

ZENTRUM ANGEWANDTE CHEMIE

**Institut für Technische Chemie
der Universität Hannover**

Neue Membrantechnologien zur Isolierung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke – Methodenentwicklung für den industriellen Einsatz

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegte und genehmigte Dissertation
von

Dipl. Chem. Torsten Weiß
geboren am 16.09.1970 in Hannover

Hannover, November 1999

Hauptreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl

Prüfungstermin: 13.12.1999

Ich versichere hiermit an Eides Statt, daß ich die Dissertation selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuelle zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, November 1999

Torsten Weiß

Curriculum vitae

Name: **Torsten Weiß**
Geburtsdatum: 16. September 1970
Geburtsort: Hannover
Eltern: Heinz Weiß, Buchhalter
Gudrun Kasimir, geb. Streich, gesch. Weiß, Detailkonstrukteurin
Familienstand ledig

Schulbildung:

- 1977 - 1981 Grundschule Comeniuschule, Hannover
- 1981 - 1983 Orientierungsstufe Edenstraße, Hannover
- 1983 - 1990 Leibnizgymnasium, Hannover
mit Abitur abgeschlossen, Note 2,8

Wehrdienst:

- 07/90 - 09/91 4. Pz.Btl. 333 in Celle/Scheuen

Hochschulausbildung:

- 10/91 - 01/97 Studiengang Chemie (Diplom) am Fachbereich Chemie, Universität Hannover
- 01/97 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie: Untersuchung zur analytischen Bestimmung von Human- und Maus Immunoglobulin G mit dem Kapillaren Mikroreaktor-Immunoassay in der Kapillarelektrophorese
Hauptreferent: Prof. Dr. T. Scheper, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
Korreferent: Prof. em. Dr. Dr. h.c. K. Schügerl, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
Note: 1,3; Gesamtnote: 1,9
- seit 02/97 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie, Zentrum Angewandte Chemie, Universität Hannover, Prof. Dr. T. Scheper

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von Februar 1997 bis Oktober 1999 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper, dem ich für die gute Betreuung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen danke.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich ganz herzlich Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl.

Dr. Roland Ulber möchte ich für die Unterstützung dieser Arbeit und die zahlreichen Anregungen danken.

Dr. Heinrich Buchholz und Dr. Wolfgang Demmer danke ich für die stets hilfsbereite Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Peter Riechel und Martina Weiß für ihre stete Hilfsbereitschaft und die kritischen und kreativen Anmerkungen. Und auch dafür, daß ich das Labor und die HPLC so oft belagert habe.

Ingrid Langwost, Miriam Menge und Dirk Kosemund danke ich für die unermüdliche und stets gründlichste Korrektur dieser und anderer Arbeiten.

Kerstin Plate, Volker Steinmann, Dirk Kosemund und Michael Walden danke ich für die gute Zusammenarbeit und Ihre hervorragenden Arbeiten auf dem Molke-Gebiet.

Klaus, Eddi und Harti danke ich für die prompte Unterstützung bei der Bewältigung diverser Computer-GAU's.

Allen Münsteraner und Hannoverschen Biotechnologen danke ich für die freundliche Aufnahme, die gute Stimmung während der Arbeit und speziell bei allen TREKKIES für täglichen Klatsch und Tratsch.

Claudia, Katja, Karen, Miriam, Thorsten, Michael gilt mein Dank für all die gemütlichen Abende und Tage während des gesamten Studiums.

Auch den Tischtennis-Kameraden danke ich für die Abwechslung vom Molke-Alltag durch Spiel, Spaß und Spannung (und Bier).

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeder Art und Weise während des Studiums unterstützt haben und ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre.

Auch bei meiner Freundin Manuela, die mir während der ganzen Arbeit zur Seite gestanden und für viel Abwechslung gesorgt hat, möchte ich mich besonders bedanken.

Schlagwörter: Lactoferrin, Membran-adsorber, Molke

keywords: lactoferrin, membrane adsorber, whey

I Abstract

Der wachsende Bedarf an biotechnologischen Erzeugnissen und isolierten Naturstoffen erfordert eine stetige Verbesserung bestehender Produktionsverfahren und eine intensive Erforschung neuer Isolierungstechniken. Eine möglichst vollständige Verwertung der Reststoffe aus landwirtschaftlichen Erzeugnissen, wie Molke oder Melasse, gewinnt dabei zunehmend an Bedeutung. Gleichzeitig müssen schnelle und automatisierbare Produktkontrollsysteme entwickelt werden, um eine kontinuierliche Prozeßüberwachung und -steuerung zu gewährleisten.

Für den Einsatz der HPLC als Referenzanalytik wird eine Methode entwickelt, mit der der Lactoferringehalt innerhalb von 8 - 10 Minuten bestimmt werden kann. Ein Vergleich mit dem zeitlich sehr aufwendigen ELISA zeigt, daß die HPLC Minderbefunde bis 25 %, in einem Fall auch bis 40 %, quantifiziert. Im Gegensatz dazu, zeigen chromatographische Verfahren mit Membranadsorbern und die 2D-Fluoreszenzspektroskopie deutliche Höherbefunde mit Abweichung zwischen 120 und 250 %. Bei geringen bLF-Gehalten in den Proben liegen die Streuungen mit bis zu 350 % noch deutlich höher, da Lactoperoxidase in der Probenvorbehandlung nicht eliminiert wird. Vorteilhaft an diesem Verfahren ist aber die kurze Analysendauer von weniger als 60 Sekunden, die bei weiterer Methodenoptimierung eine Prozeßsteuerung ermöglicht.

Für die Molkenfiltration werden Membranen mit Porengrößen von 0,1 bis 5,0 µm untersucht. Der Bereich 0,65 – 1,2 µm wird dabei bis zum Scale Up in die große Technikumsstufe näher charakterisiert. Die geringsten Retentionen von Lactoferrin werden mit 10 bzw. ca. 5 % bei den 0,8 und 1,2 µm Membranen erreicht. Durch eine Anlagenoptimierung können die Standzeiten und die Flußraten der Filtrationsmodule erhöht werden, die mittlere Flußrate liegt mit 91 L/m²h bei der 0,8 µm Membran um etwa 30 % über der der 1,2 µm Membran (68 L/m²h). Für die Reinigung der Kassetten wird eine

Increasing requirements of biotechnological products and purified natural compounds lead to high investigations on established processes and enormous research on newer isolation techniques. The refining of by-products, especially whey and molasses in food technology, is of great importance for the industry not only to isolate high value minor compounds but also to minimize costs of waste water treatment. On the other hand, fast, specific and highly automated analytical methods are needed for inprocess controlling to allow continuous and economic production.

In the present work, a reference analytic is established on a HPLC system using cation exchange chromatography column. The determination of lactoferrin is possible in 8 to 10 minutes. In comparison to time intensive ELISA measurements, the HPLC data shows lower quantifications around 25 %, in one case up to 40 %. The use of membrane adsorbers on LPLC systems and 2D-fluorescence spectroscopy measures much higher lactoferrin concentrations ranging between 100 and 250 %. In samples with low amounts of lactoferrin extreme variations up to 350 % in the analysis are determined indicating parts of lactoperoxidase remaining in sample pretreatment. In spite of this the fluorescence spectroscopy has the greatest potential for inprocess controlling. A determination of lactoferrin is possible in less than 60 seconds.

A pretreatment of sweet whey is necessary to prevent plugging of membrane adsorber modules. Crossflow microfiltration membranes with pore size ranging from 0.65 to 1.2 µm are investigated for this purpose. The lowest retentions of lactoferrin are obtained with 0.8 (10 %) and 1.2 µm (5 %) membranes. Optimization of the crossflow system allows establishment of an uniform transmembrane pressure for higher permeate fluxes and longer filtration times. The combination of a 1.2 and 0.8 µm filtration for whey shows mean permeate fluxes between 68 and 91 L/m²h. For effective cleaning

Einstufen-Reinigungsmethode entwickelt, mit der die Wasserflüsse zu über 80 % wiederhergestellt werden können.

Die Isolierung des Lactoferrins erfolgt über (Spiral-)Wickelmodule, die in den Untersuchungen vollständig charakterisiert werden. Die (geschwindigkeitsunabhängige) dynamische Kapazität der Adsorber beträgt 0,2 mg bLF/cm²; in zahlreichen Optimierungsversuchen wird der Stufengradient für die Elution mit 0,1, 0,175 und 1,0 M NaCl festgelegt. Dadurch kann eine gute Trennung der kationischen Proteine Lactoferrin und Lactoperoxidase erreicht werden, wobei die Lactoperoxidase nur als Nebenprodukt gewonnen wird (etwa $\frac{1}{45}$ der bLF-Menge). Insgesamt kann mit dieser Methode eine bLF-Ausbeute von 84 % (bezogen auf die dynamische Kapazität) bei einer Reinheit > 95 % erreicht werden.

Im abschließenden Downstreaming-Prozeß wird eine direkte Lactoferrin-Gewinnung aus den salzhaltigen Eluaten vorgestellt, bei der eine nahezu quantitative Fällung mit Ethanol (vierfaches Eluatvolumen) oder Aceton (anderthalbfaches Eluatvolumen) erreicht wird. Die biologische Aktivität des Lactoferrins bleibt dabei vollständig erhalten. Im Gegensatz dazu, wird bei der Aussalzung mit Ammoniumsulfat ein hoher Salzanteil (75 %) mitgefällt, wodurch eine Erniedrigung der Aktivität zu verzeichnen ist. Als wirtschaftlichere Alternative wird die indirekte Gewinnung vorgezogen, bei der das Eluat zunächst mit Ultrafiltration (30 kDa MWCO) entsalzt und das Konzentrat anschließend mit Gefrier- oder Sprühtrocknung aufgearbeitet wird. Hier wird ebenfalls kein Verlust der Aktivität des Lactoferrins festgestellt, die minimale Wirkkonzentration liegt unter 25 µM bLF/L.

Eine weitere Wertschöpfung wird durch enzymatischen Verdau des Lactoferrins mit Pepsin und die Isolierung des aktiven Peptids Lactoferricin erreicht. Es wird eine Membranadsorbermethode präsentiert, mit der eine Trennung von den übrigen Fragmenten unter Verwendung 0,4 M NaCl- und 2,0 M NH₄Cl-Lösung möglich ist; die Ausbeute an Lactoferricin beträgt 75 % und die minimale Wirkkonzentration < 4 µM/L.

of the modules a one-step method is presented, which reinitiate the water flux of the system up to 80 %.

The spirally wounded strong cation exchange modules are fully characterised by several investigations. The dynamic capacity of the modules is determined to be 0.2 mg bLF/cm² and elution gradient is fixed by three steps at 0.1, 0.175 and 1.0 M sodium chloride solution. A good separation between lactoferrin and impurities like lactoperoxidase and β-lactoglobulin is given under these conditions. Lactoperoxidase is only a by-product of the isolation step. The main fraction thereof elutes within the first gradient, whereas lactoferrin is in the final eluate. In comparison to the dynamic binding capacity an overall yield of 84 % of the lactoferrin is obtained, the purity of the protein being more than 95 %.

One method to get the drug substance out of the eluate is the precipitation of lactoferrin using organic solvents like ethanol and acetone. A nearly quantitative precipitation is obtained by the use of fourfold volume of ethanol or 1.5fold volume of acetone. The minimal inhibitory concentration determined in growth inhibition tests is less than 25 µM/L. In contrast, a salting out by ammonium sulphate results in a loss of biological activity of lactoferrin. Additionally HPLC data shows a protein-salt ratio of 1 : 3 in the precipitate. More economically to the precipitation of drug substance is an ultrafiltration of the eluates and freeze drying or spray drying of the concentrate. Also, a loss of activity is not obtained by this method. The prevention of bacterial infection against all kind of microorganisms is important for pharmaceutical applications and baby food products.

The enzymatic digestion of lactoferrin with pepsin and the isolation of the active peptide with membrane adsorber technology is presented in this work. A yield of 75 % of the peptide lactoferricin can be isolated by a two step gradient with 0.4 M sodium chloride and 2.0 M ammonium chloride solutions. The MIC of lactoferricin (< 4 µM/L) is much lower than that of lactoferrin.

II	Inhaltsverzeichnis	
I	Abstract	I
II	Inhaltsverzeichnis	III
III	Abkürzungsverzeichnis	V
1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Theorie	4
2.1	MOLKE	4
2.1.1	Majore Molkenproteine	5
2.1.2	Minore Molkenproteine	6
2.1.2.1	Lactoferrin	6
2.1.3	Verarbeitung und Verwendung von Molke	8
2.2	LACTOFERRIN-GEWINNUNG	10
2.2.1	Crossflow-Filtration.....	11
2.2.1.1	Membranfouling	13
2.2.1.2	Hagen-Poiseuille-Gesetz	13
2.2.1.3	Massen-Transfer-Modell	15
2.2.1.4	Widerstandsmodell	17
2.2.2	Membranadsorber	18
3	Ergebnisse	19
3.1	PROZEBEGLEITENDE ANALYTIK	19
3.1.1	HPLC	20
3.1.1.1	Methodenentwicklung.....	20
3.1.1.2	Methodenoptimierung.....	25
3.1.2	Alternative Analysenverfahren	26
3.1.2.1	ELISA	26
3.1.2.2	Kapillarelektrophorese	27
3.1.2.3	Membranadsorber	29
3.1.2.4	2D-Fluoreszenz	31
3.1.2.5	Lactoperoxidase-Assay	33
3.1.2.6	SDS-PAGE	33
3.1.2.7	MALDI-MS	37
3.1.2.8	Vergleich der Analysenverfahren	39
3.2	MOLKENFILTRATION	42
3.2.1	Alternative Filtrationsverfahren	44
3.2.1.1	Dead End-Filtration	44
3.2.1.2	Hohlfaserfiltration	46

3.2.2	Crossflow-Filtration.....	48
3.2.2.1	Labormaßstab.....	48
3.2.2.1.1	Auswahl der Prozeßparameter.....	48
3.2.2.1.2	Membranauswahl.....	51
3.2.2.1.3	Reinigung der Membranen.....	53
3.2.2.2	Kleine Technikumsstufe – Sartoco [®] Mini.....	56
3.2.2.2.1	Reinigung der Module.....	60
3.2.2.3	Große Technikumsstufe – Sartoco [®] II.....	60
3.3	ISOLIERUNG VON LACTOFERRIN.....	66
3.3.1	Labormaßstab – Sartobind [®] S100.....	66
3.3.1.1	Integritätstest und dynamische Kapazität.....	67
3.3.2	Kleine Technikumsstufe – Wickelmodul S02k-15-6.....	69
3.3.2.1	Integritätstest und dynamische Kapazität.....	70
3.3.2.2	Festlegung der Elutionsbedingungen.....	73
3.3.3	Große Technikumsstufe – Wickelmodul S05k-15-12.....	75
3.3.3.1	Integritätstest und dynamische Kapazität.....	76
3.3.3.2	Auftragungsverhalten.....	77
3.3.3.3	Elution und Bilanzierung.....	78
3.4	LACTOFERRIN-DOWNSTREAMING.....	80
3.4.1	Eluataufarbeitung.....	80
3.4.1.1	Direkte Lactoferrin-Gewinnung.....	80
3.4.1.2	Indirekte Lactoferrin-Gewinnung.....	83
3.4.2	Veredelung zu Lactoferricin.....	85
3.4.2.1	Herstellung von Lactoferricin.....	86
3.4.2.2	Isolierung von Lactoferricin.....	88
3.4.3	Produktcharakterisierung.....	90
3.4.3.1	Lactoperoxidase.....	90
3.4.3.2	Lactoferrin.....	91
3.4.3.2.1	Biologische Aktivität.....	93
3.4.3.3	Lactoferricin.....	96
3.4.3.3.1	Biologische Aktivität.....	96
3.5	PROZEBBEWERTUNG.....	97
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	102
5	Anhang.....	107
6	Literaturverzeichnis.....	124

III Abkürzungsverzeichnis

AA	Amino Acid
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6))
AC	Aceton
ACE	Affinitäts-Kapillarelektrophorese
AS	Aminosäure
bLF	Bovine Lactoferrin
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Celluloseacetat
CE	Kapillarelektrophorese
CFU	Colony Forming Units
CN	Cellulosenitrat
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DHB	1,4-Dihydroxybenzoesäure
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Em	Emission
ES	Einzelchüsse
Ex	Exzitation
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GF	Gelfiltration
GMP	Good Manufacturing Practice
HIC	Hydrophobe Interaktions Chromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Hydrosart®
IA	Ionenaustausch
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ion Exchange
IPC	Inprocess Control
α -LA	α -Lactalbumin
β -LG	β -Lactoglobulin

LF	Lactoferrin
LFcin	Lactoferricin
LFcinH	Human Lactoferricin
LFcinB	Bovine Lactoferricin
LP	Lactoperoxidase
LPLC	Low Pressure Liquid Chromatography
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation- Mass Spectrometry
MF	Mikrofiltration
MIC	Minimal Inhibitory Concentration (Minimale Hemmkonzentration)
MMB	Mineral Medium Brunner
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NaP-Puffer	Natriumphosphat-Puffer
NF	Nanofiltration
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
QS	Qualitätssicherung
RM	Reinigungsmethode
RO	Reverse Osmose
RP	Reversed Phase
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TCA	Trichloressigsäure
TF	Transferrin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of Flight
TMP	Transmembrane Pressure (Transmembrandruck)
TQM	Total Quality Management
UF	Ultrafiltration
UTMP	Uniform Transmembrane Pressure
VCR	Volume Concentration Ratio
WHO	World Health Organization
WPC	Whey Proteine Concentrate (Molkenproteinkonzentrat)

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Akzeptanz der Biotechnologie und ihrer Produkte hat sich in den letzten Jahren deutlich verbessert. Der wachsende Bedarf an rekombinant hergestellten Proteinen und isolierten Naturstoffen zwingt die Industrie, ihre Produktionslinien ständig zu verbessern, um Marktpositionen zu sichern und neue Märkte zu erschließen. Durch neue Normen wie TQM¹ ist es erforderlich, das gesamte Produktleben aus ökonomischer und ökologischer Sicht zu erfassen und zu überwachen. Dazu zählen alle Produktstufen, vom effizienten Einsatz der Edukte über umweltschonende Produktionslinien bis zum Recycling von alten Produkten oder der Verwertung von Abfall- oder Nebenprodukten.

Im traditionell landwirtschaftlich geprägten Niedersachsen ist daher eine Forschungsinitiative für die Wertschöpfung landwirtschaftlicher Produkte wie Rapsöl, Zuckerrübenmelasse und Molke im Rahmen von BioRegion-Projekten gegründet worden.

Jährlich werden allein in Deutschland etwa 10 Mio. Tonnen Molke produziert, deren Verwertung ein großes Problem darstellt. Der hohe Anteil an kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Verbindungen belastet die biologischen Stufen der Abwasserbehandlungsanlagen nachhaltig, was zu hohen Kosten bei der Einleitung führt. Die Isolierung von einzelnen Molkenkomponenten hat daher eine lange Tradition. Neben der Lactose, die mit etwa 80 % den größten Anteil an der Trockenmasse besitzt, werden auch die Vitamine und Mineralien aus der Molke gewonnen. Der Proteinanteil, etwa 10 % der Trockenmasse, wird überwiegend zu Proteinkonzentraten und -teilsolaten verarbeitet, die aufgrund ihrer guten physikalischen und chemischen Eigenschaften (hohe Wasserabsorption, gute Aminosäurebilanz etc.) in weiten Teilen der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden (vgl. Kap. 2.1.3). In diesen Bereichen läßt sich allerdings langfristig nur schwer eine weitere Wertschöpfung erzielen, da die anfallenden Molkenmengen weltweit weiter steigen werden. Innerhalb der Industrieländer stagnieren die produzierten Molkenvolumina etwa seit 1996, ein Anstieg wird dagegen durch die Verbesserung der ökonomischen Verhältnisse in den Entwicklungs- und Schwellenländern (vor allem in Asien, Südamerika, Afrika) erwartet.

Neue Märkte können nur durch die Isolierung einzelner Proteine und Peptide erschlossen werden. Dazu zählen vor allem pharmazeutische Anwendungen, die Herstellung von Designerprodukten mit probiotischen Eigenschaften (Functional Food) und Nahrungsmittel für Säuglinge (Baby Food). Im Bereich Baby Food bestehen große Unterschiede in den Zusammensetzungen zwischen humaner und boviner Milch. So ist das allergene Reaktionen auslösende β -Lactoglobulin mit über 50 % die Hauptkomponente der bovinen Molke, während es in humaner Milch überhaupt nicht vorkommt. Das Glykoprotein Lactoferrin ist in humaner Milch ein ma-

¹ TQM: Total Quality Management

jores Protein mit Konzentrationen von bis zu 10 g/L; in boviner Molke ist es mit Gehalten zwischen 20 und 200 mg/L eine minore Komponente. Die Gewinnung von Proteineinzelisolaten ist daher essentiell für die Herstellung von teil- oder volladaptierter Babynahrung und für eine mögliche Anwendung in pharmazeutischen Applikationen.

Lactoferrin gehört zur Familie der Transferrine und besitzt die Fähigkeit, in zwei identischen Proteindomänen je ein Eisenatom koordinativ zu binden. Im Vergleich zum strukturell ähnlichen Transferrin ist die Bindungsaffinität allerdings etwa 300 mal höher. Die Eisenbindung ist unterhalb von pH 2 reversibel und ermöglicht die Versorgung der verschiedenen Zellen. Die immunologischen Effekte des Lactoferrins sind bisher nur unzureichend untersucht worden. Die antimikrobielle Wirkung beruht zum einen auf dem Entzug des für Mikroorganismen lebensnotwendigen Eisens. Zum anderen wird durch eine Peptidsequenz außerhalb der eisenbindenden Domäne eine direkte Permeabilisierung der Zellwände von Mikroorganismen ermöglicht. Neben diesen Funktionen wirkt Lactoferrin anticancerogen, greift in das Immunsystem ein und steht als potentes HIV-Präventionsmittel in der Diskussion.

Das Molekulargewicht beträgt ca. 80 kDa und der isoelektrische Punkt liegt weit im basischen Bereich. Dadurch ist ein Verlust durch eine Bindung mit sauren Proteinen wie Lipopolysacchariden oder β -Lactoglobulin zwar möglich; gleichzeitig kann aber eine Isolierung des Proteins über Ionenaustauscher erreicht werden, wobei neben herkömmlichen Chromatographie-Säulen auch Membranadsorber zur Anwendung kommen. Die säulenchromatographische Gewinnung wird vor allem in Japan und den USA bereits großtechnisch durchgeführt. Die Entwicklung leistungsfähiger und kompakter Membranmodule hat erst in den letzten Jahren verstärkt eingesetzt. Im Rahmen des Projektes wird daher mit Firmen der Molken-verarbeitenden Industrie (Biolac GmbH, Harbarnsen, Deutschland) und der Separationstechnik (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) zusammengearbeitet, um mit der Membranadsorber-Technologie eine konkurrenzfähige Methode zur Säulentechnik zu entwickeln.

Gegenüber herkömmlichen Chromatographie-Materialien bieten Membranen einige Vorteile. Die stark kationischen Sulfopropyl-Austauschergruppen sind auf den Oberflächen der Poren immobilisiert. Zusammen mit den großen Poren ($> 3 \mu\text{m}$) und der verbesserten Porosität der Membranen können höhere Flußraten gefahren werden, wodurch sich die Zykluszeiten für die Beladung, Elution und Equilibrierung stark verkürzen lassen. Die Wickelmodule (Sartobind[®] Factor Two Family) sind in verschiedenen Baugrößen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Wicklungen mit Gesamtaustauschflächen zwischen 0,125 und 8 m² verfügbar. Vorteilhaft ist weiterhin die hohe Variabilität im Anlagenbau, da die einzelnen Module beliebig kombiniert werden können, während eine Kapazitätserweiterung bei der Säulentechnik nur über einen größeren Säulendurchmesser zu erreichen ist. Die mechanische und chemische Stabilität der Mem-

branen konnte ebenfalls verbessert werden, so daß sie inzwischen über den gesamten pH-Bereich stabil sind. Dies wirkt sich positiv auf die Reinigung der Module aus, da in der Milch- und Molken-verarbeitenden Industrie vor allem Kombinationen aus sauren und alkalischen Reinigungsmitteln zum Einsatz kommen. Da auch andere basische Proteine in der Molke vorhanden sind, hier ist vor allem die Lactoperoxidase zu berücksichtigen, muß eine Charakterisierung der Adsorbermodule in Bezug auf das Auftrags- (dynamische Kapazität, Flußraten) und das Elutionsverhalten (Gradientenauswahl und -optimierung) erfolgen.

Die Methodenentwicklung begrenzt sich aber nicht nur auf die Charakterisierung der Membran-adsorber in der Isolierungsstufe, sondern auf den Gesamtprozeß. Vor der Auftragung auf die Kationenaustauschermembran ist es erforderlich, die Molke zu reinigen und damit eine vollständige Beladung der Membran zu gewährleisten. Dazu müssen die Betriebsparameter für die Crossflow-Filtration in einer Laboranlage ausgewählt und im weiteren Scale Up des Systems definiert werden. Auch hier kommen Filtrationsmodule der Firma Sartorius zum Einsatz (Sartocon[®] Mini und Sartocon[®] II).

Desweiteren wird der Downstream-Prozeß für die Lactoferrin-haltigen Eluate aus der Isolierungsstufe näher charakterisiert. Dabei wird auch die Möglichkeit einer weiteren Wertschöpfung des Lactoferrins untersucht. Das Peptid-Fragment, das durch proteolytischen Verdau von Lactoferrin erhalten wird und eine hohe antimikrobielle Wirkung zeigt, besitzt ebenfalls einen hohen isoelektrischen Punkt, wodurch eine Isolierung über Ionenaustausch-Materialien ermöglicht wird. Hierzu wird ein Verfahren vorgestellt, das Peptid über Membranadsorber in einem Einstufenschritt zu isolieren.

2 Theorie

2.1 Molke

Unter dem Begriff Molke werden die flüssigen Rückstände aus der Casein- und Käseherstellung sowie der Sojaverarbeitung zusammengefaßt. Die Molken stellen gelbgrünliche Flüssigkeiten dar, die einen Großteil der Salze, Lactose und der wasserlöslichen Proteine der Milch enthalten [WONG, 1988]. Die Zusammensetzung dieser Molken ist sehr variabel, sie hängt sowohl von der eingesetzten Milch (artspezifisch) als auch von dem Verarbeitungsprozeß ab.

Der häufigste Typ ist Süßmolke (sweet whey, siehe Abbildung 2.1), die bei der Herstellung von reifen Käsesorten wie Cheddar, Schweizer Käse, Provolone etc. anfällt. Der pH-Wert der Süßmolke liegt nur leicht unterhalb dem der Milch ($\text{pH} > 5,6$). Bei der Herstellung von Hüttenkäse oder bei der Caseingewinnung entsteht Sauermolke ($\text{pH} < 5,1$). Sie stellt mit weniger als 20 Prozent nur einen kleinen Anteil an der Gesamtmolke dar [ZADOW, 1992]. Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich Süßmolke (Dünnmolke oder Molkenkonzentrat) verwendet. Bei Molkenkonzentrat handelt es sich um 5-fach aufkonzentrierte Dünnmolke.

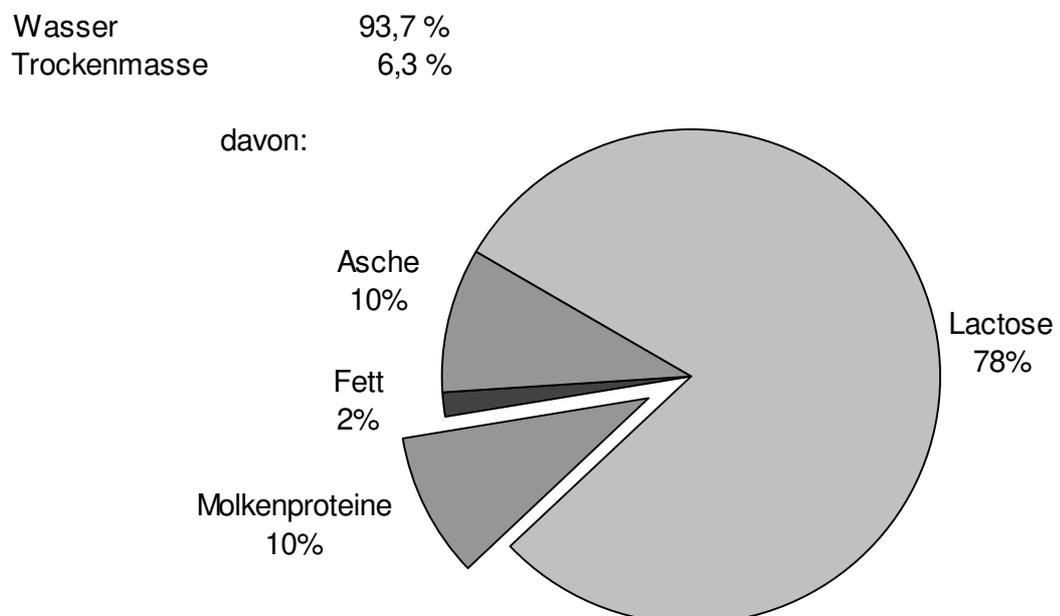


Abb. 2.1: Mittlere Zusammensetzung von Süßmolke

2.1.1 Majore Molkenproteine

Zu den Molkenproteinen gehören diejenigen Proteine, die nach der isoelektrischen Fällung der Caseine (pH 4,6) in der Sauermolke oder nach Labgerinnung der Milch (Ausfällung der Caseine als Käsebruch) in der Lab-, Süß- oder Käsemolke verbleiben. Den größten Massenanteil haben β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Serum Albumin, Immunglobuline und Proteose-Peptide (ein Protein aus der Fettkügelchenmembran und ein N-terminales Spaltprodukt vom β -Casein durch Milch-Endopeptidase [EIGEL & KEENAN, 1979; EIGEL, 1981]). Diese Proteine werden allgemein als Molkenproteine bezeichnet, aber auch als majore Molkenproteine oder Molkeneiweiß. Die Molkenproteine liegen abhängig vom pH-Wert und der Temperatur molekular-dispers verteilt vor [PESSEN ET AL., 1985] und können über Thiol-Disulfid-Wechselwirkungen oligomere Strukturen ausbilden [FOX & MULVIHILL, 1982]. Eine Übersicht der majoren Molkenproteine gibt Tabelle 2.1 [SCHLIMME & BUCHHEIM, 1995]. Einige Immunglobuline (IgG₁, IgG₂ und IgM) und das Serum Albumin werden nicht in der Milchdrüse produziert, sondern aus dem Blutserum transferriert.

Tab. 2.1: Übersicht der majoren Molkenproteine [SCHLIMME & BUCHHEIM, 1995]

	Massen-%	Anzahl Aminosäuren	Molmasse [kDa]	isoelektrischer Punkt, pI
β -Lactoglobulin	56	162	18,2	4,9 - 5,4
α -Lactalbumin	21	123	14,1	4,8
Serum Albumin	7	582	66,2	4,8
Immunglobuline	14	1400		
IgG ₁			170,0	
IgG ₂			146,0	
IgA		4100	480,0	
IgM		8300	970,0	

Das β -Lactoglobulin hat mit 56 % den größten Anteil an den Molkenproteinen. Dieser hohe Anteil ist im Hinblick auf die Verwendung der Molkenprodukte problematisch, da β -Lactoglobulin eine hohe Allergenität aufweist (vgl. Kap. 2.1.3).

2.1.2 Minore Molkenproteine

Neben den majoren Proteinen gibt es eine große Anzahl von minoren Molkenproteinen; eine Auswahl zeigt Tabelle 2.2 [SCHLIMME & BUCHHEIM, 1995]. Daneben kommen noch etwa 60 Enzyme und einige Peptidhormone vor.

Tab. 2.2: Übersicht der minoren Molkenproteine [SCHLIMME & BUCHHEIM, 1995]

	Konzentration [mg/L]	Anzahl Aminosäuren	Molmasse [kDa]	isoelektrischer Punkt, pI
Lactoferrin	100	708	80,0	8,8
Lactoperoxidase	k. A.	712	80,6	8,6
Transferrin	100	704	76,0	6,7
β_2 -Microglobulin (früher: Lactollin)	4	98	11,6	7,8
Fibronectin	40	2.265	0,3	5,6
Ereie sekretorische Komponenten (FSC)	50	k. A.	k. A.	k. A.
Butyrophilin	k. A.	526	60,0	5,1
Ceruloplasmin	k. A.	1.062	121,4	5,4

Vermutlich existiert noch eine Vielzahl von unbekanntem Verbindungen besonders im Ultraspu-
renbereich, die sich jedoch erst bei einer weiteren Verbesserung der präparativen und analyti-
schen Techniken identifizieren und charakterisieren lassen.

2.1.2.1 Lactoferrin

Lactoferrin ist ein natürliches Glykoprotein aus der Familie der Transferrine. Es besteht eine
Strukturhomologie von ca. 60 % zum Transferrin und von etwa 95 % zum humanen Lactoferrin.
Die Struktur von bovinem Lactoferrin (bLF) ist kristallographisch aufgeklärt worden [NORRIS
ET AL., 1986], es besteht aus einem 708 Aminosäuren beinhaltenden Mono-peptid-Strang, der zu
zwei Schleifen (der N- und der C-Schleife) gefaltet ist. An jede dieser zwei Zonen kann ein Fe^{3+} -
Ion koordinativ gebunden werden. Die Affinität zum Eisen ist sehr hoch (ca. 250 mal größer als
die von Transferrin), und erst bei sehr niedrigen pH-Werten < 2 ist die Bindung reversibel. Die
Molmasse von Lactoferrin beträgt in etwa 85.000 g/mol (Da) - je nach Eisengehalt und Glykoli-
sierungsgrad.

Lactoferrin findet sich in sämtlichen exokrinen Sekreten der Säugetiere wie Speichel, Blutplasma, Augen- und Schleimhaut-Flüssigkeit, hauptsächlich aber in der Muttermilch. Der Gehalt an Lactoferrin ist von der Spezies abhängig, am höchsten ist seine Konzentration in humaner Muttermilch mit etwa 2 g/L; während der ersten Tage nach der Geburt beträgt der Lactoferrin-Anteil sogar bis zu 10 g/L [ELLISON & GIEHL, 1991; TOMITA, 1997]. In Kuhmilch sind die Konzentrationen deutlich kleiner, sie liegen hier im Bereich 0,02 – 0,2 g/L [MASSON & HEREMANS, 1971].

Im Falle einer bakteriellen Infektion kann bei Säugetieren ein Anstieg der Lactoferrin-Konzentration in der entsprechenden Region beobachtet werden [WEINBERG, 1978]. Die immunologischen Effekte des Lactoferrins beruhen im wesentlichen auf zwei Mechanismen:

- 1) Bakterien benötigen Eisen für ihr Wachstum. Durch den Entzug dieses für sie essentiellen Metalls wirkt das Lactoferrin direkt hemmend auf Krankheitserreger [ARNOLD ET AL., 1982; LEHRER & GANZ, 1988]. Interessant dabei ist, daß z.B. das Wachstum der für den Organismus wichtigen Bakterien in Mund und Darm nicht beeinflußt wird [ARNOLD ET AL., 1980; PCT WO 95/22258]. Aufgrund dieser, die Mund- und Darmflora regulierenden Eigenschaft, hat sich Lactoferrin in Japan bereits als Babynahrungszusatz durchgesetzt.
- 2) Lactoferrin beeinflußt das Bakterienwachstum auch unabhängig vom Eisenhaushalt. So hat sich herausgestellt, daß das Protein in der Lage ist, direkt an die Zellwände von Mikroorganismen zu binden und diese zu permeabilisieren [BROCK, 1995; ELLISON ET AL., 1988]. Weiterhin wird vermutet, daß Lactoferrin Tumorerkrankungen positiv beeinflußt. Die genaue Wirkungsweise des Proteins ist noch nicht bekannt, fest steht jedoch, daß Lactoferrin wachstumsstimulierend auf Lymphocyten und Fibroblasten wirkt und somit die körpereigenen Abwehrkräfte steigert [BROCK, 1995; TOMITA, 1997].

Lactoferrin ist in der Lage, längere Zeit in stark saurem Medium unzersetzt zu bestehen. Da in den Zellen der Magenwand spezielle Rezeptoren für Lactoferrin existieren, dient es auch hier als Eisenlieferant – eine Eigenschaft, auf die in den Prospekten der Firmen hingewiesen wird, die das Protein als Nahrungszusatz verkaufen. So wird Lactoferrin durch die Lebensmittelindustrie als körpernahes und deshalb besonders schonendes Mittel zur Eisenapplikation und Lebensmittelveredlung vermarktet. Typische Anwendungsgebiete sind diätische Lebensmittel, Sportler- und Säuglingsnahrung und probiotische Erzeugnisse (Functional Food-Produkte). Auch in Kosmetika und pharmazeutischen Applikationen ist eine Anwendung denkbar. Immer mehr Firmen in Japan, USA und Westeuropa (vor allem in den Benelux-Ländern) isolieren das Lactoferrin aus der Molke. Das hat zur Folge, daß in den letzten zwei Jahren ein deutlicher Preisverfall stattgefunden hat. Lag der Preis 1997 noch bei etwa 1.000 US\$/kg, ist inzwischen nur noch mit einem Erlös von ca. 1.000 DM/kg zu rechnen.

2.1.3 Verarbeitung und Verwendung von Molke

Allein in Deutschland fallen jährlich etwa 10 Mio. Tonnen Molke (1998) an, von denen ca. 4 Mio. Tonnen auch in Deutschland verarbeitet werden. Durch ihren hohen Gehalt an Stickstoff- und Kohlenstoff-Verbindungen ist die Molke eine große Belastung für die biologischen Stufen in den Kläranlagen. Eine weitestgehende Verwertung der Molke ist daher auch aus umweltpolitischen Gründen besonders wichtig.

Seit etwa 30 Jahren findet eine intensive Forschung auf dem Gebiet der Aufarbeitung und der Verwertung von Molke und deren Inhaltsstoffen statt. In Tabelle 2.3 sind einige Verarbeitungsmethoden aufgeführt [ZADOW, 1992], die zu einer großen Anzahl an Molkenprodukten mit variabler Zusammensetzung führen.

Neben der Einbeziehung der Proteine in die Käseherstellung [LELIEVRE, 1995] finden Molkenpulver, -konzentrate und -isolate Verwendung in vielen Nahrungsmitteln [LORENZEN, 1987; SIENKIEWICZ & RIEDEL, 1990; MOSTERT & ROBERTS, 1993; RIEDEL, 1994] (Tabelle 2.4). Auch für diätische Lebensmittel und Sportlernahrung werden Molkenpräparate verwendet. Vorteilhaft ist der hohe Gehalt an essentiellen Aminosäuren der Molke verglichen mit den Gehalten in anderen Proteinen und den FAO¹-Empfehlungen [FAO/WHO², 1990; BARTH & BEHNKE, 1997]. Auch die Ergebnisse aus aufwendigen Versuchen an gesunden erwachsenen Personen bestätigen diesen Sachverhalt [JEKAT & KONFRANYI, 1970].

Tab. 2.3: Verarbeitungsmethoden für Molke [ZADOW, 1992]

Verfahren	Resultierende Produktzusammensetzung			
	Protein [%]	Lactose [%]	Asche [%]	Fett [%]
Erhitzen	80	5	4 - 5	5
Elektrodialyse	20 - 25	45 - 60	3 - 18	2 - 4
Gelfiltration (GF)	55 - 60	18 - 22	10 - 18	6 - 9
Ultrafiltration (UF)	30 - 76	6 - 55	3 - 12	1 - 5
Ionenaustausch (IA)	15	78	1	1
UF + GF	81	12	2	3
IA + UF	76	16	1	3

¹ FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

² WHO: World Health Organization

Tab. 2.4: Einsatzmöglichkeiten von Molkenproteinen in der Lebensmittelindustrie [Barth & Behnke, 1997]

Proteinfunktion	Einsatzmöglichkeiten
Proteinanreicherung	Diät- und Schonkostnahrung, Schlankheitspräparate, Aufbaunahrung, Geriatrie, Backwaren, Getränke, Sportlernahrung, Milcherzeugnisse
Optimierung der Aminosäurebilanz	Säuglingsernährung, Heilnahrung Komposition mit Pflanzenproteinen
Löslichkeit	Getränke
Wasserabsorption	Wurst, Brot, Kuchen, Milcherzeugnisse
Viskosität	Suppen, Soßen
Elastizität	Fleischwaren, Backwaren
Emulgierung	Speiseeis, Suppen, Soßen, Fleischwaren, Kaffeeweißer, Feinkosterzeugnisse, Süßwaren
Verschäumung	Backwaren, Süßwaren, Desserts
Gelbildung	Fleischwaren, Backwaren, Desserts, Quark, Käse
Stabilisierung	Suppen, Milcherzeugnisse, Feinkosterzeugnisse

Molkeneiweiß wird auch zur Anreicherung von Molkengetränken verwendet ebenso wie Fruchtzusätze zur Geschmacksverbesserung [RIEDEL, 1994; VOJNOVIC ET AL., 1993]. Molken- und Molken-Soja-Getränke können zur Gewichtsreduktion und gegen Bluthochdruck (geringer Natriumgehalt) eingesetzt werden [PATIL ET AL., 1984; ANEMÜLLER, 1982; WENZEL ET AL., 1986].

Ein großer Markt für Molkenproteine liegt im Bereich der Säuglingsnahrung. Die Ursache hierfür ist der erhebliche Unterschied in der Zusammensetzung zwischen Humanmilch und Kuhmilch [HAMBRAEUS, 1985; LÖNNEDAL & ATKINSON, 1995; RÄIHÄ, 1985]. In der Kuhmilch ist das β -Lactoglobulin das Hauptprotein mit über 50 % Massenanteil, in der Humanmilch ist es dagegen überhaupt nicht vorhanden, dafür besitzt Humanmilch einen höheren Anteil an α -Lactalbumin. Auch das für die Eisenversorgung wichtige Lactoferrin und das im Gastrointestinal-Trakt antibakteriell wirkende Lysozym ist in der Humanmilch stärker vertreten. Zusammen mit den anderen Minorproteinen erfüllen sie wesentliche Schutz- und Unterstützungsfunktionen im Immunsystem des Kleinkinds [HAMBRAEUS, 1985; REITER, 1985; SCHOPPE ET AL., 1989]. Im Vergleich zur Kuhmilch beträgt der gesamte Proteingehalt in der Humanmilch nur 27 %. Dabei

ist das Verhältnis Casein zu Molkenprotein sehr verschieden; in der Kuhmilch liegt es bei 3,8 und in der Humanmilch bei 0,31. Mit den in Tabelle 2.3 erwähnten Methoden kann die Molkenprotein-Zusammensetzung nur bedingt variiert werden [ZADOW, 1992; SIEMENSAM ET AL., 1993]. Dies ist problematisch, da β -Lactoglobulin (in der Humanmilch nicht vorhanden) und α -Lactalbumin die höchste Allergenität in Hauttests aufweisen [JOST ET AL., 1987]. Um den Gehalt an β -Lactoglobulin zu reduzieren, werden Methoden wie die selektive Fällung [PEARCE, 1983; KUWATA ET AL., 1985] und die enzymatische Hydrolyse [PAHUD ET AL., 1985; JOST ET AL., 1987; JOST ET AL., 1991] erwogen. Die immunologischen Effekte sind den minderen Molkenproteinen und -peptiden zuzuschreiben, allerdings ist die Wirkungsweise noch nicht geklärt. Die Molkenproteine enthalten einen hohen Anteil an Glutamylcystein-Gruppen, die für die Bildung von Glutathion erforderlich sind. Das Glutathion ist an der Stabilität von Zellmembranen und am Schutz der Zellen vor Bestrahlungseinflüssen und Sauerstoffradikalen beteiligt [BOUNOUS & GOLD, 1991; BOUNOUS ET AL., 1993; WONG & WATSON, 1995]. Fest steht bisher nur, daß eine anticancerogene Wirkung zu beobachten ist [CHIMIEL, 1997; SMITHERS ET AL., 1997; GOREWEIT & SPITSBERG, 1997] und bei HIV-Patienten die Immunantwort gesteigert wird [BOUNOUS, 1997]. Auch eine direkte immunitätsverändernde Wirkung auf die Zellen des Immunsystems wird nicht ausgeschlossen [MEISEL ET AL., 1989; MINCHEVA NILSSON ET AL., 1990].

Die Gewinnung von Proteineinzelisolaten und die weitere Erforschung der immunologischen Effekte wird zukünftig weiter an Bedeutung gewinnen. Nur so ist es möglich, Molkenprodukte in beliebiger und definierter Zusammensetzung herzustellen (Designerprodukte wie Functional Food). Dies ist auch wichtig bei der Herstellung von zur Humanmilch teil- oder volladaptierten Produkten in der Säuglingsernährung.

2.2 Lactoferrin-Gewinnung

In der Literatur sind viele Methoden zur Isolierung von Lactoferrin aus Milch oder Molke veröffentlicht worden. Einige davon behandeln die Isolierung von Lactoferrin durch Membranfiltration mit Ultrafiltrationsmembranen [KOTHE ET AL., 1987; SCOTT & LUCAS, 1989; MAYNARD ET AL., 1989]. Die geringe Auflösung bei Membranfiltrationen führt aber nur zu ungenügend reinen Proteinfractionen. Die überwiegende Zahl der Veröffentlichungen beschäftigt sich mit chromatographischen Methoden, vor allem mit Ionenaustauschharzen für die Säulenchromatographie. Zum Einsatz kommen Anionenaustauscher [GROVES, 1965; YOSHIDA, 1989] und Kationenaustauscher vom Carboxymethyl-Typ [LAW & REITER, 1977; MONSAN ET AL., 1987; OKONOGI ET AL., 1988; YOSHIDA & YE-XIUYUN, 1991A], vom Sulfopropyl-Typ [SHIMAZAKI ET AL., 1988; DIONYSIUS

ET AL., 1991; FRANCIS ET AL., 1995; YOSHIDA & YE-XIUYUN, 1991B] und vom Cellulosephosphat-Typ [FOLEY & BATES, 1987]. Auch andere Chromatographie-Methoden wie Metallaffinitäts-Chromatographie [AL-MASHIKHI ET AL., 1988; KIM & CRAMER, 1994], Hydrophobe Interaktions-Chromatographie [YOSHIDA, 1989] und Gelfiltrations-Chromatographie [AL-MASHIKHI & NAKAI, 1987] werden erwähnt. Weiterhin existieren viele Methoden in der Affinitäts-Chromatographie, z.B. mit Heparin [BLÄCKBERG & HERNELL, 1980; CHU ET AL., 1993], mit Ferritin [PAHUD & HILPERT, 1976], mit Cibacron Blue F3G-A [BEZWODA & MANSOOR, 1986; SHIMAZAKI & NISHIO, 1991], mit DNA modifizierter Agarose [HUTCHENS ET AL., 1989] und mit monoklonalen Antikörpern gegen Lactoferrin [BUGLANOV, 1986; KAWAKAMI ET AL., 1987A, 1987B]. Es handelt sich dabei nicht nur um bLF-Isolierungen aus Süßmolke, sondern auch um Isolierungen aus anderen Molken (z.B. Sauermolke) oder Milch und um Lactoferrin anderer Spezies (z.B. Human-LF oder Schweine-LF). Die Methoden sind austauschbar, da der isoelektrische Punkt von Lactoferrin bei allen Spezies im basischen Bereich liegt.

In allen Fällen muß vor der eigentlichen Isolierung eine Reinigung des Auftragsmediums erfolgen. Methoden wie Feststoffseparation, Zentrifugation oder auch die Caseinfällung sind aber nur für Forschungszwecke im Labormaßstab sinnvoll. Für den industriellen Bedarf ist der Einsatz einer kontinuierlichen Filtration vorzuziehen.

2.2.1 Crossflow-Filtration

Filtration bezeichnet eine physikalische Trennmethode, bei der gelöste oder suspendierte Teilchen oder Moleküle einer Lösung aufgrund ihrer Größe getrennt werden können.

Auf die Klassifizierung von Filtern und der Filtermaterialien wird hier nicht eingegangen. Grundsätzlich ist die kleinste Polymereinheit das Ethen (Vinyl-), das zu langen Ketten polymerisiert wird. Dabei können auch Mischpolymere eingesetzt werden und eine Reihe anderer Substituenten für die Quervernetzung. Gängige Membranmaterialien sind z. B. Cellulosederivate, Polypropylen, Polysulfon und Polyethersulfon. Für weitere Informationen wird auf einschlägige Literatur verwiesen [MULDER, 1996; CHERYAN, 1998].

Im Gegensatz zur statischen Filtration (Dead End-Filtration, Abbildung 2.2 links), bei der der Filterkuchen ständig wächst und die Standzeiten begrenzt sind, wird in der Crossflow-Filtration das Medium tangential zur Membranoberfläche geführt (Querstromfiltration, Abbildung 2.2 rechts). Dabei werden Teile der Grenzschicht wieder abgetragen und längere Standzeiten ermöglicht. Crossflow-Anlagen kommen in allen Filtrationsbereichen wie reverser Osmose (RO), Nanofiltration (NF), Ultrafiltration (UF) oder Mikrofiltration (MF) zum Einsatz. Der Filtrationsprozeß wird durch viele Faktoren wie Viskosität der Lösung, Temperatur, Scherrate, Transmem-

brandruck (TMP), Konzentration an filterbaren Anteilen in der Lösung und auch durch die Geometrie der Anlage beeinflusst. Um diese Einflüsse besser abschätzen zu können, wurden verschiedene Modelle zur Berechnung der Permeatflüsse entwickelt (vgl. Kap. 2.2.1.1 ff).

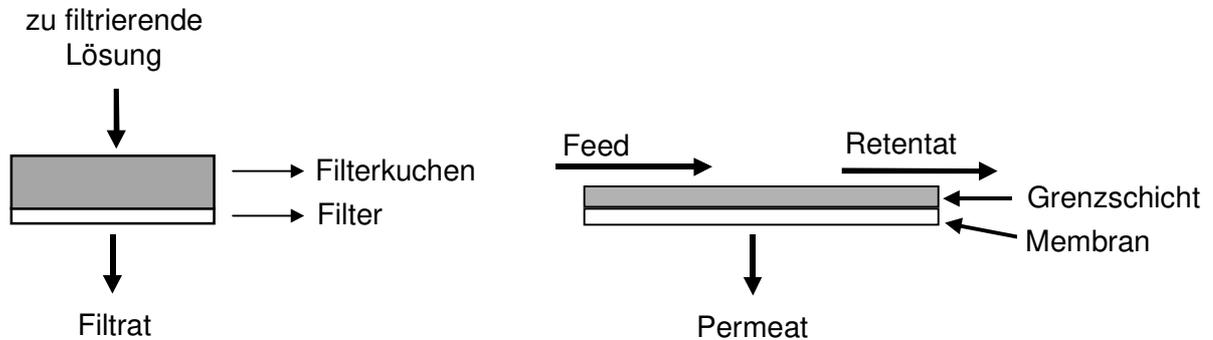


Abb. 2.2: Dead End-Filtration (links) und Crossflow-Filtration (rechts)

In Labor- und Pilotanlagen kommt häufig die Batchmethode (Abbildung 2.3 links) zum Einsatz, bei der das Retentat im Kreis geführt wird. Das Filtrationsmedium wird im Verlauf der Filtration ständig aufkonzentriert, so daß zu keinem Zeitpunkt stationäre Bedingungen herrschen. Mit der Feed & Bleed-Methode können diese Probleme umgangen werden (Abbildung 2.3 rechts). Dabei sorgt die Feed-Pumpe für den Systemdruck, während die Kreislaufpumpe für die Überströmung zuständig ist. Nach einer kurzen Einlaufphase wird Retentat aus dem Kreislauf abgeführt. Da im Kreislauf Retentatkonzentrationen vorliegen, die den Endkonzentrationen bei der Batch-Methode gleichen, werden nur geringe Permeatflüsse erzielt. Daher sind große Membranflächen erforderlich. Um dies zu umgehen, kann man die Feed & Bleed Methode mehrfach hintereinander durchführen, wobei die Retentatkonzentration erst im letzten Abschnitt hohe Werte erreicht (Multistage Feed & Bleed).

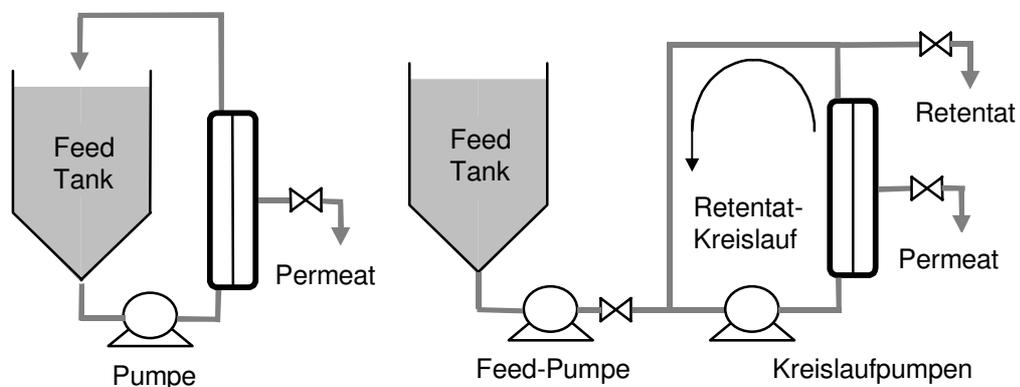


Abb. 2.3: Betriebsarten und Prozeßführung [CHERYAN, 1998]

links: Batch-Anordnung

rechts: Feed & Bleed-Methode

Auch die Druckverhältnisse zwischen Retentat- und Permeatseite (TMP) sowie der Druckabfall tangential zur Membranoberfläche sind problematisch. Um die Druckverhältnisse besser steuern zu können, kann auch auf der Permeatseite ein Kreislauf aufgebaut werden. Vergleiche zu diesen Methoden auch die Abbildung 3.31 in Kapitel 3.2.2.3 und Abbildung 3.59 in Kapitel 3.5.

2.2.1.1 Membranfouling

Fouling ist einer der limitierenden Faktoren in der Membrantechnologie. Es zeigt sich in einem kontinuierlichen Abfall des Permeatflusses, auch wenn alle übrigen Betriebsparameter konstant gehalten werden. Der Grund dafür liegt in den Wechselwirkungen zwischen der Membran und den Partikeln der Lösung oder auch zwischen den Partikeln untereinander. Kommt es dabei zu Ablagerungen der Partikel auf der Membran oder sogar in den Membranporen, so spricht man von „Fouling“. Es ist ein irreversibler Effekt, der erst durch die Reinigung der Membran beseitigt werden kann. Dieser Prozeß darf nicht mit der Bildung der Gelschicht aus dem Film-Theorie-Modell (vgl. Kap. 2.2.1.3) verwechselt werden, da die Gelschicht durch Variieren der Betriebsparameter verändert werden kann. Das Fouling wird begünstigt durch hohe Transmembrandrücke, hohe Feed-Konzentrationen und hohe Ladungsdichten auf der Membran.

Um den Permeatfluß während einer Filtration zu beschreiben, wurden verschiedene mathematische Modelle entwickelt, die jedoch aufgrund der komplexen Vorgänge auf der Membranoberfläche nur als Näherungen in Teilbereichen der Filtration verstanden werden dürfen.

2.2.1.2 Hagen-Poiseuille-Gesetz [GRANDISON & LEWIS, 1996; CHERYAN, 1998]

Das grundlegende Problem bei der Berechnung des Permeatflusses ist die Tatsache, daß die Vorgänge nahe der Membranoberfläche nur unzureichend beschrieben werden können. Für eine ideale Situation mit gleichmäßig geformten Membranporen, ohne Fouling (vgl. Kap. 2.2.1.1), ohne Konzentrationspolarisation und einer inkompressiblen Lösung läßt sich das Hagen-Poiseuille Gesetz zur Beschreibung des Flusses im druckkontrollierten Bereich der Filtration verwenden:

$$J = \frac{\varepsilon \cdot d_p^2 \cdot \text{TMP}}{32 \cdot \Delta x \cdot \mu} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Darin ist J der Fluß durch die Membran, ε die Oberflächenporosität der Membran, Δx die Länge der Pore, d_p deren Durchmesser, μ die Viskosität und TMP ist der angewandte Transmembrandruck. Die Berechnung des Transmembrandrucks erfolgt nach:

$$\text{TMP} = (P_R - P_P) \quad (\text{Gl. 2.2})$$

P_P ist der gemessene Druck auf der Permeatseite und P_R ist der mittlere Druck auf der Retentatseite. Er wird über den Eingangsdruck P_e und den Ausgangsdruck P_a bestimmt:

$$P_R = \frac{P_e + P_a}{2} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Da das Hagen-Poiseuille Gesetz außer dem Transmembrandruck nur konstante Größen verwendet, sollte der Permeatfluß sich linear mit dem Transmembrandruck ändern, was für Wasser auch der Fall ist.

Bei realen Filtrationen zeigen sich bei hohen Transmembrandrücken deutliche Abweichungen von diesem Gesetz. Bei steigendem Druck kann die Filtration sogar in einem druckunabhängigen Bereich verlaufen. Der Wasserfluß wird meist nicht beeinflusst, er ist in Abbildung 2.4 links als Vergleich angegeben. Ein möglicher Grund für diese Abweichung vom Hagen-Poiseuille Gesetz ist die Konzentrationspolarisation an der Membranoberfläche (siehe Kap. 2.2.1.3).

Allgemein ist mit steigenden Konzentrationen im Medium (Abbildung 2.4 rechts) ein Abfall der Flußrate (Gl. 2.1) zu verzeichnen, da zum einen die Viskosität steigt und andererseits durch das verstärkte Fouling eine Abnahme der Porendurchmesser und der Oberflächenporosität erfolgt.

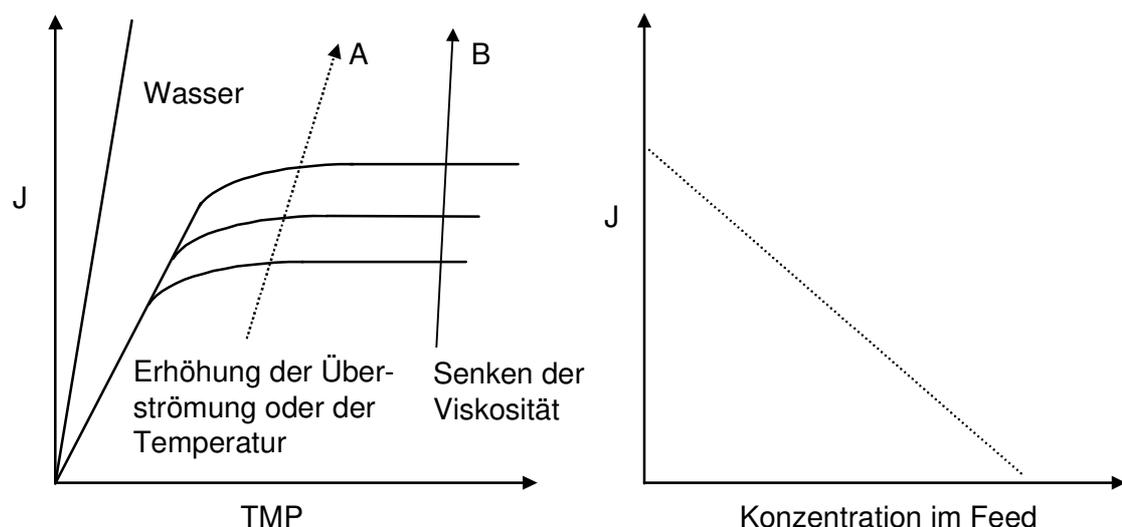


Abb. 2.4: links: Einfluß verschiedener Betriebsparameter auf den Permeatfluß
rechts: Einfluß der Feed-Konzentration auf den Permeatfluß [GRANDISON & LEWIS, 1996]

2.2.1.3 Massen-Transfer-Modell [GRANDISON & LEWIS, 1996; CHERYAN, 1998]

Das Massen-Transfer-Modell wird auch als Film-Theorie-Modell bezeichnet und beruht auf der Konzentrationspolarisation an der Membranoberfläche im druckunabhängigen Bereich. Konzentrationspolarisation tritt auf, wenn Makromoleküle oder suspendierte Teilchen von der Membran zurückgehalten werden. Wenn die Rückdiffusion der zurückgehaltenen Teilchen in den Feed langsamer als ihr Transport zur Membran verläuft, kommt es zur Anreicherung der zurückgehaltenen Teilchen oberhalb der Membran. Es entsteht ein Konzentrationsgradient innerhalb der Strömungsgrenzschicht über der Membran. Durch erhöhte Konzentrationen in dieser Grenzschicht (Boundary Layer) wird der Transport zur Membran erschwert und der Permeatfluß gesenkt.

Dabei kann es zur Ausbildung einer Gelschicht über der Membran kommen, die den Permeatfluß durch zusätzlichen Widerstand reduziert. Innerhalb dieser Gelschicht bleibt die Konzentration konstant und damit auch der Permeatfluß. Abbildung 2.5 zeigt schematisch den Konzentrationsverlauf über der Membran.

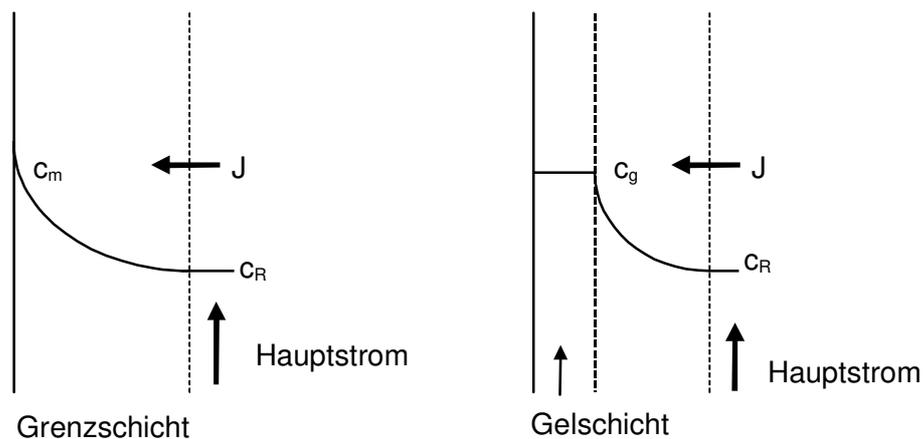


Abb. 2.5: Konzentrationspolarisation ohne (links) und mit Gelschicht (rechts) [GRANDISON & LEWIS, 1996]

c_m = Konzentration an der Membran; c_g = Konzentration in der Gelschicht und c_r = Konzentration im Retentat

Unter Gleichgewichtsbedingungen sind die Massenströme zur und von der Membran weg gleich groß und es gelten die Gleichungen 2.4 bzw. 2.5:

$$J \cdot c = D \cdot \frac{dc}{dy} + J \cdot c_p \quad (\text{Gl. 2.4})$$

$$J \cdot (c - c_p) = D \cdot \frac{dc}{dy} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Darin ist c die Konzentration einer Komponente der Lösung am Ort y über der Membran und c_p die Permeatkonzentration. Unter Vernachlässigung axialer Konzentrationsgradienten erhält man für die Integration über die Höhe der Grenzschicht L :

$$J = D/L \cdot \ln[(c_m - c_p)/(c_R - c_p)] \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Die Bezeichnung c_R steht für die Retentatkonzentration. Der Ausdruck D/L wird als Massentransferkoeffizient k bezeichnet. Wird eine Komponente vollkommen von der Membran zurückgehalten ($c_p = 0$), so erhält man für diese Komponente:

$$J = k \cdot \ln[c_m/c_R] \quad (\text{Gl. 2.7})$$

Dies ist die Gleichung zur Berechnung der Permeatflüsse mit dem Film-Theorie Modell. Kommt es zur Bildung einer Gelschicht, ist c_m durch c_g zu ersetzen (vgl. Abb. 2.5 rechts). Da innerhalb der Gelschicht der Fluß konstant ist ($c_g = \text{konstant}$, eine Druckerhöhung führt nur zum Wachsen der Gelschicht und nicht zur Steigerung des Permeatflusses), wird dieses Modell meist zur Berechnung der Permeatflüsse im druckunabhängigen Bereich (vgl. Abb. 2.4 links) benutzt. Änderungen von J werden durch die eingesetzte Konzentration c_R oder durch Einflüsse, die die Größe von k bestimmen, erreicht. Zu diesen Einflüssen zählen Temperaturänderungen (= Änderung von D) oder auch Veränderungen der Scherrate (hohe Scherrate = schmale Grenzschicht $\rightarrow L$ wird kleiner).

In Zusammenhang mit der Festlegung der Größe von k wurden viele Modelle erstellt, die auf dem Film-Theorie Modell basieren. Zu diesen Modellen gehören das „Drei Zonen Konzept“, die „Oberflächenerneuerungstheorie“, die „Durchdringungstheorie“, das „Turbulente Grenzschicht Modell“ u.a. [SHERWOOD ET AL., 1975; TREYBAL, 1981]. Keines dieser Konzepte ist vollständig zufriedenstellend, sie gelten jeweils für bestimmte Arten oder Bereiche der Crossflow-Filtration. Unter diesen Umständen bietet die Berechnung von k über die Sherwoodzahl eine Möglichkeit den Permeatfluß vorherzusagen:

$$k = \frac{\text{Sh} \cdot D}{d_h} = A \cdot (\text{Re})^\alpha \cdot (\text{Sc})^\beta \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Mit den Kennzahlen $\text{Sh} = k d_h / D$ (Sherwoodzahl), $\text{Re} = d_h V / \mu$ (Reynoldszahl) und $\text{Sc} = \mu/D$ (Schmidtzahl). Die Werte für A , α und β sind Konstanten, deren Größe von den Strömungsverhältnissen abhängt. Für turbulente Strömung ($\text{Re} > 4000$) gilt z.B.:

$$\text{Sh} = 0,023 \cdot (\text{Re})^{0,8} \cdot (\text{Sc})^{0,33} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Für Plattenmodule berechnet sich der hydraulische Durchmesser nach (a = Breite, b = Höhe):

$$d_h = 2 \frac{a \cdot b}{(a + b)} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

In einigen Fällen wird damit eine ausreichend gute Vorhersage für den Permeatfluß erreicht. Die berechneten Werte fallen oft kleiner als die gemessenen aus, was einige Autoren auf die nicht berücksichtigten Turbulenzen zurückführen. Angesichts der Tatsache, daß für die Kenn-

zahlberechnung konstante Dichten und Viskositäten angenommen werden, ist diese Erklärung sicherlich zu einfach und die wahren Verhältnisse bei der Filtration weitaus komplexer. Auch werden bei diesen Berechnungen keine Annahmen über die Zusammensetzung des Feeds berücksichtigt.

2.2.1.4 Widerstandsmodell [GRANDISON & LEWIS, 1996; CHERYAN, 1998]

Keines der vorigen Modelle gilt für den gesamten Druckbereich während der Ultra- oder Mikrofiltration, d.h. druckkontrolliert bei geringen Drücken und druckunabhängig bei hohen Drücken. Ein oft benutzter Ansatz für die Berechnung des Permeatflusses (J) über den gesamten Druckbereich ist die Aufteilung der flußlimitierenden Größen in Widerstände, die dem angelegten Transmembrandruck entgegenwirken. Damit ergibt sich folgender Ausdruck:

$$J = \frac{\text{TMP}}{\mu \cdot (R_m + R_f + R_p)} \quad (\text{Gl. 2.11})$$

Darin ist μ die Viskosität des Permeats (nicht des Retentats !) und die Widerstände teilen sich auf in Membranwiderstand R_m , Widerstand durch Fouling R_f (siehe Kap. 2.2.1.1) und den Widerstand durch Konzentrationspolarisation R_p . Für nichtkompressible Flüssigkeiten wird die Viskosität mit dem Widerstand zusammengefaßt. Der Widerstand der Membran R_m kann durch Messen der Wasserflüsse bestimmt werden. Mitunter werden R_m und R_f als ein Widerstand R'_m zusammengefaßt. Da die Durchlässigkeit der Gelschicht (bei kompressiblen Gelschichten ändert sich c_g , vgl. Kap. 2.2.1.3) und ihre Ausdehnung vom angelegten Druck abhängen, kann R_p als Funktion des Transmembrandrucks ausgedrückt werden:

$$R_p = \phi \cdot \text{TMP} \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Mit $R'_m = R_m + R_f$ folgt:

$$J = \frac{\text{TMP}}{R'_m + \phi \cdot \text{TMP}} \quad (\text{Gl. 2.13})$$

Gleichung 2.13 beschreibt den Verlauf des Permeatflusses, wie er in Abbildung 2.4 links dargestellt ist. Für eine bestimmte Lösung lassen sich damit Betriebspunkte einer Anlage vergleichen und der optimale Fluß ermitteln. Eine der größten Schwierigkeiten bei der Entwicklung eines Modells für die Crossflow-Filtration realer Medien ist, deren komplexe Zusammensetzung zu berücksichtigen. Meist handelt es sich dabei um Mehrkomponentensysteme mit Komponenten, die entweder nur teilweise oder vollständig zurückgehalten werden. Für den Bereich der Ultrafiltration werden meist gute Vorhersagen getroffen. Doch bei der Filtration von Suspensionen oder kolloiden Lösungen, wie sie häufig bei der Mikrofiltration auftreten, zeigen sich starke Abweichungen von vorher berechneten Werten. Ein Grund für derartige Abweichungen ist das Fouling, dessen Auftreten bei den hier vorgestellten Modellen nur vom Widerstandsmodell berücksichtigt wird.

2.2.2 Membranadsorber

Das basische Glykoprotein Lactoferrin liegt in der Süßmolke (pH 6,0 – 6,6) kationisch vor, wodurch sich seine Isolierung über einen Ionenaustausch-Prozeß anbietet. Unter Ionenaustausch versteht man eine adsorptive, chromatographische Technik, bei der Wechselwirkungen von positiv oder negativ geladenen Molekülen an einer entsprechend anders geladenen Matrix stattfinden. Die Erhöhung der Ionenstärke mit Salzen oder ein pH-Shift führt zur Elution der gebundenen Moleküle. Coulombsche Wechselwirkungen zwischen den geladenen Gruppen sind für die Anziehung bzw. Bindung verantwortlich [PHARMACIA, 1996]. Bei solchen Adsorbentien sind die Austauscherguppen auf den Porenoberflächen der Membran fixiert. Bei schwachen Kationenaustauschern dienen Carboxymethylgruppen als Austauscherguppen. Diese Gruppen bieten die Möglichkeit, die Elution mit einem pH-Gradienten durchzuführen, was zu Eluaten mit geringen Salzkonzentrationen führt. Im Fall der starken Kationenaustauscher sind die Austauscherguppen Sulfonylegruppen, die über einen breiten pH-Bereich deprotoniert vorliegen. Die Elution erfolgt hier ausschließlich über Salzgradienten.

Es existieren bereits eine Reihe von Arbeiten, die sich mit der Isolierung von Lactoferrin über Membranadsorber beschäftigen [PCT WO 93/02098; MITCHELL ET AL., 1994; ZIETLOW & ETZEL, 1995; ADISAPUTRO ET AL., 1996; CHIU & ETZEL, 1998]. Diese Form der Isolierung hat erst in den letzten fünf Jahren verstärkt eingesetzt. Die Ursache hierfür liegt darin begründet, daß die Eigenschaften der Membranadsorber in den vergangenen Jahren deutlich verbessert wurden. Bei den Adsorbentien von Sartorius handelt es sich um großporige Membranen aus modifizierter Cellulose mit Porengrößen $\geq 3 \mu\text{m}$. Die Austauscherguppen (Sulfopropyl-Typ) sind auf der Porenoberfläche immobilisiert. Aufgrund der großen Poren ist eine Porendiffusion vernachlässigbar, wodurch höhere Flußraten und damit kürzere Zykluszeiten ermöglicht werden. Die planaren Bauformen mit 15 bzw. 100 cm^2 Fläche werden für analytische Zwecke und für erste Tests in der Isolierungsstufe verwendet. Für größere Anlagen stehen seit kurzem (Spiral-)Wickelmodule (Sartobind[®] Factor Two Family, Sartorius, Göttingen) zur Verfügung. Die Adsorber sind in verschiedenen Bauhöhen und mit einer unterschiedlichen Anzahl an Membranlagen erhältlich, wodurch Austauschflächen zwischen 0,125 und 8,0 m^2 erreicht werden. Gegenüber Säulen, bei denen eine Kapazitätserweiterung nur durch einen größeren Durchmesser zu erreichen ist, können einzelne Adsorbermodule beliebig kombiniert werden. Außerdem können die Membranen innerhalb kürzester Zeit ausgetauscht werden. Die Wickelmodule werden in der kleinen und großen Technikumsstufe mit Flächen von 0,25 und 1,0 m^2 eingesetzt (vgl. Kap. 3.3.2 und 3.3.3). Die verwendeten Adsorber werden in den Kapiteln 3.1.2.3 (Analytik) und 3.3.1 ff (Isolierung) noch ausführlich beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Prozeßbegleitende Analytik

Die prozeßbegleitende Analytik stellt einen wichtigen Teilbereich des Projekts dar. Primärziel war dabei die Entwicklung einer intime-Analytik, die innerhalb kürzester Zeit (< 1 min) eine Quantifizierung und somit eine Steuerung (Controlling) der laufenden Produktion ermöglicht. Das Spektrum der untersuchten Analysemethoden zeigt Tabelle 3.1, es reicht von den klassischen chromatographischen Verfahren (HPLC, High Performance Liquid Chromatography; PAGE, Polyacrylamide Gel Electrophoresis) bis zu jüngeren Verfahren wie der Zweidimensional-(2D-)Fluoreszenzspektroskopie [STEUBER, 1999].

Tab. 3.1: Kriterienvergleich einiger Analyseverfahren

ACE = Affinity Capillary Electrophoresis; Affinitäts-Kapillarelektrophorese

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay

LPLC = Low Pressure Liquid Chromatography

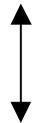
Zeitfaktor	Analyseverfahren	Analyseverfahren	Spezifität
intime	2D-Fluoreszenz	ELISA	spezifisch
	ACE	ACE	
	HPLC	HPLC	
	LPLC	LPLC	
	ELISA	2D-Fluoreszenz	
offline			

Tabelle 3.1 zeigt die Einteilung der Verfahren unter zwei Gesichtspunkten:

1. Der Schnelligkeit der Methode, die für das Prozeßcontrolling erforderlich ist und
2. der Spezifität in Bezug auf den Analyten Lactoferrin.

Die Gelelektrophorese (SDS-PAGE¹) und die Massenspektrometrie (MALDI-MS²) sind in der Tabelle nicht erfaßt, da die für eine quantitative Analyse erforderlichen Geräte nicht verfügbar sind und so nur qualitative Aussagen getroffen werden können (vgl. auch Kap. 3.1.2.6 und 3.1.2.7). Der Standard-Referenztest ELISA ist aufgrund der Verwendung von bLF-Antikörpern zwar hochspezifisch, ist aber eine reine offline Methode, die zudem sehr teuer ist (Kap. 3.1.2.2). Im Gegensatz dazu ist die 2D-Fluoreszenz eine echte intime-Analytik, ein Scan des gesamten Spektrums von 290-600 nm dauert etwa 1 min (Kap. 3.1.2.4). Auf die Probleme bei der Kapillarelektrophorese und der Niederdruckchromatographie wird in den Kapiteln 3.1.2.2 und 3.1.2.3

¹ SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

² MALDI-MS: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Mass Spectrometry

näher eingegangen. Aufgrund der Verfügbarkeit von HPLC-Anlagen in allen Laboratorien und der ausgewogenen Balance zwischen Spezifität und online-Fähigkeit, wurde die HPLC als Standard-Analysenmethode ausgewählt.

3.1.1 HPLC

Die Quantifizierung von bLF kann generell mit allen Varianten der HPLC erfolgen. Am häufigsten werden jedoch Reversed Phase (RP)-Materialien [HUTCHENS ET AL., 1989] und Ion Exchange (IEX)-Materialien [DIONYSIUS ET AL., 1991; FRANCIS ET AL., 1995] sowohl in HPLC- wie auch in FPLC¹-Systemen eingesetzt. Die RP-HPLC kann bei verschiedenen Medien (Süßmolke, Sauermolke, Milchvarianten) eingesetzt werden. Da bei der Biolac GmbH ausschließlich Süßmolke zur Lactoferrin-Gewinnung eingesetzt werden soll, wird die HPLC auf Basis einer Kationenaustauschersäule (Mono S H/R 5/5, Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgebaut.

3.1.1.1 Methodenentwicklung

Die verwendete Süßmolke besitzt einen pH-Wert zwischen 6,2 und 6,6. Lactoferrin (LF, pI 8,4 - 9,0 [MOGUILEVSKY ET AL., 1985]) und Lactoperoxidase (LP, pI 8,5) sind stark basische Glykoproteine und liegen daher kationisch vor, während die übrigen Proteine, vor allem die majoren Komponenten α -Lactalbumin (α -LA, pI 4,8), β -Lactoglobulin (β -LG, pI 5,1 - 5,4), Caseine (pI 3,3 - 5,3) und Bovines Serum Albumin (BSA, pI 4,7 - 4,8) anionisch vorliegen. Eine qualitative Analyse des bLF ist daher mit einem Kationenaustauscher möglich [EKSTRAND & BJÖRCK, 1986], die Trennung von Lactoperoxidase und Lactoferrin erfolgt durch einen Salzgradienten (Natriumchlorid, NaCl) bei der Elution (Abbildung 3.1). Der Gradient wird mit 0,5 M NaCl für die Lactoperoxidase und 1,0 M NaCl für das bovine Lactoferrin festgelegt. Abbildung 3.1 rechts zeigt das Chromatogramm einer Molkenprobe. Hier wird die Komplexität des biologischen Mediums Molke (vgl. auch Kap. 2.2) noch einmal deutlich. Zunächst werden alle Komponenten detektiert, die nicht wechselwirken können, da sie ungeladen oder anionisch sind. Anschließend wird die Lactoperoxidase eluiert und schließlich Lactoferrin.

Lactoferrin, das als minores Protein mit Gehalten von 20-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in der Molke zu erwarten ist [LAW & REITER, 1977], zeigt das kleinste Signal im Chromatogramm. Daher ist eine hohe

¹ FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

Selektivität der HPLC sehr wichtig, die mit der verwendeten IEX-Säule und den entsprechenden Gradienten gegeben ist.

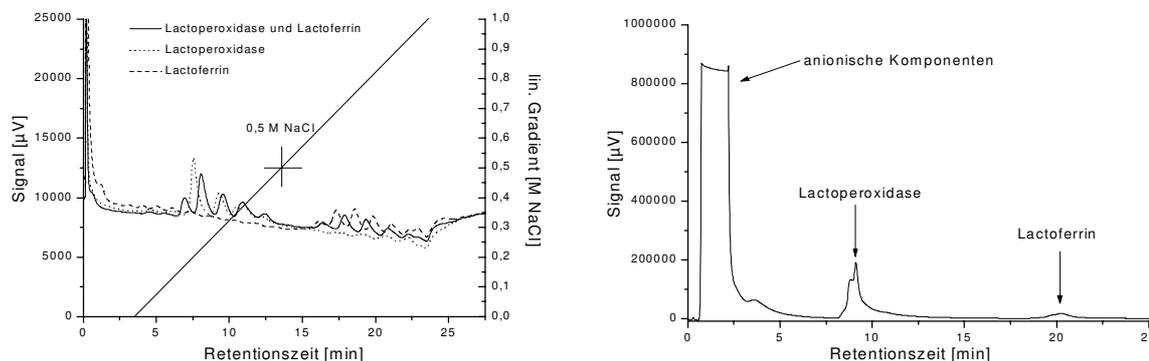


Abb. 3.1: links: Linearer Salzgradient (0,0 – 1,0 M NaCl) zur Trennung der anionischen Proteine Lactoperoxidase und Lactoferrin
rechts: Chromatogramm einer Molkenprobe (Stufengradient)

Weiterhin ist der Einfluß der Probenvorbereitung sehr wichtig, da die Molke Anteile von Lipiden und unlöslichen Caseinen enthält, die das Chromatographiematerial zusetzen würden. Ein zweites Problem besteht in einer möglichen Minderquantifizierung des Lactoferrins durch Wechselwirkung mit den anionischen Bestandteilen der Molke. Wechselwirkungen mit Proteinen wie β -Lactoglobulin [LAMPREAVE ET AL., 1990] oder Ribonuclease [DE MINGO ET AL., 1994] und Lipopolysacchariden [MIYAZAWA ET AL., 1991] sind bekannt. Um diese Einflüsse zu minimieren, werden unter anderem eine Caseinfällung durchgeführt und der Anteil an Konkurrenzionen durch Zugabe von 0,4 M Natriumchlorid erhöht. Aus Tabelle 3.2 ist zu entnehmen, daß die Art der Probenvorbereitung keinen Einfluß auf die Quantifizierung von Lactoferrin hat. Die Einzelergebnisse weisen dabei nur Streuungen um maximal 1,2 % um den Mittelwert auf. Selbst die einfache Zentrifugation (Zeile 1) liegt nur ca. 2,5 % unter dem Mittelwert, so daß eine aufwendige Probenvorbereitung nicht notwendig ist, sondern einfaches Abzentrifugieren der unlöslichen Komponenten ausreicht.

Tab. 3.2: Einfluß der Probenvorbereitung auf den ermittelten Lactoferringehalt einer Probe

Probenvorbereitung	bLF [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	SD, RSD
Zentrifuge 14000 U/min, RT	163,5	
Ultrazentrifuge 20000 g, 4 °C	168,4	
Zugabe 0,4 M NaCl	168,3	
Caseinfällung	167,4	
Caseinfällung + 0,4 M NaCl	169,6	
Mittelwert	167,4	$\pm 2,1 \mu\text{g}/\text{mL}; \pm 1,2 \%$

In Realproben aus Molkenkonzentraten sind bLF-Gehalte bis 500 µg/mL, aus Dünnmolke bis 200 µg/mL zu erwarten. Die Eluate aus der Isolierung des Lactoferrins sind deutlich höher konzentriert (> 1000 µg/mL) und müssen vor der Analyse entsprechend verdünnt werden. Der Meßbereich bis 500 µg/mL und die Kalibrierfunktion sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Auswertungen erfolgen über die Fläche, eine Höhenauswertung ist zwar möglich, aber mit größeren Fehlern behaftet.

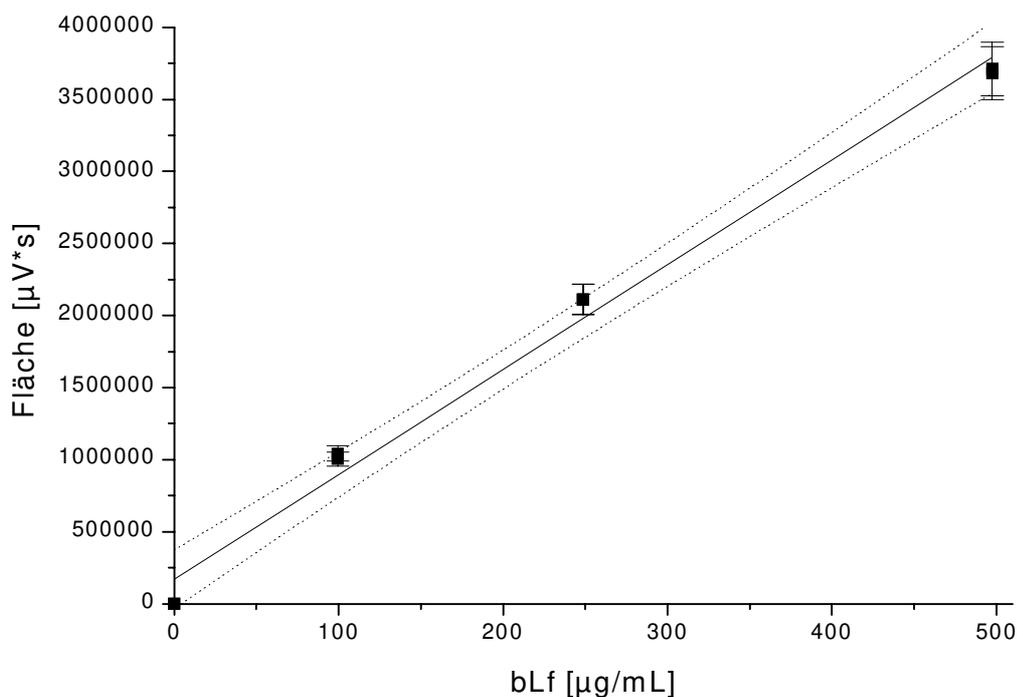


Abb. 3.2: Kalibrierfunktion und Meßbereich der HPLC (R = 0,995; SD = 155422,1)

Die Richtigkeit einer Methode wird in %-Wiederfindung angegeben. Sie kann durch Spikeversuche von Realproben mit Standards ermittelt werden, um Aufschluß über mögliche Matrixeffekte geben zu können. Die Wiederfindungsrate liegt bei etwa 90 % ± 3 %.

Die Präzision einer Methode gliedert sich in drei verschiedene Teile:

1. Die kurzfristige Wiederholpräzision die die Standardabweichung innerhalb eines kurzen Zeitraums angibt: Für das Verfahren ergibt sich eine Abweichung von 17,3 %.
2. Die mittelfristige Wiederholpräzision, die die Standardabweichung innerhalb eines mittelfristigen Zeitraums (mehrere Tage oder Wochen) und/oder unter verschiedenen Bedingungen (unterschiedliche Laboranten, etc.) darstellt.

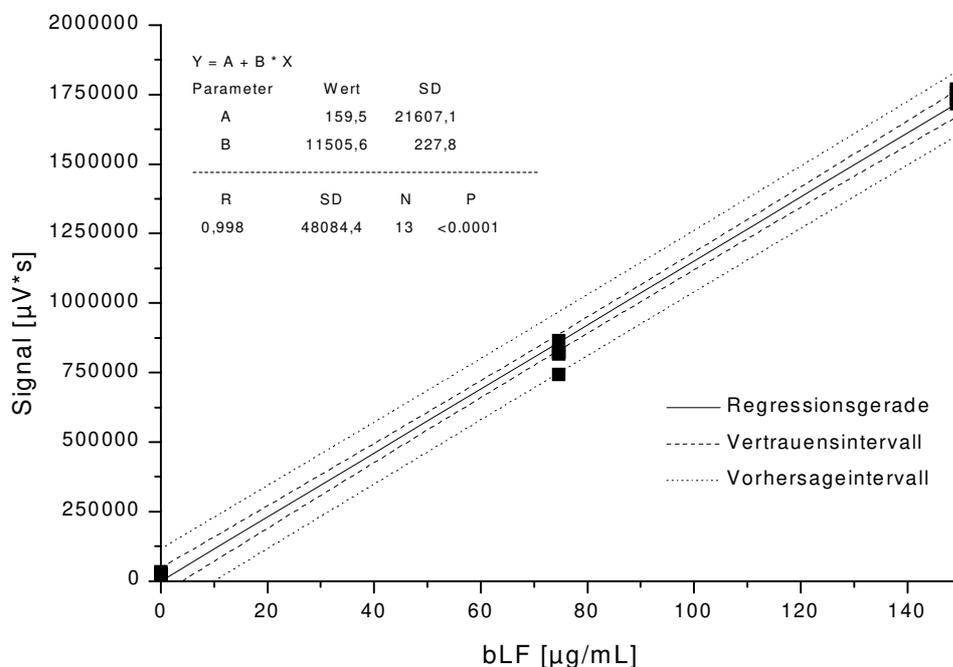
Die Wiederholpräzision innerhalb eines mittelfristigen Zeitraums liegt bei 10 %. Bei den beiden nicht aufgeführten Meßwerten handelt es sich um Ausreißer (Tabelle 3.3).

Tab. 3.3: Mittelfristige Wiederholpräzision von fünf Molkenproben innerhalb einer Meßwoche

Meßtag	Probe 1	Fehler [± µg/mL]	Probe 2	Fehler [± µg/mL]	Probe 3	Fehler [± µg/mL]	Probe 4	Fehler [± µg/mL]	Probe 5	Fehler [± µg/mL]
1	94,9	5,2	94,9	5,2	94,9	5,2	94,9	5,2	94,9	5,2
2	99,3	1,0	108,1	13,8	99,8	1,3	89,1	10,1	107,1	5,6
3	102,8	20,7	108,1	13,8	95,9	6,7	99,4	1,0	100,2	7,6
4	82,3	30,8	104,2	12,5	100,8	14,4	88,6	12,7		
7			109,8	11,2	97,7	11,5	104,3	1,8	102,3	0,2
Mittelwert	94,8	8,9 (10 %)	105,0	6,0 (5,7 %)	97,8	2,5 (2,6 %)	95,3	6,7 (7,0 %)	101,1	5,1 (5,0 %)

3. Die Vergleichspräzision, die sich aus Ringversuchen in unterschiedlichen Laboratorien oder Institutionen ergibt. Sie wird hier aber nicht bestimmt.

Auch die Nachweisgrenze (critical level nach IUPAC), sowie die Erfassungsgrenze (detection limit nach IUPAC) und die Bestimmungsgrenze (quantification limit nach IUPAC) müssen bei der Methodenentwicklung berücksichtigt werden. Sie können aus der Kalibration (Abbildung 3.3) berechnet werden.

**Abb. 3.3: Kalibrationsdaten zur Berechnung von Nachweis- und Erfassungsgrenze**

Die Nachweisgrenze ergibt sich demnach (vgl. Kap. 5.5) zu 13,8 µg/mL, die Erfassungsgrenze zu 27,6 µg/mL und die Bestimmungsgrenze zu 41,8 µg/mL. Die Bestimmungsgrenze kann zwar mit Hilfe der Statistik festgelegt werden, ist jedoch grundsätzlich der Verantwortung des Laborleiters bzw. einer Normung überlassen.

Die Robustheit einer Methode stellt ein weiteres wichtiges Kriterium dar, wobei die Einflüsse auf das System durch Variationen verschiedener Systemparameter untersucht werden, z.B. der Einfluß verschiedener Kationenaustauschersäulen eines oder mehrerer Hersteller. Dieses kann jedoch im Rahmen der universitären Forschung nur selten durchgeführt werden. Vielmehr werden die Parameter Pufferkonzentrationen und pH-Wert des Puffers verändert. Als Pufferkonzentrationen werden 10, 20, 50 und 100 mM Natriumphosphat-Puffer (NaP-Puffer) mit einem pH-Wert von 7 gewählt. Die Quantifizierungen schwanken dabei um maximal 15 % um den Mittelwert. Ansonsten konnte jedoch keine Korrelation zwischen den Pufferkonzentrationen und den Höher- oder Minderbefunden festgestellt werden. Der 20 mM NaP-Puffer wird schließlich als Standardpuffer für die HPLC eingesetzt und der pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0 variiert.

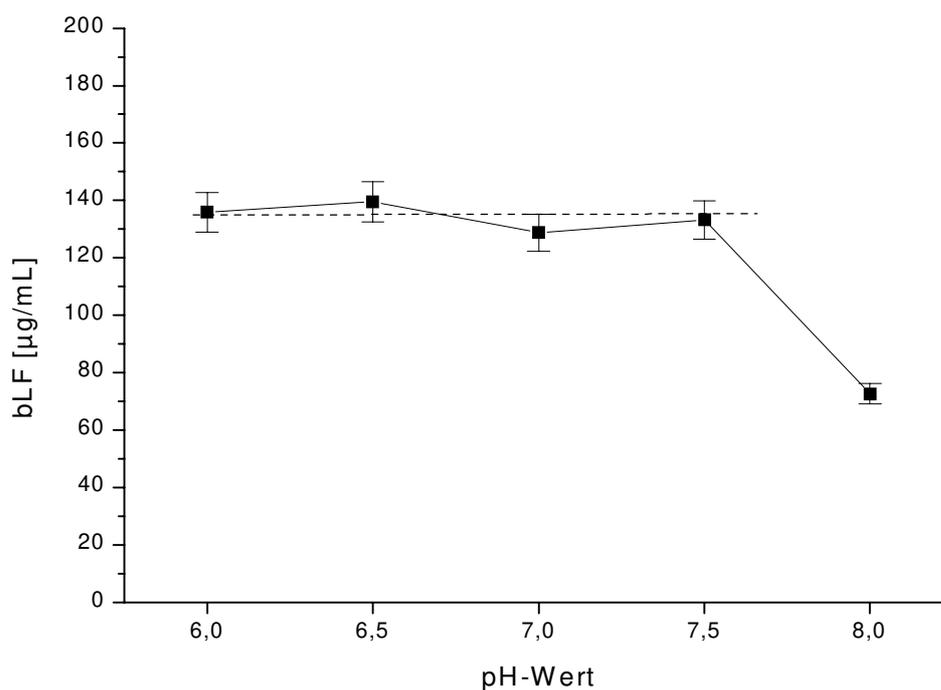


Abb. 3.4: Untersuchung zur Robustheit der HPLC

Aus Abbildung 3.4 ist deutlich zu erkennen, daß im pH-Bereich 6,0 – 7,5 nur ein Fehler von 5 % vorhanden ist, bei pH 8,0 jedoch ein Einbruch in der Quantifizierung um etwa 45 % erfolgt. Dieser hängt mit der Nähe des pH-Wertes zum isoelektrischen Punkt (pI) von 8,4-9,0 des bLF zu-

sammen. Durch geringfügige lokale pH-Änderungen im Bereich der Säule können Teile des Lactoferrins bereits isoelektrisch vorliegen und sich daher der Quantifizierung entziehen. Da auf der anderen Seite bei einem pH von 6,0 andere Molkenproteine bereits kationisch geladen sein könnten und die Gefahr von Höherquantifizierungen besteht, wird der 20 mM NaP-Puffer mit einem pH-Wert von 7 als Standardpuffer definiert.

Die statistischen Untersuchungen zur entwickelten HPLC-Methode wurden am Anfang dieser Dissertation erstellt. Sollte die HPLC im späteren industriellen Prozeß eingesetzt werden, so werden die Methoden regelmäßig gemäß den GMP¹- und QS²-Normen validiert. In der Forschung werden diese Werte jedoch oftmals vernachlässigt und in der Regel gar nicht oder nur einmal bestimmt, zumal die Geräte oft von mehreren Personen benutzt werden. Die ermittelten Daten können daher nur als Richtwerte der Methode betrachtet werden, die aber die gute Spezifität und Robustheit des Systems veranschaulichen.

3.1.1.2 Methodenoptimierung

Die Methodenoptimierung stellt einzig und allein eine Zeitoptimierung dar. Wie aus Abbildung 3.1 rechts zu erkennen ist, dauert die zunächst entwickelte Methode 20 min bis zur Detektion des Lactoferrins. Die Lactoperoxidase (und möglicherweise geringe Verunreinigungen), die bei 8,5 min detektiert wird, stellt ein Nebenprodukt bei der Isolierung über Kationenaustauschermaterialien dar. Sollte die Lactoperoxidase im industriellen Prozeß eine Rolle spielen, so kann die Methode um maximal 8,5 min verkürzt werden. Die Lactoperoxidase wird dann nach etwa 4 min detektiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine optimierte Methode verwendet, nach der Lactoferrin bei einer Retentionszeit von 10,3 min detektiert wird (Abbildung 3.5). Da die Lactoperoxidase zur Zeit das Nebenprodukt darstellt, wird auf dessen Quantifizierung verzichtet. Die Peaks weisen ein relativ großes Tailing auf, weshalb das Fenster bis zum Lactoferrinsignal entsprechend groß gewählt wird. Würden die Signale nicht ausreichend aufgelöst werden und ineinander laufen, bedeutet dies eine Änderung im Grundsignal, was wiederum zu höheren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen führen würde.

¹ GMP: Good Manufacturing Practice

² QS: Qualitätssicherung

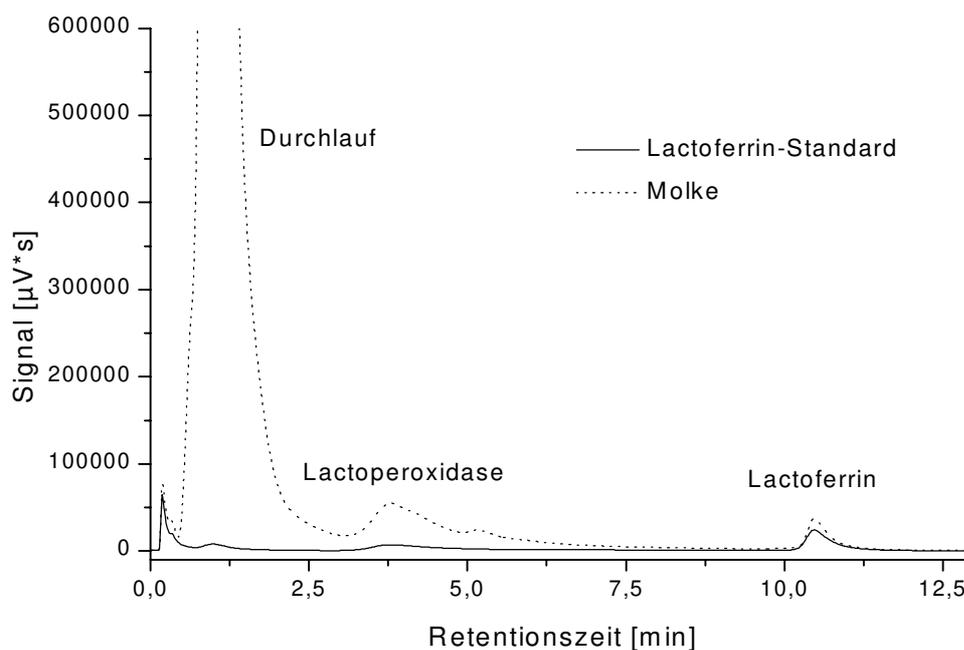


Abb. 3.5: Zeitoptimiertes HPLC-Chromatogramm

Die HPLC ist mit einer Analysendauer von 10,3 min und einer Gesamtlaufzeit (inklusive Equilibrierung) von 28 min nicht intime-fähig. Selbst wenn die Gradienten früher geschaltet werden, ergibt sich immer noch eine Retentionszeit für bLF von etwa 5 min. Die HPLC kann daher nicht für das Controlling eingesetzt werden, erweist sich aber als stabile online Referenzanalytik.

3.1.2 Alternative Analyseverfahren

In diesem Kapitel werden eine Reihe von Analyseverfahren im Hinblick auf ihre Spezifität und ihre Schnelligkeit untersucht. Eine vergleichende Zusammenfassung aller Verfahren ist in Kapitel 3.1.2.8 gegeben.

3.1.2.1 ELISA

Verschiedene Arbeitsgruppen berichten über den Aufbau eines eigenen ELISA für Lactoferrin [BEZWODA ET AL., 1985; LE MAGNEN ET AL., 1989], für die Untersuchungen in dieser Arbeit wird jedoch ein kommerziell erhältlicher „Bovine Lactoferrin ELISA KIT“ (Bio-X, Brüssel, Belgien) verwendet. Die monoklonalen bLF-Antikörper sind auf einer 96er Mikrotiterplatte immobilisiert.

Nach Inkubation mit den bLF-haltigen Proben wird ein mit Peroxidase gelabelter polyklonaler bLF-Antikörper hinzugefügt und abermals inkubiert. Das Substrat (Wasserstoffperoxid) und das Chromogen (Tetramethylbenzidin, TMB) werden zugegeben und anschließend die Absorption bei 450 nm gemessen.

Der ELISA ist sehr zeitaufwendig, dafür aber auch sehr empfindlich. Er wird in der Regel als Referenzanalyse von der FDA¹ akzeptiert. Ein Kit (2 Mikrotiterplatten) kostet zur Zeit ca. 300,- DM, wobei die Platten nur einmal verwendbar sind. Der ELISA wird daher vor allem während des Aufbaus einer alternativen Standardanalytik eingesetzt (vgl. Kap. 3.1.2.8).

3.1.2.2 Kapillarelektrophorese

In der Literatur ist eine Vielzahl von Veröffentlichungen zum Thema Molkenanalytik erschienen; dabei handelt es sich größtenteils um Quantifizierungen von majoren Proteinen. So konnte durch Minimierung der Protein-Wand-Wechselwirkungen durch Salzzugabe [LAUER & MCMANIGALL, 1986] eine Auftrennung der majoren Proteine erreicht werden [RECIO ET AL., 1995]. PATERSON ET AL. [1995] gelang sogar die Identifizierung verschiedener Genotypen von β -Lactoglobulin und Casein in beschichteten Kapillaren. Die Analytik von LF in humaner Milch zeigten DE JONG ET AL. [1993], allerdings gehört hier das LF mit 7 mg/mL zu den majoren Proteinen. Die Bestimmung von bovinem Lactoferrin, das gegenüber den Molkenproteinen eine etwa 70-fach geringere Konzentration aufweist, ist jedoch ausgesprochen schwierig [RIEHEL ET AL., 1998].

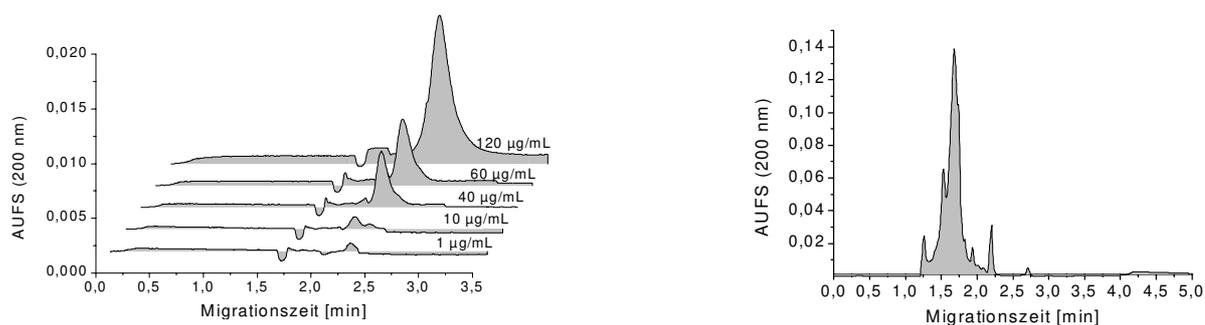


Abb. 3.6: Elektropherogramme von bLF-Standard (links) und Molke (rechts) [RIEHEL, 1998]
Spannung: 10 kV; Temperatur: 25 °C, Kapillare: 50 μ m x 27 cm fused silica; 5 sec Druckinjektion; CE-Puffer: 40 mM Borat pH 9,0; Probe: 1-120 μ g/mL bLF (Fluka) in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4

¹ FDA: Food and Drug Administration

Die Elektropherogramme von bLF-Standard und einer Molkenprobe zeigt Abbildung 3.6. Es sind fünf unzureichend aufgelöste Signale bei der Molke erkennbar. Lactoferrin migriert bei 2,2 min, eine Quantifizierung ist unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht möglich. Neben Variationen im pH-Wert des Boratpuffers (pH 9,0 – 10,6 und < 2) wurden auch Salzadditive und micellare Puffer eingesetzt; es konnte jedoch entweder keine ausreichende Auftrennung der Proteine erreicht werden, oder das System erwies sich als zu unempfindlich [RIECHEL, 1998].

Um auf die wesentlich empfindlichere Detektion mit Laser-induzierter Fluoreszenz zurückgreifen zu können, wurde ein CE-Immunoassay mit polyklonalen FITC¹-markierten anti-Lactoferrin Antikörpern aufgebaut. Mit der Affinitäts-Kapillarelektrophorese konnte allerdings auch nach Umpolung der Elektroden kein zusätzliches Signal des Antikörper-Antigen-Komplexes nachgewiesen werden. Die Quantifizierung erfolgte daher indirekt über die Abnahme der Fläche des Antikörpersignals. Ein Beispiel für eine Kalibration findet sich in Abbildung 3.7. Sind die Antigenbindungsstellen des Antikörpers besetzt, zeigt sich eine Stagnation der Peakflächenabnahme; es ergibt sich eine exponentielle Kalibrationsfunktion. Durch eine höhere Antikörperkonzentration kann dieser Umstand beseitigt werden, andererseits kann daraus die Schlußfolgerung gezogen werden, daß der Antikörper und der Immunkomplex migrieren und eine unterschiedliche Fluoreszenzaktivität aufweisen. Die Migrationszeit des Komplexes liegt bei 2,5 min und kann durch Erhöhung der Spannung auf 0,6 min gesenkt werden.

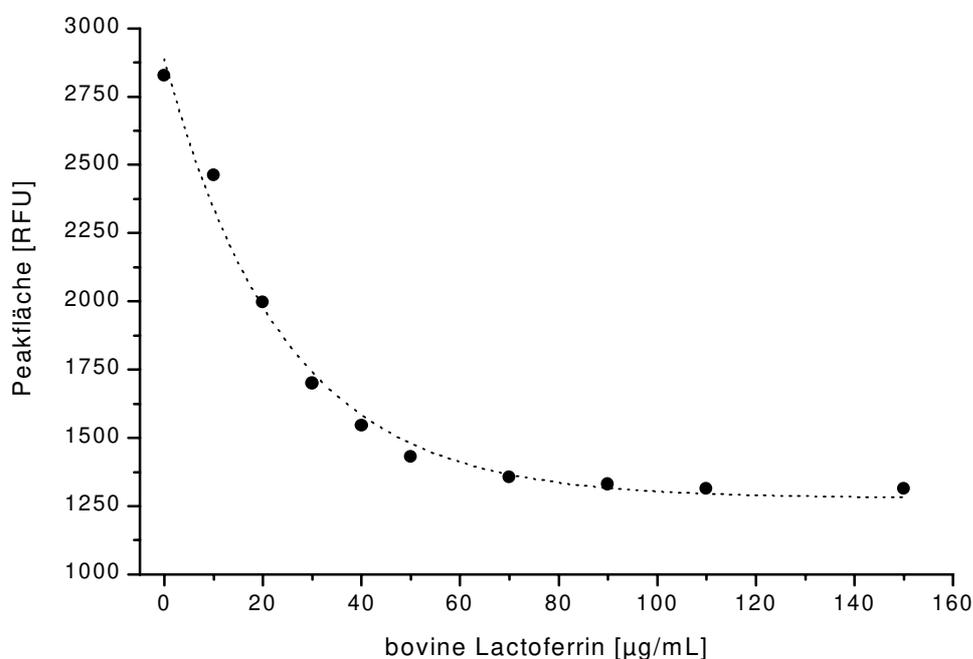


Abb. 3.7: Kalibrationsfunktion für den Immunkomplex [RIECHEL, 1998]

¹ FITC: Fluoresceinisothiocyanat

Ein Vergleich der ACE-Daten mit ELISA-Messungen (Tabelle 3.3) zeigt, daß bei drei Molkenproben (3, 4 und 6) nur eine Abweichung von unter 10 % besteht. In den anderen Proben weichen die ACE-Werte aber um bis zu 60% ab. Dabei gibt es keine generelle Tendenz zu Minder- oder Höherbefunden, sondern die Werte streuen in beide Richtungen, in zwei Fällen gibt es Minderbefunde und in einem Fall einen Höherbefund.

Tab. 3.3: Vergleich ACE/ ELISA Daten [RIEHEL, 1998]

	Molke 1	Molke 2	Molke 3	Molke 4	Molke 5	Molke 6
ELISA	116,24	124,70	117,91	113,87	126,49	99,50
[µg/mL]	+/- 2,44	+/- 3,20	+/- 3,32	+/- 3,39	+/- 2,00	+/- 7,54
CE-Immunoassay	164,12	56,10	112,24	121,07	70,81	107,19
[µg/mL]	+/- 5,42	+/- 1,53	+/- 1,54	+/- 0,94	+/- 3,86	+/- 4,39
Δc [µg/mL]	47,9	68,6	5,7	7,2	55,7	7,7

Im Verlauf weiterer Untersuchungen konnte diese uneinheitliche Tendenz zu Minder- und Höherbefunden nicht beseitigt werden. Die ACE wurde aufgrund dieser Ergebnisse nicht weiter für die Lactoferrin-Analytik eingesetzt, obwohl sie durch ihre kurzen Analysenzeiten (1 bis 2 min) intime-fähig ist. Da die Kapillarzonenelektrophorese (CZE oder CE) nur eine unzureichende Trennung gewährleistet, ist ihr Prozeßeinsatz erst ab der Lactoferrin-Isolierungsstufe möglich. Die intime-Analytik ist zur Überwachung des Durchbruchverhaltens der Membranadsorber während der Molkenauftragung erforderlich, im abschließenden Downstreaming kann jedoch auf eine intime-Analytik verzichtet werden.

3.1.2.3 Membranadsorber

Wie bereits erwähnt, steht die Wertschöpfung aus Molke über Membrantechnologien am Beispiel von Lactoferrin im Vordergrund dieser Arbeit. Aufgrund der Projektnähe wird daher der Versuch unternommen, eine Analytik auf der Basis der Membranadsorber aufzubauen. Es handelt sich dabei um den gleichen Membrantyp (Sartobind® S, starker Kationenaustauscher mit Sulfopropylgruppen) wie bei der Gewinnung von bLF. Allerdings werden für die Isolierung zylindrische Wickelmodule der „Factor Two Family“ (vgl. auch Kap. 3.3) eingesetzt, für die analy-

tische Seite wird auf kleinere Module vom Typ S15 (5 Lagen zu 3 cm²) bzw. S100 (5 Lagen zu 20 cm²) zurückgegriffen (Abbildung 3.8).

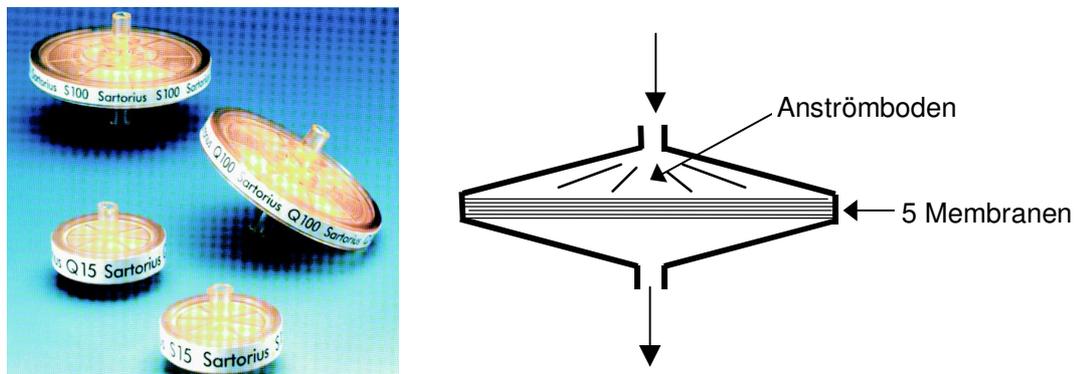


Abb. 3.8: links: Sartobind S15 und S100 der Firma Sartorius (Quelle: Sartorius)
rechts: Aufbau der Sartobind S Module [KOSEMUND, 1998]

Die kovalent gebundenen Sulfonylgruppen sind an den Poreinnenoberflächen lokalisiert. Da es sich um ein mikroporöses Material auf Cellulosebasis mit Porengrößen $\geq 3 \mu\text{m}$ handelt, ist eine Porendiffusionskinetik vernachlässigbar. Dadurch entstehen selbst bei Flußraten über 1 mL/min nur geringe Gegendrücke. Die Versuche können somit auf einer Niederdruckanlage der Firma BioRad (Biologic LP, BioRad, München, Deutschland) durchgeführt werden.

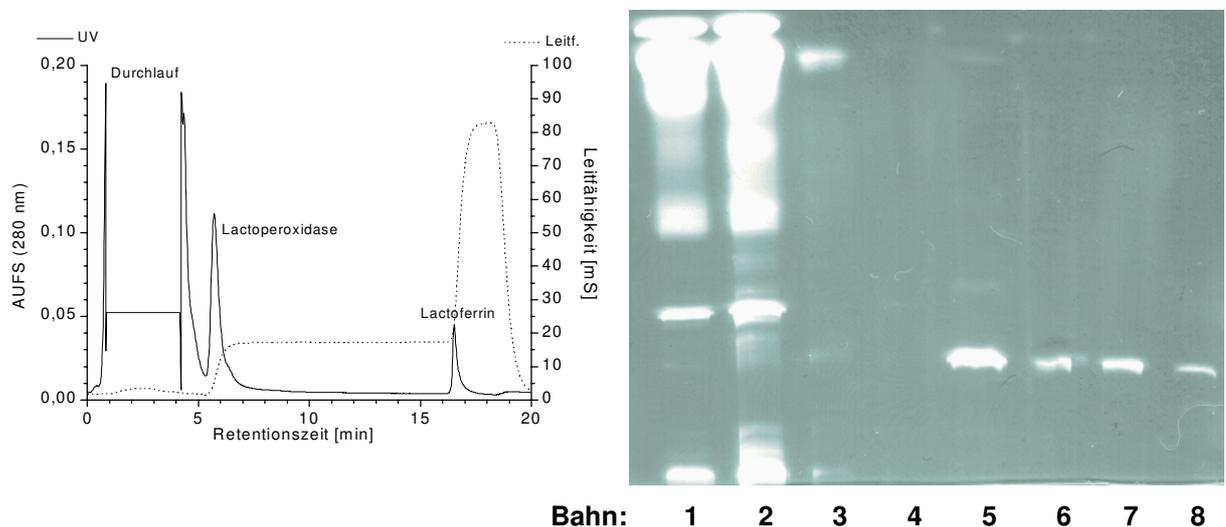


Abb. 3.9: links: LPLC-Chromatogramm einer Molkenprobe
Probenauftragung 1 mL/min (2 min), anschließend 4 mL/min Flußrate
rechts: Kontrolle der LPLC-Fractionen mit SDS-PAGE 12,5% homogen, Silberfärbung;
Bahn 1: Molke (1:10 verdünnt), 2: Durchlauf, 3 + 4: 0,3 M NaCl Fraktion, 5: bLF-Standard 100 $\mu\text{g/mL}$, 6 - 8: 1,0 M NaCl-Fraktion [KOSEMUND, 1997]

Ebenso wie bei der HPLC wird auch bei der Membranadsorber-Analytik nach der Methodenoptimierung ein 20 mM NaP-Puffer pH 7,0 verwendet. Auch das Chromatogramm zeigt ein identisches Erscheinungsbild (Abbildung 3.9 links). Nach dem Durchlauf der nicht oder anionisch geladenen Komponenten, folgt bei einem Gradienten von 0,3 M NaCl die Lactoperoxidase-reiche Fraktion, bei 1,0 M NaCl das Lactoferrin. Die SDS-PAGE (Abbildung 3.9 rechts) zeigt, daß β -Lactoglobulin in der Lactoperoxidase-Fraktion (Bahn 3) vorhanden ist, in der Lactoferrin-Fraktion (Bahn 6-8) jedoch nicht mehr.

Die Analysendauer kann auch hier optimiert werden, sofern auf eine Quantifizierung der Lactoperoxidase verzichtet werden kann. Dann ist eine Quantifizierung des Lactoferrins nach 7 bis 8 min möglich. Es ist jedoch trotz der höheren Flußraten nicht möglich, die Membranadsorber für eine intime-Analytik einzusetzen. Zum Vergleich der LPLC mit anderen Analysenverfahren siehe Kapitel 3.1.2.8.

3.1.2.4 2D-Fluoreszenz

Die 2D-Fluoreszenz ist eine sehr schnelle optische Analysenmethode. In einem Wellenlängenbereich von 200 – 500 nm (Schrittweite 10 nm) werden π -Elektronen angeregt (Exzitation, Ex) und die jeweiligen Emissionsspektren (Em) aufgenommen. Je größer dabei der Anteil an aromatischen und/oder π -Elektronensystemen im Molekül ist, desto charakteristischer ist die Fluoreszenz. Die Aufnahme eines kompletten Spektrums, wie es in Abbildung 3.10 für Molke dargestellt ist, dauert etwa 1 min. Die 2D-Fluoreszenz erfüllt daher die Grundvoraussetzung für ein Prozeßcontrolling. In dem Konturdiagramm (Abbildung 3.10) zeigen die roten Balken den Streulichtbereich bei Emission = Exzitation und Emission = 2 x Exzitation. Die Wellenlängenpaare Ex/Em=450/510 nm und 370/510 nm sind charakteristisch für Riboflavin (Vitamin B₂), bei 320/410 nm ist Vitamin B₆ zu erkennen.

Proteine zeigen geringe Fluoreszenzaktivität im Bereich 290/330 nm, sofern bestimmte Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin) in der Sequenz vorhanden sind, hier ist auch das Lactoferrin zu finden (Abbildung 3.11 links). Die 2D-Fluoreszenz ist zwar sehr empfindlich (Proben müssen teilweise um den Faktor 100 verdünnt werden) aber auch unselektiv in Bezug auf Lactoferrin. Um die störenden Molkenproteine zu entfernen, wird zweckmäßigerweise ein starker Anionenaustauscher (Sartobind[®] Q100, Sartorius, Göttingen) vorgeschaltet (Abbildung 3.11 rechts). Da das Wellenlängenpaar (290/330 nm) bekannt ist, kann auf die Aufnahme eines Gesamtspektrums verzichtet und Lactoferrin so innerhalb weniger Sekunden quantifiziert werden

(vgl. hierzu auch Kap. 3.1.2.8). Weitere Optimierungen, auch in Hinblick auf das Problem Lactoferrin/kationische Komponenten (Lactoperoxidase) und die Prozeßankopplung sind Teil laufender Untersuchungen [STEUER, 1999]. Die 2D-Fluoreszenz besitzt aber momentan das größte Potential im Hinblick auf das Prozeßcontrolling.

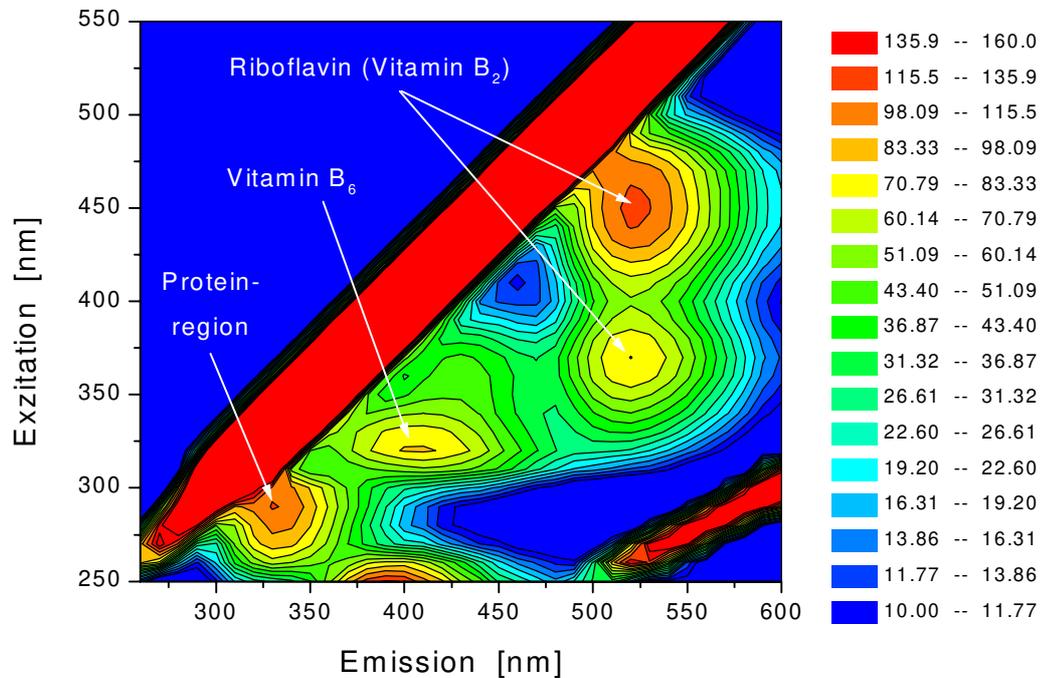


Abb. 3.10: 2D-Fluoreszenz-Konturplot einer Molkenprobe [STEUER, 1999]

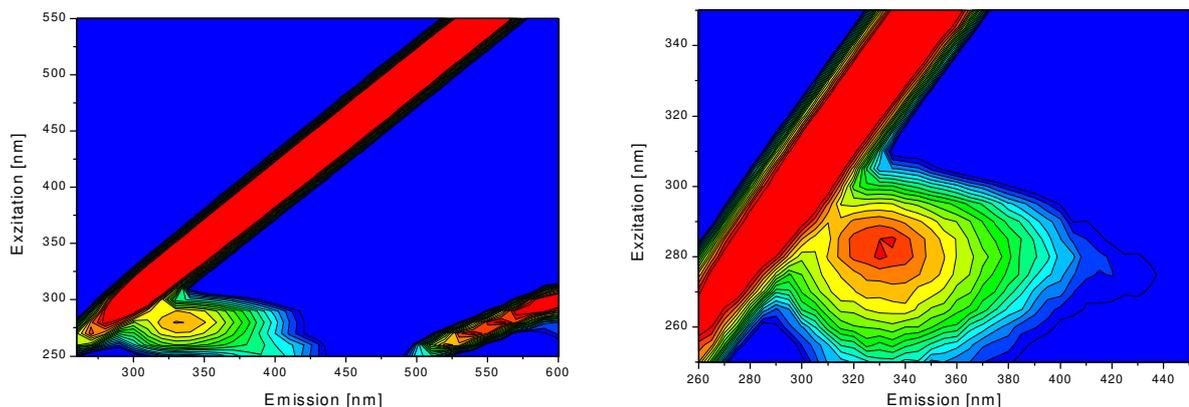


Abb. 3.11: 2D-Fluoreszenz-Konturplot von Lactoferrin-Standard und Molke nach Anionenaustauscher Sartobind Q100 [STEUER, 1999]

links: Lactoferrin-Standard, Scan über das gesamte Spektrum

rechts: Molke nach Anionenaustauscher, optimierter Scanbereich

3.1.2.5 Lactoperoxidase-Assay

Lactoperoxidase fällt bei der Lactoferrin-Isolierung als Nebenprodukt an. Auf eine Quantifizierung der LP wird verzichtet. Da es sich aber um ein Enzym handelt, wird ein Assay zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt, der indirekt auch Aufschluß über die Mengenverhältnisse in den Eluaten geben kann. Lactoperoxidase ist ein Hämenzym, es hat katalytische Funktion bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser [STRYER, 1991]. Auf dieser Reaktion basiert auch der enzymatische Assay. Dabei wird die Reaktion von H_2O_2 mit ABTS¹ katalysiert [PÜTTER & BECKER, 1983] und bei 405 nm verfolgt. Nach Gleichung 5.1 (Kap. 5.1.5) kann so auf die Units/L geschlossen werden.

Angewendet wird der Assay vorwiegend bei der Gradientenoptimierung in der Isolierungsstufe, hier sind nur die relativen Anteile der LP in den Einzelfractionen von Interesse, nicht jedoch die absoluten Gehalte.

3.1.2.6 SDS-PAGE

Die PAGE ist aufgrund der langen Laufzeiten (ca. 30 min + 45 min Entwicklung) von vornherein nicht für die Prozeßsteuerung vorgesehen. Durch ihre hohe Empfindlichkeit und ihre gute Auflösung eignet sie sich aber hervorragend für qualitative Aussagen über die Reinheit einer Probe. Mit der Silberfärbemethode können Verunreinigungen bis etwa 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nachgewiesen werden, während die Coomassie-Färbung nur bis ca. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reicht.

Es gibt Densimeter für die Gelelektrophoresesysteme, um die Gele zu scannen und so zu quantifizieren. Die Quantifizierung verschiedener Molkenproteine und verschiedener Genotypen der Caseine wurde mit dieser Methode eingehend untersucht [BASCH ET AL., 1985]. Leider stand ein solches Gerät nicht zur Verfügung. Im Rahmen einer Diplomarbeit [MÜNSTERMANN, 1998] wurde daher eine andere Quantifizierungsmethode ausprobiert. Dabei wurde das entwickelte Gel mit einem DIN A4-Flachbettscanner eingescannt und mit einer Bildverarbeitungssoftware (Optimas 5, Optimas Corporation, Seattle, USA) quantifiziert. In Abbildung 3.12 sind zwei Kalibrationen mit Lactoferrin dargestellt. Ab einer Konzentration von etwa 70 – 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bLF geht die Funktion in einen Sättigungsbereich über. Der lineare Meßbereich ist daher stark eingeschränkt. Außerdem sind die Kalibrationen parallel auf der x-Achse verschoben. Durch Extrapolation (gestrichelte Linien) der Kalibrationsfunktionen werden dem Absorptionwert Null be-

¹ ABTS: 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6))

reits Konzentrationen um 50 µg/mL zugeordnet. Dieses Verhalten kann nur durch unterschiedliche Hintergrundfärbungen der Gele erklärt werden.

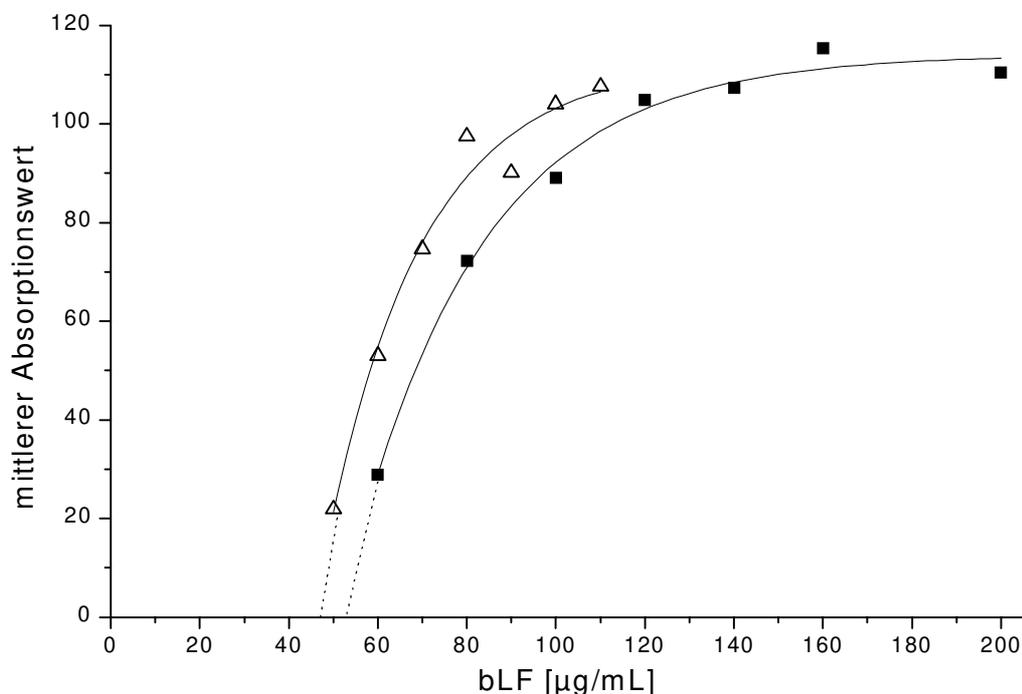


Abb. 3.12: Vergleich zweier Kalibrationen mit Lactoferrin-Standard nach Optimas-Auswertung [MÜNSTERMANN, 1998]

Das Problem der Methode liegt in der Auswertungssoftware. So können die Eigenschaften der Gele variieren, was sich in einer unterschiedlichen Entwicklung der Banden und des Gelhintergrundes bemerkbar macht. Je mehr der Hintergrund entfärbt wird, desto mehr werden auch die Proteinbanden aufgehellt. Bei einem Laserscanner wird das komplette Gel eingescannt und der Hintergrund entsprechend herausgerechnet. Mit der verwendeten Optimas-Software ist dies jedoch nicht möglich, da die Proteinbanden vor der Auswertung markiert werden müssen. Daher kann es allein aufgrund der Hintergrundfärbung/-entfärbung zu verschiedenen Quantifizierungen kommen. Die PAGE wird daher nur qualitativ verwendet, um Aussagen über Verunreinigungen der einzelnen Fraktionen treffen zu können.

Die Bandenzuordnungen zu den Molkenproteinen sind in Abbildung 3.13 in Laufrichtung (von unten nach oben) dargestellt. Die inverse Darstellung wird nur für die bessere Unterscheidung verwendet.

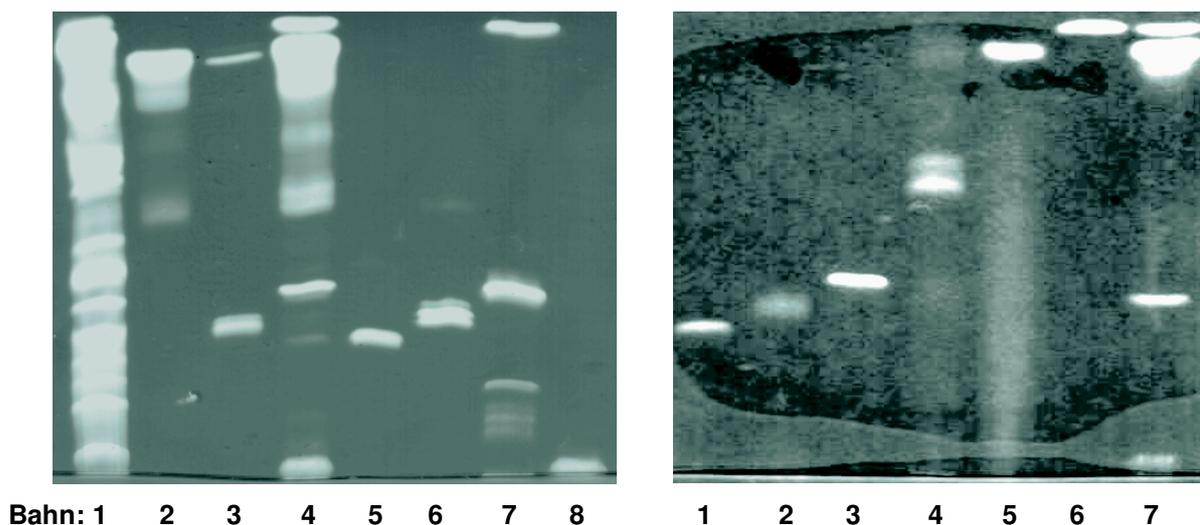


Abb. 3.13: SDS-PAGE von Molkenproteinen; 12,5% homogen, Silberfärbung, für alle Standards 100 µg/mL

links: Bahn 1: M_w -Standard, 2: β -Lactoglobulin (β -LG), 3: Lactoperoxidase (LP), 4: Molkenkonzentrat (1:5 verdünnt), 5: Lactoferrin (LF), 6: Transferrin (TF), 7: Bovine Serum Albumin (BSA) + α -Lactalbumin (α -LA), 8: bov. IgG [KOSEMUND, 1997]

rechts: Bahn 1: Lactoferrin (LF), 2: Lactoperoxidase (LP), 3: Bovine Serum Albumin (BSA), 4: Casein (500 µg/mL), 5: β -Lactoglobulin (β -LG), 6: α -Lactalbumin (α -LA), 7: Dünnmolke (1:5 verdünnt) [WALDEN, 1999]

Die zugehörigen R_f -Werte sind in Tabelle 3.4 zusammengefaßt. Lediglich Lactoperoxidase und Transferrin können aufgrund ihrer ähnlichen Molekulargewichte nicht unterschieden werden. Außerdem kann bei Konzentrationen > 100 µg/mL der Bereich um 80 kDa nicht mehr aufgelöst werden, so daß nur qualitative Aussagen zu den Verunreinigung durch die majoren Molkenproteinen gemacht werden können.

Tab. 3.4: R_f -Werte von Molkenproteinen in der 12,5% SDS-PAGE [WALDEN, 1999]

Protein	M_w [kDa] (Literaturwerte)	R_f -Werte	C Ag-Färbung [µg/mL]	C Coomassie Blue -Färbung [mg/mL]
α -Lactalbumin	14,2	0,96	100	1
β -Lactoglobulin	18,4	0,92	100	1
Caseine	20-24 40-48 (dimer)	0,62-0,66 (dimer)	500	3
Bov. Serum Albumin	66,2	0,42	100	1
Lactoperoxidase	73	0,35	200	3
Transferrin	73	0,35	100	1
Lactoferrin	83	0,30	100	1
Immunglobulin G	150	0,00	100	1

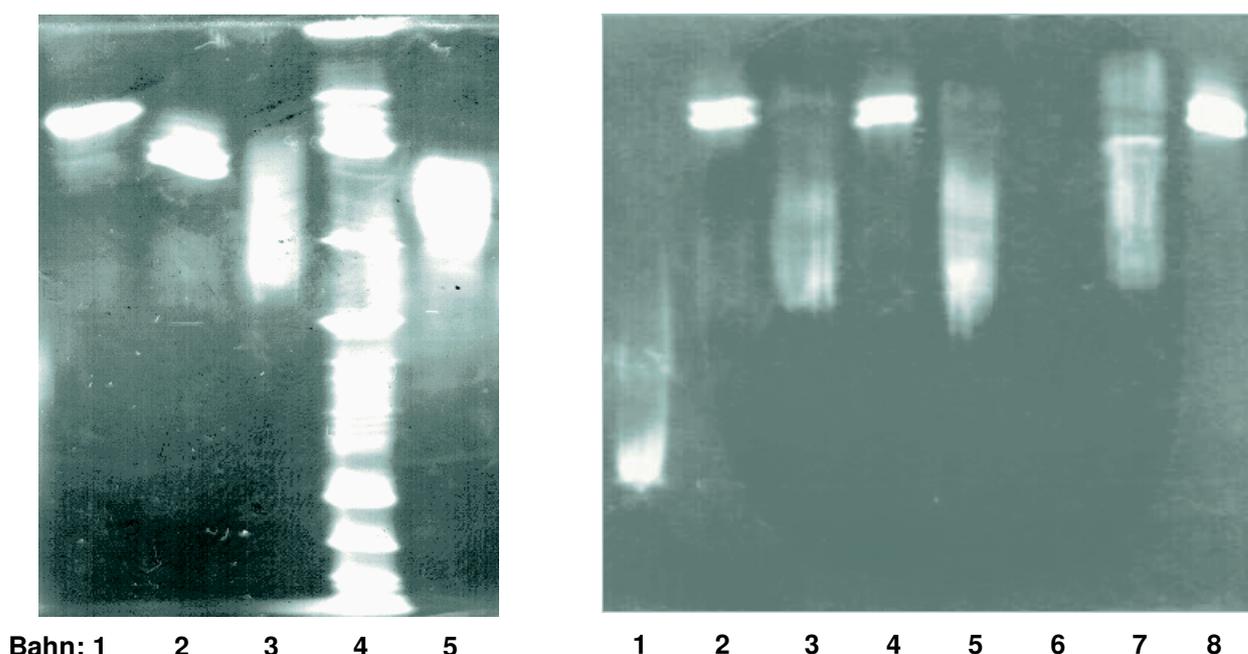


Abb. 3.14: SDS-PAGE, IEF-Gel pH 3-9, Silberfärbung

links: Bahn 1: Bovine Serum Albumin, 2: β -Lactoglobulin, 3: Lactoferrin, 4: IEF-Standard, 5: Transferrin; alle Proteine 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [KOSEMUND, 1997]
 IEF-Marker : pI 3,6 Amyloglucosidase (*Aspergillus niger*), pI 4,6 Trypsin Inhibitor (Soybean), pI 5,1 β -Lactoglobulin (bovine milk), pI 5,4 + pI 5,9 Carboanhydrase (bovine Erythrocyten), pI 6,6 Carboanhydrase (human Erythrocyten), pI 7,2 Myoglobin (Horse Heart), pI 8,2 + pI + 8,6 + pI 8,8 Lentil Lectin (*Lens Culinaris*), pI 9,3 Trypsinogen (bovine Pancreas)

rechts: Bahn 1, 3, 7: isoliertes Lactoferrin (LF), 5: Morinaga-bLF, 2, 4, 8: β -Lactoglobulin, 6: leer; alle Proteine 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [WALDEN, 1999]

Es wurden Untersuchungen durchgeführt, den isoelektrischen Punkt (isoelektrische Fokussierung, IEF-Gel 3-9) von Lactoferrin zu bestimmen [KOSEMUND, 1997; WALDEN, 1999]. In Abbildung 3.14 links sind als Vergleich BSA (pI 4,8) und β -Lactoglobulin (pI 5,1) aufgetragen. Diese Proteine wandern im pH-Gradient bis zu ihren isoelektrischen Punkten, während das Lactoferrin nur eine verschmierte Bande zeigt. In Abbildung 3.14 rechts werden die Auftragungsorte der Proben von Lactoferrin und β -Lactoglobulin variiert. Die Bahnen 1 und 2 werden im basischen (unten), die Bahnen 3 bis 5 im neutralen (mittig) und die Bahnen 7 und 8 im sauren Bereich (oben) aufgetragen. Das β -Lactoglobulin wandert von allen Auftragungsorten in seinen isoelektrischen Bereich (pI 5,1 – 5,4), während das Lactoferrin nur geringfügig um seinen Auftragungspunkt wandert. Eine konkrete Aussage zum isoelektrischen Punkt von bLF kann daher nicht getroffen werden.

3.1.2.7 MALDI-MS

In der MALDI-MS kommt der Matrix eine entscheidende Bedeutung zu. Sie ist für die Desorption und die Ionisation des Analyten erforderlich und besitzt ein hohes Absorptionsvermögen bei der verwendeten Laserwellenlänge. Das Kompakt Maldi 3 (Kratos Analytical) besitzt einen Stickstofflaser (337 nm), für dessen Wellenlänge sich besonders α -Cyano-4-hydroxymizsäure (α -Cyanomizsäure), Sinapinsäure (trans-3,5-Dimethyl-4-hydroxymizsäure) und 1,4-Dihydroxybenzoesäure (DHB) [BAHR ET AL., 1994] als Matrix eignen.

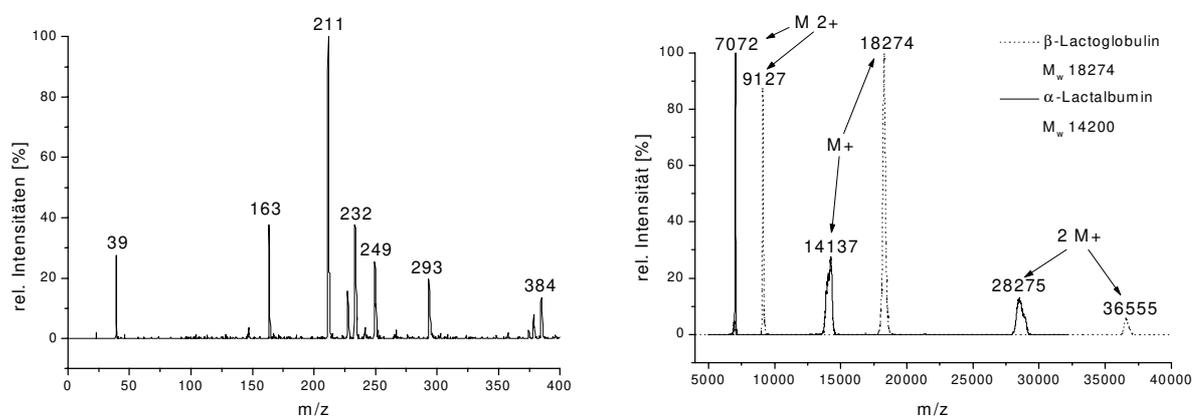


Abb. 3.15: MALDI-Spektren von α -Cyanomizsäure (links) und kleinen Molkenproteinen (rechts) [WALDEN, 1999]

links: 10g/L in Acetonitril (ACN)/ 0,1% TFA 2:1 (v/v), 20 Einzelschüsse (ES)

rechts: α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin 100 μ g/mL in Acetonitril (ACN)/ 0,1% TFA 2:1 (v/v), 20 Einzelschüsse (ES)

Bei einem Vergleich der Spektren dieser Substanzen zeigen die der α -Cyanomizsäure die höchsten Intensitäten, weshalb α -Cyanomizsäure als Standardmatrix verwendet wird (Abbildung 3.15 links). Die Matrix ist bekannt dafür, daß mehrfach geladene Signale und Polymere (vor allem bei kleineren Molekülen < 20 kDa) im Spektrum vorhanden sind (Abbildung 3.15 rechts).

Die Spektren der größeren Proteine (BSA, LP, LF) zeigt Abbildung 3.16. BSA eignet sich, da es nicht glykosiliert ist, hervorragend zur Masse-Kalibration. Es wird aber auch deutlich, daß aufgrund der hohen Anzahl mehrfach geladener Peaks eine eindeutige Zuordnung der Signale unterhalb von 30 kDa schwierig wird, da neben den kleineren Proteinen hier auch die mehrfach geladenen Signale der großen Proteine (bLF, LP, BSA) liegen. Weiterhin ist zu erkennen, daß die Auflösung der Peaks (Breite des Peaks auf halber Höhe) mit höheren Massenbereichen

stark abnimmt. Sind kleinere Proteine wie α -LA oder β -LG in der Probe vorhanden, werden die bLF-Signale deutlich intensitätsschwächer. Hier wird mit Standards identischer Konzentrationen gearbeitet, in Realproben wie Molke ist daher Lactoferrin oder Lactoperoxidase kaum noch zu detektieren, da α -LA (14,2 kDa) und β -LG (18 kDa) in erheblich höheren Konzentrationen vorliegen (zusammen etwa $\frac{3}{4}$ der Molkenproteinfraktion).

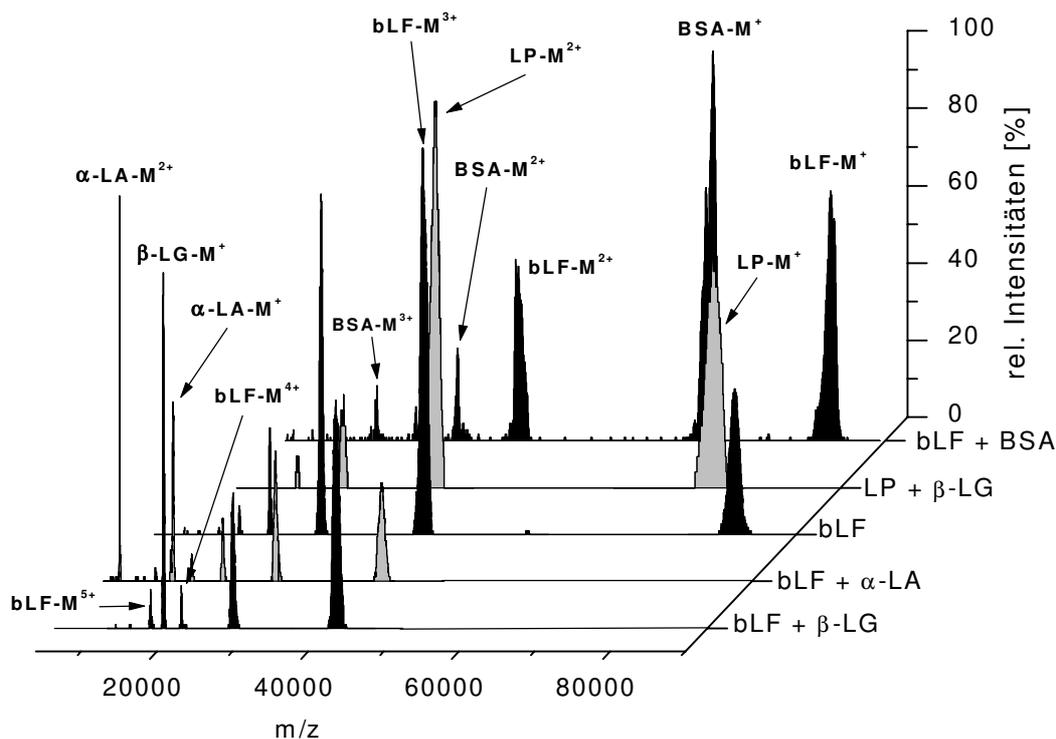


Abb. 3.16: MALDI-Spektren der Molkenproteine (Standards)

Die Spektren bLF + α -LA sowie bLF + β -LG sind nur bis 50 kDa dargestellt
bLF und BSA in allen Proben 1 mg/mL, LP 2 mg/mL, α -LA und β -LG 50 μ g/mL

Eine Quantifizierung ist mit dem verwendeten Gerät nicht möglich. Bei Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Lactoferrin-Signale (Abbildung 3.17), zeigen sich Abweichungen vom Mittelwert in den Peakflächen von 36,2 % (M^+ -Peak), 21,1 % (M^{2+} -Peak), 16,3 % (M^{3+} -Peak) und von 19,5 % (Summe M^+ - M^{3+} -Peak). Die Ursache dieser Streuungen liegt in der Kristallisation des Analyten in der Matrix. Dabei ergeben sich Orte mit guter Kristallisation („hot spots“) und mit weniger guter Kristallisation. Um eine bessere Reproduzierbarkeit zu erhalten, müßte der gesamte Analyt in der Matrix kristallisiert sein und erfaßt werden können. Was für Standards noch möglich sein könnte, erweist sich aber in Realproben als äußerst schwierig. Hier wirken sich vor allem ein- und zweiwertige Salze störend bei der Kristallisation aus, aber auch kleinere Proteine werden wesentlich leichter in die Kristallmatrix eingebunden als große Proteine wie Lactopero-

xidase, Lactoferrin und Immunglobuline. Die Quantifizierung von Lactoferrin mit MALDI-MS [NELSON ET AL., 1994] ist zumindest mit dem Kompakt Maldi 3 nicht möglich. Die Anwendung des MALDI-MS beschränkt sich daher auf qualitative Aussagen zu den Eluaten aus der Lactoferrin-Isolierung.

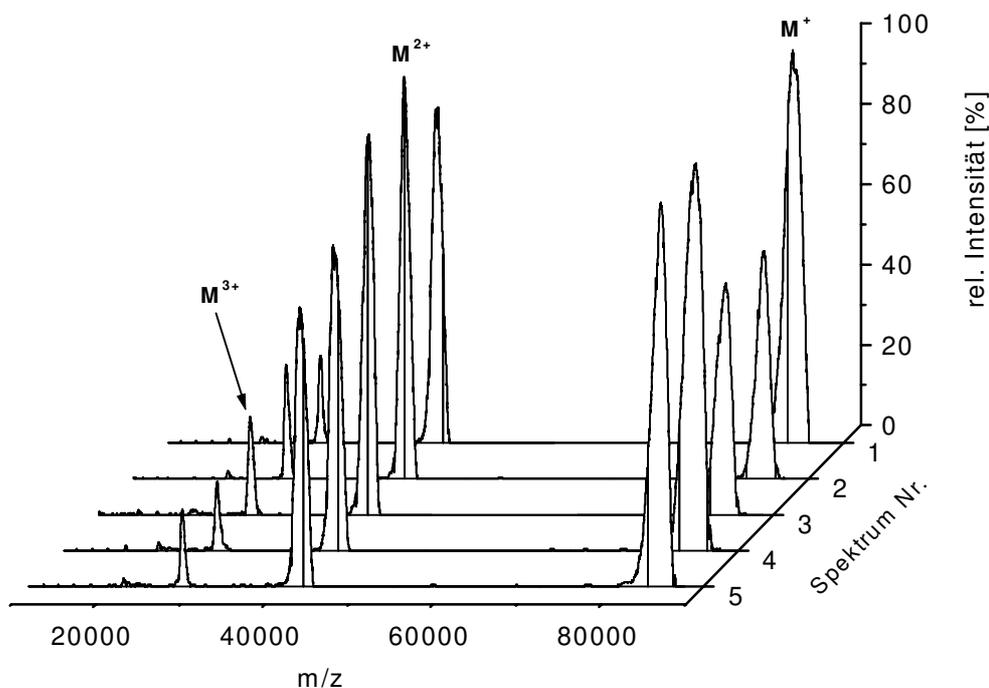


Abb. 3.17: Reproduzierbarkeit der MALDI-Messungen mit bLF-Standard [WALDEN, 1999]

3.1.2.8 Vergleich der Analysenverfahren

Wie bereits erwähnt, eignen sich die SDS-PAGE und MALDI-MS aufgrund der oben aufgeführten Gründe nicht zur Quantifizierung von Lactoferrin. Sie werden daher nur für qualitative Aussagen verwendet. Für einen Vergleich kommen daher nur die hochspezifischen Verfahren (ELISA und ACE) und die klassischen chromatographischen Verfahren (HPLC und LPLC) in Frage. Der ELISA dient dabei nur als erste Referenzmethode, da er zum einen teuer ist und zum anderen auch aufgrund der langen Vorbereitungsdauer (offline) nur schwer automatisierbar ist. Für den Vergleich werden sechs verschiedene Molkenproben herangezogen (Abbildung 3.18), die ELISA-Daten sind dabei als waagerechte Balken ohne Standardabweichung (Referenz) dargestellt. Die ermittelten Daten werden prozentual dargestellt (ELISA = 100 %).

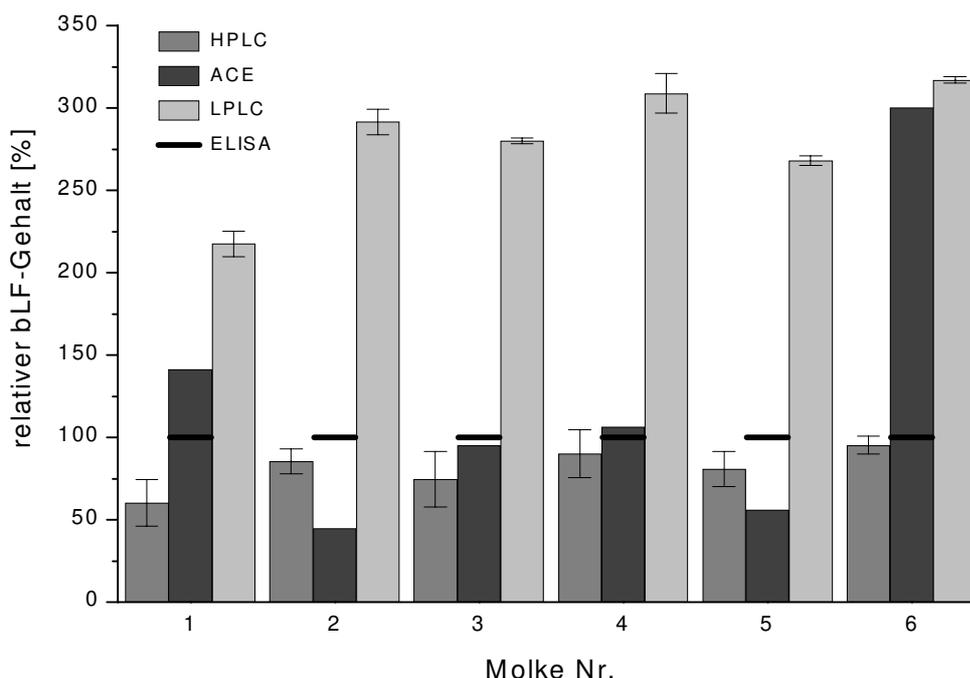


Abb. 3.18: Vergleich von HPLC-, ACE- und LPLC-Werten mit ELISA-Daten

Es fällt auf, daß die HPLC-Werte einen generellen Minderbefund quantifizieren. Die Abweichung ist in Molke 1 mit 40 % am größten, ansonsten weichen die HPLC-Befunde um max. 25 % von den ELISA-Werten ab. Eine zweite generelle Tendenz liegt in den Höherbefunden der Membranadsorber (LPLC), die bei 120 – 220 % liegt. Die LPLC liefert also 2 –3 fach zu hohe Werte in ihren Analysen. Die ACE schwankt in ihren Befunden (vgl. auch Kap. 3.1.2.2) um bis zu 60 %, sowohl zu Höher- als auch zu Minderbefunden (Molke 6: 200%). Ein Problem ist wahrscheinlich der exponentielle Verlauf der Kalibrationen bei der ACE. Obwohl die Proben in den linearen Meßbereich verdünnt werden müssen, können schon geringe Fluoreszenzschwankungen in den flachen Kalibrationsbereich führen und somit große Schwankungen verursachen. Für die ACE kann daher in diesem Fall auch keine Abweichung angegeben werden.

Die HPLC ist wie bereits erwähnt als Ersatz für den aufwendigen und teuren ELISA als Standardreferenzmethode etabliert. Die Membranadsorber-Analytik wird aber aufgrund der Projektnähe weiterverfolgt [STEUBER, 1999]. Beide Verfahren eignen sich aber trotzdem nicht für das Prozeßcontrolling. Hier hat die 2D-Fluoreszenz mit Meßzeiten von unter 1 min das größte Einsatzpotential. Da alle kationischen Bestandteile der Molke in der Probe noch vorhanden sein können (vgl. hierzu Kap. 3.1.2.7), wird die 2D-Fluoreszenz direkt mit der Membranadsorber-Analytik verglichen (Abbildung 3.19).

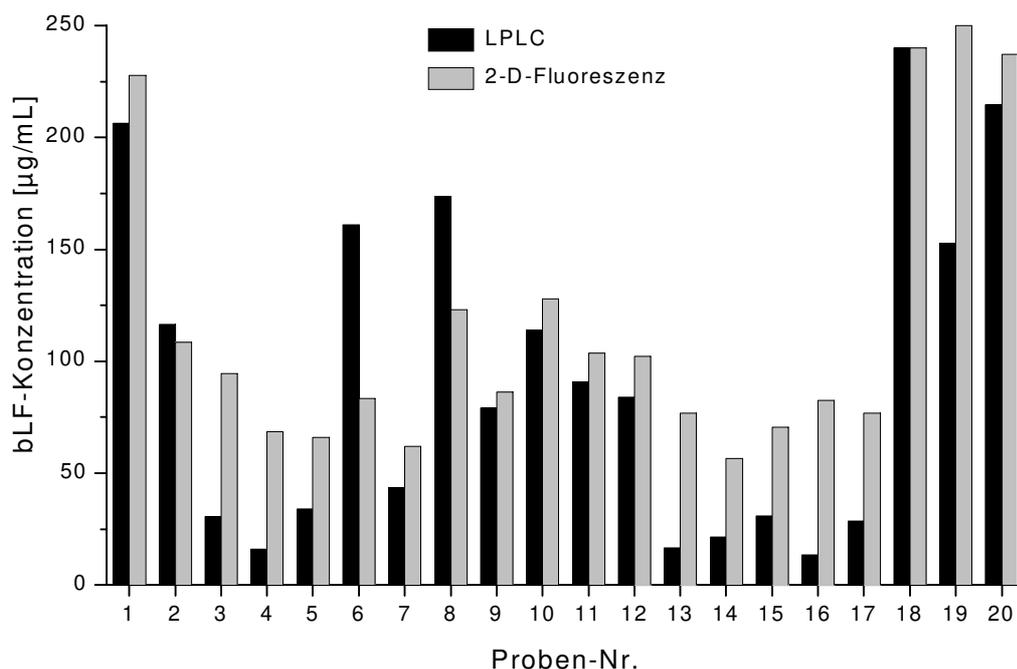


Abb. 3.19: Vergleich von 2D-Fluoreszenz und LPLC-Daten [STEUBER, 1999]
 Proben aus verschiedenen Teilen des Prozesses

Es ist zu erkennen, daß die LPLC- und die 2D-Fluoreszenz-Daten generell korrelieren. Das bedeutet, daß auch die 2D-Fluoreszenz im Vergleich zu HPLC- oder ELISA-Messungen erhebliche Höherbefunde aufweist. Aufgrund der Vorbehandlung der Proben für die 2D-Fluoreszenz (Anionenaustauscher) ist in allen Proben noch Lactoperoxidase vorhanden. Die 2D-Fluoreszenz zeigt daher besonders bei geringen bLF-Gehalten (LPLC, Probe 3 - 5 und 13 - 17) große Höherbefunde (100 – 350 %) zur LPLC. Hier macht sich die noch vorhandene Lactoperoxidase zwangsläufig prozentual stärker bemerkbar. Bei höheren Lactoferrin-Gehalten reduzieren sich diese Schwankungen auf 10 bis 50 %. Da die LPLC, wie oben erwähnt, zwei- bis dreifach höhere bLF-Konzentrationen im Vergleich zur HPLC quantifiziert, liegen demnach auch die 2D-Fluoreszenz-Daten um den Faktor zwei bis drei zu hoch.

Die Optimierung der 2D-Fluoreszenzanalytik in Bezug auf das Problem Lactoperoxidase/ Lactoferrin muß daher weiter forciert werden [STEUBER, 1999], da nur sie die Möglichkeiten für das Prozeßcontrolling besitzt.

3.2 Molkenfiltration

Die Vorfiltration von Molke stellt den ersten Teilbereich bei der Lactoferrin-Gewinnung dar (Abbildung 3.20). Eine Vorreinigung der Molke ist zwingend erforderlich, da die Lipide und Caseine bei der Käseherstellung nicht vollständig abgetrennt werden. Im Fall von Molkenkonzentraten (5fach aufkonzentrierte Molke) sind zusätzlich präzipitierte Proteinanteile vorhanden, die während des Aufkonzentrierungsprozesses (Sprühtrocknung) entstehen. Sowohl Molke als auch Molkenkonzentrat als Rohmaterial lassen sich nicht auf die Membranadsorber auftragen. Für eine bessere Übersicht werden die drei Teilbereiche der Lactoferrin-Gewinnung getrennt dargestellt. Die Teilbereiche ergeben sich aus Abbildung 3.20; es handelt sich um die Molkenfiltration (Kap. 3.2), die Lactoferrin-Isolierung (Kap. 3.3) und das Downstreaming (Kap. 3.4).

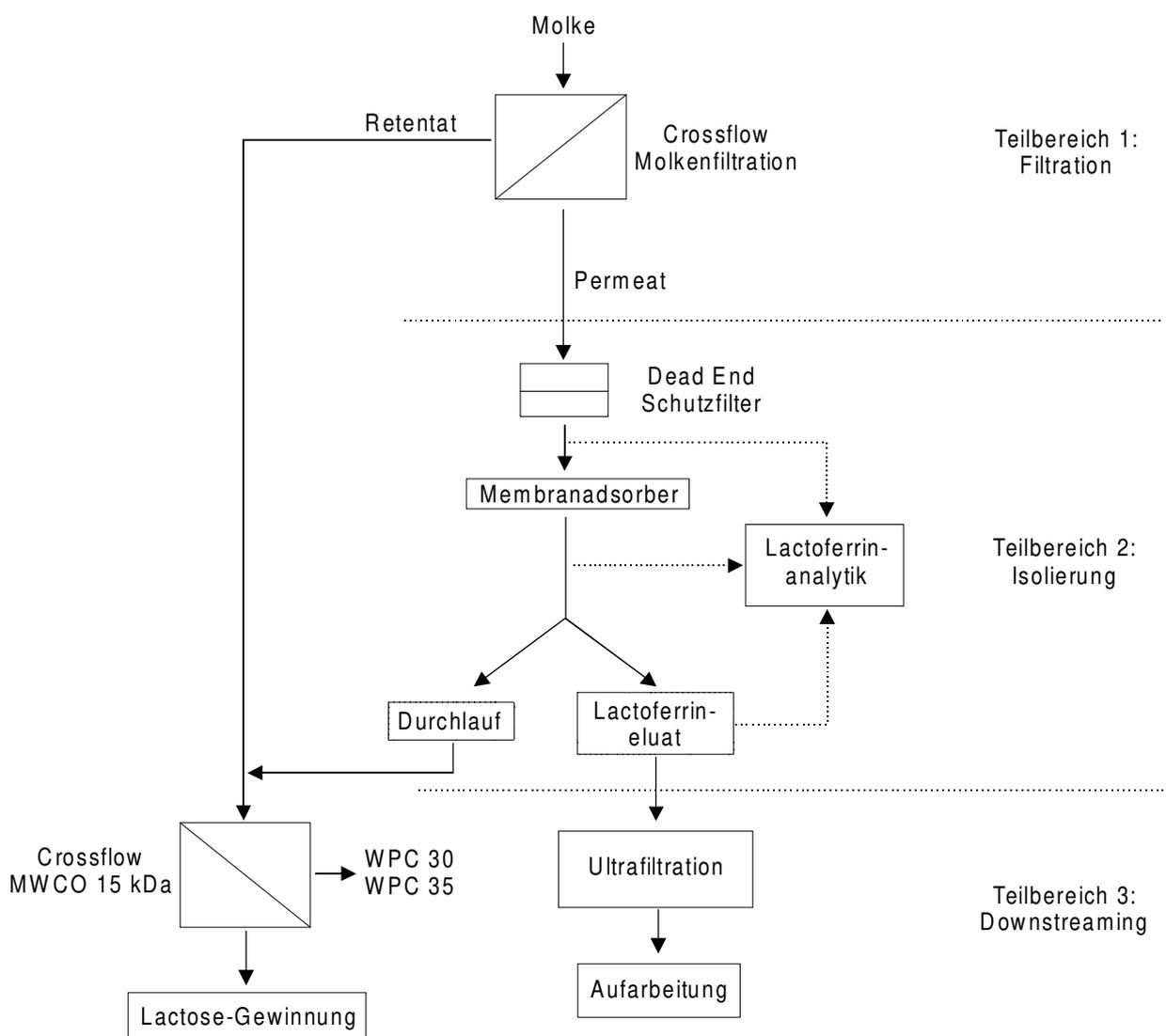


Abb. 3.20: Schematische Darstellung der Lactoferrin-Gewinnung
 MWCO = Molecular Weight Cut-Off; WPC: Whey Protein Concentrate

Der Einfachheit halber wird im folgenden immer von Molke gesprochen. Dabei ist die Dünnmolke aus der Käseherstellung gemeint, eventuelle Untersuchungen mit Molkenkonzentrat sind gesondert vermerkt. Außerdem handelt es sich immer um Süßmolke, die bei der Herstellung reifer Käsesorten wie Cheddar oder Gouda anfällt.

Der Begriff der Qualität der Filtrate/Permeate wird in dieser Arbeit häufiger verwendet, er bezieht sich aber ausschließlich auf den Aufreinigungseffekt der Filtrate/Permeate durch die Filtration. Die Aufreinigung wird durch die Änderung der Transmission einer Probe ermittelt. Sie ist ein wichtiges Kriterium, da der Schwebstoffanteil in den Filtraten/Permeaten gegenüber den Molken soweit vermindert werden muß, daß eine vollständige Beladung der Adsorbermodule erfolgen kann, bevor diese verblocken.

Abbildung 3.21 links zeigt eine Reihe von Retentat- und Permeatproben über einen Scanbereich von 400 – 800 nm. Bei Proben geringer Trübung (Permeate) nehmen die Transmissionsdifferenzen mit zunehmender Wellenlänge ab, bei Proben hoher Trübung (Molken und Retentate) verhält es sich umgekehrt. Um in allen Fällen bei einfachen Einzelwellenlängenmessungen sinnvolle Aussagen zur Transmission oder Transmissionsdifferenz treffen zu können, werden alle weiteren Messungen bei 600 nm durchgeführt. In diesem Bereich (560 – 660 nm) werden auch optische Dichten bei Kultivierungen von Mikroorganismen gemessen.

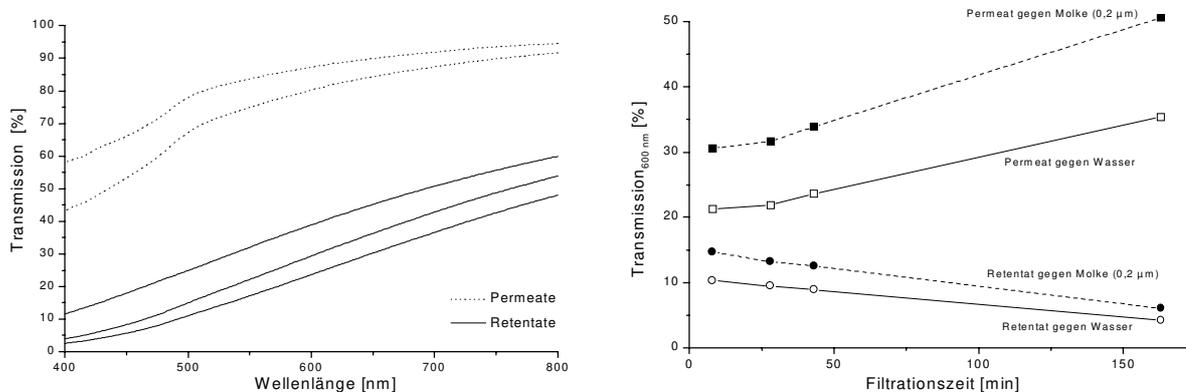


Abb. 3.21: links: Transmissionsspektren (400 – 800 nm) verschiedener Permeate und Retentate [KOSEMUND, 1998]
rechts: Transmissionswerte bei 600 nm verschiedener Permeat- und Retentatproben aus einer Filtration [KOSEMUND, 1998]

Die Transmissionsmessungen vereinfachen sich nochmals, wenn die Werte gegen Wasser bestimmt werden. Um die Eigenabsorption der Proben durch die löslichen Komponenten (Gelbfärbung durch Riboflavin) zu normieren, wird ebenfalls gegen sterilfiltrierte Molke (0,2 µm) gemessen. Da die Transmissionswerte der Permeate im Verlauf einer Batch-Filtration (Abbildung 3.21 rechts) zunehmen (Aufbau einer Deckschicht durch Fouling) und die der Retentate abnehmen (Aufkonzentrierungseffekte), sind in Tabelle 3.4 die relativen Verhältnisse der Transmissions-

werte zueinander dargestellt. Die Transmissionswerte gegen Molke (0,2 μm) liegen dabei für alle Permeate und Retentate um den Faktor 1,4 über den Messungen gegen Wasser. Der absolute Fehler der Transmissionmessungen liegt bei $\pm 2\%$. Dadurch ergibt sich ein größerer prozentualer Fehler bei kleineren Transmissionswerten (Retentate, Molkenkonzentrate).

Tab. 3.4: Verhältnisse der Transmissionswerte gegen Wasser und Molke (0,2 μm) untereinander [KOSEMUND, 1998]; P = Permeat; R = Retentat

$P_{\text{Wasser}}/R_{\text{Wasser}}$	$P_{\text{Molke}}/R_{\text{Molke}}$	$P_{\text{Molke}}/P_{\text{Wasser}}$	$R_{\text{Molke}}/R_{\text{Wasser}}$
2,07	2,09	1,44	1,43
2,32	2,40	1,45	1,40
2,65	2,71	1,44	1,41
8,51	8,43	1,43	1,44

Da für die Beurteilung der Filtration nur die Relativwerte von Permeat und Retentat ausschlaggebend sind, genügt eine Transmissionsmessung bei 600 nm gegen Wasser; Messungen gegen Molke sind im folgenden daher gesondert vermerkt.

3.2.1 Alternative Filtrationsverfahren

Da es sich beim Kooperationspartner Sartorius AG um einen Membranspezialisten handelt, liegt der Schwerpunkt der Arbeit auf der Anwendung von Filtrationsmembranen und Membranadsorbentien. Alternativ werden auch Versuche mit Hohlfasermembranen (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) unternommen. Während der Filtrationsversuche im Labormaßstab werden außerdem Filtrationen im Dead End-Modus durchgeführt, da dies die einzige Möglichkeit ist, größere Volumina für die Auftragsversuche zu gewinnen.

3.2.1.1 Dead End-Filtration

Dead End-Filtrationen eignen sich sehr gut, um größere Mengen Filtrat in relativ kurzer Zeit zu gewinnen. Für den Einsatz in kontinuierlichen Prozessen sind sie jedoch völlig ungeeignet. Durch den kontinuierlichen Aufbau des Filterkuchens sind die Filtrationszeiten sehr kurz. Daher müssen diese Module häufiger gereinigt werden (hohe Kosten für die Reinigungsmittel) und es ergeben sich Verluste im Rohmaterial, da der Filterkuchen nicht den Molkenproteinkonzentraten zugeführt werden kann.

Bei Filtrationen mit Molkenkonzentrat kann auch mit verschiedenen Filterkombinationen von 20, 8 und 5 μm kein auftragungsfähiges Permeat erhalten werden. Hier müßten weitere Stufenfiltrationen analog den (Dünn)Molkeversuchen erfolgen.

Für Dünnmolke reicht eine Kombination der Abscheidungsraten von 3, 0,8 und 0,65 μm aus. Die Abscheidungsrate ergibt sich aus der Faserstruktur der Tiefenfilter, es handelt sich nicht um Membranen mit definierten Porengrößen. Filtriert werden immer Volumina zwischen 20 und 25 L. Der Tiefenfilter mit 3 μm aus Polypropylen (2000 cm^2 Fläche) zeigt dabei keinen Anstieg im Transmembrandruck und der Transmissionswert der Filtrate liegt um etwa 5 – 7 % über den Molkewerten (Molken 15 – 20 %). Der kombinierte Tiefenfilter aus Celluloseacetat mit 0,8 und 0,65 μm (je 1000 cm^2 Fläche) zeigt dagegen einen kontinuierlichen Druckanstieg bis etwa 1,0 bar während der Filtration (Abbildung 3.22), ein deutlicher Hinweis für den Aufbau des Filterkuchens. Gleichzeitig verringert sich die Filtrationsrate um ca. 25 %. Die Transmissionswerte dieses Filtrats liegen um weitere 10 – 15 % über den Werten der Filtrate aus den 3,0 μm Filtrationen, allerdings zeigt sich hier ein Lactoferrin-Verlust von 10 – 20 %. Die Dead End-Filtration ist damit zunächst die einzige Methode, die ausreichende Volumina (> 10 L) an auftragungsfähigen Permeaten (≥ 40 % Transmission, vgl. Kap. 3.3) liefert.

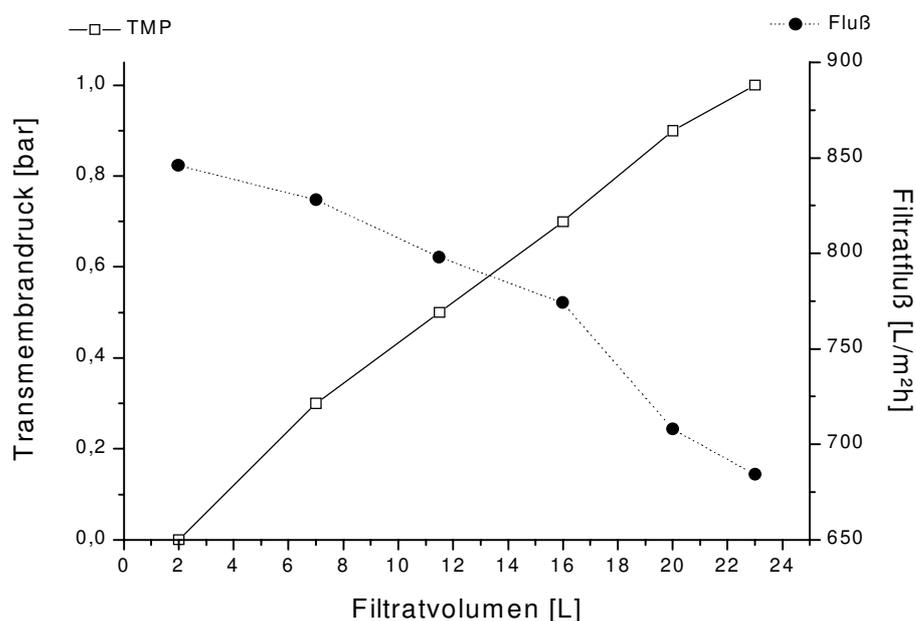


Abb. 3.22: Dead End-Filtration von Molkenpermeat (3 μm vorfiltriert) mit Tiefenfilter-Kombination 0,8/ 0,65 μm
 3,0 μm Sartopure® PP 552130P9-0; 0,8/0,65 μm Sartoclean® CA 5621305G9-0

Die Flußraten werden bei Filtrationen üblicherweise auf $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$ normiert. Die Werte liegen bei Dead End-Filtrationen deutlich höher als bei Crossflow-Filtrationen, aus den oben genannten Gründen ist ein Prozeßeinsatz aber unökonomisch.

3.2.1.2 Hohlfaserfiltration

Die Untersuchungen werden mit einem Hohlfasermodule (0,45 μm Polysulfon) der Firma Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland) durchgeführt. In dem Modul sind 12 Hohlfasern mit einer Gesamtfiltrationsfläche von 110 cm^2 untergebracht. Der Vorteil von Hohlfasern liegt in ihrer Geometrie begründet. Das Medium kann ungehindert durch den Kanal fließen (Lumen 1 mm), während in Plattenmodulen die einzelnen Membranen durch Nylonspacer getrennt werden müssen. Dadurch ergeben sich im Kanal wesentlich höhere Scherraten, die den Aufbau einer Deckschicht (Fouling) minimieren. Bei Suspensionen und kolloidalen Lösungen kann zusätzlich ein „turbular pinch effect“ [CHERYAN, 1998] auftreten; dabei bewegen sich die Partikel von der Membranwand weg in die Mitte des Filtrationskanals. Tabelle 3.5 zeigt die Scherraten von Hohlfaser- und Plattenmodul im Labormaßstab (Formeln siehe Kap. 5.2). Unter identischen Flußbedingungen liegt die Scherrate im Hohlfasermodule um 289 % höher. Trotz der hohen Scherraten liegt im Hohlfasermodule eine laminare Strömung vor. In Plattenmodulen besitzt die Strömung turbulenten Charakter durch die verwendeten Spacer.

Tab. 3.5: Vergleich der Scherraten von Hohlfaser- und Plattenmodul

	Hohlfaser	Plattenmodul
Filtrationsfläche [cm^2]	110	50
Retentatfluß J [L/min]	1,0	1,0
Lumen d [cm]	0,1	-
Spacerbreite a [cm]	-	5,0
Spacerhöhe b [cm]	-	0,064
Anzahl x Hohlfasern/ Membranen	12	1
Anströmfläche A [cm^2]	0,094	0,320
Strömungsgeschwindigkeit V [cm/sec]	176,93	52,08
Scherrate γ [sec^{-1}]	14154,3	4882,8

Die Ergebnisse der Filtrationen von Molke und Molkenkonzentrat in dem Hohlfasermodule zeigt Abbildung 3.23 links und rechts. Im Fall der Molke fällt die Flußrate um 25 % auf einen Endwert von 14 $\text{L/m}^2\text{h}$, bei dem Molkenkonzentrat dagegen deutlich auf knapp 4 $\text{L/m}^2\text{h}$ (50 %), obwohl hier das Permeatvolumen etwa ein Drittel geringer ist. Die Deckschicht wächst bei den Konzentraten sehr viel schneller. Dies ist auch der Grund, warum die Transmission der Permeate beim Molkenkonzentrat stetig steigt, während bei der Dünnmolke doch einige Schwebstoffe ins Per-

meat gelangen. Trotzdem handelt es sich bei allen Permeaten um optisch klare Lösungen, die auch voll auftragungsfähig sind. Die Lactoferrin-Verluste sind allerdings viel zu hoch. Bei der Dünnmolke ergibt sich ein Verlust von ca. 25 %, beim Konzentrat bereits von 70 %, bezogen auf die Molke.

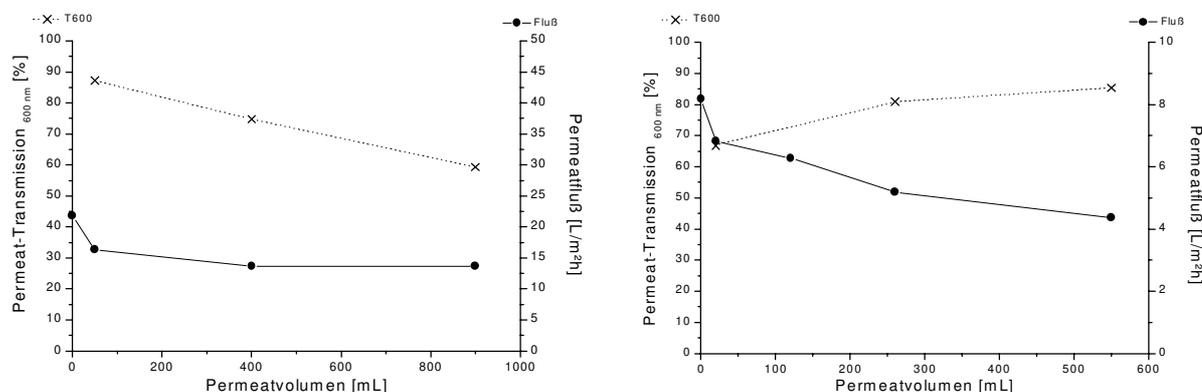


Abb. 3.23: Filtrationen mit Hohlfasermodule (0,45 µm, Polysulfon)

Modultyp: CFP-4-E-3A; T = 20 °C; Überströmung 1,2 L/min, TMP 0,3 – 0,4 bar

links: Molke

rechts: Molkenkonzentrat

Weitere Versuche wurden mit den Hohlfasern nicht durchgeführt, allerdings wurden Proben von der Firma Biolac zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Proben von Hohlfaserfiltrationen mit Molkenkonzentraten bei Porengrößen von 0,2, 0,4 und 1,0 µm, die mit der HPLC auf ihren Lactoferrin-Gehalt untersucht werden. Die Retentionen von Lactoferrin belaufen sich dabei auf 90, 85 und < 10 %. Es können keine Aussagen zum zeitlichen Verlauf der Filtrationen bei diesen Proben gemacht werden. Da in den Plattenmodulen aber Strömungen mit geringen Scherarten vorliegen, die zu einem verstärkten Aufbau der Deckschichten auf der Membran führen, sollten bei den Plattenmodulen auch Poren mit mehr als 1 µm in Betracht gezogen werden.

Aus diesen Ergebnissen können wichtige Richtwerte für die Übertragung der Filtration auf die Plattenmodule gezogen werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Dead End-Versuchen kann man einen Porengrößenbereich von 0,65 – 1,2 µm definieren, der genauer untersucht werden muß. Außerdem werden Permeatqualitäten von 40 % Transmission angestrebt, um eine ausreichende Permeatauftragung auf die Membranadsorber zu gewährleisten, bevor diese verblocken (Kap. 3.3).

3.2.2 Crossflow-Filtration

3.2.2.1 Labormaßstab

Das Testmodul hat eine Filtrationsfläche von 50 cm², bestehend aus nur einer Membranlage in der Dimension 5 x 10 cm. Da größere Plattenmodule aus mehreren Membranlagen aufgebaut sind, können die Ergebnisse aus den Untersuchungen im Labormaßstab nicht direkt auf größere Anlagen übertragen werden. Sie dienen in erster Linie dazu, die Prozeßparameter bei der Filtration weiter einzugrenzen [KOSEMUND, 1998].

3.2.2.1.1 Auswahl der Prozeßparameter

Über- und unterhalb der Membranen müssen Spacer (Nylon) eingesetzt werden, um ein direktes Aufeinanderliegen der Membranen in größeren Modulen zu verhindern. Dafür stehen zwei verschiedene Spacer zur Auswahl, ein sogenannter Engspalt-Spacer (Dicke ca. 0,45 mm) und ein Weitspalt-Spacer (Dicke etwa 0,65 mm). Unter identischen Flußbedingungen ergeben sich für Engspalt-Spacer etwa doppelt so große Scherraten (Tabelle 3.6). Dies ist natürlich wünschenswert bei der Minimierung des Membranfoulings, gleichzeitig erhöht sich aber der Gegenruck im Modul. Der gleiche Effekt kann auch durch Erhöhung des Retentatflusses erzielt werden. Eine endgültige Auswahl über den Spacereinsatz kann im Testmodul noch nicht getroffen werden, da der Spacer nicht optimal eingepaßt ist. Für die weiteren Untersuchungen wird der Weitspalt-Spacer eingesetzt.

Tab. 3.6: Vergleich der Scherraten von Engspalt- und Weitspalt-Spacern

	Engspalt	Weitspalt
Filtrationsfläche [cm ²]	50	50
Retentatfluß J [L/min]	1,0	1,0
Spacerbreite a [cm]	5,0	5,0
Spacerhöhe b [cm]	0,045	0,065
Anzahl x Membranen	1	1
Anströmfläche A [cm ²]	0,225	0,325
Strömungsgeschwindigkeit V [cm/sec]	74,07	51,28
Scherrate γ [sec ⁻¹]	9876,5	4733,7

Die Untersuchungen zur Filtration von Molkenkonzentrat haben keine zufriedenstellenden Ergebnisse geliefert. Das Membranfouling setzt zu schnell ein und die Filtrationszeiten werden drastisch verkürzt. Im folgenden werden daher alle Versuche mit (Dünn-)Milch durchgeführt.

Membranfouling stellt das größte Problem bei der Filtration von Molke oder Milch dar. Die Deckschicht setzt sich aus einem reversiblen und einem irreversiblen Anteil zusammen (vgl. hierzu auch Anhang). Der irreversible Anteil (adsorptive Anlagerung von Komponenten = Fouling) kann nur durch Reinigung der Membran beseitigt werden, der reversible Anteil (keine adsorptive Anlagerung) kann durch Erhöhung der Überströmung der Membran minimiert werden. Analog existieren bei der Filtration zwei Arbeitsbereiche, der druckkontrollierte und der druckunabhängige Bereich. Im letzteren hat sich die irreversible Foulingschicht bereits soweit aufgebaut, daß durch höhere Transmembrandrücke (TMP) keine höhere Filtrationsleistung erreicht werden kann. Ein längeres Arbeiten ist daher nur im druckkontrollierten Bereich möglich. Abbildung 3.24 zeigt die Arbeitspunkte für eine Hydrosart[®]-Membran mit 0,8 µm, die im Recycled Batch-Modus bestimmt werden. Dabei werden alle Ströme (Retentat und Permeat) wieder in den Molkentank zurückgeführt, um eine Veränderung der Ausgangsmolke zu minimieren. Während Wasser keine Foulingeffekte zeigt und der Fluß mit steigendem TMP linear ansteigt, geht der druckkontrollierte Bereich bei Molke ab 0,2 bar in den druckunabhängigen Bereich über. Der Aufbau der Deckschicht wird durch die gestrichelte Linie verdeutlicht. Wird der TMP aus dem druckunabhängigen Bereich wieder verringert, sind die erzielten Flußraten um bis zu 70 % erniedrigt. Die Arbeitspunkte sind nicht scale up-fähig, sie müssen daher für jede Membran und jedes Modul neu bestimmt werden.

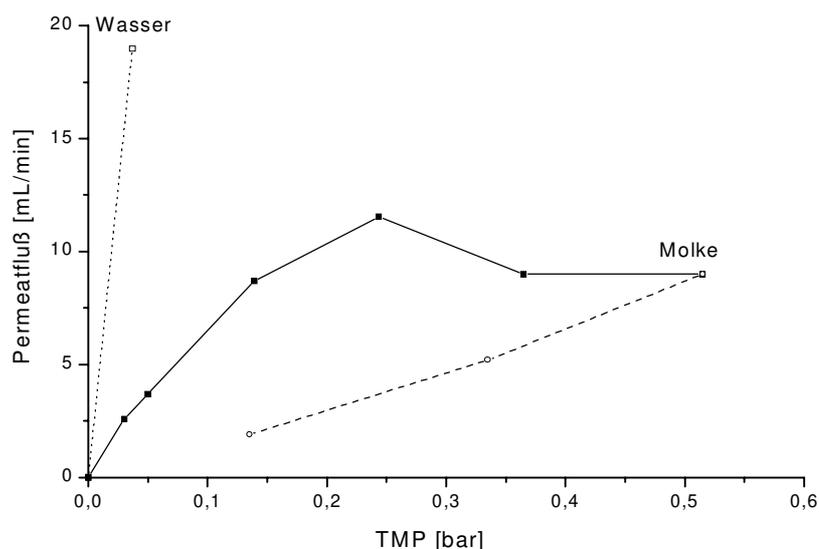


Abb. 3.24: Bestimmung der Arbeitspunkte im Recycled Batch-Modus (Hydrosart[®] 0,8 µm) [Kosemund, 1998]; Membrantyp: TX12-18604; T = 50 °C; Überströmung 1,1 L/min

Im weiteren wird der Einfluß der Temperatur auf die Filtration untersucht (Abbildung 3.25). Zum einen wird ein Temperaturbereich von 50 °C ausgewählt, da hier auch die Firma Biolac ihre Prozesse fährt, zum anderen ein Bereich von etwa 10 °C. Beide Filtrationen werden mit einem identischen TMP gestartet. Bei höherer Temperatur zeigt sich ein annähernd kontinuierlicher Anstieg des TMP (gleichbedeutend mit dem Aufbau der Deckschicht), analog verhalten sich die Transmissionswerte der Permeate, die von 22 auf 36 % ansteigen. Ähnliche Transmissionswerte werden bei erniedrigter Temperatur erhalten, allerdings erfolgt der steile Anstieg des TMP erst ab etwa 800 mL Permeatvolumen. Die Permeatflüsse nehmen in beiden Fällen parallel ab. Der Unterschied wird erst deutlich, wenn die Filtrationsdauer berücksichtigt wird. Bei 10 °C wird 265 min filtriert, um 800 mL Permeat zu gewinnen, es ergibt sich ein mittlerer Fluß von 36,2 L/m²h. Bei 50 °C werden für Filtration des gleichen Volumens nur 185 min benötigt. Der mittlere Fluß ist mit 51,9 L/m²h um 43 % höher. Die Ursache liegt in der geringeren Viskosität der Molke bei höheren Temperaturen. Dadurch kann das Membranfouling weiter minimiert und längere Filtrationszeiten der Module ermöglicht werden.

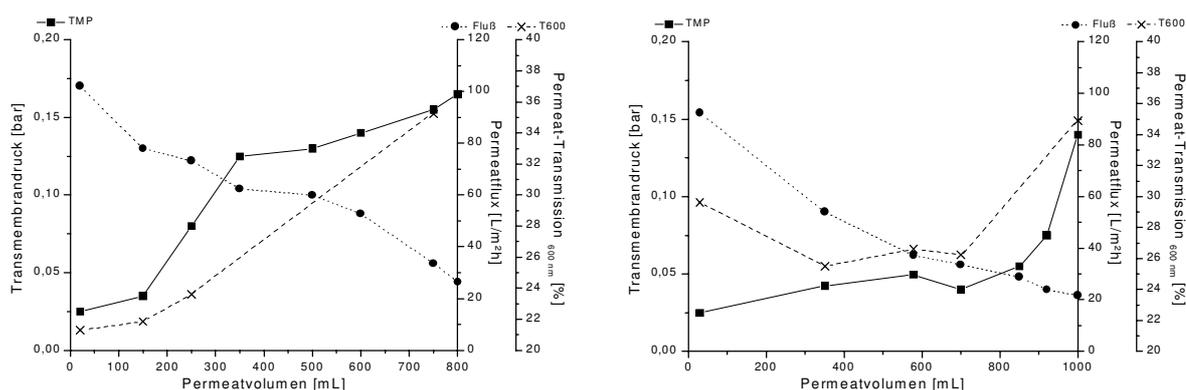


Abb. 3.25: Einfluß der Filtrationstemperatur bei Molke (Hydrosart® 0,8 µm)

links: Molke bei 45 - 50 °C [KOSEMUND, 1998]

Membrantyp: TX12-18604; Überströmung 1,1 L/min

rechts: Molke bei 10 - 15 °C

Membrantyp: TX12-18604; Überströmung 1,2 L/min

Die Untersuchung der Prozeßparameter zeigt, daß eine Filtration von Molke bei 50 °C durchgeführt werden sollte. Ist dies nicht möglich, so sollte der Temperaturbereich unter 15 °C liegen. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur, wonach eine Molkenfiltration zwischen 20 und 40 °C äußerst ungünstig ist, da hier die Wechselwirkung der Teilchen untereinander am größten ist und der Aufbau der Deckschicht beschleunigt wird [CHERYAN, 1998]. Desweiteren sollte die Überströmung der Membran möglichst hoch gewählt werden, um die Deckschichtbildung zu verlangsamen. Eine endgültige Aussage zu den Spacern ist erst bei der Verwendung der größeren Plattenmodule möglich. Die Transmembrandrücke sollten während der Filtration möglichst niedrig (< 0,3 bar) gewählt werden.

3.2.2.1.2 Membranauswahl

Für die Membranauswahl steht eine breite Palette an Materialien und Porengrößen zur Verfügung. Die Porengrößen reichen von 0,65 – 5,0 µm, an Membranmaterialien sind Celluloseaacetat (CA) und nitrat (CN) sowie Hydrosart® (HS) vorhanden. Bei Celluloseacetat und nitrat handelt es sich um symmetrische Membranen. Hydrosart® ist eine asymmetrische Membran, weil die eigentliche Membran zusätzlich auf einem Stützvlies aufgebracht ist, wodurch sie mechanisch wesentlich stabiler ist. Es handelt sich um eine Membran auf Cellulosebasis, allerdings wurden die Celluloseeinheiten weiter polymerisiert. Die chemischen Eigenschaften gegenüber Lösemitteln und vor allem gegenüber Säuren und Laugen können dadurch verbessert werden. Hydrosart ist stabil im pH-Bereich 1 – 14, aber instabil gegenüber oxidierenden Verbindungen. Die Membran wird in den Porengrößen 0,8, 1,2 und 5,0 µm verwendet. Für 0,65 µm wird auf Celluloseacetat zurückgegriffen, da dieses gegenüber Cellulosenitrat deutlich bessere Flußeigenschaften besitzt.

Bei den Versuchen mit Dead End- und Hohlfasermusername wurde bereits ein Porengrößenbereich von 0,65 – 1,2 µm ausgewählt, der auf die Plattenmodule übertragen werden soll. Der Vollständigkeit halber wird trotzdem eine Filtration mit 5,0 µm durchgeführt (Abbildung 3.26 links).

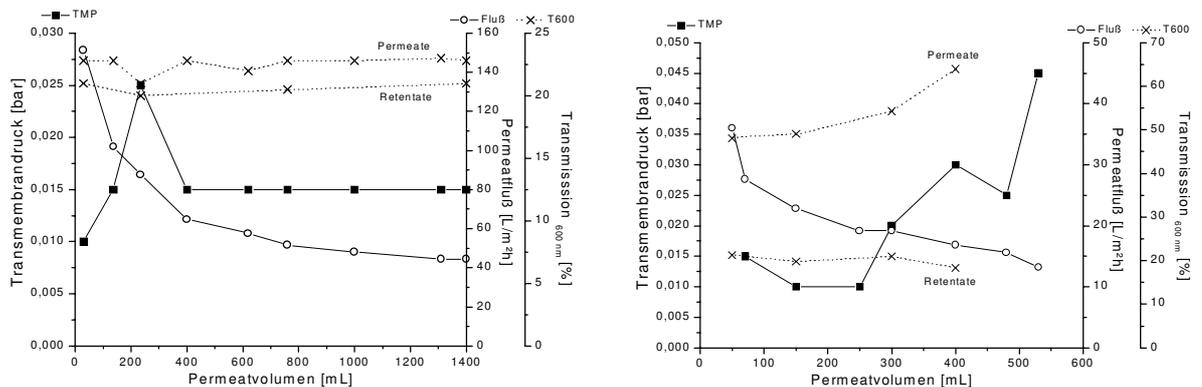


Abb. 3.26: Dünnmolke-Filtration mit 5,0 µm Hydrosart®- (links) und 0,65 µm Celluloseacetat-Membranen (rechts)

links: Membrantyp: 10442, T = 10 – 20 °C; Überströmung 1,1 L/min
rechts: Membrantyp: 11105, T = 50 °C, Überströmung 1,2 L/min

Dabei zeigt sich aber, wie erwartet, kein Aufreinigungseffekt der Permeate. Die Transmissionen der Permeate und der Retentate sind identisch, ebenso die Lactoferringehalte der Proben. Enttäuschend sind hier die erzielten Permeatflußraten. Die mittlere Flußrate beträgt nur

56,0 L/m²h. Die Ursache hierfür liegt nicht in der niedrigen Filtrationstemperatur begründet. Bei so großen Poren ist der Temperatureinfluß zwischen 10 und 50 °C unerheblich. Möglicherweise gibt es hier durch Caseinagglomerate oder größere Präzipitate eine verstärkte Verblockung innerhalb der Poren. Da der Porendurchmesser nicht homogen ist, könnten Komponenten bei großen Poren eindringen und diese verstopfen, während sie bei kleinen Poren nur zum Aufbau der Deckschicht auf der Membran beitragen.

Im Gegensatz dazu kann ein deutlicher Aufreinigungseffekt bei einer Porengröße von 0,65 µm erzielt werden (Abbildung 3.26 rechts). Die Transmissionen der Permeate liegen mit Werten zwischen 50 und 65 % um 30 bis 45 % über den Retentatwerten. Allerdings muß hier ein 20 - 30 %iger Lactoferrinverlust in Kauf genommen werden.

Einen vergleichenden Überblick über die wichtigsten Parameter der Filtrationen im Porengrößenbereich von 0,65 – 5,0 µm gibt Tabelle 3.7. Die Transmission der verwendeten Dünnmolke liegt je nach Qualität zwischen 15 und 25 %. Ein Aufreinigungseffekt der Permeate ist erst ab einer Porengröße kleiner 1,2 µm zu erkennen. Dieser vergrößert sich mit kleineren Porengrößen auf Werte um 60 % bei der 0,65 µm Membran. Auf der anderen Seite zeigen sich bei dieser Membran schon deutliche bLF-Verluste (ca. 25 %), während die 0,8 und 1,2 µm Membranen eine gute Permeation des bLF ermöglichen. Die mittleren erzielten Flußraten liegen bei den 1,2 und 5,0 µm Membranen zwar in demselben Bereich (50 - 100 L/m²h), allerdings sind mit der 5,0 µm Membran wesentlich längere Filtrationen möglich. Einen Aufreinigungseffekt hat diese Membran aber nicht, daher eignet sie sich auch nicht für weitere Versuche.

Tab. 3.7: Einfluß der Porengröße auf die Filtrationsergebnisse

	Retention von bLF [%]	Permeat-Transmission [%]	mittlerer Permeatfluß [L/m ² h]
CA 0,65 µm	20 - 30	50 - 65	15 - 25
HS 0,8 µm	10 - 15	30 - 45	30 - 45
HS 1,2 µm	< 10	25 - 35	50 - 90
HS 5,0 µm	< 1	20	50 - 100

Die Untersuchungen zur Crossflow-Filtration im Labormaßstab bestätigen den Porengrößenbereich von 0,65 – 1,2 µm für planare Module. Eine differenzierte Membranauswahl ist erst in den Technikumsstufen möglich, da hier Plattenmodule verwendet werden, in die die Membranen und Spacer optimal eingesetzt sind. Die in Tabelle 3.7 aufgeführten Parameter sind daher nur als Anhaltspunkte für den weiteren Scale Up-Prozeß zu bewerten.

3.2.2.1.3 Reinigung der Membranen

Während einer Filtration baut sich an der Membranoberfläche eine Deckschicht (Fouling) auf, die den Transmembrandruck und damit die Flußrate während der Filtration verändert. Wie bereits erwähnt, kann dabei zwischen einem reversiblen und einem irreversiblen Fouling unterschieden werden (vgl. Kap. 2.2). Reversibles Fouling wird durch einen Konzentrationsgradienten (Konzentrationspolarisation) der Komponenten an der Membranoberfläche erzeugt. Die Breite dieser Grenzschicht kann aber durch Erhöhung der Überströmung verkleinert werden. Irreversibles Fouling dagegen entsteht durch Ablagerung oder Adsorption der Partikel der Lösung auf der Membran oder in den Membranporen. Bei Süßmolke sind vor allem α -Lactalbumin (short-term) und β -Lactoglobulin (long-term) für das Fouling verantwortlich. Verstärkt wird dieser Effekt durch zweiwertige Metallionen, vor allem Calcium, die eine Brückenfunktion zwischen Membran und Partikeln erfüllen [CHERYAN, 1998]. Die Adsorption kann nur durch eine regelmäßige Reinigung der Membran rückgängig gemacht werden. Nach erfolgter Reinigung kann durch Messung der Wasserflüsse J bei verschiedenen Transmembrandrücken TMP nach Gleichung 3.1 der Membranwiderstand R_m (reziproke Steigung der Regression) ermittelt werden (Abbildung 3.27), da Wasser selbst keine Foulingeffekte zeigt. Durch Vergleich der Steigungen vor der Filtration und nach der Reinigung kann eine Aussage über den Reinigungseffekt (Wiederherstellung der Wasserflüsse) gemacht werden.

$$J = \frac{1}{R_m} * TMP \quad (\text{Gl. 3.1})$$

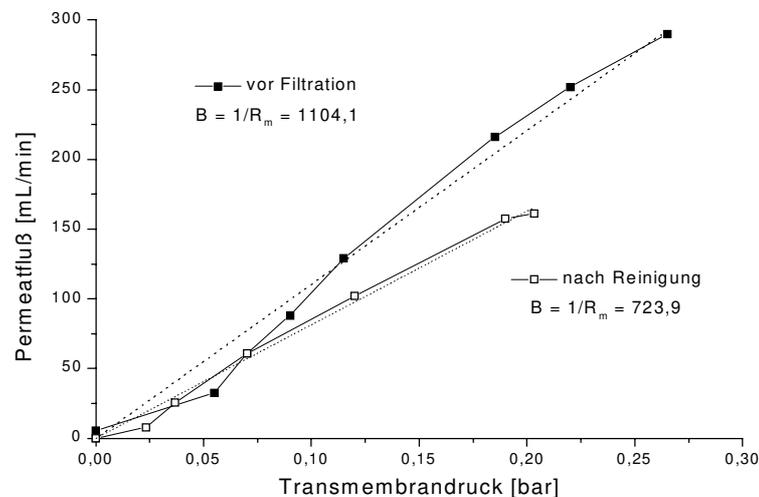


Abb. 3.27: Ermittlung der Membranwiderstände durch lineare Regression

Die genauen Zusammensetzungen und Anwendungen der einzelnen Reinigungsmethoden sind in Kapitel 5.2.1 aufgeführt. In Reinigungsmethode 1 (RM 1) wird die Membran zunächst mit 20 % Zitronensäure behandelt, um Calcium als Calciumcitrat zu entfernen und Teile der Proteine zu denaturieren. Vor allem bei Milch- und Molkenprodukten soll dadurch eine effiziente Reinigung gewährleistet sein [CHERYAN, 1998]. Anschließend wird mit 1 M Natronlauge (NaOH) behandelt, um Lipide und Proteine zu hydrolisieren, und abschließend mit 50 % Isopropanol, um restliche hydrophobe Verunreinigungen zu entfernen. Tabelle 3.8 zeigt die Effektivität der Reinigungsmethode. Die ermittelten Steigungen nach der Filtration sind dabei ins Verhältnis zur neuwertigen Membran gesetzt. Die Wasserflüsse können demnach zu 94 bis 120 % wiederhergestellt werden. Auffällig ist das schlechte Quellverhalten der Membran bei Lagerung in 0,1 M NaOH. Die Flußwerte liegen hier um 88 % niedriger als bei der neuwertigen Membran. Durch Lagerung in 50 % Isopropanol kann dieser Umstand aber beseitigt werden.

Tab. 3.8: Reziproke Membranwiderstände bei Reinigungsmethode 1 [KOSEMUND, 1998]
Membrantyp: 96-0146-3, HS 1,2 µm, Filtration bei T = 50 °C; Überströmung 0,9 - 1,1 L/min

Filtration Nr.	Nachtlagerung in	Steigung [mL/(min bar)]		Wiederherstellung rel. Einheiten
		vor Filtration	nach Reinigung	
1	neue Membran	1278,9	1198,4	0,94
2	0,1 M NaOH	150,3	1532,6	1,20
3	50% Isopropanol	1777,5	1375,1	1,08
4	50% Isopropanol	1270,1	1537,0	1,20
5	50% Isopropanol	1589,8	1388,0	1,09

Da bei Reinigungsmethode 1 mit drei Lösungen gearbeitet wird, ist diese Methode sehr zeit- und aufwendig und unwirtschaftlich. Es wird daher nach einer Einstufen-Reinigungsmethode gesucht, um die Reinigung effizienter zu machen. In der Literatur gibt es viele Untersuchungen zum Foulingverhalten und zur Reinigung von Filtermembranen [COOLBEAR ET AL., 1992; DAUFIN ET AL., 1992; BOHNER & BRADLEY, 1992; NISBET, 1981], diese befassen sich jedoch ausschließlich mit der Reinigung von Ultrafiltrations- oder keramischen Membranen.

Es wird eine Mischung aus Natronlauge, Natriumtripolyphosphat, Dinatrium-EDTA¹, Natrium-D-gluconat und SDS mit einer Gesamtkonzentration von 10 g/L zusammengestellt (RM 2). SDS soll dabei die Proteine, Fette, Biopolymere etc. in Micellen einschließen und für einen beschleunigten Abtransport sorgen. Tripolyphosphat, Gluconat und EDTA sollen vor allem zweiwertige Ionen komplexieren. Diese Mischung wird außerdem in einer vierfach (40 g/L, RM 3)

¹ EDTA: Ethylendiamintetraacetat

und einer achtfach (80 g/L, RM 4) höheren Konzentration eingesetzt. Reinigungsmethode 4 enthält insgesamt 1 M/L NaOH. Alternativ wird auch ein handelsübliches Reinigungsmittel der Firma Henkel (Düsseldorf, Deutschland) aus der Ultrasil-Reihe verwendet (RM 5). Es handelt sich um P3-Ultrasil 62 (1% v/v), eine Lösung, die zusätzlich Proteasen und Alkalasen enthält, aber Cellulasefrei ist. Als Vergleich steht außerdem 1 M NaOH zur Verfügung (RM 6).

Da käuflich zu erwerbende Filtrationsmodule üblicherweise in benetztem Zustand (20% Ethanol- oder Glycerinlösung) ausgeliefert werden, müssen die unterschiedlichen Quellzustände der Membranen berücksichtigt werden. Die Versuche werden so variiert, daß die neuwertigen Membranen zunächst einmal mit der jeweiligen Reinigungsmethode behandelt (Initialisierung) und die nachfolgenden Ergebnisse auf diese Initialisierung bezogen werden. Die Molke wird mit einem Transmembrandruck von etwa 0,5 bar filtriert, um ein deutliches Fouling zu erzielen. Die ersten beiden Filtrationen werden in einem für Molke günstigen Temperaturbereich (bis 10 °C) durchgeführt, die übrigen im ungünstigen bis 30 °C (Tabelle 3.9).

Tab. 3.9: Wiederherstellung der Wasserflüsse mit Einstufen-Reinigungsmethoden

Membrantyp: 96-0443-3, HS ca. 0,8 µm, Filtration 1 + 2 bei T = 6 - 10 °C, Filtration 3 + 4 bei 6 - 30 °C, Überströmung 1,0 – 1,2 L/min

Reinigungs- methode	Wiederherstellung der Wasserflüsse, rel. Einheiten				
	Initialisierung	Filtration Nr. 1	Filtration Nr. 2	Filtration Nr. 3	Filtration Nr. 4
2	0,96	0,89	0,90	0,72	0,69
3	0,96	0,94	-	0,86	0,81
4	1,00	1,01	0,87	0,90	0,83
5	1,01	0,88	0,72	0,37	0,36
6	0,66	0,37	-	-	-

Das deutlich schlechtere Quellverhalten von Natronlauge aus Tabelle 3.8 kann hier bestätigt werden. Bereits nach der Initialisierung der neuen Membran können die Flüsse nur zu 66 % wiederhergestellt werden, nach der ersten Reinigung sogar nur zu 37 %. RM 6 erweist sich daher nur als unzureichende Reinigungsmethode, die Untersuchungen werden hier eingestellt. Wesentlich bessere Ergebnisse zeigen die Reinigungsmethoden 2 – 5, der Quellzustand der Membranen wird in allen Fällen nicht verändert. Eine unzureichende Reinigung zeigt sich bei Ultrasil 62 (RM 5) bei Filtrationen im ungünstigen Temperaturbereich. Hier können die Flüsse nur zu einem Drittel regeneriert werden. Die effektivste Reinigung kann mit Methode 4 erzielt werden, bei der sich die Flüsse auch nach den Filtrationen im ungünstigen Temperaturbereich zu über 80 % wiederherstellen lassen.

3.2.2.2 Kleine Technikumsstufe – Sartoccon® Mini

Im ersten Scale Up wird die Crossflow-Filtrationsanlage Sartoccon® Mini eingesetzt. Sie kann mit bis zu 10 Kassetten bestückt werden, wobei eine Kassette eine Filtrationsfläche von 0,1 m² besitzt. Insgesamt handelt es sich pro Kassette um 12 Membranen der Dimension 11 x 8 cm, zwischen denen die Spacer eingebracht sind, es ergeben sich so abwechselnd Retentat- und Permeatlagen. Tabelle 3.10 zeigt, daß sowohl bei Engspalt- als auch bei Weitspalt-Modulen die Scherraten unter 4000 sec⁻¹ liegen und damit ein verstärktes Fouling zu erwarten ist. Der Grund dafür liegt in der Steigerung der Filtrationsfläche um den Faktor 20 gegenüber dem Labormaßstab. Der Retentatfluß läßt sich aber nicht im gleichen Maße steigern, da sonst die operativen Drücke zu hoch werden.

Eingesetzt werden in dieser Versuchsreihe nur die Weitspalt-Module.

Tab. 3.10: Scherraten von Engspalt- und Weitspalt-Spacern in Sartoccon® Mini-Modulen

	Engspalt	Weitspalt
Filtrationsfläche [cm ²]	1000	1000
Retentatfluß J [L/min]	4,5	4,5
Spacerbreite a [cm]	11,0	11,0
Spacerhöhe b [cm]	0,045	0,065
Anzahl x Membranlagen	14	12
Anzahl y Retentaträume	8	7
Anströmfläche A [cm ²]	3,96	5,01
Strömungsgeschwindigkeit V [cm/sec]	18,94	14,99
Scherrate γ [sec ⁻¹]	2525,3	1383,2

In dieser Stufe sind die Spacer und Membranen zum ersten Mal in eine Kassette eingeschweißt und daher optimal eingepaßt. Zur Klärung, ob das Medium Molke für die schlechte Permeation des Lactoferrins verantwortlich ist oder ob Lactoferrin selbst auch bei kleineren Poren unter 0,65 µm schon zurückgehalten wird, werden diverse Standards mit 0,2 µm HS filtriert. Es handelt sich um BSA, bLF und eine Kombination beider, bei der zunächst bLF und direkt anschließend BSA filtriert wird (alle Standards 400 mg/L in 100 mM NaP-Puffer pH 6,4) [STEINMANN, 1997]. Die Bilanzierung dieser Filtrationen ist in Abbildung 3.28 dargestellt. Es zeigt sich, daß bLF nur zu 9 % ins Permeat gelangt. Knapp die Hälfte des eingesetzten bLF wird in den Reinigungslösungen wiedergefunden, zeigt also starke Foulingeffekte aufgrund des basischen pl.

Die Untersuchungen mit BSA (pI 4,8) zeigen dagegen gute Permeation (83 %). Die Foulingeffekte werden auch an der Kombination bLF/ BSA deutlich. Nachdem zunächst der bLF-Standard und anschließend der BSA-Standard filtriert werden, können nur noch 14 % des BSA ins Permeat gelangen.

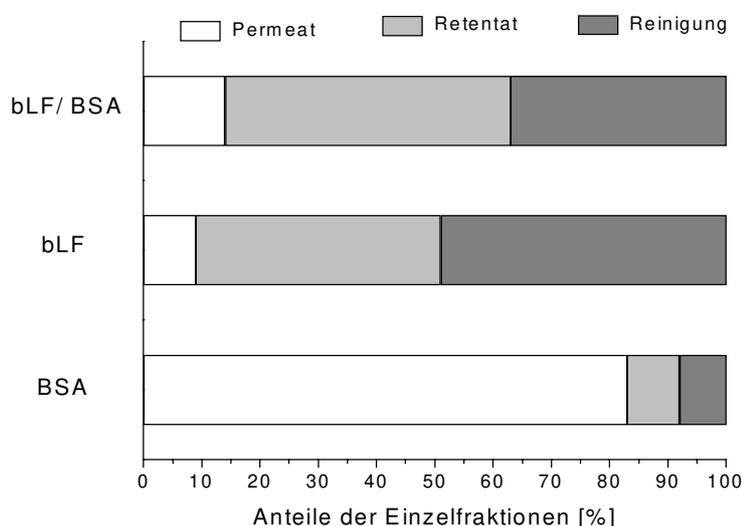


Abb. 3.28: Einfluß der isoelektrischen Punkte von bLF und BSA auf die Filtration [Steinmann, 1997]; Membran: HS 0,2 μm , $T = 20$ °C; Überströmung 4,0 L/min, alle Standards 400 $\mu g/mL$

Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen vermuten, daß bei allen Filtrationen mit Lactoferrin mit Verlusten durch Eigenfouling des bLF aufgrund des hohen pI zu rechnen ist. Im industriellen Prozeß, in dem kontinuierlich filtriert wird, sind diese Verluste aber wegen der großen Volumina vernachlässigbar. In der Forschung können solch riesige Volumina jedoch nicht gehandhabt werden. Hier müssen batch-Versuche gefahren werden, so daß auch der Aufkonzentrierungsfaktor (volume concentration ratio, VCR) des Retentats eine größere Bedeutung bekommt. In Abbildung 3.29 sind die Parameter VCR, pH-Wert und Transmission der Permeate für Filtrationen bei 50 (links) und 10 °C (rechts) dargestellt. Die pH-Werte im Permeat nehmen bei hohen Filtrationstemperaturen mit zunehmendem Aufkonzentrierungsfaktor ab, und zwar von 6,6 (Molke) auf etwa 5,8. Dadurch können Probleme bei der Auftragung auf die Membranadsorber entstehen, da bereits ab einem pH von 5,5 – 6,0 andere Molkenproteine kationisch vorliegen. Dies würde die dynamischen Kapazitäten der Adsorbermodule in Bezug auf bLF drastisch verschlechtern und bei der Elution zu Trennproblemen führen. Die Ursache für den pH-Shift liegt vermutlich in den aktiven Enzymen in der Dünnmolke, die zum Abbau von Lactose führen und dabei möglicherweise Lactatsäure bilden. In Molkenkonzentraten dürfte dieser Umstand keine Rolle spielen, da der Aufkonzentrierungsprozeß mehrere Stunden dauert und bei einer Temperatur von 70 °C stattfindet. Hier sollte keine Enzymaktivität mehr vorhanden sein.

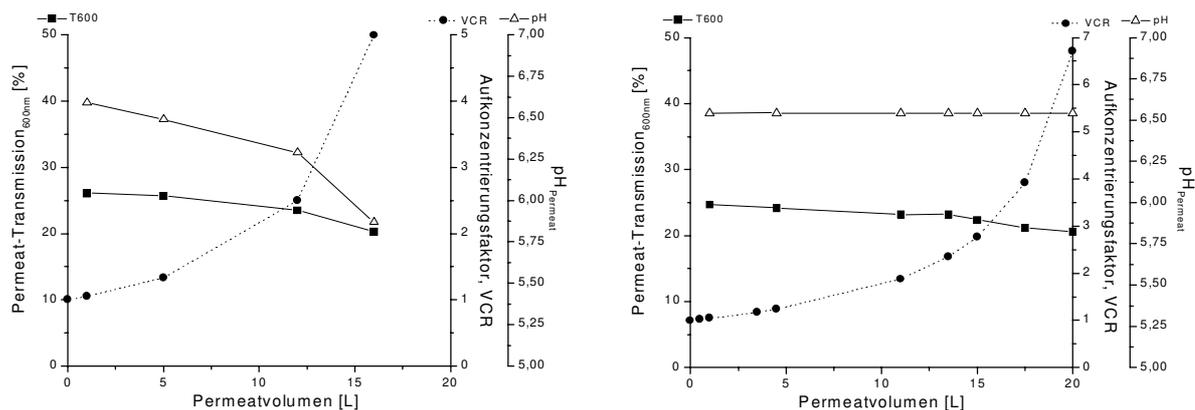


Abb. 3.29: Dünnmolke-Filtration bei 50 (links) und 10 °C (rechts) mit 1,2 µm Hydrosart®
links: Membrantyp: TX224/ 98078533, Überströmung 5,0 L/min
rechts: Membrantyp: TX224/ 98078533, Überströmung 4,5 L/min

Der pH-Shift in den Permeaten tritt bei niedrigen Temperaturen auch bei einem VCR von 7 nicht auf. Alle folgenden Filtrationen werden daher bei niedrigen Temperaturen zwischen 6 – 12 °C durchgeführt. Sollte dennoch bei hohen Temperaturen filtriert werden müssen, so darf bei Dünnmolke das VCR nicht den Wert von 2 – 3 überschreiten, um einen pH-Wert über 6 der Permeate zu gewährleisten. Die Transmissionswerte der Permeate verhalten sich in beiden Filtrationen identisch. Sie nehmen von ca. 25 auf 20 % ab, da mit zunehmender Aufkonzentrierung auch vermehrt Schwebstoffe ins Permeat gelangen.

Dieser pH-Shift der Permeate wird ebenfalls bei vergleichenden Filtrationen mit der 0,8 µm HS-Membran gefunden. Aufgrund der niedrigeren Flußraten der 0,8 µm Membranen und der damit verbundenen längeren Filtrationsdauer, liegen hier die pH-Werte bei einem VCR von 5 schon bei etwa 5,2. Das bedeutet, daß der pH-Shift auch zeitabhängig ist. Diese Zeitabhängigkeit kann nur umgangen werden, indem die Filtrationsflächen vervielfacht und damit kürzere Filtrationszeiten ermöglicht werden. Leider stehen aber nur jeweils ein Modul von jeder Porengröße zur Verfügung, da es sich um untypische Porengrößen handelt und die Module eine Sonderanfertigung im Rahmen dieses Projektes sind.

Aus Abbildung 3.30 rechts (Celluloseacetat 0,65 µm) ist zu erkennen, daß bei niedriger Filtrationstemperatur auch bei einem VCR von 16,5 kein pH-Shift stattfindet. Dafür fällt die Transmission der Permeate stark ab, von ursprünglich knapp 60 % auf einen Endwert von 15 %. Spätestens bei einem VCR von 10 sollte daher die Filtration abgebrochen werden. Die Permeate erscheinen optisch klar, allerdings bestätigt sich die 20 – 30 %ige bLF-Retention (Abbildung 3.30 links).

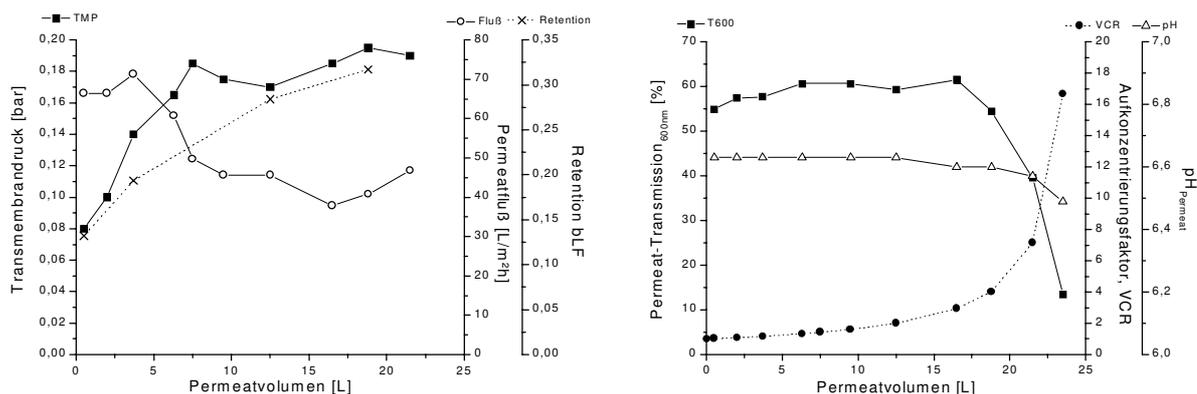


Abb. 3.30: Molkenfiltration mit 0,65 µm Celluloseacetat
 Membrantyp: 303-18405-01E, T = 6 – 12 °C, Überströmung 3,0 L/min (Engspalt-Modul)

Eine zusammenfassende Übersicht über die Filtrationen im Porengrößenbereich von 0,45 - 1,2 µm gibt Tabelle 3.11. Auch bei der Sartocoon® Mini bestätigt sich der optimale Porengrößenbereich von 0,65 – 1,2 µm. Die geringsten Retentionen an bLF von 10 % oder kleiner zeigen dabei die 0,8 und die 1,2 µm Membranen, während bei der 0,65 µm Membran bereits eine Retention zwischen 20 und 30 % zu verzeichnen ist. Die 0,65 µm Membran ist trotzdem interessant für weitere Untersuchungen, da mit dieser eine gute Aufreinigung der Permeate erzielt werden kann (+ 40 % Transmission gegenüber Molke). Hier können die Membranen mit größeren Poren nur einen Effekt von 5 - 10 % erreichen. Ein Einfluß der Temperatur zeigt sich nur bei den erzielbaren Flußraten, ansonsten können keine Effekte bezüglich Retention oder Transmission gefunden werden.

Tab. 3.11: Einfluß der Porengröße auf die Filtrationsergebnisse
 Transmission der Molken 10 – 20 %

	Filtrations- temperatur [°C]	Retention von bLF [%]	Permeat-Transmission [%]	mittlerer Permeatfluß [L/m²h]
HS 1,2 µm	50	< 10	20 - 25	120 - 130
HS 0,8 µm	50	10	25 - 30	50 - 70
HS 1,2 µm	10	< 10	20 - 25	80 - 100
HS 0,8 µm	10	10	25 - 30	40 - 50
CA 0,65 µm	10	20 - 30	50 - 60	30 - 40
HS 0,45 µm	10	45 - 55	75 - 85	25

3.2.2.2.1 Reinigung der Module

Die erfolgreichen Reinigungsmethoden Nr. 1 und 4 werden auch für die Reinigung der Sartoccon[®]-Module eingesetzt (Tabelle 3.12). Bei Methode 1 wird keine Initialisierung der Membran durchgeführt, aber die Ergebnisse im Labormaßstab haben bereits gezeigt, daß auch bei Methode 1 der Initialisierungswert bei über 90 % liegt.

Tab. 3.12: Wiederherstellung der Wasserflüsse mit den Reinigungsmethoden 1, 4 und 7
Membrantyp: TX224 HS 0,8 und 1,2 µm (RM 1 + 4)
18405-01E CA 0,65 µm (RM 7)

Reinigungs- methode	Wiederherstellung Wasserflüsse		
	Initialisierung	Filtration Nr. 1	Filtration Nr. 2
1	-	0,87	0,94
4	0,90	0,90	-
7	0,83	0,93	0,96

RM 7 ist ähnlich RM 4, allerdings ist RM 4 mit etwa 1 M/L NaOH stark alkalisch. Daher wird RM 7 mit Zitronensäure auf einen pH von 10 eingestellt. Dies ist erforderlich, da Celluloseacetat nur im pH-Bereich 4 bis 11 stabil ist. RM 7 erweist sich für CA-Membranen als genauso effektiv wie RM 4 für die HS-Membran, die Wiederherstellung der Flüsse liegt in beiden Fällen zwischen 80 und 90 %. Die Untersuchungen mit der 3-Stufen-Reinigung werden an dieser Stelle eingestellt. Obwohl sie ebenfalls sehr effektiv ist, dauert die Reinigung etwa doppelt so lange wie bei den Einstufen-Methoden.

3.2.2.3 Große Technikumsstufe – Sartoccon[®] II

Bei der Sartoccon[®] II werden Module mit einer Filtrationsfläche von 0,7 m² (Engspalt) bzw. 0,6 m² (Weitspalt) eingesetzt. Die Membranen besitzen die Dimension 17 x 14 cm, pro Kassette sind 32 bzw. 28 Membranen integriert. Dadurch ergeben sich 17 Retentaträume beim Weitspalt-Modul und 15 Retentaträume beim Engspalt-Modul (Tabelle 3.13). Die Scherraten für Weit- und Engspalt-Module liegen in etwa auf gleichem Niveau wie bei der Sartoccon[®] Mini. Für die Untersuchungen werden sowohl Weit- wie auch Engspalt-Module verwendet.

Tab. 3.13: Scherraten von Engspalt- und Weitspalt-Spacern in Sartocan® II-Modulen

	Engspalt	Weitspalt
Filtrationsfläche [cm ²]	7000	6000
Retentatfluß J [L/min]	12,5	12,5
Spacerbreite a [cm]	14,0	14,0
Spacerhöhe b [cm]	0,045	0,065
Anzahl x Membranlagen	32	28
Anzahl y Retentaträume	17	15
Anströmfläche A [cm ²]	10,71	13,65
Strömungsgeschwindigkeit V [cm/sec]	19,45	15,26
Scherrate γ [sec ⁻¹]	2593,6	1408,8

Für die Versuche wird auch der Aufbau der Crossflow-Filtration in eine UTMP (uniform trans-membrane pressure)-Crossflow-Filtration verändert (Abbildung 3.31 links). Diese Technik wird auch als CPF (co-current permeate flow) [CHERYAN, 1998; PAFYLIAS ET AL., 1996] oder von Alfa-Laval als Bactocatch bezeichnet.

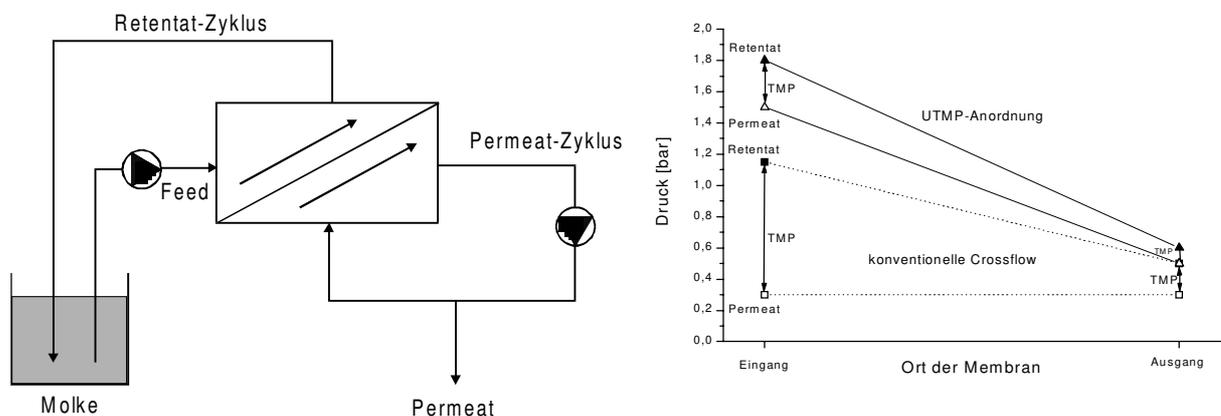


Abb. 3.31: Uniform Transmembrane Pressure (UTMP)

links: UTMP-Anordnung in der Crossflow-Filtration

rechts: Veränderung der Druckverhältnisse im Filtrationsmodul durch UTMP

Dazu wird auch auf der Permeatseite ein Pumpzyklus etabliert und der TMP über die Pumpengeschwindigkeit eingestellt. Der Vorteil dieser Anordnung wird in Abbildung 3.31 rechts deutlich. Während bei der konventionellen Anordnung auf der Retentatseite eine große Druckdifferenz

zwischen Ein- und Ausgang besteht, sind die Druckverhältnisse auf der Permeatseite konstant niedrig. Dadurch ist der TMP entlang der Membran nicht linear und es kommt im Eingangsbereich durch den hohen TMP zu frühzeitigen Foulingserscheinungen. Die Flächenauslastung der Filtrationsmembran ist daher sehr ineffektiv. Wird dagegen die UTMP-Anordnung gewählt, so wird auch auf der Permeatseite ein Druckabfall vom Eingang zum Ausgang etabliert, der TMP ist daher annähernd konstant über die gesamte Membran. Ein weiterer Vorteil von UTMP besteht in der Möglichkeit, eine Rückspülung (Backflushing) von Permeat ins Retentat durchzuführen. Dies kann durch Verminderung der Pumpengeschwindigkeit auf der Retentatseite oder durch Erhöhung der Pumpengeschwindigkeit auf der Permeatseite erfolgen. Dadurch kann zumindest der reversible Foulinganteil (nicht adsorptiv) minimiert werden. Die Folge sind die Etablierung mittlerer Flußraten auf hohem Niveau und längere Standzeiten der Module. Abbildung 3.32 zeigt die UTMP-Filtration in einem 0,65 µm CA Weitspalt-Modul.

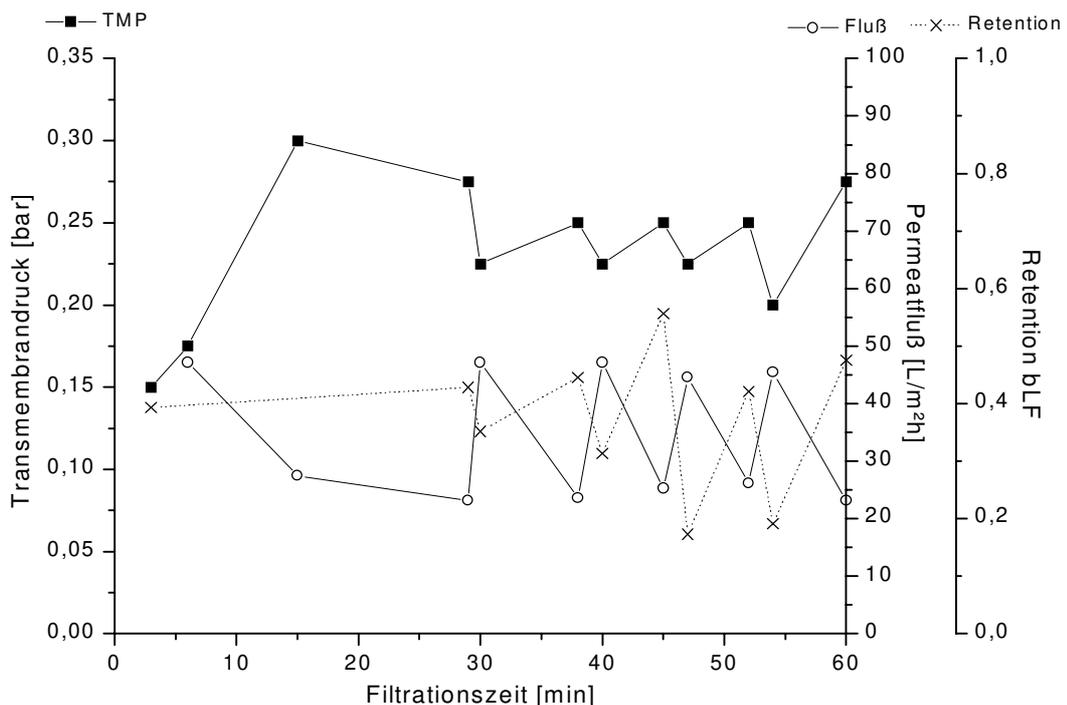


Abb. 3.32: UTMP-Filtration mit 0,65 µm Celluloseacetat

Membrantyp: 302-12305-06W, T = 6 – 12 °C, Überströmung 15,0 L/min (Weitspalt-Modul)

In den ersten 30 min ist der typische Abfall der Flußrate zu verzeichnen, gleichzeitig erhöht sich der TMP aufgrund der Foulingeffekte. Ab 30 min werden regelmäßige Rückspülungen durchgeführt. Die Permeatflüsse können dadurch wieder auf etwa 45 L/m²h gesteigert werden, bevor

ein erneuter Abfall einsetzt. Da sich die Deckschicht bei der Rückspülung verringert, ist auch ein Einfluß auf die Retention des bLF zu erkennen, die im Mittel bei etwa 35 % liegt. Weitergehende Untersuchungen zum Backflushing zeigen, daß nicht unbedingt das Rückspülvolumen, sondern die Spülfrequenz von entscheidender Bedeutung ist. Je höher die Frequenz, desto höher nivellieren sich die mittleren Permeatflüsse. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen; dabei wurden Impulse von einer Dauer $\leq 0,1$ sec gegeben und die Methode als Backpulsing oder Backshocking bezeichnet [MILISIC & BERSILLON, 1986; BHAVE, 1995; WENTEN, 1995]. Die Permeation von Lactoferrin kann trotz der UTMP-Filtration nicht verbessert werden, die weiteren Untersuchungen werden daher verstärkt auf die 0,8 und 1,2 μm Membranen gerichtet.

Ein weiteres Problem entsteht durch die geringen Scherraten in den Modulen und den damit verbundenen stärkeren Foulingeffekten. Dadurch bekommt auch die Qualität der verwendeten Molke eine größere Bedeutung. Biologische Medien zeigen naturgemäß Schwankungen in ihrer Zusammensetzung. So zeigen bereits die Molken im Extremfall Transmissionswerte zwischen 10 und 25 %. Der Schwebstoffgehalt wirkt sich wiederum auf das Fouling und damit auf die Flußraten und Standzeiten aus. In Abbildung 3.33 sind die Arbeitspunkte verschiedener Membranen (0,8 und 1,2 μm CA) bei verschiedenen Molkenqualitäten (15 und 26 % Transmission) dargestellt.

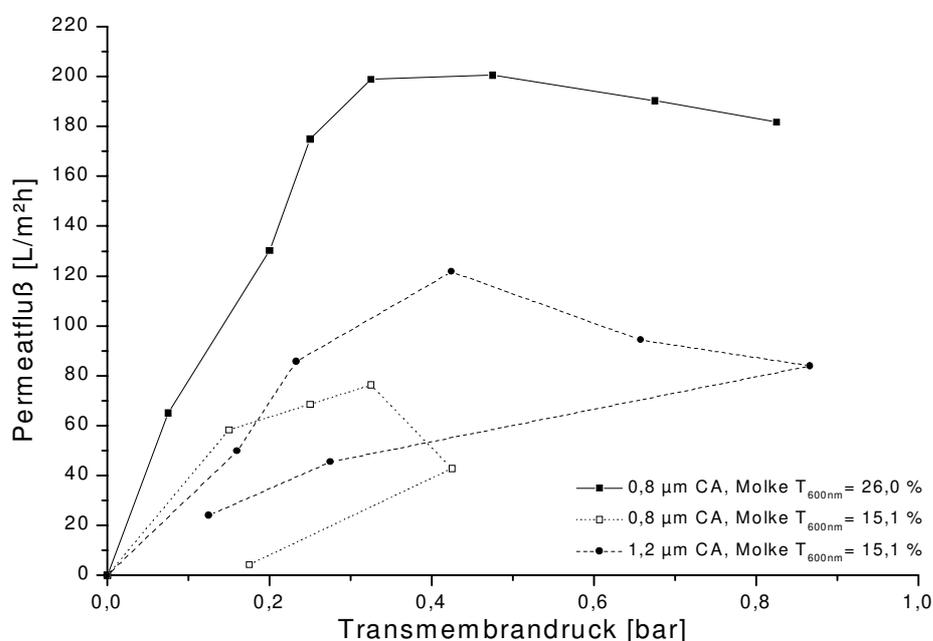


Abb. 3.33: Bestimmung der Arbeitspunkte bei unterschiedlichen Molkenqualitäten

Membrantyp: 302-18304-07E, 0,8 μm CA, T = 6 – 12 °C, Überströmung 10,0 L/min
302-12303-07E, 1,2 μm CA, T = 6 – 12 °C, Überströmung 11,0 L/min

Für die 0,8 µm Membran verläuft der druckkontrollierte Bereich bei beiden Molkenqualitäten bis zu einem TMP von etwa 0,3 bar. Allerdings sind die erreichbaren Flußraten bei der qualitativ besseren Molke (26 % Transmission) um den Faktor 2 bis 3 höher. Bei gleicher Molke (15,1 % Transmission) zeigen die 0,8 und 1,2 µm Membranen in etwa gleiches Flußverhalten. Der Arbeitsbereich liegt bei der 1,2 µm Membran allerdings um 25 % höher (bis TMP 0,4 bar).

Zwei Filtrationen der verschiedenen Molken mit der 0,8 µm Membran zeigen, daß bei höherem Schwebstoffgehalt die Filtrationszeiten (bezogen auf gleiche Volumina) um 50 % größer sind. Außerdem sind die Druckbelastungen für die Membran um 25 % größer, da die Molke eine höhere Viskosität besitzt. Der Flußratenabfall verläuft dreimal schneller, wodurch sich die Standzeiten der Membranen deutlich verkürzen. Diese Unterschiede sind bei der 1,2 µm Membran nicht so deutlich ausgeprägt.

Um den Einfluß der unterschiedlichen Molken auf die 0,8 µm Membran zu minimieren, werden daher die Molken zunächst mit 1,2 µm vorfiltriert, um Permeate mit definierten Eigenschaften zu gewinnen (Abbildung 3.34).

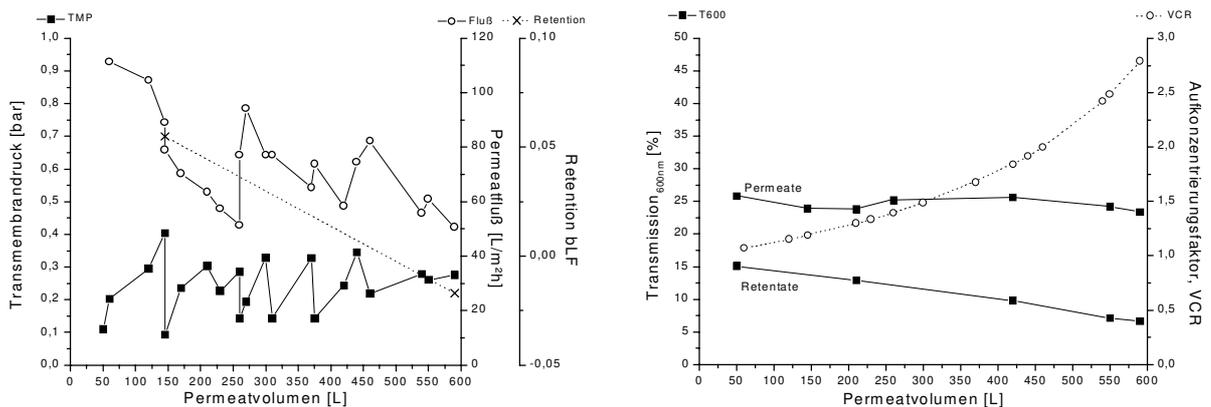


Abb. 3.34: UTMP-Filtration von Molke mit 1,2 µm Celluloseacetat

Membrantyp: 303-12303-07E, T = 6 – 12 °C, Überströmung 13,0 L/min

Der Transmembrandruck wird während der Filtration immer im Arbeitsbereich bis 0,4 bar gehalten. Deutlich zu erkennen ist der zackenförmige Verlauf durch die regelmäßigen Rückspülungen. Der Permeatfluß läßt sich, da Fouling zu jedem Zeitpunkt stattfindet, nicht bis auf den Anfangswert von etwa 110 L/m²h regenerieren. Über die gesamte Filtration ist daher ein Abfall der Flußrate zu erkennen, wenn auch auf höherem Niveau. Der mittlere Fluß liegt bei 68,3 L/m²h. Es wird ein 860 L Batch-Versuch gefahren, das VCR liegt am Ende bei 2,8. Das gewonnene Permeat besitzt eine Transmission um 25 % (Molke 15 %). Die bLF-Permeation liegt bei 95 %.

Das gewonnene Permeat (590 L) wird anschließend mit 0,8 μm filtriert (Abbildung 3.35). Es zeigt sich dabei, daß der TMP über die gesamte Filtration konstant zwischen 0,15 und 0,25 bar und damit im Arbeitsbereich liegt, eine Rückspülung ist daher nicht erforderlich. Der Molkentank wird auf einem konstanten Volumen von 200 L gehalten, erst ab einem filtrierten Volumen von 390 L wird ein echter Batch gefahren. Dies ist auch der Zeitpunkt, an dem der TMP auf 0,2 bar steigt, da jetzt das VCR exponentiell zunimmt. Erst ab etwa 520 L ist ein merklicher Flußratenabfall zu verzeichnen. Die Transmission der Permeate stabilisiert sich zwischen 30 und 35 %, die bLF-Permeation beträgt über 90 %. Die mittlere Flußrate liegt mit 90,5 L/m²h um 32 % über der mittleren Flußrate der 1,2 μm Filtration.

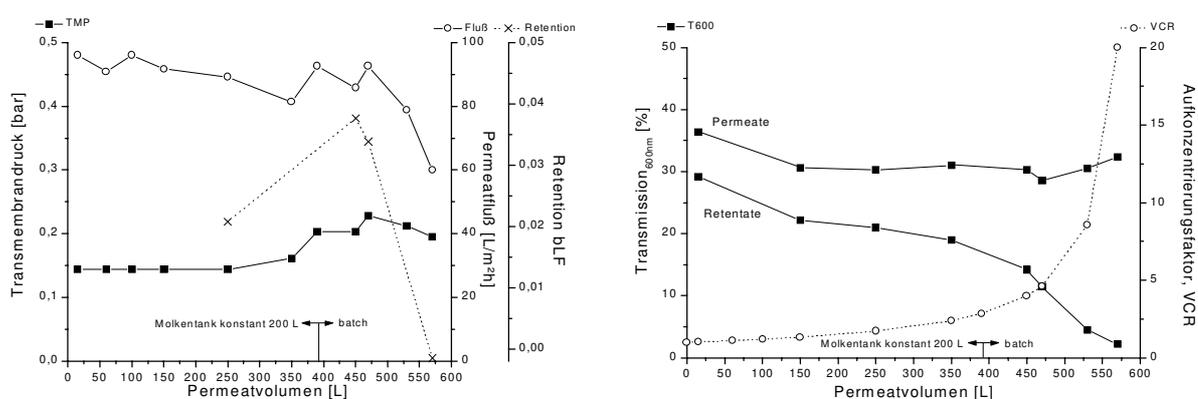


Abb. 3.35: UTMP-Filtration von Molke mit 0,8 μm Celluloseacetat
Membrantyp: 303-18304-07E, T = 6 – 12 °C, Überströmung 14,0 L/min

Die Kombination aus 1,2 und 0,8 μm Celluloseacetat in einer Doppelfiltration bietet den besten Kompromiß aus Permeation des Lactoferrins und Retention der Schwebstoffe. Durch Etablierung des UTMP-Verfahrens sind lange Filtrationszeiten der Module gewährleistet. Es gestattet den Aufbau eines konstanten Transmembrandrucks entlang der Membran und damit die optimale Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Fläche. Durch regelmäßige Rückspülungen lassen sich die reversiblen Foulingeffekte minimieren und die Permeatflußraten auf höherem Niveau stabilisieren.

Mit den entwickelten Reinigungsmethoden RM 7 für Celluloseacetat- und RM 4 für Hydrosart-Membranen können die Wasserflüsse nach der Reinigung zu 80 – 90 % regeneriert werden. Auch mit kommerziell erhältlichen Reinigungsmitteln wie P3-Ultrasil 62 (RM 5) können die Module effektiv gereinigt werden. Eine effektive Reinigung ist entscheidend für die Standzeiten der Module. Sollte die entwickelte Filtrationsmethode im späteren Verlauf des Projektes im industriellen Prozeß etabliert werden, so ist der Einsatz von Hydrosart[®]-Membranen zu empfehlen, da diese mechanisch und chemisch wesentlich stabiler sind.

3.3 Isolierung von Lactoferrin

In der Literatur sind eine Reihe von Veröffentlichungen zur Isolierung von Lactoferrin mit Kationenaustausch-Membranen erschienen [ADISAPUTRO ET AL., 1996; MITCHELL ET AL., 1994; PCT WO 93/02098]. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch auch ein Scale Up bis in die Technikkstufe mit einer Fläche von 1 m² durchgeführt.

Wie bereits aus Abbildung 3.20 ersichtlich, stellt die Isolierung von Lactoferrin mit Membranadsorbern die zweite Stufe im Gewinnungsprozeß dar. Durch die Untersuchungen sollen verschiedene Parameter näher definiert werden. Wichtige Kenngrößen bei Chromatographie-Materialien sind beispielsweise die dynamischen Kapazitäten der Adsorber oder die entstehenden Druckverhältnisse bei der Auftragung. Für die Elution müssen die Gradienten näher definiert werden, da neben bLF auch Lactoperoxidase als basisches Glykoprotein adsorbiert wird. Gleichzeitig werden auch die Permeate aus den Filtrationen auf ihre Eignung zur Auftragung auf den Austauscher getestet.

3.3.1 Labormaßstab – Sartobind® S100

Das Sartobind® S100-Modul besteht aus 5 Membranlagen von je 20 cm² (Abbildung 3.8). Während die Gesamtaustauschfläche 100 cm² beträgt, stehen als Anströmfläche nur 20 cm² zur Verfügung. Um Module unterschiedlicher Flächen oder Geometrien vergleichen zu können, werden die Auftragungsflußraten (cm³/min) ins Verhältnis zur Anströmfläche (cm²) gesetzt. Die daraus resultierenden Strömungsgeschwindigkeiten (cm/min) können direkt verglichen werden. Eine weitere Normierung der Auftragungsflußraten kann durch Einbeziehung des Differenzdrucks bei der Auftragung erfolgen (L/minbar).

Versuche zur Auftragung von 1,5 L Molkenpermeat haben gezeigt, daß bei Permeaten mit Transmissionen von 40 % oder größer keine Probleme durch Verblockung der Membranen entstehen. Verblockungserscheinungen zeigen sich erst bei Transmissionen < 35 % in den Permeaten. Das bedeutet jedoch nicht, daß mit Permeaten dieser Qualität (< 35 %) nicht gearbeitet werden könnte, da sowohl die dynamische Kapazität der Module wie auch der Lactoferringehalt in den Permeaten letztlich das Auftragungsvolumen bis zum Durchbruch von bLF bestimmen. Diese Parameter werden aber bei diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt, hier soll lediglich ein Richtwert für die Permeatqualität aus der Filtration gegeben werden. Je höher die Transmission der Permeate ist, desto mehr Volumen kann über eine bestimmte Anströmfläche aufgetragen werden, ohne daß mit einem Abfall der Flußrate oder einem Druckanstieg zu rechnen ist.

3.3.1.1 Integritätstest und dynamische Kapazität

Bevor die dynamischen Kapazitäten des S100-Moduls untersucht werden, wird ein Integritätstest durchgeführt. Dadurch wird sichergestellt, daß das Modul seine Austauschfähigkeit besitzt, also integer ist. Dazu wird eine einfache Säure-Base-Titration durchgeführt und der Durchbruch bei 10 % mittels Leitfähigkeitsmessung oder pH-Messung ermittelt. Integre Module haben einen Wert von $5 \pm 1 \mu\text{equiv}/\text{cm}^2$ bezogen auf einwertige Ionen. Tabelle 3.14 zeigt die ermittelten Durchbrüche bei Auftragungsgeschwindigkeiten zwischen 1 und 5 cm/min, die Module sind demnach integer.

Tab. 3.14: Integritätstest der Sartobind® S100-Module
Modultyp: S100X

Flußrate [mL/min]	Geschwindigkeit [cm/min]	dyn. Kapazität [$\mu\text{equiv}/\text{cm}^2$]
5	0,3	5,40
10	0,5	5,63
15	0,8	5,18
20	1,0	5,63

Die dynamischen Kapazitäten werden bei einem Durchbruch von 10 % des bLF im Filtrat der Auftragung bestimmt (Abbildung 3.36 links). Hierbei wird untersucht, ob möglicherweise eine geschwindigkeitsabhängige Austauschkinetik vorliegt. Für die S100-Module wird eine Geschwindigkeit zwischen 1,0 und 5,0 cm/min gewählt (Abbildung 3.36 rechts). Dabei kann eine Abnahme der dynamischen Kapazität von 0,58 auf 0,28 mg/cm² mit zunehmender Geschwindigkeit festgestellt werden. Dies erscheint logisch, da mit abnehmender Geschwindigkeit die dynamische in die statische Kapazität übergeht. Die statische Kapazität wird nach einer Sartorius-Prüfvorschrift (PV 73A) zu 0,7 mg/cm² bestimmt. Die dynamischen Kapazitäten betragen danach zwischen 83 % (1,0 cm/min) und 40 % (5,0 cm/min) der statischen Kapazität. Möglicherweise hängt der frühe Durchbruch bei hohen Geschwindigkeiten aber auch mit einem Verteilungsproblem des Permeats im Modul zusammen. Bei hohen Geschwindigkeiten könnte genau in der Modulmitte, wo das Permeat einströmt (vgl. Abbildung 3.8 rechts), der Durchbruch zuerst erfolgen. Die Ursachen für dieses Verhalten werden nicht weiter untersucht, da das S100-Modul der größte Kationenaustauscher in der planaren Bauform ist. Ein Modul-Scale Up wäre nur mit einer größeren Anzahl an Membranlagen oder mit einem größeren Durchmesser

der Module möglich. Im weiteren Scale Up der Isolierungsstufe werden daher (Spiral)-Wickelmodule eingesetzt.

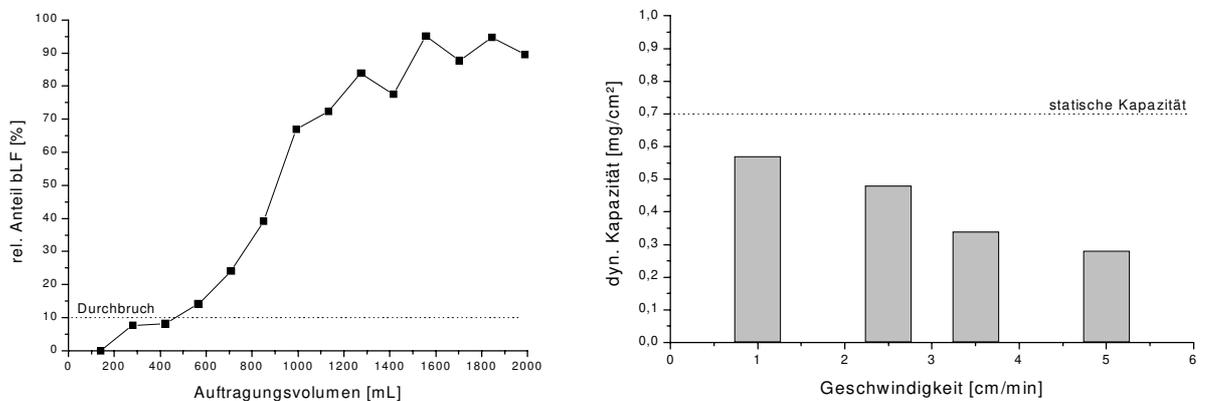


Abb. 3.36: Ermittlung der dynamischen Kapazität mit Molkenpermeat bei Sartobind® S100
links: Durchbruchkurve bei 3,5 cm/min
rechts: Dynamische Kapazitäten bei 1,0 – 5,0 cm/min Auftragungsgeschwindigkeit

Die Bestimmung von dynamischen Kapazitäten ist von großem Interesse für die Industrie. Bei einer geschwindigkeitsabhängigen dynamischen Kapazität können so im voraus die Raum-Zeit-Ausbeuten berechnet werden. Die Auftragung mit 5 cm/min ist daher, trotz der nur etwa halb so großen dynamischen Kapazität, wirtschaftlicher als die Auftragung bei 1 cm/min. Das Auftragungsvolumen kann bei Fehlen einer entsprechenden intime-Analytik zur Durchbruchbestimmung aus der dynamischen Kapazität und den online-gemessenen bLF-Gehalten des Auftragsmediums berechnet werden.

Das Molkenpermeat für die Auftragungen wird mit der Dead End-Filtration (vgl. Kap. 3.2.1.1) gewonnen, der Transmissionswert liegt bei 40 – 45 %. Bei allen Versuchen werden 1,6 bis 2,0 L Permeat aufgetragen und kein Abfall der Flußrate festgestellt. Das aufgetragene Volumen ist zwei- bis dreimal größer als es nach der dynamischen Kapazität notwendig wäre. Die Wasserflüsse können nach Reinigung der S100-Module mit 1 M NaOH bei 40 °C vollständig wiederhergestellt werden. Bei Permeat-Transmissionen ab 40 % sind Probleme weder bei der Auftragung noch bei der Reinigung zu erwarten.

3.3.2 Kleine Technikumsstufe – Wickelmodul S02k-15-6

Bei den (Spiral-)Wickelmodulen (Abbildung 3.37) erfolgt die Auftragung der Medien wie beim S100-Modul im Dead End-Modus, allerdings strömt das Medium zunächst parallel an der Membranoberfläche in das Innere des Moduls, bevor es radial nach außen durch die Membran gedrückt wird. Die Dicke einer Membran aus regenerierter Cellulose beträgt etwa 200 μm . Aufgrund der Fertigungstoleranzen ist diese Dicke aber nicht einheitlich, die Durchbrüche würden bei einlagigen Modulen immer zuerst an der dünnsten Stelle der Membran erfolgen. Die mehrlagige Bauform der Module (Tabelle 3.15) dient daher sowohl zum Ausgleich der Fertigungstoleranzen als auch zur Herstellung kompakterer Module.



Abb. 3.37: Wickelmodul S02k-15-6 der Sartobind[®] Factor Two Family (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Die Baureihe der Wickelmodule wird als Sartobind[®] Factor Two Family bezeichnet. Wie aus Tabelle 3.15 ersichtlich, unterscheiden sich Bauform, Bauhöhe und Gesamtaustauschfläche der verschiedenen Modelle jeweils um den Faktor zwei. Die Flußrate und die Kapazitäten verhalten sich entsprechend, allerdings sind diese Parameter für jedes Medium und jede Komponente unterschiedlich.

Tab. 3.15: Modultypen der Sartobind® Factor Two Family, Quelle: Sartorius

Bauform	Höhe [cm]	Fläche [m ²]	Flußrate [L/minbar]
60 Wicklungen	50.0	8.0	2.60
	25.0	4.0	1.50
	12.5	2.0	0.75
	6.3	1.0	0.35
	3.1	0.5	0.17
30 Wicklungen	50.0	4.0	7.00
	25.0	2.0	3.50
	12.5	1.0	1.70
	6.3	0.5	0.85
	3.1	0.25	0.42
15 Wicklungen	50.0	2.0	15.40
	25.0	1.0	7.50
	12.5	0.5	3.70
	6.3	0.25	1.85
	3.1	0,125	0,95

Der Vorteil der Membranmodule liegt in der einfachen Handhabung. Um die Austauschfläche zu vergrößern, können die unterschiedlichsten Module durch einfache serielle Schaltung kombiniert werden. Ist zusätzlich eine geringe Zykluszeit für die Beladung und die Elution bei einem Prozeß erforderlich, können die Module mit 15 Wicklungen, die die höchsten Flußraten zulassen, auch parallel geschaltet werden.

In dieser Technikumsstufe wird ein Modul mit 15 Wicklungen und 6 cm Bauhöhe eingesetzt (S02k-15-6 bedeutet S = starker Kationenaustauscher, 02k = 2500 cm² Austauschfläche, 15 = Anzahl der Wicklungen, 6 = Bauhöhe in cm). Die Anströmfläche auf das Modul beträgt 166,7 cm² (2500 cm²/ 15 Wicklungen).

3.3.2.1 Integritätstest und dynamische Kapazität

Obwohl die Wickelmodule durch die Qualitätssicherung von Sartorius bereits einzeln auf ihre Integrität getestet wurden, wird die Integrität des Moduls nochmals überprüft. Dazu wird wie beim S100-Modul eine Säure-Base-Titration bei verschiedenen Flußraten durchgeführt, der Durchbruch wird mit einer pH-Elektrode überwacht. Die Kapazität in Bezug auf einwertige Ionen

soll auch hier bei $5 \pm 1 \mu\text{equiv}/\text{cm}^2$ liegen. Die Integrität der Module kann mit diesen Versuchen bestätigt werden (Tabelle 3.16).

Tab. 3.16: Integritätstest vom Wickelmodul S02k-15-6

Flußrate [mL/min]	Geschwindigkeit [cm/min]	dyn. Kapazität [$\mu\text{equiv}/\text{cm}^2$]
104	0,6	4,6
235	1,4	5,5
251	1,5	4,3
480	2,9	5,4

Für die Untersuchungen zur dynamischen Kapazität für Lactoferrin werden Molkenpermeate aus den Dead End-Versuchen verwendet. Die Transmissionswerte der Permeate liegen zwischen 40 und 50 %. Es zeigen sich keine Verblockungseffekte während der Auftragungen, sowohl die Transmissionen im Durchbruch als auch die Auftragungsflußraten bleiben konstant (Abbildung 3.38 links). Bei einer Auftragungsgeschwindigkeit von 3,0 cm/min (Flußrate 500 mL/min) erfolgt der Durchbruch von Lactoferrin nach 7,5 L Permeat, insgesamt kann aber das dreifache Volumen an Permeat ohne Verblockungseffekte auf das Modul aufgebracht werden.

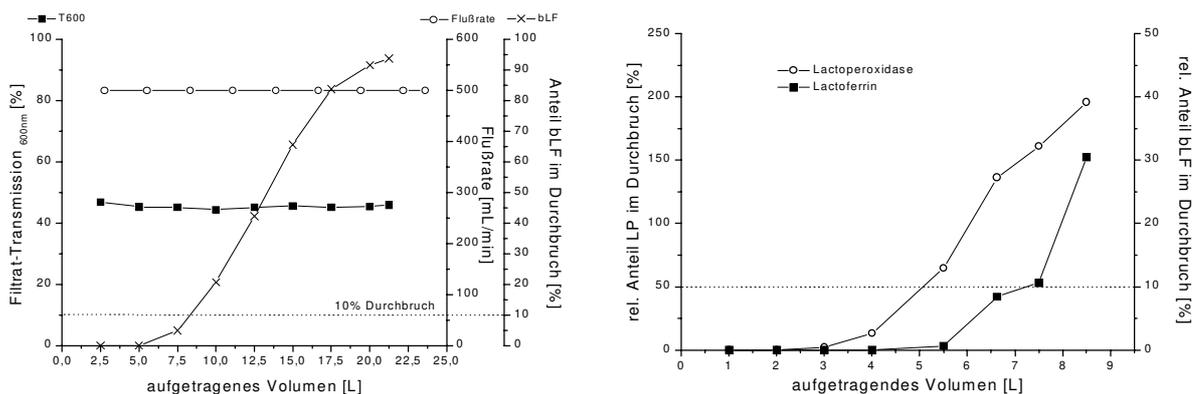


Abb. 3.38: Durchbruchkurven mit Molkenpermeat beim Wickelmodul S02k-15-6

links: Verhalten der Flußrate und der Transmission
rechts: Verhalten von Lactoferrin und Lactoperoxidase

Bei der Auftragung wird auch das Verhalten der Lactoperoxidase näher untersucht (Abbildung 3.38 rechts). Der Durchbruch von 10 % der LP erfolgt demnach bereits nach Auftragung von etwa 4 L Permeat. Lactoferrin kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt des bLF-Durchbruchs ist der LP-Anteil bereits auf 50 % des Ausgangswertes ange-
 stiegen. Der LP-Anteil im Durchbruch steigt dann im weiteren Verlauf der Auftragung auf etwa 200 %. Dieses Verhalten ist auf den besseren Austauschprozeß der LP mit dem Membrana-
 nadsorber zurückzuführen. Erst mit fortschreitender Auftragung wird die Lactoperoxidase durch
 das Lactoferrin von den Austauschplätzen verdrängt (eluiert), da bLF stärker gebunden wird
 [CHIU & ETZEL, 1998].

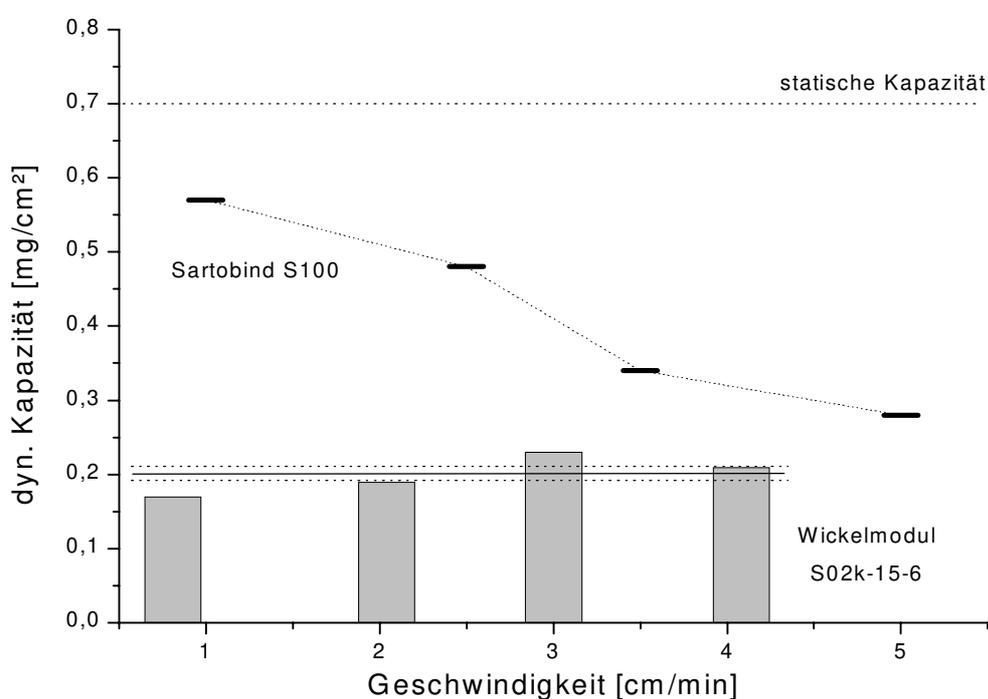


Abb. 3.39: Vergleich der dynamischen Kapazität mit Molkenpermeat beim Wickelmodul S02k-15-6 und beim Flachmodul S100

Die ermittelten dynamischen Kapazitäten des Wickelmoduls sind in Abbildung 3.39 den Kapazitäten der S100-Module gegenübergestellt. Die Abnahme der Kapazitäten mit steigender Auftragungsgeschwindigkeit kann beim Wickelmodul nicht festgestellt werden. Der Mittelwert der dynamischen Kapazitäten beträgt 0,2 mg/cm². Die Ursache liegt wahrscheinlich in der homogeneren Verteilung der Medien im Modul, bevor diese die Membranen durchströmen.

3.3.2.2 Festlegung der Elutionsbedingungen

Wie bereits erwähnt, wird die Lactoperoxidase bei der Auftragung zunächst schneller als das Lactoferrin ausgetauscht. Ein Großteil der LP wird im weiteren Filtrationsverlauf wieder von den Austauschplätzen durch das bLF verdrängt. Trotzdem bleibt ein Teil der LP weiterhin am Adsorber gebunden. Die Festlegung der Elutionsgradienten zur Trennung von LP und bLF stellt daher einen wichtigen Schritt im gesamten Prozeß dar. Im abschließenden Downstreaming-Prozeß kann die Reinheit nur minimal verbessert werden (vgl. Kap 3.4), die Reinheit des Lactoferrins wird letztlich durch die Wahl des Gradienten bei der Elution vom Membranadsorber bestimmt.

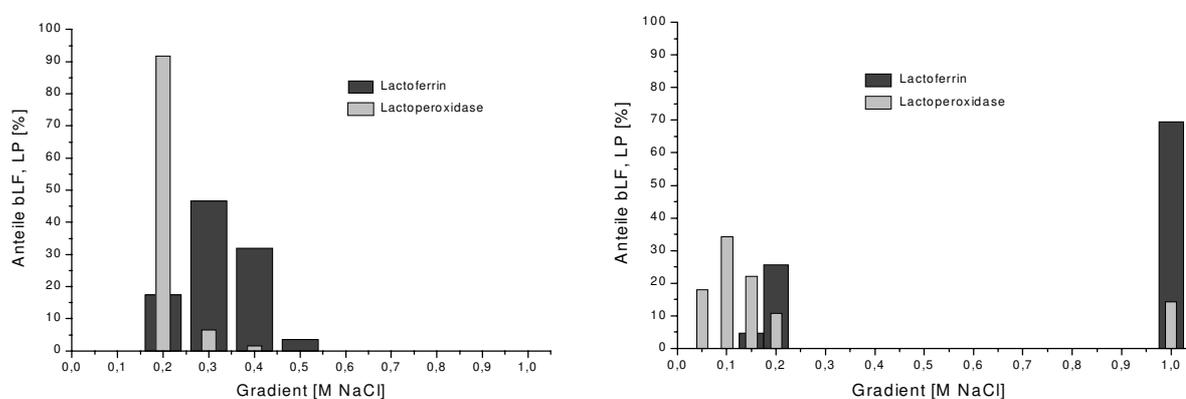


Abb. 3.40: Anteile an bLF und LP in den Einzelfraktion bei der Gradientenoptimierung LP-Daten aus WALDEN, 1999

links: Gradient 0,2 – 1,0 M NaCl in 0,1 molaren Schritten (jede Fraktion 900 mL)

rechts: Optimierung des Gradienten zur Trennung LP/ bLF (jede Fraktion 900 mL)

In Abbildung 3.40 links werden die Anteile an LP und bLF in den Einzelfraktionen bei einer Elution mit einem Stufengradienten (0,2 – 1,0 M NaCl) untersucht. Über 90 % der LP eluieren bei 0,2 M NaCl, aber auch bereits 15 % des gebundenen bLF. Der Großteil des bLF wird ab einem Gradienten von 0,3 M NaCl eluiert. Ab 0,6 M NaCl können keine LP oder bLF-Anteile mehr in den Fraktionen nachgewiesen werden. Die Trennung von LP und bLF sollte bis zu einem Gradienten von 0,2 M NaCl abgeschlossen sein, da sonst der Lactoferrinverlust zu groß wird. Der Gradient wird daraufhin im Bereich bis 0,2 M NaCl näher untersucht (Abbildung 3.40 rechts). Dabei zeigt sich, daß ca. 80 % der LP bis 0,15 M NaCl eluiert werden. Der bLF-Verlust ist mit knapp 5 % sehr klein. In der Lactoferrin-Fraktion (0,2 und 1,0 M NaCl) befinden sich aber immer noch etwa 20 % der Lactoperoxidase. Es wird daher versucht, mit einem größeren Elutionsvolumen dieses Verhältnis zu verbessern (Tabelle 3.17). Es zeigt sich, daß durch ein größeres

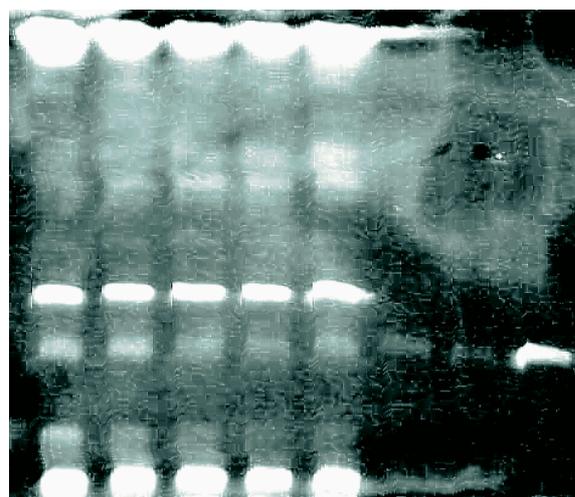
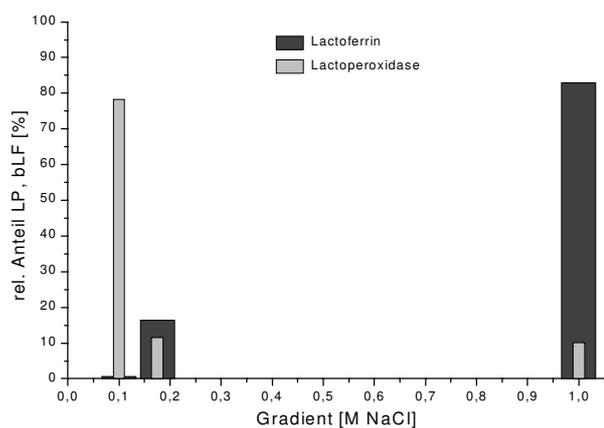
Volumen (Fraktionen 3 - 5, 0,15 M NaCl) nur noch kleine Anteile (ca. 3,5 %) der LP eluiert werden können. Der Hauptanteil der LP (89 %) eluiert bereits in den ersten 900 mL. Etwa 7 % der LP befinden sich noch in der bLF-Fraktion.

Nach Entsalzung und Gefriertrocknung werden die Auswaagen der Einzelfraktionen bestimmt. Der Absolutgehalt der Lactoperoxidase im Lactoferrin liegt demnach unter 5 %, es ergibt sich also eine gute Reinheit des isolierten Lactoferrins (> 95 %).

Tab. 3.17: Anteile bLF und LP in den Einzelfraktionen bei der Optimierung des Elutionsvolumens [WALDEN, 1999]

Gradient [M NaCl]	Fraktion Nr.	Volumen [L]	Anteile [%]	
			Lactoferrin	Lactoperoxidase
0,15	1	0,45	1,9	77,32
	2	0,45	--	11,80
	3	0,45	--	2,48
	4	0,30	--	0,77
	5	0,25	--	0,47
1,00	1	1,00	98,1	7,16

Durch den 2-Stufengradienten ist eine gute Trennung der Lactoperoxidase und des Lactoferrins bei der Elution gewährleistet. Sollte sich im Verlauf des Projekts die Notwendigkeit ergeben, auch die Lactoperoxidase zu isolieren, muß ein 3-Stufengradient für die Elution gewählt werden (Abbildung 3.41 links).



Bahn: 1 2 3 4 5 6 7 8

Abb. 3.41: Optimierter 3-Stufengradient zur Isolierung von Lactoferrin und Lactoperoxidase [WALDEN, 1999]

links: Anteile an bLF und LP in den Einzelfraktionen (alle Fraktionen 900 mL)

rechts: SDS-PAGE 12,5 % der Einzelfraktionen und Proben aus der Permeatauftragung

Bahn 1: Molke; 2: Permeat aus Dead End-Filtration; 3 – 5: Permeatauftragung nach 10, 11 und 12 min; 6: Eluat 0,1 M NaCl; 7: Eluat 0,175 M NaCl; 8: Eluat 1,0 M NaCl

In der 0,1 M NaCl-Fraktion kann so 80 % der Lactoperoxidase eluiert werden, allerdings ist auch eine Verunreinigung durch Lactoferrin zu erkennen (ca. 1 %). Dies scheint zunächst unwesentlich wenig zu sein, bezogen auf die Absolutgehalte ergibt sich aber eine Verunreinigung von 20 - 30 %, da Lactoferrin stärker und damit in größeren Mengen mit dem Membranadsorber wechselwirkt. Zusätzlich ist auf den Gelen (Abbildung 3.41 rechts, Bahn 6, 0,1 M NaCl-Fraktion) eine Verunreinigung durch β -Lactoglobulin zu erkennen. Eine weitere Optimierung der Gradienten für Lactoperoxidase erscheint nicht sinnvoll, da zusätzliche Verluste von 10 – 20 % einkalkuliert werden müssen.

Für die 1,0 M NaCl-Fraktion ergibt sich ein Lactoferringehalt von 80 % des Gesamt-bLF mit einer Verunreinigung von 10% LP. Auf die Absolutgehalte umgerechnet ergibt sich demnach eine Verunreinigung mit Lactoperoxidase von \ll 5 %. Vergleicht man die Bahnen 1 und 2 (Molke und Permeat) mit den Proben aus der Auftragung (3 – 5), erkennt man, daß die Bahnen für bLF und LP in den Durchbruchproben zwar etwas schwächer als in Molke und Permeat sind, der Durchbruch aber trotzdem schon stattgefunden hat. Die 1,0 M NaCl-Fraktion (Bahn 8) zeigt eine deutliche Lactoferrin-Bande, die Gelelektrophorese bestätigt damit die Ergebnisse der HPLC und des LP-Assays.

Für die Elution von Lactoferrin in hoher Reinheit (> 95 %) muß mindestens ein 2-Stufengradient (0,15 und 1,0 M NaCl) gewählt werden. Soll zusätzlich auch die Lactoperoxidase in möglichst hoher Reinheit gewonnen werden, ist ein 3-Stufengradient (0,1, 0,175 und 1,0 M NaCl) erforderlich.

3.3.3 Große Technikumsstufe – Wickelmodul S05k-15-12

Die Austauscherfläche wird im zweiten Scale Up vervierfacht. Dazu werden zwei Module mit 5000 cm² (S05k-15-12) in Serie geschaltet. Die automatisierte Technikumsanlage ist in Abbildung 3.42 dargestellt. Für die Elutionslösungen sind zwei Steuerkanäle vorhanden, es wird mit einem 2-Stufengradienten (0,175 und 1,0 M NaCl) eluiert.

Für die Auftragung wird das Molkenpermeat aus der Doppelfiltration mit 1,2 und 0,8 μ m Porengröße auf der Sartocon[®] II-Anlage (vgl. Kap. 3.2.2.3) verwendet. Das Gesamtpermeat aus dieser Filtration hat einen Transmissionswert von 33 %, es kann daher erstmals mit Verblockungseffekten bei der Auftragung gerechnet werden (vgl. Kap 3.3.1).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Frage, ob sich die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur dynamischen Kapazität am S02k-15-6 bestätigen lassen.

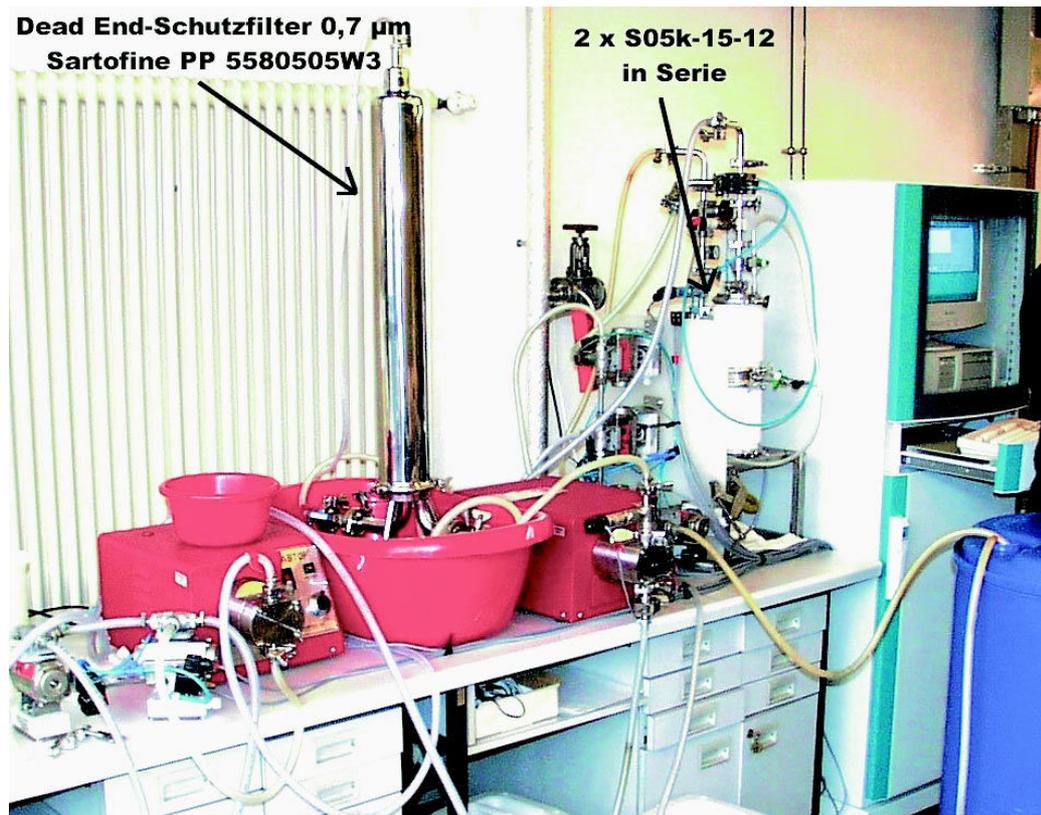


Abb. 3.42: Automatisierte Technikumsanlage

3.3.3.1 Integritätstest und dynamische Kapazität

Die Module werden wie bereits erwähnt in Serie geschaltet. Ein Integritätstest wird daher nicht durchgeführt, da dieser mit den einzelnen Modulen gemacht werden muß. Außerdem wurden die Module bereits durch die Firma Sartorius auf ihre Integrität getestet.

Die Untersuchungen zur dynamischen Kapazität werden mit insgesamt vier Modulen in zwei Kombinationen durchgeführt. Eine typische Durchbruchkurve ist für die Geschwindigkeit von 4,5 cm/min in Abbildung 3.43 links dargestellt. Insgesamt werden bei allen Versuchen etwa 50 L Molkenpermeat aus der Doppelfiltration mit 1,2 und 0,8 µm Porengröße aufgetragen. Die dynamischen Kapazitäten (Abbildung 3.43 rechts) beider Modulkombinationen betragen im Mittel 0,2 mg/cm². Allerdings zeigt sich in Modulkombination 1 eine etwas höhere dynamische Kapazität (0,22 mg/cm²), während die Kombination 2 eine etwas geringere Kapazität (0,18 mg/cm²) aufweist. Die Schwankungen der beiden Kombinationen liegen jedoch nur um 10 – 15 % um den Mittelwert von 0,2 mg/cm², es handelt sich vermutlich um Meßfehler der Analytik. Die dynamische Kapazität ist unabhängig von der Beladungsgeschwindigkeit und beträgt wie auch beim kleineren Modul (S02k-15-6) 29 % der statischen Kapazität.

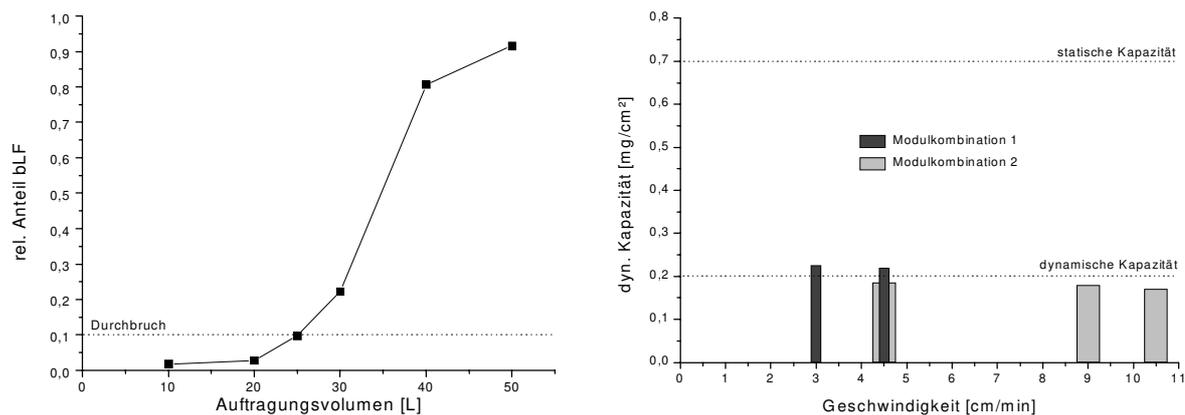


Abb. 3.43: Durchbruchverhalten mit Molkenpermeat beim Wickelmodul S05k-15-12

links: Durchbruchkurve (4,5 cm/min, Modulkombination 1)

rechts: Dynamische Kapazitäten bei verschiedenen Geschwindigkeiten (3,0 – 10,5 cm/min)

Die dynamische Kapazität von 0,2 mg/cm² des kleineren Moduls S02k-15-6 (vgl. Kap. 3.3.2.1) kann damit bestätigt werden. Auch in zukünftigen Scale Ups kann mit dieser Kapazität gerechnet werden. Sofern keine intime-Analytik zur Verfügung steht, können mit einer Volumensicherheit von 10 % bei der Auftragung auch mögliche Schwankungen ausgeglichen werden.

3.3.3.2 Auftragungsverhalten

Das aufgetragene Molkenpermeat aus der Doppelfiltration (1,2 + 0,8 µm Porengröße) hat eine Transmission von 33 %. Die Untersuchungen im Labormaßstab mit dem Sartobind S100 zeigen im Transmissionsbereich 30 – 35 % bereits Verblockungserscheinungen (= höhere Gegendrucke) des Moduls. Dieses Verhalten kann auch bei den Wickelmodulen bestätigt werden (Abbildung 3.44 links). Der Differenzdruck im Modul steigt zunächst stark an, bis das System nach etwa 4 L vollständig mit Molkenpermeat gefüllt ist. Der Druck nimmt im weiteren Verlauf der Auftragung (3,5 L/min; 10,5 cm/min) um etwa 10 % von 1,7 auf 1,9 bar zu. Eluiert wird mit 2 L/min, daher liegt der Druck bei der Elution entsprechend niedrig. Der Druckanstieg um 10 % erscheint zunächst nicht weiter problematisch, deutlicher werden die Verblockungserscheinungen bei der Auftragung der normierten Flüsse in Abbildung 3.44 rechts. Hier werden ohne zwischenzeitliche Reinigung der Module drei Auftragnungen bei Flußraten von 3,0, 3,5 und 1,5 L/min durchgeführt.

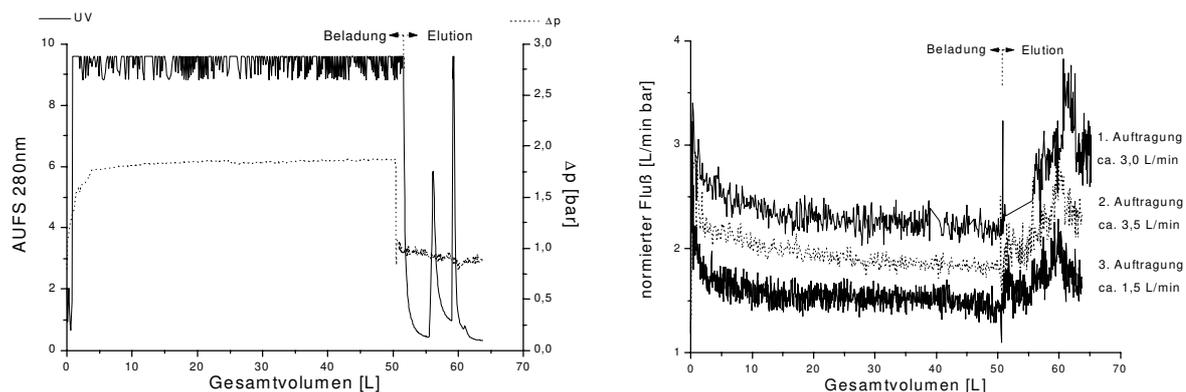


Abb. 3.44: Auftragung von Molkenpermeat bei zwei Modulen (Typ S05k-15-12) in Serie
links: UV-Signal und Differenzdruck während der Auftragung (10,5 cm/min)
rechts: Normierte Flußrate bei Modulkombination 2

Bei der ersten Auftragung (3,0 L/min = 9 cm/min) fällt der normierte Fluß von anfangs 3 L/minbar exponentiell ab und stabilisiert sich bei 2,4 L/minbar. Bei der Elution steigt der normierte Fluß bedingt durch die hohe Ionenstärke der Elutionslösungen stark an, nach der Equilibrierung liegt er knapp unterhalb des Anfangsniveaus. Die Verblockungseffekte zeigen sich dann bei der zweiten Auftragung mit 3,5 L/min (10,5 cm/min). Der normierte Fluß stabilisiert sich hier bei einem ca. 21 % niedrigerem Niveau auf 1,9 L/minbar. Im Verlauf der dritten Auftragung, die nur mit 1,5 L/min (4,5 cm/min) gefahren wird, zeigt sich ein weiterer Abfall des normierten Flusses auf 1,5 L/minbar (-21 %). Die normierten Flüsse halbieren sich demnach nach drei Auftragungen, eine Reinigung der Module muß daher nach spätestens zwei Zyklen erfolgen. Eine Reinigung der Module wird mit 1 M NaOH und 50 % Isopropanol durchgeführt, jedoch können keine zufriedenstellenden Ergebnisse mit dieser Methode erzielt werden. Hier müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Standzeiten der Adsorber zu verbessern. Da auch die Membranadsorber gute mechanische und chemische Stabilität (pH 1 - 14) zeigen, können für diese Untersuchungen auch die Einstufen-Reinigungsmethoden (RM 4 und 5, vgl. Kap. 3.2.2.1.3) aus der Filtration Anwendung finden.

3.3.3.3 Elution und Bilanzierung

Für die Elution wird ein 2-Stufengradient (0,175 und 1,0 M NaCl) verwendet. Um Meßfehler zu minimieren, werden die relativen Anteile an LP und bLF aus den Eluat von fünf Isolierungen gemittelt (Abbildung 3.45 links). 83 % des gesamten Lactoferrins können in der 1,0 M NaCl-Fraktion wiedergefunden werden, allerdings liegt die Verunreinigung durch Lactoperoxidase bei knapp 30 % der gesamten LP. Die gelelektrophoretische Untersuchung (Abbildung 3.45 rechts)

zeigt außerdem, daß Verunreinigungen durch β -Lactoglobulin und Caseine vorhanden sind (Bahn 1). Aus Abbildung 3.44 links ist zu erkennen, daß die Elutionsvolumina zu klein gewählt worden sind, da das UV-Signal zwischen den Fraktionen nicht das Grundsignal erreicht. In der Lactoperoxidase-Fraktion (Bahn 2 und 4) sind daher noch alle majoren Komponenten (BSA, Caseine, β -LG und α -LA) zu erkennen. Durch zu frühes Umschalten auf die 1,0 M Elutionslösung werden diese Verunreinigungen auch in die bLF-Fraktion (Bahn 1) verschleppt. Wird dagegen mit einem größeren Volumen eluiert, verringern sich die Verunreinigungen in der bLF-Fraktion (Bahn 3), ein Restanteil β -Lactoglobulin ist jedoch trotzdem noch nachzuweisen. Um dieses zu umgehen, könnte der erste Gradient von 0,175 auf 0,2 M NaCl erhöht werden.

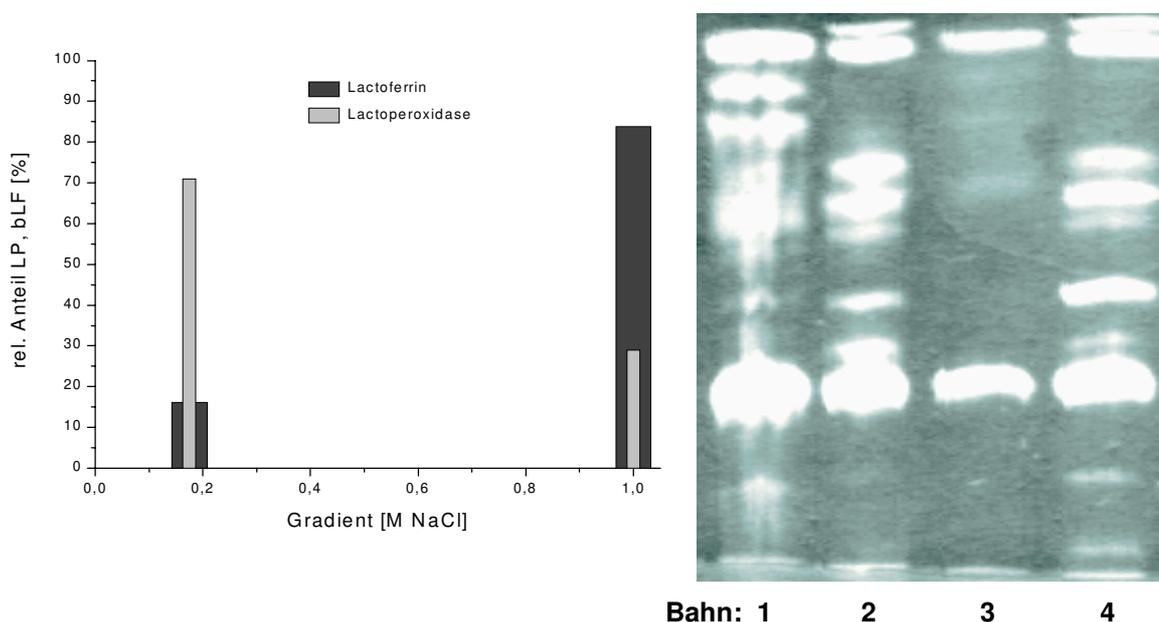


Abb. 3.45: 2-Stufengradient zur Isolierung von Lactoferrin und Lactoperoxidase

links: Anteile an bLF und LP in den Einzelfraktionen (Summe aus 5 Isolierungen)

rechts: SDS-PAGE 12,5 % der Einzelfraktionen

Bahn 1: bLF-Fraktion Isolierung 1; 2: LP-Fraktion Isolierung 1; 3: bLF-Fraktion Isolierung 2; 4: LP-Fraktion Isolierung 2; alle Fraktionen unverdünnt

Die Untersuchungen zur Elution zeigen, daß eine endgültige Festlegung der Parameter Gradient und Volumen erst in der Prozeßanlage stattfinden kann. Die vorangegangenen Ergebnisse können daher die Richtwerte nur weiter einengen.

Die Zykluszeit für die Isolierung liegt bei insgesamt 17 - 22 min (10,5 cm/min, Beladung 7 min und Elution 10 - 15 min). Um hohe Auftragsflußraten zu gewährleisten, dürfen nur Module mit 15 Wicklungen eingesetzt werden (vgl. Tab. 3.14). Sollten die Flächen trotzdem zu klein sein, muß ein weiteres Scale Up durch parallele Schaltung der Module erfolgen. Außerdem sollten die Module nach jeder zweiten Auftragsung gereinigt werden, um hohe Flußraten zu gewährleisten.

3.4 Lactoferrin-Downstreaming

Der dritte Teilbereich behandelt die Aufarbeitung der Eluate und die Charakterisierung der gewonnenen Produkte. Im Hinblick auf die industrielle Vermarktung ist ein wichtiger Aspekt, ob das Lactoferrin durch den Isolierungsprozeß seine antimikrobiellen Eigenschaften behält.

3.4.1 Eluataufarbeitung

Die Gewinnung von Lactoferrin aus den salzhaltigen (1 M NaCl) Eluaten kann prinzipiell auf zwei Arten erfolgen. Zum einen kann das Lactoferrin direkt aus dem Eluat gefällt und abfiltriert werden, zum anderen kann eine indirekte Aufarbeitung erfolgen. Dabei wird das Lactoferrinhaltige Eluat zunächst über eine Ultrafiltration entsalzt und aufkonzentriert und das Produkt anschließend durch Gefrier- oder Sprühtrocknung gewonnen.

3.4.1.1 Direkte Lactoferrin-Gewinnung

Die Ausfällung von Proteinen wird durch eine Änderung der (in der Regel wäßrigen) Lösemittel-Eigenschaften hervorgerufen. Sie ist die älteste Methode zur Trennung (und/oder Aufkonzentrierung) von Proteinen [SCOPES, 1994]. Am häufigsten wird die Ausfällung durch Zugabe von anorganischen Salzen oder organischen Lösemitteln angewandt.

Die Präzipitation von Proteinen durch Erhöhung der Salzkonzentration wird als Aussalzung (Salting Out) bezeichnet; im Gegensatz dazu heißt das Lösen von Proteinen durch Salzzugabe Salting In [REHFELD & REICHEL, 1977]. Das Salting Out ist ein Dehydratations-Prozeß der Hydrathüllen der Proteine, der durch die Elektrolytionen hervorgerufen wird.

Die Zugabe organischer Solventien führt zum einen zu Dehydratations-Effekten, zum anderen ändert sich die Dielektrizitätskonstante des Mediums. Das Medium wird unpolarer und erhöht die Aggregation der Makromoleküle.

Als geeignet für die Fällungsuntersuchungen haben sich Ammoniumsulfat, Ethanol und Aceton erwiesen [PLATE, 1999]. In weiteren Untersuchungen wird die Abhängigkeit der Mengen der Fällungsreagenzien von der bLF-Konzentration untersucht (Abbildung 3.46). Die organischen Lösemittel Ethanol (EtOH) und Aceton (AC) sind in Vielfachen der Proteinlösung angegeben, die Mengen an Ammoniumsulfat für die benötigte Endsättigung können dem Ammoniumsulfat-

Nomogramm (vgl. Kap. 5.4.1) entnommen werden. Für Ethanol und Aceton zeigen sich über den gesamten Konzentrationsbereich konstante Volumenverhältnisse von 4 : 1 für Ethanol und 1,5 : 1 für Aceton. Für Ammoniumsulfat zeigt sich eine starke Abhängigkeit der Sättigungskonzentration von der Proteinkonzentration. Sie nimmt von anfangs 75 % Sättigung bei niedrig konzentrierten Proteinlösungen (ca. 1 mg/mL) um 15 % auf 60 % Sättigung bei höher konzentrierten Lösungen ab. Eine weitere Steigerung der eingesetzten Ammoniumsulfat-Konzentration führt zu keiner Verbesserung der Ausbeuten.

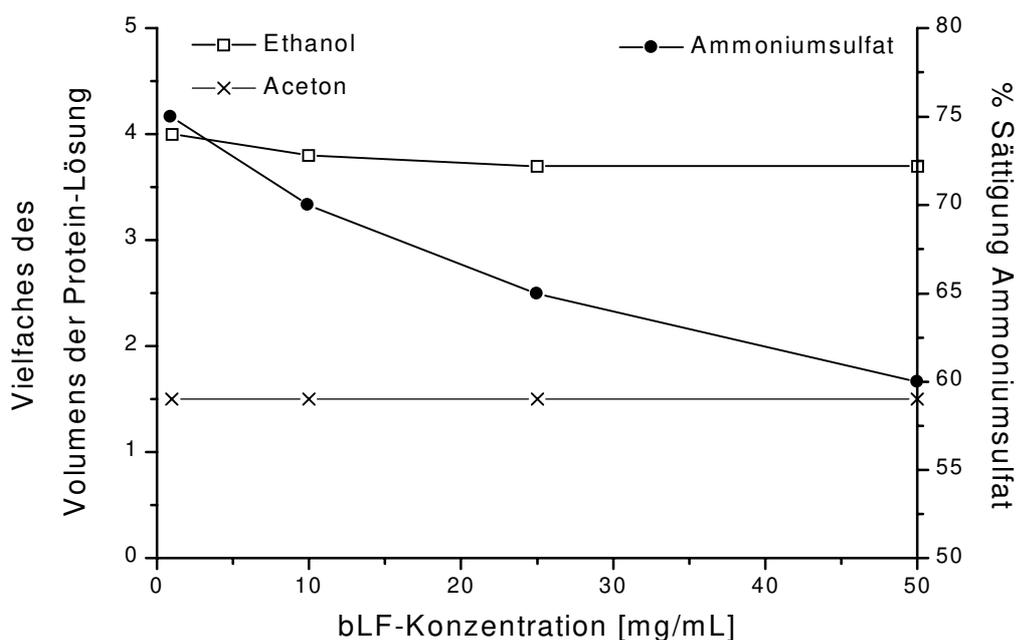


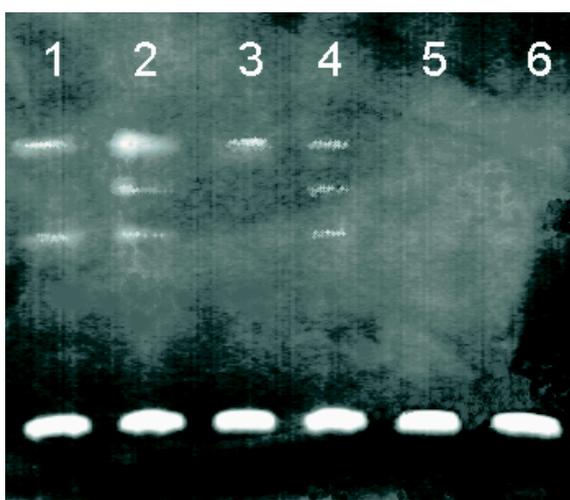
Abb. 3.46: Benötigte Mengen Fällungs-Reagens in Abhängigkeit von der bLF-Konzentration [PLATE, 1999]

Da es sich um salzhaltige Eluate handelt, muß die Reinheit der Fällungen überprüft werden, um den möglichen Salzgehalt zu ermitteln. Die in Tabelle 3.18 dargestellten Ausbeuten werden gravimetrisch bestimmt. Zunächst ist zu erkennen, daß die Ausbeuten mit steigendem bLF-Gehalt bei allen Fällungsreagenzien zunehmen. Für die organischen Lösemittel ergeben sich Ausbeuten von über 90 %, bei Ammoniumsulfat werden maximal 75 % des eingesetzten bLF wiedergefunden (gravimetrisch bestimmt). Die HPLC-Untersuchungen zeigen jedoch, daß das mit Ammoniumsulfat gefällte bLF nur einen Proteinanteil von 25 % besitzt aber noch 75 % an Salzfracht. Die Fällungen mit EtOH und Aceton zeigen dagegen nur eine geringe Salzfracht (< 2 %).

Tab. 3.18: Wiederfindung und Grad der Denaturierung von bLF bei den Fällungsuntersuchungen [PLATE, 1999]

Fällungs- reagens	Wiederfindung [%]			Denaturierungsgrad [%]		
	10 mg/mL	5 mg/mL	1 mg/mL	0 °C	5 °C	10 °C
Aceton	99	94	95	0	20	80
Ethanol	92	89	85	0	10	50
Ammoniumsulfat	75	74	68	0	0	0

Um Aussagen über eine mögliche Denaturierung des bLF treffen zu können, wird außerdem der Einfluß der Temperatur untersucht (Tabelle 3.18). Oberhalb von 5 °C ist nach Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen eine Denaturierung nicht mehr auszuschließen [SCOPES, 1994; AEBI ET AL., 1982]. Danach wird ein unlöslicher Niederschlag als denaturiert, ein löslicher als nativ angesehen. Für Temperaturen über 5 °C und bei Fällung mit organischen Reagenzien können diese Ergebnisse bestätigt werden. Für Ammoniumsulfat kann keine Denaturierung bei höheren Temperaturen festgestellt werden. Die erhaltenen Fällungen werden gelelektrophoretisch untersucht (Abbildung 3.47), wobei sich auf den Bahnen 1 – 4 noch geringe Verunreinigungen (< 10 %) durch β -Lactoglobulin und Caseine zeigen. Die Eluate für die Fällungen (Bahn 1 – 3) bzw. für die indirekte Aufarbeitung (Bahn 4, vgl. Kap. 3.4.1.2) wurden in der großen Technikumstufe gewonnen und waren aufgrund der nicht optimierten Elutionsvolumina bereits verunreinigt (vgl. Kap. 3.3.3.3). Der Aufreinigungseffekt der Fällungen ist daher nur minimal, da die Fällungen zu unspezifisch sind. Die Reinheit des Lactoferrins wird letztlich bereits bei der Elution vom Membranadsorber durch den Gradient und das Volumen bestimmt.

**Abb. 3.47: SDS-PAGE der Fällungsproben, 20 % homogen [PLATE, 1999]**

Bahn 1: bLF aus Aceton; 2: bLF aus Ethanol; 3: bLF aus Ammoniumsulfat; 4: Indirekte Gewinnung; 5: bLF-Standard aus Aceton; 6: bLF-Standard unbehandelt; alle Proteine 500 μ g/mL

Die Ammoniumsulfat-Fällung ist aufgrund ihres großen Anteils (75 %) an Salzen, die dabei mitgefällt werden, nicht für den industriellen Einsatz geeignet. Die organischen Lösemittel Aceton und Ethanol eignen sich dagegen beide für den Industrie-prozeß. Aceton ist ökonomisch die bessere Alternative, da hier nur die eineinhalbfache Menge an Fällungsreagenz eingesetzt werden muß. Die biologische Aktivität der Fällung wird in Kapitel 3.4.3.2.1 besprochen. Nachteilig sind die hohen Investitionskosten für die Anlagen (Ex-schutz) bei organischen Lösemitteln.

3.4.1.2 Indirekte Lactoferrin-Gewinnung

Die indirekte Lactoferrin-Gewinnung besteht aus zwei Teilprozessen. Zunächst müssen die salzhaltigen Eluate aus der Isolierung durch eine Ultrafiltration entsalzt werden, anschließend können die Proteine aus den aufkonzentrierten und salzfreien bLF- oder LP-Fractionen durch Gefriertrocknung oder Sprühtrocknung gewonnen werden.

Für die Entsalzung im Labormaßstab werden gebrauchsfertige Sartocoon[®] Micro-Module (Nr. 15659-00-1) mit 50 cm² Fläche eingesetzt. Die Ultrafiltrationsmembranen sind aus Polysulfon mit einem Größenausschluß (MWCO) von 10.000, 30.000 oder 50.000 (10, 30 oder 50 kDa). Die Crossflow-Filtration kann mit zwei Methoden gefahren werden:

- 1) Die Filtration wird als Mehrfach-Batch durchgeführt. Dazu wird die Proteinlösung zunächst aufkonzentriert und mit einem bestimmten Volumen Wasser versetzt. Es wird erneut aufkonzentriert. Dieser Vorgang wird (analog einer Mehrfach-Extraktion) mehrmals wiederholt.
- 2) Die Crossflow-Filtration wird als Diafiltration (kontinuierlich) durchgeführt. Die Proteinlösung wird ebenfalls aufkonzentriert und das Volumen anschließend konstant gehalten. Dazu muß über eine zweite Pumpe kontinuierlich Wasser entsprechend dem entwendeten Permeatvolumen zugeführt werden.

Bei der Diafiltration ist die Proteinkonzentration über die gesamte Filtration konstant und die Ionenstärke der Lösung nimmt kontinuierlich ab. Bei der Batch-Filtration ist die Ionenstärke innerhalb eines Batch konstant, während das Protein aufkonzentriert wird. Dieser Vorgang wiederholt sich für jeden Batch mit veränderter Ionenstärke. In beiden Fällen kommt es aufgrund von Fouling (hohe Proteinkonzentration) und abnehmenden Ionenstärken zur Abnahme der Flußraten.

Die Steuerung der Diafiltration läßt sich jedoch technisch einfacher realisieren, da nur der Permeat- und der Wasserfluß aufeinander abgestimmt werden müssen.

Die Untersuchungen mit den Ultrafiltrationsmembranen zeigen, daß bei einem MWCO von 50 kDa ein 5 – 10 %iger Lactoferrinverlust im Permeat vorhanden ist, während mit 10 oder 30 kDa kein Lactoferrin ins Permeat gelangt. Membranen besitzen nicht nur eine Porengröße, sondern weisen eine Porengrößenverteilung auf. Daher kann Lactoferrin besonders zu Beginn der Filtration, wenn nur geringes Fouling vorhanden ist, bei der 50 kDa Membran ins Permeat gelangen.

Wie in Kap. 3.3 erwähnt, wird die Reinheit des Lactoferrins bereits bei der Isolierung vom Membranadsorber festgelegt. Trotzdem können noch kleine Verunreinigungen durch α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin oder Caseine vorhanden sein. Abbildung 3.48 zeigt MALDI-MS-Spektren von Lactoferrin-Proben, die mit 10 bzw. 30 kDa entsalzt worden sind.

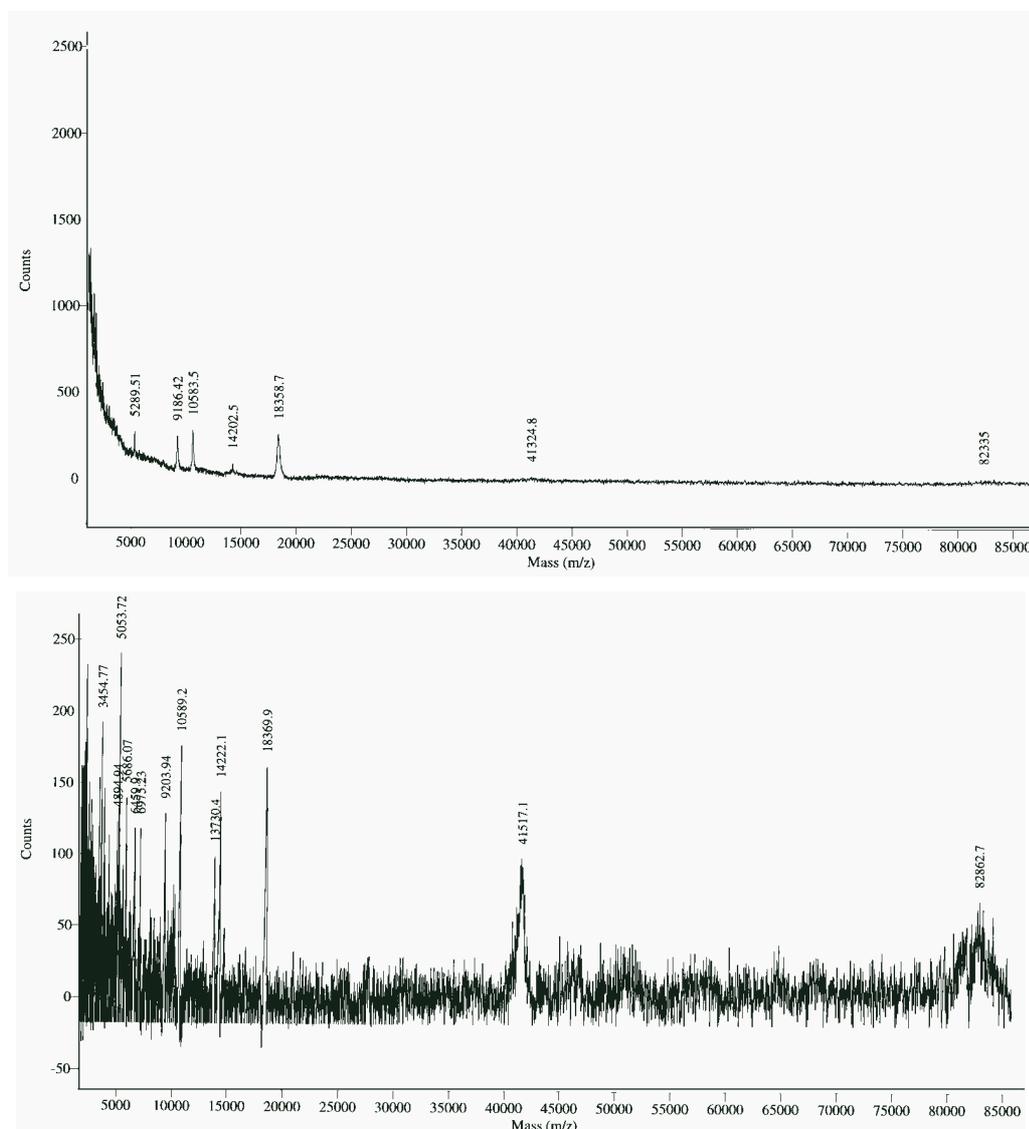


Abb. 3.48: MALDI-MS-Spektren von Lactoferrin-Proben
oben: Entsalzung mit 10 kDa MWCO
unten: Entsalzung mit 30 kDa MWCO

In Abbildung 3.48 oben (Entsalzung mit 10 kDa) sind Verunreinigungen durch α -Lactalbumin (ca. 14 kDa) und β -Lactoglobulin (ca. 18,4 kDa) deutlich zu erkennen. Die Lactoferrin-Signale (M^+ bei 82,3 kDa und M^{2+} bei 41,3 kDa) können daher kaum von dem Grundrauschen unterschieden werden. In der mit 30 kDa entsalzten Probe (Abbildung 3.48 unten) sind die Verunreinigungen dagegen deutlich abgereichert. Der Aufreinigungseffekt wird bei 50 kDa Membranen nochmals verstärkt, allerdings muß, wie bereits erwähnt, ein 10%iger Lactoferrinverlust in Kauf genommen werden.

Für den ersten Schritt der indirekten Lactoferrin-Gewinnung eignet sich die Ultrafiltrationsmembran mit 30 kDa am besten. Sie zeigt keine Permeation von Lactoferrin aber eine Permeation der kleineren Proteine, vor allem von α -LA und β -LG. Im Labormaßstab werden Micro-Module mit Polysulfon-Membran und im Technikummaßstab Sartocor[®] II-Kassetten mit Celluloseacetat-Membranen eingesetzt. Die HPLC-Daten zeigen einen 10%igen bLF-Verlust im aufkonzentrierten Eluat, der allerdings nicht auf eine Permeation von bLF zurückzuführen ist, sondern auf die Verluste durch bLF-Adsorption oder nicht ausgespültes bLF nach erfolgter Aufkonzentrierung. Je größer die zu verarbeitenden Eluatvolumina werden desto kleiner wird daher auch der zu erwartende Lactoferrin-Verlust. Im industriellen Prozeß kann daher von einem Verlust $\ll 5\%$ ausgegangen werden.

Der zweite Schritt der indirekten Lactoferrin-Gewinnung ist die Trocknung der salzfreien und aufkonzentrierten bLF-Proben. Alle Proben werden gefriergetrocknet, da eine Sprühtrocknung nicht zur Verfügung steht. Der Einfluß der Sprühtrocknung auf die biologische Aktivität von Lactoferrin (vgl. Kap. 3.4.3.2.1) kann daher nicht untersucht werden. Trotzdem kann erwartet werden, daß Lactoferrin seine Aktivität in diesem Prozeß behält, da es eine gute Thermostabilität besitzt [EP 0 437 958 A1; EP 0 364 912 A2; SAITO ET AL., 1994; SANCHEZ ET AL., 1992].

Eine Gesamtbilanzierung des Prozesses wird in Kapitel 3.5 (Prozeßbewertung) vorgenommen.

3.4.2 Veredelung zu Lactoferricin

Lactoferricin (LFcin) bezeichnet eine kleine Peptidsequenz in der Nähe des N-Terminus von Lactoferrin [TOMITA ET AL., 1994]. Der Name Lactoferricin ist eine Handelsmarke der Firma Morinaga (Japan), allgemein wird diese Sequenz als Lactoferroxin bezeichnet. Die Primärstrukturen von humanem (LFcinH) und bovinem Lactoferricin (LFcinB) sind in Abbildung 3.49 dargestellt. Bei LFcinH handelt es sich um ein Heterodimer mit insgesamt 47 Aminosäuren (AS; amino acid, AA), wobei die zwei Lactoferrin-Fragmente mit der Sequenz 12 – 47 und 1 – 11 über eine Cystein-Einheit verknüpft sind. LFcinB besteht dagegen nur aus 25 ± 1 AA (Position

17 - 41) , es ist ein monomerer Peptid-Strang. Bei der zusätzlichen Aminosäure handelt es sich um Alanin (vgl. Kap 3.4.2.1). Die Lactoferricin-Sequenzen der verschiedenen Spezies liegen außerhalb der eisenbindenden Domäne der N-Schleife des Lactoferrins. Die biologische Aktivität des LFcin ist daher im Gegensatz zum Lactoferrin unabhängig vom Eisengehalt seiner Umgebung und es wird angenommen, daß die LFcin-Sequenz ein direktes Andocken an die Zellwände der Bakterien ermöglicht, um diese zu perforieren, was schließlich zum Zelltod führt [KUWATA ET AL., 1998].

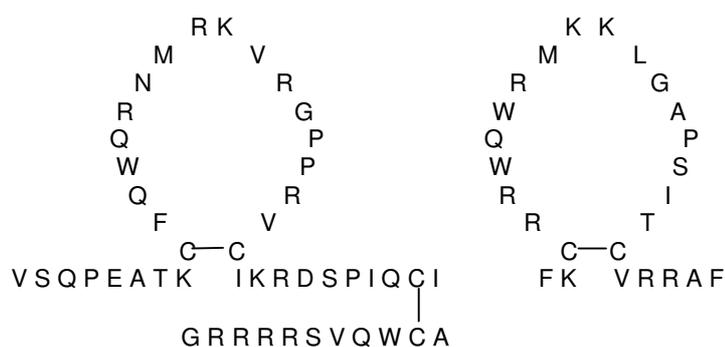


Abb. 3.49: Primärstrukturen von humanem (links) und bovinem Lactoferricin (rechts)
[BELLAMY ET AL., 1992]

3.4.2.1 Herstellung von Lactoferricin

Lactoferricin kann aus Lactoferrin durch enzymatischen Verdau mit Chymosin, Trypsin, Pepsin usw. hergestellt werden [SHIMAZAKI ET AL., 1998; DIONYSIOS & MILNE, 1997; BELLAMY ET AL., 1992]. In dieser Arbeit wird Pepsin für den proteolytischen Abbau des Lactoferrins verwendet [WALDEN, 1999; PLATE, 1999]. Dabei treten immer zwei Fragmente¹ mit den Molekulargewichten 3125 kDa (25 AA) und 3196 kDa (25 AA + Alanin) in wechselnden Mengenverhältnissen auf [RECIO & VISSER, 1999].

Um die Kinetik des Pepsin-Verdaus zu untersuchen, werden die Abbauersuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgebrochen und der Fortgang der Reaktion mit Hilfe des MALDI-MS untersucht (Abbildung 3.50). Bis zum Zeitraum von 4 h ist der bLF-Verdau noch nicht weit genug fortgeschritten. Das Hauptfragment besitzt eine Masse von 11,4 kDa (nicht dargestellt), die Signale bei 5,7 bzw. 2,8 kDa sind die 2-fach bzw. 4-fach geladenen Moleküle. LFcin (3,2 kDa) wird in diesem Zeitraum noch nicht detektiert. Nach 5 h ist dagegen ein maximales LFcin-Signal zu beobachten, das im weiteren Verlauf abnimmt. Nach 6 h ist nur noch eine kleine Menge an LFcin vorhanden.

¹ Im Rahmen dieser Arbeit wird das Fragment mit AA Nr. 17 - 42 (3195 kDa) als LFcinA bezeichnet und das Fragment mit AA Nr. 17 - 41 (3125 kDa) als LFcinB. In der Literatur existiert für das 3195 kDa Fragment keine eigene Bezeichnung.

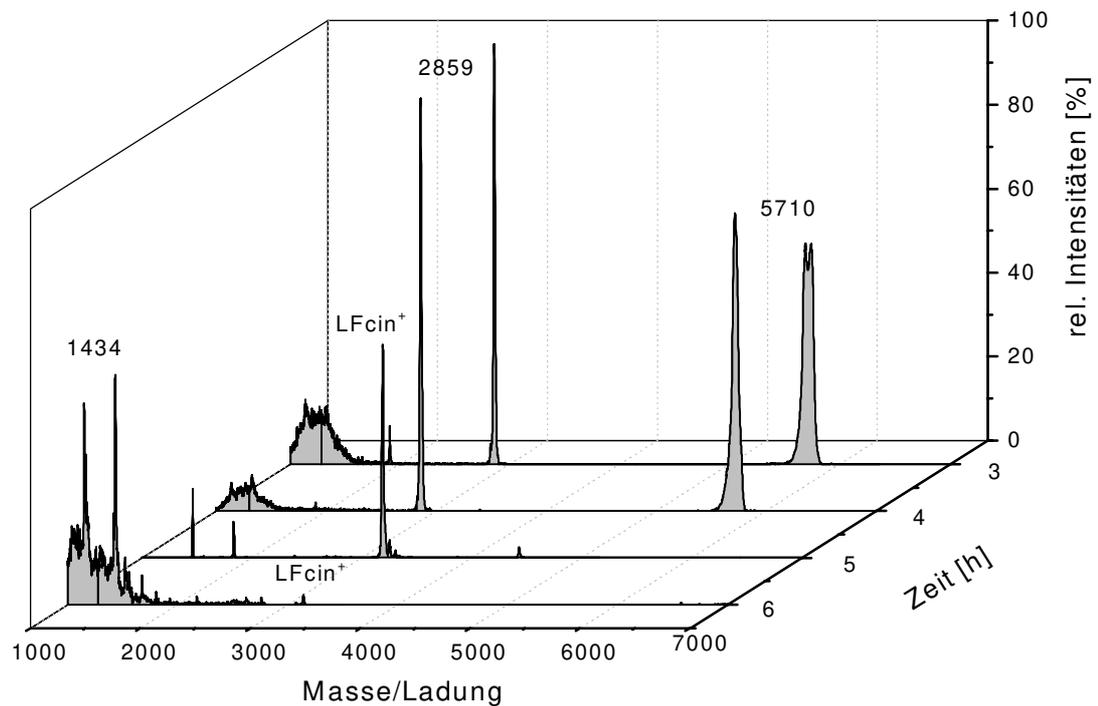


Abb. 3.50: Kinetik des bLF-Verdau mit Pepsin zu Lactoferricin [PLATE, 1999]
 10g/L in Acetonitril (ACN)/ 0,1% TFA 2:1 (v/v), Probenkonzentration 1 mg/mL
 Power 150, je 50 Einzelschüsse

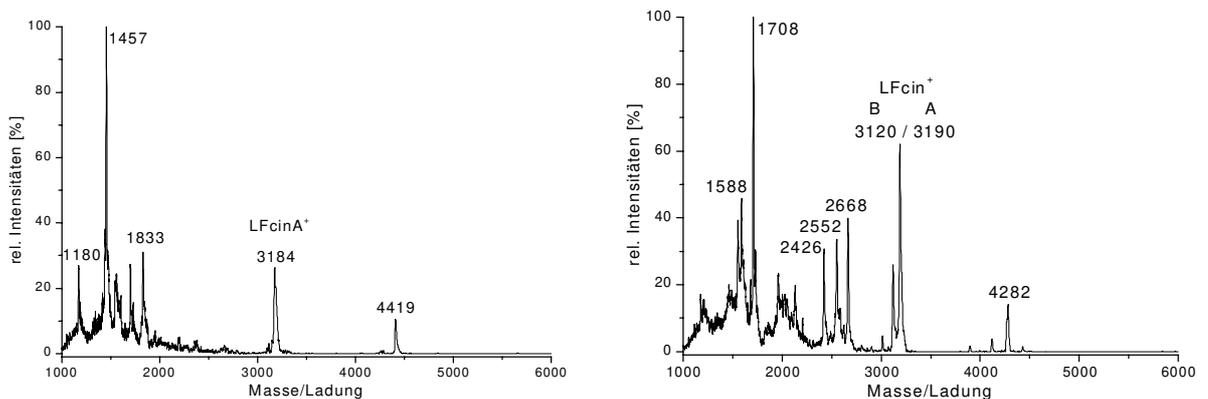


Abb. 3.51: MALDI-Spektren von zwei bLF-Proben nach 5-stündigem Pepsin-Verdau [PLATE, 1999]
 10g/L in Acetonitril (ACN)/ 0,1% TFA 2:1 (v/v), Probenkonzentration 1 mg/mL
 Power 150, je 50 Einzelschüsse

Der Vergleich eines Pepsin-Verdau in zwei identisch behandelten Proben (Abbildung 3.51) zeigt, daß das Fragmentierungsmuster sehr unspezifisch ist. In Abbildung 3.51 links fehlen beispielsweise die Signale im Bereich 2,5 kDa. Auch das LFcin-Signal zeigt eine andere Struktur. In Abbildung 3.51 rechts ist die Dublett-Struktur aus LFcinA und LFcinB deutlich zu erkennen,

während im linken Teil der Abbildung von einem Einzelsignal des LFCinA gesprochen werden kann. Die beiden Proben unterscheiden sich außerdem im Massenbereich unter 2000 Da hinsichtlich ihrer Signalverteilung und –intensität. In der Literatur wird über die große Varianz der Fragmentierungsmuster beim Pepsin-Verdau berichtet [RECIO & VISSER, 1999; HOEK ET AL., 1997; DIONYSIUS & MILNE, 1997], als einzige Gemeinsamkeit entsteht in allen Fällen Lactoferricin.

Die unspezifische Fragmentierung des Pepsin-Verdau macht eine weitere Aufreinigung des Lactoferricins erforderlich, um Aussagen über die Ausbeuten treffen zu können. Eine quantitative Analyse ist mit MALDI-MS nicht möglich (vgl. Kap. 3.1.2.7) und auch die SDS-PAGE kann nicht herangezogen werden, da Banden unter 4000 Da nicht aufgelöst werden können.

3.4.2.2 Isolierung von Lactoferricin

In der Literatur sind einige Veröffentlichungen zur Isolierung des LFCins nach enzymatischem Verdau erschienen. Dabei kommen sowohl Säulen- als auch Membranmaterialien zum Einsatz, in der Regel handelt es sich um Kombinationen von Ionenaustausch- oder Reversed Phase-Verfahren mit Hydrophober Interaktions-Chromatographie (HIC). Desweiteren steht eine große Anzahl von Puffer-Systemen und Elutionslösungen zur Verfügung, allerdings handelt es sich teilweise um problematische Chemikalien wie halbkonzentrierte Ammoniaklösung oder Acetonitril [RECIO & VISSER, 1999; HOEK ET AL., 1997, EP 0519 726 A2].

Wie Lactoferrin besitzt auch Lactoferricin einen stark basischen Charakter. Das Ziel ist daher, in Anlehnung an die Lactoferrin-Gewinnung, eine LFCin-Isolierung nur über Kationenaustausch-Membranen zu erreichen. Zweckmäßigerweise muß der Pepsin-Verdau mit den entsalzten und aufkonzentrierten Eluaten oder mit kristallinem bLF durchgeführt werden, um eine Adsorption an der Membran zu gewährleisten. Für die Isolierung wird ein S100-Membranadsorber verwendet [PLATE, 1999].

Die Isolierung des LFCin von den übrigen Peptid-Fragmenten kann mit einer Kombination von 0,4 M NaCl-Lösung und 2,0 M Ammoniumchlorid (NH₄Cl)-Lösung in einem Zweistufen-Gradienten erreicht werden. Die isolierten Fraktionen der Trennung sowie der Durchlauf und das eingesetzte Hydrolysat werden massenspektrometrisch untersucht (Abbildung 3.52). Im Durchlauf befinden sich die ungeladen und anionisch vorliegenden Fragmente mit Massen größer 4000 Da und im Bereich um 2500 Da, in der 0,4 M NaCl-Fraktionen dagegen nur Peptide im Massenbereich unter 2800 Da. Das LFCin befindet sich fast quantitativ in der 2,0 M NH₄Cl-Fraktion, deutlich ist das LFCinA und LFCinB-Dublett zu erkennen. Allerdings ist noch eine Verunreinigung bei 2957 Da vorhanden.

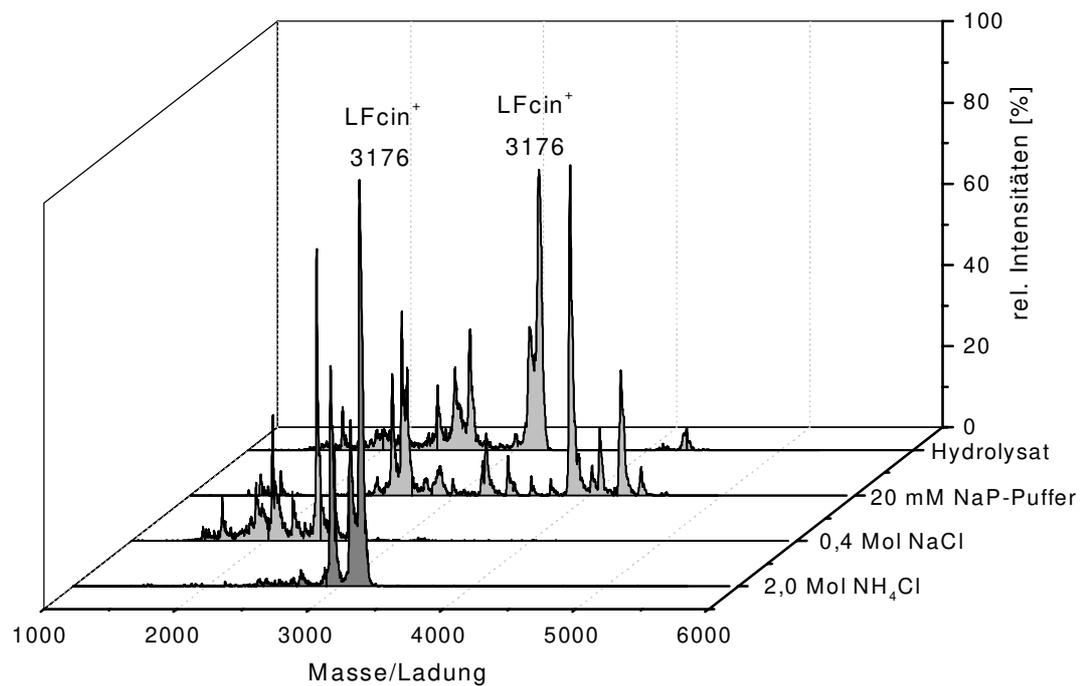


Abb. 3.52: Lactoferricin-Isolierung über Membranadsorber S100 [PLATE, 1999]
 10g/L in Acetonitril (ACN)/ 0,1% TFA 2:1 (v/v), Probenkonzentration 1 mg/mL
 Power 150, je 50 Einzelschüsse

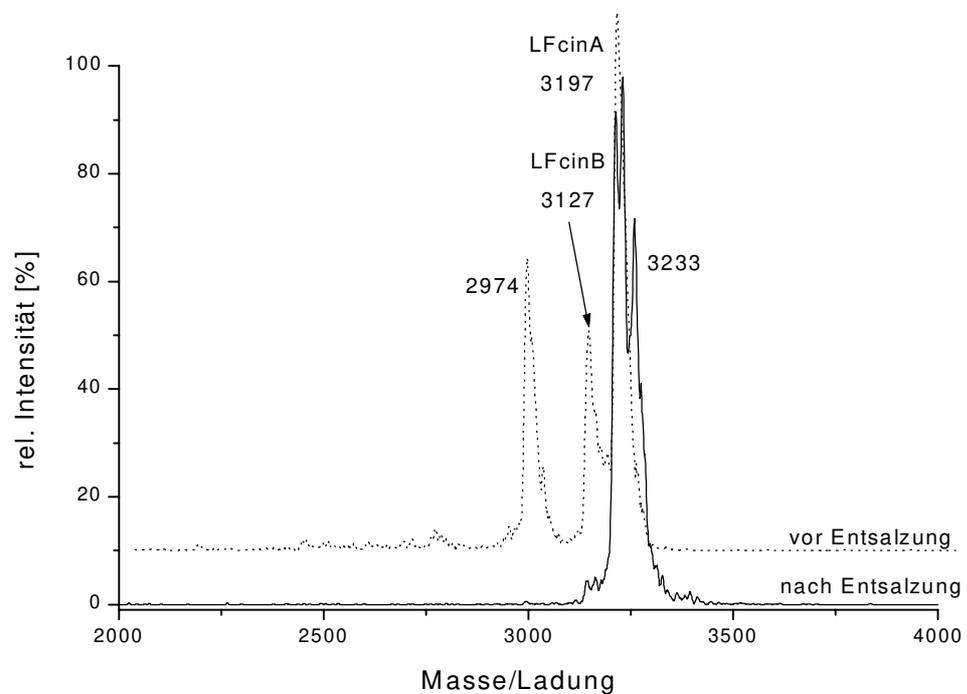


Abb. 3.53: Lactoferricin vor und nach der Entsalzung über Sephadex G-25 [PLATE, 1999]
 10g/L in Acetonitril (ACN)/ 0,1% TFA 2:1 (v/v), Probenkonzentration 1 mg/mL
 Power 150, je 50 Einzelschüsse

Zur weiteren Aufarbeitung muß analog der bLF-Gewinnung eine Entsalzung durchgeführt werden. Bei der Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen kann aufgrund der vorhandenen Porengrößenverteilung der Membran keine weitere Aufreinigung während der Entsalzung erzielt werden, da das LFcin (3,1 – 3,2 kDa) und die Verunreinigung (2,9 kDa) in ihren Massen zu dicht beieinander liegen. Daher bietet sich die Verwendung von Größenausschluß-Materialien an. Hier wird eine Abtrennung der Verunreinigung bei der Verwendung von Sephadex G-25 erreicht. Allerdings wird auch das LFcin-Signal verändert (Abbildung 3.53), vor der Entsalzung ist die Dublett-Struktur deutlich zu erkennen, nach der Entsalzung ist der Anteil an LFcinB deutlich verringert. Gleichzeitig ist noch ein unbekanntes Addukt des LFcinA zu erkennen. Für die bessere Reinheit muß also auch ein Verlust an LFcin in Kauf genommen werden. Insgesamt ergibt sich eine Ausbeute von etwa 75 % an Lactoferricin. Die biologische Aktivität des isolierten Lactoferricins wird in Kap. 3.4.3.3.1 behandelt.

Mit der entwickelten Methode zur Isolierung des LFcins ist es möglich, gute Ausbeuten bei hoher Reinheit zu erhalten. Außerdem werden nur unbedenkliche Chemikalien verwendet und die Isolierung erfolgt allein über einen Membranadsorber.

3.4.3 Produktcharakterisierung

Dieses Kapitel faßt die Ergebnisse zu den Ausbeuten und den Reinheiten der isolierten Proteine zusammen, die bereits bei den Isolierungen besprochen wurden. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Produktcharakterisierung ist die biologische Aktivität der Proteine. Sollte die Aktivität während des Gewinnungsprozesses erniedrigt werden oder sogar ganz verloren gehen, ist dies ein entscheidender Nachteil des jeweiligen Verfahrens.

3.4.3.1 Lactoperoxidase

Die Gewinnung der Lactoperoxidase ist aufgrund der basischen Eigenschaften dieses Enzyms ebenfalls mit einem Membranadsorber möglich (vgl. Kap. 3.3). Die Tatsache, daß Lactoferrin stärker als Lactoperoxidase an den Membranadsorber adsorbiert wird, führt dazu, daß die Lactoperoxidase nur das Nebenprodukt darstellt. Bei jeder Auftragung auf die beiden seriell geschalteten Adsorber von je 0,5 m² Fläche können nur etwa 35 – 40 mg Lactoperoxidase gewonnen werden. Die Lactoferrinausbeute liegt bei etwa 1700 mg, das entspricht einem Verhältnis von etwa 1 : 45. Neben einer Verunreinigung der Lactoperoxidase mit 5 - 10 % Lactoferrin sind außerdem noch Spuren von β -Lactoglobulin und Caseinen enthalten (Abbildung 3.54). Auf

den Bahnen 1 bis 4 sind kommerzielle Standards von Fluka und Sigma aufgetragen, in beiden Fällen zeigen sich auch hier Verunreinigungen durch β -Lactoglobulin. In den Proben aus eigener Isolierung (Bahn 5 – 8) ist eine kleine β -Lactoglobulinbande und eine Verunreinigung durch Caseine zu erkennen.

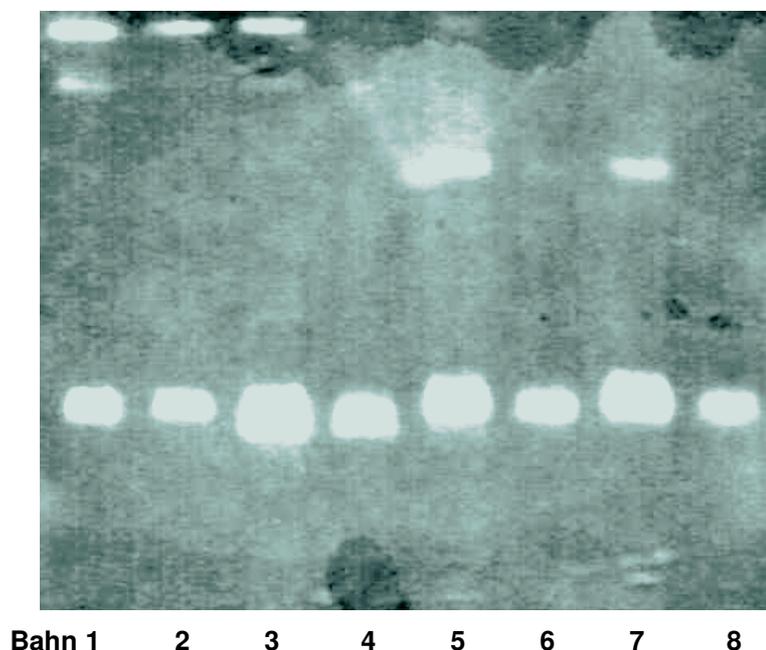


Abb. 3.54: SDS-PAGE (12,5 %, homogen) verschiedener LP-Proben [WALDEN, 1999]
Bahn 1 + 2: Fluka-LP; 3 + 4: Sigma-LP; 5 + 6: Isolierung 1; 7 + 8: Isolierung 2; jeweils 500 + 250 $\mu\text{g/mL}$

Die Aktivität der isolierten Lactoperoxidase liegt bei etwa 100 U/mg, sie liegt damit im Bereich der Lactoperoxidase der Firma Sigma (83 U/mg). Die wirtschaftliche Aufarbeitung erscheint mit der auf Lactoferrin optimierten Methode nicht sinnvoll, da die zu gewinnenden Mengen an LP sehr klein sind. Hier ist eine zusätzliche auf Lactoperoxidase optimierte Isolierungsstufe erforderlich, um größere Mengen an LP in höherer Reinheit darzustellen.

3.4.3.2 Lactoferrin

Lactoferrin wird stärker an den Membranadsorber gebunden als Lactoperoxidase. Dadurch wird die Lactoperoxidase weitestgehend vom Adsorber verdrängt; Lactoferrin ist das Hauptprodukt aus der Isolierung (vgl. Kap. 3.3). Bei Anwendung optimierter Elutionsbedingungen (Gradient und Volumen) kann mit bLF-Ausbeuten von 85 – 90 % bezogen auf die dynamische Kapazität von 0,2 mg/cm² gerechnet werden. Die Reinheit des isolierten Lactoferrins liegt bei über 95 %.

Die Lactoferrin-Proben zeigen unter Verwendung optimierter Elutionsbedingungen keine signifikanten Verunreinigungen durch majore Molkenproteine in der Gelelektrophorese (Bahn 3, 5 und 7; der Hintergrund des Gels ist unregelmäßig entfärbt) oder dem MALDI-MS-Spektrum (Abbildung 3.55 links und rechts). Im Vergleich dazu ist in der LP-Fraktion noch eine Verunreinigung durch β -Lactoglobulin und Casein zu erkennen. Eine Verunreinigung der bLF-Fraktion durch LP ist weder mit SDS-PAGE noch mit MALDI-MS nachzuweisen, nur durch den Lactoperoxidase-Assay ist eine geringe Restaktivität durch LP nachzuweisen.

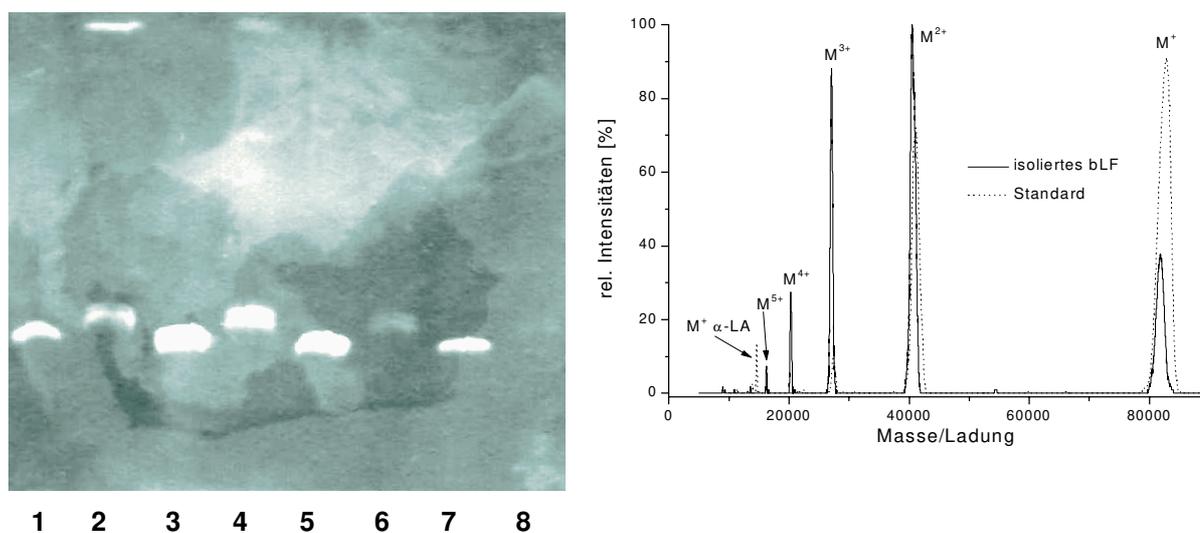


Abb. 3.55: links: SDS-PAGE (12,5 %, homogen) von Lactoferrin und Lactoperoxidase nach optimierter Elution [WALDEN, 1999]

Bahn 1: bLF-Standard; 2: LP-Standard; 3, 5 und 7: isoliertes bLF; 4, 6 und 8: isolierte LP; jeweils 400, 200 und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Standards 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

rechts: MALDI-MS-Spektren von isoliertem Lactoferrin und Standard [WALDEN, 1999]

10g/L in Acetonitril (ACN)/ 0,1% TFA 2:1 (v/v), Probenkonzentration 1 mg/mL; Power 160, je 50 Einzelschüsse

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Produktcharakterisierung ist die biologische Aktivität. Neben der Regulation der Eisenadsorption im Darm zeigt Lactoferrin auch antimikrobielle Eigenschaften gegen Bakterien und Viren. Im menschlichen Immunsystem bewirkt bLF wachstumsfördernde oder –hemmende Modulationen der Zellen. Das Einsatzgebiet von Lactoferrin reicht daher von der Nahrungsmittelindustrie (probiotische Lebensmittel und Functional Food-Produkte) bis hin zur pharmazeutischen Applikation (vgl. Kap. 2.1).

Um so wichtiger ist daher die Frage, ob durch den Isolierungsprozeß eine Beeinträchtigung der biologischen Aktivität entsteht.

3.4.3.2.1 Biologische Aktivität

Die genauen Wirkmechanismen des Lactoferrins sowohl bei der Hemmung als auch bei der Proliferation von Zellen sind in vielen Fällen noch unklar. Fest steht, daß bei Säugetieren im Falle einer bakteriellen Infektion erhöhte Lactoferrin-Konzentrationen in der betreffenden Region nachgewiesen werden können [WEINBERG, 1978]. Diese Aktivität ist bei vielen Mikroorganismen nachzuweisen, beispielsweise *Streptococcus mutans* (Bakterium der Mundflora), *E. coli* (Darmbakterium) und *Vibro cholerae* (Choleraauslöser) [ARNOLD ET AL., 1980]. Prinzipiell existieren aber zwei Hemmechanismen:

- 1) Lactoferrin besitzt im Vergleich zum strukturhomologen Transferrin (ca. 70 % Homologie) eine etwa 300fach höhere Eisenaffinität. Den Organismen wird daher ein essentielles Metall entzogen, es resultiert eine indirekte Hemmung [LEHRER & GANZ, 1988; ARNOLD ET AL., 1982].
- 2) Als basisches Protein kann Lactoferrin an Lipopolysaccharide (saure Gruppen) in den Zellwänden der Mikroorganismen binden und diese permeabilisieren [BROCK, 1995; ELLISON & GIEHL, 1991; ELLISON ET AL., 1988].

Für einen Wachstumshemmtest ist zunächst die Auswahl eines geeigneten Stammes und einer Arbeitsmethode wichtig. Die Untersuchungen ergaben, daß die Messung auf Festkulturen nach der Kirby-Bauer-Methode (Blättchen- und Zylindermethode) nicht möglich ist. Die Ursache liegt vermutlich in einer Diffusionshemmung des Lactoferrins in das Nährmedium. Besser geeignet ist dagegen der Hemmtest in Flüssigkulturen mit einer indirekten Partikelzählung über die optische Dichte [WALDEN, 1998; PLATE, 1998; TINTEMANN, 1998]. Aus verschiedenen Pilzen, Hefen und Bakterienstämmen wurde *Bacillus subtilis* DSM¹ 10 für die weiteren Hemmtests ausgewählt, da dieser Organismus auch über mehrere Tage ein schnelles und gleichmäßiges Wachstum gewährleistet.

Das isolierte Lactoferrin wird im Aufarbeitungsprozeß entsalzt und gefriergetrocknet. Anschließend wird es in bidest. H₂O gelöst und vor dem Test über einen 0,45 µm Filter (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) sterilfiltriert oder für einige Versuche auch thermisch sterilisiert. Aus Abbildung 3.56 ist zu entnehmen, daß der Eisengehalt im Nährmedium² (eisenhaltige bzw. eisenfreie Referenz) keinen Einfluß auf das Wachstum der Kulturen hat. Die Schüttelkulturen für die Lactoferrin-Zugabe werden daher im eisenfreien Medium herangezogen.

¹ DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen

² MMB: Mineral Medium Brunner, vgl. Kap. 5.4.2

Lactoferrin (Abbildung 3.56 links) zeigt bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{M/L}$ eine starke Hemmwirkung, es findet innerhalb von 6 h kein weiteres Bakterienwachstum statt. Bei 25 $\mu\text{M/L}$ bLF findet eine schwache Hemmung statt, das Wachstum setzt nach etwa 2 h verzögert ein. Dieses Ergebnis deckt sich mit Literaturangaben, nach denen die minimale hemmende Konzentration (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) bei 20 $\mu\text{M/L}$ liegt [TOMITA ET AL., 1994]. Die kleinste eingesetzte Konzentration von 10 $\mu\text{M/L}$ zeigt dagegen einen wachstumsstimulierenden Effekt. Neben dem Eisengehalt des Mediums, der wie schon beschrieben hier keinen Einfluß hat, ist auch der Eisengehalt im Lactoferrin selbst von Interesse. Lactoferrin ist in der Lage, das gebundene Eisen im sauren Milieu ($\text{pH} < 2$) zu desorbieren. Mit einer Dialyse gegen 0,5 M Zitronensäure ($\text{pH} 1,5$) werden ca. 50 % des vorhandenen Eisens (16,3 mg/ 100 g bLF) aus dem Lactoferrin-Standard entfernt. Für isoliertes bLF wird der gleiche Prozentsatz angenommen, allerdings kann hier keine Aussage zum absoluten Eisengehalt gemacht werden. Aus Abbildung 3.56 rechts ist zu erkennen, daß beim zusätzlich dialysierten Lactoferrin eine stärkere Hemmwirkung im Vergleich zum nicht dialysierten besteht. Beim dialysierten bLF ist bereits bei 25 $\mu\text{M/L}$ eine stark hemmende Wirkung zu beobachten. Auch eine Konzentration von nur 10 $\mu\text{M/L}$ bLF zeigt jetzt eine Hemmwirkung, während beim nicht dialysierten bLF in dieser Konzentration ein wachstumsstimulierender Effekt zu sehen ist.

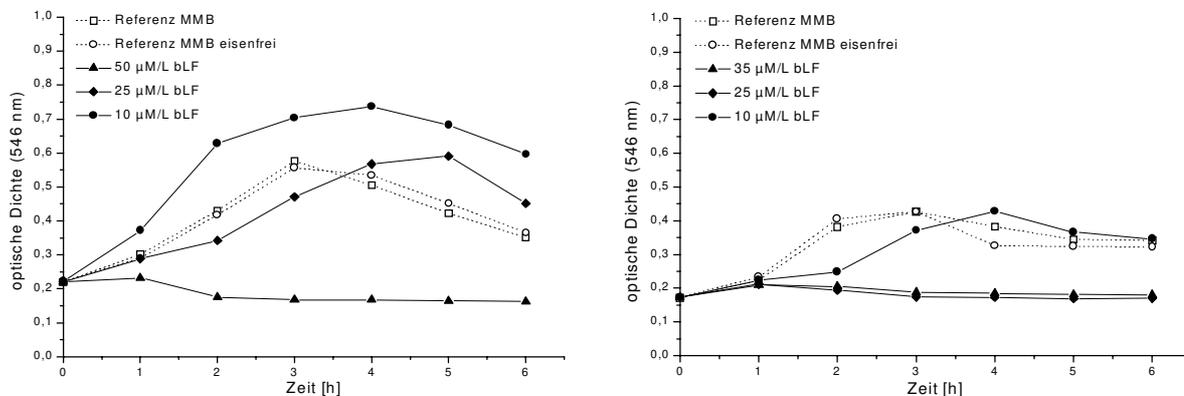


Abb. 3.56: Wachstumshemmtest von Lactoferrin gegen *Bacillus subtilis* DSM 10 [WALDEN, 1999]
links: Thermisch sterilisiertes Lactoferrin, 37 °C
rechts: Thermisch sterilisiertes und dialysiertes Lactoferrin, 37 °C

Die entwickelte Methode zur Prüfung der Hemmwirkung bietet eine einfache und schnelle Möglichkeit, die Aktivität des isolierten Lactoferrins zu überprüfen. Es zeigt sich, daß die Aktivität des Lactoferrins während des Prozesses (Isolierung – Entsalzung – Gefriertrocknung) voll erhalten bleibt. Die Frage, ob dies auch bei einer Sprüh- statt einer Gefriertrocknung der Fall ist, kann nicht beantwortet werden, da ein entsprechendes Gerät in dieser Größe nicht zur Verfü-

gung steht. Die gute Thermostabilität des Lactoferrins (vgl. Kap. 3.4.1.2) läßt aber den Schluß zu, daß die Sprühtrocknung die biologische Aktivität des Lactoferrins nicht beeinträchtigt. Die Dialyse bietet eine gute Möglichkeit, die Wirkdosis von Lactoferrin zu verbessern. Dieser Aspekt ist aber nur im Forschungsbereich von Interesse, industriell ist diese Maßnahme zu aufwendig und damit unwirtschaftlich.

Als zweite Methode der Eluataufarbeitung wird in Kapitel 3.4.1.1 die direkte Fällung aus den salzhaltigen Eluaten beschrieben, wobei sowohl organische Lösemittel (Ethanol und Aceton) als auch Ammoniumsulfat verwendet werden. Die gefriergetrockneten Proben aus diesen Fällungen werden ebenfalls auf ihre biologische Aktivität getestet. In Abbildung 3.57 sind die Wachstumshemmtests für Ammoniumsulfat (links) und Ethanol (rechts) dargestellt. Bei der Einwaage des bLF wird der vorhandene Anteil an Fällungssalz (Ammoniumsulfat) berücksichtigt (vgl. Kap. 3.4.1.1). Es zeigt sich, daß auch bei hohen bLF-Konzentrationen (25 und 50 $\mu\text{M/L}$) nur eine geringe Hemmwirkung auftritt. Die Ursache für die geringe Hemmwirkung des bLF ist vermutlich der hohe verfügbare Stickstoffanteil (Ammoniumsulfat), der wachstumsstimulierend wirkt. Blindversuche mit Ammoniumsulfat und ohne Lactoferrin-Zusatz können dieses Verhalten jedoch nur unvollständig erklären. Eine zweite mögliche Erklärung ist eine teilweise Denaturierung des bLF, wobei das denaturierte bLF aber durch Komplexbildung mit Ammoniumsulfat löslich bleibt und daher nicht als denaturiert erkannt werden kann. Dies steht jedoch im Widerspruch zur Literatur, nach der die Ammoniumsulfat-Fällung eine sehr schonende Fällungsmethode ist [AEBI ET AL., 1982].

Da die Aktivität bei der Ammoniumsulfat-Fällung beeinträchtigt wird, ist diese Aufarbeitungsmethode ungeeignet für den Prozeß.

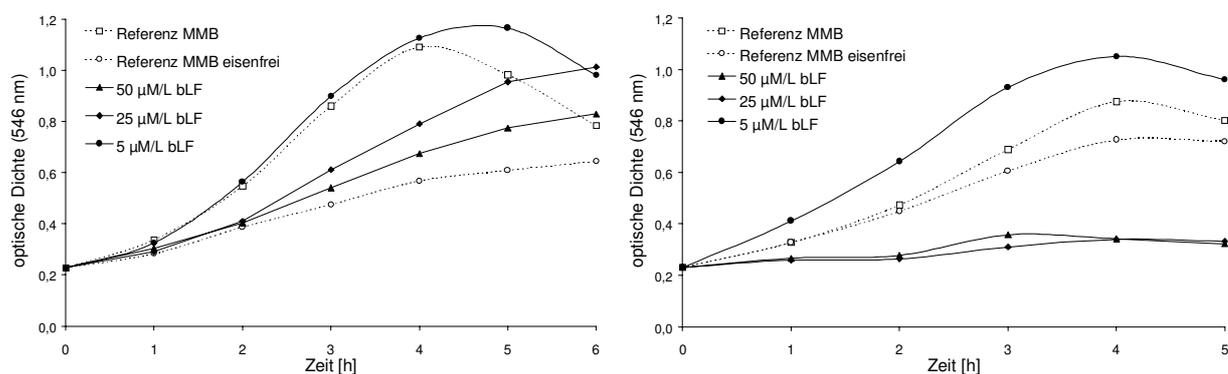


Abb. 3.57: Wachstumshemmtest von Lactoferrin gegen *Bacillus subtilis* DSM 10 [PLATE, 1999]
links: Isoliertes Lactoferrin aus der Ammoniumsulfat-Fällung, 35 °C
rechts: Isoliertes Lactoferrin aus der Ethanol-Fällung, 35 °C

Das mit Ethanol gefällte Lactoferrin (Abbildung 3.57 rechts) zeigt keinen Verlust in der Aktivität. Hier wirken die hohen Lactoferrin-Konzentrationen (25 und 50 $\mu\text{M/L}$) stark hemmend, während bei 5 $\mu\text{M/L}$ bLF ein stimulierender Effekt zu beobachten ist. Analog verhält sich auch das Aceton-gefällte Lactoferrin (nicht dargestellt). Die organischen Fällungsmittel Ethanol und Aceton können daher uneingeschränkt für die Eluataufarbeitung verwendet werden.

3.4.3.3 Lactoferricin

Das Lactoferricin kann in Ausbeuten von etwa 75 % gewonnen werden. Zur Reinheit können noch keine Aussagen getroffen werden, sie ist Teil laufender Untersuchungen [Plate, 1999].

3.4.3.3.1 Biologische Aktivität

Auch Lactoferricin zeigt eine starke antimikrobielle Wirkung gegen Pilze, Hefen sowie Gram-positive und Gram-negative Bakterien [SCHIEBLI ET AL., 1999; HOEK ET AL., 1997]. Die Wirkkonzentrationen liegen für die meisten Organismen zwischen 2 und 16 $\mu\text{M/L}$ LFcin [DIONYSIUS & MILNE, 1997; BELLAMY ET AL., 1992]. Das hergestellte Lactoferricin wird in Konzentrationen von 4 und 8 $\mu\text{M/L}$ im Wachstumshemmtest eingesetzt (Abbildung 3.58), die beide eine totale Hemmung bewirken, so daß die MIC auf jeden Fall unter 4 $\mu\text{M/L}$ liegt.

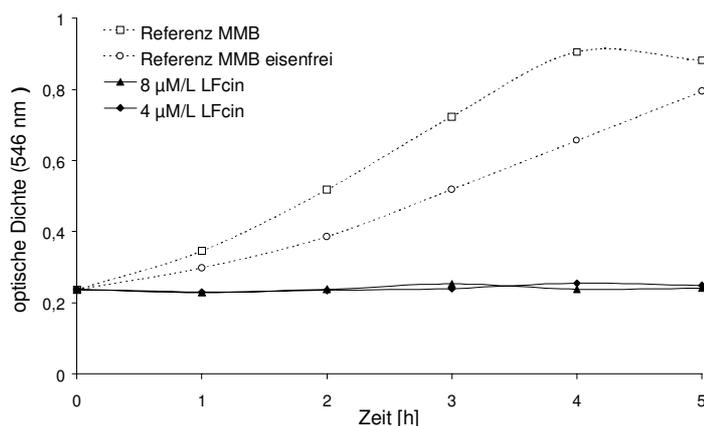


Abb. 3.58: Wachstumshemmtest von Lactoferricin gegen *Bacillus subtilis* DSM 10 bei 35 °C [PLATE, 1999]

Die Methode zur Herstellung und Isolierung von Lactoferricin ist daher uneingeschränkt anwendbar und stellt eine weitere Wertschöpfung des Lactoferrins im Hinblick auf spezielle pharmazeutische Applikationen und Produkte dar.

3.5 Prozeßbewertung

Die Prozeßbewertung gliedert sich ebenso wie der Ergebnisteil in die Bereiche Filtration, Isolierung und Downstreaming.

Die Filtration der Molke ist, wie im Vorfeld der Untersuchungen erwartet worden ist, ein schwieriger Prozeß. Große Probleme ergeben sich nicht nur durch die variable Zusammensetzung der Molke selbst, sondern auch durch die fortlaufende Aufkonzentrierung des Retentats im Verlauf der Filtration, da die Prozesse als Batch gefahren werden mußten. Der Vorratsbehälter (1000 L Molke) wird daher auch entsprechend groß gewählt, um die Aufkonzentrierung zu minimieren. In der großen Technikumsstufe (Sartocon[®] II) liegt die Aufkonzentrierung im Bereich 2 - 3. Nach diversen Untersuchungen zur Optimierung der Filtration in Bezug auf Permeation des Lactoferrins und Retention der Schwebstoffe (vgl. Kap. 3.2) wird die Doppelfiltration mit 1,2 und 0,8 µm Membranen bevorzugt. Die Vorfiltration mit 1,2 µm Porengröße hält die groben Verunreinigungen zurück und liefert ein konstantes Permeat für die Filtration mit 0,8 µm Porengröße. Diese zeichnet sich durch eine längere Standzeit der Membranen und einen höheren Permeatfluß (im Vergleich zur 1,2 µm Membran) aus. Die Retention von Lactoferrin liegt bei insgesamt 10 - 15 % für die Doppelfiltration (vgl. Kap. 3.2.2.3).

Ein Nachteil der zweifachen Filtration sind die entstehenden Kosten. Dies gilt einerseits für die Investitionskosten der notwendigen Geräte und andererseits für die laufenden Kosten (Energie und Reinigungskemikalien). Weitere Scale Ups der Filtrationsanlagen sind am Institut nicht möglich, da die erforderlichen Volumina nicht mehr zu handhaben sind. Die zukünftigen Untersuchungen werden bei der Firma Biolac GmbH in Harbarnsen durchgeführt. Hier bietet sich die Möglichkeit, durch die Verwendung von Molkenkonzentrat (fünffach aufkonzentrierte Molke) den Prozeß wirtschaftlicher zu machen. Dafür ist zunächst eine Änderung der Prozeßführung erforderlich, um eine weitere Aufkonzentrierung des Molkenkonzentrats zu vermeiden. Entweder wird das Retentat nicht zirkuliert (Abbildung 3.59 links) und direkt einem anderen Prozeß zugeführt, oder es wird mit der Feed & Bleed-Methode in der UTMP-Anordnung gearbeitet (Abbildung 3.59 rechts). Letztere bietet den Vorteil, daß nur ein geringes Molkenvolumen zirkuliert wird. Über die Feed-Pumpe wird ein Molkenvolumen in den Kreislauf gepumpt, das der Summe aus Permeatfluß und Bleed-Fluß entspricht. Um eine Aufkonzentrierung zu vermeiden, müssen diese beiden Flüsse gleich groß sein. Nachteilig an dieser Methode ist, daß sie nicht manuell durchführbar ist, da sich der Permeatfluß ständig ändert. Nur eine automatisierte Anlage ist in der Lage, die Bleed- und die Feed-Pumpe innerhalb kürzester Zeit auf die veränderten Bedingungen einzustellen. Erste Untersuchungen können daher nur mit dem in Abbildung 3.59 links skizzierten Aufbau durchgeführt werden.

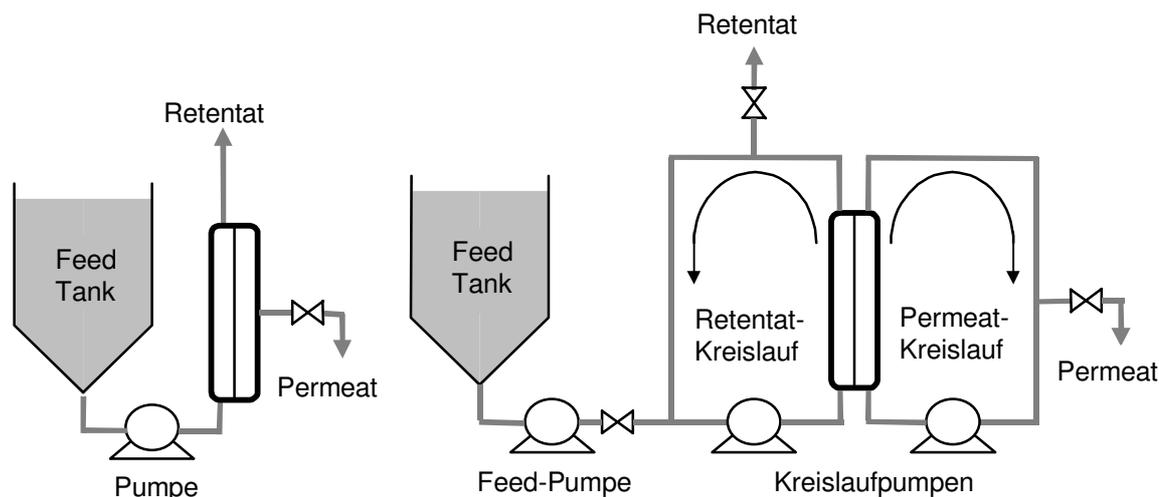


Abb. 3.59: Betriebsarten und Prozeßführung

links: Batch-Anordnung mit Einfach-Überströmung

rechts: Feed & Bleed-Methode in der UTMP-Anordnung, [CHERYAN, 1998]

Das Molkenkonzentrat hat im Gegensatz zur (Dünn-)Milche einen drei- bis vierfach höheren Lactoferrin-Gehalt. Mit der Annahme, daß die durchschnittlich zu erzielenden Permeatflüsse mit Molkenkonzentrat um den Faktor 3 – 4 geringer sind, wird die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses auf jeden Fall verbessert:

- 1) Im Fall einer Doppelfiltration mit Molkenkonzentrat sind die Investitions- und die laufenden Kosten (bezogen auf die absolute Masse an Lactoferrin) genauso hoch wie bei Molke. Die verbesserte Wirtschaftlichkeit wird im Isolierungsprozeß erreicht, da die Auftragszeit (und damit die Gesamtzykluszeit) verringert wird. Dadurch können in diesem Teilprozeß Energiekosten eingespart werden.
- 2) Im Idealfall reicht eine einmalige Filtration des Molkenkonzentrats aus. Zusätzlich zu den oben genannten Vorteilen im Isolierungsprozeß können dann auch im Bereich der Filtration Investitions- und laufende Kosten minimiert werden.

Der hohe Anteil an Trockenmasse im Molkenkonzentrat (ca. 30 %) verstärkt die Foulingerscheinungen, die im Verlauf der Filtration auftreten. Erste Untersuchungen sollten daher zunächst mit der 1,2 µm Membran durchgeführt werden.

Die Charakterisierung der Membranadsorber ist weitestgehend abgeschlossen (vgl. Kap. 3.3.2 und 3.3.3). Die dynamische Kapazität der Adsorber beträgt 0,2 mg bLF/cm² und ist unabhängig von der Auftragungsgeschwindigkeit. Die Membranen sind mechanisch und chemisch sehr stabil, eine Reinigung mit den Lösungen RM 4 oder RM 7 sollte daher unproblematisch sein. Zur Trennung von Lactoferrin und Lactoperoxidase bei der Elution muß mindestens ein Zweistufen-Gradient (0,175 und 1,0 M NaCl) gefahren werden, um eine Reinheit > 95 % des bLF zu gewährleisten (Lactoferrin-Ausbeute 80 %). Sicherheitshalber kann der erste Gradient auch höher gewählt werden; wie bereits erwähnt, müssen der Gradient und das Elutionsvolumen in jedem Scale Up neu optimiert werden.

Die Isolierungsmethode ist für weitere Scale Ups vollständig beschrieben. Sollte die Filtration von Molkenkonzentrat erfolgreich sein, so könnten die Zykluszeiten nochmals verkürzt werden. In zusätzlichen Versuchsreihen sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob das bLF-Eluat für weitere Elutionen verwendet werden kann. Dadurch können bei der eigentlichen Entsalzung Energiekosten eingespart werden, weil das bLF-Eluat bereits höher konzentriert ist, und im Isolierungsprozeß wird bei der Elution der Chemikalienverbrauch verringert.

Tab. 3.19: Vergleich Membranadsorber und S-Sepharose Big Beads

Material	S-Sepharose Big Beads	Membranadsorber	
		2x S05k-15-12 in Serie	2x S40k-30-50 parallel und 2x S20k-15-50 parallel
Durchmesser x Höhe	10 x 11	-	-
Säulenvolumen [L]	0,864	-	-
Membranfläche [cm ²]	-	10 000	120 000
Kapazität	22,9 mg/mL	0,2 mg/cm ²	0,2 mg/cm ²
bLF-Konzentration [mg/L]	32,0	32,0	32,0
Ausbeute [g]	19,8 (96 %)	1,6 (80 %)	19,2 (80%)
Flußrate [L/min]	3,0	3,0	14,0
Geschwindigkeit [cm/min]	38,0	9,0	5,3/ 10,5
Beladungsvolumen [L]	650	62,5	750
Beladungsdauer [min]	215	21	54
Elutionsdauer [min]	ca. 60	10	30
Reinigungsdauer [min]	(?)	(30)	(30)
Gesamtzykluszeit [min]	275	31	83

In Tabelle 3.19 wird die bestehende Technikumsanlage (2 x S05k-15-12 in Serie, Spalte 2) verglichen mit einer säulenchromatographischen Methode (Spalte 1), die einem Patent entnommen wurde [PCT WO 93/13676]. In beiden Fällen sind die Parameter für einen Zyklus angegeben. Die Zeit für die Reinigung der Adsorber bzw. der Säule wird nicht berücksichtigt, da dieser Parameter für die Säule nicht verfügbar ist. Die wichtigsten Parameter sind die absoluten und relativen Ausbeuten sowie die Zykluszeiten. Beim Säulenprozeß ergibt sich eine bLF-Ausbeute von 96 % (19,8 g) bei einer Gesamtzyklusdauer von ca. 4,5 h. Für den Membranadsorber liegt die Gesamtzyklusdauer bei ca. 30 min bei einer Ausbeute von 80 % (1,6 g). Es sind also etwa 12 Zyklen (= 6 h) notwendig, um die gleiche Menge an Lactoferrin zu erhalten. Dies erscheint zunächst nachteilig für den Adsorber; der Vorteil der Membranadsorber wird deutlich, wenn die normierten Flußraten betrachtet werden. Der Druckabfall über die Membranadsorber ist wesentlich geringer, der normierte Fluß ist mit 2,3 L/minbar um 53 % höher als bei der Säule (1,5 L/minbar).

Membranadsorber besitzen aber nicht nur den Vorteil, daß der Druckabfall über die Module geringer ist. Sie sind wesentlich einfacher zu handhaben, ein zeitintensives Packen und Schichten wie bei Säulenmaterialien ist nicht erforderlich. Die Vergrößerung der Austauschfläche kann sowohl durch die Modulhöhe wie auch die Anzahl der Membranlagen erfolgen. In säulenchromatographischen Anlagen dagegen kann ein Scale Up nur durch Vergrößern des Säulendurchmessers erreicht werden. Dadurch ergeben sich vielfältige Variationsmöglichkeiten in der Modulordnung (vgl. Tabelle 3.20), die jedem Produktionsprozeß optimal angepaßt werden kann.

Tab. 3.20: Modultypen der Sartobind® Factor Two Family, Quelle: Sartorius

Bauform	Höhe [cm]	Fläche [m ²]	Flußrate [L/minbar]
60 Wicklungen	50,0	8,0	2,60
	25,0	4,0	1,50
	12,5	2,0	0,75
	6,3	1,0	0,35
	3,1	0,5	0,17
30 Wicklungen	50,0	4,0	7,00
	25,0	2,0	3,50
	12,5	1,0	1,70
	6,3	0,5	0,85
	3,1	0,25	0,42
15 Wicklungen	50,0	2,0	15,40
	25,0	1,0	7,50
	12,5	0,5	3,70
	6,3	0,25	1,85
	3,1	0,125	0,95

Eine optimale Modulkombination kann beispielsweise wie folgt aussehen: Zwei Module mit 4 m² (S40k-30-50) werden parallel und die beiden Parallelstränge dann in Reihe mit zwei Modulen von jeweils 2 m² (S20k-15-50) geschaltet. Es ergibt sich eine Gesamtaustauschfläche von 12 m² (Tabelle 3.19, Spalte 3). Bei einer Flußrate von 14 L/min werden auch für die Module mit 4 m² Fläche optimale Auftragsbedingungen (je 7 L/min pro Parallelstrang) erhalten. Um die gleiche Menge an bLF in einem Zyklus zu gewinnen, müssen etwa 750 L Molke aufgetragen werden. Die Beladungszeit von ca. 55 min ist um 75 % kleiner als beim Säulenmaterial. Wenn für Elution und Reinigung je 0,5 h veranschlagt werden, ergibt sich eine Gesamtzykluszeit von annähernd 2 h. Im industriellen Prozeß werden idealerweise zwei dieser Anlagen gefahren, um durch die wechselseitige Beladung der Anlagen die Totzeiten im Prozeß zu minimieren. Damit wird eine schnelle und kontinuierliche Isolierung des Lactoferrins gewährleistet.

Für die Eluat-Aufarbeitung stehen zwei Methoden zur Verfügung:

- 1) Die direkte bLF-Gewinnung aus den salzhaltigen Lösungen durch organische Fällungsreaktionen (Ethanol und Aceton, vgl. Kap. 3.4.1.1). Dieses Verfahren besitzt jedoch einige Nachteile. Zum einen entstehen hohe Investitionskosten für die explosionsgeschützten Anlagen, zum anderen muß eine Lösemittel-Rückgewinnungsanlage etabliert werden. Außerdem müssen Maßnahmen zur Erfüllung umwelttechnischer Anforderungen (Emissionsschutz, Gewässerschutz etc.) ergriffen werden, die zusätzliche Kosten verursachen. Diese Gewinnungsmethode ist daher nur im Rahmen der Forschung von Interesse.
- 2) Die indirekte Produktgewinnung mit einer Entsalzung (vgl. Kap. 3.4.1.2). Von Vorteil sind der einfache Anlagenbau und die –steuerung sowie die direkte Rückgewinnung der Elutionslösungen. Das Lactoferrin wird im Anschluß daran aus der entsalzten und aufkonzentrierten Lösung mit einer Sprühtrocknung gewonnen. Wärmeerzeugungsanlagen (Heißdampf-Systeme) sind in der Regel in den Molken-verarbeitenden Betrieben vorhanden.

Für den Gesamtprozeß (Filtration – Isolierung - Downstreaming) ergibt sich eine Lactoferrin-Ausbeute von 60 – 65 %. In den Einzelbereichen betragen die Verluste 10 – 15 % in der Filtration und etwa 20 % bei der Isolierung. Diese Verluste sind auch bei weiteren Scale Ups zu erwarten, da eine gute Permeatqualität für die Auftragung und eine ausreichende Trennung von Lactoferrin und übrigen Komponenten bei der Elution gewährleistet sein muß. Im Downstreaming liegen die Verluste bei etwa 10 %; dieser Wert wird bei der Verarbeitung größerer Eluatvolumina aber deutlich unter 5 % sinken.

Eine weitere Wertschöpfung läßt sich durch die Weiterverarbeitung des bLF zu Lactoferricin (vgl. Kap. 3.4.1.3) erzielen. Allerdings ist LFCin kein Produkt für den Massenmarkt (Nahrungsmittel und Baby Food), sondern wird eher in speziellen pharmazeutischen Anwendungen eingesetzt werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Analytische Methodenentwicklung:

Vor der Methodenentwicklung zur Isolierung des Lactoferrins aus der Molke stand die Etablierung einer zuverlässigen Analysenmethode im Vordergrund. Neben dem Aufbau einer Referenzanalytik sollte vor allem eine schnelle Quantifizierungstechnik gefunden werden, die eine Prozeßsteuerung ermöglicht. Verfahren wie die SDS-PAGE und ELISA sind einerseits sehr spezifisch aber andererseits schwer zu automatisieren. Außerdem sind die Analysenzeiten zu lang und die notwendigen Materialien sehr teuer.

Die SDS-PAGE konnte nur für qualitative Aussagen über mögliche Verunreinigungen des Lactoferrins verwendet werden. Im Massenbereich um 80 kDa ist es trotzdem nicht möglich, eine ausreichende Auflösung zwischen Transferrin, Lactoperoxidase und Lactoferrin zu erreichen. Zwischen Transferrin und Lactoperoxidase kann nicht unterschieden werden; beide besitzen den gleichen R_f -Wert (0,35 auf homogenen 12,5 % Gelen). Bei Lactoferrin-Konzentrationen über 100 $\mu\text{g/mL}$ (R_f -Wert 0,3) werden die Banden der Proteine daher nicht mehr aufgelöst, so daß nur Aussagen zur Verunreinigung mit den majoren Proteinen getroffen werden können.

Auch MALDI-MS eignet sich nicht zur Quantifizierung von Lactoferrin, zumindest nicht mit dem zur Verfügung stehenden Gerät. Eine Ursache hierfür liegt in der heterogenen Kristallisation von bLF-Molekülen in der Matrix. Die Reproduzierbarkeit der Messungen ist nur unzureichend; es ergeben sich Abweichungen von 20 – 40 % für den bLF-Standard. In Realproben, in denen α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden sind, treten zusätzliche Quench-Effekte durch die kleineren Proteine auf, die die Sensitivität des Systems reduzieren und den Einsatz als Inprozess-Kontrolle (Inprocess Control, IPC) unmöglich machen.

Der ELISA dient als Referenzanalytik zum Vergleich der chromatographischen Verfahren (HPLC/Säule und LPLC/Membranadsorber) und der Kapillarelektrophorese. Ebenso wie beim ELISA wird auch in der ACE ein anti-bLF-Antikörper (FITC-konjugiert) verwendet, da sonst keine Trennung der Proteine erreicht werden kann oder die Empfindlichkeit zu gering ist. Nachteilig bei der ACE sind der asymptotische Verlauf der Kalibrationsfunktion und der kleine lineare Meßbereich (bis ca. 25 $\mu\text{g/mL}$), die das System sehr anfällig für Verdünnungsfehler machen. Die Lactoferrin-Quantifizierungen streuen daher auch um bis zu 60 % zu Höher- und Minderbefunden. Im Gegensatz dazu zeigen die chromatographischen Methoden einheitliche Abweichungen; die HPLC-Daten tendieren zu Minderbefunden bis 25 % und die LPLC-Werte weisen 120 – 220 %-ige Höherquantifizierungen auf. Die HPLC dient aufgrund dieser Ergebnisse als Standardmethode, zumal sie auch in den meisten Laboratorien verbreitet ist. Sie kann aber nicht zur intime-Kontrolle sondern nur zur online-Überwachung der Produktion eingesetzt werden.

Eine Prozeßsteuerung ist dagegen mit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie aufgrund der kurzen Meßzeiten von unter 1 min möglich. Allerdings besitzt bLF kein charakteristisches Wellenlängenpaar, sondern zeigt nur eine Fluoreszenzaktivität in der allgemeinen Protein-Region bei 290/330 nm Ex/Em. Eine vorherige Abtrennung aller anionischen Komponenten mit einem Ionenaustauscher ist daher zwingend erforderlich. Vergleichsmessungen mit der LPLC zeigen, daß die ermittelten bLF-Gehalte im allgemeinen korrelieren. Bei geringen bLF-Gehalten ergeben jedoch Abweichungen bis zu 350 %, die vor allem auf noch vorhandene kationische Komponenten (Lactoperoxidase) hindeuten. Hier müssen weitere Untersuchungen erfolgen, um die Spezifität der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zu erhöhen.

Lactoferrin-Gewinnung: Molkenfiltration

Im Labormaßstab werden zunächst einige Parameter für die Crossflow-Filtration näher eingegrenzt. Der Schwerpunkt dabei liegt in der Auswahl geeigneter Membranmaterialien und Porengrößen, mit dem Ziel, eine möglichst hohe Retention der Schwebstoffe sowie eine hohe Permeation von Lactoferrin zu gewährleisten. Das beste Material ist Hydrosart[®], da es eine hohe mechanische und chemische Stabilität besitzt. Da diese Membran nicht in allen Porengrößen verfügbar ist, können für einen Durchmesser von 0,65 µm nur Membranen aus Celluloseacetat verwendet werden. Insgesamt ergibt sich ein Porengrößenbereich von 1,2 – 0,65 µm, der den Hauptbestandteil näherer Untersuchungen für das weitere Scale Up darstellt. Die bLF-Retention liegt zwischen 10 und 30 % und die Aufreinigung der Molke, gemessen an der Permeat-Transmission, zwischen 10 und 50 % bezogen auf die Transmission der Molke.

Diese Daten können in der kleinen Technikumsstufe bestätigt werden. Durch die steigenden Aufkonzentrierungsfaktoren im Retentat wurde bei Filtration mit einer Temperatur von 50 °C ein Absinken des pH-Wertes im Permeat festgestellt. Die Ursache liegt vermutlich in einer vermehrten Bildung von Lactatsäure durch die vorhandenen Enzyme in der Molke. Eine Absenkung des pH-Wertes würde zu einem Anstieg kationischer Komponenten in der Molke führen, die erhebliche Trennungsprobleme in der Isolierungsstufe zur Folge haben. Der pH-Shift kann bei Filtrationen im Temperaturbereich um 10 °C unterbunden werden, außerdem sollte das VCR nicht über einen Maximalwert von 3 steigen.

Im weiteren Scale Up (Sartocon[®] II) ist der Aufbau des Systems variiert und ein Permeatzyklus aufgebaut (UTMP-Anordnung) worden. Dadurch werden der Druckabfall entlang der Membran konstanter und längere Standzeiten der Module ermöglicht. Zusätzlich kann das Permeat durch eine entsprechende Pumpensteuerung in den Retentatraum zurückgespült werden (Backflushing), um den reversiblen Anteil der Deckschicht zu minimieren. Die mittleren Flußraten können so um bis zu 50 % gesteigert werden. Dabei ist nicht das Rückspülvolumen, sondern die Frequenz entscheidend, auch kurze Rückspülpulse (< 0,2 s; Backshocking) können die Flußraten deutlich steigern [MILISIC & BERSILLON, 1986]. Die Schwankungen in der Molkenzu-

sammensetzung (Transmissionswerte bei 600 nm zwischen 10 und 25 %) beeinflussen ebenfalls die Filtrationsleistung. Bei der Bestimmung der Arbeitspunkte der 0,8 µm HS-Membran ist zu beobachten, daß bei Molken mit hoher Schwebstoff-Beladung (15,1 %) die erzielbaren Flußraten bei gleichen Transmembrandrücken um 100 – 200 % niedriger sind als bei Molken mit geringer Schwebstoff-Beladung (25 %). Membranen mit größeren Poren (1,2 µm) reagieren dagegen unempfindlicher auf unterschiedliche Molkenqualitäten. Bei einer Doppelfiltration der Molke, bei der zunächst mit 1,2 und anschließend mit 0,8 µm filtriert wird, liegt der mittlere Fluß der 1,2 µm Filtration bei etwa 68 L/m²h, die Retention von bLF unter 5 %. Insgesamt können so 590 L Permeat mit einer Transmission von 25 % gewonnen werden. Bei der sich anschließenden Filtration mit der 0,8 µm Membran liegt die mittlere Flußrate mit knapp 91 L/m²h um 30 % höher. Die Transmission des Permeats (570 L, Lactoferrin-Permeation > 90 %) beträgt etwa 33 %; eine Rückspülung war trotz des hohen VCR von 20 nicht notwendig.

Mit der Reinigungsmethode Nr. 4 ist eine schnelle und effektive Reinigung entwickelt worden, mit der die Wasserflüsse zu 80 bis 90 % wiederhergestellt werden können. Die stark alkalische Lösung eignet sich nur für Hydrosart[®]-Membranen; für die bei der Sartocoon[®] II verwendeten Celluloseacetat-Membranen kann eine im Kern identische Lösung mit einem niedrigeren pH-Wert von 10 verwendet werden.

Weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der Filtration sollten unternommen werden, um das Verfahren auch auf Molkenkonzentrat zu übertragen; im Idealfall nicht mit einer Doppelfiltration sondern mit einer Einfachfiltration. Problematisch ist bei Molkenkonzentrat der hohe Anteil der Trockenmasse (30 %). Dies entspricht einem VCR von 5 bei (Dünn-)Molke, bei dem sich bereits die Transmissionswerte des Permeats verringern. Sollten diese Versuche trotzdem erfolgreich sein, ergibt sich ein doppelter Synergieeffekt. Zum einen können bei der Filtration Energiekosten eingespart werden, zum anderen verkürzen sich die Beladungs- und damit die Gesamtzykluszeiten in der Isolierungsstufe deutlich.

Lactoferrin-Gewinnung: Isolierung

Die Charakterisierung der Membranadsorber ist weitestgehend abgeschlossen worden. Die statische Kapazität der Sartobind[®] S-Membran beträgt 0,7 mg bLF/cm². In den planaren Modulen S100 und S15 verringert sich die dynamische Kapazität von 0,58 mg bLF/cm² bei 1 cm/min auf 0,28 mg bLF/cm² bei 5 cm/min. Die Ursache ist nicht genau bekannt, eventuell handelt es sich um ein Verteilungsproblem der Molke im Modul bei höheren Auftragungsgeschwindigkeiten. Bei den Wickelmodulen ist diese Geschwindigkeitsabhängigkeit nicht festgestellt worden; die dynamische Kapazität beträgt bei diesem Bautyp 0,2 mg bLF/cm².

Lactoperoxidase wird bei der Beladung zunächst schneller an den Adsorber gebunden, aber im weiteren Verlauf der Auftragung durch Lactoferrin verdrängt. Wenn der relative Durchbruch des bLF bei 10 % (bezogen auf den Gehalt in der Molke) erfolgt, beträgt der relative LP-Anteil, der im Filtrat nachgewiesen werden kann, schon 200 %. Dieses Verhalten zeigt bereits, daß das Lactoferrin das Hauptprodukt der Isolierung ist, während die Lactoperoxidase bei dieser Methode nur ein Nebenprodukt darstellt. Die absoluten Ausbeuten bestätigen diese Voraussage. Für die Elution der Proteine ist nach zahlreichen Optimierungsversuchen ein 3-Stufengradient aufgestellt worden. Zunächst werden in der 0,1 M NaCl-Fraktion 80 % der LP (absolut ca. 40 mg bei 1 m² Fläche) eluiert. Die Verunreinigung durch bLF ist mit ca. 1 % des gebundenen Lactoferrins scheinbar gering, auf die absoluten Gehalte bezogen ergibt sich aber eine Verunreinigung von etwa 30 %. Außerdem können noch Reste von β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin die LP-Fraktion verunreinigen. Die 0,175 M NaCl-Fraktion ist eine Mischfraktion aus geringen Anteilen der LP und knapp 20 % des Lactoferrins. Mit der 1,0 M NaCl-Fraktion wird schließlich das Lactoferrin isoliert (ca. 80 % oder 1,6 g/m²). Die Verunreinigung durch LP liegt absolut bei weit unter 5 %.

Bei mehrfacher Beladung der Wickelmodule mit dem Permeat aus der oben erwähnten Doppelfiltration zeigen sich zunehmende Verblockungserscheinungen. Die normierte Auftragungsrate reduziert sich bei jeder weiteren Beladung um ca. 21 % von anfangs 2,4 L/minbar auf 1,5 L/minbar nach der dritten Auftragung. Nach jeder zweiten oder dritten Isolierung sollten die Module daher gereinigt werden. Auch hier hat sich NaOH als Reinigungsmittel nicht bewährt, es sollten daher noch Versuche mit der Reinigungsmethode 4 durchgeführt werden. Zu den Zykluszeiten der Module können keine genauen Aussagen gemacht werden, da diese letztlich von der Lactoferrin-Konzentration im Permeat abhängig sind. Der Druckabfall über einer Membran ist aber wesentlich geringer als bei Chromatographiesäulen, so daß bei vergleichbaren Anlagen deutlich kürzere Zykluszeiten erzielt werden.

Lactoferrin-Gewinnung: Downstreaming

Die Fällung des Lactoferrins aus den salzhaltigen Eluaten ist mit organischen Lösemitteln (EtOH und AC) und Ammoniumsulfat (Salting Out) untersucht worden. Bei der Ammoniumsulfat-Fällung können nur 75 % des bLF gewonnen werden. Zusätzlich beträgt das Verhältnis von bLF zu mitgefälltem Salz 25:75, so daß kein Vorteil gegenüber einer einfachen Entsalzung besteht. Außerdem wurde in den Wachstumshemmtests eine starke Beeinträchtigung der antimikrobiellen Wirkung des bLF festgestellt, die vermutlich auf den hohen Salzanteil (Stickstoffquelle) und sterischen Hinderungen des bLF zurückzuführen ist. Unter Verwendung der organischen Lösemittel kann dagegen keine Beeinträchtigung der Aktivität festgestellt werden. In beiden Fällen können über 90 % des bLF gewonnen werden, wobei bei niedrigen Temperaturen

(< 5 °C) auch keine Denaturierungen festzustellen sind. Die MIC liegt unter 25 µM/L bLF und damit im Rahmen der (aus Literaturdaten) zu erwartenden Wirkkonzentration. Trotzdem ist die Fällung aus den salzhaltigen Eluaten keine Alternative zur herkömmlichen Entsalzung, da hohe Chemikalienkosten und Investitionen für die Anlagensicherheit entstehen.

Die kostengünstigste Alternative der Eluat-Aufarbeitung bietet die auch anlagentechnisch einfach durchzuführende Entsalzung mit einer Crossflow-Filtration (Ultrafiltrationsmembran MWCO 30.000) mit anschließender Sprühtrocknung des Konzentrats. Lactoferrin besitzt eine gute Thermostabilität, so daß hier kein Verlust der antimikrobiellen Aktivität zu erwarten ist. Die Filtrate aus der Entsalzung können, im Gegensatz zu den Lösemittel-haltigen Elutionslösungen der Fällungen, nach erfolgter Neueinstellung des NaCl-Gradienten wieder für die Elution eingesetzt werden.

Eine weitere Wertschöpfung kann durch den proteolytischen Verdau des bLF mit Pepsin erzielt werden. Das entstehende Peptid kann mit der Membranadsorber-Technologie sehr einfach und schnell isoliert werden. Dazu ist ein 2-Stufengradient erforderlich, bei dem zunächst mit 0,4 M NaCl-Lösung unerwünschte Peptid-Fragmente und anschließend mit 2,0 M NH₄Cl das Lactoferricin eluiert werden. Die Aminosäuresequenz des Peptids liegt außerhalb der eisenbindenden Domäne des Lactoferrins. Die hohe antimikrobielle Wirkung (MIC < 4 µM/L) ist daher ausschließlich auf die Permeabilisierung der Zellmembran von Mikroorganismen zurückzuführen. Die Wirkdosis des Peptids ist damit deutlich niedriger als die des Lactoferrins, was die Verträglichkeit in pharmazeutischen Applikationen vergrößern sollte.

Mit dem vorgestellten Verfahren kann eine schnelle und wirtschaftliche Isolierung des Lactoferrins aus Molke durchgeführt werden. Die Vorteile der Membranadsorber-Technologie sind vor allem auf die deutlich verbesserten mechanischen und chemischen Eigenschaften der Membranen zurückzuführen. Neben den kürzeren Zykluszeiten zeigen die Membranadsorber eine gute Trennwirkung der adsorbierten Proteine, die mit sehr guten Ausbeuten und Reinheiten gewonnen werden können. Durch die verbesserten Eigenschaften der Membranen ist auch deren Reinigung unproblematisch. Der kompakte Aufbau der Wickelmodule und die hohe Flexibilität in der Modulkombination machen die Membranadsorber zu einer wirtschaftlichen Alternative zu den herkömmlichen säulenchromatographischen Verfahren. Da immer mehr Firmen an der Isolierung von Proteinen arbeiten, hat sich der Margendruck deutlich erhöht. Der Marktpreis für Lactoferrin hat sich in den letzten beiden Jahren halbiert; aktuell kostet ein Kilogramm bLF etwa 1000,- DM. Eine weitere wirtschaftliche Verbesserung des Verfahrens könnte daher auch durch die Isolierung weiterer Molkenkomponenten, beispielsweise der Lactoperoxidase oder der majoren Proteine, erzielt werden.

5 Anhang

Chemikalien:

Die Standardreagenzien wurden von den Firmen Sigma, Fluka oder Aldrich in den handelsüblichen p.a. (pro analysis)-Qualitäten bezogen.

Tab. 5.1: Nicht-Standard-Reagenzien

Substanz	Firma
ABTS	Sigma
Caseine	Fluka
α -Cyano-4-hydroxymethylsäure	Sigma
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Sigma
Insulin	Sigma
Broad pl Kit, pH 3,5 – 9,3	Pharmacia
bov. IgG	Sigma
bov. α -Lactalbumin	Fluka
bov. β -Lactoglobulin	Fluka
bov. Lactoferrin	Morinaga Milk Industries, Sigma, Fluka
bov. Lactoperoxidase	Sigma, Fluka
M _w -Standard Low Molecular Weight (14,4 – 94,0 kDa)	Pharmacia
Pepsin (porcine stomache)	Sigma
Riboflavin	Fluka
BSA	Fluka
Sinapinsäure	Sigma
bov. Transferrin	Fluka

5.1 Analytik

Die Proben (Molke, Permeate und Retentate) werden vor der Injektion 6 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Die Eluate aus der Isolierung müssen vor der Quantifizierung verdünnt werden, in der Regel reicht ein Faktor 1:100.

5.1.1 HPLC

Die HPLC-Anlage verfügt über einen Autosampler mit 96 Positionen; detektiert wird im UV-Bereich bei 280 nm. Es wird mit einer Kationenaustauschersäule vom Typ Mono S H/R 5/5 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gearbeitet.

Tab. 5.2: Laufprogramm HPLC-Analytik (zeitgesteuert)

Puffer A: 20 mM NaP-Puffer pH 7,0; Puffer B: 20 mM NaP-Puffer + 2,0 M NaCl pH 7,0

Puffer	Dauer [min]	Flußrate [mL/min]	Aktion
-	-	-	Probeninjektion (240 µL)
A	1	1,0	Durchlauf
75 % A/ 25 % B	7	1,0	1. Stufengradient
B	5	1,0	2. Stufengradient
A	15	1,0	Equilibrierung

5.1.2 Niederdruck-Chromatographie

Bei der verwendeten Anlage handelt es sich um eine Biologic LP der Firma BioRad (München, Deutschland). Das System besteht aus einer Peristaltikpumpe, einer Mischkammer, einem manuell verstellbaren Probenaufgabeventil, einer elektronischen Steuereinheit und einem Proben-sampler. Die Anlage kann mit Säulen oder Membranadsorber-Modulen (S15 und S100) betrieben werden.

Tab. 5.3: Laufprogramm Membranadsorber-Analytik (volumengesteuert)

Puffer A: 20 mM NaP-Puffer pH 7,0; Puffer B: 20 mM NaP-Puffer + 1,0 M NaCl pH 7,0

Puffer	Volumen [mL]	Flußrate [mL/min]	Aktion
A	4	1	Probeninjektion (2 mL)
66 % A/ 33 % B	4	4	1. Stufengradient
B	3	4	2. Stufengradient
A	4	4	Equilibrierung

5.1.3 Gelelektrophorese

Casein-Standard (2 g/L):

In einem 50 mL-Meßzylinder werden 100 mg Casein in 5 mL 1 M NaOH gelöst. Die Lösung wird ca. 5 min gerührt, bis das Casein vollständig gelöst ist. Nun werden ca. 30 mL bidest. H₂O zugegeben und die Lösung durch Zutropfen einer verdünnten Salzsäure (HCl)-Lösung mittels einer pH-Meßelektrode auf pH 8,3 eingestellt. Anschließend wird mit bidest. H₂O auf 50 mL aufgefüllt [BEUTEL, 1996].

5.1.3.1 Homogene SDS-Gele

Probenvorbereitung (nicht reduzierend):

Die Proteinprobe wird mit dem Puffer im Verhältnis 1:1 verdünnt, 5 min bei 100 °C gekocht und 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Probenpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0 + 2 mM EDTA + 5 % SDS + 0,02 % Bromphenolblau (+10 % Mercaptoethanol, wenn unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet werden soll)

Gele: 12,5 % und 20 % homogen (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Gelpräparation und Durchführung der Messung:

Das verwendete PhastSystem™ (Pharmacia, Uppsala, Schweden) besteht aus zwei Einheiten, einer horizontalen Laufkammer sowie der Entwicklungskammer. Zunächst werden die zu untersuchenden Substanzen auf das Gel (hier ein homogenes 20 %-Gel) aufgebracht. Es stehen acht Bahnen pro Gel zur Verfügung, aufgetragen wird jeweils 1 µL Probe pro Bahn mit Hilfe eines Probenkammes. Anschließend wird das präparierte Gel in die Laufkammer eingebracht und der Lauf durch das Anlegen einer Spannung gestartet. Nach dem Lauf wird das Gel direkt in die Entwicklungskammer überführt. Die zum Entwickeln benötigten Wasch- und Entwicklungslösungen (vor Versuchsbeginn angesetzt, s.u.) werden über ein Pumpsystem, das programmiert und somit an die individuelle Messung angepaßt werden kann, automatisch in die Entwicklungskammer eingebracht.

Silberfärbung:

Einwaagen und Vorbereitung der Lösungen für insgesamt 10 Ansätze (Lagerung bei 4 °C):

1. Waschlösung: 10 % EtOH und 5 % Essigsäure (HAc) (v/v): 500 mL EtOH + 250 mL HAc auf 5 L auffüllen
2. 5 % Glutaraldehyd: 20 mL 25 % Glutaraldehyd auf 100 mL auffüllen
3. 95 % EtOH und 5 % HAc: 285 mL EtOH + 15 mL HAc
4. 1,6 % Na₂S₂O₃-Lösung: 1,76 g Na₂S₂O₃ einwiegen
5. 0,4 % AgNO₃-Lösung: 4 g AgNO₃ in 1 L H₂O in einer dunklen Glasflasche lösen
6. Fixierpuffer: 0,3 g NaAc einwiegen
7. 2,5 % Na₂CO₃-Lösung: 37,5 g Na₂CO₃ in 1,5 L H₂O lösen
8. 2 % Formaldehyd: 2 mL Formaldehyd mit H₂O auf 100 mL auffüllen
9. Reduzierlösung: 3,7 g Tris/HCl einwiegen
10. Stop-Lösung: 100 mL Glycerin auf 1 L auffüllen

Lösungen, die jeweils frisch angesetzt werden müssen:

1. 1,6 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung: Vorlage Nr. 4 in 110 mL H_2O lösen
2. Fixierpuffer: Vorlage Nr. 6 + 4 mL 1,6 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (w/v) + 10 mL 5% Glutaraldehyd + 30 mL 95 % EtOH 5 % HAc + 66 mL H_2O
3. Entwickler: 160 mL 2,5 % Na_2CO_3 -Lösung + 2 mL 2 % Formaldehyd
4. Reduzierlösung: Vorlage Nr. 9 + 100 mL 1,6 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Tab. 5.4: Verbrauch an Lösungen für eine Silberfärbung

	mL
10% EtOH und 5% HAc	500
Fixierpuffer	100
bidest. H_2O	400
0,4 % AgNO_3 -Lösung	100
Entwickler	150
Reduzierlösung	100
Stop-Lösung	100

5.1.3.2 Isoelektrische FokussierungProbenvorbereitung für die Isoelektrische Fokussierung:

Es ist keine besondere Probenvorbereitung notwendig, allerdings sollte der Salzgehalt unter 0,7 M (bezogen auf einwertige Salze) liegen. Falls erforderlich, werden die Proben mit einer NAP-5 Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) entsalzt.

Gele: IEF-Gel 3 – 9 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Lösungen:

Abweichend von den Ansätzen der homogenen SDS-Gele wird keine Stop-Lösung benötigt. Dafür wird im ersten Waschschrift eine 20 %ige Trichloressigsäure (TCA)-Lösung gebraucht (100 g TCA mit Wasser auf 500 mL auffüllen). Als Fixierlösung wird eine 5%ige Glutaraldehydlösung benutzt.

Die isoelektrische Fokussierung hat keine Maximallaufzeit, d.h. lange Laufzeiten gewährleisten, daß die Proteine ihren isoelektrischen Punkt erreichen. Welche Mindestlaufzeit für eine bestimmte Probe nötig ist, muß getestet werden. Nach dem Lauf sollte möglichst schnell entwickelt werden (Ausfällung der Proteine mit 20%iger TCA), um eine Bandenverbreiterung durch Diffusion zu vermeiden.

Tab. 5.5: Verbrauch an Lösungen für eine Silberfärbung

	mL
20 % TCA	100
10 % EtOH und 5 % HAc	500
5 % Glutaraldehyd	100
bidest. H ₂ O	500
0,4 % AgNO ₃ -Lösung	100
Entwickler	150
Reduzierlösung	100

5.1.4 MALDI-MS

Für die Analyse mit MALDI-TOF¹-MS wurde ein Kompakt Maldi 3 von Kratos Analytical benutzt. Es gestattet Messungen von positiven und negativen Molekülionen nach linearer Detektion (1 m Weglänge) oder im Reflektor-Modus (1,5 m Weglänge). Als Bestrahlungsquelle dient ein UV-Stickstoff-Laser (337 nm), der über eine Lichtoptik in seiner Intensität abgeschwächt werden kann. Die Bestrahlungsstärke ist dadurch in einem Bereich von 0-180 relativen Einheiten zu variieren, wobei die ursprüngliche Laserstärke von 300 µJ auf 79,5% (180) bzw. 0,32% (0) reduziert wird. Die Beschleunigung der Ionen erfolgt durch Anlegung einer Spannung von 20 kV. Die Steuerung sowie die Datenaufnahme erfolgt über eine Unix-Workstation, die mittels eines optischen Leiters mit dem eigentlichen MALDI verbunden ist.

Die Kalibration der aufgenommenen Spektren erfolgt manuell, indem den Peaks eines Moleküls bekannter Masse die korrekte Masse zugewiesen wird. Das Programm errechnet aus mindestens zwei solcher Zuordnungen eine Kalibrationsfunktion, welche dann auf die nachfolgenden Messungen angewendet werden kann. Auf diese Weise ist sowohl eine interne als auch eine externe Kalibration möglich. Die Spektren lassen sich glätten, indem durch verschiedene mathematische Funktionen Mittelwerte aus mehreren aufeinanderfolgenden Kanälen gebildet werden. Weiterhin lassen sich die Peaksschwerpunkte berechnen, welche dann zur Angabe der Masse des Moleküls genutzt werden.

Probenpräparation für MALDI-MS:

Für die Probenpräparation werden Träger (Slides) mit 10 Probenspots verwendet. Jeder Probenspot ist in 1000 Positionen aufgeteilt, die in 5er Schritten angefahren werden können. Die

¹ TOF: Time of Flight

Probenauftragung erfolgt nach der „Dried-droplet-Methode“: Zunächst wird auf die Probenspots 1 µL Matrixlösung aufgetragen. Nach dem Trocknen der Matrix wird nun auf jeden Spot 1 µL der zu untersuchenden Probensubstanz aufgebracht. Abschließend wird noch einmal 1 µL Matrixlösung aufgetragen. Nach dem Trocknen sind die präparierten Slides fertig und können in das MALDI-MS zur Messung eingeführt werden. Die Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben sollte im Bereich von 1 mg/mL für Proteine > 50 kDa liegen, für kleinere Proteine können geringere Konzentrationen verwendet werden.

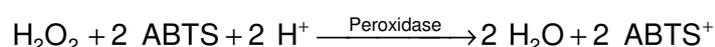
Matrizes: 15 g/L α -Cyano-4-hydroxymethylsäure gelöst in Acetonitril (ACN)/ 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) 2:1 (v/v)
 10 g/L Sinapinsäure gelöst in Acetonitril/ 0,1% TFA 2:1 (v/v)
 10 g/L 1,4-Dihydroxybenzoesäure gelöst in Acetonitril/ 0,1% TFA 2:1 (v/v)

Kalibration für die MALDI-Messungen:

Es wird eine externe Kalibration durchgeführt, d.h. eine Substanz mit bekanntem Spektrum wird vor den Proben vermessen und mit Hilfe eines im MALDI-MS gespeicherten Referenzspektrums korreliert. Die Referenzsubstanz sollte zweckmäßigerweise eine ähnliche Molmasse haben wie die Probe. Für Proteine < 20 kDa werden Insulin ($M_w \sim 5,8$ kDa) und für Proben > 20 kDa BSA ($M_w \sim 66,2$ kDa) als Kalibrationssubstanz verwendet.

5.1.5 Lactoperoxidase-Assay

Um die enzymatische Aktivität der isolierten Lactoperoxidase zu bestimmen, wird die Reaktion von H_2O_2 mit 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)) (ABTS), die von Peroxidasen katalysiert wird, photometrisch bei 405 nm verfolgt [PÜTTER & BECKER, 1983]. ABTS ist ein heterocyclisches Azin, welches als Redoxsystem drei Oxidationsstufen aufweisen: In einem ersten Schritt wird das meist farblose Azin zu einem stabilen, stark gefärbten Radikalkation oxidiert und bei einem weiteren Elektronenentzug zum Azodikation überführt. Beim ABTS erfolgt der zweite Oxidationsschritt vom grünen Radikalkation zum roten Dikation nur bei großem Überschuß an Oxidationsmittel und in stark saurem Reaktionsmilieu. Unter der katalytischen Einwirkung von Lactoperoxidase oxidiert 1 Mol H_2O_2 2 Mol reduziertes ABTS (ABTS) zum stabilen, grünen ABTS-Radikalkation (ABTS^{•+}) [GALLATI, 1979]:



Das reduzierte ABTS ist farblos, sein Absorptionsmaximum liegt bei 340 nm, das grüne ABTS-Radikalkation hat sein Absorptionsmaximum bei 414 nm.

Lösungen für LP-Assay:

1. 20 mM/L ABTS-Lösung: 1,1 g ABTS (Diammonium-Salz) in 100 mL Phosphat-Puffer lösen.
2. 67 mM/L Phosphat-Puffer pH 6,0: 0,144 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 0,798 g KH_2PO_4 in 100 mL bidest. H_2O .
3. 10 mM/L H_2O_2 -Lösung: Stammlösung von 0,1 mol/L ansetzen. Für den Versuch auf 0,01 mol/L verdünnen.
4. LP-Lösungen: Lactoperoxidase-haltige Proben oder eine Stammlösung aus 0,5 mg/mL lyophilisierter LP werden so mit Phosphat-Puffer verdünnt, daß die Absorption zwischen 0,1 und 1,0 liegt. Für jede zu untersuchende Probe muß die optimale Verdünnung ermittelt werden.

Durchführung des Assays:

In einer Küvette werden 0,2 mL ABTS- und 0,2 mL H_2O_2 -Lösung vorgelegt. 10 μL der LP-Lösung werden mit 1990 μL Puffer gemischt, in die Küvette gegeben und die Messung gleichzeitig gestartet. Zur Berechnung der LP-Aktivität werden die Absorptionswerte 1 und 6 min nach der Durchmischung benötigt; gemessen wird gegen eine Leerprobe ohne LP. Zur Berechnung der Aktivität (b) wird Gleichung 5.1 verwendet [PÜTTER & BECKER, 1983]:

$$b = \frac{\Delta A \cdot V \cdot df}{\epsilon \cdot d \cdot \Delta t \cdot v} \left[\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \right] (\text{U/mL}) \quad (\text{Gl. 5.1})$$

ΔA = Änderung der Absorption von 1 bis 6 min.

Δt = 5 min

V = Gesamtvolumen der Probe in L ($2,4 \times 10^{-3}$ L)

v = Volumen der LP-Lösung in L (1×10^{-6} L)

ϵ = Absorptionskoeffizient von ABTS bei 405 nm ($1,86 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$)

d = Dicke der Küvette in mm (10 mm)

df = Verdünnungsfaktor der Lactoperoxidase

Zur Berechnung der Aktivität des Enzyms in Units/mg wird das Ergebnis noch durch die Konzentration der angesetzten Stammlösung (mg/mL) geteilt.

5.2 Molkenfiltration

Berechnung der Scherraten:

Für das Hohlfasermodule gelten die Gleichungen 5.2 bis 5.4; d = Lumen und J = Retentatfluß.

$$\text{Anströmfläche } A = \frac{1}{4} \cdot \pi \cdot d^2 \quad (\text{Gl. 5.2})$$

$$\text{Strömungsgeschwindigkeit } V = J / A \quad (\text{Gl. 5.3})$$

$$\text{Scherrate } \gamma = 8 \cdot V / d \quad (\text{Gl. 5.4})$$

Für Plattenmodule gelten die Gleichungen 5.3, 5.5 und 5.6; a = Spacerbreite und b = Spacerhöhe.

$$\text{Anströmfläche } A = a \cdot b \quad (\text{Gl. 5.5})$$

$$\text{Scherrate } \gamma = 6 \cdot V / d \quad (\text{Gl. 5.6})$$

Batch-Filtration:

Das System wird zunächst mit Wasser gespült, um die 0,1 M NaOH oder das 50 %ige Isopropanol aus der Lagerung der Module zu entfernen und die Anlage luftfrei zu bekommen. Der Permeatausgang wird anschließend geschlossen und Molke auf der Retentatseite für 10 min zirkuliert, um die Apparatur ins Gleichgewicht zu bringen (Filtrationstemperatur 10 oder 50 °C). Das Wasser im System führt nur zu einer unbedeutenden Verdünnung der Molke. Erst danach kann der Permeatausgang vorsichtig geöffnet werden, bis der gewünschte Transmembrandruck erreicht ist.

UTMP-Filtration:

In der UTMP-Anordnung werden die Pumpen auf der Retentat- und der Permeatseite gleichzeitig angeschaltet, um den linearen TMP entlang der Membran möglichst schnell einstellen zu können. Dabei zirkuliert auf der Retentatseite die Molke, während auf der Permeatseite Wasser gepumpt wird. Der Permeatausgang wird nun gering geöffnet, um das Wasser im System durch Molkenpermeat zu ersetzen. Nach dem Austausch wird die Permeatpumpe soweit eingeregelt, daß das System bei vollständig geöffnetem Permeatausgang im Gleichgewicht steht, also weder Permeat gewonnen noch Luft eingesaugt wird. Die Filtration kann nun beginnen, der TMP wird allein durch die Permeatpumpleistung geregelt.

5.2.1 Reinigungsmethoden

Reinigung der Filtermembranen:

Die Reinigung wird im Recycled Batch-Modus durchgeführt, das heißt, auch das Permeat wird in das Vorratsgefäß zurückgeführt. Der Permeatausgang ist dabei voll geöffnet. Das Volumen der Reinigungslösung beträgt 2 – 3 L, die Temperatur liegt bei 40 – 50 °C. Bei der Mehrstufen-Reinigung wird die Membran mit jeder Lösung etwa 20 min behandelt, bei der Einstufen-Reinigung einmalig für 30 min.

Die Lagerung der Module erfolgt in 0,1 M NaOH oder in 50 % Isopropanol für Cellulosederivat-Membranen.

Tab. 5.6: Ein- und Mehrstufenmethoden für die Membranreinigung

RM Nr.	Bemerkung	Lösung Nr.		Ansatz [g/L oder mL/L]
1		1	20 % Zitronensäure (w/v)	20,0
		2	1 M NaOH	40,0
		3	50 % Isopropanol	500
2	Die %-Angaben beziehen sich auf die Gesamtkonzentration von 10 g/L	1	48 % NaOH	4,8
			+ 17 % Na-D-gluconat	1,7
			+ 17 % Na ₂ -EDTA	1,7
			+ 17 % Na ₅ P ₃ O ₁₀	1,7
			+ 1 % SDS	<u>0,1</u>
				Summe 10,0 g/L
3	wie RM 2 jedoch vierfach konzentriert	1	wie RM 2	Summe 40,0 g/L
4	wie RM 2 jedoch achtfach konzentriert	1	wie RM 2	Summe 80,0 g/L
5		1	1 % P3-Ultrasil 62	10,0
6		1	1 M NaOH	40,0
7	pH ca. 10	1	wie RM 4, zusätzlich Zitronensäure	62,0

5.3 Membranadsorber

5.3.1 Integritätstest

Die Integrität der Module wird mit einer Säure-Base-Titration überprüft. Der Verlauf der Titration kann mit Leitfähigkeits- oder pH-Messung verfolgt werden. Das Modul wird solange mit 0,5 M Salzsäure (HCl) gespült (Austauschergruppen werden protoniert), bis das Signal (Leitfähigkeit oder pH) konstant ist. Anschließend wird mit H₂O bidest. gespült, bis das Signal wieder konstant ist. Aus dem 10 %igen Abfall des Signals kann das Totvolumen der Anlage bestimmt werden (Flußrate x Zeit). Abschließend wird mit 0,05 M NaOH gespült und die Durchbruchkurve aufgenommen. Der Durchbruch ist bei einem Signalanstieg um 10 % erreicht. Die dynamische Kapazität berechnet sich nach Gleichung 5.7 (Quelle: Sartorius):

$$\text{Kapazität } K \left[\frac{\mu\text{M}}{\text{cm}^2} = \frac{\mu\text{equiv}}{\text{cm}^2} \right] = c_{\text{NaOH}} \cdot (V_{10\%} - V_0) / A \quad (\text{Gl. 5.7})$$

- Mit c_{NaOH} = Konzentration der Natronlauge [mM/L]
 $V_{10\%}$ = Volumen bis zum 10 %igem Durchbruch [mL]
 V_0 = Totvolumen der Anlage [mL]
 A = Membranfläche [cm²]

Ein integeres Modul besitzt eine Bindungskapazität für einwertige Ionen von $5 \pm 1 \mu\text{equiv}/\text{cm}^2$.

5.4 Downstream-Prozeß

5.4.1 Proteinfällung

Salting out:

Diese Proteinfällung kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die Lactoferrin-Lösung wird unter ständigem Rühren portionsweise mit Ammoniumsulfat versetzt (Tabelle 5.7). Die Zugabe darf nicht zu schnell erfolgen, um keine lokale Sättigung zu erhalten. Nach der ersten Niederschlagsbildung wird die Lösung noch ca. 15 min gerührt, dann kann der Niederschlag abzentrifugiert werden. Mit dem Überstand wird eine Nachfällung durchgeführt; die vereinigten Präzipitate werden lyophilisiert und bei 4°C gelagert.

Tab. 5.7: Nomogramm von Ammoniumsulfat [COOPER, 1982]

		Endkonzentration Ammoniumsulfat (%Sättigung)																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
Anfangskonzentration Ammoniumsulfat (%Sättigung)		Zuzugebendes Ammoniumsulfat (g/L)																
		0	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90
0		56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10			57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30						19	43	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33							12	43	74	94	142	177	214	252	292	333	426	522
35								31	63	74	129	164	200	238	278	319	411	506
40									31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45										32	65	99	134	171	210	250	339	431
50											33	66	101	137	176	214	302	392
55												33	67	103	141	179	264	353
60													34	69	105	143	227	314
65														34	70	107	190	275
70															35	72	153	237
75																36	115	198
80																	77	157
90																		79

Fällung mit Ethanol und Aceton:

Die Proteinfällung durch Zugabe der organischen Lösemittel Ethanol bzw. Aceton wird bei den Temperaturen 0 °C, 5 °C sowie bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Proteinlösung wird mit der zuvor ermittelten benötigten Menge an Fällungsreagens versetzt. Nach ca. 15 min kann der gebildete Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand verworfen werden. Das Präzipitat wird lyophilisiert und bei 4°C gelagert.

5.4.2 Enzymatischer Verdau von Lactoferrin

Lactoferrin wird durch Pepsin-Verdau von Lactoferrin dargestellt. Es wird eine 5 %ige (w/v) Lactoferrin-Lösung mit bidest. H₂O (50 mg/mL) angesetzt und mit 0,1 N Salzsäure auf pH 2,5 eingestellt (pH-Optimum für Pepsin). Anschließend wird Pepsin zugegeben (3 % Pepsin, w/w bezogen auf Lactoferrin, also 1,5 mg/mL); die optimale Reaktionstemperatur beträgt 37 °C.

Nach ca. 5 Stunden wird die Reaktion gestoppt, indem das Hydrolysat für 15 Minuten auf 80 °C erhitzt wird (Denaturierung des Pepsins). Das erhaltene Hydrolysat wird mit 0,1 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt, gebildete Präzipitate abzentrifugiert, der klare Überstand lyophilisiert und bei 4 °C gelagert.

Isolierung des LFCin-Peptids:

Es wird die Niederdruckanlage Biologic LP verwendet (Kap. 5.1.2).

Proben- und Equilibrierungspuffer: 20 mM NaP-Puffer pH 7,2

1. Stufengradient: 0,4 M NaCl-Lösung

2. Stufengradient: 2,0 M NH₄Cl-Lösung

Bei allen Versuchen wird mit einer konstanten Flußrate von 4 mL/min gearbeitet. Die Membranadsorber werden mit 1,0 M NaOH gereinigt und in 0,1 M NaOH gelagert.

5.4.3 Wachstumshemmtest

Vorkultur:

Ein 500 mL Vierschikane-Erlenmeyerkolben wird mit 20 mL zehnfach konzentriertem, eisenfreiem Mineralmedium Brunner und 160 mL H₂O bidest befüllt und bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Anschließend werden unter der Cleanbench 20 mL einer ebenfalls autoklavierten Glucoselösung (10 g/L) hinzugegeben. Von einer Stammpalte werden nun einzelne Kolonien des benötigten Mikroorganismus (*Bacillus subtilis* DSM 10) in dieses Nährmedium überführt und die Vorkultur für zwei bis drei Tage unter aeroben Bedingungen in einem Rotationsschüttler bei 120 rpm und 28 °C inkubiert.

Wachstumshemmtest:

Es werden fünf 1 L Schott Duran-Glasflaschen mit 20 mL zehnfach konzentriertem eisenfreiem Mineralmedium Brunner und 160 mL H₂O bidest befüllt und autoklaviert (121 °C, 20 min). Unter der Cleanbench werden anschließend je 20 mL sterile Glucoselösung (10 g/L) sowie unterschiedliche Mengen der erstellten Vorkultur (zwischen 100 - 1000 µL) hinzugegeben und die Flaschen bei 28 °C und 120 rpm inkubiert. Sobald eine deutliche Trübung des Mediums zu erkennen ist, werden optische Dichtemessungen durchgeführt, um den Eintritt der Kulturen in ihre exponentielle Wachstumsphase zu verfolgen.

Zeitgleich werden zweimal fünf (Doppelbestimmung) 100 mL Vierschikane-Erlenmeyerkolben für den eigentlichen Wachstumshemmtest vorbereitet. In diesen Kolben werden je 10 mL Lösung vorgelegt, bestehend aus Mineralmedium Brunner, 0,5 g/L Glucose (getrennt voneinander

autoklaviert für 20 min bei 121 °C) und unterschiedlichen Mengen an Lactoferrin. Die Lactoferrin-Konzentrationen liegen zwischen 5 µM/L und 50 µM/L und die Lactoferricin-Konzentrationen bei 4 und 8 µM/L. Für einige Versuche wird thermisch sterilisiertes bLF verwendet. Dazu wird die bLF-Lösung zunächst mit 0,1 – 1,0 M HCl auf pH 4,0 eingestellt, in einem Thermomixer bei 70 °C für 10 min erhitzt und anschließend mit 0,1 – 1,0 M NaOH neutralisiert. Sehr wichtig ist bei dieser Sterilisation ein Salzgehalt < 0,02 M/L, da sonst Denaturierung des Proteins eintritt [EP 0 437 958 A1].

Die Vorkultur, die ihre exponentielle Wachstumsphase zuerst erreicht, wird zum Animpfen der zehn 100 mL Vierschikane-Erlenmeyerkolben benutzt; dazu werden in jeden der Kolben mittels eines Dispensers jeweils 20 mL Vorkulturlösung aus der Schottflasche überführt. Die zehn Erlenmeyerkolben werden im Rotationsschüttler bei 28 °C und 120 rpm inkubiert; die erste Probenentnahme erfolgt nach 30 min; alle weiteren jeweils nach 60 min. Von jeder Probe wird die optische Dichte bestimmt und somit das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen verfolgt. Von den ersten und letzten Proben werden Verdünnungsreihen erstellt und diese ausplattiert, um die Lebendzellzahl zu bestimmen.

Ausplattieren / Bestimmung der Lebendzellzahl (CFU¹):

Von Flüssigkulturen werden Verdünnungsreihen erstellt (10^{-1} bis 10^{-6} mit 0,9 %iger NaCl-Lösung oder Mineralmedium Brunner; beide steril), ausplattiert (100 µL pro Platte) und für etwa 48 Stunden bei 28 °C im Brutschrank inkubiert. Die Platten, die zwischen 10 - 200 Kolonien enthalten, werden ausgezählt und auf die Anfangskonzentrationen nach Gleichung 5.8 zurück gerechnet:

$$CFU = 10 \cdot (0,9 \cdot CFU_x \cdot V_x + 0,1 \cdot CFU_y \cdot V_y) \quad (\text{Gl. 5.8})$$

10 : Korrekturfaktor, um von den eingesetzten 100 µL auf 1 mL umzurechnen

0,9 / 0,1 : Gewichtungsfaktoren für die zwei geeigneten Verdünnungsstufen

CFU_x / CFU_y : Anzahl der Kolonien auf den Agarplatten; x steht für die niedrigere Verdünnungsstufe mit höherer Lebendzell-Konzentration in Lösung, y für die um eine Zehnerpotenz höhere Verdünnung

V_x / V_y : Verdünnungsfaktoren der ausplattierten Lösungen

Optische Dichtemessung:

Alle Messungen werden bei der festen Wellenlänge von 546 nm gegen eine Referenz, bestehend aus einer Mineralmedium Brunner-Lösung versetzt mit einer entsprechenden Menge an Lactoferrin, durchgeführt. Für optische Dichtemessungen mit Werten von oberhalb 0,7 werden die Proben mit MMB verdünnt, da hier der lineare Meßbereich des Gerätes (Zweistrahlspektralphotometer Uvikon 922, Kontron Instruments) endet.

¹ CFU: Colony Forming Units

Herstellung der Nährmedien:**Tab. 5.8: Mineralmedium nach Brunner (eisenhaltig)**

Mineralmedium nach Brunner	Einfach	10x konzentriert
Na_2HPO_4	2,44 g	24,4 g
KH_2PO_4	1,52 g	15,2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,50 g	5,0 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,20 g	2,0 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g	0,5 g
Spurenelementlösung 4 (SL 4)	10,0 mL	100 mL
H_2O bidest.	ad 1000 mL	ad 1000 mL

Eisenfreies Mineralmedium nach Brunner: Wie oben, aber ohne FeSO_4 und $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ in der Spurenelementlösung 4.

Tab. 5.9: Zusammensetzung der Spurenelementlösung 4

Spurenelementlösung 4	
$\text{Na}_2\text{-EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,642 g
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,200 g
Spurenelementlösung 6 (SL 6)	100 mL
H_2O bidest.	ad 1000 mL

Tab. 5.10: Zusammensetzung der Spurenelementlösung 6

Spurenelementlösung 6	
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0,03 g
H_3BO_3	0,30 g
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,03 g
H_2O bidest.	ad 1000 mL

In einigen Versuchen wird eisenfreies Lactoferrin (Apolactoferrin) eingesetzt. Laut Literatur [ARNOLD ET AL., 1982] sollte dies mit Dialyse gegen 0,1 M Zitronensäure bei pH 2,3 gelingen. Versuche an diesem Institut haben dagegen ergeben, daß erst mit 0,5 M Zitronensäure der Eisengehalt um ca. 50% reduziert werden kann [WALDEN, 1998; PLATE, 1998].

Dialyse mit 0,5 M Zitronensäure:

1 g bLF wird in 10 mL 0,5 M Zitronensäure gelöst und in einen Dialyseschlauch SnakeSkin™ der Firma Pierce (10.000 MWCO) gefüllt. Dieser Schlauch wird in ein 600 mL Becherglas gehängt, in dem 250 mL 0,5 M Zitronensäure vorgelegt wird. Die Lösung wird 24 Stunden im +4°C Kühlraum gerührt. Nach Ablauf der Zeit wird die Zitronensäure erneuert und nochmals 24 Stunden bei +4°C gerührt. Die bLF-Lösung wird dem Schlauch entnommen und neutralisiert (mit 0,1-10 N NaOH), die vereinigten Dialyselösungen im Rotationsverdampfer eingeeengt und auf ihren Eisengehalt analysiert.

Photometrische Eisenbestimmung:

Um das durch Dialyse entfernte Eisen quantitativ nachzuweisen, wird eine photometrische Eisenbestimmung mit Phenanthrolin durchgeführt [WÜNSCH, 1976]. Dazu wird so viel der sauren Untersuchungssubstanz in einen 100 mL Meßkolben gegeben, daß etwa 40-500 µg Eisen vorliegen und mit Wasser auf ca. 50 mL aufgefüllt. Nun wird die Probe nacheinander mit 5 mL 1 % Hydroxylammoniumchlorid-Lösung, 5 mL 0,25 % Phenanthrolin-Lösung und 15 mL Acetatpuffer (pH ca. 3,5) versetzt. Mit Wasser wird bis zum Eichstrich aufgefüllt. Nach 30 min Wartezeit wird bei 510 nm gegen eine Leerprobe gemessen. An einer vorher aus Eisen-Standardlösung erstellten Kalibrationsgeraden läßt sich der erhaltene Wert ablesen.

5.5 Statistik

Die Berechnung der Nachweis- und Erfassungsgrenzen erfolgt mit Hilfe der nachfolgend aufgeführten Formeln [DIN 32 645, 1994; DOERFFEL, 1990].

Die Kalibriergerade besitzt die allgemeine Funktion $y = a + b \cdot x$ (Gl. 5.9)

Die Streuung $s_{y,x}$ der gemessenen Werte y um die Regression (Dimension der Meßwerte y) wird nach DIN als „Rest-Standardabweichung“ oder auch als „Streuung um die Regression“ bezeichnet. Die Beurteilung der Streuung im Konzentrationsmaß erfolgt durch die „Verfahrens-Standardabweichung“ s_{x0} (DIN): $s_{x0} = s_{y,x} / b$ (Gl. 5.10)

$$\text{Kritischer Wert der Meßgröße } y_k: \quad y_k = a + s_{y,x} \cdot t_{\bar{P},f} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (\text{Gl. 5.11})$$

$$\text{Nachweisgrenze } x_{\text{NG}}: \quad x_{\text{NG}} = \frac{(y_k - a)}{b} = s_{x0} \cdot t_{\bar{P},f} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (\text{Gl. 5.12})$$

$$\text{Erfassungsgrenze } x_{\text{EG}}: \quad x_{\text{EG}} = x_{\text{NG}} + s_{x0} \cdot t_{\bar{P},f} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (\text{Gl. 5.13})$$

$$\text{mit } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} x_i}{n} \quad \text{und} \quad Q_x = \sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2 \quad (\text{Gl. 5.14 und 5.15})$$

f = n - 2 Freiheitsgrade

m = Anzahl der Parallelbestimmungen einer Probe

n = Anzahl der Proben für die Erstellung der Kalibrierfunktion

$t_{\bar{P},f}$ = Integralgrenzen der t-Verteilung in Abhängigkeit von der Wahrscheinlichkeit \bar{P} im einseitigen Prognoseintervall und der Anzahl der Freiheitsgrade

Nach IUPAC (1994) werden die Nachweisgrenze als „critical level“ (L_C) und die Erfassungsgrenze als „detection limit“ (L_D) bezeichnet. Dabei ist zu beachten, daß die Bezeichnungen der statistischen Grenzen wird in den Normen und der Literatur nicht einheitlich verwendet wird.

Im Zuge der Bemühungen um eine Harmonisierung nationaler und internationaler Normen wurden von der ICH¹ 1996 Richtlinien für die Validierung analytischer Methoden herausgegeben. Danach können die Nachweisgrenze und die Bestimmungsgrenze unter anderem aus der Regression nach Gleichung 5.16 und 5.17 berechnet werden:

$$\text{Nachweisgrenze, Detection Limit } DL = \frac{3,3 \cdot F}{S} \quad (\text{Gl. 5.16})$$

$$\text{Bestimmungsgrenze, Quantitation Limit } QL = \frac{10 \cdot F}{S} \quad (\text{Gl. 5.17})$$

mit F = Standardabweichung der Antwort. Diese kann durch Mehrfachmessung von Leerproben bestimmt werden oder aus der Kalibrationsfunktion, indem die Standardabweichung der Regression oder die Standardabweichung des Ordinatenabschnitts verwendet wird und

S = Steigung der Kalibrationsfunktion.

¹ ICH: International Conference on Harmonisation

5.6 Einbuchstabencode der Aminosäuren

Tab. 5.11: Buchstabencode für Aminosäuren [VOLLHARDT, 1990]

1-Code	Aminosäure	3-Code	pI
A	Alanin	Ala	6,2
C	Cystein	Cys	6,9
D	Asparaginsäure	Asp	5,5
E	Glutaminsäure	Glu	5,3
F	Phenylalanin	Phe	5,9
G	Glycin	Gly	6,1
H	Histidin	His	5,7
I	Isoleucin	Ile	6,0
K	Lysin	Lys	7,4
L	Leucin	Leu	6,0
M	Methionin	Met	5,8
N	Asparagin	Asn	5,4
P	Prolin	Pro	6,3
Q	Glutamin	Gln	5,7
R	Arginin	Arg	8,0
S	Serin	Ser	5,8
T	Threonin	Thr	5,6
V	Valin	Val	6,0
W	Tryptophan	Trp	5,9
Y	Tyrosin	Tyr	7,1

6 Literaturverzeichnis

ADISAPUTRO, I.A., **WU**, Y.-J., **ETZEL**, M.R., Strong cation and anion exchange membranes and beads for protein isolation from whey, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19(9)** (1996) 1437

AEBI, H., **BRODBECK**, U., **KOHLER**, H., **LAUBER**, K., **PFLEIDERER**, G., **VON WARTBURG**, J.P., **WYSS**, S., Einführung in die praktische Biochemie, Karger Verlag, 3. Auflage, 1982

AL-MASHIKHI, S.A., **LI-CHAN**, E., **NAKAI**, S., Separation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography, *J. Dairy Sci.*, **71** (1988) 1747

AL-MASHIKHI, S.A., **NAKAI**, S., Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey proteins by gel filtration techniques, *J. Dairy Sci.*, **70** (1987) 2486

ANEMÜLLER, H., Die Molke-Trinkkur, Walter Häddeke Verlag, Weil der Stadt, 1982

ARNOLD, R.R., **BREWER**, M., **GAUTHIER**, J.J., Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms, *Infect. Immun.*, **28** (1980) 893

ARNOLD, R.R., **RUSSEL**, J.E., **CHAMPION**, W.J., **BREWER**, M., **GAUTHIER**, J.J., Bactericidal Activity of Human Lactoferrin: Differentiation from the Stasis of Iron Deprivation, *Infect. Immun.*, **35** (1982) 792

BAHR, U., **KARRAS**, M., **HILLENKAMP**, F., Analysis of biopolymers by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **384** (1994) 783

BARTH, C.A., **BEHNKE**, U., Ernährungsphysiologische Bedeutung von Molke und Molkenbestandteilen, *Nahrung*, **41(1)** (1997) 2

BASCH, J.J., **DOUGLAS**, F.W., **PROCINO**, L.G., **HOLSINGER**, V.H., **FARRELL JR.**, H.M., Quantitation of Caseins and Whey Proteins of Processed Milks and Whey Protein Concentrates, Application of Gel Electrophoresis, and Comparison with Harland-Ashworth Procedure, *J. Dairy Sci.*, **68** (1985) 23

BELLAMY, W., **TAKASE**, M., **YAMAUCHI**, K., **WAKABAYASHI**, H., **KAWASE**, K., **TOMITA**, M., Identification of the bactericidal domain of lactoferrin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1121** (1992) 130

BEUTEL, S., Untersuchung des enzymatischen Abbaus von Casein, Schwerpunktarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1996

BEZWODA, W.R., **BAYNES**, R.D., **KHAN**, Q., **MANSOOR**, N., Enzyme linked immunosorbent assay for lactoferrin. Plasma and tissue measurements, *Clin. Chim. Acta*, **151** (1985) 61

- BEZWODA, W.R., MANSOOR, N.**, Isolation and characterization of lactoferrin from human whey by adsorption chromatography using Cibacron Blue F3G-A linked affinity adsorbent, *Clin. Chim. Acta*, **157** (1986) 89
- BHAVE, R.R.**, Personal communication, USFilter, Warrendale, PA, 1995
- BLÄCKBERG, L., HERNELL, O.**, Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step, *FEBS Letters*, **109(2)** (1980) 180
- BOHNER, H.F., BRADLEY JR., R.L.**, Effective Cleaning and Sanitizing of Polysulfone Ultrafiltration Membrane Systems, *J. Dairy Sci.*, **75** (1992) 718
- BOUNOUS, G.**, Immune-enhancing properties of whey protein isolates in HIV patients, International Whey Conference, Rosemont, 1997
- BOUNOUS, G., BARUCHEL, S., FALUTZ, J., GOLD, P.**, Whey proteins as a food supplement in HIV seropositive individuals, *Clin. Invest. Med.*, **16** (1993) 204
- BOUNOUS, G., GOLD, P.**, The biological activity of undenaturated dietary whey proteins: Role of glutathione, *Clin. Investig. Med.* **14** (1991) 296
- BROCK, J.**, Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein?, *Immun. Today*, **16** (1995) 417
- BUGLANOV, A.A.**, Use of an affinity immunosorbent for the isolation of lactoferrin from the serum of breast milk, *Khim. Prir. Soedin.*, **6** (1986) 749
- CHERYAN, M.**, Ultrafiltration and Microfiltration Handbook, Technomic Publishing Company, Lancaster, Basel, 1998
- CHIMIEL, J.F.**, Anti-tumor effects of dietary whey protein and its value for head and neck cancer patients, International Whey Conference, Rosemont, 1997
- CHIU, C.K., ETZEL, M.R.**, Fractionation of Lactoperoxidase and Lactoferrin from Bovine Whey Using a Cation Exchange Membrane, *J. Food Sci.*, **65(5)** (1998) 996
- CHU, R.M., WANG, S.-R., WENG, C.-N., PURSEL, V.G.**, Isolation and characterization of porcine milk lactoferrin, *Am. J. Vet. Res.*, **54(7)** (1993) 1155
- COOLBEAR, T., MONK, C., PEEK, K., MORGAN, H.W., DANIEL, R.M.**, Laboratory-scale investigations into the use of extremely thermophilic proteinases for cleaning ultrafiltration membranes fouled during whey processing, *J. Membrane Sci.*, **67** (1992) 93

- DAUFIN, G., MERIN, U., KERHERVE, F.-L., LABBE, J.-P., QUEMERAIS, A., BOUSSER, C.,** Efficiency of cleaning agents for an inorganic membrane after milk ultrafiltration, *J. Dairy Res.*, **59** (1992) 29
- DE JONG, N., VISSER, S., OLIEMAN, C.,** Determination of milk proteins by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **652** (1993) 207
- DE MINGO, J.C., SANCHEZ, L., MATA, L., PEREZ, M.D., CALVO, M.,** Study of the interaction between ribonuclease and lactoferrin from bovine and human milk, European Iron Club Meeting, Gargano, Italien, Abstract p. 19
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, DIN 32 645, 1994**
- DOERFFEL, K.,** Statistik in der analytischen Chemie, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH, Leipzig, 5. Auflage, 1990
- DIONYSIUS, D.A., HERSE, J.B., GRIEVE, P.A.,** Extraction of Lactoperoxidase and Lactoferrin from Whey using Batch Ion Exchange Techniques, *Austr. J. Dairy Technol.*, **46** (1991) 72
- DIONYSIUS, D.A., MILNE, J.M.,** Antibacterial Peptides of Bovine Lactoferrin: Purification and Characterization, *J. Dairy Sci.*, **80** (1997) 667
- EIGEL, W.N.,** Identification of proteose-peptone component 5 as a plasmin-derived fragment of beta-casein, *Int. J. Biochem.* **13** (1981) 1081
- EIGEL, W.N., KEENAN, T.W.,** Identification of proteose-peptone component 8-slow as a plasmin-derived fragment of bovine beta-casein, *Int. J. Biochem.* **10** (1979) 529
- EKSTRAND, B., BJÖRCK, L.,** Fast protein liquid chromatography of antibacterial components in milk, *J. Chromatogr.*, **358** (1986) 429
- ELLISON III, R.T., GIEHL, T.J.,** Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysosyme, *J. Clin. Invest.*, **88** (1991) 1081
- ELLISON III, R.T., GIEHL, T.J., LAFORCE, F.A.,** Damage of the Outer Membrane of Enteric Gram-Negative Bacteria by Lactoferrin and Transferrin, *Infect. Immun.*, **56** (1988) 2774
- EUROPEAN PATENT APPLICATION, EP 0 364 912 A2, Method for thermally treating lactoferrin, 1990**
- EUROPEAN PATENT APPLICATION, EP 0 437 958 A1, Method for heat treatment of lactoferrin without losing physiological activities thereof, 1991**

EUROPEAN PATENT APPLICATION, EP 0 519 726 A2, A process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity, 1992

FAO/WHO, Protein quality evaluation, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation Bethesda, MD, USA, 4 – 8 December 1989, FAO Food and Nutrition Paper 51, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1990

FOLEY, A.A., **BATES**, G.W., The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction, *Anal. Biochem.*, **162** (1987) 296

Fox, P.F., **MULVIHILL**, D.M., Milk proteins: Molecular, colloidal, and functional properties, *J. Dairy Res.*, **49** (1982) 679

FRANCIS, G.L., **REGESTER**, G.O., **WEBB**, H.A., **BALLARD**, F.J., Extraction from Cheese Whey by Cation-Exchange Chromatography of Factors that Stimulate the Growth of Mammalian Cells, *J. Dairy Sci.*, **78** (1995) 1209

GALLATI, H., Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **17** (1979) 1

GOREWEIT, R.C., **SPITSBERG**, V.L., Anti-cancer properties of proteins in the milk fat globule membranes in whey, International Whey Conference, Rosemont, 1997

GRANDISON, A.S., **LEWIS**, M.J., Separation process in the food and biotechnology industries, Technomic Publishing Company, Lancaster, Basel, 1996

GROVES, M.L., Preparation of some iron-binding proteins and α -lactalbumin from bovine milk, *Biochim. Biophys. Acta*, **100** (1965) 154

HAMBRAEUS, L., Importance of milk proteins in human nutrition: Physiological aspects, in: Milk Proteins '84, 63 – 79, Proceedings of the International Congress on Milk Proteins, Luxemburg, 7 – 11 May 1984, Ed.: T.E. Galesloot, B.J. Tinbergen, Pudoc, Wageningen, 1985

HOEK, K.S., **MILNE**, J.M., **GRIEVE**, P.A., **DIONYSIUS**, D.A., **SMITH**, R., Antibacterial Activity of Bovine Lactoferrin-Derived Peptides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41** (1997) 54

HUTCHENS, T.W., **MAGNUSON**, J.S., **YIP**, T.-T., Rapid purification of porcine colostrum whey lactoferrin by affinity chromatography on single-stranded DNA-agarose. Characterization, amino acid composition and N-terminal amino acid sequence, *Biochim. Biophys. Acta*, **999** (1989) 323

ICH, Guidance for Industry: Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996

- JEKAT, F., KONFRANYI, E.,** Zur Bestimmung der biologischen Wertigkeit von Nahrungsproteinen, XV. Milch und Milchprodukte, Hoppe-Seyler's Z., *Physiol. Chem.*, **351** (1970) 47
- JOST, R., MONTI, J.C., PAHUD, J.J.,** Whey protein allergenicity and its reduction by technological means, *Food Technol.*, **41** (1987) 118
- JOST, R., MONTI, J.C., PAHUD, J.J.,** Reduction of whey protein allergenicity by processing, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **289** (1991) 309
- KAWAKAMI, H., SHINMOTO, H., DOSAKA, S., AHIKO, K.,** Method for separating bovine lactoferrin from cow's milk and purifying same, U.S. patent 4,668,771, 1987
- KAWAKAMI, H., SHINMOTO, H., DOSAKA, S., SOGO, Y.,** One-step isolation of lactoferrin using immobilized monoclonal antibodies, *J. Dairy Sci.*, **70** (1987) 752
- KIM, Y.J., CRAMER, S.M.,** Experimental studies in metal affinity displacement chromatography of proteins, *J. Chromatogr. A*, **686** (1994) 193
- KOSEMUND, D.,** Isolierung und Bestimmung von bovine Lactoferrin aus Molke unter Verwendung von Kationenaustauschern, Schwerpunktarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1997
- KOSEMUND, D.,** Aufarbeitung von Süßmolke mittels Crossflowfiltration zur Isolierung von Lactoferrin, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1998
- KOTHE, N., DICHELMULLER, H., STEPHAN, W., EICHENTOPF, B.,** Method of preparing a solution of lactic colostric immunoglobulins or both and use thereof, U.S. Patent 4,644,056, 1987
- KUWATA, H., YIP, T., TOMITA, M., HUTCHENS, T.W.,** Direct evidence of the generation in human stomache of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1429** (1998) 129
- KUWATA, T., PHAM, A., NAHAI, S.,** Elimination of β -Lactoglobulin from whey to stimulate human milk protein, *J. Food Sci.*, **50** (1985) 605
- LAMPREAVE, F., PINEIRO, A., BROCK, J.H., CASTILLO, H., SANCHEZ, L., CALVO, M.,** Interactions of bovine lactoferrin with other proteins of milk whey, *Int. J. Biol. Macromol.*, **12** (1990) 2
- LAUER, H.H., MACMANIGALL, D.,** Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 166

- LAW, B.A., REITER, B., The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey, *J. Dairy Res.*, **44** (1977) 595
- LEHRER, R.I., GANZ, T., Neutrophils and Host Defence, *Ann. Intern. Med.*, **109** (1988), 127
- LELIEVRE, J., Whey proteins in chesse – An Overview, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **367** (1995) 359
- LE MAGNEN, C., RAINARD, P., MAUBOIS, J.L., PARAF, A., PHAN THANH, L., Dosage de la lactoferrine bovine par les techniques immunoenzymatiques (ELISA), *Le Lait*, **69** (1989) 23
- LÖNNEDAL, B., ATKINSON, ST., Nitrogen components of milk, A. Human milk proteins, in: Handbook of Milk Composition, Ed.: R.G. Jensen, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1995, 351 - 368
- LORENZEN, P.CHR., Molkenprotein: Das andere Eiweiß aus der Milch, in: Milcheiweiß für Lebensmittel, Ed.: A. Nienhaus, E. Reimerdes, Behr's Verlag, Hamburg, 1987, 221 - 236
- MASSON, P.L., HEREMANS, J.F., Lactoferrin in milk from different species, *Comp. Biochem. Physiol.*, **39** (1971) 119
- MAYNARD, F., PIERRE, A., MAUBOIS, J.L., Fractionation of human lactoferrin and α -lactalbumin using microfiltration and ultrafiltration membranes, *Le Lait*, **69** (1989) 59
- MEISEL, H., FRISTER, H., SCHLIMME, E., Biologically active peptides in milk proteins, *Z. Ernährungswiss.*, **28** (1989) 267
- MILISIC, V., BERSILLON, J.L., Anti-fouling Techniques in Cross-flow Microfiltration, *Filtration & Separation*, **23** (Nov. 1986) 347
- MINCHEVA NILSSON, L., HAMMARSTRÖM, M.L., JUTO, P., HAMMARSTRÖM, S., Human milk contains proteins that stimulate and suppress T-lymphocyte proliferation, *Clin. Exp. Immunol.*, **79** (1990) 463
- MITCHELL, I.R., SMITHERS, G.W., DIONYSIUS, D.A., GRIEVE, P.A., REGESTER, G.O., JAMES, E.A., Extraction of lactoperoxidase and lactoferrin from cheese whey using membrane cation exchangers, in: Indigenous Antimicrobial Agents of Milk – Recent Developments, 1994, 89 – 95, Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium
- MIYAZAWA, K., MANTEL, C., LU, L., MORRISON, D.C., BROXMEYER, H.E., Lactoferrin-lipopolysaccharide binding to monocyte/macrophage-differentiated HL-60 cells, *J. Immunol.*, **146** (1991) 723

- MOGULEVSKY, N., RETEGUI, L.A., MASSON, P.L.**, Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes, *Biochem. J.*, **229** (1985) 353
- MONSAN, P.F.E., THILBAULT, P.A., BROSSARD, C., BRUVIER, C.S.J.**, Extraction of milk proteins and manufacture of pharmaceutical products, German Patent DE 3,623,474, 1987
- MOSTERT, J.F., ROBERTS, J.J.**, Whey and whey powders, in: Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, Ed.: R. Macrae, R.K. Robinson, M.J. Sadler, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1993, Vol. 7, 4888 - 4908
- MULDER, M.**, Basic Principles of Membrane Technology, Kluwer Academic Publishers, 2. edition, 1996
- MÜNSTERMANN, Y.**, Optimierung gelelektrophoretischer Methoden zur Analytik von Milchproteinen, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1998
- NELSON, R.W., MCLEAN, M.A., HUTCHENS, T.W.**, Quantitative Determination of Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 1408
- NISBET, T.J.**, Observations on the Fouling of Polysulphone Ultrafiltration Membranes by Acid Whey, *New Zealand J. Dairy Sci. and Technol.*, **16** (1981) 113
- OKONOJI, S., TOMITA, M., TOMIMURA, T., TAMURA, Y., MIZOTA, T.**, Process for producing bovine lactoferrin in high purity, U.S. patent 4,791,193, 1988
- PAFYLIAS, I., CHERYAN, M., MEHAIA, M.A., SAGLAM, N.**, Microfiltration of milk with ceramic membranes, *Food Res. International*, **29(2)** (1996) 141
- PAHUD, J.J., HILPERT, H.**, Affinity Chromatography of Lactoferrin on Immobilized Ferritin, *Protides Biol. Fluids*, **23** (1976) 571
- PAHUD, J.J., MONTI, J.C., JOST, R.**, Allergenicity of whey protein: Its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **4** (1985) 408
- PATENT COOPERATION TREATY, PCT WO 93/02098**; Isolation of charged particles from fluids, 1993
- PATENT COOPERATION TREATY, PCT WO 93/13676**; Process for isolating lactoferrin and lactoperoxidase from milk and milk products, and products obtained by such process, 1993
- PATENT COOPERATION TREATY, PCT WO 95/22258**, Isolation of lactoferrin from milk, 1995

- PATERSON**, G.R., **HILL**, J.P., **OTTER**, D.E., Separation of beta-lactoglobulin A, B and C variants of bovine whey using capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **700** (1995) 105
- PATIL**, G.R., **PATIL**, A.A., **GUPTA**, S.K., **RAJOR**, R.B., Manufacture of whey-soy beverages: A review, *J. Food Sci. Technol.*, **21** (1984) 340
- PEARCE**, R.J., Thermal separation of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin in bovine cheddar cheese whey, *J. Dairy Technol.*, **38** (1983) 144
- PESSEN**, H., **PUCCELL**, J.M., **FARELL JR.**, H.M., Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of the self associating globular protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **828** (1985) 1
- PLATE**, K., Untersuchung zur wachstumshemmenden Wirkung von bovinem Lactoferrin auf *Bacillus subtilis* DSM 10, Schwerpunktarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1998
- PLATE**, K., Optimierung im Downstreamprozeß zur Gewinnung von Lactoferrin und Lactoferricin, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1999
- PÜTTER**, J., **BECKER**, R., Peroxidases, in: Methods of Enzymatic Analysis, Ed.: Bergmeyer, H.U., Verlag Chemie, 3rd edition, 1983, Vol. 3, 286 – 293
- RÄIHÄ**, N.C.R., Protein quantity and quality in infant feeding, in: milk Proteins '84, 142 - 153, Proceedings of the International Congress on Milk Proteins, Luxemburg, 7 – 11 May 1984, Ed.: T.E. Galesloot, B.J. Tinbergen, Pudoc, Wageningen, 1985
- RECIO**, I., **MOLINA**, E., **RAMOS**, M., **DE FRUTOS**, M., Quantitative analysis of major whey proteins by capillary electrophoresis using uncoated capillaries, *Electrophoresis*, **16** (1995) 654
- RECIO**, I., **VISSER**, S., Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin, *J. Chromatogr. A*, **831** (1999) 191
- REHFELD**, N., **REICHELT**, D., Analytische und präparative Methoden der klinischen Biochemie, Akademie-Verlag Berlin, 2. Auflage, 1977
- REITER**, B., The biological significance and exploitation of the non-immunoglobulin protective proteins in milk: Lysozym, lactoferrin, lactoperoxidase, xanthinoxidase, *IDF Bull.*, **191** (1985) 2

- RIEHEL**, P., Entwicklung und Einsatz kapillarelektrophoretischer Methoden zur Produktkontrolle wirtschaftlich und pharmazeutisch relevanter Proteine und Wirkstoffe aus der biotechnologischen Produktion, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1998
- RIEHEL**, P., **WEIß**, T., **ULBER**, R., **BUCHHOLZ**, H., **SCHEPER**, T., Analysis of bovine lactoferrin in whey using capillary electrophoresis (CE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC), in : *Advances in Lactoferrin Research*, Ed.: G. Spik, D. Legrand, J. Mazurier, J.P. Perraudin, Plenum Press, New York, 1998, 33 - 40
- RIEDEL**, C.-L., Molke-Rohstoff für neue Produkte, *Dt. Milchwirtsch.*, **45** (1994) 174 – 179, 230 – 235, 278 - 283
- SAITO**, H., **TAKASE**, M., **TAMURA**, Y., **SHIMAMURA**, S., **TOMITA**, M., Physicochemical and antibacterial properties of lactoferrin and its hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH, in: *Lactoferrin: Structure and Function*, Ed.: T.W. Hutchens et al., Plenum Press, New York, 1994, 219
- SANCHEZ**, L., **PEIRO**, J.M., **CASTILLO**, H., **PEREZ**, M.D., **ENA**, J.M., **CALVO**, M., Kinetic Parameters for Denaturation of Bovine Milk Lactoferrin, *J. Food Sci.*, **57(4)** (1992) 873
- SCHIBLI**, D.J., **HWANG**, P.M., **VOGEL**, H.J., The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles, *FEBS Letters*, **446** (1999) 213
- SCHLIMME**, E., **BUCHHEIM**, W., *Milch und ihre Inhaltsstoffe. Chemische und physikalische Grundlagen*, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, 1995
- SCHOPPE**, I., **BARTH**, C.A., **HAGEMEISTER**, H., The nutritive value of bovine lactoferrin, in: *Milk Proteins. Nutrition, Clinical, Functional and Technological Aspects*, 108 – 109, Ed.: S.A. Barth, E. Schlimme, Steinkopff Verlag, Darmstadt und Springer-Verlag, New York, 1989
- SCOPES**, R.K., *Protein Purification*, Springer Verlag, 3. Auflage, 1994
- SCOTT**, G.H., **LUCAS**, D.O., Immunologically active whey fraction and recovery process, U.S. patent 4,834,974, 1989
- SHERWOOD**, R.K., **PIGFORD**, R.F., **WILKE**, C.R., *Mass Transfer*, McGraw-Hill, New York, 1975
- SHIMAZAKI**, K., **TAZUME**, T., **UJI**, K., **TANAKA**, M., **KUMURA**, H., **MIKAWA**, K., **SHIMO-OKA**, T., Properties of a Heparin-binding Peptide Derived from Bovine Lactoferrin, *J. Dairy Sci.*, **81** (1998) 2841

- SHIMAZAKI, K., NISHIO, M., KAWANO, N.**, Separation of biologically active proteins from whey, *Japanese J. Dairy Food Sci.*, **37(2)** (1988) 45
- SHIMAZAKI, K.-I., NISHIO, N.**, Interacting Properties of Bovine Lactoferrin with Immobilized Cibacron Blue F3GA in Column Chromatography, *J. Dairy Sci.*, **74** (1991) 404
- SIENKIEWICZ, T., RIEDEL, C.-L.**, Whey and Whey Utilization, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, 2. bearbeitete und erweiterte Auflage, 1990
- SIEMENSAM, A.D., WICKER, J.W., BAK, H.J.**, The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formula, *Trends Food Sci. Technol.*, **4** (1993) 16
- SMITHERS, G.W., MCINTOSH, G.H., REGESTER, G.O., JOHNSON, M.A., ROYLE, P.J., LE LEU, R.K., JELEN, P.**, Anti-cancer effects of dietary whey proteins, International Whey Conference, Rosemont, 1997
- STEINMANN, V.**, Entwicklung von Analysenverfahren für Molkeproteine über Membranadsorber am Beispiel von Lactoferrin, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1997
- STUEBER, D.**, laufende Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1999
- STRYER, L.**, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage, 1991
- TINTEMANN, C.**, Untersuchung zur antimikrobiellen Wirkung von Bovine Lactoferrin, Schwerpunktarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1998
- TOMITA, M.**, Biological functions of lactoferrin: Basic research and applications, Informationsblatt der Morinaga Milk Industry Co. Ltd (Japan), 1997
- TOMITA, M., TAKASE, M., WAKABAYASHI, H., BELLAMY, W.**, Antimicrobial Peptides of Lactoferrin, in: Lactoferrin: Structure and Function, Ed.: T.W. Hutchens et al., Plenum Press, New York, 1994
- TREYBAL, R.E.**, Mass Transfer Operations, McGraw-Hill, New York, 1981
- VOJNOVIC, V., RITZ, M., VAHCIC, N.**, Sensory evaluation of whey-based fruit beverages, *Nahrung*, **37** (1993) 246
- WALDEN, M.**, Untersuchung zur biologischen Aktivität von bovinem Lactoferrin, Schwerpunktarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1998

- WALDEN**, M., Aufbau einer Qualitätskontrolle für die isolierten Molkeproteine Lactoferrin und Lactoperoxidase, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1999
- WEINBERG**, E.D., Iron and Infection, *Microbiol. Reviews*, **42** (1978) 45
- WENTEN**, I.G., Mechanisms and Control of Fouling in Crossflow Microfiltration, *Filtration & Separation*, **23(3)** (1995) 253
- WENZEL**, H., EPELT, S., SPLITT, S., SWOBODNIK, W., WECHSLER, J.G., DITSCHUNEIT, H., Ergebnisse der Adipositasbehandlung mit eiweißangereicherter Molke, *Akt. Ernährungsmed.*, **11** (1986) 71
- WONG**, N.P., Fundamentals of Dairy Chemistry, Van Nostrand Reinhold, New York, 3rd edition, 1988
- WONG**, CH.W., WATSON, D.L., Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice, *J. Dairy Res.*, **62** (1995) 359
- WÜNSCH**, G., Optische Analysenmethoden zur Bestimmung anorganischer Stoffe, de Gruyter, Berlin, 1976
- YOSHIDA**, S., Preparation of lactoferrin by hydrophobic interaction chromatography from milk acid whey, *J. Dairy Sci.*, **72** (1989) 1446
- YOSHIDA**, S., YE-XIUYUN, Isolation of Lactoperoxidase and Lactoferrins from Bovine Milk Acid Whey by Carboxymethyl Cation Exchange Chromatography, *J. Dairy Sci.*, **74** (1991A) 1439
- YOSHIDA**, S., YE-XIUYUN, Isolation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine milk rennet whey and acid whey by sulphopropyl cation-exchange chromatography, *Neth. Milk Dairy J.*, **45** (1991B) 273
- ZADOW**, J.G., Whey and Lactose Processing, Elsevier Applied Science, London, New York, 1992
- ZIETLOW**, M.F., ETZEL, M.R., Evaluation of sulfopropyl ion-exchange membrane cartridges for isolation of proteins from bovine whey, *J. Liq. Chromatogr.*, **18(5)** (1995) 1001