die in Abbildung 2.12 (vgl. Kapitel 2.3.3) gezeigt sind, wurden erste Vorüberlegungen für die Methodenentwicklung getroffen. Um eine Trennung beider Proteine zu gewährleisten, sollten sie unterschiedliche Nettoladungen aufweisen. Als pH-Wert des Puffersystems wurde pH 7 gewählt, sodass BSA negativ geladen ist und an einen Anionenaustauscher binden kann und Lysozym positiv geladen ist und an einen Kationenaustauscher binden kann. Für die folgenden Versuche wurde ein starker Anionenaustauscher (Sartobind[®] Q 75) mit quarternären Ammoniumliganden gewählt, sodass BSA bindet und Lysozym durchbricht, um das Prinzip der PCC mit der aufgebauten Anlage zu testen. Folgende Bedingungen wurden für die Versuche verwendet:

- AEX-Membranadsorber Sartobind[®] Q MA75
- Flussrate: 5 mL/min
- Bindungspuffer: 20 mM Phosphat-Puffer mit pH 7,0
- Elutionspuffer: 20 mM Phosphat-Puffer mit pH 7,0 und 1 M NaCl

4.2.1.1 Bindungsexperiment

Mit dem FPLC System Äkta pure 25 L von GE Healthcare (Schweden) wurde eine geeignete Aufreinigungsmethode entwickelt. In Abbildung 4.9 ist das Chromatogramm der Bindungsexperimente sowie die dazugehörige SDS-PAGE dargestellt. Mit diesem Bindungsversuch wurde gezeigt, dass die Theorie mit der Praxis übereinstimmt und BSA an den Membranadsorber bindet. Lysozym stellt die Verunreinigung dar und bindet aufgrund der positiven Gesamtladung nicht. Die Konzentrationen der beiden Proteine wurden für dieses Experiment so gewählt, dass die Verunreinigung höher konzentriert vorliegt als das Produkt. Es wurden 1 g/L BSA und 4,8 g/L Lysozym in 20 mM Phosphat-Puffer mit pH 7,0 verwendet. Die Methode wurde zweimal mit jeweils 5 mL Probenvolumen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen.

Während der Probenaufgabe bricht Protein durch, das nicht an den Membranadsorber bindet. Die SDS-PAGE (vgl. Anhang B.2.1) zeigt, dass es sich hierbei um Lysozym (Bande bei 14 kDa) handelt und nicht um das Zielprotein BSA. Erst während der Elution mit steigendem Salzgradienten wird bei ca. 0,3 M NaCl das Zielprotein BSA in einem Peak mit einer kleinen Schulter (Tailing) eluiert und ist in der SDS-PAGE bei 66 kDa sichtbar. Neben den Banden der eingesetzten Proteine sind weitere Banden sichtbar, die aufgrund des technischen Reinheitsgrades der verwendeten Proteine erklärbar sind.

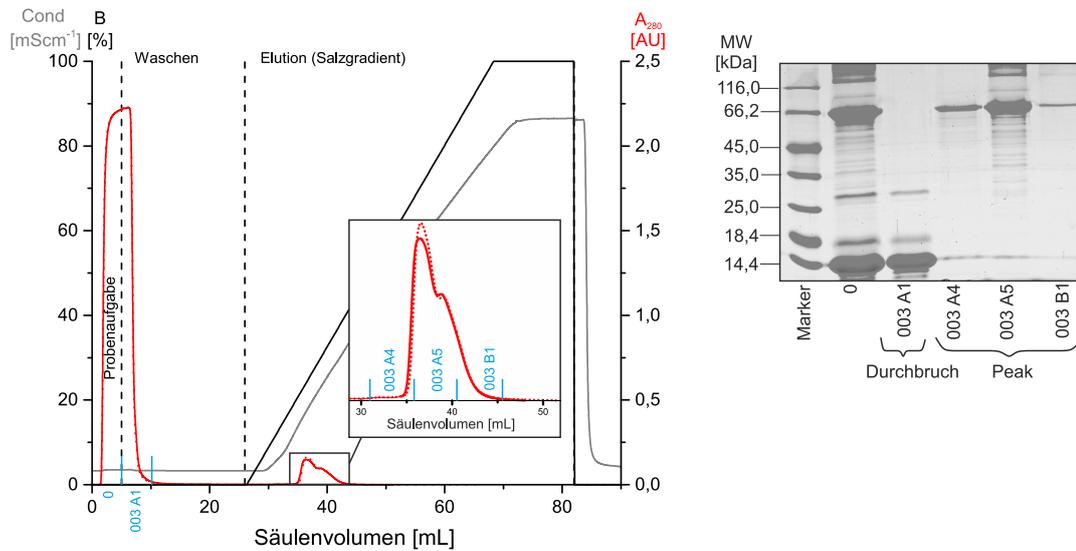


Abbildung 4.9: Links ist das Chromatogramm der Bindungsexperimente dargestellt. Die Probenaufgabe betrug jeweils 5 mL mit 1 g/L BSA und 4,8 g/L Lysozym in 20 mM Phosphat-Puffer mit pH 7,0 an Sartobind® Q. Rechts ist das Gel der SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung gezeigt. Die Probenaufgabe betrug: 5 μL Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) und jeweils 10 μL der Nullprobe (0), des Durchbruchs (003A1) und des Peaks (003A4 - 003B1) [114].

Geringe Unterschiede der Chromatographieläufe sind lediglich in der Elution zu erkennen, die mithilfe der Analytik nicht weiter bestätigt werden konnten. Die Wiederfindung liegt bei 94 %. Somit konnte gezeigt werden, dass mit einem AEX-Membranadsorber die Auftrennung von BSA und Lysozym erfolgreich ist (Proof of Concept), sodass im folgenden Abschnitt die benötigten Durchbruchkurven zur Ermittlung der Switching Conditions für die PCC aufgezeichnet werden können.

4.2.1.2 Kapazitätsbestimmung

Um die maximale Bindungskapazität des Membranadsorbers Sartobind® Q MA75 (Membranfläche: 75 cm^2) für BSA zu bestimmen, wurde eine Durchbruchskurve an der Äkta pure aufgenommen. Die Probenaufgabe der BSA-Lösung ($c = 4,9 \text{ g/L}$) wurde solange durchgeführt, bis das UV-Signal einen konstanten Endwert (UV_{max}) erreichte. Die Konzentration am Ausgang entspricht dann der Konzentration am Eingang der Säule.

In Abbildung 4.10 ist die Durchbruchskurve von BSA gezeigt. Nach Erreichen von 90 % Durchbruch steigt das Signal langsam an, bis schließlich UV_{\max} erreicht wird. Durch die Bauweise des Membranadsorbers mit dem engen Ein- und Auslass wird die Proteinlösung ungleichmäßig verteilt, wodurch diese Zeitverzögerung zustande kommen kann. Die dynamische Bindungskapazität bei 10 % des Durchbruchs (DB_{10}) beträgt 54,2 mg pro Membranadsorber und die statische Bindungskapazität (maximale Kapazität) 73,5 mg pro Membranadsorber.

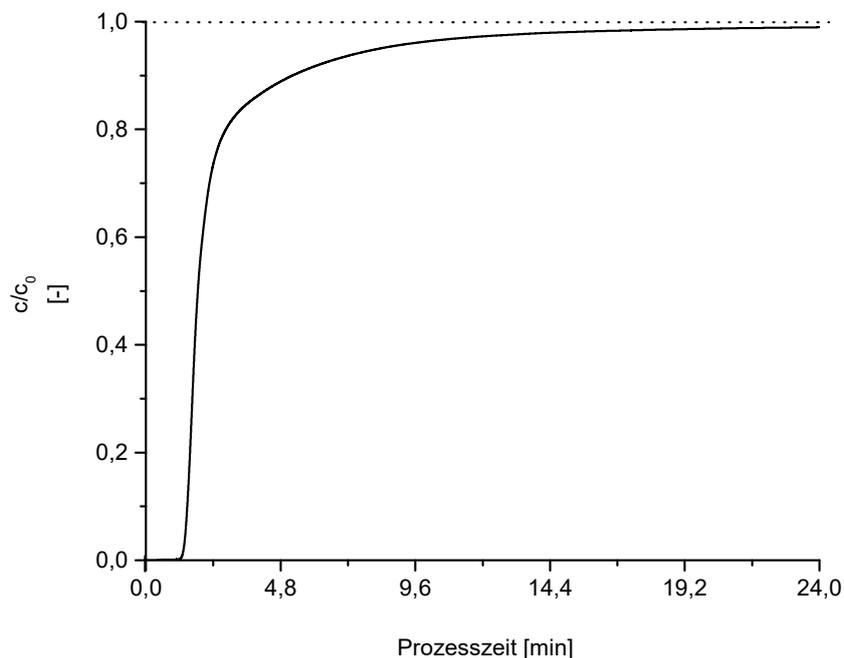


Abbildung 4.10: Normierte Durchbruchskurve von 4,9 g/L BSA an Sartobind® Q bei einer Flussrate von 5 mL/min [114].

4.2.1.3 Bestimmung der Doppeldurchbruchskurve

Die Doppeldurchbruchskurve wird an der PCC-Anlage und nicht mithilfe der Äkta pure bestimmt. Da die Schichtdicken der UV-Messzellen sich um den Faktor 5 (PCC: 10 mm und Äkta: 2 mm) unterscheiden, müssen die Proteinkonzentrationen angepasst werden. Des Weiteren müssen auch die linearen Messbereiche der einzelnen Proteine berücksichtigt werden (vgl. Abbildung 4.8).

Die Proteinlösung mit 1 g/L BSA und 0,25 g/L Lysozym wird auf die Membranadsorber der PCC-Anlage appliziert. Die Steuerung der Komponenten erfolgt für die Aufnahme der Durchbruchskurve manuell. In Abbildung 4.11 ist der Doppeldurchbruch zu sehen. Zunächst bricht die Verunreinigung Lysozym durch, und mit steigender Sättigung der Bindungsstellen des Membranadsorbers mit Zielprotein bricht BSA durch. Zur Bestimmung von UV_{\max} wird die Proteinlösung direkt in die Messküvette injiziert; diese beträgt 1,098 AU.

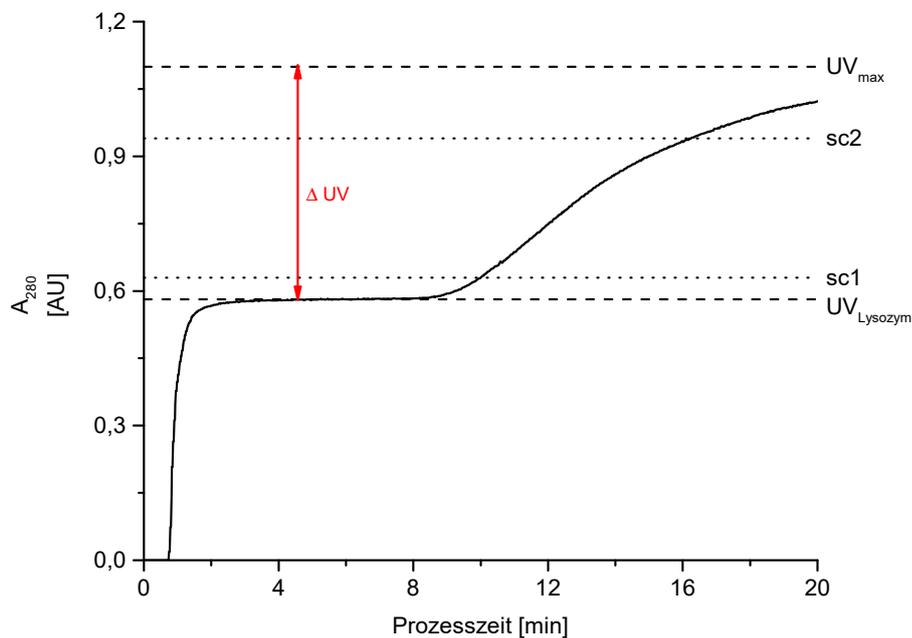


Abbildung 4.11: Chromatogramm der Doppeldurchbruchskurve von 1 g/L BSA und 0,25 g/L Lysozym bei 5 mL/min an Sartobind[®] Q zur Bestimmung der Switching Conditions [114].

Anhand der aufgenommenen Doppeldurchbruchskurve wird für UV_{Lysozym} ein Wert von 0,581 AU ermittelt. Die Differenz ΔUV zwischen UV_{\max} und UV_{Lysozym} beträgt 0,517 AU. Mithilfe von ΔUV werden die Switching Conditions (sc1 und sc2) berechnet:

$$sc1 = 0,1 \cdot \Delta UV + UV_{\text{Lysozym}} = 0,1 \cdot 0,517 \text{ AU} + 0,581 \text{ AU} = 0,630 \text{ AU} \quad (4.3)$$

$$sc2 = 0,7 \cdot \Delta UV + UV_{\text{Lysozym}} = 0,7 \cdot 0,517 \text{ AU} + 0,581 \text{ AU} = 0,940 \text{ AU} \quad (4.4)$$

In Anlehnung an Warikoo *et. al.* entspricht Switching Condition 1 (sc1) dem DB_{10} (dynamische Bindungskapazität bei 10 %) und Switching Condition 2 (sc2) 70 % der dynamischen Bindungskapazität[25].

4.2.2 Transfer auf die PCC-Anlage

Nachdem die Aufreinigungsmethode entwickelt und die Switching Conditions bestimmt wurden, muss der automatisierte Ablaufplan mit der Software pythonTM programmiert werden. In dem Programm werden zunächst die Switching Conditions übertragen. Die Pumpe und der Fraktionssammler werden initialisiert. Die Programmstruktur ist in Phasen unterteilt, welche Beladung, Waschen, Gradientenelution und Regeneration definieren. Die Definition enthält dabei die benötigten Ventileinstellungen, die Nutzung der Kanäle der Pumpe sowie die Pumpraten. Die definierten Phasen werden dann so kombiniert, dass das Prinzip der PCC erfüllt wird. Als Kriterium, um in die nächste Phase zu gelangen, dient der von den Spektrometern übermittelte Wert für die UV-Messung bei 280 nm (sc1 und sc2). Das pythonTM-Skript für die Aufreinigung ist im Anhang C.2 hinterlegt.

In Tabelle 4.4 ist der Ablauf für die Trennung von BSA und Lysozym zusammengefasst. Dabei sind das Beladen eines Membranadsorbers und das Waschen, die Elution und die Regeneration des nächsten Membranadsorbers zeitlich synchronisiert. Um die zweiphasige Beladung auf die drei Phasen Waschen, Elution und Regeneration anzupassen, werden die Pumpraten variiert. Während der Beladung wird mit 5 mL/min und während des Waschens, der Elution und der Regeneration mit 8,6 mL/min gepumpt. Des Weiteren werden auch Pausenzeiten eingefügt, die auf die Trennaufgabe zugeschnitten sind. Ein Zyklus ist definiert als Beladung, Elution und Regeneration aller drei Membranadsorber und dauert 46 min.

Tabelle 4.4: Ablauf der Phasen für die automatisierte Aufreinigung von BSA und Lysozym mit der PCC-Anlage

Beladung	Waschen, Elution, Regeneration	Dauer
MA1 bis sc1	Waschen MA3	
MA1 bis sc2	Elution MA3	
	Regeneration MA3	
MA2 bis sc1	Waschen MA1	
MA2 bis sc2	Elution MA1	46 min
	Regeneration MA1	
MA3 bis sc1	Waschen MA2	
MA3 bis sc2	Elution MA2	
	Regeneration MA2	

Dieser Ablauf wurde zunächst auf Fehler getestet, um dann im Langzeitbetrieb automatisiert die Aufreinigung von BSA und Lysozym durchzuführen. Für das Langzeitexperiment wurden 1,7 L der Proteinlösung ($c_{\text{BSA}} = 1 \text{ g/L}$ und $c_{\text{Lysozym}} = 0,25 \text{ g/L}$) eingesetzt. Zusätzlich wurden 2,5 L Bindungs- und Elutionspuffer benötigt. In 5,5 h wurden über 7 Zyklen 1,44 g BSA aufgereinigt.

In Abbildung 4.12 sind die sieben Zyklen des Langzeitversuchs sowie der erste Zyklus als Vergrößerung dargestellt. Im ersten Zyklus unterscheiden sich die Durchbruchkurven der Membranadsorber hinsichtlich der UV-Messdaten des Plateaus der Verunreinigungen. Dieser Unterschied kann durch unterschiedliches Equilibrieren der Membranadsorber zustande kommen. Ab dem zweiten Zyklus liegt die Differenz im Rahmen der Abweichung der Spektrometer von 4 %. Da der lineare Bereich von BSA nur bis 1,25 rel. AU geht, kann über die unterschiedlichen Höhen der Elutionspeaks kein Rückschluss auf die Proteinkonzentration getroffen werden. Der Versuch musste nach 7 Zyklen abgebrochen werden, da das Erreichen von sc2 zum Produktdurchbruch auf den nachfolgendem Membranadsorber führte (vgl. Kapitel 2.2.3).

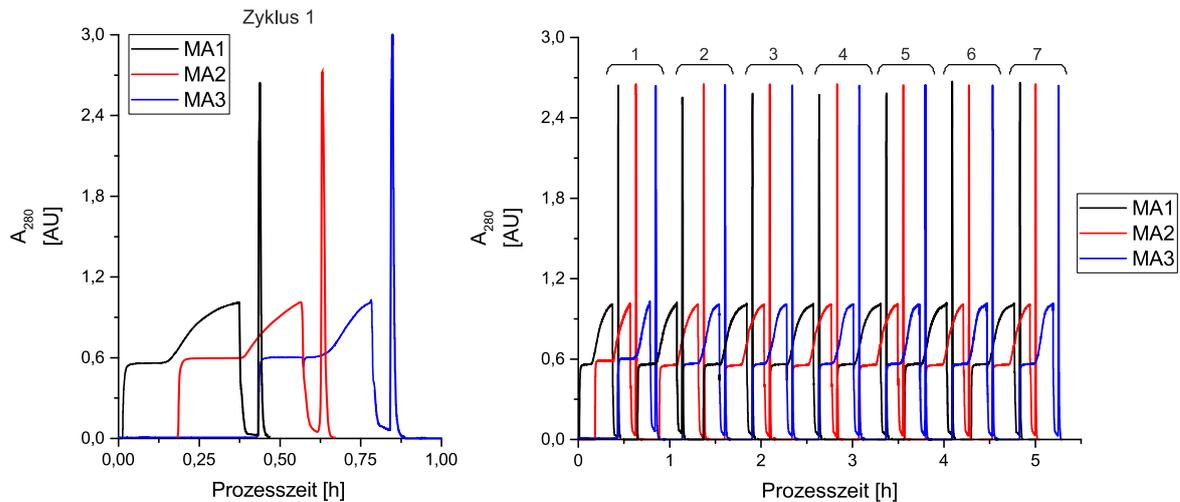


Abbildung 4.12: Links ist das Chromatogramm des ersten Zyklus vergrößert dargestellt. Rechts ist das Chromatogramm des PCC-Langzeitversuch mit 7 Zyklen zur Aufreinigung von BSA gezeigt. Aufreinigung von 1,7 L Proteinlösung aus 1 g/L BSA und 0,25 g/L Lysozym in 5,5 h. Feed-Volumenstrom: 2,5 mL/min, Puffer A und B: 8,6 mL/min [114].

Exemplarisch wurden die Zyklen 1 und 6 mittels Bradford-Assay und SDS-PAGE analysiert. Hierfür wurden die Proben von dem Waschschriff und dem Elutionspeak vereint. In Abbildung 4.13 ist das mit Coomassie gefärbte Gel gezeigt. In den Elutionsproben aller Membranadsorber beider Zyklen sind klare Banden bei der Größe von BSA zu erkennen. Aufgrund des technischen Reinheitsgrades sind auch noch weitere Verunreinigungen zu sehen, die bei den gleichen Bedingungen eluieren wie das BSA. Lysozym ist zu keiner Zeit des Prozesses in den Elutionsfraktionen detektierbar. Während des Waschens wird die verbleibende Feed-Lösung (Gemisch aus BSA und Lysozym) aus dem Membranadsorber gespült, sodass in den Waschfraktionen Banden beider Proteine detektiert werden. Im Waschschriff geht somit Produkt verloren. Diesen Verlust könnte man durch einen sogenannten Interconnected Wash verhindern. Dabei wird die Waschfraktion auf einen Membranadsorber geleitet, und das Produkt kann an die freien Bindungsstellen binden. Das hätte allerdings Umbaumaßnahmen der PCC-Anlage zur Folge.

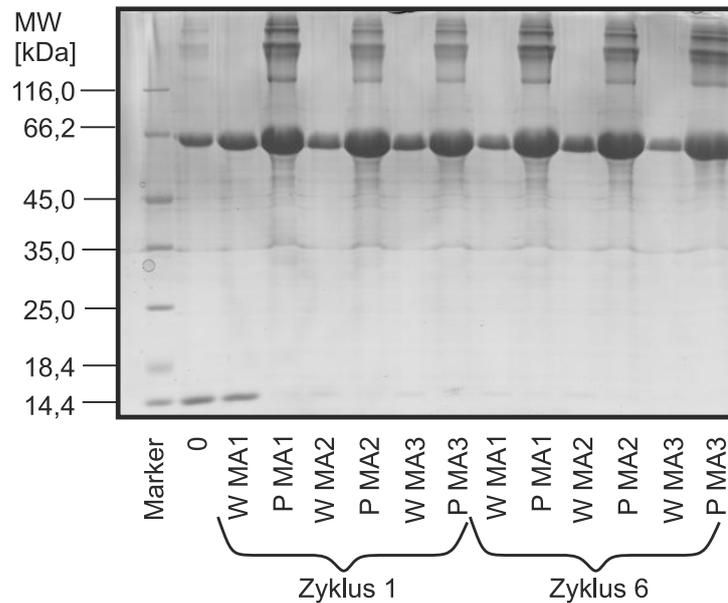


Abbildung 4.13: Gel der SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung zum Langzeitversuch mit BSA und Lysozym. Dargestellt sind Zyklus 1 und Zyklus 6 im Vergleich. W: Waschschrift, P: Elution von BSA, MA: Membranadsorber. Auftrag von 5 μL der 0 Probe und Elution, 10 μL der Waschschrift und 3 μL Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) [114].

Die Ergebnisse der Proteinanalytik nach Bradford sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Beim ersten Zyklus unterscheiden sich die Konzentrationen der Peaks um ca. 30 %. Diese Abweichung tritt auf, da die Beladungszeiten der Membranadsorber, aufgrund der unterschiedlichen UV-Werte der Durchbruchskurven von Lysozym, unterschiedlich lang sind. Das UV-Signal des dritten Membranadsorbers ist nach oben verschoben. Somit wird sc2 schneller erreicht, und weniger BSA kann binden. Auch in Zyklus 6 treten Abweichungen von 15 % auf, die zum einen von den Abweichungen der einzelnen Spektrometer (Unterschied von 4 %) und zum anderen von der Messungenauigkeit der Proteinanalytik hervorgerufen werden. Der Standardfehler der Analytik setzt sich aus der Standardabweichung der Steigung und des y-Achsenabschnitts der Kalibrationsgeraden zusammen und beträgt 20 %. Obwohl Schwankungen der Proteinkonzentration während der Elution auftreten, geht kein Produkt verloren.

Tabelle 4.5: Gesamtproteinbestimmung nach Bradford der gesammelten fraktionierten Proben vom Waschen und der Elution. Vergleichend dargestellt Zyklus 1 und Zyklus 6

	Probe	Gesamtproteinkonzentration [g/L]
	0	2,87
Zyklus 1	W MA1	2,15
	P MA1	17,55
	W MA2	1,58
	P MA2	14,73
	W MA3	1,49
	P MA3	12,61
Zyklus 6	W MA1	1,38
	P MA1	17,41
	W MA2	1,71
	P MA2	14,86
	W MA3	1,14
	P MA3	17,04

Diese Aufreinigungsmethode liefert eine Wiederfindung von 85 % mit einem Aufkonzentrierungsfaktor der vereinten Proben von 12,6 - 17,6. Die Ausbeute beträgt 1,44 g und kann durch die Ergänzung des Interconnected Wash auf 1,5 g maximiert werden. Aufgrund der Switching Condition 1 bei 10 % kommt es zu einem Produktverlust von 0,2 g, der durch Verändern der Switching Condition ebenfalls minimiert werden kann.

Die Abbildung 4.14 zeigt die Überlagerung der Durchbruchkurven der Zyklen 1 und 6. Der Fokus liegt dabei auf dem Produktdurchbruch von BSA, da anhand dieser Kurve Aussagen über die Kapazität der einzelnen Membranadsorber getroffen werden können. Nach Herstellerangaben kann der verwendete Membranadsorber Sartobind® Q 75 bis zu 100 Mal beladen werden und sollte dann mit 1 M NaOH regeneriert werden. Insgesamt können bis zu 1.000 Aufreinigungszyklen durchgeführt werden. Dabei ist davon auszugehen, dass sich diese Angabe auf den Batch-Betrieb bezieht. Durch das PCC-Prinzip wird in den Versuchen mindestens die 7-fache Menge an Produkt aufgetragen, wodurch die Leistung schneller abnimmt.

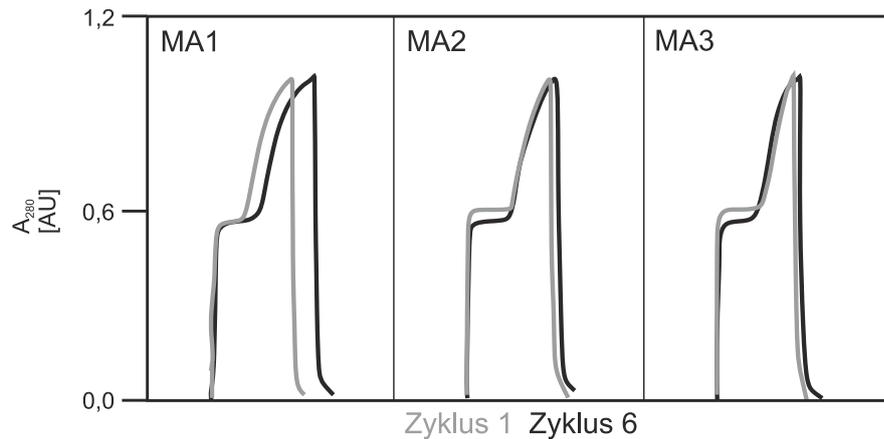


Abbildung 4.14: Überlagerung der Durchbruchkurven der einzelnen Membranadsorber von Zyklus 1 und Zyklus 6 [114].

In Zyklus 6 wird mehr Zeit benötigt, um die nächste Switching Condition (sc2) zu erreichen. Das ist ein Anzeichen dafür, dass die Leistung der Membranadsorber abgenommen hat. Die Regeneration mit 1 M NaCl ist demnach nicht ausreichend, um stark gebundene Moleküle zu entfernen. Um die Anzahl der Zyklen zu verlängern, sollten ein Cleaning in Place (CIP) Vorgang mit 1 M NaOH zwischen jeweils drei Zyklen bei der Aufreinigung von BSA eingebaut werden.

4.2.3 Fazit

In diesem Abschnitt wurde die PCC-Anlage anhand einer einfachen Trennaufgabe von BSA und Lysozym getestet. Die Methodenentwicklung wurde an dem FPLC-System Äkta pure 25 L durchgeführt. Dabei bindet BSA bei pH 7 an den AEX-Membranadsorber Sartobind[®] Q 75, während Lysozym als Verunreinigung durchbricht. Mittels eines Salzgradienten bis 1 M NaCl eluiert das Zielprotein und resultiert in einer Wiederfindung von 99 %.

Anhand der Durchbruchkurve von BSA konnte eine dynamische Bindungskapazität von 54,2 mg und eine statische Bindungskapazität von 73,5 mg ermittelt werden.

Nachdem die Methode etabliert wurde, konnte diese erfolgreich auf die PCC übertragen werden. Dazu musste die Konzentration der eingesetzten Proteine angepasst werden, da die UV-Durchflussküvetten der FPLC und der PCC unterschiedliche Schichtdicken besitzen. Damit wurde sichergestellt, dass die Switching Conditions während des Betriebs detektiert werden konnten. In dem Langzeitversuch konnten 1,7 L Feed-Lösung ($c_{\text{BSA}} = 1 \text{ g/L}$, $c_{\text{Lysozym}} = 0,25 \text{ g/L}$) innerhalb von 5,5 Stunden aufgereinigt werden. Die Methode liefert eine Wiederfindung von 85 %. Die Verluste an Zielprotein kommen aufgrund der festgelegten Switching Condition (sc1) sowie des Verlusts der Feed-Lösung während des Waschens zustande. Mit einem Interconnected Wash, dem Transfer der Waschfraktion auf einen freien Membranadsorber, könnte dieser Verlust minimiert werden. Des Weiteren können die Switching Conditions variabel an das jeweilige Trennproblem angepasst werden, sodass mit einem früheren Umschalten weniger Zielprodukt verloren ginge. Während des Langzeitlaufs konnte beobachtet werden, dass die Leistung mit der Zeit abnimmt. Mit einem CIP-Schritt (z.B mit 1 M NaOH) im Abstand von jeweils drei Zyklen könnten die Membranadsorber besser regeneriert werden.

Die in diesem Kapitel erlangten Erkenntnisse werden genutzt, um die Aufreinigung von *Candida antarctica* lipase B (CalB) aus *E.-coli*-Lysat mit der PCC-Anlage umzusetzen.

4.3 Aufreinigung von CalB mit der PCC-Einheit

Nachdem die Auftrennung eines binären Gemischs (BSA und Lysozym) erfolgreich mit der PCC-Anlage durchgeführt wurde, wird in diesem Abschnitt auf eine reale Trennaufgabe eingegangen. Hierfür wurde die industriell relevante *Candida antarctica* lipase B aus *E.-coli*-Lysat aufgereinigt. DNA und HCP stellen somit die Verunreinigungen dar, die mit der CalB um Bindungsstellen konkurrieren können. In der Literatur sind verschiedene Aufreinigungsmethoden beschrieben (vgl. Tabelle 2.3), die aber Nachteile hinsichtlich der Kapazität oder der Wiederfindung haben. Die Kationenaustauschchromatographie erweist sich aufgrund des breiten pI-Bereichs der CalB (vgl. Abbildung 2.9) als schwierig, da die CalB nur bei niedrigem pH-Wert ($\text{pH} < 5$) binden kann. Deshalb soll in dieser Arbeit eine zuverlässige Aufreinigung mit einer Anionenaustauschermembran Sartobind® Q 75 entwickelt werden. Für die Methodenentwicklung wurden zunächst kommerzielle CalB und anschließend Lysat mit hinzugefügter CalB verwendet. Zuletzt wurde die entwickelte Methode für die Aufreinigung von CalB aus Lysat auf die PCC-Anlage übertragen und im Langzeitbetrieb durchgeführt.

4.3.1 Methodenentwicklung

Um die Bindung an die AEX-Membran zu gewährleisten, muss CalB eine negative Nettoladung tragen. Des Weiteren muss die Aktivität der CalB bei der Wahl des Puffersystems berücksichtigt werden. CalB weist bis pH 10 eine hohe Aktivität auf, sodass folgende Bedingungen für die Versuche verwendet wurden:

- AEX-Membranadsorber Sartobind® Q MA75
- Flussrate: 5 mL/min
- Bindungspuffer: 20 mM Tris-HCl mit pH 8,5
- Elutionspuffer: 20 mM Tris-HCl mit pH 8,5 und 1 M NaCl

4.3.1.1 Bindungsexperimente

Im Lysat enthaltene DNA, die negativ geladen ist, bindet auch den Membranadsorber, kann aber mit 1 M Salz vom Membranadsorber eluiert werden, was bei der Übertragung auf die PCC berücksichtigt werden muss. Mit dem FPLC-System Äkta pure 25 L von GE Healthcare (Schweden) wurde eine geeignete Aufreinigungsmethode entwickelt. In Abbildung 4.15 sind das Chromatogramm der Bindungsexperimente mit kommerzieller CalB von c-Lecta GmbH (Deutschland) sowie das dazugehörige Gel der SDS-PAGE gezeigt. Die aufgegebene Menge CalB (0,75 mg) wurde so gewählt, dass die gesamte Proteinmenge an den Membranadsorber bindet. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten (bis 1 M NaCl), die in einem hohen Peak (Fraktionen 1B5 und 1B6) mit breitem Tailing (Fraktionen 1B7 bis 1C4) resultierte. CalB eluierte bei ca. 0,2 M Ionenstärke des Elutionspuffers. In dem silbergefärbten Gel weisen die Fraktionen 1B5 bis 1B8 eine Bande der Größe von CalB auf. Die Fraktionen ab 1B10 enthalten kein Zielprotein mehr und sind Verunreinigungen, die aufgrund des technischen Reinheitsgrades von CalB zu erklären sind. Die resultierende Wiederfindung der Methode liegt bei 63 %.

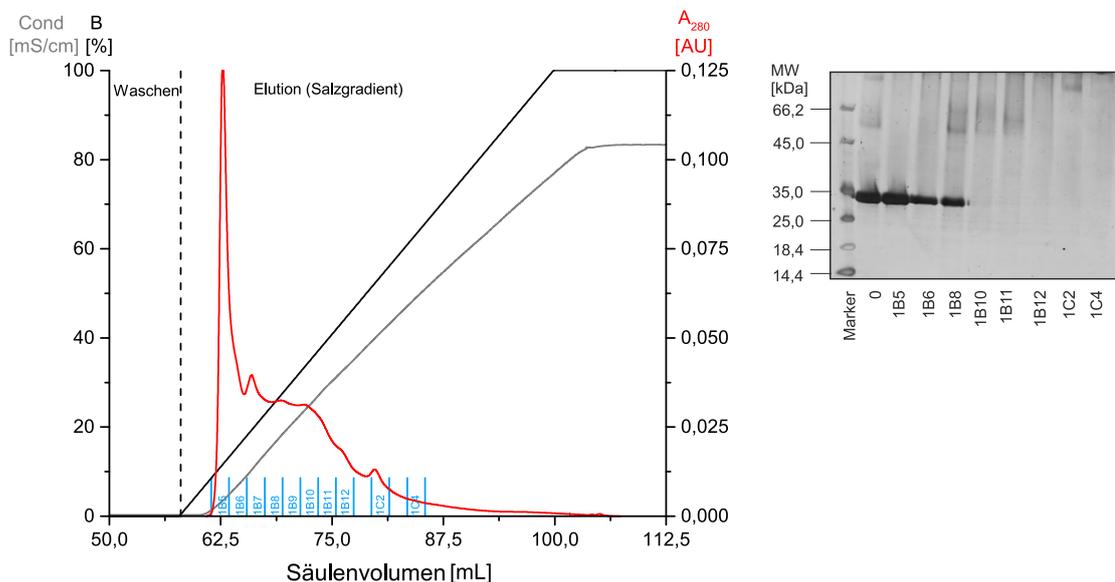


Abbildung 4.15: Links ist das Chromatogramm des Bindungsversuchs dargestellt. Die Proben- aufgabe betrug 5 mL mit 0,15 g/L CalB in 20 mM Tris-HCl mit pH 8,5 an Sartobind® Q. Rechts ist das Gel der SDS-PAGE mit Silberfärbung gezeigt. Die Proben- aufgabe betrug: 10 µL Probe und 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) [114].

Da sichergestellt wurde, dass CalB unter den oben verwendeten Bedingungen an den Membranadsorber bindet, wurde im nächsten Experiment versucht, die Elution von CalB in einem scharfen Peak zu gewährleisten. Dafür wurde eine Stufenelution bei 0,2 M, 0,5 M und 1 M NaCl (20 %, 50 % und 100 % des Elutionspuffers) durchgeführt. In Abbildung 4.16 sind das Chromatogramm der angepassten Methode mit Stufenelution sowie das dazugehörige Gel gezeigt. Zur weiteren Beurteilung wurden auch eine Gesamtproteinanalytik sowie ein Aktivitätsassay durchgeführt.

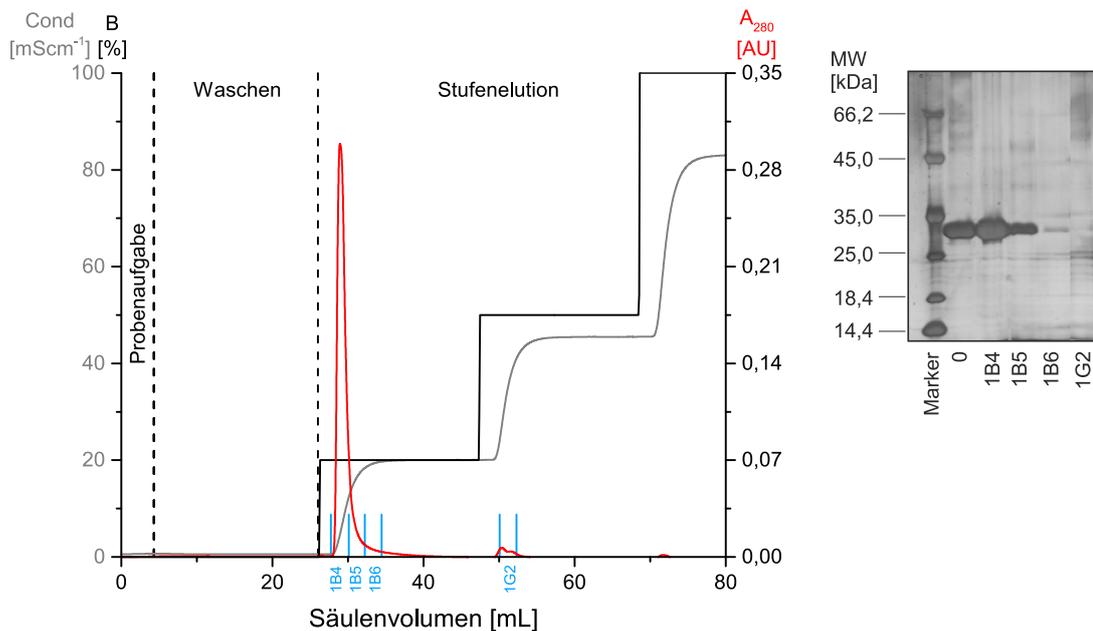


Abbildung 4.16: Links ist das Chromatogramm der Stufenelution (20, 50, 100 % Elutionspuffer) abgebildet. Die Probenaufnahme betrug 5 mL mit 0,3 g/L CalB in 20 mM Tris-HCl mit pH 8,5 an Sartobind[®] Q. Rechts ist das Gel der SDS-PAGE mit Silberfärbung dargestellt. Die Probenaufnahme betrug: 10 μL Probe und 5 μL Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) [114].

Die Elutionsstufe bei 0,2 M Ionenstärke führt zu einem scharfen Peak mit hoher Aktivität. Die letzte Fraktion des Elutionspeaks (1B6) weist eine geringere Menge an CalB auf. Bei der zweiten Elutionsstufe bei 0,5 M NaCl (50 % des Elutionspuffers) eluieren lediglich Verunreinigungen, die keine Aktivität aufweisen. Bei der letzten Elutionsstufe mit 1 M Ionenstärke (100 % des Elutionspuffers) werden kaum Proteine detektiert; dennoch ist die Elution bei 1 M NaCl für spätere Experimente mit Lysat wichtig, um DNA und stark bindende Wirtsproteine zu eluieren.

Die Methode liefert eine Wiederfindung von 99,99 %, und die in der kommerziellen CalB enthaltenden Verunreinigungen konnten erfolgreich separiert werden. Die Aktivität im Peak liegt um 20 % höher als in der Nullprobe.

Anschließend wurde diese Methode für die Aufreinigung von CalB aus *E.-coli*-Lysat getestet. Dafür wurden 150 g/L Biofeuchtmasse (BFM) einer *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS Kultur mit Ultraschall (vgl. Anhang B.4.4) aufgeschlossen und anschließend die Zelltrümmer abzentrifugiert und das Lysat filtriert. Dann wurden 0,3 g/L CalB hinzugefügt. In Abbildung 4.17 sind das Chromatogramm und das dazugehörige Gel der SDS-PAGE dargestellt.

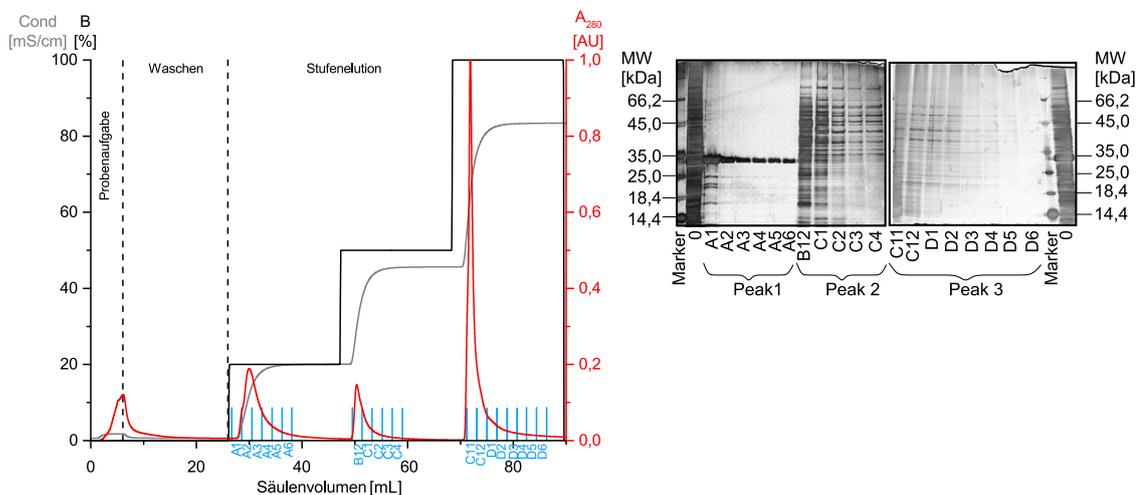


Abbildung 4.17: Links ist das Chromatogramm der Stufenelution (20, 50, 100 % Elutionspuffer) gezeigt. Die Probenaufgabe betrug 5 mL von 0,3 g/L CalB in Lysat an Sartobind® Q. Rechts ist das Gel der SDS-PAGE mit Silberfärbung dargestellt. Die Probenaufgabe betrug: 10 µL Probe und 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) [114].

Bei der ersten Elutionsstufe bei 0,2 M Ionenstärke eluiert CalB in einem scharfen Peak mit Tailing. Im silbergefärbten Gel ist zu sehen, dass CalB hochrein im Vergleich zur Nullprobe vorliegt. Lediglich in der ersten Fraktion A1 sind andere Banden sichtbar. In allen Fraktionen des ersten Peaks lässt sich eine Lipase-Aktivität bestimmen. Das Aktivitätsmaximum liegt bei 98 % der Nullprobe. Anhand der Gesamtproteinanalytik konnte eine Wiederfindung von 99,33 % ermittelt werden. In den Fraktionen des zweiten und dritten Peaks kann keine Aktivität bestimmt werden, und auch im Gel sind lediglich Verunreinigungen sichtbar.

Um diese Methode auf die PCC zu übertragen, wurde sie vereinfacht, indem nur eine zweistufige Elution bei 0,2 M und 1 M NaCl (20 % und 100 % des Elutionspuffers) durchgeführt wurde. Bei 1 M NaCl kann davon ausgegangen werden, dass alle Verunreinigungen und DNA eluieren und keine CalB verloren geht.

4.3.1.2 Kapazitätsbestimmung

Um die maximale Bindungskapazität des Membranadsorbers für CalB zu bestimmen, wurde eine Durchbruchskurve aufgenommen, die in Abbildung 4.18 gezeigt ist. Die Beladung mit CalB-Lösung ($c = 0,11 \text{ g/L}$) wurde bis zum Erreichen von UV_{\max} durchgeführt. Die dynamische Bindungskapazität DB_{10} beträgt 4,2 mg und die statische Bindungskapazität 6,3 mg. Im Vergleich zu BSA kann nur eine wesentlich geringere Menge CalB (Faktor 10 kleiner) an den Membranadsorber binden, was aufgrund von Abschirmungseffekten (shielding) der Liganden durch CalB auftreten kann.

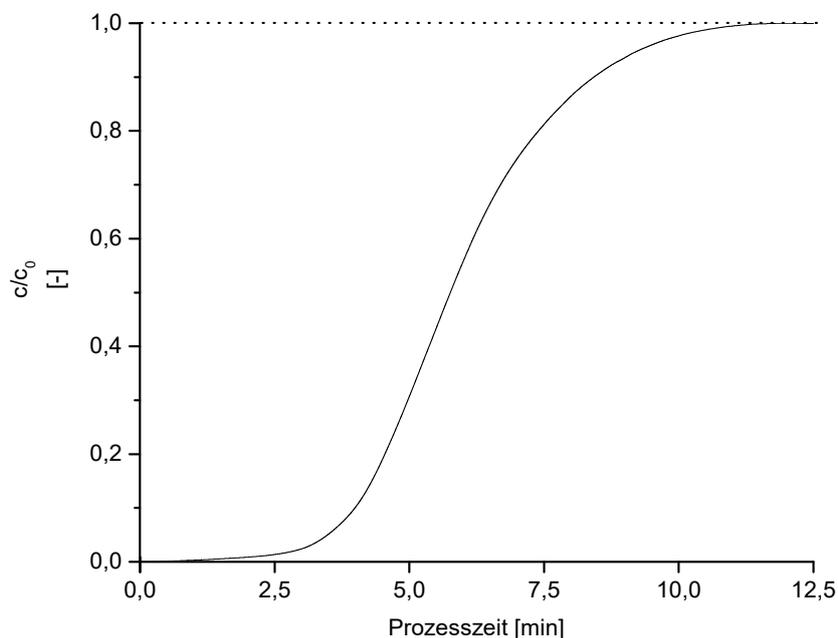


Abbildung 4.18: Normierte Durchbruchskurve von 0,11 g/L CalB an Sartobind® Q bei einer Flussrate von 5 mL/min [114].

4.3.1.3 Bestimmung der Doppeldurchbruchskurve

In Abbildung 4.19 ist die Doppeldurchbruchskurve zur Bestimmung der Switching Conditions gezeigt. Die Feed-Lösung wurde für die Verwendung an der PCC-Anlage angepasst und bestand aus Lysat mit 0,15 g/L BFM und 0,3 g/L CalB in 10 mM Tris-HCL mit pH 8,5. Wie im vorherigen Versuch wurden sc1 bei 10 % und sc2 bei 70 % festgelegt.

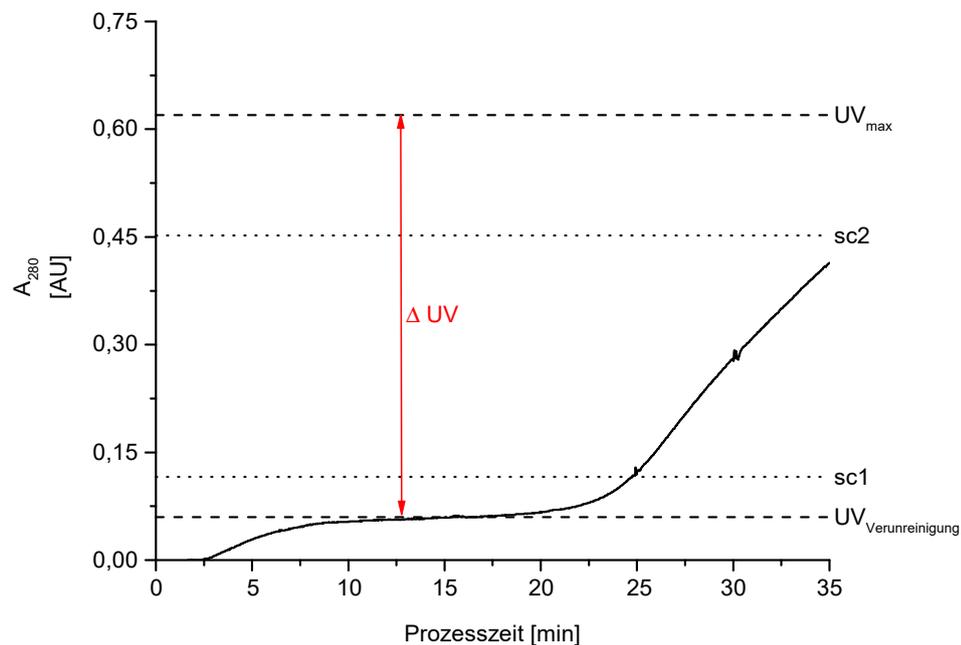


Abbildung 4.19: Chromatogramm der Doppeldurchbruchskurve von Lysat mit 0,150 g/L BFM und 0,3 g/L CalB in 20 mM Tris-HCl mit pH 8,5 an Sartobind® Q zur Bestimmung der Switching Conditions [114].

Anhand der aufgenommenen Doppeldurchbruchskurve wird für $UV_{\text{Verunreinigung}}$ ein Wert von 0,07 AU ermittelt. Die Differenz ΔUV zwischen UV_{max} und $UV_{\text{Verunreinigung}}$ beträgt 0,55 AU. Mithilfe von ΔUV werden die Switching Conditions (sc1 und sc2) berechnet:

$$sc1 = 0,1 \cdot \Delta UV + UV_{\text{Verunreinigung}} = 0,1 \cdot 0,550 \text{ AU} + 0,070 \text{ AU} = 0,125 \text{ AU} \quad (4.5)$$

$$sc2 = 0,7 \cdot \Delta UV + UV_{\text{Verunreinigung}} = 0,7 \cdot 0,550 \text{ AU} + 0,070 \text{ AU} = 0,455 \text{ AU} \quad (4.6)$$

4.3.2 Transfer auf die PCC-Anlage

Nachdem die Switching Conditions bestimmt wurden, muss der automatisierte Ablaufplan mit der Software pythonTM programmiert werden, wie schon zuvor für die Aufreinigung von BSA. In dem Programm werden die Switching Conditions hinterlegt sowie die einzelnen Phasen für Beladung, Waschen, Elution und Regeneration definiert. In Tabelle 4.6 sind die benötigten Phasen für die Aufreinigung von CalB zusammengefasst. Dabei sind das Beladen eines Membranadsorbers und das Waschen, die zweistufige Elution (20 % und 100 % des Elutionspuffers) und die Regeneration des nächsten Membranadsorbers zeitlich aufeinander abgestimmt. Um den Ablauf zu synchronisieren, wurden die Pumpraten der einzelnen Phasen angepasst. Da die Kapazität des Membranadsorbers, CalB zu binden, niedrig ist, wurde die Pumprate der Feed-Lösung auf 2,5 mL/min herabgesetzt, damit die Beladungszeit länger als die Regenerationszeit ist. Während des Waschens, der Elution und der Regeneration wird mit 8,5 mL/min gepumpt. Des Weiteren werden auch Pausenzeiten eingefügt, die auf die Trennaufgabe zugeschnitten sind (vgl. Anhang C.3). Ein Zyklus ist definiert als Beladung, Elution und Regeneration aller drei Membranadsorber und dauert 70 min.

Tabelle 4.6: Ablauf der Phasen für die automatisierte Aufreinigung von CalB aus Lysat mit der PCC-Anlage

Beladung	Waschen, Elution, Regeneration	Dauer
MA1 bis sc1	Waschen MA3 Elution MA3 bei 0,2 M NaCl	70 min
MA1 bis sc2	Elution MA3 bei 1 M NaCl Regeneration MA3	
MA2 bis sc1	Waschen MA1 Elution MA1 bei 0,2 M NaCl	
MA2 bis sc2	Elution MA1 bei 1 M NaCl Regeneration MA1	
MA3 bis sc1	Waschen MA2 Elution MA2 bei 0,2 M NaCl	
MA3 bis sc2	Elution MA2 bei 1 M NaCl Regeneration MA2	

Dieser Ablauf wurde zunächst auf Fehler getestet, um dann im Langzeitbetrieb automatisiert die Aufreinigung von CalB aus Kulturüberstand durchzuführen. Für das Langzeitexperiment wurden 0,9 L der Feed-Lösung (0,15 g/L BFM und 0,3 g/L) eingesetzt. Zusätzlich wurden 3 L Bindungs- und Elutionspuffer benötigt. In 6 Stunden wurden über fünf Zyklen 0,22 g CalB aufgereinigt.

In Abbildung 4.20 sind die fünf Zyklen des Langzeitversuchs sowie der erste Zyklus als Vergrößerung dargestellt. Der charakteristische Doppeldurchbruch ist bei diesem Experiment schwerer erkennbar, obwohl die Konzentrationen des Lysats und der CalB angepasst wurden. Das Verunreinigungsplateau fällt gering aus, da die in dem Lysat enthaltenen HCP an den Membranadsorber binden. In der Produktdurchbruchskurve sind somit neben dem Produkt noch Verunreinigung vorhanden, die an den Membranadsorber binden. Die Aufreinigung von CalB mit einem AEX-Membranadsorber kann über fünf Zyklen betrieben werden.

Die zweistufige Elution liefert bei der ersten Elutionsstufe (0,2 M NaCl) den Produktpeak und bei der zweiten Elutionsstufe (1 M NaCl) den Verunreinigungspeak. Ab dem dritten Zyklus eluieren allerdings die Peaks so dicht hintereinander, dass sie nicht mehr unterschieden werden können. Bis zum vierten Zyklus ist der Doppeldurchbruch bei allen Membranadsorbern sichtbar; allerdings sind die Kurven stark verbreitert. Das heißt, dass die Beladungszeit der Membranadsorber bis zum Erreichen von sc_2 steigt, was wiederum dazu führt, dass die verbleibende Zeit für die Elution verkürzt werden muss. Daraus resultiert die Überlagerung der beiden Elutionspeaks.

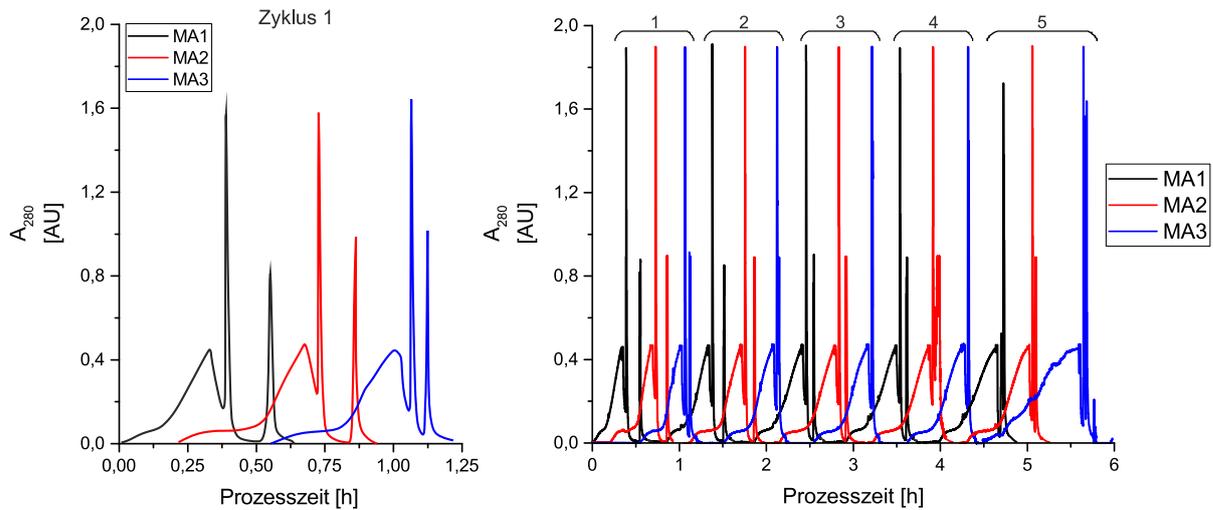


Abbildung 4.20: Links ist das Chromatogramm des ersten Zyklus vergrößert dargestellt. Rechts ist das Chromatogramm des PCC-Langzeitversuch mit 5 Zyklen zur Aufreinigung von CalB aus *E.-coli*-Lysat gezeigt. Aufreinigung von 0,9 L Feed-Lösung aus 0,15 g/L BFM und 0,3 g/L hinzugefügter CalB in 6 h. Feed-Volumenstrom: 2,5 mL/min und Puffer A und B: 8,6 mL/min [114].

Exemplarisch wurden die Zyklen 1 und 5 mittels Bradford und SDS-PAGE analysiert. Hierfür wurden die Proben der einzelnen Phasen vereint. In Abbildung 4.21 ist das silbergefärbte Gel dargestellt mit den Fraktionen des Waschens (W) und der Elution (E20 und E100). Aufgrund technischer Probleme fehlen die Waschfraktion und die erste Elutionsstufe des ersten Membranadsorbers im ersten Zyklus. Die Elutionsfraktionen bei 0,2 M Ionenstärke weisen intensive Banden auf Höhe des CalB-Standards auf. Bei der zweiten Elutionsstufe eluieren, wie erwartet, lediglich Verunreinigungen. In Zyklus 5 nehmen die Verunreinigungen, die zusammen mit dem Produkt bei 0,2 M NaCl eluieren, zu. Zusammen mit den verbreiterten Durchbrüchen kann das auf eine Abnahme der Leistung der Membranadsorber hindeuten. Stärker bindende Proteine und DNA konnten durch die Elution mit 1 M NaCl nicht von der Membran eluiert werden, wodurch die Leistung über die Zyklen abnimmt. Ein zusätzlicher Cleaning in Place (CIP) Schritt nach jedem Zyklus könnte die Membranen wieder regenerieren. Während des Waschschritts geht Zielprotein verloren. Diese Problematik wurde bereits während der Aufreinigung von BSA thematisiert. Durch eine technische Änderung der PCC-Anlage könnte dieser Verlust durch die Einführung eines Interconnected Wash minimiert werden. Dabei wird Zielprotein während des Waschens auf einen freien Membranadsorber geleitet.

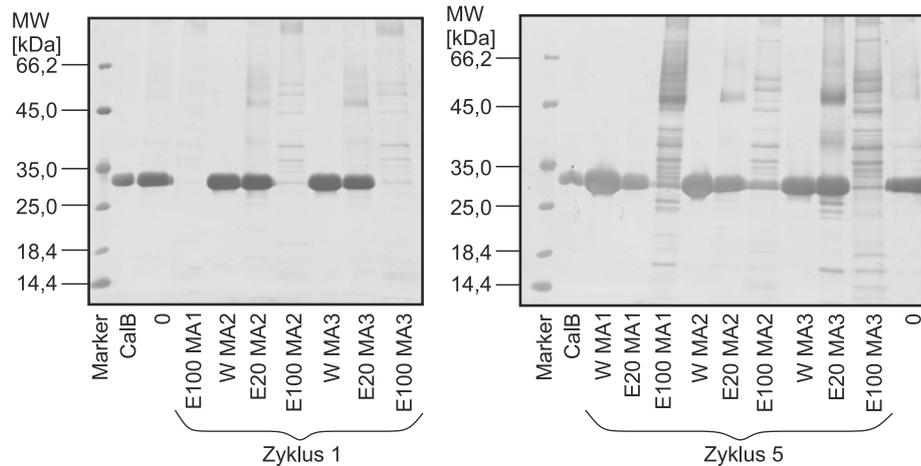


Abbildung 4.21: Gel der SDS-PAGE mit Silberfärbung des Langzeitversuchs mit CalB. Dargestellt Zyklus 1 und Zyklus 5 im Vergleich. W: Waschschrift, E20: Elution von CalB bei 0,2 M NaCl (20 % Elutionspuffer), E100: Elution der Verunreinigungen bei 1 M NaCl (100 % Elutionspuffer), MA: Membranadsorber. Probenaufgabe von 10 μ L Probe und 5 μ L Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) [114].

In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse der Gesamtproteinanalytik und des Aktivitätsassays zusammengefasst. Die Proben des Produktpeaks weisen Konzentrationen zwischen 0,24 g/L und 0,3 g/L Protein auf und zeigen eine vergleichbare Aktivität zur Nullprobe.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Gesamtproteinanalytik nach Bradford und des Aktivitätsassays der ersten Elutionsstufe bei 0,2 M NaCl. Vergleichend dargestellt sind Zyklus 1 und Zyklus 5

	Probe	Gesamtproteinkonzentration [g/L]	Aktivität [U]
	0	0,37	15,9
	MA1	n.b.	n.b.
Zyklus 1	MA2	0,27	19,7
	MA3	0,30	18,5
	MA1	0,24	14,5
Zyklus 5	MA2	0,31	17,7
	MA3	n.b.	n.b.

* n.b.: nicht bestimmt, aufgrund technischer Probleme bei der Fraktionierung

Generell wird durch die Ergebnisse sichtbar, dass CalB in hoher Reinheit eluiert wird. Die Gesamtausbeute beträgt 0,22 g, was einer Wiederfindung von 80 % entspricht. Durch die Realisierung des Interconnected Wash könnten weitere 10 % CalB gewonnen werden. Weiteren Produktverlust könnte man durch das Herabsetzen der Switching Condition 1 minimieren.

In Abbildung 4.22 sind die Durchbruchskurven der Zyklen 1 und 5 überlagert. Die Durchbrüche der Verunreinigungen decken sich in beiden Zyklen. Beim Betrachten der Produktdurchbrüche ist zu erkennen, dass die Leistung stark sinkt, da das UV-Signal langsamer ansteigt, und somit die Switching Condition 2 zu einem späteren Zeitpunkt erreicht wird. Das hat, wie bereits beschrieben, Auswirkungen auf die kontinuierliche Aufreinigung, da die Zeit für das Waschen, die Elution und die Regeneration verkürzt wird. Des Weiteren führt das spätere Erreichen der sc2 zu einem Produktdurchbruch auf dem nachfolgenden Membranadsorber, was zu einem Abbruch des Langzeitversuchs führt, da das Prinzip der PCC nicht mehr gewährleistet werden kann.

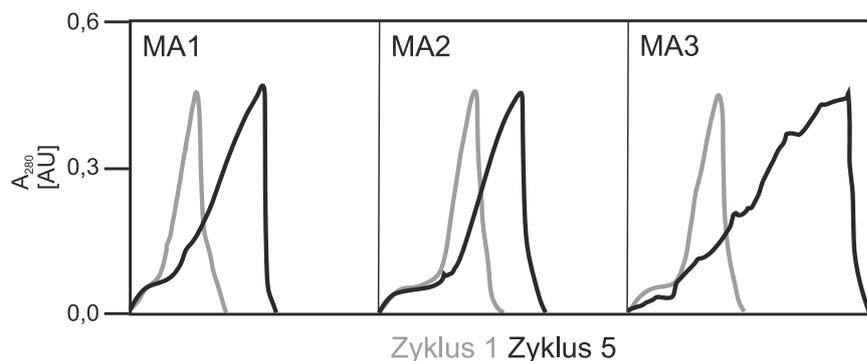


Abbildung 4.22: Überlagerung der Durchbruchskurven der einzelnen Membranadsorber von Zyklus 1 und Zyklus 5 [114].

4.3.3 Fazit

In diesem Abschnitt wurde die PCC-Anlage für die Aufreinigung eines realen Aufreinigungsproblems genutzt. Die Methodenentwicklung wurde zunächst für kommerzielle CalB an dem FPLC-System Äkta pure 25 L durchgeführt. Anschließend wurde die Methode mit Lysat wiederholt, welches mit CalB versetzt war. Die Fermentation

des *E.-coli*-Stamms lieferte eine zu geringe Ausbeute; deshalb wurde das Lysat mit kommerzieller CalB angereichert. CalB bindet bei 20 mM Tris-HCl mit pH 8,5 an den AEX-Membranadsorber Sartobind® Q 75. Mit einer zweistufigen Salzelution eluiert das Zielprotein bei 0,2 M NaCl und die Verunreinigungen bei 1 M NaCl. Diese Methode liefert einen scharfen Produktpeak mit einer Wiederfindung von 99 %. Die Aktivität der Elutionsfraktion ist um 20 % höher als die der Nullprobe.

Anhand der Durchbruchskurve, die mit reiner CalB durchgeführt wurde, konnten eine dynamische Bindungskapazität von 4,2 mg und eine statische Bindungskapazität von 6,3 mg ermittelt werden.

Diese vielversprechende Methode wurde nach Bestimmung der Switching Conditions auf die PCC-Anlage übertragen. In dem Langzeitversuch konnten mit der PCC 0,9 L Feed-Lösung (0,15 g/L BFM und 0,3 g/L CalB) innerhalb von 6 h aufgereinigt werden. Die Methode liefert eine Wiederfindung von 80 %. Die Verluste an Zielprotein kommen aufgrund der festgelegten Switching Condition (sc1) sowie des Verlusts der Feed-Lösung während des Waschens zustande. Über den Verlauf der Zyklen nahm die Leistung stark ab. Problematisch sind dabei stark bindende Komponenten des Lysats, wie HCP und DNA. Durch einen CIP-Schritt nach jedem Zyklus z. B. mit 1 M NaOH könnten diese Bestandteile von den Membranadsorbern gelöst werden. Die Methode zur Aufreinigung von CalB mit der PCC erweist sich als praktikabel; allerdings wären Chromatographiemethoden, die selektiv CalB binden, vorteilhaft.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue Applikationen der Enzymaufreinigung untersucht. Zum einen wurden modifizierte Tiefenfilter und zum anderen eine kompakte kontinuierliche Chromatographie Anlage für die Aufreinigung des Modellproteins *Candida antarctica* lipase B (CalB) verwendet.

Untersuchung von modifizierten Tiefenfiltern zur Enzymaufreinigung

Im ersten Teilprojekt wurden zellulosebasierte Tiefenfilter, die in der pharmazeutischen, biotechnologischen Industrie sowie in der Lebensmittelindustrie zum Einsatz kommen, mit verschiedenen Polyelektrolyten (PEI, PAH, PSS, Glutaraldehyd) vom Projektpartner Surflay GmbH beschichtet. Diese Filter wurden charakterisiert hinsichtlich ihrer adsorptiven Eigenschaften bei der Enzymaufreinigung. Durch die Bindung an die Tiefenfilter können Enzyme stabilisiert und für den wiederholten Gebrauch zugänglich gemacht werden. Des Weiteren wurde die Aktivität des gebundenen Enzyms CalB mit einem *p*-NPA Assay analysiert, um die beste Beschichtung zu ermitteln. Die besten Ergebnisse hinsichtlich der Bindungskapazität und der Enzymaktivität liefern Tiefenfilter mit einer anionischen PAH/PSS-Beschichtung. Die besten Bindungsbedingungen konnten bei einer geringen Ionenstärke und niedrigem pH-Wert erzielt werden: Mit einem 20 mM Acetatpuffer mit pH 4. Die Lagerung der beladenen PAH/PSS Filter bei 4 °C in Puffer führte zu der geringsten Abnahme der Enzymaktivität und resultiert in einer Halbwertszeit von 108 Tagen. Im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Methoden konnte so eine 10,8-fach längere Halbwertszeit erreicht werden. Nach mehrfachen Umsetzungsreaktionen verliert die gebundene CalB an spezifischer Aktivität. Nach 4-fachem Gebrauch ist die Aktivität um 50 % gesunken. Des Weiteren wurde die Alterung beschichteter Tiefenfilter anhand der Glutaraldehyd-aktivierten Träger untersucht. Da-

bei wurden neue Filter mit einem Jahr alte Filter verglichen. Diese Beschichtung weist eine begrenzte Haltbarkeit auf, wodurch es zu bis zu 10 % Bindungskapazitäts- und bis zu 9 % Aktivitätsverlusten kommt. Darüber hinaus wurde die Verwendung der Tiefenfilter für die Aufreinigung aus Kulturbrühe (Direct Capture) ohne anschließende Elution der Lipase getestet. Dabei können Verfahrensschritte eingespart werden, da direkt nach der Bindung der Enzyme eine Umsetzungsreaktion durchgeführt werden kann. Das Direct Capture konnte erfolgreich mit zellfreiem Überstand durchgeführt werden, bis zu durchschnittlichen Biomassekonzentrationen von $OD_{600} = 7$.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von modifizierten Tiefenfiltern eine technische Lösung darstellt, um Enzyme aufzureinigen, zu binden und so in biokatalytischen Prozessen einzusetzen. Der Einsatz der Tiefenfilter beim Direct Capture ist nur begrenzt möglich; durch Vergrößern der nominellen Abscheiderate könnte ein Verblocken der Filter hinausgezögert werden. Für Anwendungen mit anderen Enzymen müsste die optimale Oberflächenmodifikation der Tiefenfilter neu evaluiert werden.

Periodic Counter-Current Chromatographie

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurde eine Periodic Counter-Current Chromatographie-Anlage aufgebaut und in Betrieb genommen. Die modulare, kompakte Einheit wurde charakterisiert und anhand einer einfachen Trennaufgabe einer binären Mischung aus BSA und Lysozym getestet. Die Methodenentwicklung der Aufreinigungsstrategie wurde an einem FPLC-System (Äkta pure 25 L, GE Healthcare) durchgeführt. Das Produkt BSA bindet bei 20 mM Phosphat Puffer mit pH 7 an den AEX-Membranadsorber Sartobind[®] Q MA75. Das Produkt (BSA) eluiert unter steigendem Salzgradienten (1 M NaCl). Die entwickelte Methode liefert eine dynamische Bindungskapazität (DB10) von 54,2 mg und liegt damit nur knapp 10 % unter den Herstellerangaben (60 mg). Die Wiederfindung des Produkts liegt bei über 99 %. Die Methode konnte erfolgreich für den Langzeitbetrieb mit der PCC angepasst werden, sodass die Testung der Anlage mit der einfachen Aufreinigungsaufgabe abgeschlossen werden konnte. In Tabelle 5.1 ist die kontinuierliche Aufreinigung der Aufreinigung im Batch-Modus gegenübergestellt.

Tabelle 5.1: Vergleich der Aufreinigung von BSA mit der PCC-Anlage oder im Batch-Betrieb

PCC	Batch
• mind. 85 % Wiederfindung	• 99 % Wiederfindung
• Aufreinigung von BSA: 0,262 g/h	• Aufreinigung von BSA: 0,139 g/h
• Pufferverbrauch: 0,455 L/h	• Pufferverbrauch: 0,278 L/h

Bei der Aufreinigung mit der PCC kann in der gleichen Zeit fast doppelt so viel BSA aufgereinigt werden. Wenn man allerdings noch die Versatzzeit berücksichtigt, also die Zeit, die benötigt wird, um einen neuen Batch-Lauf zu starten, ist die PCC im Vergleich noch effektiver. Auch der Pufferbedarf kann durch die gesteigerte Kapazitätsausschöpfung um ca. 40 % minimiert werden.

Die Einstellungen und Erkenntnisse aus dieser Trennaufgabe wurden im Anschluss dazu genutzt, um die Aufreinigung einer realen Trennaufgabe von CalB aus *E.-coli*-Lysat durchzuführen. Für die Methodenentwicklung an der Äkta pure 25 L wurde kommerzielle CalB verwendet. Durch den breiten pI-Bereich von CalB lieferten bisherige Aufreinigungsstrategien keine optimalen Ergebnisse. Bei der entwickelten Strategie bindet CalB bei 20 mM Tris-HCl Puffer mit pH 8,5 an den AEX-Membranadsorber Sartobind® Q MA75. Die zweistufige Elution bei 0,2 M NaCl (20 % des Elutionspuffers) und bei 1 M NaCl (100 % des Elutionspuffers), liefert eine Wiederfindung von 99 % in der ersten Elutionsstufe. Die Verunreinigungen eluieren bei 1 M NaCl. Die Aufnahme der Durchbruchskurve ergab eine dynamische Bindungskapazität von 4,2 mg und eine statischen Bindungskapazität von 6,3 mg. Die maximal gebundene Menge CalB liegt weit unter der gebundenen Menge an BSA, was aufgrund von Abschirmungseffekten (shielding) der Liganden durch CalB auftreten kann.

Im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Aufreinigungsstrategien von CalB (Tabelle 5.2), weist die entwickelte Methode bessere Eigenschaften in Wiederfindung, Aktivität und Aufreinigungsfaktor auf. Die Reinheit konnte aufgrund der Silberfärbung nicht bestimmt werden, jedoch wurde sie visuell als hoch bewertet.

Tabelle 5.2: Vergleich von publizierten One-Step Aufreinigungsstrategien von CalB mit der entwickelten Methode

Methode	Wiederfindung	Aktivität	Reinheit	Aufreinigungsfaktor
AEX [99]	47 %	18,8 IU	-	1,38
B-AC [100]	73 %	-	91 %	-
CEX [93]	-	-	-	1,5
HIC [101]	23 %	90 U	-	1,29
AEX	97 %	91 U	hoch	bis zu 4,0

Da die Kultivierung des *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS Stamms mit dem pET-26b(+) Vektor und dem Insert für CalB nicht ausreichend lösliches Zielprodukt lieferte, wurde das Lysat mit kommerzieller CalB versetzt. Die Aufreinigung lieferte hochreine Produktpeaks mit einer hohen Aktivität. Die Methodenentwicklung konnte erfolgreich auf die Aufreinigung von CalB aus Lysat adaptiert werden, sodass im nächsten Schritt der Langzeitbetrieb mit der PCC durchgeführt werden konnte. In Tabelle 5.1 ist die kontinuierliche Aufreinigung von CalB der Aufreinigung im Batch-Modus gegenübergestellt. Auch bei der Aufreinigung von CalB aus *E. coli* kann man durch die Verwendung der PCC-Anlage sowohl ca. 30 % der Zeit, als auch 30 % des Pufferbedarfs einsparen.

Tabelle 5.3: Vergleich der Aufreinigung von CalB mit der PCC-Anlage oder im Batch-Betrieb

PCC	Batch
• mind. 80 % Wiederfindung	• 99 % Wiederfindung
• Aufreinigung von CalB: 0,037 g/h	• Aufreinigung von CalB: 0,025 g/h
• Pufferverbrauch: 0,5 L/h	• Pufferverbrauch: 0,341 L/h

Sowohl bei der Aufreinigung von BSA als auch bei der von CalB kommt es zu Produktverlusten von 10 - 15 % während des Waschens der Säule. Mit der Einführung eines Interconnected Wash könnten diese Verluste minimiert werden. Für diese Änderung in der Methodik ist eine Ergänzung der PCC-Anlage nötig und durchaus empfehlenswert. Weiteren Produktverlust kann man durch die Änderung der Switching Condition 1 er-

reichen, indem früher der Durchbruch auf den folgenden Membranadsorber geleitet wird. Während der Langzeitversuche ist die Abnahme der Performance der Membranadsorber sichtbar. Da die Säulen weit über die dynamische Bindungskapazität beladen werden, müssen diese früher regeneriert werden. Deshalb sollte ein CIP-Schritt mit 1 M NaOH eingeführt werden; dadurch würden auch stark bindende Verunreinigungen und DNA von der Membran eluiert werden.

Da die Anlage für die Aufreinigung aus Kulturbrühe entwickelt wurde, eignen sich Aufreinigungsmethoden, die das Produkt spezifisch binden können. Dies kann durch die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie erreicht werden, wenn das Zielprotein einen Aufreinigungs-Tag (z. B. His-Tag) besitzt. Damit bietet sich auch die Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern mit einer Protein A Säule an. In der Literatur ist fast ausschließlich die Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern mit der PCC zu finden. Wenn IEX- oder HIC-Membranadsorber verwendet werden sollen, empfiehlt es sich, sekretierte Proteine aufzureinigen, da die Probleme, die durch das Binden von DNA und HCP entstehen, geringer sind.

Die in dieser Arbeit aufgebaute Anlage wurde so konzipiert, dass sie einfach erweiterbar ist. So ist es möglich weitere online Analytik, wie Leitfähigkeits- oder pH-Wertmessung, in das System zu integrieren. Eine Erweiterung um eine vierte Säule wäre ebenfalls möglich, um größere Flexibilität in Bezug auf die Schaltzeiten zu erreichen. Neben der Proteindetektion bei 280 nm sind die verwendeten Spektrometer in der Lage, Wellenlängenbereiche zu scannen, um spezifische Absorptionsmaxima einzelner Produkte zu erfassen. Die Anlage könnte auch umgerüstet werden, um fluoreszierende Proteine zu detektieren.

A Materialien

A.1 Chemikalien

Tabelle A.1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben

Chemikalien	Hersteller, Land
Agar	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ammominumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
α -Lactose Monohydrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck KGaA, Deutschland
D(+)-Glucose Monohydrat	Fluka (Sigma Aldrich), USA
Dimethylsulfoxid	AppliChem GmbH, Deutschland
Essigsäure	AppliChem GmbH, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Formaldehyd	AppliChem GmbH, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Harnstoff	Fluka (Sigma Aldrich), USA
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Deutschland
iso-Propanol	Merck KGaA, Deutschland
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka (Sigma Aldrich), USA
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Tabelle A.1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben

Chemikalien	Hersteller, Land
Kupfer(II)-chlorid	Fluka (Sigma Aldrich), USA
Kupfer(II)-Sulfat Pentahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Fluka (Sigma Aldrich), USA
Manganchlorid Tetrahydrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Methanol	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Natriummetabisulfit	Riedel-de Haen (Sigma Aldrich), USA
Natriummolybdat Dihydrat	Fluka (Sigma Aldrich), USA
Natriumphosphat Dihydrat	Riedel-de Haen (Sigma Aldrich), USA
Natriumselenit	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Nickel(II)-chlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ortho-Phosphorsäure (85 %)	Merck KGaA, Deutschland
<i>para</i> -Nitrophenolacetat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Quick Start™ Bradford Protein Assay	Bio-Rad, USA
Rotiphorese 40 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Salzsäure (37 %)	Fluka (Sigma Aldrich), USA
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
TRIS	Sigma-Aldrich Corporation, USA
TRIS/HCl	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Urea	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Zinkchlorid	Fluka (Sigma Aldrich), USA
Zinksulfat Heptahydrat	AppliChem GmbH, Deutschland

A.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle A.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Land
Einwegspritzen (1 mL - 50 mL)	Omnifix B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Falcons (15 mL und 50 mL)	Corning Inc., USA
Kanülen	B. Braun, Deutschland
Membranadsorber, Sartobind® Q75	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Mikrotiterplatte, 96 Well	Brand, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Ansell Healthcare LLC, USA
Pipettenspitzen (versch. Größen)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
PVDF Immun-Blot-Membran	Bio-Rad, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 mL - 2 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Sterilfilter (Luer-Lock)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Vicaspin 20 (10000 MWCO PES)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland

Tabelle A.3: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

Gerät	Hersteller, Land
Analysenwaage ED224S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Autoklav, Systec V-150	Systec, Deutschland
Cary 50 Scan UV-Visible	Varian, Schweiz
Durchflussküvette, 10 mm	Helma GmbH & Co. KG, Deutschland
FPLC-System, Äkta Pure 25 L	GE Healthcare, Schweden
Frenchpress ML-11	Microfluidics, USA
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific, USA
Heraeus Multifuge X1R Centrifuge	Thermo Scientific, USA
IKA KS 400 ic control	Thermo Scientific, USA
IP High Precision Pump	Ismatec, Schweiz
Kolbenhubpipetten	Eppendorf AG, Deutschland
Magnetrührer C-Mag HS7	IKA Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Multiskan Go	Thermo Scientific, USA
Multiskan Spectrum	Thermo Scientific, USA
Reinstwasseranlage Arium 611	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland

Tabelle A.3: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

Gerät	Hersteller, Land
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, USA
Sicherheitswerkbank, Hera Safe	Thermo Scientific, USA
Spektrophotometer, NanoDrop 1000	PeqLab-Biotechnologie, Deutschland
Ultraschallsonde, Labsonic	B. Braun, Deutschland

Tabelle A.4: Verwendete Software mit Herstellerangaben

Software	Hersteller, Land
UNICORN 6	GE Healthcare Life Sciences, Schweden
OriginLab	OriginLab, USA
CorelDRAW X6	Corel, Deutschland
SkantIt™	Thermo Scientific, USA
GelAnalyzer Freeware	GelAnalyzer
ProfiLab-Expert 4.0	Abacom, Deutschland
python™	Python Software Foundation, USA

A.3 Kulturmedien, Puffer, Reagenzlösungen

Kulturmedien

LB-Medium (Lysogeny Broth)	10 g/L Natriumchlorid, 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt
LB-Agar	10 g/L Natriumchlorid, 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 15 g/L Agar
TB-Medium (Terrific Broth)	12 g/L Trypton, 24 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Glycerin,

	0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4
Glycerinlösung für Cryokulturen (2x)	80 % (v/v) Glycerin, 20 % (v/v) ddH ₂ O
Antibiotikum Stammlösung (1000x)	25 mg/mL Kanamycin
Puffer	
Lysispuffer	6 M Urea, 10 mM Metabisulfit, 10 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM Ascorbinsäure
0,2 M Acetatpuffer mit pH 4,0	12,01 g/L Essigsäure, 6,8 g/L Natriumchlorid
0,2 M Acetatpuffer mit pH 5,0	12,01 g/L Essigsäure, 0,82 g/L Natriumchlorid
0,2 M MES Puffer mit pH 7,0	39,04 g/L MES (Pufferan)
0,2 M Tris-HCl Puffer mit pH 8,0	31,52 g/L Tris-HCl)
TGS Puffer mit pH 8,3	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Kaliumphosphat Laufpuffer	0,02 M KH_2PO_4 mit pH 7,0
Kaliumphosphat Elutionspuffer	0,02 M KH_2PO_4 mit pH 7,0, 1 M NaCl
Tris Laufpuffer	0,02 M Tris-Base mit pH 8,5

Tris Elutionspuffer	0,02 M Tris-Base mit pH 8,5, 1 M NaCl
50 mM Phosphatpuffer mit pH 7,4	81,8 mL 50 mM Na ₂ HPO ₄ , 18,2 mL 50 mM KH ₂ PO ₄
Reagenzlösungen	
<i>p</i> -NPA Aktiviätsassay	Lösung A: 20 mM <i>p</i> -NPA in Dimethylsulfoxid Lösung B: 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4)
CalB-Stammlösung	111,27 g/L in 50 mM Kaliumphosphat- puffer (pH 6,8)
Lösungen für die SDS-PAGE	
Polyacrylamid Sammelgel (6 %)	750 µl Polyacrylamid/Bisacrylamid, 300 µl SDS (1 %), 630 µl 1,5 M Tris-HCl mit pH 6,8, 3,770 mL ddH ₂ O, 10 µl TEMED, 10 µl APS (25 %)
Polyacrylamid Trenngel (12 %)	1,5 mL Polyacrylamid/Bisacrylamid, 0,5 mL SDS (1 %), 1,4 mL 1,5 M Tris-HCl mit pH 8,8, 1,6 mL ddH ₂ O, 10 µl TEMED, 10 µl APS (25 %)
Polyacrylamid Trenngel (15 %)	3 mL Polyacrylamid/Bisacrylamid, 0,8 mL SDS (1 %), 2 mL 1,5 M Tris-HCl mit pH 8,8, 2,08 mL ddH ₂ O,

	8 μ l TEMED, 32 μ l APS (25 %)
Lämmli-Probenpuffer (2x)	125 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 0,004 % Bromphenolblau
SDS-Probenpuffer (2x)	800 μ l Lämmli-Probenpuffer, 100 μ l Glycerin (20 %), 100 μ l β -Mercaoptoethanol (10 %)
Färbelösungen	
Coomassie Färbelösung	376 mL ddH ₂ O, 48 mL H ₃ PO ₄ (85 %), 40,8 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 490 mg Coomassie G-250, 82 mL Methanol
Fixierer	45 % ddH ₂ O, 45 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Farmers Reducer	0,1 % Kaliumhexacyanoferrat(III), 0,1 % Natriumthiosulfat
Silbernitrat-Lösung	0,1 % Silbernitrat
Natriumcarbonat-Lösung	2,5 % Natriumcarbonat
Formaldehyd-Lösung	300 μ l Formaldehyd, 100 mL 2,5 % Natriumcarbonat-Lösung
5 % Essigsäure-Lösung	5 % Essigsäure

A.4 Biomoleküle, Vektoren, Zellen

Biomoleküle

CalB	c-Lecta GmbH, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Lysozym	Fluka Chemie (Sigma-Aldrich), USA
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific, USA
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific, USA

Zellen

<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS	Merck Millipore, Deutschland
--------------------------------------	------------------------------

Vektoren

pET-26b(+) [Cat. No. 69862-3]	Novagen, USA
-------------------------------	--------------

Die folgende adaptierte Gensequenz für die Lipase aus *C. antarctica* (LF 058) wurde über die Schnittstellen NdeI und XhoI in den Expressionsvektor pET-26b(+) kloniert (Abbildung A.1) und vom Institut für Biochemie der Universität Greifswald bereitgestellt.

```

CATATGCTAC CTTCCGGTTC GGACCCTGCC TTTTCGCAGC CGAAGTCGGT
GCTGGATGCG GGTCTGACCT GCCAGGGTGC TTCGCCATCC TCGGTCTCCA
AACCGATCCT TCTGGTCCCA GGTACCGGCA CCACAGGTCC ACAGTCGTTC
GACTCGAACT GGATTCCGCT GTCAACGCAG TTAGGTTACA CACCGTGCTG
GATCTCACCA CCGCCGTTC TGTGAACGA CACCCAGGTC AACACGGAGT
ACATGGTCAA CGCCATCACC GCGCTGTACG CTGTTTCGGG CAACAACAAG
CTTCCAGTGC TTGGCTGGTC CCAGGGTGGT CTGTTGCAC AGTGGGGTCT
GACCTTCTTC CCAAGTATCC GTTCCAAGGT CGATCGTCTT ATGGCCTTTG
CGCCAGACTA CAAGGGCACC GTCCTGGCCG GCCCTCTGGA TGCACTGGCG
GTTAGTGAC CATCCGTATG GCAGCAAACC ACCGGTTCGG CACTGACCAC
CGCACTGCGT AACGCAGGTG GTCTGACCCA GATCGTGCCA ACCACCAACC
TGTA CTGCGC GACCGACGAG ATCGTTCAGC CTCAGGTGTC CAACTCGCCA
CTGGACTCAT CCTACCTGTT CAACGGTAAG AACGTCCAGG CACAGGCCGT
GTGTGGTCCG CTGTTCTGCA TCGACCATGC AGGCTCGCTG ACCTCGCAGT
TCTCCTACGT CGTCGGTCGT TCCGCCCTGC GCTCCACCAC GGGCCAGGCT
CGTAGTGAC ACTATGGCAT TACGGACTGC AACCTCTTC CAGCCAATGA
TCTGACTCCA GAGCAAAAGG TCGCCGCGGC TGCCTGCTG GCGCCGGAAG
CTGCAGCCAT CGTGCGGGT CCAAAGCAGA ACTGCGAGCC AGACCTGATG
CCATACGCC GCCCATTTGC AGTAGGCAAA CGTACCTGCT CCGGCATCGT
CACCCCTGA CTCGAG

```

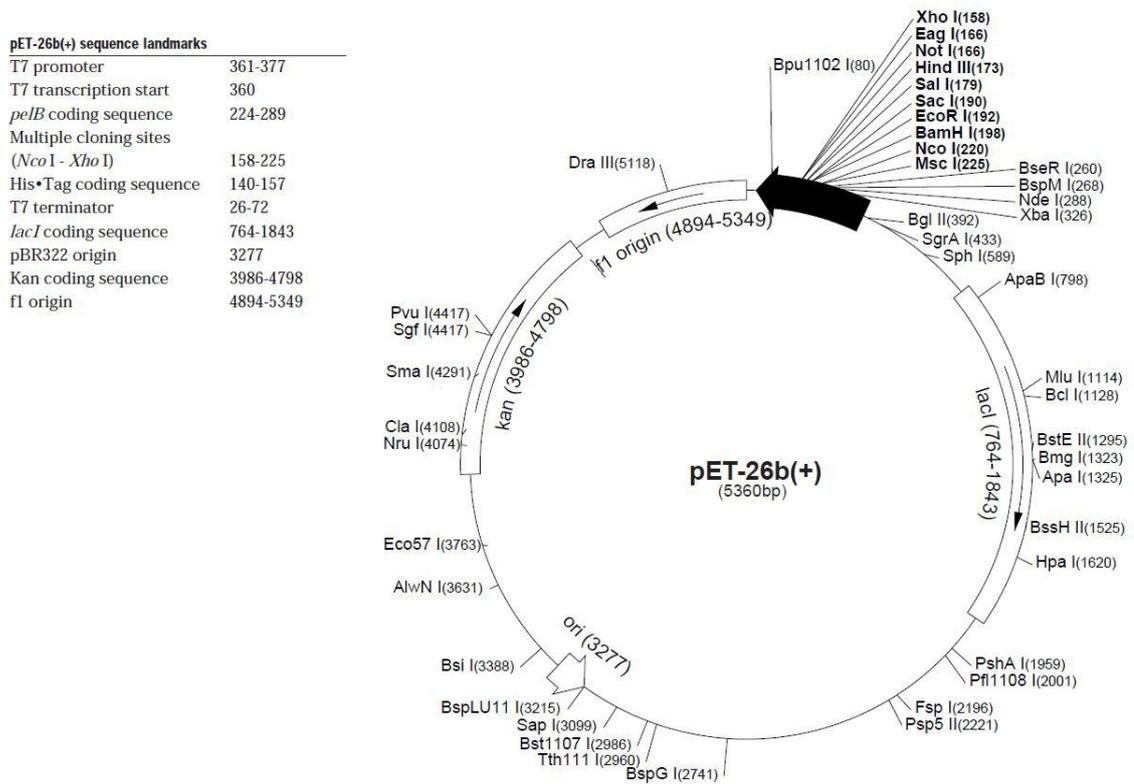


Abbildung A.1: Vektorkarte des Expressionsvektors pET-26b(+) von Novagen (USA).

B Methoden

B.1 Enzymimmobilisierung

Zunächst werden die Tiefenfilter in Puffer (MES-Puffer mit pH 7, Acetatpuffer mit pH 4 oder Tris-Puffer mit pH 8) equilibriert, dann werden sie in die speziell angefertigten Halter eingespannt. Der Aufbau (vgl. Abbildung 3.2) besteht aus einer Mischkammer, einer Peristaltikpumpe, dem Halter für die Filter und einer UV/Vis-Messkammer (Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm). Die Enzymlösung besteht aus 20 mL Puffer mit einer CalB-Konzentration von 0,83 mg/mL. Die Filter werden im Kreislauf mit der Enzymlösung mit einer Flussrate von 0,81 mL/min durchströmt. Die Abreicherung an Enzym in der Lösung wird mit dem Spektrophotometer Cary 50 Scan von Varian (USA) bei 280 nm verfolgt, bis keine Änderung der Absorption festgestellt werden kann. Periodisch wurden Offline-Proben für die Gesamtproteinanalytik gesammelt.

B.1.1 Enzymaktivitätsassay mit *p*-NPA

Zur Aktivitätsbestimmung von *Candida antarctica* lipase B (CalB) wird ein Assay mit *para*-Nitrophenolacetat (*p*-NPA) durchgeführt. Der Test kann in 96-Well-Platten oder im Durchfluss mit den Tiefenfiltern erfolgen.

Für die Messung in Mikrotiterplatten werden 200 μ L 50 mM Phosphatpuffer mit pH 7,4, 5 μ L Probe und 10 μ L Substratlösung in das Well gegeben. Durch die hydrolytische Spaltung des Substrats kann das Produkt *para*-Nitrophenol (*p*-NP) bei 405 nm detektiert werden. Die Proben werden fünfmal in dreiminütigem Abstand vermessen. Die

Signalintensität vom jeweiligen Puffer (Blank) wird von den zu vermessenden Proben substrahiert. Anhand der Steigung der Extinktion kann eine Geradengleichung erstellt werden, die das Umsetzungsverhalten von Substrat zu Produkt angibt. Die Enzymaktivität wird in Units pro Volumen Probe angegeben. Eine Unit entspricht einem Substratumsatz von einem μmol Substrat pro Minute. Die benötigten Lösungen können Abschnitt A.3 entnommen werden.

Für die Bestimmung im Durchfluss wird der Aufbau aus Abbildung 3.2 verwendet. Einzige Änderung ist die Verwendung einer Durchfluss-Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm. Der Reaktionsansatz bestehend aus 20 mL 50 mM Phosphatpuffer mit pH 7,4 und 1 mL *p*-NPA Substratlösung wird in einem Gefäß mit Alufolie vor Lichteinwirkung geschützt. Die Substratlösung wird im Kreislauf durch die mit CalB immobilisierten Tiefenfilter mit einer Flussrate von 0,81 mL/min gepumpt. Die Messung erfolgt über 15 Minuten in einem Intervall von 0,04 Minuten bei 405 nm. Die Signalintensität des Puffers wird vor jeder Messung als Blank gesetzt. Anhand der Steigung der Extinktion kann eine Geradengleichung erstellt werden, die das Umsetzungsverhalten von Substrat zu Produkt angibt.

B.2 Proteinanalytik

B.2.1 SDS-PAGE

Zur qualitativen Beurteilung der Chromatographie-Läufe wurden die Proteine mit einer diskontinuierlichen SDS-PAGE aufgetrennt. Die benötigten Lösungen für das Sammel- und Trenngel können Abschnitt A.3 entnommen werden. Für die Auftrennung von CalB werden 15 % Trenngele und für die Auftrennung von BSA und Lysozym 12 % Trenngele verwendet.

Die Proben wurden im gleichen Verhältnis mit SDS-Probenpuffer (A.3) versetzt und bei 95 °C für 10 min gekocht. Die Proben (3 -10 μL) und der Proteinmarker (5 μL) werden auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteingemische erfolgt zunächst bei 100 V, nach Durchlaufen des Sammelgels bei 150 V in TGS-Puffer.

B.2.2 Färbemethoden der SDS-PAGE Gele

B.2.2.1 Coomassie Färbung

Zur Anfärbung der Proteinbanden im Polyacrylamidgel wird das Gel über Nacht bei Raumtemperatur in der Coomassie Färbelösung (A.3) unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wird das Gel bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes mit Wasser gewaschen. Die Gele wurden dann eingescannt und mit der Software GelAnalyzer ausgewertet.

B.2.2.2 Silberfärbung

Für eine sensitivere Visualisierung der Proteinbanden wird die Silberfärbung verwendet. Das Gel wird für mindestens 20 min in Fixierer unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird das Gel zweimal kurz mit Wasser gewaschen, um es dann für 2,5 min in Farmers Reducer zu schwenken. Bis zur vollständigen Entfärbung wird das Gel mit Wasser gewaschen. Dann wird das Gel für 30 min in der Silbernitrat-Lösung inkubiert und anschließend erneut zweimal mit Wasser und einmal mit Natriumcarbonat-Lösung gewaschen. Die Entwicklung wird durch Zugabe der Formaldehyd-Lösung gestartet. Durch Zugabe der Essigsäure-Lösung kann die Entwicklung bei gewünschter Intensität der Banden gestoppt werden. Anschließend werden die Gele eingescannt. Alle benötigten Lösungen sind in A.3 aufgeführt.

B.2.3 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Zur Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde das Quick Start™ Bradford Protein Assay Reagenz von Bio-Rad (USA) verwendet. Es werden jeweils 20 μL der Probe und 300 μL des Bradford-Reagenz in das Well einer Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wird 30 s geschüttelt und für 5 min im Multiskan GO inkubiert. Anschließend werden die Proben bei 595 nm gemessen. Die Signalintensität vom jeweiligen Puffer (Blank) wird von den zu vermessenden Proben subtrahiert. Anhand einer Standardgeraden mit CalB, BSA oder Lysozym wird die Proteinkonzentration

bestimmt. Zur Berechnung der Ergebnisse der vermessenen Proben wurden die in Abbildung B.1 dargestellten Kalibrationsgeraden verwendet.

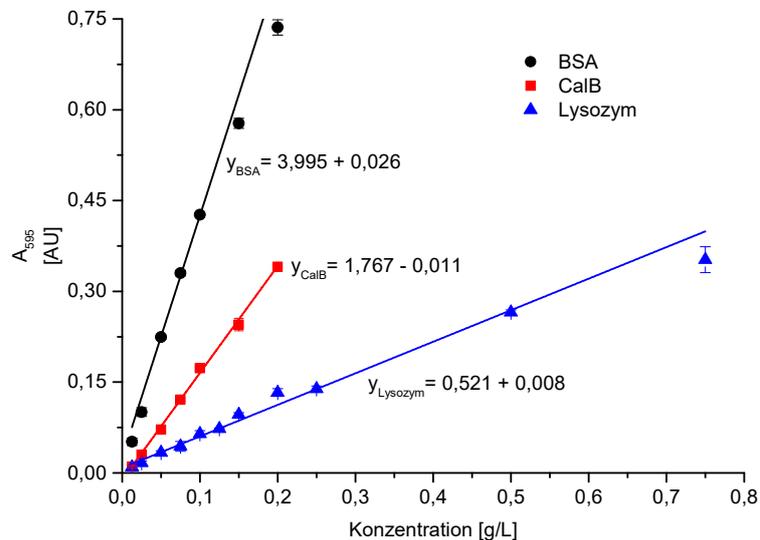


Abbildung B.1: Kalibrationsgeraden für Lysozym (0,0125 g/L - 0,75 g/L), CalB (0,0125 g/L - 0,2 g/L) und BSA (0,0125 g/L - 0,2 g/L).

B.3 Chromatographie

B.3.1 Ionenaustauschchromatographie

Die Entwicklung der chromatographischen Methoden wurden an dem FPLC-System Äkta pure 25 L von GE Healthcare durchgeführt. Für die Ionenaustauschchromatographie wurde ein Anionenmembranadsorber Sartobind[®] Q 75 von Sartorius verwendet. Die Flussrate bei allen Experimenten betrug 5 mL/min. Zunächst wurde der Membranadsorber mit Laufpuffer für 15 CV (CV: column volume) equilibriert, dann erfolgte die Probenaufgabe. Ungebundene Proteine wurden durch einen Waschschrift über 10 CV von der Membran gewaschen. Über 20 CV wurde mittels eines linearen Gradienten unter steigender Salzkonzentration (bis 1 M NaCl) eluiert. Dann wurde ein High Salt Wash mit 1 M NaCl über 5 CV durchgeführt, bevor der Membranadsorber über 5 CV

mit Laufpuffer re-equilibriert wurde. Die Elution wurde dann für jedes aufzureinigende Protein optimiert und gegebenenfalls eine Stufenelution eingeführt. Die verwendeten Puffer sind in Kapitel A.3 aufgelistet. Für die Aufreinigung von BSA wurde ein Kaliumphosphatpuffer mit pH 7 und für die Aufreinigung von CalB ein Tris-Puffer mit pH 8,5 verwendet.

B.3.2 PCC-Einheit

Vor Verwendung der PCC-Anlage wurden einige Vorbereitungen getroffen. Die Methode zur Aufreinigung des Zielproteins wurde bereits entwickelt und die Konzentration der Feed-Lösung an den Messbereich der PCC-Anlage angepasst. Alle Puffer wurden bereits angesetzt: Puffer A, Puffer B und die Feed-Lösung. Dann werden folgende Schritte der Reihenfolge nach durchgeführt:

- Anschalten der Lichtquelle (Deuterium), Schalter auf **close**
- Mischkammer anschalten
- Fraktionssammler anschalten, 82 Tropfen einstellen (entspricht 3 mL Fraktionen)
- Pumpschläuche einspannen und Pumpe anschalten:
Puffer A = Kanal 1, Puffer B = Kanal 2, Feed = Kanal 3
- Spektrometer Programm *oceanoptics* bzw. *Photometer ocean optics* öffnen
- Spektrometer starten in putty
 - Putty öffnen: Hostname 10.115.1.166, STS Load, Open
 - Passwort: tciewerk
 - Starten mit `./start_spectrometer`
- Das Programm modulare fplc 2.1 starten und Handsteuerung anschalten (blinkt rot)
- Ventile prüfen
- Das System manuell mit Puffer A füllen (Schläuche A, B und Feed in Flasche mit Puffer A)
Achtung! Die Schläuche können abplatzen, wenn Luft im System ist
- Die Membranadsorber (MA) einbauen (niedriger Fluss)
- Die MA manuell equilibrieren und den dark setzen, dann den Schalter an

der Lichtquelle auf open und die reference im Spektrometer Programm *oceanopticsspecontrol* bzw. *Photometer ocean optics* setzen

Achtung! In putty kontrollieren, ob die reference gesetzt wurde

- UV_{\max} bestimmen, indem die Feed-Lösung in die Küvette injiziert wird
 - nach der Messung wieder durch Puffer A ersetzen und spülen bis keine Luft mehr im System ist
 - Aufnahme des Durchbruchs der Verunreinigung mit den MA durch manuelle Ansteuerung der Pumpe und Ventile
 - Die Feed-Lösung wird auf je einen MA aufgetragen bis ein konstantes Plateau der Verunreinigung erreicht wird
 - Wiederholung für alle MA (oder je nach Aufwand für einen MA)
- Problem:** UV-Spektrometer sind nicht identisch, Standardabweichung: 4 %
- Wenn UV_{\max} und $UV_{\text{Verunreinigung}}$ bekannt sind, wird ΔUV errechnet:

$$\Delta UV = UV_{\max} - UV_{\text{Verunreinigung}}$$
 - Anschließend werden die Switching Conditions 1 und 2 berechnet, je nach Trennaufgabe werde diese angepasst (vgl. Kapitel 2.2.3)
 - WinSCP wird geöffnet
 - Hostname: 10.115.1.166, Passwort: tcifplc
 - sc1 und sc2 werden in der aktuellen Datei *ablauf3_bsalys.py* in angepasst, die Methode wird nochmals überprüft, evtl. Pausen anpassen
 - Die Handsteuerung im Programm modulare fplc 2.1 wird ausgeschaltet (**wichtig!**), alle Ventile sind grau
 - Datenaufzeichnung im Spektrometer Programm *oceanopticsspecontrol* bzw. *Photometer ocean optics* in Grafik und Tabelle (Alt + C) stoppen
 - Der Versuch kann gestartet werden, indem die Datei *modulare_FPLC_14.py* gestartet wird
 - Datei *modulareFPLC_14.py* wählen und mit putty öffnen
 - Passwort: tcifplc
 - Der Versuch wird mit ./start gestartet (man sieht nicht, was das Programm macht)
 - Mit python™ *modulare_FPLC_14.py* kann verfolgt werden, was das Programm macht (Verfolgung von Fehlern; wird empfohlen)
 - Die Datenaufzeichnung wird manuell im Spektrometer Programm *oceanopticsspecontrol* bzw. *Photometer ocean optics* gestartet, dazu wird der

Record Button im Reiter Tabelle **und** Grafik gedrückt

- Die Tabelle kann mit Alt + C gelöscht werden
- Der Fraktionssammler kann maximal 80 Proben à 3 mL sammeln
 - Wenn diese Tubes befüllt sind, müssen diese ausgetauscht werden
 - Die andere Möglichkeit ist, den Schlauch in den waste zu hängen
- Der Versuch wird beendet, indem die Datei *modulareFPLC_14.py* mit **Strg + C** gestoppt wird
- Die Pumpe muss manuell gestoppt werden, und die Regeneration sowie das Waschen der Membranadsorber werden manuell im Modus Handsteuerung des Programms Modulare FPLC durchgeführt
- Die Daten werden gespeichert, indem die Tabelle als .txt-Datei exportiert wird
 - Rechtsklick auf Tabelle, Exportieren

B.4 Proteinexpression

B.4.1 Transformation mittels Hitzeschock-Methode

Das bereitgestellte Plamid mit der Gensequenz für CalB wurde mittels der Hitzeschock-Methode in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS transformiert. Es wurden 2 μL Vektor-DNA ($c_{\text{Nanodrop}} = 124,7 \text{ ng}/\mu\text{L}$) zu 50 μL Bakteriensuspension gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 s bei 42 °C. Dann wurde die Bakteriensuspension auf Eis gelagert und 250 μL vorgewärmtes (37 °C) SOC-Medium (Super Optimal Broth) dazugegeben. Anschließend wird die Bakteriensuspension bei 37 °C und 225 rpm für eine Stunde inkubiert. Die Suspension wurde auf LB-Agarplatten mit Kanamycin unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungsreihen (1/10 und 1/100) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden gepickt, Glycerin-Stammkulturen erstellt und auf Proteinexpression untersucht.

B.4.2 Glycerin-Stammkultur

Ein 100 mL Schüttelkolben mit 25 mL LB Medium und Kanamycin wurde mit einer Einzelkolonie *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Bei Erreichen einer $OD_{600} = 3,0$ wurden 0,5 mL Kulturbrühe mit 0,5 mL 80 % (v/v) Glycerinlösung versetzt und in beschrifteten sterilen Gefrierkulturröhrchen bei -80 °C gelagert.

B.4.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Für die Vorkultur werden 20 mL TB-Medium mit 25 µg/mL Kanamycin mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte angeimpft und in einem 100 mL Schüttelkolben mit Schikanen bei 37 °C und 180 rpm über Nacht kultiviert. Die 100 mL Hauptkultur mit TB-Medium in 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen wird mit einer Start-OD von $OD_{600} = 0,1$ angeimpft. Die Kultivierung wurde bei 37 °C und 180 rpm durchgeführt. Die Proteinexpression wurde in der exponentiellen Phase bei einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,8 mit Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Temperatur wird auf 20 °C reduziert und die Proteinproduktion erfolgt für 24 h. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 xg für 15 min und 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert. Die Wachstumskurve für *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS ist in Abbildung B.2 gezeigt.

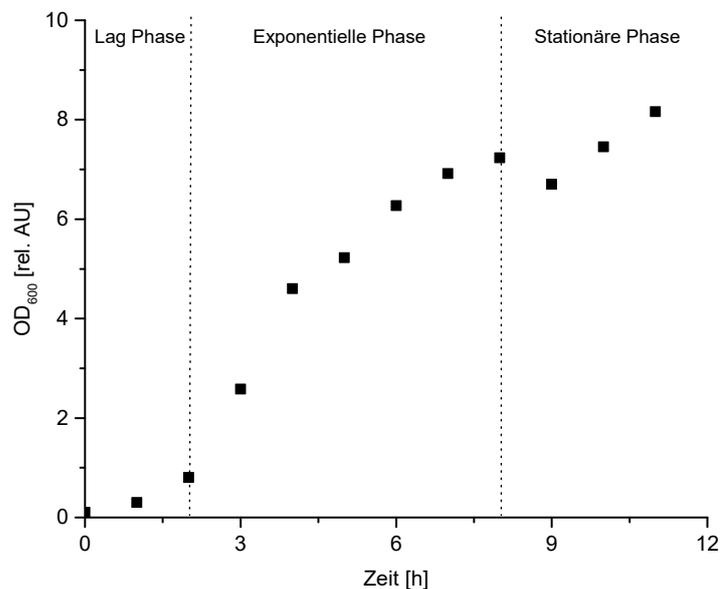


Abbildung B.2: Wachstumskurve von *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS in TB-Medium im 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen bei 37 °C und 180 rpm.

B.4.4 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Das abzentrifugierte Zellpellet wird gewaschen, erneut abzentrifugiert und dann im gewünschten Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt mit der Ultraschallsonde (Amplitude = 100 %, Zyklus = 0,6 s), während die Proben auf Eis gelagert werden. Der Aufschluss erfolgt bei kleinen Probenvolumina (0,3 mL) für 3 x für 45 s mit 30 s Pause zwischen den Beschallungen und für große Probenvolumina (5 mL) für 10 x für 45 s mit 30s Pause zwischen den Beschallungen. Die Suspension wird anschließend zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

C Ergänzende Daten

C.1 Programmablauf Modulare PCC

```
# -*- coding: cp1252 -*-
#
# Ablaufsteuerung fuer die modulare FPLC
#
# erledigt:
#
#      2016 - 1.0 Grundgeruest; funktioniert
# 20.10.2016 - 1.1 Neue Klasse photometer
# 31.10.2016 - 1.2 Klasse pumpe erweitert
# 07.12.2016 - 1.3 Fraktionssammler eingebunden
# 12.12.2016 - 1.4 Neues Ventil V_F8

import mbclient_l1 as mbclient
import Ismatec21 as ismatec
import logging
import time
import collections as col

### KONSTANTEN ###

ABLAUFNAME = "ablauf3bsalys.py"

#####

logging.basicConfig(level = logging.DEBUG,
                    format = "%(asctime)s_[(levelname)-8s]_%(message)s",
                    datefmt = "%d.%m.%Y-%H:%M:%S")

class pumpe:
    ni=0 # Instanz-Zaehler
    def __init__(self, port, kanal):
        if pumpe.ni == 0: # Erste Instanz
            pumpe.isma = ismatec.ismatec(port)
            pumpe.isma.kanalmodus(1)
            pumpe.ni = pumpe.ni + 1
            self.kanal = kanal
            logging.info("Neue_Pumpen-Instanz: \_Nr. "+str(pumpe.ni)+"\_Port\_"+port+"\_Kanal\_"+str(kanal))
            logging.info("Pumpenversion: \_"+pumpe.isma.version(self.kanal))

    def start(self):
        pumpe.isma.start(self.kanal)

    def stop(self):
        pumpe.isma.stop(self.kanal)

    def speedmodus(self):
        pumpe.isma.speedmodus(self.kanal)
```

```

def speed(self, v):
    pumpe.isma.speed(self.kanal, v)

def ratemodus(self):
    pumpe.isma.ratemodus(self.kanal)

def rate(self, r):
    pumpe.isma.rate(self.kanal, r)

def rechts(self):
    pumpe.isma.direction(self.kanal, 'r')

def links(self):
    pumpe.isma.direction(self.kanal, 'l')

class ventil:
    ni=0 # Instanz-Zaehler
    def __init__(self, ip, bit):
        if ventil.ni==0: # erste Instanz
            ventil.fbk = mbclient.client(ip, 502)
            ventil.fbk.start()
        self.bit = bit
        ventil.ni = ventil.ni + 1
        logging.info("Neue_Ventil-Instanz: %Nr. "+str(ventil.ni)+"_IP_"+ip+"_Bit_"+str(bit))

    def no(self):
        ventil.fbk.sendBit(self.bit, 0)
    def off(self):
        ventil.fbk.sendBit(self.bit, 0)

    def nc(self):
        ventil.fbk.sendBit(self.bit, 1)
    def on(self):
        ventil.fbk.sendBit(self.bit, 1)

    def status(self):
        ventil.fbk.status()

class photometer:
    ni=0 # Instanz-Zaehler
    def __init__(self, ip, nr):
        if photometer.ni==0: # erste Instanz
            photometer.mbc = mbclient.client(ip, 502)
            photometer.mbc.start()
        self.nr = nr
        photometer.ni = photometer.ni + 1
        logging.info("Neue_Photometer-Instanz: %Nr. "+str(photometer.ni)+"_IP_"+ip)

    def roh(self):
        val = photometer.mbc.receiveWord(self.nr*10 + 3)
        return val

    def absorbtion(self):
        val = photometer.mbc.receiveWord(self.nr*10 + 2)/1000.0
        return val

    def wait(self, val, t):
        self.fifo = col.deque()
        while True: # Erzeugt Liste mit t+1 Elementen
            self.fifo.append(self.absorbtion())
            if t == 0:
                break
            t = t-1
            time.sleep(1)
        while True:
            time.sleep(1)
            self.fifo.popleft() # aeltestes Element entfernen
            self.fifo.append(self.absorbtion())
            mean = sum(self.fifo)/len(self.fifo)

```

```
        logging.info(str(mean))
        if mean >= val:
            break
    return mean

##### Von Oben bitte Finger weg #####

def pause(sec):
    time.sleep(sec)

# Konstanten :- )

FBK_IP = "10.115.1.165" # WAGO Feldbuskoppler fuer die Ventile
MBC_IP = "10.115.1.162" # Controller fuer die STS Spectrometer
COMPORT = "/dev/ttyUSB0"
#COMPORT = "com1"
# Geraeteinstanzen

V_E1 = ventil(FBK_IP,0)
V_F1 = ventil(FBK_IP,1)
V_M1 = ventil(FBK_IP,2)
V_M7 = ventil(FBK_IP,3)
V_F6 = ventil(FBK_IP,4)
V_M6 = ventil(FBK_IP,5)
V_E6 = ventil(FBK_IP,6)
V_F7 = ventil(FBK_IP,7)
V_F4 = ventil(FBK_IP,8)
V_M5 = ventil(FBK_IP,9)
V_F5 = ventil(FBK_IP,10)
V_M4 = ventil(FBK_IP,11)
V_E5 = ventil(FBK_IP,12)
V_E4 = ventil(FBK_IP,13)
V_F2 = ventil(FBK_IP,14)
V_M3 = ventil(FBK_IP,15)
V_F3 = ventil(FBK_IP,16)
V_M2 = ventil(FBK_IP,17)
V_E3 = ventil(FBK_IP,18)
V_E2 = ventil(FBK_IP,19)
V_F8 = ventil(FBK_IP,22)

Fraksam_EA = ventil(FBK_IP,20)
Fraksam_ES = ventil(FBK_IP,21)

Pump_1 = pumpe(COMPORT,1)
Pump_2 = pumpe(COMPORT,2)
Pump_3 = pumpe(COMPORT,3)
Pump_4 = pumpe(COMPORT,4)

Photometer_1 = photometer(MBC_IP,1)
Photometer_2 = photometer(MBC_IP,2)
Photometer_3 = photometer(MBC_IP,3)

# Ablauf starten
logging.info('Starte_Ablauf!:_' + ABLAUFNAME)
execfile(ABLAUFNAME)

"""
while True:
    print Photometer_1.roh()
    print Photometer_1.absorbtion()
    time.sleep(1)
# Testablauf """
```

C.2 Programmablauf BSA

```
# -*- coding: cp1252 -*-
# Beladung MA1 bis MA3

# Switching Conditions eingeben
SC1_1 = 0.627
SC2_1 = 1.005
SC1_2 = 0.627
SC2_2 = 1.005
SC1_3 = 0.627
SC2_3 = 1.005

def Init():
    Pump_1.stop()
    Pump_2.stop()
    Pump_3.stop()
    Pump_4.stop()
    Pump_1.ratemodus()
    Pump_2.ratemodus()
    Pump_3.ratemodus()
    Pump_4.ratemodus()
    Fraksam_EA.on()
    pause(5)
    Fraksam_EA.off()

def Stop_Pumps():
    Pump_1.stop()
    Pump_2.stop()
    Pump_3.stop()
    Pump_4.stop()

def FeedMA1():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.no()
    V_F2.no()
    V_F4.nc()
    V_F5.nc()
    V_F7.no()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(5)
    Pump_3.start()

def FeedMA1MA2():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.nc()
    V_F2.nc()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.no()
    V_F4.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(5)
    Pump_3.start()

def FeedMA2WashMA1():
```

```
Stop_Pumps ()
V_F1.nc ()
V_F2.no ()
V_F3.no ()
V_M3.no ()
V_M4.no ()
V_F5.no ()
V_F4.no ()
V_F7.no ()
V_E1.no ()
V_M1.nc ()
V_M7.no ()
V_M2.nc ()
V_E2.no ()
V_E3.no ()
V_E4.nc ()
V_E5.no ()
V_E6.nc ()
V_F6.nc ()
V_F8.no ()
Pump_3.rate (5)
Pump_3.start ()
Pump_1.rate (8.6)
Pump_1.start ()
Fraksam_ES.on ()

def FeedMA2EluteMA1 () :
Stop_Pumps ()
V_F1.nc ()
V_F2.no ()
V_F3.no ()
V_M3.no ()
V_M4.no ()
V_F5.no ()
V_F4.no ()
V_F7.no ()
V_E1.no ()
V_M1.nc ()
V_M7.no ()
V_M2.nc ()
V_E2.no ()
V_E3.no ()
V_E4.nc ()
V_E5.no ()
V_E6.nc ()
V_F6.nc ()
V_F8.no ()
Pump_3.rate (5)
Pump_2.rate (8.6)
Pump_3.start ()
Pump_2.start ()

def FeedMA2MA3EluteMA1 () :
Stop_Pumps ()
V_F1.nc ()
V_F2.no ()
V_F3.no ()
V_M3.no ()
V_M4.no ()
V_F5.nc ()
V_F4.nc ()
V_M5.no ()
V_M6.no ()
V_F7.no ()
V_E1.no ()
V_M1.nc ()
V_M7.no ()
V_M2.nc ()
V_E2.no ()
V_E3.no ()
```

```
V_E4.nc()
V_E5.no()
V_E6.nc()
V_F6.no()
V_F8.no()
Pump_3.rate(5)
Pump_3.start()
Pump_2.rate(8.6)
Pump_2.start()

def FeedMA2MA3WashMA1():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.no()
    V_F3.no()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.nc()
    V_F4.nc()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_E1.no()
    V_M1.nc()
    V_M7.no()
    V_M2.nc()
    V_E2.no()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    V_F6.no()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(5)
    Pump_3.start()
    Pump_1.rate(8.6)
    Pump_1.start()

def FeedMA3WashMA2():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.nc()
    V_F3.nc()
    V_F4.no()
    V_F5.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.nc()
    V_M3.nc()
    V_M4.nc()
    V_E4.no()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    V_F6.no()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(5)
    Pump_3.start()
    Pump_1.rate(8.6)
    Pump_1.start()

def FeedMA3EluteMA2():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.nc()
    V_F3.nc()
    V_F4.no()
    V_F5.no()
```

```
V_M5.no()
V_M6.no()
V_F7.no()
V_E1.nc()
V_E2.nc()
V_E3.nc()
V_M3.nc()
V_M4.nc()
V_E4.no()
V_E5.no()
V_E6.nc()
V_F6.no()
V_F8.no()
Pump_3.rate(5)
Pump_2.rate(8.6)
Pump_3.start()
Pump_2.start()

def FeedMA3MA1EluteMA2():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.nc()
    V_F3.nc()
    V_F4.no()
    V_F5.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F6.no()
    V_F7.nc()
    V_M7.nc()
    V_F8.nc()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.nc()
    V_M3.nc()
    V_M4.nc()
    V_E4.no()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    Pump_3.rate(5)
    Pump_3.start()
    Pump_2.rate(8.6)
    Pump_2.start()

def FeedMA3MA1WashMA2():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.nc()
    V_F3.nc()
    V_F4.no()
    V_F5.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F6.no()
    V_F7.nc()
    V_M7.nc()
    V_F8.nc()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.nc()
    V_M3.nc()
    V_M4.nc()
    V_E4.no()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    Pump_3.rate(5)
    Pump_3.start()
    Pump_1.rate(8.6)
    Pump_1.start()
```

```
def FeedMA1WashMA3():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.no()
    V_F2.no()
    V_F4.nc()
    V_F5.nc()
    V_F7.no()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.nc()
    V_M5.nc()
    V_M6.nc()
    V_E6.no()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(5)
    Pump_3.start()
    Pump_1.rate(8.6)
    Pump_1.start()

def FeedMA1EluteMA3():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.no()
    V_F2.no()
    V_F4.nc()
    V_F5.nc()
    V_F7.no()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.nc()
    V_M5.nc()
    V_M6.nc()
    V_E6.no()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(5)
    Pump_2.rate(8.6)
    Pump_3.start()
    Pump_2.start()

def FeedMA1MA2EluteMA3():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.nc()
    V_F2.nc()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.no()
    V_F4.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.no()
```

```
V_E4.nc()
V_E5.nc()
V_M5.nc()
V_M6.nc()
V_E6.no()
V_F6.nc()
V_F8.no()
Pump_3.rate(5)
Pump_3.start()
Pump_2.rate(8.6)
Pump_2.start()

def FeedMA1MA2WashMA3():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.nc()
    V_F2.nc()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.no()
    V_F4.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.nc()
    V_M5.nc()
    V_M6.nc()
    V_E6.no()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(5)
    Pump_3.start()
    Pump_1.rate(8.6)
    Pump_1.start()

# Start des Zyklus

print "Starte den zyklischen Prozess"

Init()

FeedMA1()
Photometer_1.wait(SC1_1,3)

FeedMA1MA2()
Photometer_1.wait(SC2_1,3)

while True:

    FeedMA2WashMA1()
    pause(188)

    FeedMA2EluteMA1()
    Photometer_2.wait(SC1_2,3)

    FeedMA2MA3EluteMA1()
    pause(102)

    FeedMA2MA3WashMA1()
    Photometer_2.wait(SC2_2,3)

    FeedMA3WashMA2()
    pause(188)
```

```

FeedMA3EluteMA2()
Photometer_3.wait(SC1_3,3)

FeedMA3MA1EluteMA2()
pause(102)

FeedMA3MA1WashMA2()
Photometer_3.wait(SC2_3,3)

FeedMA1WashMA3()
pause(188)

FeedMA1EluteMA3()
Photometer_1.wait(SC1_1,3)

FeedMA1MA2EluteMA3()
pause(102)

FeedMA1MA2WashMA3()
Photometer_1.wait(SC2_1,3)

```

C.3 Programmablauf CalB

```

# -*- coding: cp1252 -*-
# Beladung MA1 bis MA3
# Switching Conditions eingeben
SC1_1 = 0.116
SC2_1 = 0.452
SC1_2 = 0.116
SC2_2 = 0.452
SC1_3 = 0.116
SC2_3 = 0.452

def Init():
    Pump_1.stop()
    Pump_2.stop()
    Pump_3.stop()
    Pump_4.stop()
    Pump_1.ratemodus()
    Pump_2.ratemodus()
    Pump_3.ratemodus()
    Pump_4.ratemodus()
    Fraksam_EA.on()
    pause(5)
    Fraksam_EA.off()

def Stop_Pumps():
    Pump_1.stop()
    Pump_2.stop()
    Pump_3.stop()
    Pump_4.stop()

def FeedMA1():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.no()
    V_F2.no()
    V_F4.nc()
    V_F5.nc()
    V_F7.no()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()

```

```
Pump_3.rate (2.5)
Pump_3.start ()

def FeedMA1MA2():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.nc()
    V_F2.nc()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.no()
    V_F4.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate (2.5)
    Pump_3.start ()

def FeedMA2WashMA1():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.no()
    V_F3.no()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.no()
    V_F4.no()
    V_F7.no()
    V_E1.no()
    V_M1.nc()
    V_M7.no()
    V_M2.nc()
    V_E2.no()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate (2.5)
    Pump_3.start ()
    Pump_1.rate (8.6)
    Pump_1.start ()
    Fraksam_ES.on()

def FeedMA2EluteMA1():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.no()
    V_F3.no()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.no()
    V_F4.no()
    V_F7.no()
    V_E1.no()
    V_M1.nc()
    V_M7.no()
    V_M2.nc()
    V_E2.no()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    V_F6.nc()
```

```
V_F8.no()
Pump_3.rate(2.5)
Pump_2.rate(1.72)
Pump_1.rate(6.88)
Pump_3.start()
Pump_2.start()
Pump_1.start()

def FeedMA2MA3EluteMA1():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.no()
    V_F3.no()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.nc()
    V_F4.nc()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_E1.no()
    V_M1.nc()
    V_M7.no()
    V_M2.nc()
    V_E2.no()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    V_F6.no()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(2.5)
    Pump_3.start()
    Pump_2.rate(8.6)
    Pump_2.start()

def FeedMA2MA3WashMA1():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.no()
    V_F3.no()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.nc()
    V_F4.nc()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_E1.no()
    V_M1.nc()
    V_M7.no()
    V_M2.nc()
    V_E2.no()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    V_F6.no()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(2.5)
    Pump_3.start()
    Pump_1.rate(8.6)
    Pump_1.start()

def FeedMA3WashMA2():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.nc()
    V_F3.nc()
    V_F4.no()
```

```
V_F5.no()
V_M5.no()
V_M6.no()
V_F7.no()
V_E1.nc()
V_E2.nc()
V_E3.nc()
V_M3.nc()
V_M4.nc()
V_E4.no()
V_E5.no()
V_E6.nc()
V_F6.no()
V_F8.no()
Pump_3.rate(2.5)
Pump_3.start()
Pump_1.rate(8.6)
Pump_1.start()

def FeedMA3EluteMA2():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.nc()
    V_F3.nc()
    V_F4.no()
    V_F5.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.nc()
    V_M3.nc()
    V_M4.nc()
    V_E4.no()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    V_F6.no()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(2.5)
    Pump_2.rate(1.72)
    Pump_1.rate(6.88)
    Pump_3.start()
    Pump_2.start()
    Pump_1.start()

def FeedMA3MA1EluteMA2():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.nc()
    V_F3.nc()
    V_F4.no()
    V_F5.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F6.no()
    V_F7.nc()
    V_M7.nc()
    V_F8.nc()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.nc()
    V_M3.nc()
    V_M4.nc()
    V_E4.no()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    Pump_3.rate(2.5)
    Pump_3.start()
    Pump_2.rate(8.6)
```

```
Pump_2.start()

def FeedMA3MA1WashMA2():
    Stop_Pumps()
    V_F1.nc()
    V_F2.nc()
    V_F3.nc()
    V_F4.no()
    V_F5.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F6.no()
    V_F7.nc()
    V_M7.nc()
    V_F8.nc()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.nc()
    V_M3.nc()
    V_M4.nc()
    V_E4.no()
    V_E5.no()
    V_E6.nc()
    Pump_3.rate(2.5)
    Pump_3.start()
    Pump_1.rate(8.6)
    Pump_1.start()

def FeedMA1WashMA3():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.no()
    V_F2.no()
    V_F4.nc()
    V_F5.nc()
    V_F7.no()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.nc()
    V_M5.nc()
    V_M6.nc()
    V_E6.no()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(2.5)
    Pump_3.start()
    Pump_1.rate(8.6)
    Pump_1.start()

def FeedMA1EluteMA3():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.no()
    V_F2.no()
    V_F4.nc()
    V_F5.nc()
    V_F7.no()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.nc()
```

```
V_M5.nc()
V_M6.nc()
V_E6.no()
V_F6.nc()
V_F8.no()
Pump_3.rate(2.5)
Pump_2.rate(1.72)
Pump_1.rate(6.88)
Pump_3.start()
Pump_2.start()
Pump_1.start()

def FeedMA1MA2EluteMA3():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.nc()
    V_F2.nc()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.no()
    V_F4.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.nc()
    V_M5.nc()
    V_M6.nc()
    V_E6.no()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(2.5)
    Pump_3.start()
    Pump_2.rate(8.6)
    Pump_2.start()

def FeedMA1MA2WashMA3():
    Stop_Pumps()
    V_F1.no()
    V_M1.no()
    V_M7.no()
    V_M2.no()
    V_F3.nc()
    V_F2.nc()
    V_M3.no()
    V_M4.no()
    V_F5.no()
    V_F4.no()
    V_M5.no()
    V_M6.no()
    V_F7.no()
    V_E1.nc()
    V_E2.nc()
    V_E3.no()
    V_E4.nc()
    V_E5.nc()
    V_M5.nc()
    V_M6.nc()
    V_E6.no()
    V_F6.nc()
    V_F8.no()
    Pump_3.rate(2.5)
    Pump_3.start()
    Pump_1.rate(8.6)
```

```
Pump_1.start()

# Start des Zyklus'
print "Starte den zyklischen Prozess"
Init()

FeedMA1()
Photometer_1.wait(SC1_1,3)
FeedMA1MA2()
Photometer_1.wait(SC2_1,3)

while True:

    FeedMA2WashMA1()
    pause(150)

    FeedMA2EluteMA1()
    Photometer_2.wait(SC1_2,3)

    FeedMA2MA3EluteMA1()
    pause(300)

    FeedMA2MA3WashMA1()
    Photometer_2.wait(SC2_2,3)

    FeedMA3WashMA2()
    pause(150)

    FeedMA3EluteMA2()
    Photometer_3.wait(SC1_3,3)

    FeedMA3MA1EluteMA2()
    pause(300)

    FeedMA3MA1WashMA2()
    Photometer_3.wait(SC2_3,3)

    FeedMA1WashMA3()
    pause(150)

    FeedMA1EluteMA3()
    Photometer_1.wait(SC1_1,3)

    FeedMA1MA2EluteMA3()
    pause(300)

    FeedMA1MA2WashMA3()
    Photometer_1.wait(SC2_1,3)
```

D Mitarbeit an Experimenten

Im Rahmen der Promotion betreute Abschlussarbeiten, aus denen Ergebnisse in die vorliegende Dissertation eingeflossen sind, sind im Folgenden aufgeführt.

Funmilola Josephine Heinen, Bachelorarbeit: Produktion der Lipase CalB in *E. coli* zur Immobilisierung auf beschichteten Trägermaterialien, im Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 02/2015 - 04/2015.

Insa Haacke, Bachelorarbeit: Produktion und Aufreinigung der Lipase CalB aus *E. coli*, im Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 02/2016 - 04/2016.

Chantal Marie Brämer, Masterarbeit: Periodic counter-current Chromatographie - Kontinuierliche Aufreinigung von Modellproteinen mit Membranadsorbentien, im Fach Pharmaceutical Biotechnology der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, 08/2016 - 02/2017.

Die Masterarbeit von Chantal Brämer wurde in Kooperation mit der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg (HAW Hamburg) durchgeführt. Diese Masterarbeit sind Ergebnisse entnommen, die in Kapitel 4 aufgeführt und entsprechend zitiert sind.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Abbildung des Prinzips der Tiefenfiltration, adaptiert nach [10].	4
2.2	Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme eines Tiefenfilterquerschnitts. Das Filterhilfsmittel (Kieselgur) ist in den Maschen der Zellulosefasern eingeschlossen [11].	4
2.3	Vereinfachte Abbildung der Layer-by-Layer-Technologie. Schritte 1 und 3 repräsentieren die zwei Adsorptionsschritte. Zuerst wird der Träger mit Polyanionen (blau), danach mit Polykationen (rot) beladen. Schritte 2 und 4 sind Waschschriffe, um ungebundene Ionen zu entfernen. In Wirklichkeit sind die Schichten mehr miteinander verwoben [17, 18], adaptiert nach [14].	6
2.4	Schematische Abbildung der Continuous Annular Chromatography (CAC), adaptiert nach [36].	9
2.5	Schematische Abbildung der 4-Zonen True Moving Bed (TMB) Chromatographie, adaptiert nach [36].	11
2.6	Column Switching Strategie der PCC, adaptiert nach [25, 33].	12
2.7	Schematische Abbildung einer 3C-PCC (3 Säulen PCC), adaptiert nach [25].	13
2.8	Dreidimensionale Struktur der <i>Candida antarctica</i> lipase B (CalB). Die Sekundärstrukturen (α -Helices und β -Faltblätter) sind in grün, und die katalytische Triade (Ser105, Asp187, His224) ist in rot dargestellt [91]. . .	17
2.9	Verlauf der berechneten Nettoladung von CalB in Abhängigkeit des pH-Wertes [91].	18
2.10	Dreidimensionale Struktur von Lysozym (PDB ID: 4YOP) [104].	21
2.11	Dreidimensionale Struktur von BSA (PDB ID: 3V03) [108].	22
2.12	Titrationkurve von BSA und Lysozym, adaptiert nach [110].	23

3.1	(a) Konfokale Fluoreszenzaufnahme von fluoreszierendem Polyethylenimin. Das PEI ist an die Komponenten (Kieselgur und Zellulose) des Standardfilters Typ D gebunden. Die großen Fasern stellen die Zellulose dar, und die kleinen Teilchen sind Kieselgur. (b) Identisches Bild wie (a) als Transmissionsaufnahme. Die Bilder (a und b) wurden mit einem Zoom von 40 x aufgenommen und haben eine Größe von 250 x 250 μm [11].	27
3.2	Schema des Versuchsaufbaus zur Durchströmung der Tiefenfilter mit UV/Vis-Messstelle zur Verfolgung der Proteinkonzentration sowie des Aktivitätsnachweises von CalB [11].	28
3.3	Vergleich des unbeschichteten Tiefenfilters Typ D mit verschiedenen Polyelektrolyt-beschichteten Filtern anhand der Bindungskapazität und der spezifischen Aktivität [11].	30
3.4	Einfluss der Ionenstärke (10 mM - 200 mM) auf die Bindungskapazität und die spezifische Aktivität [11].	31
3.5	Vergleich der spezifischen Aktivität über 28 Tage nach Lagerung der beladenen Tiefenfilter in Puffer bei 4 °C, bei Raumtemperatur (RT) oder nach Trocknung [11].	32
3.6	Auswirkung von Mehrfachverwendbarkeit der Tiefenfilter auf die spezifische Aktivität.	33
3.7	Alterung der mit Glutaraldehyd-aktivierten Polyelektrolytbeschichtungen und der Einfluss auf die Bindungskapazität und die spezifische Aktivität.	34
3.8	Vergleich der Bindungskapazität und der spezifischen Aktivität von CalB aus aufgeschlossenem Zellysate (*) und zellfreiem Überstand. Die optische Dichte (OD) wurde vor dem Ultraschall-Zellaufschluss bestimmt [11].	36
4.1	Schaltplan der PCC-Anlage.	40
4.2	Konfiguration der PCC-Anlage mit Peristaltikpumpe, Mischkammer, Durchfluss-Quarzglasküvetten, Membranadsorber, 3-Wege-Ventile, UV-Spektrometer, Deuterium/Halogen-Lichtquelle und Fraktionssammler.	41
4.3	Aufbau der UV/Vis Detektion mit den Lichtleitern, den drei Spektrometern und der Lichtquelle von Ocean Optics.	42
4.4	Manuelle Bedienoberfläche zur Schaltung der Ventile, erstellt mit ProfiLab-Expert 4.0.	46

4.5	Manuelle Bedienoberfläche zum Festlegen des Dark- und des Referenzwertes, erstellt mit ProfiLab-Expert 4.0.	47
4.6	Untersuchung unterschiedlicher Integrationszeiten von 50 - 400 ms bei der Messung verschiedener BSA-Konzentrationen bei einer Wellenlänge von 280 nm [114].	48
4.7	Darstellung des linearen Messbereichs der verschiedenen Integrationszeiten sowie Zoom des niedrig konzentrierten Proteingehalts [114].	49
4.8	Kalibrationsgeraden aller drei Spektrometer für die Standardproteine BSA, Lysozym und CalB. Anhand des linearen Bereichs werden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen berechnet [114].	50
4.9	Links ist das Chromatogramm der Bindungsexperimente dargestellt. Die Probenaufgabe betrug jeweils 5 mL mit 1 g/L BSA und 4,8 g/L Lysozym in 20 mM Phosphat-Puffer mit pH 7,0 an Sartobind® Q. Rechts ist das Gel der SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung gezeigt. Die Probenaufgabe betrug: 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) und jeweils 10 µL der Nullprobe (0), des Durchbruchs (003A1) und des Peaks (003A4 - 003B1) [114].	54
4.10	Normierte Durchbruchskurve von 4,9 g/L BSA an Sartobind® Q bei einer Flussrate von 5 mL/min [114].	55
4.11	Chromatogramm der Doppeldurchbruchskurve von 1 g/L BSA und 0,25 g/L Lysozym bei 5 mL/min an Sartobind® Q zur Bestimmung der Switching Conditions [114].	56
4.12	Links ist das Chromatogramm des ersten Zyklus vergrößert dargestellt. Rechts ist das Chromatogramm des PCC-Langzeitversuch mit 7 Zyklen zur Aufreinigung von BSA gezeigt. Aufreinigung von 1,7 L Proteinlösung aus 1 g/L BSA und 0,25 g/L Lysozym in 5,5 h. Feed-Volumenstrom: 2,5 mL/min, Puffer A und B: 8,6 mL/min [114].	59
4.13	Gel der SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung zum Langzeitversuch mit BSA und Lysozym. Dargestellt sind Zyklus 1 und Zyklus 6 im Vergleich. W: Waschschrift, P: Elution von BSA, MA: Membranadsorber. Auftrag von 5 µL der 0 Probe und Elution, 10 µL der Waschschrte und 3 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) [114].	60

4.14	Überlagerung der Durchbruchskurven der einzelnen Membranadsorber von Zyklus 1 und Zyklus 6 [114].	62
4.15	Links ist das Chromatogramm des Bindungsversuchs dargestellt. Die Probenaufgabe betrug 5 mL mit 0,15 g/L CalB in 20 mM Tris-HCl mit pH 8,5 an Sartobind® Q. Rechts ist das Gel der SDS-PAGE mit Silberfärbung gezeigt. Die Probenaufgabe betrug: 10 µL Probe und 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) [114].	65
4.16	Links ist das Chromatogramm der Stufenelution (20, 50, 100 % Elutionspuffer) abgebildet. Die Probenaufgabe betrug 5 mL mit 0,3 g/L CalB in 20 mM Tris-HCl mit pH 8,5 an Sartobind® Q. Rechts ist das Gel der SDS-PAGE mit Silberfärbung dargestellt. Die Probenaufgabe betrug: 10 µL Probe und 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) [114].	66
4.17	Links ist das Chromatogramm der Stufenelution (20, 50, 100 % Elutionspuffer) gezeigt. Die Probenaufgabe betrug 5 mL von 0,3 g/L CalB in Lysat an Sartobind® Q. Rechts ist das Gel der SDS-PAGE mit Silberfärbung dargestellt. Die Probenaufgabe betrug: 10 µL Probe und 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) [114].	67
4.18	Normierte Durchbruchskurve von 0,11 g/L CalB an Sartobind® Q bei einer Flussrate von 5 mL/min [114].	68
4.19	Chromatogramm der Doppeldurchbruchskurve von Lysat mit 0,150 g/L BFM und 0,3 g/L CalB in 20 mM Tris-HCl mit pH 8,5 an Sartobind® Q zur Bestimmung der Switching Conditions [114].	69
4.20	Links ist das Chromatogramm des ersten Zyklus vergrößert dargestellt. Rechts ist das Chromatogramm des PCC-Langzeitversuch mit 5 Zyklen zur Aufreinigung von CalB aus <i>E.-coli</i> -Lysat gezeigt. Aufreinigung von 0,9 L Feed-Lösung aus 0,15 g/L BFM und 0,3 g/L hinzugefügter CalB in 6 h. Feed-Volumenstrom: 2,5 mL/min und Puffer A und B: 8,6 mL/min [114].	72

4.21	Gel der SDS-PAGE mit Silberfärbung des Langzeitversuchs mit CalB. Dargestellt Zyklus 1 und Zyklus 5 im Vergleich. W: Waschschrift, E20: Elution von CalB bei 0,2 M NaCl (20 % Elutionspuffer), E100: Elution der Verunreinigungen bei 1 M NaCl (100 % Elutionspuffer), MA: Membranadsorber. Probenaufgabe von 10 μ L Probe und 5 μ L Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific) [114].	73
4.22	Überlagerung der Durchbruchkurven der einzelnen Membranadsorber von Zyklus 1 und Zyklus 5 [114].	74
A.1	Vektorkarte des Expressionsvektors pET-26b(+) von Novagen (USA). . .	89
B.1	Kalibrationsgeraden für Lysozym (0,0125 g/L - 0,75 g/L), CalB (0,0125 g/L - 0,2 g/L) und BSA (0,0125 g/L - 0,2 g/L).	93
B.2	Wachstumskurve von <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS in TB-Medium im 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen bei 37 °C und 180 rpm.	98

Tabellenverzeichnis

2.1	Vor- und Nachteile von kontinuierlichen Prozessen	7
2.2	Übersicht von Vor- und Nachteilen sowie Anwendungsbeispielen der PCC	15
2.3	Übersicht von publizierten One-Step Aufreinigungsstrategien von CalB	20
3.1	Übersicht der Eigenschaften der verschiedenen modifizierten Tiefenfilter [11]	26
4.1	Übersicht der verbauten Komponenten der PCC	43
4.2	Bauteileliste der Steuereinheit	44
4.3	Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) der Standard- proteine BSA, Lysozym und CalB für die UV-Messung bei 280 nm mit den STS-UV Spektrometern der PCC-Anlage	50
4.4	Ablauf der Phasen für die automatisierte Aufreinigung von BSA und Lysozym mit der PCC-Anlage	58
4.5	Gesamtproteinbestimmung nach Bradford der gesammelten fraktionier- ten Proben vom Waschen und der Elution. Vergleichend dargestellt Zy- klus 1 und Zyklus 6	61
4.6	Ablauf der Phasen für die automatisierte Aufreinigung von CalB aus Lysat mit der PCC-Anlage	70
4.7	Ergebnisse der Gesamtproteinanalytik nach Bradford und des Aktivi- tätsassays der ersten Elutionsstufe bei 0,2 M NaCl. Vergleichend darge- stellt sind Zyklus 1 und Zyklus 5	73
5.1	Vergleich der Aufreinigung von BSA mit der PCC-Anlage oder im Batch- Betrieb	78
5.2	Vergleich von publizierten One-Step Aufreinigungsstrategien von CalB mit der entwickelten Methode	79

5.3 Vergleich der Aufreinigung von CalB mit der PCC-Anlage oder im Batch-Betrieb	79
A.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben	81
A.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben	82
A.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben	83
A.3 Verwendete Geräte mit Herstellerangaben	83
A.3 Verwendete Geräte mit Herstellerangaben	84
A.4 Verwendete Software mit Herstellerangaben	84

Literaturverzeichnis

- [1] Jose Cleiton S. dos Santos, Oveimar Barbosa, Claudia Ortiz, Angel Berenguer-Murcia, Rafael C. Rodrigues, and Roberto Fernandez-Lafuente. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. *ChemCatChem*, 7(16):2413–2432, 2015.
- [2] Roger A. Sheldon and Sander van Pelt. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society reviews*, 42(15):6223–6235, 2013.
- [3] Mahesh Prashad and Klaus Tarrach. Depth filtration: Cell clarification of bioreactor offloads. *Filtration & Separation*, 43(7):28–30, 2006.
- [4] Benjamin Minow, Florian Egner, Franziska Jonas, and Bertille Lagrange. High-cell-density clarification by single-use diatomaceous earth filtration. *BioProcess International*, 12(4):2–9, 2014.
- [5] Adith Venkiteshwaran, Jace Fogle, Purbasa Patnaik, Ron Kowle, and Dayue Chen. Mechanistic evaluation of virus clearance by depth filtration. *Biotechnology progress*, 31(2):431–437, 2015.
- [6] Laborwasser akademie: Tiefenfilter.
- [7] Yinges Yigzaw, Robert Piper, Minh Tran, and Abhinav A. Shukla. Exploitation of the adsorptive properties of depth filters for host cell protein removal during monoclonal antibody purification. *Biotechnology progress*, 22(1):288–296, 2006.
- [8] H. R. Charlton, J. M. Relton, and N. K. Slater. Characterization of a generic

- monoclonal antibody harvesting system for adsorption of dna by depth filters and various membranes. *Bioseparation*, 8(6):281–291, 1999.
- [9] Benjamin Michen, Annegret Diatta, Johannes Fritsch, Christos Aneziris, and Thomas Graule. Removal of colloidal particles in ceramic depth filters based on diatomaceous earth. *Separation and Purification Technology*, 81(1):77–87, 2011.
- [10] Matthias Kraume. *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik: Grundlagen und apparative Umsetzungen*. VDI-Buch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2004.
- [11] Sarah Schreiber, Axel Thiefes, Ute Schuldt, Lars Dahne, Thomas Scheper, and Sascha Beutel. New application of depth filters for the immobilization of candida antarctica lipase b. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(2):599–607, 2017.
- [12] Mathias Ulbricht. Oberflächenmodifikationen. In Klaus Ohlrogge and Katrin Ebert, editors, *Membranen*. Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [13] Katharine B. Blodgett and Irving Langmuir. Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Physical Review*, 51(11):964–982, 1937.
- [14] G. Decher. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 277(5330):1232–1237, 1997.
- [15] Gero Decher and Jong-Dal Hong. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. 1. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, 46(1):321–327, 1991.
- [16] G. Decher and J. D. Hong. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: 2. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 95(11):1430–1434, 1991.
- [17] Claire S. Peyratout and Lars Dahne. Tailor-made polyelectrolyte microcapsules:

- from multilayers to smart containers. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 43(29):3762–3783, 2004.
- [18] Ramy A. Ghostine, Marie Z. Markarian, and Joseph B. Schlenoff. Asymmetric growth in polyelectrolyte multilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 135(20):7636–7646, 2013.
- [19] Guy Ladam, Pierre Schaaf, Frédéric J. G. Cuisinier, Gero Decher, and Jean-Claude Voegel. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. *Langmuir*, 17(3):878–882, 2001.
- [20] P. Bertrand, A. Jonas, A. Laschewsky, and R. Legras. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties. *Macromolecular rapid communications*, pages 319–348, 2000.
- [21] A. Delcorte, P. Bertrand, E. Wischerhoff, and A. Laschewsky. Adsorption of polyelectrolyte multilayers on polymer surfaces. *Langmuir*, 13(19):5125–5136, 1997.
- [22] Frank Caruso, Kenichi Niikura, D. Neil Furlong, and Yoshio Okahata. 2. assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing. *Langmuir*, 13(13):3427–3433, 1997.
- [23] Guy Ladam, Pierre Schaaf, Gero Decher, Jean Voegel, and Frederic J. G. Cuisinier. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. *Biomolecular engineering*, 19(2-6):273–280, 2002.
- [24] Matthew S. Croughan, Konstantin B. Konstantinov, and Charles Cooney. The future of industrial bioprocessing: batch or continuous? *Biotechnology and bioengineering*, 112(4):648–651, 2015.
- [25] Veena Warikoo, Rahul Godawat, Kevin Brower, Sujit Jain, Daniel Cummings, Elizabeth Simons, Timothy Johnson, Jason Walther, Marcella Yu, Benjamin Wright, Jean McLarty, Kenneth P. Karey, Chris Hwang, Weichang Zhou, Frank Riske, and Konstantin Konstantinov. Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins. *Biotechnology and bioengineering*, 109(12):3018–3029, 2012.

- [26] Anurag S. Rathore, Harshit Agarwal, Abhishek Kumar Sharma, Mili Pathak, and S. Muthukumar. Continuous processing for production of biopharmaceuticals. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 45(8):836–849, 2015.
- [27] Andrew L. Zydney. Perspectives on integrated continuous bioprocessing—opportunities and challenges. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 10:8–13, 2015.
- [28] Eric S. Langer and Ronald A. Rader. Introduction to continuous manufacturing: Technology landscape and trends. *Continuous Bioprocessing: Current Practice and Future Potential*, pages 3–8, 2013.
- [29] Petra Gronemeyer, Reinhard Ditz, and Jochen Strube. Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. *Bioengineering*, 1(4):188–212, 2014.
- [30] C. R. Lowe, A. R. Lowe, and G. Gupta. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3):561–574, 2001.
- [31] Alois Jungbauer. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. *Trends in Biotechnology*, 31(8):479–492, 2013.
- [32] Jürgen Wolfgang and Adalbert Prior. Continuous annular chromatography. In Ruth Freitag, editor, *Modern Advances in Chromatography*, Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. Springer, Berlin, 2002.
- [33] Rahul Godawat, Kevin Brower, Sujit Jain, Konstantin Konstantinov, Frank Riske, and Veena Warikoo. Periodic counter-current chromatography – design and operational considerations for integrated and continuous purification of proteins. *Biotechnology journal*, 7(12):1496–1508, 2012.
- [34] A. J. P. Martin. Summarizing paper. *Discussions of the Faraday Society*, 7:332–336, 1949.
- [35] Andrea Uretschlager and Alois Jungbauer. Preparative continuous annular chro-

- matography (p-cac), a review. *Bioprocess and biosystems engineering*, 25(2):129–140, 2002.
- [36] Andrew L. Zydney. Continuous downstream processing for high value biological products: A review. *Biotechnology and bioengineering*, 113(3):465–475, 2016.
- [37] Frank Hilbrig and Ruth Freitag. Continuous annular chromatography. *Journal of Chromatography B*, 790(1-2):1–15, 2003.
- [38] P. E. Barker and S. Bridges. Continuous annular chromatography for the separation of beet molasses. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 51(3):347–359, 1991.
- [39] H. J. Bart, R. C. Messenböck, C. H. Byers, A. Prior, and J. Wolfgang. Continuous chromatographic separation of fructose, mannitol and sorbitol. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 35(6):459–471, 1996.
- [40] Charles H. Byers, Warren G. Sisson, Joseph P. DeCarli, and Giorgio Carta. Sugar separations on a pilot scale by continuous annular chromatography. *Biotechnology progress*, 6(1):13–20, 1990.
- [41] Berndt Finke, Bernd Stahl, Markus Pritschet, Dirk Facius, Jurgen Wolfgang, and Guenther Boehm. Preparative continuous annular chromatography (p-cac) enables the large-scale fractionation of fructans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17):4743–4748, 2002.
- [42] J. Wolfgang, A. Prior, H. J. Bart, R. C. Messenböck, and C. H. Byers. Continuous separation of carbohydrates by ion-exchange chromatography. *Separation Science and Technology*, 32(1-4):71–82, 1997.
- [43] Joseph P. de Carli, Giorgio Carta, and Charles H. Byers. Displacement separations by continuous annular chromatography. *AIChE Journal*, 36(8):1220–1228, 1990.
- [44] Takuya Fukumura, Vinay M. Bhandari, Akio Kitakawa, and Toshikuni Yonemoto. Complete separation of ternary mixture of amino acids using continuous

- rotating annular chromatography with partial recycling of effluent. *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN*, 33(5):778–784, 2000.
- [45] Youichi Takahashi and Shigeo Goto. Continuous separations of amino acids by using an annular chromatograph with rotating inlet and outlet. *Separation Science and Technology*, 26(1):1–13, 1991.
- [46] R. Giovannini and R. Freitag. Continuous isolation of plasmid dna by annular chromatography. *Biotechnology and bioengineering*, 77(4):445–454, 2002.
- [47] Gene F. Bloomingburg and Giorgio Carta. Separation of protein mixtures by continuous annular chromatography with step elution. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 55(1-2):B19–B27, 1994.
- [48] A. Buchacher, G. Iberer, A. Jungbauer, H. Schwinn, and D. Josic. Continuous removal of protein aggregates by annular chromatography. *Biotechnology progress*, 17(1):140–149, 2001.
- [49] R. Giovannini and R. Freitag. Isolation of a recombinant antibody from cell culture supernatant: Continuous annular versus batch and expanded-bed chromatography. *Biotechnology and bioengineering*, 73(6):522–529, 2001.
- [50] Günter Iberer, Horst Schwinn, Djuro Josić, Alois Jungbauer, and Andrea Buchacher. Improved performance of protein separation by continuous annular chromatography in the size-exclusion mode. *Journal of chromatography. A*, 921(1):15–24, 2001.
- [51] K. Reissner, A. Prior, J. Wolfgang, H. J. Bart, and C. H. Byers. Preparative desalting of bovine serum albumin by continuous annular chromatography. *Journal of chromatography. A*, 763(1-2):49–56, 1997.
- [52] Andrea Uretschläger, Adelheid Einhauer, and Alois Jungbauer. Continuous separation of green fluorescent protein by annular chromatography. *Journal of chromatography. A*, 908(1-2):243–250, 2001.
- [53] Jens H. Vogel, Huong Nguyen, Markus Pritschet, Richard van Wegen, and Kon-

- stantin Konstantinov. Continuous annular chromatography: General characterization and application for the isolation of recombinant protein drugs. *Biotechnology and bioengineering*, 80(5):559–568, 2002.
- [54] Friederike Sander and Matthias Lübbert. Simulated moving bed chromatographie ein kontinuierliches chromatographieverfahren. *News Analytik*, pages 1–7, 2011.
- [55] Markus Juza, Marco Mazzotti, and Massimo Morbidelli. Simulated moving-bed chromatography and its application to chirotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18(3):108–118, 2000.
- [56] Donald B. Broughton and Clarence G. Gerhold. Continuous sorption process employing fixed bed of sorbent and moving inlets and outlets. *United States Patent 2,985,589*, 1961.
- [57] Arvind Rajendran, Galatea Paredes, and Marco Mazzotti. Simulated moving bed chromatography for the separation of enantiomers. *Journal of chromatography. A*, 1216(4):709–738, 2009.
- [58] Sabine Imamoglu. Simulated moving bed chromatography (smb) for application in bioseparation. In Ruth Freitag, editor, *Modern Advances in Chromatography, Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. Springer, Berlin, 2002.
- [59] Douglas M. Ruthven and C. B. Ching. Counter-current and simulated counter-current adsorption separation processes. *Chemical Engineering Science*, 44(5):1011–1038, 1989.
- [60] Roger-Marc Nicoud, Géraldine Fuchs, Philippe Adam, Michel Bailly, Ernst Küsters, Firoz D. Antia, Robert Reuille, and Emil Schmid. Preparative scale enantioseparation of a chiral epoxide: Comparison of liquid chromatography and simulated moving bed adsorption technology. *Chirality*, 5(4):267–271, 1993.
- [61] Kenji Hashimoto, Shuji Adachi, and Yoshihito Shirai. Continuous desalting of proteins with a simulated moving-bed adsorber. *Agriculture and Biological Chemistry*, 52(9):2161–2167, 1988.

- [62] D. A. Horneman, M. Ottens, J. T. F. Keurentjes, and L. A. M. van der Wielen. Micellar gradients in size-exclusion simulated moving bed chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1113(1-2):130–139, 2006.
- [63] D. A. Horneman, M. Ottens, L. A. M. van der Wielen, and J. T. F. Keurentjes. Viral clearance using surfactant-aided size-exclusion chromatography. *AIChE Journal*, 53(6):1441–1449, 2007.
- [64] Lars Christian Kessler, Ludmila Gueorguieva, Ursula Rinas, and Andreas Seidel-Morgenstern. Step gradients in 3-zone simulated moving bed chromatography. application to the purification of antibodies and bone morphogenetic protein-2. *Journal of chromatography. A*, 1176(1-2):69–78, 2007.
- [65] Martin Wellhoefer, Wolfgang Sprinzl, Rainer Hahn, and Alois Jungbauer. Continuous processing of recombinant proteins: Integration of inclusion body solubilization and refolding using simulated moving bed size exclusion chromatography with buffer recycling. *Journal of chromatography. A*, 1319:107–117, 2013.
- [66] Giorgio Carta and Ernie X. Perez-Almodovar. Productivity considerations and design charts for biomolecule capture with periodic countercurrent adsorption systems. *Separation Science and Technology*, 45(2):149–154, 2010.
- [67] Marc Bisschops. Bio smb TM technology: Continuous countercurrent chromatography enabling a fully disposable process. In Ganapathy Subramanian, editor, *Biopharmaceutical Production Technology*, pages 769–791. Wiley-VCH, s.l., 2012.
- [68] Mattias Bryntesson, Martin Hall, and Karol Lacki. Chromatography method. *United States Patent 7,901,581 B2*, 2011.
- [69] Fabian Steinebach, Thomas Muller-Spath, and Massimo Morbidelli. Continuous counter-current chromatography for capture and polishing steps in biopharmaceutical production. *Biotechnology journal*, 11(9):1126–1141, 2016.
- [70] M. Schulte and J. Strube. Preparative enantioseparation by simulated moving bed chromatography. *Journal of chromatography. A*, 906(1-2):399–416, 2001.

- [71] Ekta Mahajan, Anupa George, and Bradley Wolk. Improving affinity chromatography resin efficiency using semi-continuous chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1227:154–162, 2012.
- [72] James Pollock, Glen Bolton, Jon Coffman, Sa V. Ho, Daniel G. Bracewell, and Suzanne S. Farid. Optimising the design and operation of semi-continuous affinity chromatography for clinical and commercial manufacture. *Journal of chromatography. A*, 1284:17–27, 2013.
- [73] Daniel Baur, Monica Angarita, Thomas Müller-Späth, Fabian Steinebach, and Massimo Morbidelli. Comparison of batch and continuous multi-column protein a capture processes by optimal design. *Biotechnology journal*, 11(7):920–931, 2016.
- [74] Ron Gillespie, Thao Nguyen, Sean Macneil, Laurie Jones, Shon Crampton, and Suresh Vunnum. Cation exchange surface-mediated denaturation of an aglycosylated immunoglobulin (igg1). *Journal of chromatography. A*, 1251:101–110, 2012.
- [75] Adrian M. Gospodarek, Diana E. Hiser, John P. O’Connell, and Erik J. Fernandez. Unfolding of a model protein on ion exchange and mixed mode chromatography surfaces. *Journal of chromatography. A*, 1355:238–252, 2014.
- [76] Nikhil Kateja, Harshit Agarwal, Vishwanath Hebhi, and Anurag S. Rathore. Integrated continuous processing of proteins expressed as inclusion bodies: Gcsf as a case study. *Biotechnology progress*, 2016.
- [77] G.A. Heeter and A.I. Liapis. Perfusion chromatography: performance of periodic countercurrent column operation and its comparison with fixed-bed operation. *Journal of Chromatography A*, 711(1):3–21, 1995.
- [78] Sharmista Chatterjee. *Fda perspective on continuous manufacturing*, 2012.
- [79] Bharat V. Bhut, Kenneth A. Christensen, and Scott M. Husson. Membrane chromatography: protein purification from e. coli lysate using newly designed and commercial anion-exchange stationary phases. *Journal of chromatography. A*, 1217(30):4946–4957, 2010.

- [80] Stefan Fischer-Frühholz. Membranadsorber: Schneller am Ziel in der Biochromatographie. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, pages 2–4, 2004.
- [81] Stefan Fischer-Frühholz. Membranadsorber: Chromatographiesche aufreinigung in neuen Dimensionen. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, 2004.
- [82] R. R. Deshmukh, T. N. Warner, F. Hutchison, M. Murphy, W. E. 2nd Leitch, P. de Leon, G. S. Srivatsa, D. L. Cole, and Y. S. Sanghvi. Large-scale purification of antisense oligonucleotides by high-performance membrane adsorber chromatography. *Journal of chromatography. A*, 890(1):179–192, 2000.
- [83] Charbel Haber, Jonathan Skupsky, Ann Lee, and Russ Lander. Membrane chromatography of DNA: Conformation-induced capacity and selectivity. *Biotechnology and bioengineering*, 88(1):26–34, 2004.
- [84] Heather L. Knudsen, Robert L. Fahrner, Yuan Xu, Lenore A. Norling, and Gregory S. Blank. Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification. *Journal of Chromatography A*, 907(1-2):145–154, 2001.
- [85] Michael Phillips, Jason Cormier, Jennifer Ferrence, Chris Dowd, Robert Kiss, Herbert Lutz, and Jeffrey Carter. Performance of a membrane adsorber for trace impurity removal in biotechnology manufacturing. *Journal of chromatography. A*, 1078(1-2):74–82, 2005.
- [86] Joe X. Zhou, Tim Tressel, Uwe Gottschalk, Felix Solamo, Andre Pastor, Shinta Dermawan, Tony Hong, Oscar Reif, Jeff Mora, Fred Hutchison, and Michael Murphy. New q membrane scale-down model for process-scale antibody purification. *Journal of chromatography. A*, 1134(1-2):66–73, 2006.
- [87] Tatiana B. Tennikova and Frantisek Svec. High-performance membrane chromatography: Highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed-phase modes. *Journal of Chromatography A*, 646(2):279–288, 1993.
- [88] Stefan Fischer-Frühholz, Dave Zhou, and Miyako Hirai. Sartobind stic® salt-tolerant membrane chromatography. *Nature methods*, 7:12–13, 2010.

- [89] Uwe Gottschalk. Bioseparation in antibody manufacturing: The good, the bad and the ugly. *Biotechnology progress*, 24(3):496–503, 2008.
- [90] J. Uppenberg and T. A. Jones. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase b from candida antarctica. *Structure*, 2(4):293–308, 1994.
- [91] Peter Trodler. Untersuchung von lipasen - elektrostatik, selektivität und einfluss von lösungsmitteln auf struktur und dynamik.
- [92] Emily M. Anderson, Karin M. Larsson, and Ole Kirk. One biocatalyst—many applications: The use of candida antarctica b-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16(3):181–204, 2009.
- [93] Peter Trodler, Jens Nieveler, Monika Rusnak, Rolf D. Schmid, and Jurgen Pleiss. Rational design of a new one-step purification strategy for candida antarctica lipase b by ion-exchange chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1179(2):161–167, 2008.
- [94] Vicente Gotor-Fernández, Rosario Brieva, and Vicente Gotor. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40(3-4):111–120, 2006.
- [95] Ralf Günter Berger, editor. *Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Berlin and Heidelberg, 2007.
- [96] Maurice C. R. Franssen, Laura Alessandrini, and Giancarlo Terraneo. Biocatalytic production of flavors and fragrances. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 2005.
- [97] Zi Jin, Janvier Ntwali, Shuang-Yan Han, Sui-Ping Zheng, and Ying Lin. Production of flavor esters catalyzed by calb-displaying pichia pastoris whole-cells in a batch reactor. *Journal of biotechnology*, 159(1-2):108–114, 2012.
- [98] Monica Lopez-Garcia, Ignacio Alfonso, and Vicente Gotor. Highly efficient biocatalytic resolution of cis- and trans-3-aminoindan-1-ol: Syntheses of enantiopure

- orthogonally protected cis- and trans-indane-1,3-diamine. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 10(12):3006–3014, 2004.
- [99] Carlos R. Llerena-Suster, Laura E. Briand, and Susana R. Morcelle. Analytical characterization and purification of a commercial extract of enzymes: a case study. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 121:11–20, 2014.
- [100] Hongyan Yao, Tian Zhang, Hongwei Xue, Kexuan Tang, and Rongxiu Li. Biomimetic affinity purification of candida antarctica lipase b. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 879(32):3896–3900, 2011.
- [101] Ayana Ujiie, Hideo Nakano, and Yugo Iwasaki. Extracellular production of pseudozyma (candida) antarctica lipase b with genuine primary sequence in recombinant escherichia coli. *Journal of bioscience and bioengineering*, 121(3):303–309, 2016.
- [102] P. Jollès. Recent developments in the study of lysozymes. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 3(1):28–36, 1964.
- [103] P. Jollès. Lysozymes: A chapter of molecular biology. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 8(4):227–294, 1969.
- [104] M. Sugahara, T. Nakane, M. Suzuki, and E. Nango. CRYSTAL STRUCTURE OF HEN EGG-WHITE LYSOZYME. 2015.
- [105] Karolina A. Majorek, Przemyslaw J. Porebski, Arjun Dayal, Matthew D. Zimmerman, Kamila Jablonska, Alan J. Stewart, Maksymilian Chruszcz, and Wlodek Minor. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular immunology*, 52(3-4):174–182, 2012.
- [106] Theodore Peters. *All about albumin: Biochemistry, genetics, and medical applications*. Academic Press, San Diego, 1996.
- [107] Fahimeh Jalali, Parisa S. Dorraji, and Hamid Mahdiuni. Binding of the neuroleptic drug, gabapentin, to bovine serum albumin: Insights from experimental and computational studies. *Journal of Luminescence*, 148:347–352, 2014.

- [108] K. A. Majorek, P. J. Porebski, M. Chruszcz, S. C. Almo, and W. Minor. *Crystal structure of Bovine Serum Albumin*. 2012.
- [109] Tamara Topala, Andreea Bodoki, Luminita Oprean, and Radu Oprean. Bovine serum albumin interactions with metal complexes. *Clujul medical (1957)*, 87(4):215–219, 2014.
- [110] Tangir Ahamed, Beckley K. Nfor, Peter D. E. M. Verhaert, Gijs W. K. van Dedem, Luuk A. M. van der Wielen, Michel H. M. Eppink, Emile J. A. X. van de Sandt, and Marcel Ottens. ph-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations. *Journal of chromatography. A*, 1164(1-2):181–188, 2007.
- [111] Agatha Bastida, Pilar Sabuquillo, Pilar Armisen, Roberto Fernández-Lafuente, Joan Huguet, and José M. Guisán. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(5):486–493, 1998.
- [112] Anna Trusek-Holownia and Andrzej Noworyta. Catalytic membrane preparation for enzymatic hydrolysis reactions carried out in the membrane phase contactor. *Desalination*, 144(1-3):427–432, 2002.
- [113] Silvia Cesarini, Belen Infanzon, F. I. Javier Pastor, and Pilar Diaz. Fast and economic immobilization methods described for non-commercial pseudomonas lipases. *BMC biotechnology*, 14:27, 2014.
- [114] Chantal Brämer. Periodic counter-current chromatographie – kontinuierliche chromatographie von modellproteinen mit membranadsorbern: Masterarbeit. 2017.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Sarah Schreiber
Geburtsdatum	25.11.1987
Geburtsort	Hamburg
Nationalität	Deutsch

Ausbildung

seit 02.2014	Promotionsstudium Chemie, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
2011 - 2013	Masterstudium Pharmaceutical Biotechnology, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
2008 - 2011	Bachelorstudium Biotechnologie, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
1998 - 2007	Allgemeine Hochschulreife , Gymnasium Glinde