

**Prozessdesign, Prozessoptimierung und scale up
am Beispiel des
industriell relevanten Enzyms Formiatdehydrogenase aus *E. coli***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ute Reichert

aus Hagen

Mai 2002

Referent: Frau Prof. Dr. Kula

Co-Referent: Herr Prof. Dr. Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2002

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungen

Formelübersicht

Symbole

Geräte und Chemikalien

1.	Einleitung	1
2.	Aufgabenstellung, Ziel der Arbeit	3
3.	Theoretische Grundlagen	4
3.1	Co-Faktorregenerierung mittels Formiatdehydrogenase (FDH)	4
3.2	Aufreinigung der FDH aus <i>Candida boidinii</i>	5
3.3.	Prozessdesign	6
3.3.1	Zellaufschluss	6
3.3.2.	Fest-Flüssigtrennung	7
3.3.2.1.	Charakterisierung des Feststoffanteils	7
3.3.2.2.	Sedimentation und Zentrifugation	7
3.3.2.3	Filtration	8
3.3.2.4	Flokkulation	9
3.3.3.	Erster Aufreinigungsschritt	9
3.3.3.1.	Chromatographische Verfahren	9
3.3.3.1.1.	Adsorption und Desorption	10
3.3.3.1.2.	Elektrostatische Wechselwirkungen	11
3.3.3.1.3.	Ionenaustauschchromatographie	12
3.3.3.1.4.	Membranionenaustauscher	13
3.3.3.1.5.	Affinitätschromatographie und pseudo Affinitätschromatographie	15
3.3.3.1.6.	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	15
3.3.3.2.	Integrative Verfahren	16
3.3.3.2.1.	Adsorption im expandierten, ideal klassierten Bett	16

3.4	Prozessoptimierung eines Fließbettprozesses	17
3.4.1.	Adsorberscreening	18
3.4.2	Adsorptionsisothermen	19
3.4.3.	Biomasse Adsorber Interaktion	20
3.4.4	Bestimmung der Verweilzeitverteilung (RTD)	22
3.4.5	Bettexpansion beim Auftrag biomasse haltiger Lösungen	26
3.4.6	Durchbruchskurve zur Bestimmung der dynamischen Kapazität und des Diffusionsmechanismus	27
3.5	Konfocale Laserscanning Mikroskopie	30
4.	Material und Methoden	32
4.1	Fermentation des rekombinanten <i>e.coli</i> JM 105	32
4.2	Zellaufschluß	32
4.2.1	Ultraschallaufschluß	32
4.2.2	Desintegrator oder Kugelmühlenaufschluß	33
4.3	Analytische Methoden	33
4.3.1.	FDH Aktivitätsbestimmung	33
4.3.2	Gesamtproteinbestimmung	34
4.3.3	DNA-Konzentrationsbestimmung mit Pico Green	34
4.3.4.	SDS-Gelelektrophorese	35
4.4	Polyethylenimin zur Flokkulation des <i>E. coli</i> Homogenats	35
4.5	Benzonasebehandlung des Homogenats	35
4.6	Kopplung des Farbstoffliganden (Procion red) an die Streamline AC-Matrix	36
4.6.1	Bestimmung der Farbstoffligandendichte	37
4.7	Stabilitätsuntersuchungen der FDH	37
4.7.1	Stabilität der FDH bei RT	37
4.7.2	pH-Stabilitätsuntersuchung der FDH	37
4.8	Chromatographische Methoden zur Prozessentwicklung	

	und –optimierung	38
4.8.1	Adsorptionskinetiken zum Adsorberscreening	38
4.8.1.1	Bestimmung der Bindungsbedingungen für die HIC	39
4.8.2	Biomasse-Adsorberinteraktions Bestimmung mittels Puls-Antwort Experiment	39
4.8.3	Aufnahme von Adsorptionsisothermen	40
4.8.4	RTD-Messung	40
4.8.5	Bettexpansion	41
4.8.6	Durchbruchskurven	41
4.8.7	Optimierung der Elutionsbedingungen	42
4.9	Adsorptionsisothermen an der Phenylsepharose	42
4.9.1	Durchbruchskurve der FDH auf der Phenylsepharose	43
4.10	Methoden zur Konfokalmikroskopie	43
4.10.1	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	43
4.10.2	Fluoreszenzmarkierung der Membran	44
4.10.3	Bindung der fluoreszenzmarkierten Proteine an der Membran	44
4.10.4	Präparation der Membran	45
4.10.5	Proteinadsorption am Streamline Red Adsorber	45
4.11	Viskositätsbestimmung	45
5.	Ergebnisse und Diskussion	46
5.1	Vorversuche zur FDH	46
5.1.1	Ultraschallaufschluß der FDH exprimierenden <i>E. coli</i> Zellen	46
5.1.2	Bestimmung der kritischen Ammoniunsulfatkonzentration	47
5.2	Fed batch Hochzelldichte Fermentation des rekombinanten <i>E. coli</i> JM 105 C23S Mutante	48
5.3	Prozessentwicklung und –optimierung	49
5.3.1	Prozessrelevante Stabilitäten der FDH	49
5.3.1.1	FDH Stabilität bei Raumtemperatur	49
5.3.1.2	pH-Stabilität der FDH	50

5.3.2	Fest-Flüssigtrennung unterstützt durch eine PEI-Flokkulation	51
5.3.2.1	Partikelgrößenverteilung vor und nach Zugabe von PEI	51
5.3.2.2	DNA-Abreicherung bei der PEI-Flokkulation	55
5.3.3	EBA-Prozess Entwicklung und Optimierung	57
5.3.3.2	Biomasse-Adsorber Interaktion	58
5.3.3.3	Adsorptionsisothermen zur Bestimmung der Gleichgewichtskapazität	60
5.3.3.4	Festlegung des Arbeitsbereich	61
5.3.3.5	Verweilzeitverteilung	62
5.3.3.6	Bettexpansion	62
5.3.3.7	Durchbruchskurven	63
5.3.3.8	Das Arbeitsdiagramm	64
5.3.3.9	Optimierung des Waschachrittes	66
5.3.3.10	Elutionsoptimierung	66
5.3.4	Der FDH-EBA Prozess	67
5.3.4.1	scale up	69
5.3.5	Membranchromatographie als zweiter Aufreinigungsschritt	70
5.3.5.1	Durchbruchskurven: Eluat EBA auf einer Aniontauschermembran	71
5.3.5.2	Aufreinigung der FDH über ein Sartorius Anionentauschermodul	72
5.3.5	Alternative Aufreinigungsstrategien der FDH	74
5.2.5.1	Phenylsepharose	75
5.3.5.2	Adsorptionsisotherme	75
5.3.5.3	Durchbruchskurve FDH aus dem PEI Überstand auf Phenylsepharose.	76
5.2.5.3	Elutionsbedingungen HIC	76
5.3.6	Zusammenfassung: Strategien der FDH-Aufreinigung bis zur technischen Reinheit	77
5.4	Ökonomische Prozessbetrachtung und Gegenüberstellung der möglichen Aufreinigungsstrategien	79

5.5	Konfokal Laser Mikroskopie	82
5.5.1	Homogenität des Streamline Red Adsorbers	82
5.5.2	Prinzipiell Messung der Proteinbindung an Membranen mit BSA und Lysozym	84
5.5.3	FDH Bindung an einer Anionentauschermembran	85
5.5.4	Zusammenfassung Konfokale Messungen	86
6.	Zusammenfassung und Ausblick	87
8.	Anhang	
	Hochzelldichte Fermentationsmedium	
	Eichgerade zum Pico Green Test	
	Fluoreszenzfarbstoffe	
	Phasensysteme FDH-Aufreinigung	
	Kostenrechnung	
	Preisliste	

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: graphische Darstellung eines prinzipiellen Proteinaufreinigungsprozess
- Abb. 2 : schematische Darstellung der Co-Faktorregenerierung am Beispiel der FDH
- Abb. 3: Schematischer Übersicht Zellaufschlussmethoden
- Abb. 4: Schematische Gegenüberstellung der diffusiven Vorgänge im porösen Partikel im Vergleich zur Membran
- Abb. 5: schematische Darstellung der Experimente zur Prozessoptimierung und –parameter Bestimmung
- Abb. 6: Kinetik der Proteinadsorption
- Abb. 7: schematische Darstellung einer Adsorptionsisotherme
- Abb. 8: Experimentelle Anordnung des Puls Antwort Experiments zur Biomasse Adsorber Interaktion
- Abb. 9: Schematische Darstellung zweier Puls Antwort Experimente, ohne Biomasse Adsorberinteraktion $P = 1$ und starke Biomasse Adsorber Interaktion $P = 0,22$
- Abb. 10: Idealisierte Darstellung der Antwortfunktion $C(t)$ auf einen Dirac-impuls für verschiedene Reaktortypen
- Abb. 11: Schematische, graphische Darstellung des PDE Modells nach Villiermaux und Swaaij
- Abb. 12: Schematische Darstellung des Weges eines Proteins entlang des Konzentrationsgefälles in der Flüssigphase und im Partikel
- Abb. 13: Beispiel eines Arbeitsdiagramms: Effizienz des Prozesses ist aufgetragen bei unterschiedlichen sedimentierten Betthöhen gegen die lineare Fließgeschwindigkeit
- Abb. 14: schematische Darstellung des optischen Prinzips der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (Denk et al.)
- Abb. 15: Schematische Darstellung des Farbstoffliganden Reactive Red 120 an den Adsorber
- Abb. 16: schematische Darstellung zur Aufgabe eines Biomassepulses
- Abb. 17: schematischer Versuchsaufbau zur Messung der Verweilzeitverteilung
- Abb. 18: Ultraschallaufschlusskinetik einer 40% igen E.Coli Suspension, 50 mM KPi pH 7,0
- Abb. 19: fraktionierte Ammoniumsulfatfällung der FDH, klarer Homogenatüberstand (Tris/HCl pH 7,5) + Ammoniumsulfat, nach Zentrifugation 10 min 5000 rpm Aktivitätsbestimmung der FDH, als auch Gesamtproteinbestimmung

- Abb. 20: Wachstumskurve des rekombinanten E.coli JM 105 im Fed batch HZD-Medium Anfangsvolumen 10 l
- Abb. 21: Stabilitätsmessung: FDH-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei RT im Homogenatüberstand
- Abb. 22: FDH Stabilität in einem pH-Bereich von 3-12
- Abb. 23: Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von der PEI-Konzentration(Tris/HCl Puffer pH 7,5)
- Abb. 24: Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von der PEI Konzentration, 10%ig E.Coli Homogenat in 50 mM Tris Puffer pH 7,0
- Abb. 25: Die FDH-Aktivität und Gesamtproteinkonzentration bei steigender PEI-Konzentration nach Zentrifugation 4000 U/min, 5 min, im klaren Überstand
- Abb. 26: DNA-Konzentration vor und nach der PEI-Fällung (0,5%) im Überstand
- Abb. 27: Adsorptionskinetiken der Adsorber DEAE, Q-XL, Pheny, Red, Ansatz: 1 g Adsorber und 10 ml 1:3 verdünnter klarer Überstand Tris/HCl pH 7,5
- Abb. 28: Transmission der Adsorber DEAE, Q-XL, Pheny und Red mit und ohne vorheriger Benzonasebehandlung (50 mM Tris/HCl pH 7,5
- Abb. 29: Abhängigkeit der Biomasse Adsorberinteraktion von der Leitfähigkeit der Lösung
- Abb. 30: Adsorptionsisothermen für FDH an Streamline Red (50 mM Tris/HCl pH 7,5)
- Abb. 31: Adsorptionsisothermen bei steigender Leitfähigkeit der Lösung (50 mM Tris/HCl pH 7,5)
- Abb. 32: Verweilzeitverteilung im Puffer und im 15%igen Homogenat, Tracer Li⁺, 50 mM Tris/HCl pH 7,5
- Abb. 33: Expansionskurven für verschiedene Biomassekonzentrationen (50 mM Tris/HCl pH 7,5). Der Expansionsgrad n (L/L0) ist gegen die steigende
- Abb. 34: Durchbruchkurven im Festbett bei zwei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten
- Abb. 35: Arbeitsdiagramm für den FDH Prozess auf roter Sepharose
- Abb. 36: Die Unterschiedlichen Elutionen aufgetragen auf ein 12,5 % iges SDS Gel unter reduzierenden Bedingungen, Silber gefärbt.
- Abb. 37: Durchbruchkurven: Eluat Streamline Red auf Q-Membran von Sartorius, Anströmfläche von 0,78 cm (Volum entspricht 2 ml Gel)
- Abb. 38: schematischer Querschnitt des Sartorius Membranadsorber Moduls (Bild von Sartorius AG)
- Abb. 39: Schnitt in das 500 cm² Anionenaustauschermodule von Sartorius (Bild von Sartorius AG)

- Abb. 40: Adsorptionsisotherme von FDH aus dem PEI-Überstand an Phenylsepharose (1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7,5)
- Abb. 41: Durchbruchskurve FDH aus PEI Überstand auf Phenylsepharose.
(1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7,5)
- Abb. 42: Fließbilder der vier Aufreinigungsstrategien der FDH aus *E. coli*
- Abb. 43: Vergleich der Gesamt- und anteiligen Arbeitskosten zur Aufreinigung von 100000 U FDH aus *E. coli*
- Abb. 44: Selbst modifizierter roter Adsorber: Partikelschnitt und Intensitätsprofil
- Abb. 45: gleichzeitige BSA (rot) und Lysozym (blau) Bindung in 50 mM Acetat Puffer pH 5,0 an Sartobind S (Sartorius) mit Membranskelettfärbung (grün) im Gleichgewicht
- Abb. 46: Bindung der FDH an Sartobind Q (Anionentauschmembran Sartorius), 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 im Gleichgewicht

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:* Pipettierschema des volumetrischen FDH-Aktivitätstests
- Tab. 2:* Adsorber und gewählte Bindungsbedingungen zur Adsorptionskinetikmessung
- Tab. 3:* Daten und Ergebnisse der rekombinanten *E. coli* Kultivierung nach der PEI Fällung (50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,0)
- Tab. 5:* Zusammenfassung der DNA-Konzentrationsbestimmung vor und nach der PEI-Fällung (0,5%) bei wechselnder Leitfähigkeit und sinkender Biomassekonzentration, Doppelbestimmungen
- Tab. 6:* Aus den Bindungskinetiken geschätzte Gleichgewichtskapazitäten der untersuchten Adsorber
- Tab. 7:* maximale Gleichgewichtskapazität und K_a -Wert für eine Adsorptionsisotherme von FDH an Streamline© Red mit und ohne Biomasse
- Tab. 8:* Zusammenfassung der Elutionsexperimente
- Tab. 9:* Zusammenfassung der 19L Homogenataufreinigung
- Tab. 10:* Ergebnisse eines Laufes EBA-Eluat auf Sartobind© Q Membranionenaustauscher
- Tab. 11:* Übersicht und Vergleich der möglichen FDH Aufreinigungswege nach Zellaufschluß
- Tab. 12:* Produktionskosten für 1U FDH aus *E. coli*

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
BSA	Rinderserum Albumin
CIP	Cleaning in place
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonucleicacid
EBA	Expanded bed adsorption
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiminotetraacetat
Et al.	und andere
EtOH	Ethanol
eq	Gleichgewicht
FDH	Formiatdehydrogenase
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	High performance liquid chromatography
HZD	Hochzelldichte
IPTG	β -D-Isopropylthiogalaktosid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
min	Minuten
mM	millimolar
NAD	Nikotionamid-adenin-dinuclotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotionamid-adenin-dinuclotid (reduzierte Form)
n. m.	nicht meßbar
OD	Optische Dichte
OH-Gruppen	Hydroxidgruppen
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
pH-Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Q-XL	Quarternary Aminomethyl
upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtempereatur

RTD	Residence time distribution, Verweilzeitverteilung
pI	Isoelektrischer Punkt
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat- (polyacrylamid-) Gelelektrophorese
-SH	Sulfhydrylgruppe
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
w/w	Weight per weight (Gewichtsprozent)
w/v	Weight per volume (Volumenprozent)

Formelübersicht

Sedimentation und Zentrifugation

Sinkgeschwindigkeit

$$[1] \quad w_{fg} = \frac{1}{18} * \frac{\Delta \delta * d_p^2}{\eta} * g$$

$\Delta \delta$: Dichteunterschied [$\text{kg} * \text{m}^{-3}$]
 d_p : Partikeldurchmesser [m]
 η : dynamische Viskosität der Flüssigkeit [$\text{n} * \text{s} * \text{m}^{-2}$]
 g : Erdbeschleunigung [$\text{m} * \text{s}^{-2}$]

Proportionalitätsfaktor

$$[2] \quad z = \frac{r * \omega^2}{g}$$

r : Radius [m]
 ω : Winkelgeschwindigkeit [s^{-1}]
 g : Erdbeschleunigung [$\text{m} * \text{s}^{-2}$]

Absetzgeschwindigkeit

$$[3] \quad W_{fz} = \frac{1}{18} * \frac{\Delta \delta * d_p^2}{\eta} * r * \omega^2$$

Kritischer Partikeldurchmesser

$$[4] \quad d_c = \sqrt{\frac{1}{18 * \frac{\eta}{\Delta \delta * g} * \frac{1}{z_a} * \frac{dV/dt}{A_s}}}$$

d_c : kritischer Partikeldurchmesser [m]
 dV/dt : Volumenstrom [$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$]
 z_a : maximaler Beschleunigungsfaktor
 A_s : Klärfläche [m^2]

Adsorption und Desorption/ elektrostatische Wechselwirkungen

Adsorptionsisotherme nach Langmuir

$$[5] \quad Q = \frac{Q_{\max} K_A C}{1 + K_A C}$$

Q_{\max} : Beladung [mg/ml]
 K_A : Adsorptionskonstante [mg/ml]
 C : Flüssigphasenkonzentration [mg/ml]

elektrisches Potential

$$[6] \quad \Delta\varphi = \frac{d Q}{\epsilon_0 \epsilon_I A}$$

ϵ_0 = elektrische Feldstärke
 ϵ_I = Dielektrizitätskonstante

Expanded Bed Chromatographie

Durchtrittszahl

$$[7] \quad P = \frac{A_{\text{Pulsantwort}}}{A_{\text{Aufgabepuls}}}$$

A: Fläche

Transmission

$$[8] \quad Tr = P * 100$$

Van Deemter Gleichung

$$[9] \quad H = B_1 d + B_2/v + B_3 d^2 v$$

H = Höhe einer theoretischen Stufe
B = Konstanten
d = Partikeldurchmesser
v = Strömungsgeschwindigkeit

Verweilzeit

$$[10] \quad \tau = \frac{L_R}{dV/dt} = \frac{L_R}{U}$$

L_R : Reaktorlänge [cm]
 dV/dt : Volumenstrom [l/h]
U: lineare Fluidgeschwindigkeit [cm/h]

Bodensteinzahl

$$[11] \quad Bo = \frac{U L_R}{D_{axl}} = \frac{\text{erzwungener Stoffstrom}}{\text{axiale Dispersion}}$$

U: lineare Fließgeschwindigkeit [cm/h]
 L_R : Länge des Reaktors [cm]
 D_{axl} : Axialer Dispersionskoeffizient
d: Durchmesser des Reaktors [cm]

Péclet-Zahl

$$[12] \quad Pe = \frac{U d}{D_{axl}} = Bo \frac{d}{L_R}$$

Axialer Dispersionskoeffizient

$$[13] \quad D_{axl} = \frac{\eta}{\rho_l \cdot \text{Re}_{mf}} \cdot \frac{\text{Re}^2}{0,2 + 0,011 \cdot \text{Re}^{0,48}}$$

$$\text{Mit: } \text{Re}_{mf} = \left[(33,7)^2 + 0,0408 \cdot \frac{d_p^3 \cdot \rho_l \cdot (\rho_s - \rho_l) \cdot g}{\eta^2} \right]^{1/2} - 33,7$$

Re: Reynoldsche Zahl
 ε : Hohlraumanteil eines Fließbetts
 ρ : Dichte [kg/m³]
 η : dynamische Viskosität [kg/(m·s)]

$$[15] \quad D_{axl} = \frac{U \cdot d_p}{0,23 \cdot \left(\frac{\rho_p}{\rho_l} \right)^{-2,673} \cdot \varepsilon^{-2,467}}$$

PDE-Model

$$[16] \quad C(s) = \frac{\sqrt{Bo} \cdot \exp\left(\frac{Bo}{2}\right) \cdot \exp\left[-\sqrt{Bo \cdot \alpha} \cdot \sqrt{s + \frac{N}{\alpha} + \frac{Bo \cdot \alpha}{4} - \frac{N^2 \cdot (1-\alpha)}{\alpha}}\right]}{\frac{\sqrt{Bo}}{2} + \sqrt{\alpha} \cdot \sqrt{s + \frac{N}{\alpha} + \frac{Bo \cdot \alpha}{4} - \frac{N^2 \cdot (1-\alpha)}{\alpha}}}$$

Expansion nach Richardson und Zaki

$$[17] \quad U = U_t \cdot \varepsilon^n$$

$$[18] \quad \frac{L}{L_0} = \frac{(1-\varepsilon_0)}{1 - \left(\frac{U}{U_t}\right)^{\frac{1}{n}}}$$

Berechnung einer Durchbruchskurve

$$[19] \quad T = 1 + \left(\frac{1}{N_p} + \frac{1}{N_f} \right) \left(\frac{\Phi(X) + \frac{N_p}{N_f} \cdot (LN(X) + 1)}{\frac{N_p}{N_f} + 1} \right)$$

$$[20] \quad \Phi(X) \cong 2.39 - 3.59\sqrt{1-X}$$

$$[21] \quad N_p = \frac{15 \cdot D_e \cdot L_0 \cdot (1 - \varepsilon_0)}{U \cdot r_p^2}$$

$$[22] \quad N_f = \frac{3 \cdot k_f \cdot L \cdot (1 - \varepsilon)}{r_p \cdot U}$$

$$[23] \quad T = \frac{V_{brk} \cdot C_0}{Q_{eq} \cdot V_s}$$

Flüssigkeitsseitiger Transportkoeffizient

$$[24] \quad k_f = \frac{D}{d_p} \cdot \left[\frac{2\zeta + \left\{ \frac{2\zeta^2 \cdot (1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}}}{\left[1 - (1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}}\right]^2} - 2 \right\} \cdot \tanh(\zeta)}{\frac{\zeta}{1 - (1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}}} - \tanh(\zeta)} \right]$$

mit

$$[25] \quad \zeta = \left[\frac{1}{(1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}}} - 1 \right] \cdot \frac{\gamma}{2} \cdot \text{Re}_p^{\frac{1}{2}} \cdot \text{Sc}^{\frac{1}{3}} \quad \text{Re}_p = \frac{U \cdot d_p \cdot \rho_l}{\eta} \quad \text{Sc} = \frac{\eta}{D \cdot \rho_l}$$

Symbole

Kultivierung

μ :	spez. Wachstumsgeschwindigkeit	[h ⁻¹]
x:	Biotrockenmasse	[kg/l]
x ₀ :	Biotrockenmasse zum Zeitpunkt t=0	
t:	Kultivierungsdauer	[h]

Sedimentation und Zentrifugation

$\Delta\delta$:	Dichteunterschied	[kg * m ⁻³]
d _p :	Partikeldurchmesser	[m]
η :	dynamische Viskosität der Flüssigkeit	[n * s * m ⁻²]
g:	Erdbeschleunigung	[m * s ⁻²]
r:	Radius	[m]
ω :	Winkelgeschwindigkeit	[s ⁻¹]
g:	Erdbeschleunigung	[m * s ⁻²]
d _c :	kritischer Partikeldurchmesser	[m]
dV/dt:	Volumenstrom	[m ³ s ⁻¹]
z _a :	maximaler Beschleunigungsfaktor	
A _s	Klärfläche	[m ²]

Adsorption und Desorption

Q _{max} :	Beladung	[mg/ml]
K _A :	Adsorptionskonstante	[mg/ml]
C:	Flüssigphasenkonzentration	[mg/ml]
ϵ_0 :	elektrische Feldstärke	
ϵ_f :	Dielektrizitätskonstante	

enzymatischer Test

ΔE :	Extinktionssänderung bei 340 nm	[min ⁻¹]
V:	Testvolumen	[ml]
ϵ :	molarer Extinktionskoeffizient für NADH	(6,22 [l * mmol ⁻¹ * cm ⁻¹])
d:	Schichtdicke der Küvette	[cm]
v:	Probenvolumen	[ml]
f:	Verdünnungsfaktor der Enzymlösung	

Expanded Bed Adsorption, Prozess Design

A	spezifische Oberfläche	[m ² /m ³]
A _p	äußere Oberfläche eines Adsorberpartkels	[m ²]
C	Konzentration	[kg/m ³]
C _{aus}	Austrittskonzentration	[kg/m ³]
C ₀	Zulaufkonzentration	[kg/m ³]
C _f	Konzentration in der mobilen Phase	[kg/m ³]
C _p	Porenkonzentration	[kg/m ³]
C _{p,r=rp}	Konzentration am Kornrand	[kg/m ³]
d _c	Säulendurchmesser	[m]
d _p	Partikeldurchmesser	[m]
d _{pm}	mittlerer Partikeldurchmesser	[m]
d _{pmin}	Durchmesser des kleinsten Partikels einer Verteilung	[m]
d _{pmax}	Durchmesser des größten Partikels einer Verteilung	[m]
D	Diffusionskoeffizient in freier Lösung	[m ² /s]
D _{axl}	axialer Dispersionskoeffizient der flüssigen Phase	[m ² /s]
D _{axp}	axialer Dispersionskoeffizient der festen Phase	[m ² /s]
D _{Ob}	apparenter Oberflächendiffusionskoeffizient	[m ² /s]
D _p	apparenter Porendiffusionskoeffizient	[m ² /s]
D _s	apparenter Feststoffdiffusionskoeffizient	[m ² /s]
DL	Durchsatzleistung	[kg/s]
DL _v	volumetrische Durchsatzleistung	[m ³ /s]
F	volumetrische Fließgeschwindigkeit	[m ³ /s]

g	Gravitationskonstante	[m ² /s]
H	Höhe einer theoretischen Stufe	
J	Flux	[kg/(m ² ·s)]
k _f	Stoffübergangskoeffizient	[m/s]
K _A	Langmuir-Konstante	[m ³ /kg]
K _r	Kennzahl der Adsorptionsreaktion	
L	Länge des Adsorberbetts	[m]
L ₀	Länge des abgesetzten Adsorberbetts	[m]
M _r	Molekulargewicht	[kg/mol]
n	Expansionsindex	
N	Stofftransportkennzahl im PDE Modell	
N _{lim}	limitierende Stofftransportkennzahl	
P	Dimensionslose Durchtrittszahl	$P = \frac{A_{\text{Pulsantwort}}}{A_{\text{Aufgabepuls}}}$
Q	Kapazität (Konzentration in der stationären Phase)	[kg/m ³]
Q _{Db}	Durchbruchkapazität (bei 10 % Durchbruch)	[kg/m ³]
Q _{Gl}	Gleichgewichtskapazität	[kg/m ³]
Q _{max}	Maximale Kapazität	[kg/m ³]
r _c	Radius der inneren Schale beim Schalenadsorber	[m]
r _p	Kornradius	[m]
R*	Gleichgewichtsparameter	
s	Laplace Variable	
t	Zeit	[s]
T _a	absolute Temperatur	[K]
Tr	Transmission	Tr = P * 100

U_{mf}	Minimale Fluidisierungsgeschwindigkeit einer monodispersen Schüttung	[m/s]
U	lineare Fluidgeschwindigkeit	[m/s]
U_t	freie Sinkgeschwindigkeit	[m/s]
U_{tf}	Minimale Fluidisierungsgeschwindigkeit einer polydispersen Schüttung	[m/s]
v_s	adsorbierendes Volumen eines Schalenadsorbers	[m ³]
v_p	Gesamtvolumen eines Schalenadsorbers	[m ³]
V_l	Volumen der mobilen Phase	[m ³]
V_s	Schüttvolumen der stationären Phase	[m ³]
v	Strömungsgeschwindigkeit	[m ³ /s]
x	Ortskoordinate in Fluxrichtung	
X	dimensionslose Konzentration	C/C_0
z	Ortskoordinate in Richtung der Längsachse eines Adsorberbetts	

Griechische Formelzeichen

α	Anteil des homogen durchströmten Volumens im PDE Modell	
ε	Hohlraumanteil eines Fließbetts	
ε_0	Hohlraumanteil einer Schüttung	
ε_p	apparente innere Porosität	
κ	Transportparameter	$\frac{15 \cdot D_s \cdot (1 - \varepsilon) \cdot Q_{Gl}}{r_p^2 \cdot C_0}$
μ_1	erstes normiertes Moment der Verweilzeitverteilung	
μ_2	zweites normiertes Moment der Verweilzeitverteilung	

ρ_l	Fluiddichte	[kg/m ³]
ρ_s	Feststoffdichte	[kg/m ³]
τ	hydrodynamische Verweilzeit	[s]
Θ	dimensionslose Zeit	t/τ
η	dynamische Viskosität	[kg/(m·s)]

Dimensionslose Kennzahlen

Bo	Bodensteinzahl	$\frac{U \cdot L}{D_{axl}}$
Ga	Gallilieozahl	$\frac{\rho_l \cdot (\rho_l - \rho_s) \cdot g \cdot d_p^3}{\eta^2}$
m	Phasenverhältnis	$\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}$
N_f	Kennzahl des äußeren Transports	$\frac{3 \cdot k_f \cdot (1 - \varepsilon) \cdot L}{r_p \cdot U}$
N_p	Kennzahl des inneren Transports bei Porendiffusion	$\frac{15 \cdot D_p \cdot (1 - \varepsilon) \cdot L}{r_p^2 \cdot U}$
N_s	Kennzahl des inneren Transports bei Feststoffdiffusion	$\frac{15 \cdot D_s \cdot (1 - \varepsilon) \cdot L \cdot Q_{Gl}}{r_p^2 \cdot U \cdot C_0}$
P	Durchtrittszahl beim Puls/Antwort-Experiment nach Kap. 6 (Gl. 48)	
Pe	Peclet-Zahl	$\frac{U \cdot L}{D_{axl}}$
Re_p	Kornreynoldszahl	$\frac{U \cdot d_p \cdot \rho}{\eta}$
Re_{mf}	Kornreynoldszahl bei Mindestfluidisierung	$\frac{U_{mf} \cdot d_p \cdot \rho}{\eta}$
Sc	Schmidt Zahl	$\frac{\eta}{D \cdot \rho_l}$

Sh	Sherwood Zahl	$\frac{k_f \cdot D}{d}$
T	dimensionsloser Durchsatz	$\frac{(V_l - \varepsilon \cdot V_s) \cdot C_0}{Q_{Gl} \cdot V_s}$
κ	Transportparameter	$\frac{15 \cdot D_s \cdot (1 - \varepsilon) \cdot Q_{Gl}}{r_p^2 \cdot C_0}$
μ_1	erstes normiertes Moment der Verweilzeitverteilung	
μ_2	zweites normiertes Moment der Verweilzeitverteilung	
ρ_l	Fluidichte	kg/m ³
ρ_s	Feststoffdichte	kg/m ³
τ	hydrodynamische Verweilzeit	s
Θ	dimensionslose Zeit	t/ τ
η	dynamische Viskosität	kg/(m·s)

Sonstige Symbole und Indizes

$0, \infty$	Umgebungs-, Ausgangszustände
dyn	dynamisch
eff	effektiv
equi	Im Gleichgewicht
θ	Belegungsgrad
\emptyset	Durchmesser

Verwendete Geräte und Chemikalien

Äkta explorer	(Amersham Bioscience)
Äkta purifier	(Amersham Bioscience)
Casy Coulter Counter	(Amersham Bioscience)
Disintegrator	(IMA)
Fermenter 20L	(Braun)
Fluoreszenzphotometer Optiplex 6*110	(Varian)
FPLC Säule 0,5 cm Ø	(Amersham Bioscience)
Ionenselektive Elektrode	(WTW)
Konfokalmikroskop Leica TCS SP	(Zeiss)
Kugelmühle	(Netzsch)
Leitfähigkeitsmeßgerät LF 538	(WTW)
Membranmodul Sartobind Q 100	(Sartorius)
pH-Meter	(Knick)
Protein-Elektrophoresekammer	(Biorad)
Sartobind Q Membran	(Sartorius)
Sartobind S Membran	(Sartorius)
Schlauchpumpe	(Watson Marlow)
Schlauchpumpe Minipuls	(Abimed)
Schüttler Cerbomat MO	(Braun)
Streamline 20 Säule	(Amersham Bioscience)
Streamline 200 Säule	(Amersham Bioscience)
Tischzentrifuge 5415 C	(Eppendorf)
Überkopfschüttler	(Heidolph)
UV/Vis-Spektralphotometer 16 A	(Shimadzu)
UV online Messgerät	(Knauer)
Ultraschall Zellaufschlußgerät	
Viskosimeter	(Haake)
Zentrifuge Hettich universal	(Hettich)
Zentrifuge Sorvall RC5B	(Du Pont)

Alle hier nicht explizit aufgeführten Chemikalien waren mindestens p.a. Qualität und wurde von den Firmen Fluka, Sigma, Roth oder Merck bezogen.

Die Nährmedienbestandteile waren von Merck oder Difco. Alle verwendete Adsorber stammen von (Amersham Bioscience).

Pico Green P-7581 DNA-Test (Molekular Probes)

Fluoreszenzfarbstoffe

FITC Derivat (Molekular Probes)

DTAF (Molekular Probes)

CY5 (Amersham Bioscience)

CY3 (Amersham Bioscience)

1. Einleitung

1. Einleitung

Die Anfänge der Biotechnologie reichen bis weit vor Beginn der christlichen Zeitrechnung zurück, doch erst die Entdeckung des Penicillins (1928) durch Alexander Fleming ließ die Biotechnologie zu einer interessanten Wissenschaft in unserem Zeitalter werden.

Heutzutage ist die Biotechnologie in vielen Bereichen der Chemie, Pharmazie, Medizin und der Nahrungsmittelindustrie angesiedelt. Eines dieser Gebiete stellt die Verwendung von Enzymen als alternative Katalysatoren bei organischen Synthesen dar (Jones 1986, Uhlig 1991).

Die Produktion dieser biochemischen Katalysatoren erfolgt häufig durch Kultivierung rekombinanter Zellen, wobei *E. coli* das am häufigsten verwendete Expressionssystem darstellt (Hanahan 1983). Um in der eigentlichen Reaktion eingesetzt werden zu können, müssen die benötigten Enzyme aus der Kulturbrühe oder dem Zellhomogenat aufgereinigt werden (Kula 1984).

Da es keine universelle Aufreinigungsstrategie für Proteine gibt, ist für jedes Zielprotein ein neuer Aufreinigungsprozess zu entwickeln, wobei die einzelnen Reinigungsschritte logisch aufeinander abgestimmt sein sollten, um sowohl die Effizienz zu maximieren als auch die Kosten zu minimieren. Mathematische Modelle unterstützen hierbei und können die experimentelle Arbeit reduzieren (Cowan et al. 1989, Helfferich 1990, Bellot und Condoret 1991).

Der klassische Proteinaufreinigungsprozess bei interzellulären Produkten besteht aus Zellaufschluss, gefolgt von einer Fest-Flüssigtrennung, sowie von chromatographischen Grob- und Feinreinigung. Der erste Schritt der Grobreinigung ist ein Aufreinigungs- und Konzentrierungsschritt. Sowohl Grob- als auch Feinreinigung können aus diversen Chromatographie- oder Fällungsschritten bestehen. (s. Abb. 1)

1. Einleitung

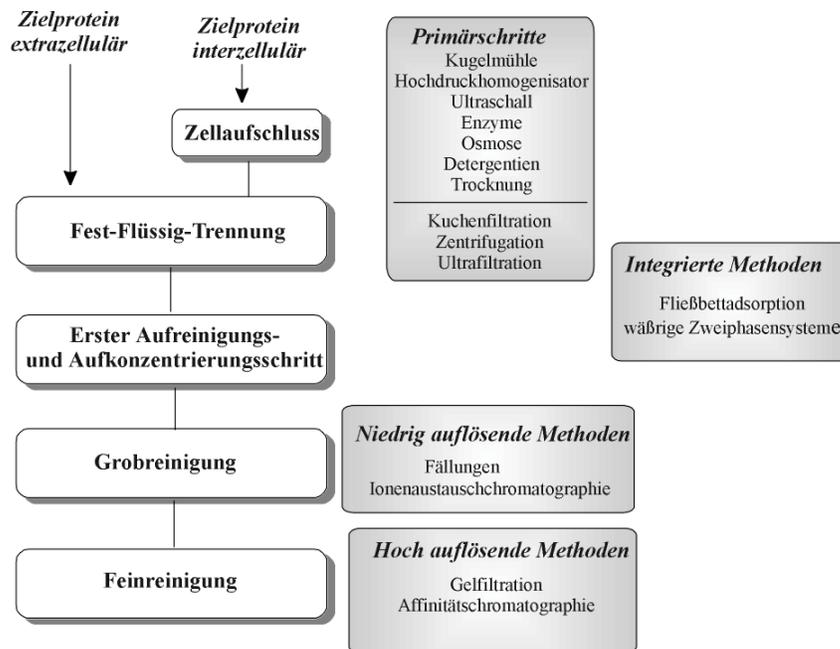


Abb. 1: graphische Darstellung eines prinzipiellen Proteinaufreinigungsprozess

Die Schritte dieses allgemeinen Aufreinigungsschemas können durch Hilfsmittel, wie z. B. Flokkulierungsmittel, oder wäßrige Zweiphasensysteme bei der Fest-Flüssig Trennung, oder neue Methoden wie die Expanded Bed Chromatographie (EBA), die Schritte miteinander kombinieren, ergänzt oder verkürzt werden (Milburn et al 1990, Kula, M.-R 1988, Chase 1994). Ein möglichst kurzer, aus wenigen Schritten bestehender, Aufreinigungsprozess ist sowohl effizient, als auch ökonomisch. Ziel der Prozessentwicklung sollte es daher sein ein Zielprotein mit möglichst wenigen, logisch aufeinander aufbauenden Schritten, in kurzer Zeit bis zum gewünschten Reinheitsgrad zu isolieren. Die problemlose Maßstabsvergrößerung (scale up) sollte hierbei Voraussetzung sein.

Downstream Processing ist somit ein Gebiet, das für die biotechnologische Industrie immer mehr an Bedeutung gewinnt (Kula et al 1984). Die Kosten zur Proteinaufreinigung können abhängig von der gewünschten Reinheit des Produktes bis zu 90 % des gesamten Produktionsprozesses betragen (Weatherley 1994)

2. Aufgabenstellung

2. Aufgabenstellung, Ziel der Arbeit

Am Institut für Enzymtechnologie wurde die Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* in *E. coli* kloniert und mittels gerichteter Mutagenese in ihrer Prozessstabilität verbessert (Slusarczyk et al (1997/1998)). Dieses Enzym dient universell zur in situ Co-Faktor Regenerierung bei enzymatischen Reduktionen (s. Abschnitt 3.1). Die Eigenschaft der FDH, zur Regenerierung von NAD^+ zu NADH , ermöglicht es dieses Enzym als Co-Faktorregnerator bei NADH benötigenden, enzymatischen Reaktionen einzusetzen. Bei der Degussa Hüls AG (Hanau) wurde die FDH bereits zur Kofaktorregenerierung bei der enzymatischen Synthese von Leucin erfolgreich eingesetzt. Die leichte Zugänglichkeit des Enzyms, durch Klonierung in *E. coli*, ist eine gute Voraussetzung für weitere Einsatzmöglichkeiten der FDH, hinzu kommt der niedrige Preis des Formiat als Substrat.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen optimierten, effizienten und ökonomischen Aufreinigungsprozess zur Isolierung der rekombinanten FDH aus *E. coli*, zu entwickeln.

Hierzu wurden die durch die Molekularbiologie und bisherigen Aufreinigungsprotokolle gefundenen Eigenschaften der FDH, wie pH- und Temperaturstabilität, Hydrophobizität und Bindungs- sowie Elutionsbedingungen auf Anionentauschern, zugrunde gelegt (Iding 1995). Diese Basisinformationen dienten dazu, neue Ansätze und Wege in der FDH-Isolierung zu finden. Die einzelnen Schritte wie Zellaufschluss, Fest-Flüssigtrennung, Grob- und Feinreinigung mussten zunächst auf ihre Durchführbarkeit überprüft und dann optimiert werden. Auch alternative Aufreinigungsmethoden wie die Expanded Bed Adsorption (EBA) als Kombination von Fest-Flüssigtrennung und erstem Chromatographieschritt wurden hierbei berücksichtigt. Eine logische Hintereinanderreihung oder Verknüpfung der einzelnen Methoden führte zu mehreren Aufreinigungsstrategien. Ein Vergleich der möglichen Prozesse sowohl in Effizienz als auch in Ökonomie sollte durch eine Kostenkalkulation den besten Prozess aufzeigen.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Co-Faktorregenerierung mittels Formiatdehydrogenase (FDH)

Dehydrogenasen katalysieren die reduktive Aminierung von prochiralen α -Ketosäuren zu enantiomerenreinen Aminosäuren. Die Umsetzung erfolgt bei Raumtemperatur und ist stereospezifisch, Eigenschaften, welche von einer rein chemischen Reaktion nicht erfüllt würden (Kula und Wandrey 1987, Krix et al 1997).

Die L-Leucindehydrogenase und L-Phenylalanindehydrogenase fanden aus diesem Grund schon entsprechende Anwendung (Schmidt et al 1987, Hummel und Kula 1989).

Bei der Umsetzung wird jedoch ein Reduktionsäquivalente liefernder Co-Faktor in äquimolaren Mengen benötigt, der dann, nach der enzymatischen Reaktion, in seiner oxidierten Form vorliegt (Hummel et al. 1989). Um eine kontinuierliche, enzymatische Umsetzung zu gewährleisten, muß der Co-Faktor wieder reduziert werden (Kometani et al 1994, Wong und Whitesides 1981). Die Kopplung der Synthesereaktion mit einer zweiten, enzymatischen Co-Faktor Regenerierungsreaktion führt zu einem geschlossenen Kreislauf und somit zu einer kontinuierlichen Produktbildung (Wichmann et al 1987, Kragel et al 1992, Brommarius et al. 1992)

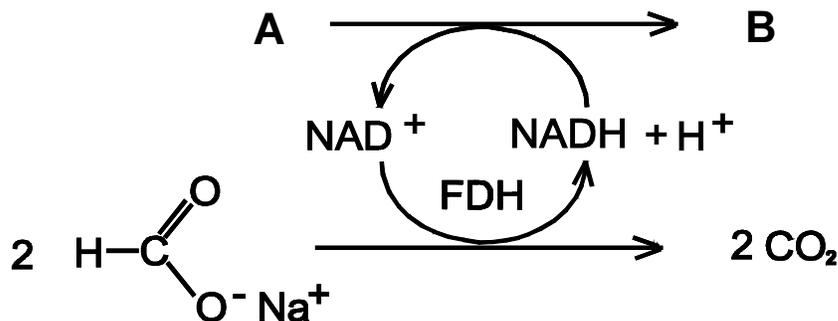


Abb. 2: schematische Darstellung der Co-Faktorregenerierung am Beispiel der FDH

Diese *in situ* Co-Faktor Regeneration ermöglicht die Produktion von Aminosäuren im industriellen Maßstab. Wandrey et al zeigten (1984) die Möglichkeit der kontinuierlichen Produktion von L-Aminosäuren im Enzym-Membran Reaktor auf. Bei der kontinuierlichen Regenerationsreaktion durch ein sekundäres Enzym ist zu bedenken, daß in der Nebenreaktion Produkte entstehen, die aus dem Reaktionsgemisch und von dem Syntheseprodukt abgetrennt werden müssen. Das Substrat der Nebenreaktion sollte möglichst leicht zugänglich und damit entsprechend billig sein, wie das einzusetzende Enzym selbst.

3. Theorie

Aus diesem Grunde bot sich die aus *Candida boidinii* isolierte Formiatdehydrogenase an (Schütte et al. 1976). Die enzymatische Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid (CO₂) mittels der Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* (Sahm 1977), bei gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH, macht dieses Enzym zur Co-Faktorregenerierung interessant (Kula und Wandrey 1987, Brommarius et al 1995). Die FDH wird intrazellulär in der methylotrophen Hefe *Candida boidinii* gebildet und kann aus den Zellen gewonnen und aufgereinigt werden (Cordes und Kula 1986, Geahel und Kula 1985, Walsdorf et al 1990). Das Produkt der Regenerationsreaktion, Kohlendioxid, reagiert, abhängig vom pH-Wert der Lösung, zum Bicarbonat oder kann leicht abgetrennt werden, was eine ständige Triebkraft der Reaktion zur Produktseite bedingt.

Um die FDH leichter zugänglich zu machen, wurde das Enzym in *E. coli* kloniert und exprimiert (Slusarczyk et al 1998, Allen und Holbrook 1995). Eine zusätzliche Optimierung des Nährmediums, sowie die Hochzelldichte-Fermentation erlauben es, in kurzer Zeit, relativ große Mengen des Enzyms zugänglich zu machen (Sahm 1977, Weuster-Botz et al, 1994, Felber 2001). Die Punktmutation einer oberflächenorientierten SH-Gruppe (AS 23) der rekombinanten FDH sollte eine höhere Prozessstabilität bewirken, um die Standzeiten im Reaktor zu verlängern und das Enzym bei der Ultrafiltration stabiler machen (Kelly und Zydney 1994, Slusarczyk et al 1997, Dikov et al. 1980)

3.2 Aufreinigung der FDH aus *Candida boidinii*

Zur Isolierung der FDH aus *Candida boidinii* wurde bereits ein Aufreinigungsprozess entwickelt und verschiedene, alternative Methoden angedacht. (Cordes und Kula 1986, Geahel und Kula 1985, Walsdorf et al. 1990, Binkele 1995). Bei dem bis dato verwendeten Aufreinigungsprozess erfolgt nach einem Zellaufschluss die Abtrennung der Zelltrümmer durch Extraktion in einem PEG/Salz Zwei-Phasensystem. Die FDH verteilt sich hier zu 90% in die PEG reiche Topphase. Ein hoher Salzgehalt im anschließenden zweiten PEG/Salz Phasensystem bedingt eine Verteilung der FDH in die Bottomphase. Um eine anschließende Ionenaustauschchromatographie zu ermöglichen, wird der Salzgehalt zunächst durch eine Diafiltration reduziert. Nach dem Ionentauscher (Q-Sepharose) erhält man die FDH zu 60 % rein mit einer ca. 75%igen Ausbeute. Der gesamte Prozess dauert 3 Tage. Die Gesamtausbeute liegt hier bei ca. 70%.

3. Theorie

3.3. Prozessdesign

Ziel des Prozessdesigns ist es, die möglichen Aufreinigungsschritte auszuwählen und miteinander zu kombinieren um eine oder mehrere alternative Aufreinigungsstrategien zu entwickeln. Ein Ökonomievergleich sollte dann zum besten Prozess führen.

3.3.1 Zellaufschluss

Die Aufreinigung intrazellulärer Produkte setzt einen effektiven Zellaufschluss voraus. Die Methode der Wahl hängt hier in erster Linie von der Art des Mikroorganismus ab. Während Zellen, ohne starke Zellwand, relativ leicht mit nicht mechanischen Methoden aufzuschließen sind, benötigt man bei stabileren, von einer komplexen Zellwand umgebenen, Zellen einen mechanischen Aufschluß (Harrison 1993). Abb. 3 gibt einen Überblick über die gängigen Verfahren.

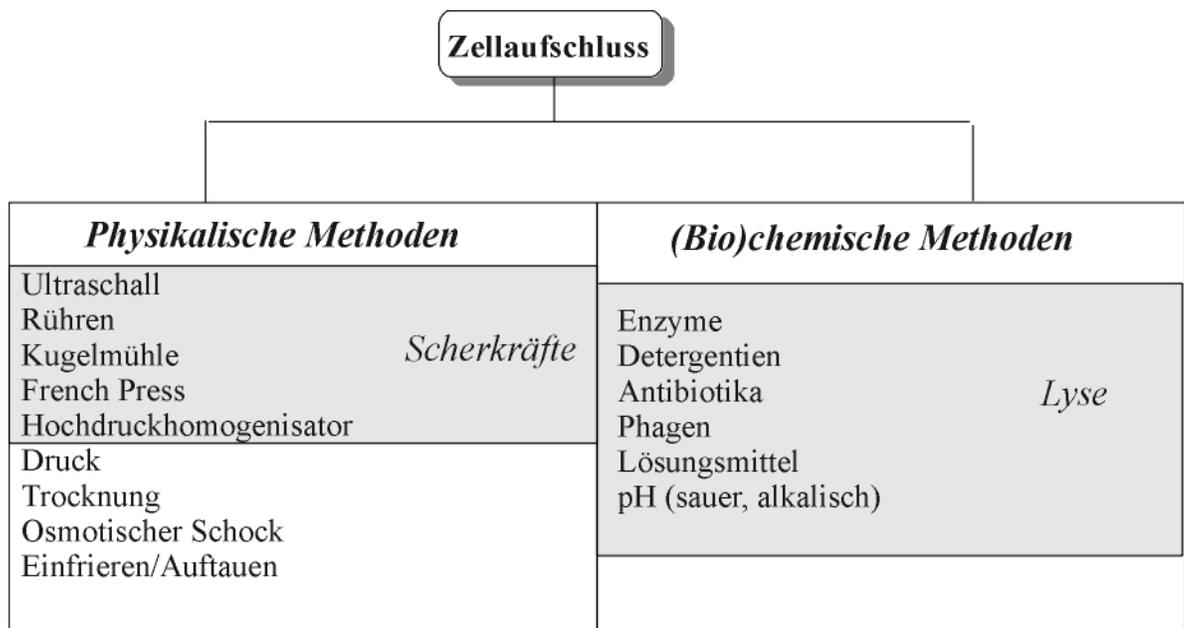


Abb.3: Schematische Übersicht Zellaufschlußmethoden

Neben der Effektivität und Kostengünstigkeit des zu wählenden Aufschlussverfahrens für einen entsprechenden Organismus, ist auch die Möglichkeit zur problemlosen Maßstabsvergrößerung entscheidend (Kula und Schütte 1987, Schütte und Kula 1990).

Die Integrität des Zielproteins sollte bei der gewählten Methode gewährleistet sein. In der Praxis wird deshalb der technische Aufschluß mit Hochdruckhomogenisator oder Rührwerkskugelmühle favorisiert (Schütte und Kula 1986).

3. Theorie

3.3.2. Fest-Flüssigtrennung

Die Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile nach dem Aufschluß kann mit den klassischen Methoden, wie Sedimentation oder Filtration erfolgen. Hierbei sind die Partikelgröße, -dichte und die Viskosität der Suspension bestimmende Größen. Um einen effektiven Klärungsprozess zu entwickeln, ist es daher nötig, insbesondere den Feststoffanteil zu charakterisieren.

3.3.2.1. Charakterisierung des Feststoffanteils

Die primären Partikeleigenschaften wie Konzentration, Größenverteilung, Gestalt und Form, Dichte und Oberflächenbeschaffenheit in Verbindung mit Flüssigkeitseigenschaften wie Viskosität und Dichte ermöglichen eine erste Charakterisierung der Suspension. Zur genaueren Betrachtung sind die sekundären Eigenschaften, die Sedimentationsgeschwindigkeit der Feststoffe und die Filterkuchenstabilität heranzuziehen (Svarovsky 1981). Ziel ist es, von den primären Eigenschaften auf die sekundären Eigenschaften schließen zu können, um damit eine geeignete Trennmethode zu bestimmen.

3.3.2.2. Sedimentation und Zentrifugation

Das grundlegende Prinzip der Sedimentation oder Zentrifugation ist die Trennung von Partikeln oder Flüssigkeiten unterschiedlicher Dichte im Erdschwerefeld. Hierbei wirkt bei der Sedimentation auf ein Partikel nur die Gravitationskraft des Erdschwerefeldes. Die Sinkgeschwindigkeit kann über das Stoke'sche Gesetz wie folgt beschrieben werden:

$$w_{fg} = \frac{1}{18} * \frac{\Delta \delta * d_p^2}{\eta} * g \quad [1]$$

$\Delta \delta$: Dichteunterschied [$\text{kg} * \text{m}^{-3}$] d_p : Partikeldurchmesser [m] η : dynamische Viskosität der Flüssigkeit [$\text{n} * \text{s} * \text{m}^{-2}$] g : Erdbeschleunigung [$\text{m} * \text{s}^{-2}$]
--

Die Zentrifugation macht sich, im Gegensatz zur Sedimentation, die Zentrifugalkraft zu nutze, welche ein Vielfaches der Erdbeschleunigung darstellen kann (Gl. [2]). Die so zu erzielenden höheren Durchsatz- und Trennleistungen bedingen eine höhere Raumzeitausbeute.

Das Verhältnis der jeweiligen Zentrifugalbeschleunigung $r * \omega^2$ zur Erdbeschleunigung g wird durch den Proportionalitätsfaktor z beschrieben

3. Theorie

$$z = \frac{r * \omega^2}{g} \quad [2]$$

r : Radius [m] ω : Winkelgeschwindigkeit [s^{-1}] g : Erdbeschleunigung [$m * s^{-2}$]

Aus Gleichung [1] und [2] ergibt sich für die Absetzgeschwindigkeit im Zentrifugalfeld w_{fz} :

$$W_{fz} = \frac{1}{19} * \frac{\Delta \delta * d_p^2}{\eta} * r * \omega^2 \quad [3]$$

Um die kritische Partikelgröße bestimmen zu können, bei der noch eine Abscheidung der Feststoffe erfolgt, ist für, jede Zentrifuge und dem jeweils angelegten Volumenstrom eine charakteristische Größe, die sogenannte Klärflächenbelastung zu bestimmen. Diese stellt den Quotient aus angelegtem Volumenstrom und Klärfläche der Zentrifuge dar. Eine Abtrennung der Partikel erfolgt nur wenn dessen Sinkgeschwindigkeit größer als die Klärflächenbelastung ist. Somit ergibt sich für den kritischen Partikeldurchmesser:

$$d_c = \sqrt{\frac{\eta}{18 * \Delta \delta * g} * \frac{1}{z_a} * \frac{dV/dt}{A_s}} \quad [4]$$

d_c : kritischer Partikeldurchmesser [m] dV/dt : Volumenstrom [$m^3 s^{-1}$] z_a : maximaler Beschleunigungsfaktor A_s Klärfläche [m^2]
--

Mittels Gleichung [4] ist voraus zu berechnen, ob Partikel innerhalb einer bestimmten Größenverteilung in einer Zentrifuge sedimentiert werden können oder nicht.

3.3.2.3 Filtration

Eine Alternative zur Zentrifugation stellt die Filtration von feststoffhaltigen Lösungen dar. Hierbei unterscheidet man zwischen der Dead End und der Querstromfiltration. Im Dead End Modus wird die Suspension frontal auf ein Filter gegeben.

Der Druckabfall bedingt einen Durchtritt der Flüssigkeit, während die Feststoffe auf dem Filter (Kuchenfiltration) oder innerhalb des Filters (Tiefenfiltration) verbleiben. Im Querstrommodus wird die Suspension tangential über das Filter geleitet.

3. Theorie

Auch hier bedingt der Druckabfall den Durchtritt eines Teils der Flüssigkeit durch das Filter (Filtrat), während die restliche Suspension (Retentat), aufgrund der Überströmgeschwindigkeit, eine Schichtbildung auf dem Filter und damit eine Verblockung vermindert (Datar und Rosen 1996, Kroner et al. 1992). Abhängig vom Porendurchmessers des verwendeten Filters definiert man die Ultra- und Mikrofiltration. Die Ultrafiltrationsfilter werden aufgrund ihrer Undurchlässigkeit für Proteine bedingt durch die geringe Porengröße zur Proteinkonzentration und/oder Diafiltration verwendet.

3.3.2.4 Flokkulation

Liegt die durchschnittliche Partikelgröße in einer Suspension unter der kritischen Partikelgröße, kann eine Partikelvergrößerung durch Aggregation der Feststoffe durch ein geeignetes Flokkulationsmittel erreicht werden. Für Zellhomogenate greift man hierbei auf kationische Polymere zurück. Die Bindung erfolgt über eine elektrostatische Adsorption. Als Flokkulationsmittel, zur Klärung von *E. coli* Homogenaten, hat sich Polyethylenimin (PEI) bewährt (Jendrisak 1987). Ein positiver Nebeneffekt bei der Feststoff Flokkulation mit PEI ist die gleichzeitige Fällung der DNA und die Abtrennung von Lipiden. Die Sedimentationseigenschaften der Aggregate sind eindeutig verbessert und eine kontinuierliche Zentrifugation ist möglich (Persson und Lindman 1987). Bei der Flokkulation ist zu bedenken, dass PEI nur bei neutralen pH positiv geladen ist und Zusätze wie Antischaum oder Calciumionen die Aggregation beeinflussen können.

3.3.3. Erster Aufreinigungsschritt

Der als primärer Aufreinigungsschritt (capture Step) bezeichnete erste Prozessschritt dient dazu, das Arbeitsvolumen zu reduzieren und möglichst einen ersten Aufreinigungserfolg, bezogen auf das Zielprotein, zu erzielen. Hier finden Filtrationsschritte, chromatographische Verfahren und integrative Verfahren Anwendung.

3.3.3.1. Chromatographische Verfahren

Der russische Biologe Tswett zerlegte Farbstoffe in ihre Komponenten indem er sie über eine Kalksäule laufen ließ und begründete somit 1906 die Säulenchromatographie (Atkins 1995).

3. Theorie

Heute versteht man unter Chromatographie die analytische und präparative Auftrennung von Stoffgemischen durch Transport- und Verteilungsvorgänge in dünnen, meist dispersen Phasenschichten an der Grenzfläche einer mobilen und stationären Phase (Kümmel und Worch 1990). Wie bei der destillativen Fraktionierung oder Gegenstromextraktion tritt auch bei der Chromatographie eine vielfache Wiederholung eines Separationsprozesses auf. Die hieraus abzuleitende Separationsfunktion zeigt die Verteilung einer gelösten Substanz zwischen mobiler und stationärer Phase. Die chromatographischen Verfahren werden einerseits aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Wirkungsmechanismen in Adsorptions-, Verteilungs-, Gelpermeations-, Ionenaustausch- und hydrophobe Interaktionschromatographie unterschieden. Andererseits kann man eine Unterscheidung aufgrund von Art und Aufbau der Trägermaterialien vornehmen in Papier-, Säulen- und Dünnschichtchromatographie.

3.3.3.1.1. Adsorption und Desorption

Lagern sich bewegliche Teilchen an eine Oberfläche an, so spricht man von Adsorption. Neben dem Ausmaß und der Geschwindigkeit der Adsorption sind die Natur und Bindung des Adsorbats an das Adsorbens von Interesse.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten der adsorptiven Bindung. Die Physisorption beruht auf schwachen, physikalischen Wechselwirkungen, wie den Van-der Waal'schen Kräften, die auch über größere Entfernungen wirken können (Stahlberg et al. 1992). Die frei werdende Energie liegt auf dem Niveau der Kondensationsenthalpie.

Treten bei der Adsorption chemische Bindungen auf, so spricht man von Chemisorption. Die hier zu messende Enthalpie ist sehr viel größer. Von der chemischen Bindung unterscheidet sich die Chemisorption, weil die chemisorbierten Teilchen auf der Adsorbensoberfläche durchaus noch beweglich sind. Während es bei der Physisorption aufgrund der, über größere Entfernung wirkenden, Kräfte zur Ausbildung von mehreren Schichten kommt, beschränkt sich die Chemisorption, über die Natur ihrer chemischen Bindung, auf die Ausbildung einer monomolekularen Adsorptionsschicht (Atkins 1995).

Die Adsorptionswahrscheinlichkeit eines Adsorbats wird neben konstanten Stoffparametern bestimmt von dem Belegungsgrad der Oberfläche. Sie stellt den Quotient aus Zahl der adsorbierten Teilchen und Anzahl der auftreffenden Teilchen pro Flächen- und Zeiteinheit dar und nimmt mit steigendem Belegungsgrad θ ab, bzw. ist proportional zu $(1-\theta)$. Ausmaß und Art der Adsorption hängen von folgenden Faktoren ab:

3. Theorie

- chemische Struktur und Zusammensetzung des Adsorbats und des Adsorbens
- Oberflächenstruktur des Adsorbens
- Druck und Temperatur
- Gegenwart von anderen Adsorbaten

Beschränkt sich die Adsorption auf eine monomolekulare Schicht und ist die Adsorptionswärme unabhängig von der Belegung, lassen sich die kinetische Zusammenhänge nach Langmuir (1918) ableiten

Das Prinzip jeder Chromatographie beruht auf den physikalischen Gesetzen der Adsorption und Desorption, und kann unter entsprechenden Voraussetzungen mittels der Langmuir-Gleichung beschrieben werden. Dies sind: die Adsorption darf nur in einer Monolayerschicht erfolgen und es existieren keiner Wechselwirkungen der Adsorbatmoleküle untereinander (keine laterale oder kooperative Interaktion). Bei Erfüllung dieser Bedingungen ergibt sich die Adsorptionsisotherme nach Langmuir für den stationären Zustand wie folgt:

$$Q = \frac{Q_{\max} K_A C}{1 + K_A C} \quad [5]$$

Q_{\max} : Beladung [mg/ml] K_A : Adsorptionskonstante [mg/ml] C: Flüssigphasenkonzentration [mg/ml]
--

3.3.3.1.2. Elektrostatische Wechselwirkungen

Das Prinzip der elektrostatischen Wechselwirkung stellt die Basis der Ionenaustauschchromatographie dar.

An der Phasengrenzfläche von stationärer und mobiler Phase kommt es häufig zu Konzentrationsverschiebungen gegenüber den Verhältnissen im Innern der Phasen, was als Adsorption beschrieben wird.

Das Ausbilden einer Adsorptionsschicht ist eng verknüpft mit dem Auftreten des Oberflächenpotentials χ . Bei der Ionenaustauschchromatographie kommt es zur spezifischen Adsorption einer Ionensorte unter Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht, die in idealisierter Form bereits 1879 von Helmholtz beschrieben wurde.

Helmholtz beschreibt die sich ergebende Doppelschicht in erster Näherung als planparallelen Plattenkondensator, dessen Kapazität sich als Quotient von Ladung und Spannung beschreiben läßt. Die Ladung ist von der Plattenfläche und der Spaltbreite abhängig.

3. Theorie

Unter Berücksichtigung der Proportionalitätsfaktoren, elektrische Feldkonstante und Dielektrizitätskonstante, ergibt sich in Anlehnung an das Kondensatormodell für die Doppelschicht bei gegebener Fläche A und Schichtdicke d eine Potentialdifferenz der inneren elektrischen Potentiale $\Delta\phi$, welche der Spannung U entspricht.

$$\Delta\phi = \frac{d Q}{\epsilon_0 \epsilon_I A} \quad [6]$$

ϵ_0 = elektrische Feldstärke ϵ_I = Dielektrizitätskonstante
--

Der Potentialverlauf zwischen den beiden Schichten ist linear.

In Realität erhält man aufgrund der thermischen Bewegung der Lösungsmittelmoleküle ein Modell, welches sich aus einer definierten starren Doppelschicht und einer diffusen Doppelschicht zusammensetzt. Bei diesem Sternschen Modell ist der Potentialverlauf entlang der starren Doppelschicht linear, um dann entlang der diffusen Doppelschicht sich asymptotisch einer relativ niedrigen Potentialdifferenz zu nähern (Wedler, 1995).

Für die Adsorption von Proteinen an Oberflächen bedeutet das, wenn im gewählten Puffer die Oberfläche sich mit entgegengesetzter Ladung zum Protein auflädt, wird eine Adsorption der Proteinmoleküle erfolgen. Für die Ionenaustauschchromatographie, mit den in einer mobilen Phase lokalisierten Gegenionen, ist eigentlich nur ein begrenzter Teil der Doppelschicht relevant. Eine Vergrößerung der Kapazität kann somit bei gegebenen Ionenpaaren hauptsächlich über die zur Verfügung stehende Fläche erfolgen.

Die klassischen Chromatographiegele bestehen aus porösen Partikeln. Die Diffusion des Adsorbats innerhalb des Partikels ist hier von besonderer Bedeutung. Die unterschiedlichen Diffusionsmechanismen hat u. a. Andreas Karau (1996) in seiner Dissertation ausführlich dargelegt (Karau 1996, Boyer und Hsu 1992, Ma et al. 1996).

3.3.3.1.3. Ionenaustauschchromatographie

Die am häufigsten als primärer Aufreinigungsschritt eingesetzte Methode ist die Ionenaustauschchromatographie. Sie ist definiert als reversibler Stoffaustausch der, in Lösung befindlichen, Ionen. Die reversible, elektrostatische Wechselwirkung zwischen positiv oder negativ geladenen Gruppen der Probenmoleküle (mobile Phase) und den an einer Matrix kovalent gebundenen Ladungsträgern (stationäre Phase) ist die Grundlage dieser Chromatographie-Methode.

3. Theorie

Man unterscheidet, je nach Ladung des zu bindenden Probenmoleküls, zwischen Anionen- und Kationentauschern (Cooper 1982). Während bei Anionentauschern Ammoniumionen-Derivate Anwendung finden, greift man bei Kationentauschern oft auf Sulfonsäure- oder Carbonsäuregruppen zurück. Die Ladung gelöster Proteine ist abhängig von ihren oberflächenorientierten Aminosäureresten, deren effektive Ladung wiederum von dem pH der Lösung abhängt. So liegt das Protein netto bei einem pH-Wert oberhalb seines isoelektrischen Punktes (pI) als Anion und einem pH-Wert unterhalb seines pI als Kation vor. Diesen Effekt macht man sich bei Elution über einen pH-Shift zu Nutze. Die Elution über einen Salzgradienten beruht im Gegensatz dazu auf der Konkurrenzreaktion der Salzionen und der Proteinmoleküle um die Bindungsstellen.

Das prinzipielle Vorgehen bei einer Ionenaustauschchromatographie ist immer gleich. Die Matrix wird zunächst mit den Gegenionen abgesättigt. Danach erfolgt der Auftrag der Proteinmoleküle bei möglichst geringer Salzkonzentration, die Bindung erfolgt aufgrund der oben beschriebenen Konkurrenzreaktion. Bei der Elution wird aufgrund der Variation des pH-Wertes oder der Salzkonzentration das Bindungsgleichgewicht des Proteins an der Matrix verschoben. Durch geeignete Wahl des Austauschermaterials und der Chromatographiebedingungen, wie Salzgehalt und pH-Wert, kann so eine effiziente und selektive Bindung des Zielproteins erfolgen (Dorfner 1991). Mit der Bindung an die stationäre Phase geht eine Konzentrierung des Zielproduktes, im Vergleich zur Konzentration in der Auftragslösung, einher, weshalb diese Chromatographie oft als erster Aufreinigungs- und Konzentrierungsschritt verwendet wird (Janson und Ryden 1998). Aber auch als Negativsäulen finden Ionenaustauscher Anwendung. Bei der Negativsäule bindet das Zielprotein nicht, während Verunreinigungen auf der Säule verbleiben und somit abgetrennt werden können.

3.3.3.1.4 Membranionenaustauscher

Die Transportlimitierung herkömmlicher Gele ($\phi P = 30-50$ nm) liegt im diffusiven Transport der kolloidalen Proteine in die Gelpore und bei der Elution wieder hinaus (Helfferich und Hwang 1991). Hierdurch verringert sich die mögliche Fließgeschwindigkeit durch das Bett insbesondere bei großen Gelpartikeln. Eine Möglichkeit, solch lange Prozeßzeiten und die Limitierung des chromatographischen Prozesses durch Diffusion zu vermeiden, besteht in der Verwendung von Adsorbermaterialien mit ausreichend großen mikroporösen Kanälen, die einen konvektiven Transport ermöglichen.

3. Theorie

Eine besondere Form mikroporösen Trägermaterials stellt eine Membran oder eine Stapelung dieser dar (s. Abb.4). (Thömmes und Kula 1995)

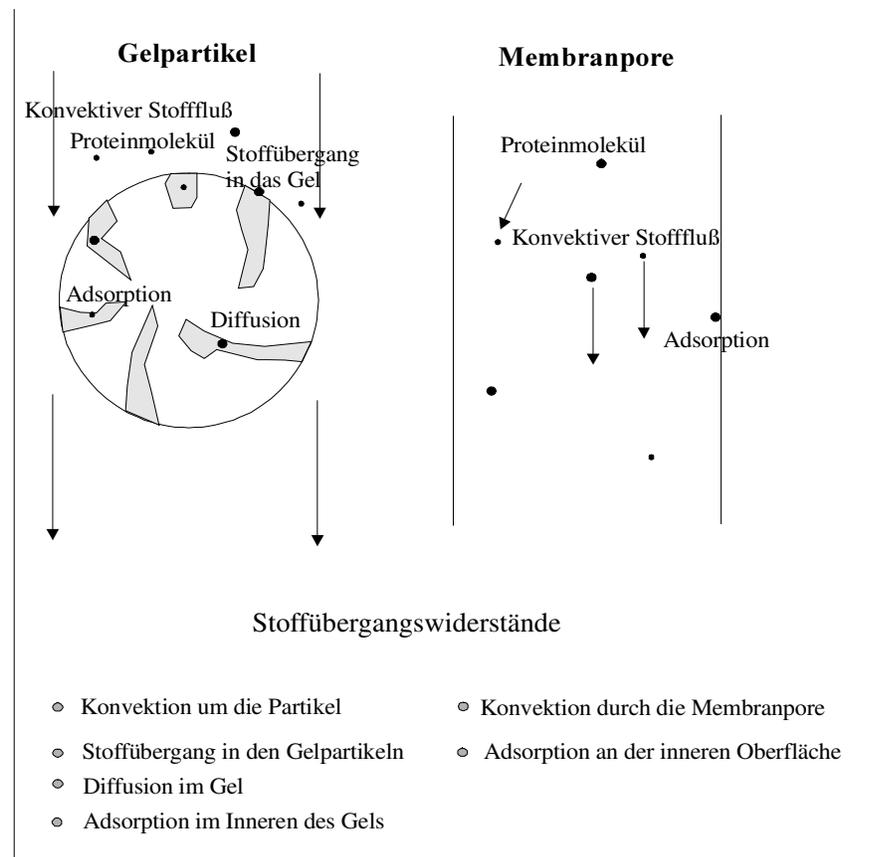


Abb. 4: Schematische Gegenüberstellung der diffusiven Vorgänge im porösen Partikel im Vergleich zur Membran

Sie bietet gegenüber den Gelmaterialien einen direkteren Stoffübergang und z.T. eine größere mechanische und chemische Stabilität (Briefs 1996, Gebauer et al 1997) Um eine vergleichbare Kapazität zu porösen Partikeln zu gewährleisten, wird die innere Adsorberoberfläche durch eine räumlich ausgedehnte Ligandenschicht, die in der Lage ist mehrere Schichten des Adsorbats zu binden, vergrößert (Tsuneda et al, 1995). Diese spezifische Ligandenschicht besteht aus Polymerketten, wobei mehrere Liganden Gruppen jeweils an ein Polymer gebunden sind (Tsuneda et al, 1994).

Der konvektive Transport der Lösung durch die Membran erlaubt hohe Fluidgeschwindigkeiten bei hohen effizienten Bindungsraten (Briefs und Kula 1991). Die Membran ist weitgehend inkompressibel, da es keine Bewegung innerhalb der Matrix gibt, kann es nicht zur Kanalbildung kommen. Ein Abrieb des Materials ist nahezu ausgeschlossen. Da viele Membranen autoklavierbar, sind besteht die Möglichkeit des sterilen Arbeitens.

3. Theorie

Die chemische Inertheit der Membran läßt effektive Reinigungsprozeduren (*cleaning in place* (CIP)) zu. Ein Maßstabsvergrößerung (*scale up*) erscheint möglich. (Thömmes und Kula 1995)

3.3.3.1.5. Affinitätschromatographie und pseudo Affinitätschromatographie

Speziell für Moleküle mit ausgeprägter dreidimensionaler Struktur gibt es die Methode der Affinitätschromatographie. Schon 1968 zeigten Cuatrecasas, Wilchek und Anfinsen, dass es möglich ist, ein Enzym an einen kompetitiven Inhibitor zu binden, welcher auf einer festen Trägermatrix durch kovalente Bindung immobilisiert war (Cuatrecasas et al 1968). Die Affinitätschromatographie führt aufgrund ihrer hohen Selektivität zu wesentlich reinerem Produkt und ist somit meist effizienter als eine Ionenaustauschchromatographie. Die verwendeten Liganden sind vorwiegend Antigene, Cofaktoren und neuerdings vermehrt spezifische Peptidliganden. Eine spezielle Form stellt die Ni-Chelat Chromatographie dar, bei der Proteine über einen zugänglichen, aus mehreren Histidinen bestehenden Endteil, dem sogenannte HisTag, der Aminosäurekette an Nickelionen gebunden werden (Chilla et al 1973, Porath et al 1975). Der His-Tag kann molekularbiologisch an das zu exprimierende Protein angehängt werden und ermöglicht somit eine effiziente Aufreinigung des rekombinanten Proteins. Ein wesentlicher Nachteil der Affinitätschromatographie sind die zumeist teuren Affinitätsliganden. Um die Kosten zu reduzieren, kann die sogenannte pseudo Affinitätschromatographie eingesetzt werden (Sulkowski 1985). Ersetzt man den Affinitätsliganden durch einen Farbstoff kommt man zur Farbstoff-Liganden Chromatographie, die vielfach zur Aufreinigung von NAD(P)⁺/NAD(P)H abhängigen Enzymen verwendet wird. Aber auch andere Co-Faktoren wie ADP, AMP, ATP und GTP können manchmal durch Farbstoffe ersetzt werden (Quadri und Easterby, 1980, McCreath et al. 1995). Eine Weiterentwicklung der Affinitätschromatographie stellt die Adsorption mittels Peptid-liganden dar, die speziell für das entsprechende Targetprotein selektioniert werden.

3.3.3.1.6. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Während bei der Ionenaustauschchromatographie elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Adsorber und Adsorbat für die Adsorption verantwortlich sind, interagieren bei der hydrophoben Interaktionschromatographie hydrophobe Regionen des Zielproteins mit den hydrophoben Liganden des Adsorbers (Scopes 1987).

3. Theorie

Als Liganden werden meist Kohlenwasserstoffketten unterschiedlicher Länge z.B. Octyl-, Octadecylgruppen oder aromatische Liganden gewählt. Ein hoher Salzgehalt und damit verbunden eine hohe Ionenkonzentration im Puffer blockiert ionische Wechselwirkungen und bringt die hydrophoben Regionen des Zielproteins zum Tragen. Wichtig ist es somit für jedes Zielprotein die geeignete Salzkonzentration zu ermitteln.

3.3.3.2. Integrative Verfahren

Als integrativ werden Verfahren bezeichnet, die verschiedene Eigenschaften in einem Verfahrensschritt kombinieren, wie bei der Extraktion in wässrigen Zweiphasensystemen oder der Adsorption im expandierten, ideal klassierten Fließbett eine erste Aufreinigung mit der Fest-Flüssigtrennung verbunden ist. Auch die Flokkulation, hier schon in Abschnitt 3.2.2.4 eingeführt, kann als integratives Verfahren angesehen werden.

3.3.3.2.1. Adsorption im expandierten, ideal klassierten Bett

Die ‚Fließbettadsorption‘ stellt ein integratives Verfahren zur Proteinaufarbeitung dar. Bei dieser Methode soll die Grundoperationen Fest-Flüssigtrennung mit dem ersten chromatographischen Schritt kombiniert werden (Thömmes 1997).

Geeignete poröse Adsorberpartikel werden durch einen aufwärts gerichteten Fluidstrom in einer Säule expandiert. Hierbei stehen der Auftriebskraft und Widerstandskraft jedes Partikels dessen Gewichtskraft entgegen, die scheinbare ‚Immobilisierung‘ des Partikels erfolgt im Kräftegleichgewicht. Die Position jedes Partikels ist somit eine Funktion der Dichte und der Größe (Al-Dibouni und Garside 1997). Der interpartikuläre Abstand wird durch die Expansion erhöht und man erhält ein ideal klassiertes Bett. Die Klassierung des Bettes erhält man durch den Einsatz einer Größenverteilung des Adsorbats und der daraus resultierenden Sortierung der einzelnen Partikel nach Dichte und Größe im Fluidstrom, beschreiben durch das Stoke'sche Gesetz. Der vergrößerte zwischenpartikuläre Abstand ermöglicht den Auftrag von feststoffhaltigen Lösungen, in diesem Fall von Zellsuspensionen oder Zellhomogenaten (Harrison 1994). Idealerweise adsorbiert das Zielprotein an den Adsorberpartikeln, während Verunreinigungen und Zellen oder Zelldebris ungehindert die Säule passieren. Hierbei kann die Problematik der Biomasse-Adsorberinteraktion auftreten. Statt die Säule zu passieren bindet Zelldebris an den Adsorberpartikeln und es kommt zur Aggregation und Inhomogenität.

3. Theorie

Das Fluidisierungsverhalten der Säule wird bei starker Biomasse/Ad-sorberinteraktion so stark beeinflusst, dass es zum Zusammenbruch des expandierten Bettes kommen kann.

Eine Kombination des expandierten Bett Modus mit den Eigenschaften der Affinitätschromatographie kann zu einem sehr effektiven und kostengünstigen Verfahren führen (Spalding 1991).

3.4 Prozessoptimierung eines Fließbettprozesses

Die hier dargestellten Experimente und Modellierungen zur Prozessoptimierung eines Fließbettprozesses wurden weitgehend im Institut für Enzymtechnologie entwickelt und fanden teilweise in der Arbeit von Jan Feuser schon ihre Anwendung. Die theoretische Grundlagen und Ableitungen werden ausführlich in der Habillationschrift von Dr. J. Thömmes (1999) beschrieben. Im folgenden wird eine geeignete Strategie, bestehend aus einer logischen Kette einfacher Experimente, zur Entwicklung eines Fließbettprozesses dargestellt. Im besonderen Fall der Fließbettadsorption sind neben der Charakterisierung der Proteinadsorption, die analog zur Festbettchromatographie behandelt werden kann (Abschnitt 3.3.3.1.1), die Qualität der Fluidisierung und die Ausbildung eines stabilen Fließbettes zu beachten.

Abb. 5 zeigt die logischen Abfolge von Experimenten bis zum optimierten Prozess und dessen Betriebsparametern, die im folgenden beschrieben werden:

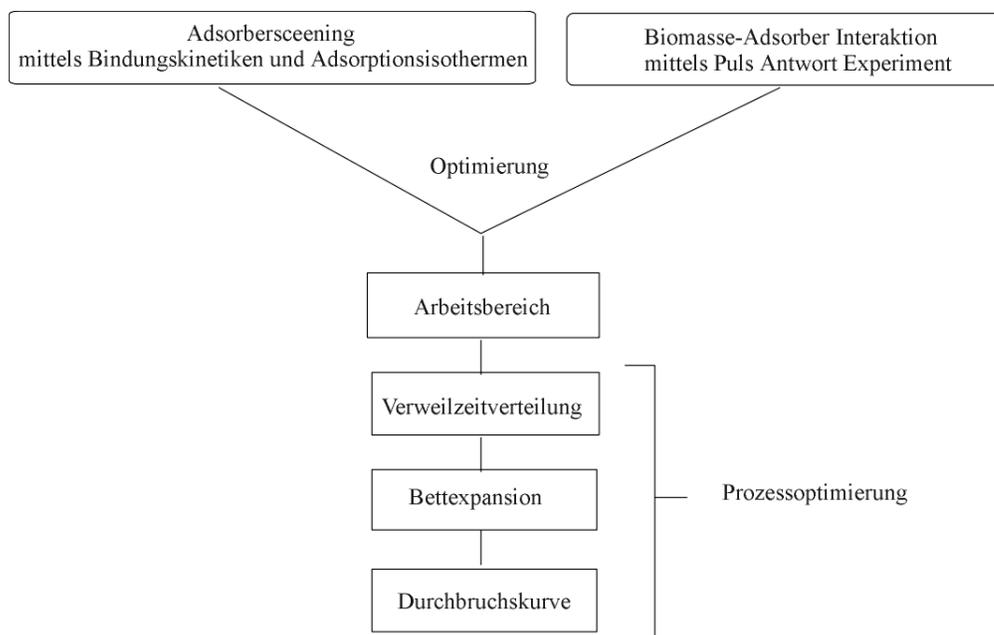


Abb. 5: schematische Darstellung der Experimente zur Prozessoptimierung und –parameter Bestimmung

3. Theorie

3.4.1. Adsorberscreening

An erster Stelle der Prozessentwicklung steht die Suche nach dem geeigneten Adsorber für das Zielprotein. Im Adsorberscreening wird auf maximale Bindungskapazität und Selektivität hin selektiert. Bekannte Eigenschaften wie pH-Stabilität, Hydrophobizität und der isoelektrische Punkt des Zielproteins geben erste Hinweise, welche Adsorber sinnvoller Weise zu testen sind.

Beim Screening konzentriert man sich zunächst auf die Proteinbindung. Die einfachste Methode, die Bindung zu untersuchen, besteht in der Aufnahme einer Bindungskinetik, wobei in diskreten Zeitabständen die Konzentration des Zielproteins in der flüssigen Phase bestimmt wird. Am einfachsten ist die Aufnahme einer Kinetik im batch Versuch mit definierten Adsorber- und Fluidmengen (Abb.6) Die Zielproteinadsorption an der festen Phase wird hier über die Zielproteinabnahme in der Fluidphase definiert.

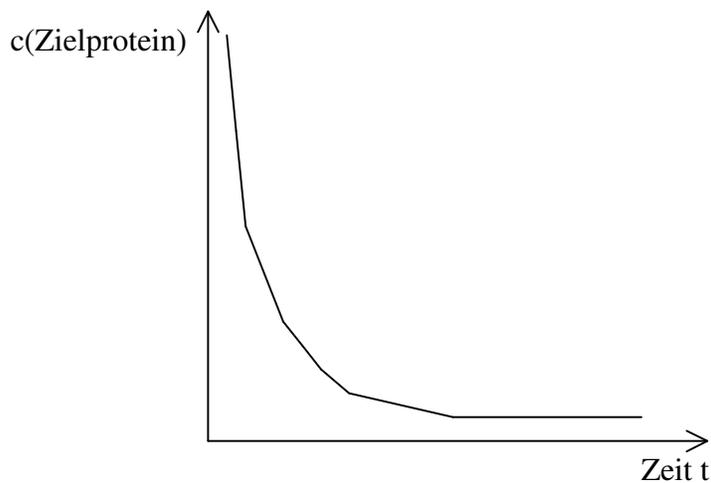


Abb. 6: Kinetik der Proteinadsorption

Die Kinetik beinhaltet zwei Informationen, zunächst die Geschwindigkeit in der sich das Adsorptionsgleichgewicht einstellt, was wichtig für die nachfolgenden Versuche zur Bestimmung der Gleichgewichtskapazität ist, sowie erste Hinweise auf die Größenordnung der Gleichgewichtskapazität. Aufgrund dieser Informationen ist es möglich, nur geeignete Adsorber für weitere Untersuchungen auszuwählen.

3. Theorie

3.4.2 Adsorptionsisothermen

Der nächste Schritt ist die Bestimmung der Gleichgewichtskapazität der gewählten Adsorber bezüglich des Zielproteins. Eine Gleichgewichtsisotherme kann durch einfache batch Versuche mit variierenden Adsorbermengen und gleichbleibender Zielprotein Konzentration ermittelt werden (Arve und Liapis 1987). Die zuvor gewonnenen Information bezüglich der Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung ist hier wichtig, da nur Daten im Gleichgewichtszustand bestimmt werden. Eine typische Gleichgewichtsisotherme ist in Abb.7 dargestellt (Nicoud und Seidel-Morgenstern 1996)

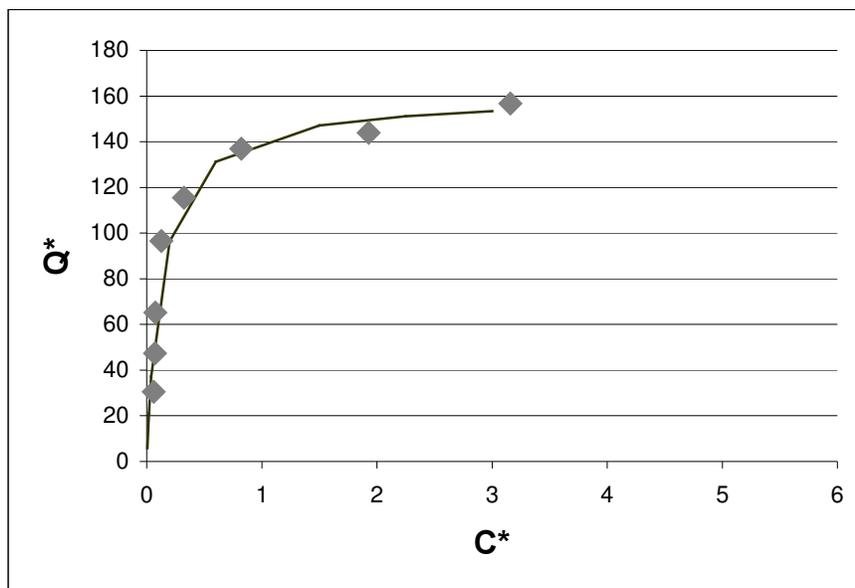


Abb. 7: schematische Darstellung einer Adsorptionsisotherme

Die mathematische Anpassung der Isotherme erfolgt zumeist nach den Grundlagen der Langmuiradsorption (Abschnitt 3.3.3.1.1. und der Gleichung [1]). Obwohl dieses Adsorptionsmodell die Komplexität der Proteinadsorption nicht berücksichtigt, beschreibt es trotz seiner mathematischen Einfachheit meist ausreichend die Adsorptionsisothermen von Proteinen an Matrices. Die ausgewerteten Messergebnisse liefern die Gleichgewichtskapazität des Zielproteins für den gewählten Adsorber bei gegebenen Bedingungen und die Gleichgewichtskonstante K_a . Ein hoher K_a –Wert bedeutet dabei, dass schon bei geringen Ausgangskonzentrationen in der Fluid-Phase hohe Gleichgewichtskapazitäten erzielt werden können, was bei evt. notwendigen Verdünnungen der Fluidphase von Bedeutung ist.

3. Theorie

Mit dieser Methode kann auch der Einfluss von Parametern wie pH-Wert, Salzkonzentration, Viskosität und Temperatur erfasst und die Adsorptionsbedingungen optimiert werden (Wright et al. 1998).

3.4.3. Biomasse Adsorber Interaktion

Wie bereits erwähnt unterscheidet sich die Fließbett Adsorption von der Festbett-Chromatographie durch die Möglichkeit des Auftrags von Biomasse haltigen Lösungen. Der Einfluss von Biomasse ist somit bei dieser Aufreinigungsmethode nicht zu vernachlässigen (Fernández-Lahore et al 2000, Feuser et al 1999, Daniels 1980).

Um diesen Parameter genauer zu untersuchen und eine Optimierung vornehmen zu können, bedient man sich des sogenannten Puls-Antwort Experiments. Hierbei wird der Adsorber in einer Säule, im zell-freien Puffer stabil expandiert, danach wird durch eine Probenschleife ein Biomassepuls aufgegeben und die Streulichtadsorption bei 600 nm vor und nach der Säule detektiert (Abb. 8).

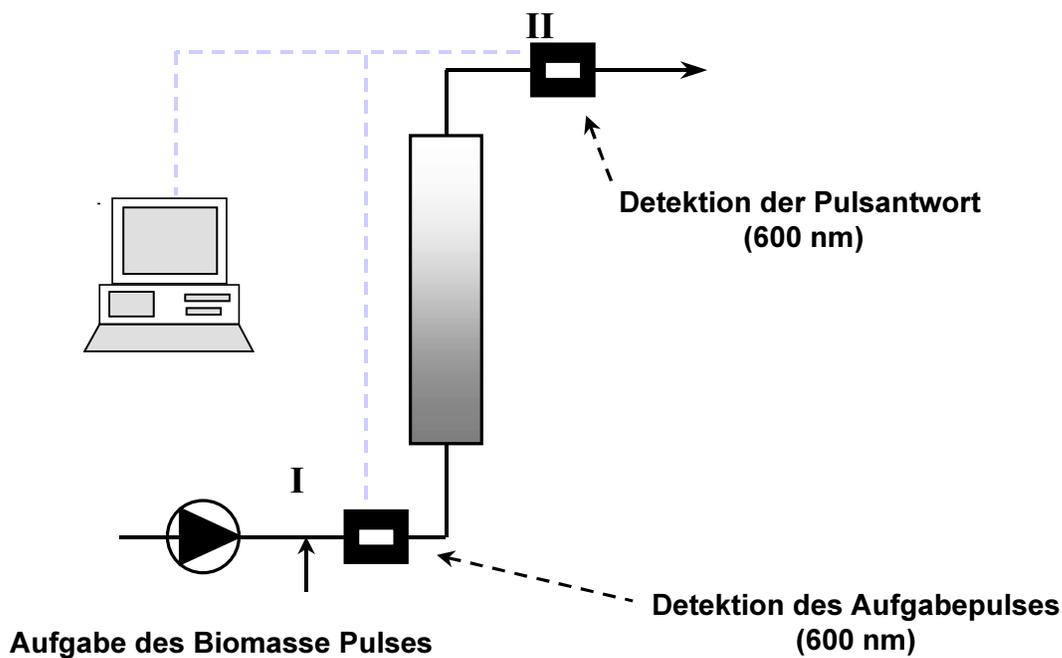


Abb.8: Experimentelle Anordnung des Puls Antwort Experiments zur Biomasse Adsorber Interaktion

Die Adsorption bei 600 nm in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen ergibt somit zwei Signale (Abb. 9).

3. Theorie

Die Flächen unter den Kurven werden in Beziehung gesetzt und die dimensionslose Durchtrittszahl P bestimmt (Gl. 7) wobei die Fläche des Aufgabepulses 100% entspricht.

$$P = \frac{A_{\text{Pulsantwort}}}{A_{\text{Aufgabepuls}}} \quad [7] \quad \boxed{A: \text{Fläche}}$$

die Transmission wird definiert als prozentualer Anteil der Pulsantwort zum Ausgangspuls (Gl. 8)

$$Tr = P * 100 \quad [8]$$

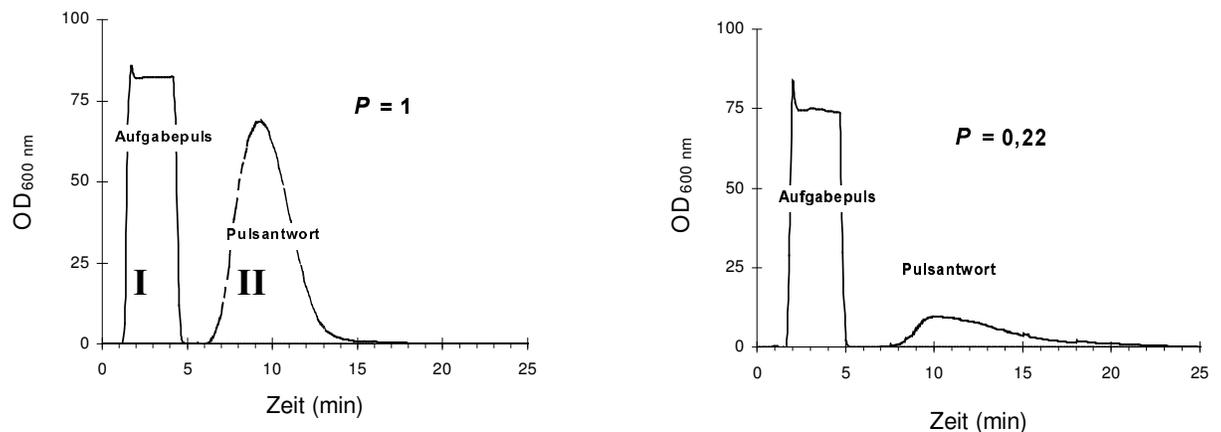


Abb. 9: Schematische Darstellung zweier Puls Antwort Experimente, ohne Biomasse Adsorberinteraktion $P = 1$ und starke Biomasse Adsorber Interaktion $P = 0,22$

Eine abnehmende Transmission zeigt eine erhöht Biomasse Adsorber Interaktion an, was zur Aggregatbildung und dem Auftreten von stagnierenden Zonen im Fließbett führen kann. Die ideale Fluidisierung wird dadurch gestört. Ziel einer Prozessoptimierung ist es, Bedingungen zu finden, bei denen eine möglichst hohe Transmission der Biomasse möglich ist. Systeme mit einer Transmission größer 90% gelten als Interaktions-frei. Um die Stabilität des ideal fluidisierten Bettes bei zuvor bestimmter geringer Biomasse Adsorber Interaktion auch unter Biomasse Einfluß zu bestimmen, bedient man sich des Experiments zur Bestimmung der Verweilzeitverteilung.

3. Theorie

3.4.4 Bestimmung der Verweilzeitverteilung (RTD)

Unter realen Bedingungen erfolgt der Durchfluß durch eine Chromatographiesäule nicht in idealer Pfropfenströmung, sondern weicht aufgrund von Diffusion und Verwirbelung in der mobilen Phase, sowie Diffusion und Stoffaustausch in der stationären Phase von diesem Modell ab.

Insbesondere der kinetische Effekt der Diffusion im homogenen Säulenbett wurde 1956 von van-Deemter mit folgender Gleichung beschrieben.

$$H = B_1d + B_2/v + B_3d^2v$$

[9]

H = Höhe einer theoretischen Stufe
B = Konstanten
d = Partikeldurchmesser
v = Strömungsgeschwindigkeit

Die Anwendung dieser Gleichung zeigt, wie eine Peakverbreiterung minimiert und die Auflösungsschärfe durch eine Partikelverkleinerung erhöht werden kann, was in den 70er Jahren zur Entwicklung der HPLC-Technik führte.

Geht man von den Idealvorstellungen des ideal durchmischten Rührkessels mit einem Theoretischen Boden auf der einen Seite und dem Strömungsrohr mit idealer Pfropfenströmung und im Prinzip unendlich vielen Theoretischen Böden auf der anderen Seite aus, so liegt eine Chromatographiesäule irgendwo dazwischen. Um verschiedene Säulen miteinander vergleichen zu können, gibt es dimensionslose Kenngrößen wie die Bodensteinzahl, Péclet-Zahl und die Anzahl der Theoretischen Böden (Levenspiel 1984).

Diese Kenngrößen lassen sich aus dem Verweilzeitverhalten (RTD) eines mit der Matrix nicht interagierenden Spurstoffes berechnen. Die Rückvermischung dieses Stoffes wird durch dessen Verweilzeitverhalten charakterisiert. Um nähere Informationen zu erhalten, betrachtet man die Antwort des Systems über die Zeit auf ein gegebenes Eingangssignal, das Verweilzeitspektrum. Hierzu bedient man sich des sogenannten Dirac-Impulses, einer Nadelfunktion oder Pulsfunktion, im Idealfall unendlich schmal und unendlich hoch, mit den Eigenschaften $\delta(t)=\infty$ für $t=0$. Diese Auftragsfunktion ruft eine Antwortfunktion hervor, die sogenannte C-Kurve, die je nach Reaktortyp einen entsprechend Verlauf nimmt (s. Abb.10).

3. Theorie

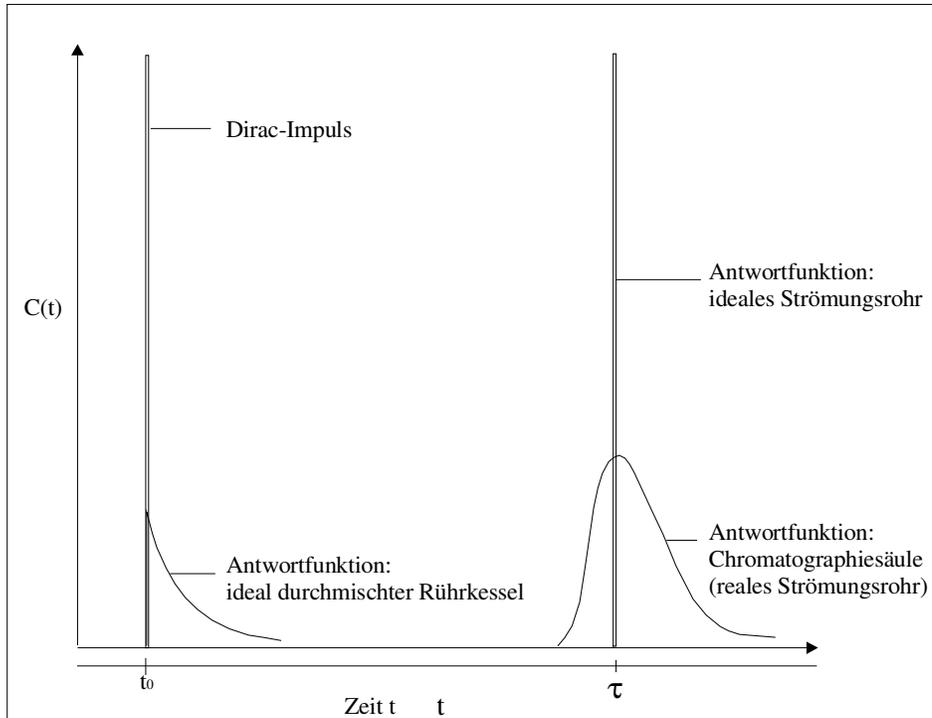


Abb. 10: Idealisierte Darstellung der Antwortfunktion $C(t)$ auf einen Dirac-impuls für verschiedene Reaktortypen

Im idealen Strömungsrohr mit reinem konvektivem Transport ist die mittlere Verweilzeit eines Spurstoffteilchens gleich der Raumzeit auch hydrodynamische Verweilzeit τ genannt. In diesem Fall ist sie nur von der Reaktorlänge L_R und dem Volumenstrom dV/dt abhängig.

$$\tau = \frac{L_R}{dV/dt} = \frac{L_R}{U}$$

[10]

L_R :	Reaktorlänge [cm]
dV/dt :	Volumenstrom [l/h]
U :	lineare Fluidgeschwindigkeit [cm/h]

Bei dem realen Strömungsrohr, der Chromatographie Säule, tritt neben der rein konvektiven Strömung axiale Dispersion auf, welche die typische Verbreiterung der C-Kurve bedingt (Carlos und Richardson 1968, Chung und Wen 1968). Die axiale Dispersion ist zurückzuführen auf die Summe von Rückvermischung bzw. konvektiver Vermischung aufgrund von Turbulenzen und Wirbeln in Strömungsrichtung, einer nicht konstanten Strömungsgeschwindigkeit über den Säulenquerschnitt sowie der molekularen Diffusion der Spurstoffteilchen entgegen der Strömungsrichtung.

3. Theorie

Eine Kenngröße für die axiale Dispersion ist die Bodensteinzahl Bo , welche das Verhältnis von konvektivem Transport zu diffusivem Transport angibt bzw. erzwungenem Stoffstrom zu axialer Dispersion. Mit der Bodensteinzahl in direktem Zusammenhang steht die Péclet-Zahl Pe als Quotient von konvektivem Transport zur Dispersion bzw. erzwungenem Stoffstrom zu Dispersion.

$$Bo = \frac{U \cdot L_R}{D_{axl}} = \frac{\text{erzwungener Stoffstrom}}{\text{axiale Dispersion}} \quad [11]$$

$$Pe = \frac{U \cdot d}{D_{axl}} = Bo \cdot \frac{d}{L_R} \quad [12]$$

U: lineare Fließgeschwindigkeit [cm/h]
 LR: Länge des Reaktors [cm]
 Daxl: Axialer Dispersionskoeffizient
 d: Durchmesser des Reaktors [cm]

Beide Kenngrößen werden zur Charakterisierung der Rückvermischung im Reaktor herangezogen (Kunii und Levenspiel 1996).

Die Bilanz für einen Spurstoff muß den erzwungenen konvektiven und den diffusiven Stofftransport einschließen. In einem homogen durchströmten Fließbett kann die Antwortfunktion mittels des Dispersionsmodells beschrieben werden, wobei man die Bedingungen eines geschlossenen Systems zugrunde legt (Nelson und Galloway 1975, Levenspiel 1984).

$$D_{axl} = \frac{\eta}{\rho_l \cdot Re_{mf}} \cdot \frac{Re^2}{0,2 + 0,011 \cdot Re^{0,48}} \quad [13]$$

Mit $Re_{mf} = \left[(33,7)^2 + 0,0408 \cdot \frac{d_p^3 \cdot \rho_l \cdot (\rho_s - \rho_l) \cdot g}{\eta^2} \right]^{1/2} - 33,7 \quad [14]$

$$D_{axl} = \frac{U \cdot d_p}{0,23 \cdot \left(\frac{\rho_p}{\rho_l} \right)^{-2,673} \cdot \epsilon^{-2,467}} \quad [15]$$

Re: Reynoldsche Zahl
 ϵ : Hohlraumanteil eines Fließbetts
 ρ : Dichte [kg/m³]
 η : dynamische Viskosität [kg/(m·s)]

3. Theorie

Ist es nicht mehr möglich, die Antwortsignale über das Dispersionsmodell zu beschreiben, ist dies ein eindeutiger Hinweis für Instabilität bzw. Totzonen im fluidisierten Fließbett durch Ausbildung von Turbulenzen oder Strömungskanälen.

Eine präzisere Beschreibung bietet dann das PDE Modell (Plug Flow with Dispersion and Mass Exchange) von Villermaux und Swaaij, das Strömungskanäle und Totzonen durch Aufteilung eines Fließbettes in eine gut durchströmte und eine stagnierende Region unter Stoffaustausch berücksichtigt. (Abb. 11) (Villermaux und van Swaaij 1969).

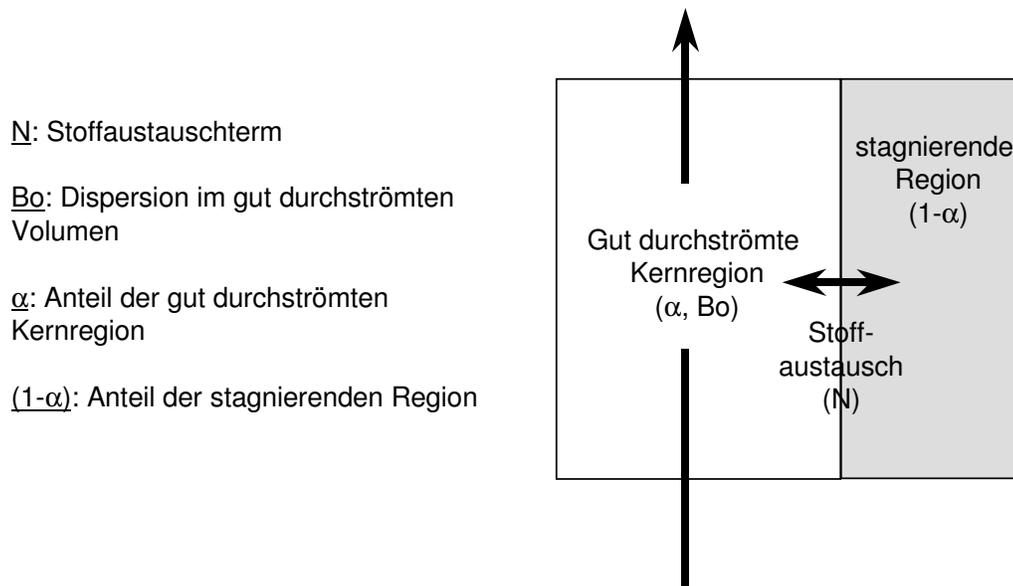


Abb. 11: Schematische, graphische Darstellung des PDE Modells nach Villermaux und Swaaij

Der Parameter α repräsentiert hierbei den gut durchströmten und ideal fluidisierten Anteil und sollte bei einem stabilen ideal fluidisiertem Bett nicht unter 0,8 liegen. Die Berechnung von α erfolgt in der Laplace Ebene nach Gl. 16, eine Rücktransformation erfolgt numerisch mittels des Scientist Programms (Micromath, Salt Lake City).

$$C(s) = \frac{\sqrt{Bo} \cdot \exp\left(\frac{Bo}{2}\right) \cdot \exp\left[-\sqrt{Bo \cdot \alpha} \cdot \sqrt{s + \frac{N}{\alpha} + \frac{Bo \cdot \alpha}{4} - \frac{N^2 \cdot (1-\alpha)}{\alpha}}\right]}{\frac{\sqrt{Bo}}{2} + \sqrt{\alpha} \cdot \sqrt{s + \frac{N}{\alpha} + \frac{Bo \cdot \alpha}{4} - \frac{N^2 \cdot (1-\alpha)}{\alpha}}} \quad [16]$$

3. Theorie

Ist mit Hilfe der RTD Bestimmung sicher gestellt, dass die Stabilität des Fließbetts nicht durch den Biomasseanteil beeinträchtigt wird und das Zielprotein unter geeigneten Bedingungen an den gewählten Adsorber bindet, kann die Prozessauslegung vorgenommen werden.

Der erste Schritt hierzu ist die Bestimmung der Bettexpansion bei Auftrag biomassehaltiger Lösung, zur Berechnung wird das Modell von Richardson und Zaki (1954) herangezogen. Die Fluidisierung wird hier unter realen Prozessbedingungen charakterisiert.

3.4.5 Bettexpansion beim Auftrag biomasse haltiger Lösungen

Im Gegensatz zur Festbettchromatographie ist es bei der Fließbettadsorption wichtig, die Expansion des Adsorberbetts zu ermitteln. Diese Expansion ist eine Funktion der Flüssigkeitsviskosität und der Biomassekonzentration im Auftrag. Ziel ist es, die geeignete sedimentierte Bettlänge L_0 und Fließgeschwindigkeit U bei gegebener Säulenlänge (Streamline 200 = 1m) zu bestimmen. Eine Aufnahme des Expansionsgrads L/L_0 zur linearen Fluidgeschwindigkeit U kann nach Richardson und Zaki evaluiert werden (Gl. 17/18)

$$U = U_t \cdot \varepsilon^n$$

[17/18]

$$\frac{L}{L_0} = \frac{(1 - \varepsilon_0)}{1 - \left(\frac{U}{U_t}\right)^{\frac{1}{n}}}$$

Sind U_t und der Expansionsindex n bekannt, ist es möglich, die Bettexpansion innerhalb des sinnvollen Betriebsbereiches des Prozesses vorherzuberechnen. Wobei zu berücksichtigen ist, dass diese beiden Parameter Funktionen der physikalischen Parameter Dichte ρ und Viskosität η sind. Daher ist es nicht möglich, den gemessenen Expansionsgrad auf andere biomassehaltige Lösungen zu übertragen.

Sind die Parameter wie Auftrag- bzw. Bindungsbedingungen, sedimentierte Betthöhe und Fluidgeschwindigkeit ermittelt, ist es sinnvoll, die dynamische Kapazität des Adsorbers für das Zielprotein zu bestimmen, um die Beladung zu optimieren. Hierzu dient die Durchbruchskurve.

3. Theorie

3.4.6 Durchbruchskurve zur Bestimmung der dynamischen Kapazität und des Diffusionsmechanismus

Die Diffusion von Proteinen im Partikel wird zumeist als geschwindigkeits-bestimmender Schritt angesehen. Daher ist es möglich mit relativ einfachen Modellen den Durchbruch in gepackten Säulen berechnen und zu optimieren (Hall et al 1966). Betrachtet man jedoch die Diffusion genauer ist es möglich den Prozess in zwei Schritte zu unterteilen. Abb. 12 zeigt schematisch die Diffusion eines Proteins entlang des Konzentrationsgefälles zunächst innerhalb der Filmschicht, welche den Partikel umgibt und danach innerhalb einer Partikelpore. Die wichtigsten Parameter sind hier der flüssigkeitsseitige Transportkoeffizient k_f und der scheinbare, partikelseitige Diffusionskoeffizient D_e .

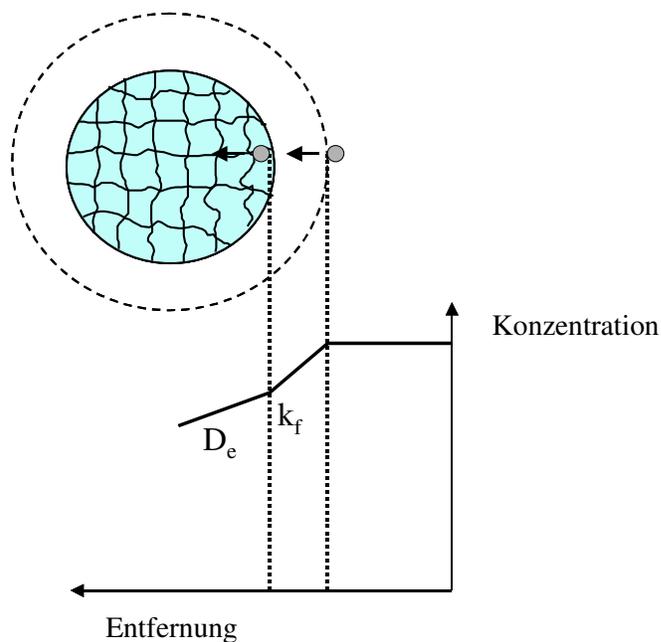


Abb. 12: Schematische Darstellung des Weges eines Proteins entlang des Konzentrationsgefälles in der Flüssigphase und im Partikel

Bei der Modellierung werden verschiedene Modelle, die auf unterschiedlichen Transportmechanismen beruhen, zur Datenanpassung verwendet. Das Modell mit dem besten Fit wird schließlich zur Modellierung der Durchbruchskurve verwendet.

Limitierende Transportmechanismen können sein:

- Filmdiffusion
- Porendiffusion
- Feststoffdiffusion
- Kombinierte Modelle (z.B. Film- und Porendiffusion)

3. Theorie

Auch die durch zwei Schritte limitierte Adsorption kann durch ein Modell von Hall beschrieben werden. Die Durchbruchskurve wird als Funktion eines flüssigkeits- und eines partikelseitigen Transportparameters beschrieben, welche die Parameter Fluidgeschwindigkeit U , Säulenlänge L , Partikelradius r_p , D_e und k_f beinhaltet Gl 19-23.

$$T = 1 + \left(\frac{1}{N_p} + \frac{1}{N_f} \right) \left(\frac{\Phi(X) + \frac{N_p}{N_f} \cdot (LN(X) + 1)}{\frac{N_p}{N_f} + 1} \right) \quad [19]$$

$$\Phi(X) \cong 2.39 - 3.59\sqrt{1-X} \quad [20]$$

$$N_p = \frac{15 \cdot D_e \cdot L_0 \cdot (1 - \varepsilon_0)}{U \cdot r_p^2} \quad [21]$$

$$N_f = \frac{3 \cdot k_f \cdot L \cdot (1 - \varepsilon)}{r_p \cdot U} \quad [22]$$

$$T = \frac{V_{brk} \cdot C_0}{Q_{eq} \cdot V_s} \quad [23]$$

Will man diese Gleichungen dazu benutzen, eine Durchbruchskurve zu berechnen, müssen D_e , k_f und die Gleichgewichtskapazität Q_{eq} bekannt sein. Q_{eq} ist aus der Adsorptionsisotherme zu entnehmen oder aus der Durchbruchskurve zu berechnen, D_e kann durch Aufnahme einer Durchbruchskurve im gepackten Bett bestimmt werden und k_f kann näherungsweise durch eine in der Literatur beschriebene Korrelation berechnet werden Gl 24/25.

$$k_f = \frac{D}{d_p} \cdot \left[\frac{2\zeta + \left\{ \frac{2\zeta^2 \cdot (1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}}}{\left[1 - (1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}} \right]^2} - 2 \right\} \cdot \tanh(\zeta)}{\frac{\zeta}{1 - (1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}}} - \tanh(\zeta)} \right] \quad [24]$$

mit

$$\zeta = \left[\frac{1}{(1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}}} - 1 \right] \cdot \frac{\gamma}{2} \cdot \text{Re}_p^{\frac{1}{2}} \cdot \text{Sc}^{\frac{1}{3}} \quad \text{Re}_p = \frac{U \cdot d_p \cdot \rho_l}{\eta} \quad \text{Sc} = \frac{\eta}{D \cdot \rho_l} \quad [25]$$

3. Theorie

Definiert man die maximal tolerierbare Durchbruchkonzentration als 10% ergibt sich für $C/C_0 = 0,1$. Der dimensionslose Auftrag T kann für die gegebene Durchbruchkonzentration berechnet werden.

Die Effektivität des Prozesses E ($Q_{brk}/Q_{eq.}$) kann bei bekannter sedimentierter Betthöhe L_0 , der Fluidgeschwindigkeit U und dem Partikelradius r_p als Funktion von U und L_0 bestimmt werden. Das abzuleitende Arbeitsdiagramm (Abb. 13) ermöglicht es, den Arbeitspunkt bei geeigneter sedimentierter Betthöhe und Fluidgeschwindigkeit zu ermitteln. Hier kann man zwischen maximaler Prozessleistung oder maximaler Adsorbernutzung wählen, je nach den Erfordernissen wie z.B. Adsorberkosten oder Proteinstabilität.

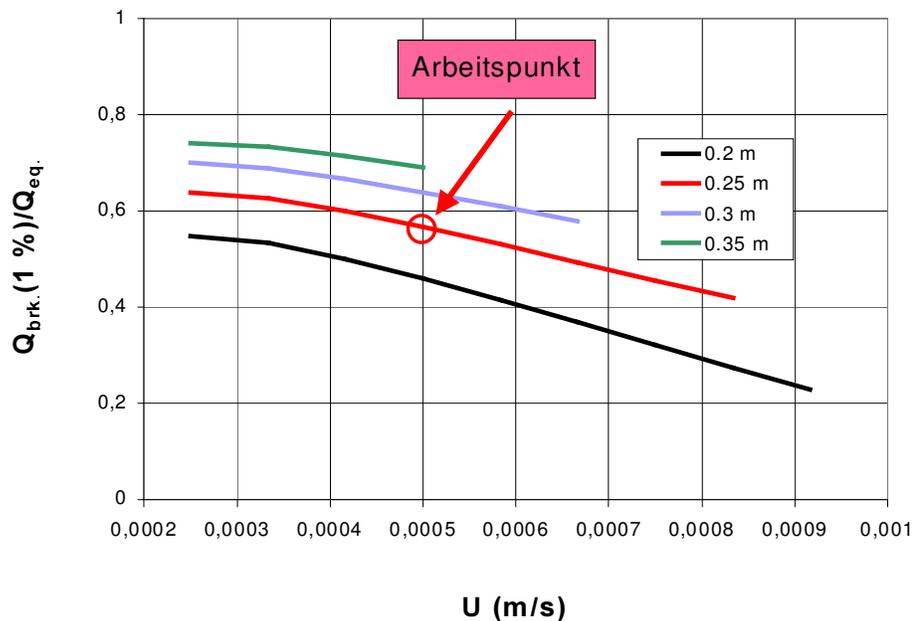


Abb. 13: Beispiel eines Arbeitsdiagramms: Die Effizienz des Prozesses ist aufgetragen bei unterschiedlichen sedimentierten Betthöhen gegen die lineare Fluidgeschwindigkeit

Über die Proteinausgangskonzentration in der Prozesslösung lässt sich abschließend noch das Auftragsvolumen V_{brk} berechnen. Damit können die optimalen Prozessparameter wie L_0 , U , und Auftragsvolumen ausgelegt werden.

3. Theorie

3.5 Konfokale Lasers Scanning Mikroskopie

Proteinadsorption kann mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie in porösen Medien visualisiert werden, wie die Studien von Linden und Ljunglöf (1999) zeigen (Linden et al. 2000, Ljunglöf und Thömmes 1998, Ljunglöf und Hjorth 1996).

Hier sollte diese Methode dazu dienen, die Bindung der FDH an der inneren Membranoberfläche einer Anionentauscher Membran zu zeigen und die Theorie der Proteinschichtbildung innerhalb der Tentakelliganden zu untermauern.

Zur Homogenitätsprüfung des Farbstoffliganden im porösen Adsorberpartikel wurde ebenfalls diese Methode herangezogen, um die gleichmäßige Bindung der FDH im Adsorber sichtbar zu machen..

Durch einen Laser wird die Fluoreszenz geeigneter Farbstoffmoleküle wie von Heim et al (1995) beschrieben angeregt und deren Emission detektiert (Heim et al. 1994 / 1996, Göppert-Mayer 1931, Pawley 1995). Die spezielle optische Einheit (Abb.14) eines konfokal Laser Scanning Mikroskops ermöglicht die Fokussierung verschiedener Ebenen innerhalb eines dreidimensionalen Objektes (Minsky 1957 / 1988).

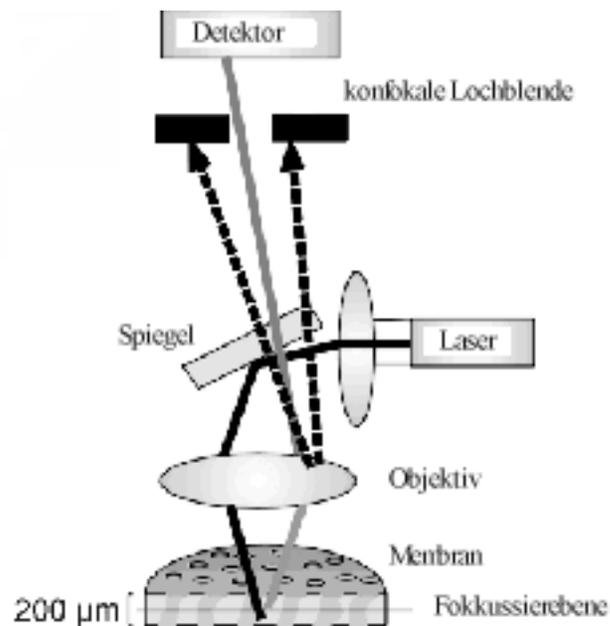


Abb.14: schematische Darstellung des optischen Prinzips der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (Denk et al. 1990 / 1991)

3. Theorie

Es ist somit möglich ein entsprechendes Objekt optisch in flache Schnitte entlang der z-Richtung zu zerlegen. Die Separation verschiedener Wellenlängen ermöglicht die simultane Messung verschiedener Farbstoffe. Diese Eigenschaft ermöglicht es, das markierte Membranskelett und das gebundene markierte Protein in einem Bild zu visualisieren.

4. Material und Methoden

4. Material und Methoden

4.1 Fermentation des rekombinanten *E.coli* JM 105

Der verwendete Stamm JM 105 *E. coli*, Vector pBTac2, C23S Mutante wurde von H. Slusarczyk IET (Slusarczyk et al. 1998) zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung erfolgte im fed batch, der Feed wurde nach 10 h gestartet und nach 19,5 h wurden die Zellen mit 1mM/L IPTG induziert. Die gesamte Fermentationszeit betrug 32 h.

Durchführung

Die Fermentation des rekombinanten *E. coli* erfolgte als Hochzelldichte Fermentation im fed batch. (F.Felber, 2001) Die Zellen wurden hierzu von einer Platte in 100 mL LB Medium (s. Anhang) übertragen, im Schüttelkolben angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 5,4, nach 16 h, 1%ig auf 10 L HZD- Medium im 20 L Fermenter angeimpft.

Der Feed wurde bei einer erreichten OD₆₀₀ im Fermenter von 17 (nach ca.10 h) gestartet. Die computergestützte Regelung erfolgte über eine angenommene spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ von 0,03 h⁻¹. 19,5 h nach Beginn der Fermentation wurden die Zellen mit 1mM/L IPTG induziert um die FDH Produktion zu starten. 12,5 h später wurde die Fermentation beendet. Die Zellausbeute betrug 2,1 kg.

4.2 Zellaufschluß

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation, die Zellmasse wurde portioniert und eingefroren Die abzentrifugierten, eingefrorenen Zellen wurden zum Zellaufschluß im Aufschlusspuffer (50 mM Kpi oder 50 mM Tris/HCl) 40%ig suspendiert

Der Zellaufschluß wurde je nach Volumen der aufzuschließender Zellsuspension gewählt. Kleinere Volumina bis 50 ml wurden im Destintegrator oder mit Ultraschall aufgeschlossen, größere Volumina mittels Kugelmühle.

4.2.1 Ultraschallaufschluß

Nur kleinere Volumina können mit der Ultraschallmethode aufgeschlossen werden, der Vorteil liegt darin, dass es hier zu keinem Verlust von Homogenat kommt. Um die optimalen Aufschlussbedingungen auszutesten, wurde zunächst einen Aufschlusskinetik aufgenommen.

4. Material und Methoden

Hierzu wurde die FDH Aktivität in diskreten Zeitabständen bei gleichbleibender Beschallung bestimmt.

Durchführung

Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon Tubes gefüllt und im Eisbad 3*10 min mit 100% Leistung und einer jeweils 5 minütigen Unterbrechung zum Abkühlen der Suspension beschallt.

4.2.2 Desintegrator oder Kugelmühlenaufschluß

Sowohl im Desintegrator als auch in der Kugelmühle wurden die Zellen mechanisch mit Glasperlen Ø 0,2 µm aufgeschlossen.

Im Desintegrator S erfolgte der Aufschluß ½ h lang bei einer Drehzahl von 6000/min im Eisbad mit maximales Füllvolumen (100 ml Homogenat und 250 ml Glasperlen).

Der Aufschluß in der Kugelmühle erforderte 4 Passagen bei einer Drehzahl von 2500 min, einem Füllvolumen von 85% (425ml Glasperlen), bei Raumtemperatur, wobei die Vorlage mittels Eisbad gekühlt wurde

4.3 Analytische Methoden

4.3.1. FDH Aktivitätsbestimmung

Zur Quantifizierung der FDH wude die volumetrische Aktivität herangezogen. Diese konnte mittels eines optischen Tests über die NADH-Bildung bestimmt werden. Sie dient, ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtproteinkonzentration, zur Bestimmung der spezifischen Aktivität.

Tab.1 Pipettierschema des volumetrischen FDH-Aktivitätstests

Lösung	Volumen [ml]	Konzentration im Test [mM]
1 M Natriumformiat	0,5	162
10 mM NAD+	0,5	1,62
100 mM KPi Puffer pH 7,5	2,0	64,5
Enzymlg.	0,1	0,02-0,04 U

Die Reaktion wird durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Die Messung erfolgt 1 min bei 340 nm und 30°C

4. Material und Methoden

Die volumetrische Aktivität wird berechnet nach Gleichung 24

$$U/ml = \frac{\Delta E / \text{min} * V}{\epsilon * d * v} * f \quad [24]$$

ΔE : Extinktionsänderung bei 340 nm
[min^{-1}]

V: Testvolumen [ml]

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient für NADH
(6,22 [$\text{l} * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$])

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

v: Probenvolumen [ml]

4.3.2 Gesamtproteinbestimmung

Die Gesamtproteinbestimmung erfolgte photometrisch nach Bradford (1976).

Hierbei wurde eine BSA Eichgerade in einem Konzentrationsbereich von 0-100 μg BSA/ml zugrundegelegt.

4.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung mit Pico Green

Die DNA-Konzentration nach der PEI-Fällung wurde mittels eines interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoffs (Pico Green P-7581 von Molecular Probes Inc., USA) bestimmt (Sambrook et al. 1989, Wittler 1996.).

Durchführung:

Um das Messreagenz zu erhalten, wird Pico Green Reagenz 1:200 mit einem 10 mM Tris Puffer 1 mM EDTA, pH 7,5 verdünnt.

Zur Messung werden jeweils 500 μL Messreagenz und 500 μL Probe in einer 1 mL Küvette miteinander vermischt und bei Raumtemperatur 5 min im Dunkeln inkubiert.

Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 480 nm die Messung bei 520 nm.

Eine Eichung erfolgte mit DNA (low molekular weight, aus Kalbsthymus, Fluka) in einem Konzentrationsbereich von 0-2000 ng/ml. Eine Linearität zeigt sich zwischen 50 und 1000 ng, Konzentrationen unter 50 ng sind mit dieser Meßmethode nicht mehr zu bestimmen.

4. Material und Methoden

4.3.4. SDS-Gelelektrophorese

Die Proteinzusammensetzung verschiedener Proben kann mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt, bzw visualisiert werden. Die Gelelektrophorese wurde hierbei unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die im Auftrennung im elektrischen Feld erfolgt aufgrund der SDS-Absättigung proportional zum Molekulargewicht. Ein Standard ermöglicht hierbei eine Einordnung der Banden. Die Proteinbanden wurden nach der Methode von Blum et al. 1987 silbergefärbt (Rabilloud 1992). Es wurden 12,5 %ige Gele verwendet.

4.4 Polyethylenimin zur Flokkulation des *E. coli* Homogenats

Der Einfluß verschiedener PEI-Konzentrationen auf die Aggregation im biomassehaltigen Überstand sollte getestet werden.

Durchführung:

In graduierten Reagenzgläsern wurde sowohl 40%iges, als auch 10%iges *E. coli* Homogenat mit Konzentrationen von 0/ 0,2/ 0,4/ 0,6/ 0,8/ 1,0 und 1,5 %w/v PEI versetzt. Die Gläser wurden zehn Minuten im Überkopfschüttler gut durchmischt und der Feststoff für weitere zehn Minuten sedimentieren lassen. Zur Messung der Partikelgrößenverteilung wurden die Ansätze nochmals aufgeschlämmt und eine Probe entnommen. Nach Zentrifugation 5 min bei 4000 U/min wurde die FDH Enzymaktivität und die Gesamtproteinkonzentration im Überstand gemessen.

Die Partikelgrößenverteilung wurde mit einem *Casy* Coulter Counter bestimmt. (Manual Casy Systems, Amersham Bioscience, Freiburg)

4.5 Benzonasebehandlung des Homogenats

Die Endonuklease Benzonase spaltet langkettige DNA in kürzere Oligonukleotide. (Benzonase Manual, Merck Darmstadt, Deutschland)

Durchführung

Das 40%ige Homogenat in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 wurde mit 5 U pro g Biomasse versetzt und 5 mM MgCl₂ zugegeben. Der Ansatz wurde 1,5 h bei RT inkubiert.

4. Material und Methoden

4.6 Kopplung des Farbstoffliganden (Procion red) an die Streamline AC-Matrix

Die Kopplung eines Farbstoffs an die Streamline AC-Matrix von Amersham Bioscience (Uppsala Schweden) erfolgte nach Chang et al. (1995).

Durchführung:

10 g Matrix wurden mit 10 ml Farbstofflösung (20 mg/L Reaktiv Red von Sigma) versetzt und bei 800 rpm und RT im Erlenmeyerkolben 40 min geschüttelt. Nach Zugabe von 2 ml 22% (w/v) NaCl-Lösung wurde die Suspension für weitere 1,5 h bei RT geschüttelt. 100 mg Na_2CO_3 wurden zugegeben und der Ansatz danach bei 60°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Ungebundener Farbstoff wurde nach der Immobilisierungsreaktion mit 1 M NaCl in 25%igem Ethanol, 4 M Harnstoff und 0,5 M NaOH ausgewaschen. Nach Equilibrierung mit dem entsprechendem Puffer konnte das Material zur Adsorption benutzt werden.

Die Immobilisierung des Farbstoffs erfolgt bei dieser Reaktion über die freien OH-Gruppen der Agarose Adsorbermatrix Abb.15

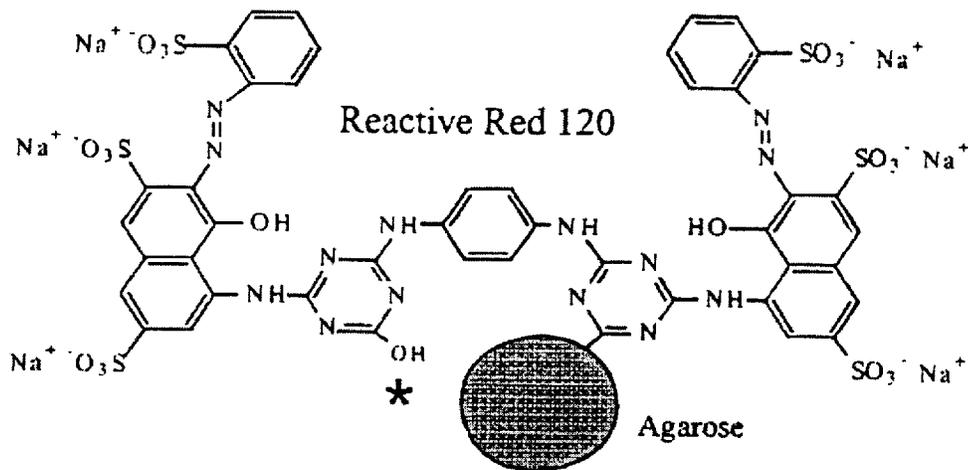


Abb. 15 Schematische Darstellung des Farbstoffliganden Reactive Red 120 an den Adsorber

4. Material und Methoden

4.6.1 Bestimmung der Farbstoffligandendichte

Um die Effektivität der Immobilisierung abschätzen zu können, wurde die Ligandendichte photometrisch nach saurer Hydrolyse bestimmt.

Durchführung

1 g des Adsorbers wurde mit 50 mL 8 M HCl versetzt und 20 min bei 80°C inkubiert. Das Lysat wurde 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 8 m NaOH neutralisiert. Die Adsorption der Lösung wurde bei 543 nm bestimmt.

Zur Referenzwertbestimmung wurde 1 g eines unmodifizierten Streamline AC Adsorbers entsprechend behandelt.

Mit einem molaren Extinktions Koeffizienten von 53,25 l/mol * cm ergab sich eine Farbstoffkonzentration von 0,7 µmol/g Adsorber, was einem Zehntel der Farbstoffligandendichte (6,8 µmol/mL Adsorber) entspricht, die von Chang et al (1995) erzielt werden konnte.

4.7 Stabilitätsuntersuchungen der FDH

4.7.1 Stabilität der FDH bei RT

Die Stabilität bei Raumtemperatur gibt Auskunft über mögliche Prozesszeiten ohne Aktivitätsverlust des Enzyms allein durch die Prozessdauer und wird im wesentlichen von der Proteaseempfindlichkeit bestimmt.

Durchführung:

Zur Stabilitätsbestimmung der FDH wurden 20 ml klarer Homogenatüberstand (Tris/HCl pH 7,5) bei Raumtemperatur inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und auf FDH-Aktivität untersucht.

4.7.2 pH-Stabilitätsuntersuchung der FDH

Der pH-Tolereanzbereich des Enzyms gibt Informationen zur Festlegung des Auftrags- bzw. Elutions pH sowie den möglichen Bereich für einen pH-Shift zur Elution.

4. Material und Methoden

Durchführung

20 ml klarer Homogenatüberstand wurden mit HCl, bzw. NaOH auf pH 3,0 bzw. pH 12 titriert. Jeweils nach Einstellung einer pH-Einheit wurde nach 30 min eine Probe entnommen und nach Zentrifugation die FDH-Aktivität mit Hilfe des Enzymtests bestimmt. Die Volumenvergrößerung durch die Titration wurde bei der Aktivitätsbestimmung eingerechnet.

4.8 Chromatographische Methoden zur Prozessentwicklung und -optimierung

4.8.1 Adsorptionskinetiken zum Adsorberscreening

Die Aufnahme von Bindungskinetiken kann zum Adsorberscreening herangezogen werden und dient zur Bestimmung der Reaktionszeit bis zur Einstellung des Bindungsgleichgewichts zwischen Adsorber und Zielprotein. Die Kinetiken werden im Satzreaktor ausgeführt und sind daher sehr einfach aufzunehmen.

Durchführung:

Für das hier zu untersuchende System wurde jeweils 1 g des equilibrierten Adsorbers in einem 25 mL Erlenmeyerkolben vorgelegt und mit 1:3 mit Puffer verdünnten klarem Homogenatüberstand versehen. Die Adsorberproben und eine Kontrolle ohne Adsorberzusatz wurden bei 150 rpm geschüttelt, in diskreten Zeitabständen Proben entnommen und auf ihre FDH-Aktivität getestet.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die gewählten Adsorber und den entsprechenden Equilibrierungspuffer.

Tab. 2 Adsorber und gewählte Bindungsbedingungen zur Adsorptionskinetikmessung

DEAE	50 mM Tris/HCl pH 7,5
Q-XL	50 mM Tris/HCl pH 7,5
Phenyl	50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄
Streamline©RED	50 mM Tris/HCl pH 7,5

Bindungsbedingungen wurden für die Ionentauscher DEAE und Q-XL bei pH 7,5 und einer Leitfähigkeit unter 5 mS/cm gewählt. Diese Bedingungen wurden auch für den roten Adorber (Streamline Red) übernommen.

4. Material und Methoden

4.8.1.1 Bestimmung der Bindungsbedingungen für die HIC

Für die HIC mit Phenylsepharose musste zunächst die kritische Ammoniumsulfatkonzentration ermittelt werden, bei der das Zielprotein nicht ausgefällt wird. Hierzu wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt.

Durchführung:

Gleiche Mengen klar zentrifugierter Homogenatüberstand wurden mit ansteigenden Mengen Ammoniumsulfat zwischen 0-30% w/v (0-5 M) versetzt, im Überkopfschüttler geschüttelt, bis das Salz vollständig gelöst war und dann abzentrifugiert (5000 u/min, 10 min).

Im Überstand wurde die FDH Aktivität und das Gesamtprotein bestimmt.

4.8.2 Bestimmung der Biomasse-Adsorberinteraktion mittels Puls-Antwort Experiment

Die Biomasserückhaltung ist für die EBA relevant, da eine starke Bindung von Zelldebris, die Integrität des ideal fluidisierten und expandierten Adsorberbetts in Frage stellt.

Der Versuchsaufbau wurde in Abschnitt 3.3.3 dargestellt. Es wurde eine Glassäule mit 1 m Länge und einem Durchmesser von 20 mm verwendet. Das Adsorbervolumen betrug 31,4 mL was einer sedimentierten Betthöhe von 10 cm entspricht

Durchführung

In eine im Institut für Enzymtechnologie entworfene und gebaute Säule wurden zunächst bis zu einer Höhe von 1-2 cm 0,5 mm Ø Glasperlen zur Verbesserung der Anströmung eingefüllt. Am oberen Ende der Säule befindet sich ein variabler Adapter.

Der Adsorber wird in Puffer (50 mM KPi pH 7,5) equilibriert und fluidisiert. Ein Teil des Homogenats wird mit Puffer verdünnt, bis die optische Dichte bei 600nm im linearen Messbereich des Photometers liegt (OD 0,5-0,7). Ein Puls dieser biomassehaltigen Lösung wird aufgegeben und die Extinktion bei 600nm vor und nach der Säule gemessen. Abb. 16 verdeutlicht schematisch den Versuchsaufbau.

4. Material und Methoden

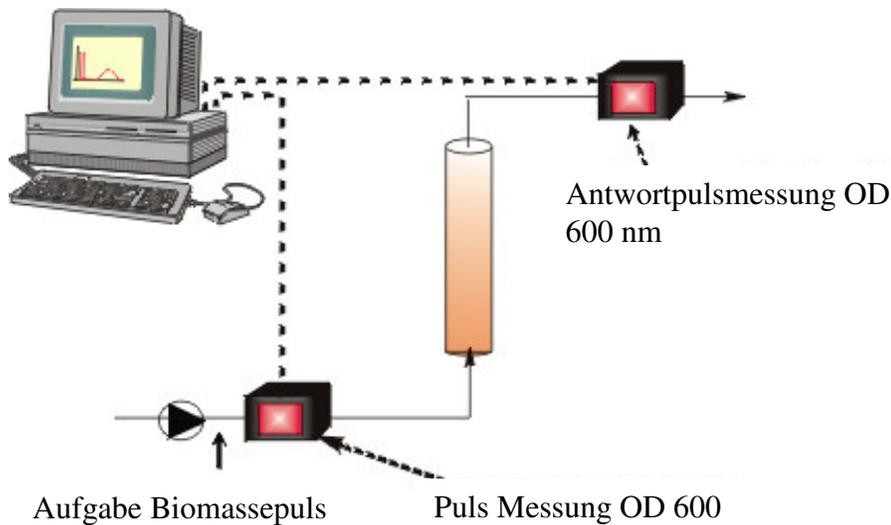


Abb. 16 schematische Darstellung zur Aufgabe eines Biomassepulses

4.8.3 Aufnahme von Adsorptionsisothermen

Adsorptionsisothermen ermöglichen die Berechnung des k_a -Wertes und der Gleichgewichtskapazität als Funktion der Proteinkonzentration im Fluid. Die Optimierung der Kapazität kann durch Aufnahme von Adsorptionsisothermen unter variierenden Bedingungen erfolgen

Durchführung

Steigende Mengen des zuvor equilibrierten Adsorbers (50 mM Tris/HCl pH 7,5) wurden in 50mL Erlenmeyerkolben eingewogen, die jeweils gleiche Menge an klarem Homogenat (50 mM Tris/HCl pH 7,5) in die Kolben gegeben und die Suspensionen auf einem Schüttler 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Gleichgewichtseinstellung wurden den Kolben Proben entnommen und die FDH-Aktivität bestimmt.

4.8.4 RTD-Messung

Zur Messung der Verweilzeitverteilung wurde der gleiche Aufbau benutzt wie zum Puls-Antwort Experiment. Ein nicht interagierender Tracer wie Li^+ dient zu Messung.

Durchführung

Der equilibrierte Adsorber wird in der Säule mit 15 % igem E.coli Homogenat in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 expandiert ($v = 8,3 \cdot 10^{-4}$), dann wird ein 500 μL Puls einer 5,0%igen LiCl Lösung über eine Probenschleife injiziert (Äkta Explorer System, Amersham Bioscience

4. Material und Methoden

Biotech, Uppsala Schweden). Die Lithiumionen werden mittels einer ionenselektiven Elektrode detektiert (Fernández-Lahore et al. 2001). Der Antwortpuls kann über die Momentenmethode ausgewertet werden. Da keine direkte Proportionalität zwischen Ionenkonzentration und dem elektrischen Signal besteht, ist es notwendig die ionenselektive Elektrode vor der Messung zu kalibrieren.

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt

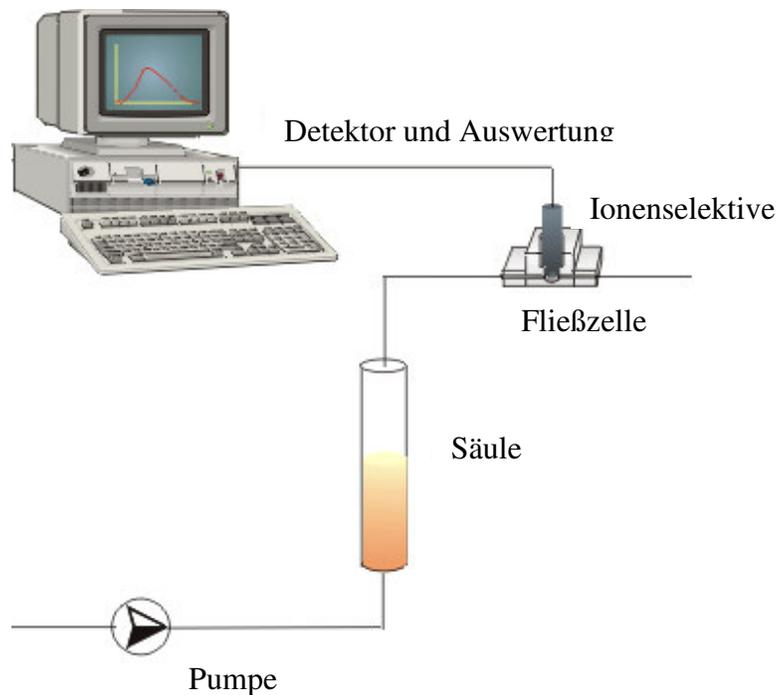


Abb. 17: schematischer Versuchsaufbau zur Messung der Verweilzeitverteilung

4.8.5 Bettexpansion

Die von Dichte und Viskosität des Homogenats abhängige Bettexpansion wurde mit einer 20mm Ø Säule aufgenommen. Die Auswertung nach Richardson und Zaki liefert den Expansionsgrad und die optimale lineare Fließgeschwindigkeit wird aus dem Arbeitsdiagramm abgeleitet.

Durchführung

Die Höhe des Bettes wurde nach Equilibrierung mit Biomasse haltigen Lösungen, von 0%, 5%, 10%, 15% Gehalt Biofeuchtmasse, bestimmt. Zusätzlich wurden unterschiedliche lineare Fluidgeschwindigkeiten von $3,3 / 5 / 6,7$ und $8,4 \cdot 10^{-4}$ m/s getestet.

Eine Auftragung $\ln U$ gegen $\ln \varepsilon$ führt zum Arbeitsdiagramm, aus dem die optimalen Arbeitsbedingungen abzulesen sind.

4. Material und Methoden

4.8.6 Durchbruchskurven

Die Aufnahme von Durchbruchskurven in einer kleinen Festbettsäule XK 16/20 (Amersham Bioscience, Uppsala Schweden) ermöglicht die Bestimmung der dynamischen Kapazität und des vorliegenden Diffusionsmechanismus. Mit dem daraus zu bestimmenden Diffusionskoeffizienten D_p kann der Durchbruch in der EBA-Säule simuliert werden.

Durchführung:

Eine 16 mm \varnothing Säule mit 15 cm Betthöhe wurde mit klarem Überstand (50 mM Tris/HCl pH 7,5 und 8,9 mS/cm) solange beaufschlagt bis die FDH Aktivität am Säulenausgang der im Auftrag entsprach. Das Experiment wurde bei unterschiedlichen Fluidgeschwindigkeiten von 3,3/5/6,7 und $8.4 \cdot 10^{-4}$ m/s durchgeführt.

4.8.7 Optimierung der Elutionsbedingungen

Neben der optimalen Bindung ist auch die Elution entscheidend von Bedeutung, so können mit entsprechend gesetzten Stufen oder Gradienten Begleitprotein abgetrennt, und ein besserer Aufreinigungserfolg erzielt werden.

Durchführung:

Eine 6mm \varnothing Säule mit einer Betthöhe von 10 cm wurde mit 20 mL klarem Überstand (6 U/mL FDH Aktivität) beladen. Mit Hilfe eines Äkta explorer system wurden unterschiedliche Gradienten angelegt.

4.9 Adsorptionsisothermen an der Phenylsepharose

Zur Optimierung einer hydrophoben Interaktionschromatographie wurde eine Adsorptionsisotherme der FDH im Überstand der PEI Fällung aufgenommen. Die Ammoniumsulfatkonzentration war zuvor im Vorversuch bestimmt worden.

Durchführung

Der Überstand der PEI-Fällung wird mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 1mol/L versetzt und geschüttelt bis das Salz vollständig gelöst ist. Ein Teil der Phenylsepharose wird mit KPi Puffer pH 7,5 + 1M Ammoniumsulfat equilibriert. Im 50 ml Schüttelkolben werden in 10 ml Überstand steigende Mengen Adsorber suspendiert.

4. Material und Methoden

Die Kolben werden so lange unter schütteln inkubiert, bis sich das Adsorptionsgleichgewicht eingestellt hat. Die FDH Aktivität im Überstand wird gemessen.

4.9.1 Durchbruchskurve der FDH auf der Phenylsepharose

Die Durchbruchskurven wurden in einer kleinen Säule 1 cm Ø und 12,2 cm Betthöhe am Äkta Explorer System (Amersham Bioscience) durchgeführt.

Durchführung

Die Phenylsepharosesäule wird zunächst mit 10 Säulenvolumen 50 mM KPi Puffer pH 7,5 + 1 M Ammoniumsulfat equilibriert. Der Fällungsüberstand wird mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 1 mol/l versetzt und solange gerührt bis das Salz vollständig gelöst ist. Der Auftrag erfolgt mit einer Fließgeschwindigkeit von 2,5 cm/min. Der Durchlauf wird in 2 ml Fraktionen aufgefangen und auf FDH-Aktivität überprüft.

4.10 Methoden zur Konfokalmikroskopie

Zur konfokalmikroskopischen Untersuchung der Proteinbindung an dem entsprechenden Träger, mussten die Proteine und/oder die Adsorbermaterialien mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden.

4.10.1 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Es ist möglich Fluoreszenzfarbstoffe an die Aminofunktion von Proteinen zu koppeln.

Die Markierung der Proteine erfolgte nach Herstellerangaben von Molecular Probes (Leiden) oder Amersham Bioscience (Uppsala, Schweden). Der Farbstoff lag in 10 µg Portionen im Eppendorfgefäß vor.

Durchführung

Zunächst wird eine Stammlösung des Proteins von 10 mg/ml Protein in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,2 hergestellt. Es wird 1 ml entnommen und auf den Farbstoff gegeben. Die Farbstoff-Protein-Lösung wird im Dunkeln im Überkopfschüttler ca 2 h bei RT inkubiert.

4. Material und Methoden

Die Trennung des markierten Farbstoffs von ungebundenem Farbstoff erfolgt über kleine Gelfiltrationssäulen (PD-10Amersham Bioscience, Uppsala Schweden).

Hierzu werden die Säulen mit dem gewünschten Puffer (50 mM Tris/HCL pH 7,5 oder 50 mM Acetatpuffer pH 4,5) equilibriert, das Farbstoff-Protein-Gemisch wird aufgegeben und die markierten Proteinmoleküle selektiv aufgefangen.

9 ml der Stammlösung s.o. wurden mit 1 ml der markierten Proteinlösung gemischt und in den entsprechenden Versuchen eingesetzt.

4.10.2 Fluoreszenzmarkierung der Membran

Das Membranskelett sollte durch Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffs an die OH-Gruppen der modifizierten Cellulosestruktur im Konfokalmikroskop sichtbar gemacht werden.

Durchführung

Die Ionentauschermembran wurde zurechtgeschnitten und in einem geeigneten Ultrafiltrationsmodul zwischen zwei Mikrofiltrationsmembranen platziert. Nach Equilibrierung mit 0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,2 wurden 10 ml Farbstofflösung (10µg/10ml) im Kreis über Nacht durch das Modul gepumpt. Die Membran wurde dann mit VE-Wasser, 20% EtOH und Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Equilibrierung mit dem geeigneten Puffer.

4.10.3 Bindung der fluoreszenzmarkierten Proteine an der Membran

Die nach Abschnitt 4.9.2 vorbehandelte Membran sollte nun mit Protein, bis zum Bindungsgleichgewicht, beladen werden.

Durchführung

Die Proteinlösung wurde hierzu über Nacht bei RT im Kreis über die Membran gepumpt.

4. Material und Methoden

4.10.4 Präparation der Membran

Um die Membran mit gebundenen Protein im Konfokalmikroskop zu betrachten, wurde die Ionenaustauschmembran aus dem Ultrafiltrationsmodul entnommen. Es wurden Kreise von 1 cm \emptyset ausgestanzt und diese auf einen entsprechenden Objektträger gelegt. Während der konfokalen Messungen musste die Membran immer feucht gehalten werden.

4.10.5 Proteinadsorption am Streamline Red Adsorber

Um die Homogenität der Liganden am Streamline Red Adsorber zu testen, wurde der Adsorber bis zum Gleichgewichtszustand mit markierter FDH inkubiert.

Durchführung

1 g Adsorber wird mit 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 equilibriert. Im 50 ml Schüttelkolben wurden 1 g Adsorber mit 10 ml Lösung (s. Abschnitt 4.9.1) versehen und die Suspension 2 h bei RT geschüttelt.

4.11 Viskositätsmessung

Die Viskositäten der Lösungen wurden mittels eines Rotationsviskosimeters bestimmt in Bezug auf die Viskosität von Wasser als 0,00097 Pa.s bei Raumtemperatur.

5. Ergebnisse und Diskussion

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Vorversuche zur FDH

Einige Vorversuche wurden ausgewählt, um die Stabilität und das Verhalten der FDH in Abhängigkeit von Parametern wie Temperatur, pH-Wert oder Ammoniumionenkonzentration zu bestimmen.

5.1.1 Ultraschallaufschluß der FDH exprimierenden *E. coli* Zellen

Um einen möglichst effizienten Aufschluß zu erhalten, ist die Kenntnis der Aufschlußkinetik für das entsprechende System entscheidend. Die Konzentration des Zielproteins soll bei minimaler Aufschlusszeit maximal sein.

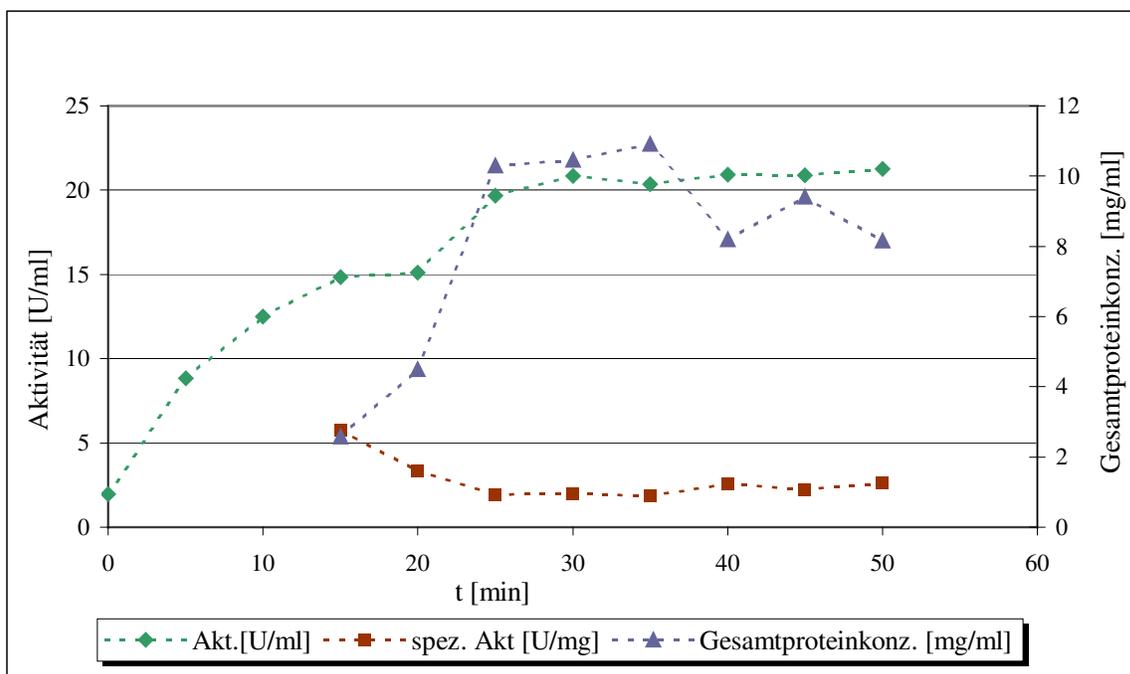


Abb. 18: Ultraschallaufschlussskinetik einer 40% igen *E. coli* Suspension, 50 mM KPi pH 7,0

Wie in Abb.18 verdeutlicht wird, ist schon eine FDH-Aktivität zu messen während die Proteinkonzentration noch unter der Nachweisgrenze liegt. Der Aktivitätstest ist offensichtlich wesentlich sensitiver als die Gesamtproteinbestimmung. Im weiteren Verlauf zeigt

sich eine kontinuierliche Zunahme der Proteinkonzentration in Korrelation zur steigenden FDH Aktivität. Nach 30 min ist die maximale FDH Aktivität erreicht.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1.2 Bestimmung der kritischen Ammoniumsulfatkonzentration

Die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) erfordert die Zugabe von Salzen (s. Abschnitt 3.3.3.1.5). Das aufgrund seiner azeotropen Eigenschaften meist verwendete Salz ist Ammoniumsulfat. Die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentration sollte dabei nicht zu hoch gewählt werden, um eine Aussalzung des Zielproteins zu vermeiden, und nicht zu niedrig, um eine optimale Bindung zu gewährleisten.

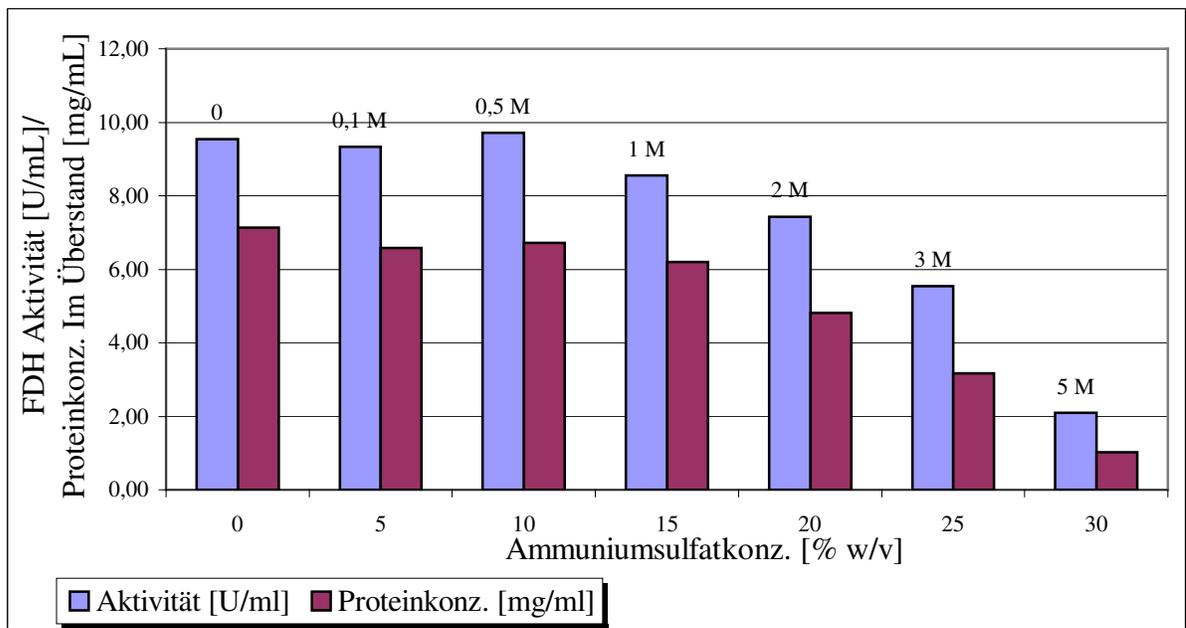


Abb. 19: fraktionierte Ammoniumsulfatfällung der FDH, klarer Homogenatüberstand (Tris/HCl pH 7,5) + Ammoniumsulfat, nach Zentrifugation 10 min 5000 rpm (Hettich Zentrifuge)

Aus Abb. 19 ist zu entnehmen, daß Ammoniumsulfatkonzentration größer als 1 M wenig sinnvoll sind, da hier schon die FDH Aktivität bis zu 20 % sinkt.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.2 Fed batch Hochzelldichte Fermentation der rekombinanten *E. coli* JM 105 C23S

Mutante

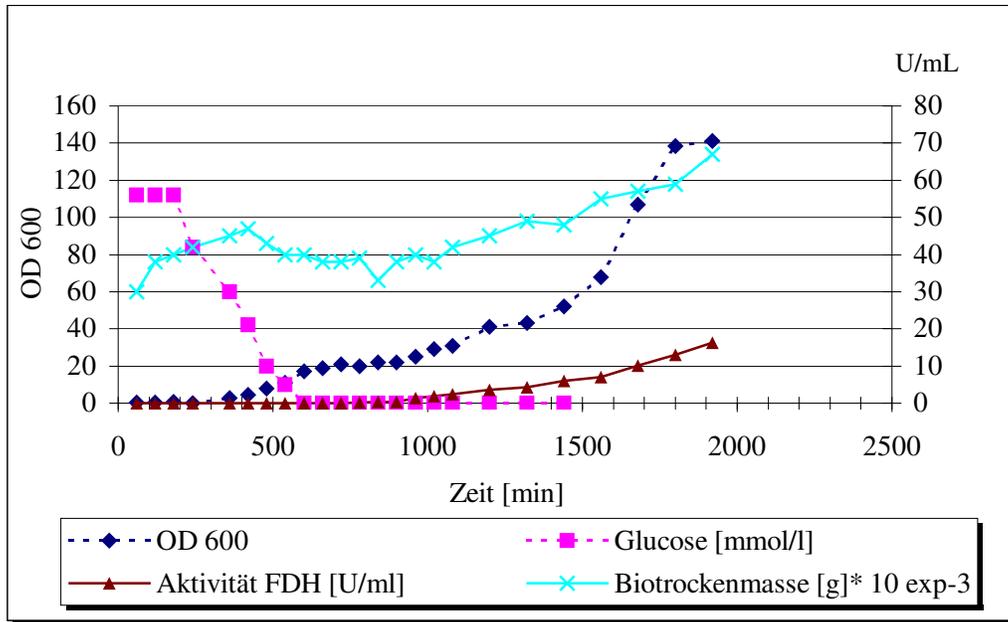


Abb. 20: Wachstumskurve des rekombinanten *E. coli* JM 105 im Fed batch HZD-Medium Anfangsvolumen 10 l

Die Wachstumskurve (Abb. 20) zeigt nach einer Lag-Phase im vorderen Bereich von ca. 4 h. ein exponentielles Wachstum, die Zellzahl steigt bei gleichzeitigem Verbrauch von Glukose. Nach 10 h ist einer Glucoselimitierung erreicht und die Kultur geht zeitweise in eine stationäre Phase über, bis die Zufütterungsstrategie greift und erneut das exponentielle Wachstum einsetzt. Betrachtet man jedoch die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ hier definiert über die Biotrockenmasse als

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t}$$

μ : spez. Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]
 x : Biotrockenmasse [kg/l]
 x_0 : Biotrockenmasse zum Zeitpunkt

5. Ergebnisse und Diskussion

genauer, ist zu erkennen, dass die spezifisch Wachstumsgeschwindigkeit in der ersten exponentiellen, unlimitierten Wachstumsphase mit $0,051 \text{ h}^{-1}$ doppelt so hoch liegt wie in der zweiten exponentiellen Phase mit $0,025 \text{ h}^{-1}$. Dies zeigt die gewollte Glukoselimitierung der Zellen während der gesamten Zufütterung auf. Durch die Limitierung soll die Acetatbildung vermieden werden.

Nach Induktion mit IPTG steigt die FDH Aktivität an, erst jetzt wird von den Zellen das Enzym gebildet. Die stationäre Phase nach 30 h ist auf eine einsetzende Sauerstofflimitierung zurückzuführen.

Die sich ergebenden Daten bezüglich dieser Kultivierung sind in Tab. 3 aufgeführt

Tab.3 Daten und Ergebnisse der rekombinanten *E. coli* Kultivierung

Endvolumen	11 L
Biofeuchtmasse	1800 g
Biotrockenmasse	0,076 kg/L
FDH Aktivität	178 640 U
Produktausbeutekoeffizient (Units FDH/g Biotrockenmasse)	213,7 U/g

Da die Kultivierung nicht optimal verlaufen ist und etwas abweichend von der Methode von Stephan Felber durchgeführt wurde, sind leider keine Vergleiche anzustellen und Durchschnittswerte anzugeben. Setzt man jedoch einen Biofeuchtmasseanteil von ca. 30 % bei Hochzelllichtfermentationen voraus, liegt man hier mit ca. 17% wesentlich darunter. Durch diese Kultivierung wurde jedoch ausreichend FDH für eine Aufreinigung im Pilotmaßstab bei einer Beladung von 17 U/g Adsorber zur Verfügung gestellt.

5.3 Prozessentwicklung und –optimierung

5.3.1 Prozessrelevante Stabilitäten der FDH

5.3.1.1 FDH Stabilität bei Raumtemperatur

Wichtig für einen erfolgreichen Prozess ist die Stabilität des Enzyms möglichst bei Raumtemperatur, um zusätzliche Kosten für eine Kühlung zu vermeiden, die bei einem scale

5. Ergebnisse und Diskussion

up entsprechend aufwendig werden kann. Abb.21 zeigt eine relativ konstante Stabilität der FDH bei Raumtemperatur über 18 h. Der Aktivitätsverlust bleibt innerhalb dieser 18h unter 10%. Liegt die Prozesszeit innerhalb dieses Zeitraums, ist somit nicht mit einem größeren FDH-Aktivitätsverlust allein aufgrund der Prozessdauer zu rechnen.

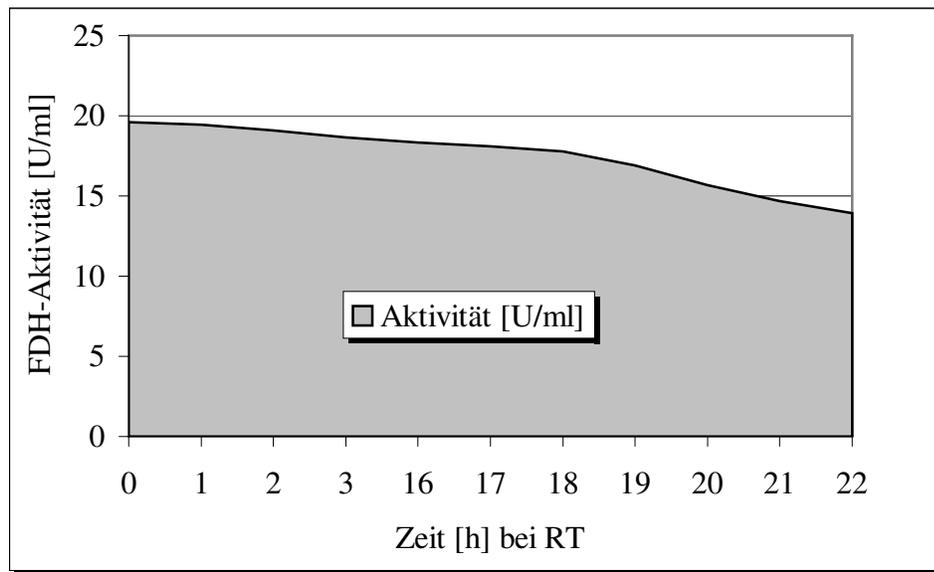


Abb. 21: Stabilitätsmessung: FDH-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei RT im Homogenatüberstand

5.3.1.2 pH-Stabilität der FDH

Der pH Stabilitätsbereich ist besonders für die Entwicklung eines Ionenaustauschchromatographie-Prozess von Bedeutung. Das Enzym muß bei dem gewählten pH-Wert des Auftrags, sowie des Elutionspuffers stabil sein. Ein etwaiger pH-Shift zur Elution kann nur im stabilen pH-Bereich des Enzyms erfolgen.

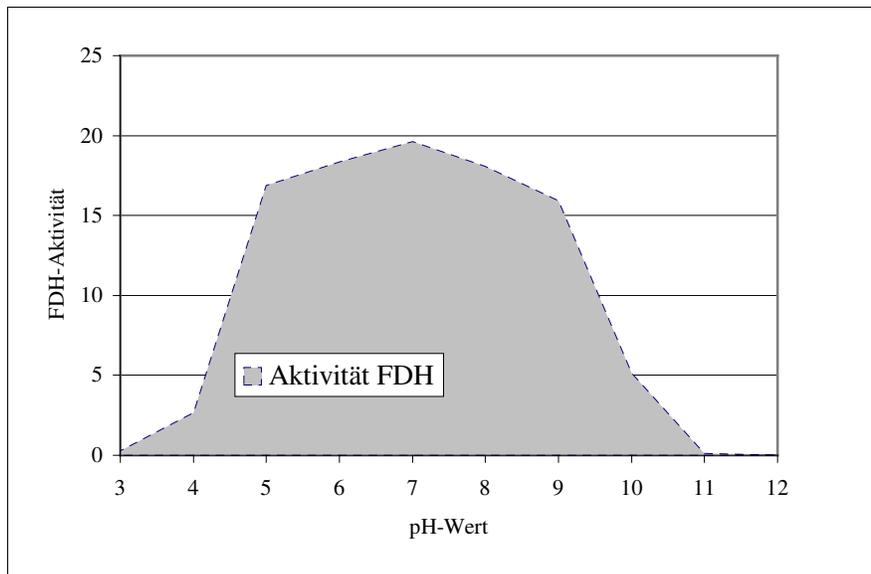


Abb. 22: FDH Stabilität in einem pH-Bereich von 3-12, Probenahme jeweils 30 min nach pH-Einstellung

Abb.22 verdeutlicht den pH-Toleranzbereich der FDH. Zwischen pH 5,0 und 9 ist die FDH relativ stabil, während pH-Werte über 10 und unter 4 eine fast vollständige irreversible Inaktivierung des Enzyms hervorrufen.

5.3.2 Fest-Flüssigtrennung unterstützt durch eine PEI-Flokkulation

5.3.2.1 Partikelgrößenverteilung im *E. coli* Homogenat vor und nach Zugabe von PEI

Wie in Abschnitt 3.3.2.4 bereits dargestellt erreicht man eine bessere Klärung einer Suspension mittels Zentrifugation durch Partikelvergrößerung. Abb. 23 verdeutlicht die Veränderungen in der Partikelgrößenverteilung eines *E. coli* Homogenates in Abhängigkeit von der PEI-Konzentration.

5. Ergebnisse und Diskussion

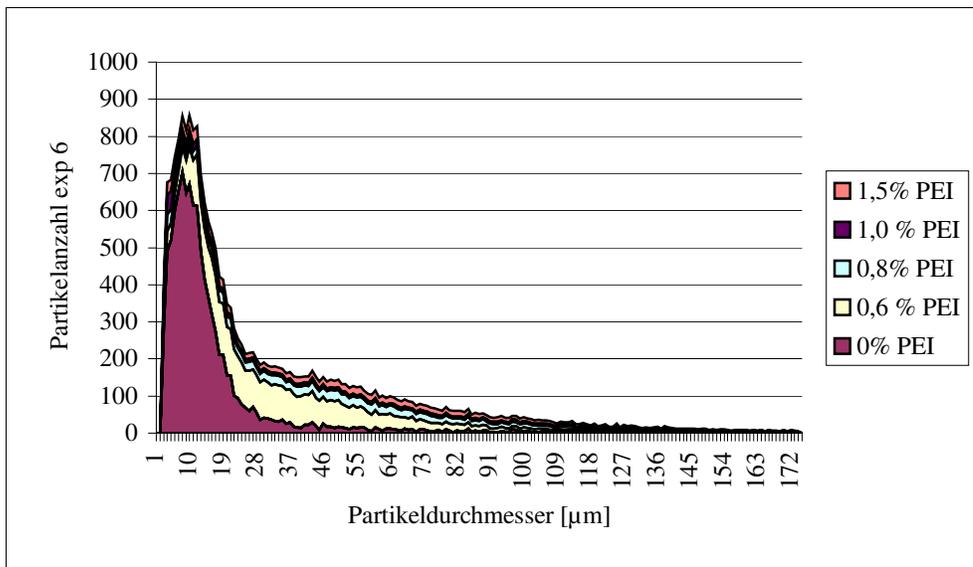


Abb. 23: Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von der PEI-Konzentration (Tris/HCl Puffer)

Eindeutig ist bei steigender PEI-Konzentration eine Verschiebung des Maximums entlang der y-Achse zu größeren Partikelradien hin zu sehen. Eine genauere Aussage ist möglich bei Betrachtung des mittleren Partikeldurchmessers in Abhängigkeit von der PEI-Konzentration (Abb. 24).

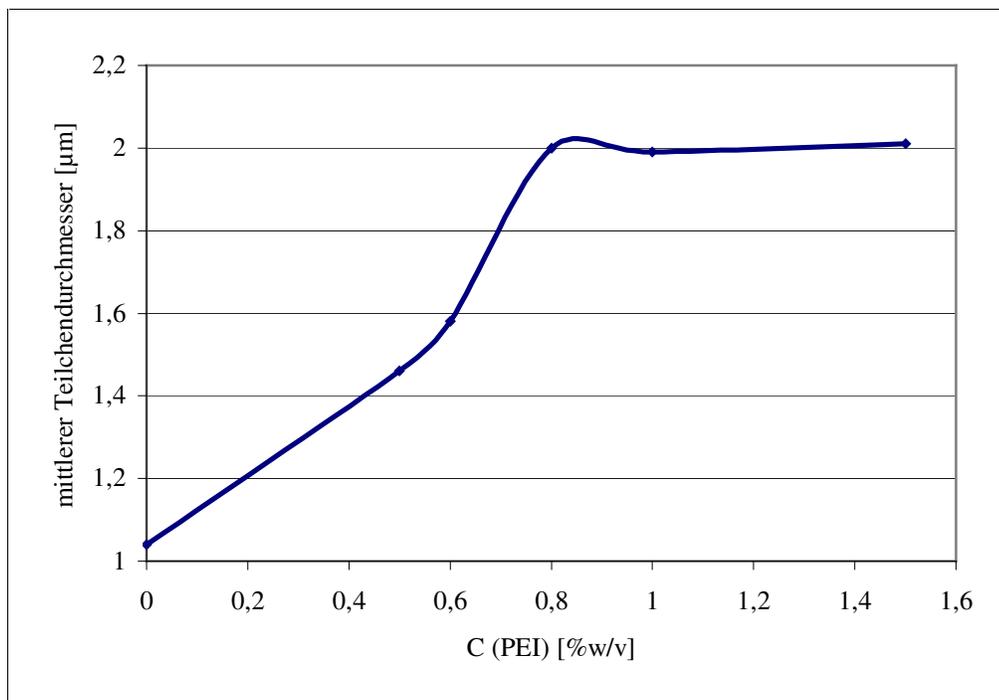


Abb. 24: Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von der PEI Konzentration, 10%ig *E. Coli* Homogenat in 50 mM Tris Puffer

5. Ergebnisse und Diskussion

Abb. 24 verdeutlicht, dass eine Verdopplung der Partikelgröße über eine PEI Zugabe möglich ist.

Es zeigt sich eine optimale PEI Konzentration, über die hinaus keine Partikelvergrößerung mehr zu erzielen ist. Da es sich bei PEI um ein mehrfach geladenes Polymer handelt, ist für die Ionenaustauschchromatographie prinzipiell ein Überschuß zu vermeiden, die ideale Konzentration liegt somit bei 0,8 % PEI w/v bei diesem speziellen E.coli Homogenat in Tris-Puffer. Für andere Homogenate und andere Puffer wäre die PEI Konzentration neu zu ermitteln.

Legt man Gleichung 3 (Abschnitt 3.3.2.2.) zu Grunde, zeigt sich, bei bekannter Winkelgeschwindigkeit, dynamischer Viskosität, sowie bekanntem Volumenstrom und Dichteunterschied, erhöht sich die Absetzgeschwindigkeit des Teilchen, bei einer Verdopplung des Partikeldurchmessers von 1 μm auf 2 μm , um das Vierfache. Ausschlaggebend hierfür ist, dass der Partikeldurchmesser in die Zentrifugengleichung zum Quadrat eingeht. Eine Partikelabtrennung erfolgt nur wenn die Sinkgeschwindigkeit des Partikels größer als die Klärflächenbelastung (Volumenstrom/Klärfläche) der Zentrifuge ist.

Legt man die Daten einer kontinuierlichen Zentrifuge (Heraeus, Contifuge Stratos) mit $z_a = 25040$, $dV/dt = 36 \text{ L}$ und $A_s = 0,37 \text{ m}^2$, sowie eine angenommene dynamischen Viskosität von $0,001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, einen Dichteunterschied von $0,1 \text{ kg/m}^3$ und $g = 0,981 \text{ m/s}^2$ zugrunde, ergibt sich nach Gleichung 4 (Abschnitt 3.3.2.2) ein kritischer Partikeldurchmesser von $1,1 \mu\text{m}$. Nur alle Partikel größer als $1,1 \mu\text{m}$ werden somit in der Zentrifuge abgetrennt. Ohne eine Partikelvergrößerung mit PEI von $1 \mu\text{m}$ auf $2 \mu\text{m}$ des durchschnittlichen Partikeldurchmessers würde die Partikelbelastung im Homogenat maximal um 50 % reduziert. Die Erhöhung des durchschnittlichen Partikeldurchmessers mittels Flokkulation bewirkt somit eine bessere Partikelabreicherung im Homogenat mittels kontinuierlicher Zentrifugation, wenn auch keine, trotz Flokkulation, vollständige Klärung der Suspension möglich ist. Die restlichen Partikel könnten beispielsweise durcheine nachgeschaltete Tiefenfiltration oder Cross-Flow-Filtration abgetrennt werden.

5. Ergebnisse und Diskussion

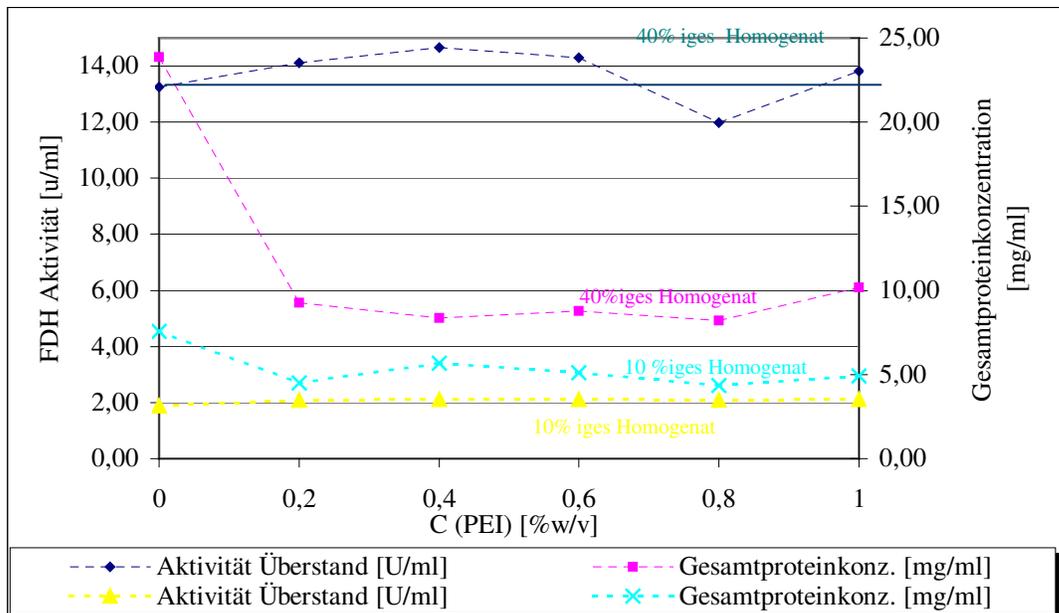


Abb. 25: Die FDH-Aktivität und Gesamtproteinkonzentration bei steigender PEI-Konzentration nach Zentrifugation 4000 U/min, 5 min, im klaren Überstand

Die enzymatische Aktivität der FDH wird durch die PEI-Fällung offensichtlich nicht beeinträchtigt (Abb. 25). Die Werte schwanken nur im Rahmen der Meß- und Verdünnungsungenauigkeit von 10-15% um einen festen Wert. Auffällig ist jedoch die Abnahme des Gesamtproteins von 62% beim 40%igem Homogenat und 35% beim 10%igem Homogenat im ersten Schritt von 0 auf 0,2% PEI, während die Proteinkonzentration bei steigendem PEI Gehalt konstant bleibt. Diese Werte liegen außerhalb des angenommenen Fehlerbereiches von 20% beim Bradfordtest, auch ein Einfluß des PEI konnte durch die Eichung gegen Puffer mit der entsprechenden PEI-Konzentration als Nullwert ausgeschlossen werden. Diese Proteinabnahme konnte bei weiteren Messungen, entsprechend den Literaturangaben (Bradford) jedoch nicht reproduziert werden (Tab 4). Der Fehlerbereich liegt bei diesen Messungen zwischen 8-37 %, das PEI scheint in diesem Fall einen Einfluß auf die Proteinbestimmung zu haben.

5. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 4: Gesamtproteinbestimmung bei Biomassekonzentrationen von 40, 30 und 20% vor und nach der PEI Fällung (50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,0)

40% Biomasse		30 % Biomasse		20% Biomasse	
c Ges. Prot. (mg/ml) vorher	c Ges. Prot. (mg/ml) nacher	c Ges. Prot. (mg/ml) vorher	c Ges. Prot. (mg/ml) nacher	c Ges. Prot. (mg/ml) vorher	c Ges. Prot. (mg/ml) nacher
9,9	10	12	8,7	7,0	6,5
8,5	10	8,3	8,7	7,8	6,5
12	10	11	7,6	8,2	6,4
12	10	12	7,6	7,4	6,4
12	11	11	7,9	8,0	6,4
12	11	11	7,9	7,1	6,4

Tabelle 4 zeigt eindeutig für sechs parallele Messungen nur geringe Schwankungen und keine eindeutige Tendenz zur Proteinabnahme.

5.3.2.2 DNA-Abreicherung bei der PEI-Flokkulation

Tab. 5: Zusammenfassung der DNA-Konzentrationsbestimmung vor und nach der PEI-Fällung (0,5%) bei wechselnder Leitfähigkeit und sinkender Biomassekonzentration, Doppelbestimmungen

40% Biomasse

Biofeucht- masse [%]	Lfkt [mS/cm]	pH vor PEI	pH nach PEI	c FDH [U/ml] nach PEI	c FDH [U/ml] vor PEI	Wieder- findung [%]	c DNA (µg/ml) vor PEI	c DNA (µg/ml) nach PEI
40	15	6,6	8,75	12,25	12,68	83	7732	38
40	9,9	6,6	9,0	13,9	13,07	92	11130	35
40	7	6,6	8,8	14,1	12,57	97	16378	32

30% Biomasse

30	15	6,6	9,1	9,7	9,30	93	3546	25
30	9,9	6,6	9,0	9,9	8,89	100	3630	22
30	7	6,6	9,2	10,4	8,89	112	3526	17,4

20% Biomasse

20	15	6,6	9,5	6,4	6,38	92	3630	17
20	9,9	6,6	9,4	6,1	6,25	90	1480	12,9
20	7	6,6	9,7	6,5	6,38	93	1990	13,3
20	4	6,6	9,5	6,3	6,38	91	4086	12,4

10% Biomasse

10	15	6,6	10,1	3,4	2,98	109	1302	67
10	9,9	6,6	10,1	3,3	3,57	90	1480	81
10	7	6,6	10,0	3,6	3,34	102	1048	28
10	4	6,6	9,8	3,3	3,41	96	1010	8,5
10	2	6,6	9,9	3,3	3,41	95	1624	7,7

5. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5 stellt eine Übersicht der ermittelten DNA-Konzentration bei gleicher PEI-Konzentration (0,5%) und variierenden Biomasse Anteilen dar.

Der pH-Wert der Lösung verschiebt sich nach PEI-Zugabe ca. 3 Einheiten in den basischen Bereich und wurde nicht korrigiert. Er liegt aber meistens unter dem kritischen pH-Wert von 10 (s. Abschnitt 5.3.2). Die Wiederfindung der FDH Aktivität im Überstand einer PEI-Fällung liegt im Schnitt über 90 %, während die DNA-Abreicherung durchschnittlich über 95% liegt. Abb. 26 verdeutlicht die DNA Abnahme für unterschiedliche Ausgangskonzentrationen von Biomasse. Weder die Biofeuchtmasskonzentration noch die DNA-Ausgangskonzentration haben hier einen Einfluß auf die Flokkulation und DNA-Fällung.

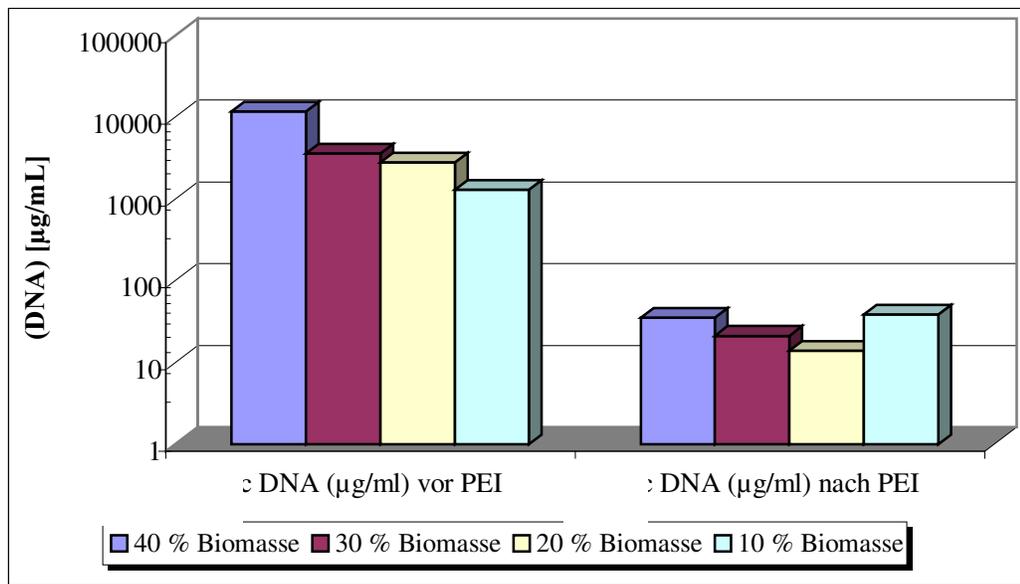


Abb.26 DNA-Konzentration vor und nach der PEI-Fällung (0,5%) im Überstand

Die Biomasseabreicherung kann durch die Menge an Sediment oder besser durch eine photometrische OD 600 Bestimmung quantifiziert werden und betrug für die gewählte PEI-Konzentration zur Fällung 100%.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.3.3 EBA-Prozess Entwicklung und Optimierung

5.3.3.1 Adsorberscreening über die Adsorptionskinetik

Fünf unterschiedliche Adsorber Streamline© DEAE, als schwacher Anionentauscher, Streamline© Q-XL, als starker Anionentauscher, Streamline© Phenyl, für die hydrophobe Interaktionschromatographie und Streamline© Red, als ein pseudo Affinitätsadsorber, wurden aufgrund der FDH-Eigenschaften für das Adsorberscreening ausgewählt. Für jeden Adsorber wurde eine Adsorptionskinetik aufgenommen (Abb. 27)

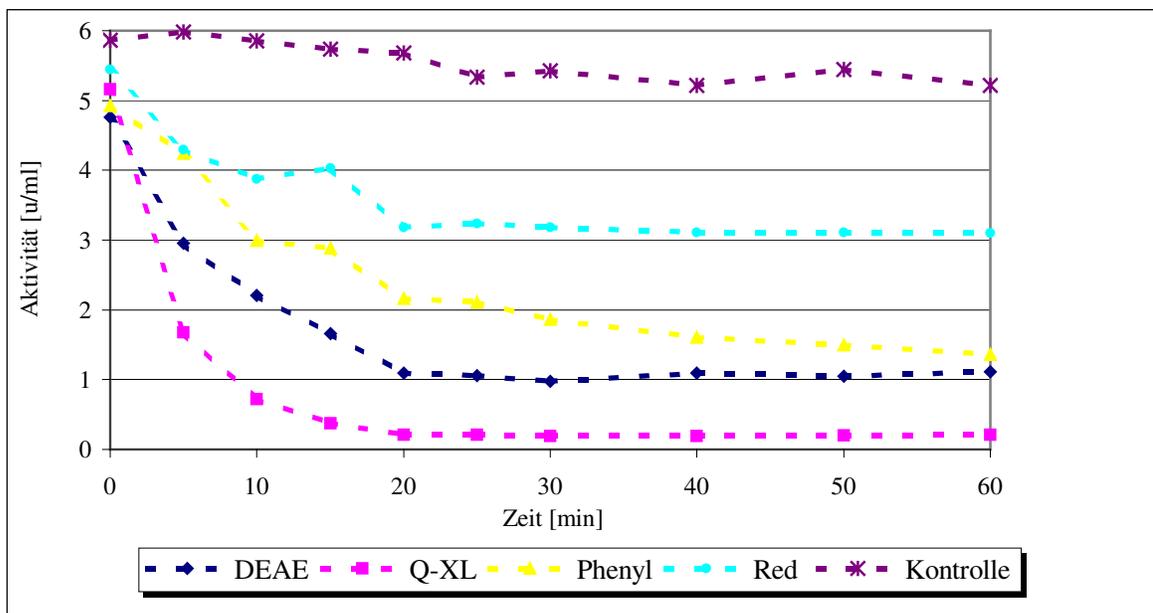


Abb. 27: Adsorptionskinetiken der Adsorber DEAE, Q-XL, Phenyl, Red, Ansatz: 1 g Adsorber und 10 ml 1:3 verdünnter klarer Überstand Tris/HCl pH 7,5

Alle Kurven zeigen über die Zeit eine gewisse Abnahme der FDH-Aktivität im Überstand. Definiert man die Differenz der Enzymaktivität zwischen der Kontrolle, dem Überstand ohne Adsorberzusatz, und den Proben als gebundene FDH wird deutlich, daß alle Adsorber, jedoch mit unterschiedlichen Kapazitäten, FDH binden. Das Bindungsgleichgewicht stellt sich bei allen Adsorbent relativ schnell schon nach 25 min ein.

Tabelle 6 zeigt die Abschätzung der Adsorberkapazitäten in Bezug auf FDH abgeleitet aus den Adsorptionskinetiken.

5. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 6: Aus den Bindungskinetiken geschätzte Gleichgewichtskapazitäten der untersuchten Adsorber

Adsorber	Geschätzte Kapazität [U/g]
DEAE	41,0
Q-XL	50,1
Phenyl	38,5
Red	21,0

Eine genauere Bestimmung der Gleichgewichtskapazität ermöglichen Adsorptionsisothermen. Es ist jedoch ein eindeutiger Trend zu sehen, vom starken zum schwachen Anionentauscher, über Phenylseparose zur roten Sepharose.

5.3.3.2 Biomasse-Adsorber Interaktion

Die Adsorption von Biomasse an den Adsorberpartikeln reduziert nicht nur deren Kapazität, es kann auch zur Aggregationbildung in der Säule und damit zu Ausbildung von Totzonen kommen. Eine Transmission von mindestens 0,9 muß erreicht werden, um einen stabilen EBA-Prozess entwickeln zu können.

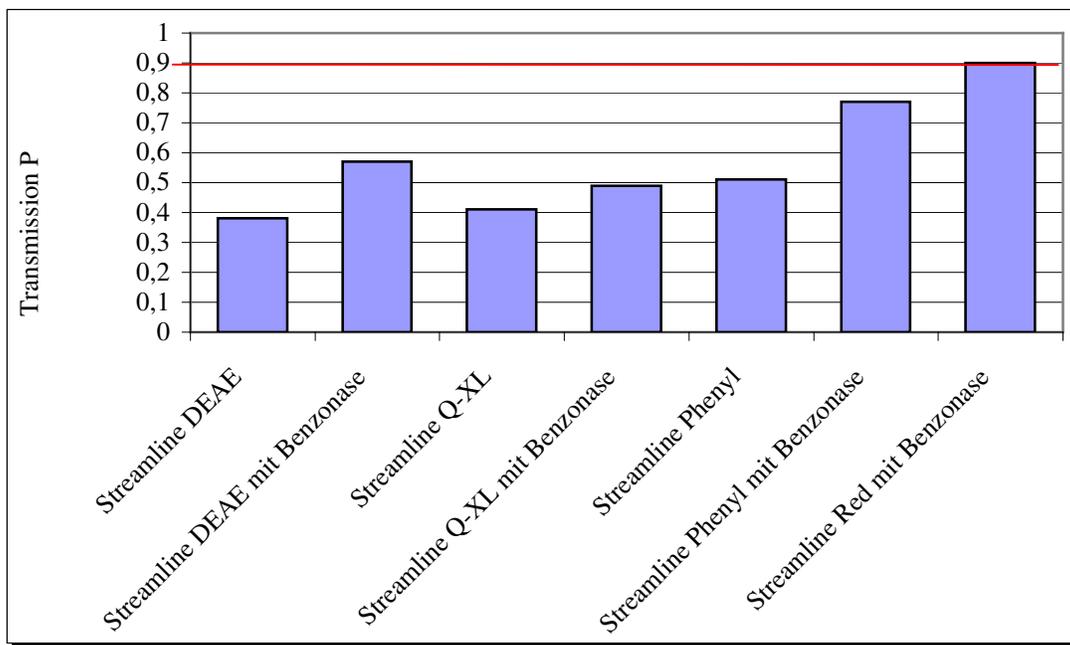


Abb. 28: Biomassetransmission bei den Adsorbent DEAE, Q-XL, Phenyl und Red mit und ohne vorheriger Benzonasebehandlung (50 mM Tris/HCl pH 7,5)

5. Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abb. 28 zu sehen, erreicht nur der Farbstoffadsorber die notwendige Transmission von 0,9.

Die Benzonasebehandlung, zur Reduktion der DNA-Kettenlänge, führt jeweils zu einer Erhöhung der Transmission. Offensichtlich ist die Biomasse-Adsorberinteraktion, in Anwesenheit von langkettiger DNA höher. Die Vermutung liegt nahe, dass die negativ geladene DNA an die Oberfläche der Anionentauscherpartikel bindet und aufgrund ihrer Struktur weitere Biomassepartikel zurück hält. Die erhöhte Biomasse Transmission nach Benzonasebehandlung auch bei den Adsorbent Phenyl und Red, die eigentlich keine Affinität zu DNA besitzen, widerspricht dieser Annahme. Offensichtlich scheint die Kettenlänge der DNA auch ohne Adsorption an den Adsorberpartikeln einen Einfluß zu haben. Der Vergleich mit einem Fibringerinsel in der Blutgerinnung verdeutlicht am besten diesen Effekt. Die Ketten der DNA bilden ein Gerüst gleich den Fibrinfäden im Blutgerinnsel und schließen Biomassepartikel mit ein. Es kommt zu einer verstärkten Aggregatbildung. Diese Aggregate können über ihren Biomasseanteil an den Adsorberpartikeln binden und es tritt eine stärkere Biomasse Rückhaltung auf. In irgendeiner Form muß eine Bindung an die Liganden erfolgen, da der Streamline© AC Adsorber, ohne Liganden, eine 100%ige Transmission der Biomasse auch ohne Benzonasebehandlung aufweist.

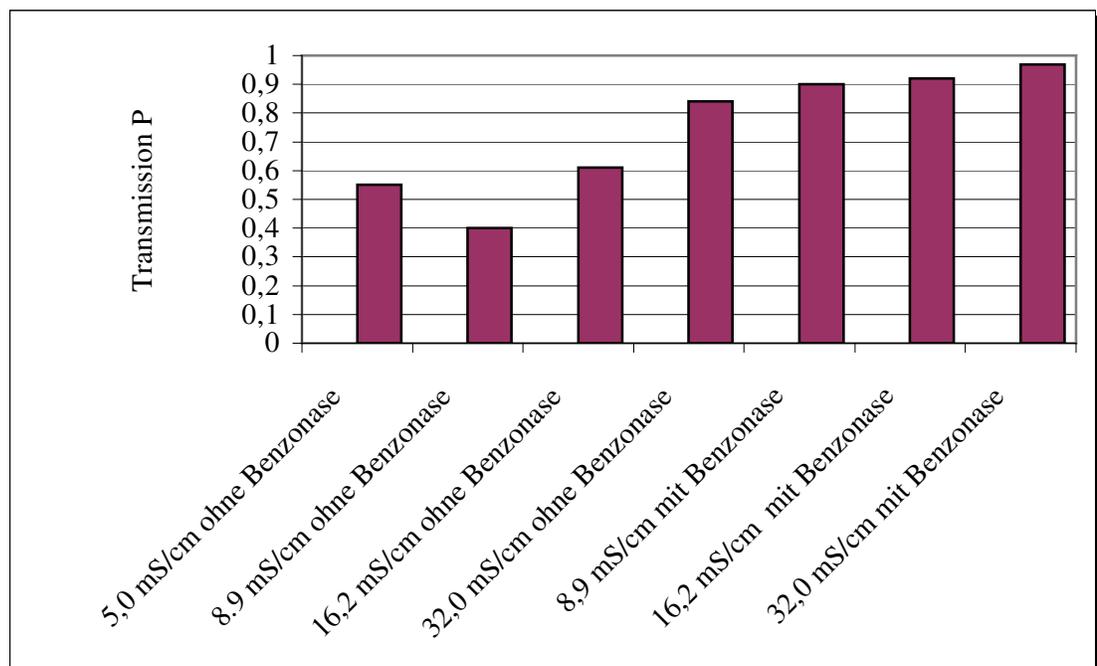


Abb. 29: Abhängigkeit der Biomasse Adsorberinteraktion von der Leitfähigkeit der Lösung an Streamline© Red

5. Ergebnisse und Diskussion

Abb. 29 zeigt für Streamline© Red eine bessere Biomassetransmission mit steigender Leitfähigkeit, bei 32 mS/cm sind schon 97% der Transmission erreicht. Auch diese Graphik verdeutlicht noch einmal den relativ starken Einfluß der Benzonase, der bei durchschnittlich 10% liegt.

5.3.3.3 Adsorptionsisothermen zur Bestimmung der Gleichgewichtskapazität

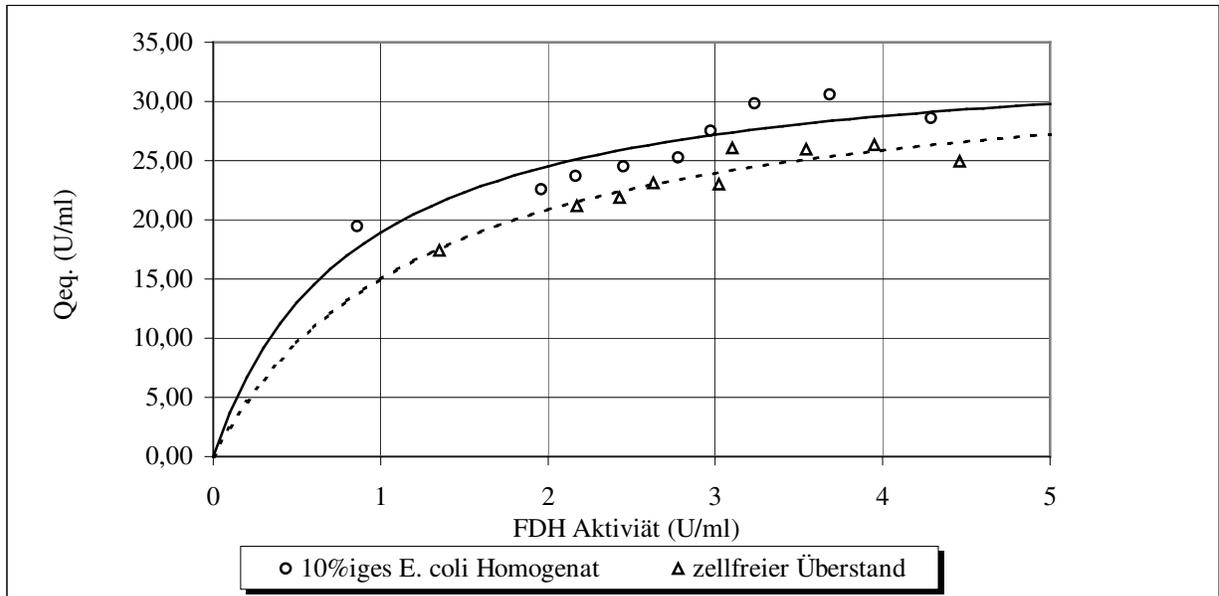


Abb. 30: Adsorptionsisothermen für FDH an Streamline© Red (50 mM Tris/HCl pH 7,5)

Abb. 30 zeigt nur einen geringen Unterschied zwischen der FDH Adsorption aus Biomasse freier oder Biomasse haltiger Lösung. Konkret ist dies am Ka-Wert und der maximalen Kapazität festzumachen (Tab. 7). Die Gleichgewichtskapazität und die Langmuir Konstanten (Ka-Wert) sind fast gleich

Tab. 7 maximale Gleichgewichtskapazität und ka-Wert für eine Adsorptionsisotherme von FDH an Streamline© Red mit und ohne Biomasse

Lösung	Q max [U/ml]	Ka-Wert [mL/mg]
Mit Biomasse	34,79	1,19
Ohne Biomasse	34,12	1,27

5. Ergebnisse und Diskussion

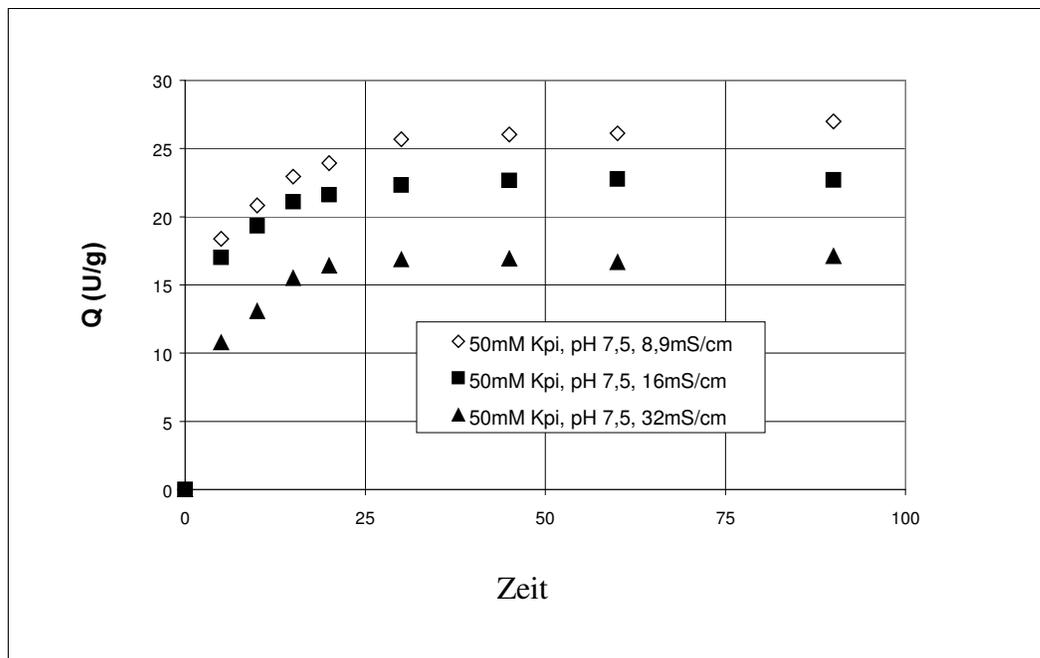


Abb 31: Adsorptionsisothermen: FDH an Streamline© Red bei steigender Leitfähigkeit der Lösung (50 mM Tris/HCl pH 7,5)

Mit steigender Leitfähigkeit der Lösung steigt auch die Biomasse Transmission, während die Proteinbindung sich gegenläufig darstellt (Abb. 31). Bei einer Leitfähigkeit von 32 mS/cm werden nur noch 60% der Kapazität bei 8,9 mS/cm erreicht. Es ist somit notwendig, einen Konsens zwischen der Effizienz der Adsorption und der Biomasse Transmission zu finden.

5.3.3.4 Festlegung des Arbeitsbereich

Nach Adsorbersceening und Bestimmung der Biomasseinteraktion kristallisiert sich der rote Adsorber als einzig sinnvoll für einen EBA-Prozess heraus. Obwohl er die geringste Kapazität für die FDH aufweist, ist er der einzige, der eine 90 % Biomassetransmission aufweist, die für ein stabiles Fließbett notwendig sind.

Die Leitfähigkeit der Lösung beeinflusst die Proteinbindung erheblich, bei einer relativ geringen Gleichgewichtskapazität von 34 U/mL ist ein weiterer Kapazitätsverlust durch Erhöhung der Leitfähigkeit zu vermeiden. Die Biomasse Transmission liegt bei 8,9 mS/cm an der kritischen Grenze von 90 %, daher wird die Fluidisierung der Säule durch Messung der Verweilzeitverteilung kontrolliert.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.3.3.5 Verweilzeitverteilung

Die Verweilzeitverteilung ermöglicht es, die Qualität der Fluidisierung in der EBA-Säule zu bestimmen. Abb.32 zeigt die normierten Messergebnisse der Antwortfunktion

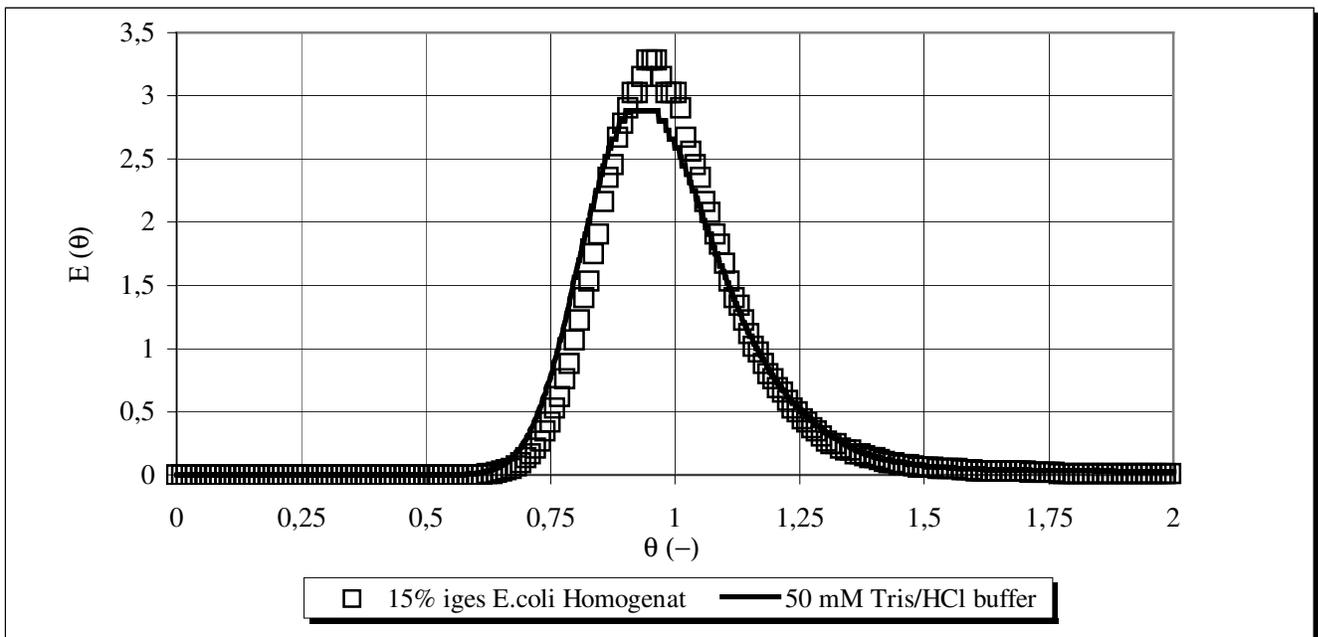


Abb. 32: Verweilzeitverteilung im Puffer und im 15%igen Homogenat, Tracer Li^+ , 50 mM Tris/HCl pH 7,5, Streamline© Red

Vergleicht man die im Puffer aufgenommene Idealkurve mit der in 15%igem Homogenat gemessenen, zeigt sich keine große Abweichung. Die Kurve ist symmetrisch, es tritt kein Tailing auf und das Maximum liegt sehr nahe an der normierten Zeit 1. Bei auftretenden Totzonen oder Kanalbildung in der Säule wäre das Maximum deutlich zu geringeren Zeiten verschoben.

5.3.3.6 Bettexpansion

Die Bettexpansion hängt von der Viskosität und der Dichte der Auftragslösung ab und wird in diesem Fall durch den Biofeuchtmassanteil bestimmt.

Abb. 33. verdeutlicht den Arbeitsbereich für eine sinnvollen EBA-Prozess. Die Fluidgeschwindigkeit muß ein Minimalwert überschreiten, um eine vollständige Fluidisierung und damit einen vergrößerten interpartikulären Abstand der Adsorberteilchen zu gewährleisten.

5. Ergebnisse und Diskussion

Eine zu hohe Fluidgeschwindigkeit expandiert das Bett über die kritische Größe von 3-4, festgelegt durch die Säulenlänge, und Partikel werden gegebenenfalls ausgeschwemmt

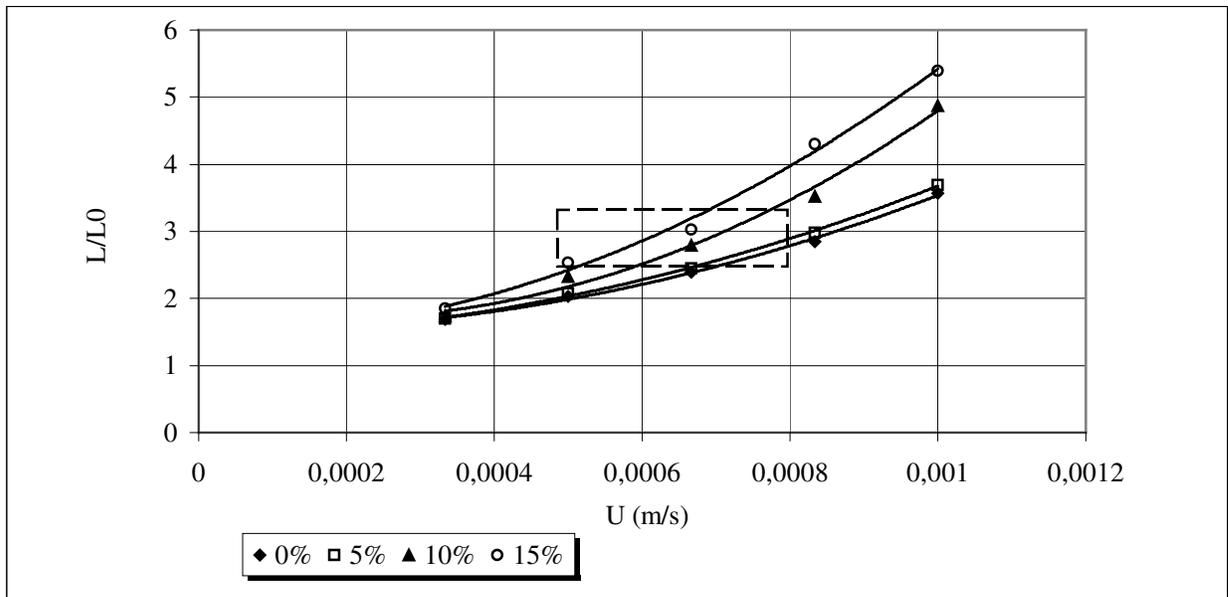


Abb. 33: Expansionskurven für Streamline Red bei verschiedene Biomassekonzentrationen (50 mM Tris/HCl pH 7,5). Der Expansionsgrad n (L/L_0) ist gegen die steigende lineare Fluidgeschwindigkeit aufgetragen.

5.3.3.7 Durchbruchskurven

Die Aufnahme von Durchbruchskurven dient dazu, die Adsorption des Zeilproteins auf dem gewählten Adsorber zu charakterisieren. Hierzu werden Durchbruchskurven bei unterschiedlichen Fluidgeschwindigkeiten im Festbett aufgenommen und anhand dieser die dynamische Kapazität (10 % Durchbruch) bestimmt. Das Hall Model (Abschnitt 3.4.6) simuliert den Durchbruch als Funktion eines Transportparameters, von der Flüssigkeits-, als auch der Feststoffseite her. Hierbei fließen wichtige Prozessparameter, wie lineare Fluidgeschwindigkeit U , Säulenlänge L und Partikelradius r_p ($1 \cdot 10^{-4}$ m) ein, hinzu kommt der apparente Partikel Diffusionskoeffizient, der D_e -Wert, und der Flüssigkeits Transport Koeffizient k_f . Für zwei Verweilzeiten, 172 s und 430 s wurden Durchbruchskurven aufgenommen und D_e für beide mit $1,1 \cdot 10^{-11}$ m²/s bestimmt.

5. Ergebnisse und Diskussion

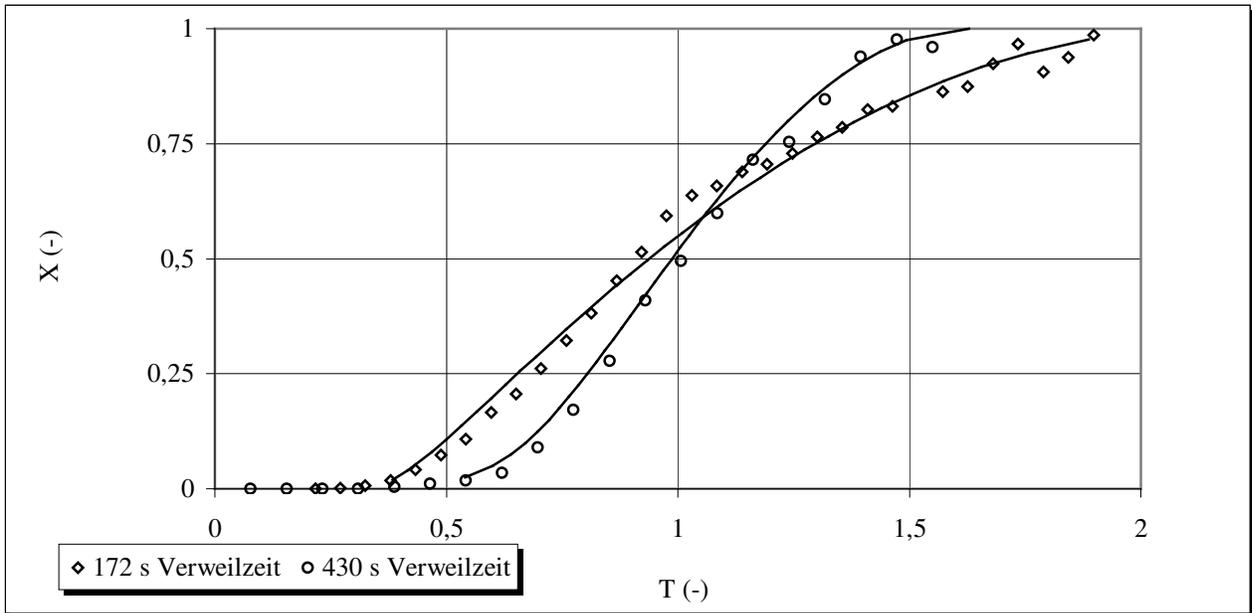


Abb. 34: Durchbruchkurven im Festbett bei zwei verschiedenen Fluidgeschwindigkeiten
Streamline© Red

Bei kürzeren Verweilzeiten also höheren Fließgeschwindigkeiten ist die Durchbruchskurve flacher, das Protein bricht schneller durch und die dynamische Kapazität sinkt. Längere Verweilzeiten ermöglichen der FDH längere Diffusionswege. Es kann mehr Protein gebunden werden, die dynamische Kapazität ist größer und die Durchbruchskurve nähert sich der Idealform einer Sprungfunktion an. Die Durchbruchskurven wurden mit Hilfe des Hall Modells gefittet. Es zeigte sich hierbei, daß eine Film- und Porendiffusionslimitierung vorliegt. Der aus der Durchbruchskurve erhaltenen D_e -Wert ($1.1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) dient zur Aufstellung des Arbeitsdiagramms

5.3.3.8 Das Arbeitsdiagramm

Die vorangegangenen Versuche liefern die Parameter, die zur Erstellung des Arbeitsdiagramms notwendig sind. Q_{\max} wird über die Adsorptionsisothermen ermittelt. Die ideale Fluidgeschwindigkeit erhält man aus den Expansionversuchen, D_e läßt sich aus den Durchbruchkurven ableiten, sowie k_f nach Gleichung [24] berechnen.

5. Ergebnisse und Diskussion

$$k_f = \frac{D}{d_p} \cdot \left[\frac{2\zeta + \left\{ \frac{2\zeta^2 \cdot (1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}}}{\left[1 - (1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}} \right]^2} - 2 \right\} \cdot \tanh(\zeta)}{\frac{\zeta}{1 - (1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}}} - \tanh(\zeta)} \right] \quad [27]$$

und

$$\zeta = \left[\frac{1}{(1-\varepsilon)^{\frac{1}{3}}} - 1 \right] \cdot \frac{\gamma}{2} \cdot \text{Re}_p^{\frac{1}{2}} \cdot \text{Sc}^{\frac{1}{3}} \quad \text{Re}_p = \frac{U \cdot d_p \cdot \delta_l}{\eta} \quad \text{Sc} = \frac{\eta}{D \cdot \delta_l}$$

Mit diesen Werten wurde die Durchbruchkurve unter verschiedenen Bedingungen simuliert. Die Effektivität des Prozesses ($Q_{\text{brk}}/Q_{\text{eq}}$) stellt sich bei bekannter sedimentierter Betthöhe, der Fluidgeschwindigkeit und dem Partikelradius als Funktion der linearen Fließgeschwindigkeit und der sedimentierten Betthöhe dar.

Für die Erstellung des Arbeitsdiagramms geht man von 15%igem *E. coli* Homogenat mit einer Viskosität η von $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ kg/(m*s)}$ und einer Dichte ρ von 1015 kg/m^3 mit $5,3 \text{ U/ml}$ FDH-Aktivität aus.

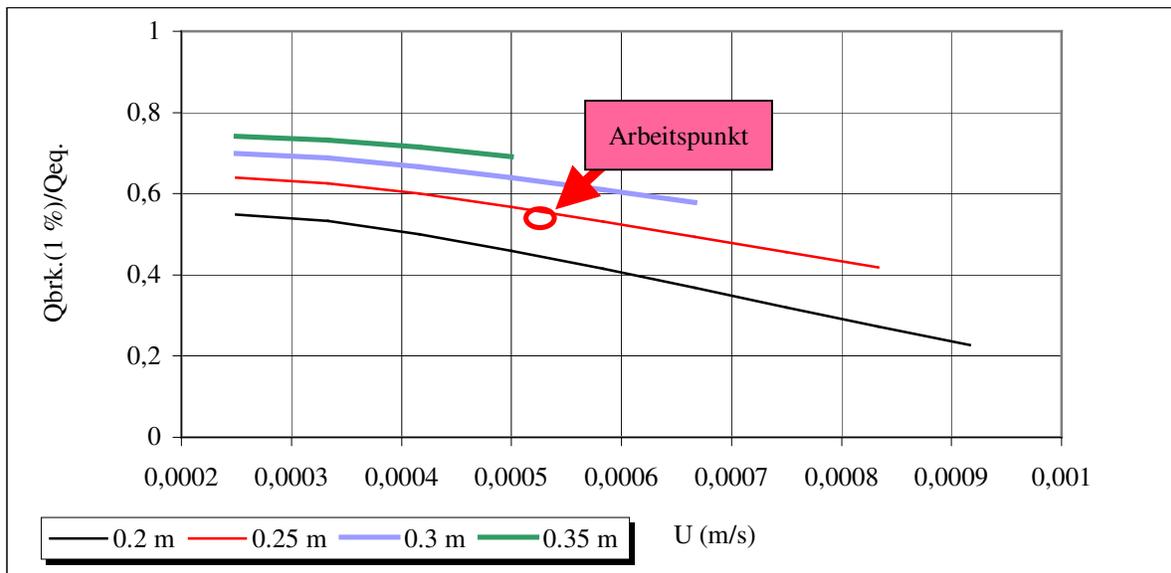


Abb. 35: Arbeitsdiagramm für den FDH Prozess auf Streamline© Red

5. Ergebnisse und Diskussion

Aus dem Arbeitsdiagramm ergibt sich für die FDH-Bindung ein optimaler Arbeitspunkt bei einer linearen Fluidgeschwindigkeit von 0,0005 m/s und einer abgesetzten Betthöhe von 25 cm. Hierbei wird die limitierende Säulenhöhe von 0,9 m nicht erreicht.

5.3.3.9 Optimierung des Waschschrilles

Durch eine geeignete Kombination von Waschschrilles ist es möglich die Spezifität des entsprechenden Chromatographieschrilles zu erhöhen. Speziell für die FDH-Bindung an den Streamline© Red Adsorber konnte mit einem zweiten Waschschrilles (50 mM KPi pH 7,5 + 2 mM Na₂SO₄), nach Auswaschen des Probenauftrags mit Equilibrierungspuffer (50 mM KPi pH 7,5), eine weitere Abreicherung von Begleitproteinen erzielt werden.. Die FDH kann danach mit einer Reinheit von 98 % eluiert werden, jedoch nur mit einer Ausbeute von 80 %. Ohne den zweiten Waschschrilles werden 94 % Ausbeute erreicht, aber mit einer schlechtere Reinheit der FDH.

Um die Rückvermischung im expandierten Bett zu minimieren kann mit einer Lösung höherer Dichte das Homogenat ausgewaschen werden. In diesem Fall wurde die höhere Dichte der Waschlösung im Vergleich zum *E. coli* Homogenat durch Zugabe von 12,5 % Glycerin in den Waschpuffer (50 mM KPi pH 7,5) erzielt.

5.3.3.10 Elutionsoptimierung

Die Wahl entsprechender Bedingungen kann zu einer selektiven Elution des Zielproteins und zu einer weiteren Abtrennung unerwünschter Nebenprodukte führen.

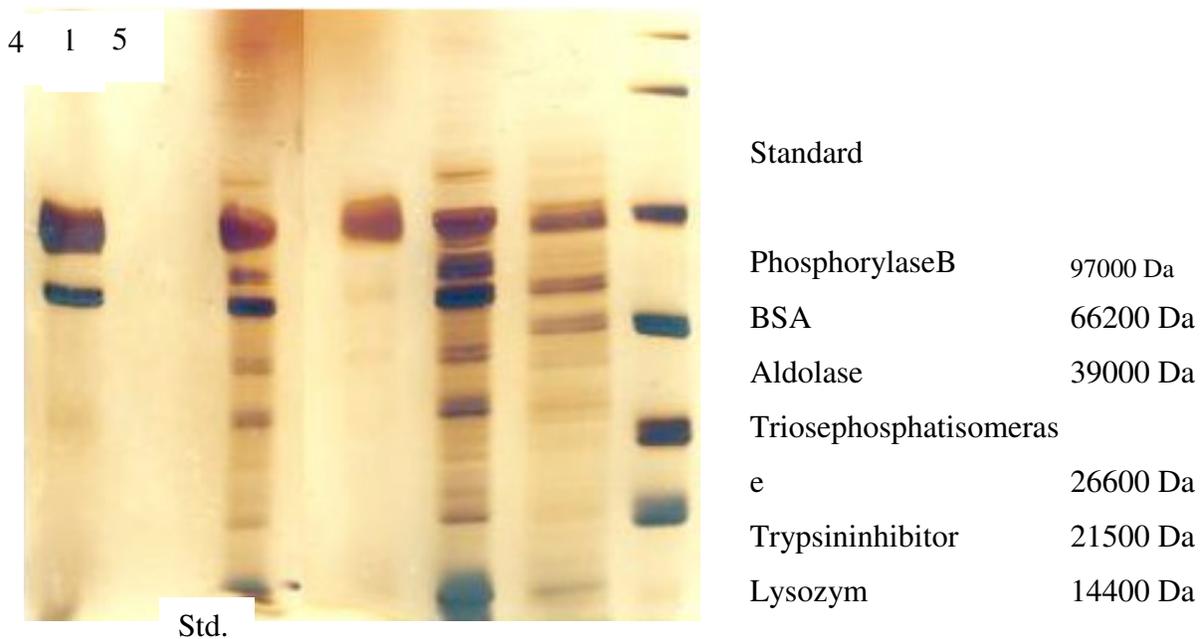
5. Ergebnisse und Diskussion

Tab.8: Zusammenfassung der Elutionsexperimente

	% Ausbeute	spez. Akt. [U/mg]
10 mM Natriumsulfat, 25mM Tris, pH 8,5	1	
1M Natriumformiat, 25mM Tris, pH 8,5	8	
1mM Natriumformiat, 2mM Na ₂ SO ₄ , 25mM Tris, pH 8,5	3	
7mM NAD ⁺ , 25mM Tris, pH 7,5	95	5,7
5mM NAD ⁺ , 0,5M NaCl, 25mM Tris, pH 7,5	90	5,5
0,15mM NAD ⁺ , 2mM Na ₂ SO ₄ , 25mM Tris, pH 8,5	63	2,5
1,5mM NAD ⁺ , 2mM Na ₂ SO ₄ , 25mM Tris, pH 8,5	94	3,2
1,5mM NAD ⁺ , 2mM Na ₂ SO ₄ , 25mM Tris, pH 8,5 (nach Vorelution)	78	6,1

Tabelle 8 faßt die Elutionsexperimente zusammen. Das beste Ergebnis wird durch Elution mit 7 mM NAD⁺ erzielt, der Co-Faktor stellt aber auch den weitgehend bedeutendsten Kostenfaktor im Prozess dar (70%). Auf Kosten der Ausbeute besteht jedoch die Möglichkeit die NAD⁺-Konzentration auf ca. ein Fünftel zu reduzieren. Zusätze von NaCl oder dem Substrat Natriumformiat zeigen keine oder nur eine geringe Wirkung. Die Kombination von 1,5 mM NAD⁺ und 2 mM Na₂SO₄ mit einem vorgeschalteten Waschschrift erlaubt eine 80%ige Ausbeute bei 98%iger Reinheit der FDH (reine FDH besitzt eine Spezifische Aktivität von 6,7 U/mg). Verzichtet man auf geringe Prozente in der Reinheit, durch Weglassen des zweiten Waschschriftes, erreicht man auch mit dieser Elution 94% Ausbeute.

5. Ergebnisse und Diskussion



		Gesamtprotein- konzentration (μg)
Spur 1	Elution mit 7mM NAD^+	3,5
Spur 2	Elution mit 2mM Na_2SO_4 , 1,5mM NAD^+ , ohne 2mM Na_2SO_4 waschen	3,33
Spur 3	Elution mit 2mM Na_2SO_4 , 1,5mM NAD^+ , nach waschen mit 2mM Na_2SO_4	3
Spur 4	Waschen mit 2mM Na_2SO_4	5
Spur 5	Probe	3,33

Abb. 36: Die Unterschiedlichen Elutionen aufgetragen auf ein 12,5 % iges SDS Gel unter reduzierenden Bedingungen, Silber gefärbt.

Das SDS-Gel (Abb. 36) zeigt eindeutig die beste Aufreinigung der FDH in Spur 3, nach einem Waschschrift mit Natriumsulfat erfolgt die Elution durch ein NAD^+ /Natriumsulfat-Gemisch.

5.3.4 Der FDH-EBA Prozess

Aufgrund der vorliegenden Daten wurde folgende Strategie zur Aufreinigung der rekombinanten FDH aus *E. coli* entwickelt:

5. Ergebnisse und Diskussion

- Homogenisierung von *E. coli* mit 40 % Biofeuchtmasse in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5, der 5 U Benzonase pro g Biomasse und 5 mM MgCl₂ enthält.
- 2 h Inkubation des Homogenats (Benzonase Aktivität)
- Verdünnung auf einen Biofeuchtmasseanteil von 15 %, pH 7.5 und einer Leitfähigkeit von 9 mS/cm
- Equilibrierung von 0.25 m sedimentierte Betthöhe von Streamline Red bei einer linearen Fluidgeschwindigkeit von $5 \cdot 10^{-4}$ m/s mit 50 mM Tris/HCl Puffer (pH 7,5, 9 mS/cm Leitfähigkeit)
- Auftrag von 3 Säulenvolumen der sedimentierten Betthöhe (maximal 13U/ml dynamische Kapazität)
- 1. Waschschrift mit 3 sedimentierten Bettvolumen 50 mM KPi pH 7,5, 12,5 % Glycerin (die Glycerinzugabe dient dazu aufgrund des Dichteunterschieds der Lösungen die Rückvermischung zu minimieren, was ein Verringerung des Waschvolumens ermöglicht)
- 2. Waschschrift mit 50 mM KPi pH 8,5 und 2 mM Na₂SO₄ (im expandierten Bett, Fluidgeschwindigkeit $4 \cdot 10^{-4}$ m/s)
- Elution mit 50 mM KPi pH 8,5, 2 mM Na₂SO₄, 1 mM NAD (im sedimentierten Bett, Fluidgeschwindigkeit $4 \cdot 10^{-4}$ m/s)

Regeneration des Adsorbers mit 0.5 M NaOH/1M NaCl (im expandierten Bett, Fluidgeschwindigkeit $4 \cdot 10^{-4}$ m/s)

5.3.4.1 Scale up

Die festgelegten Prozessparameter wurden zunächst anhand von drei Säulenläufen in einer 5 cm Ø EBA-Säule überprüft.

5. Ergebnisse und Diskussion

Bei einem Adsorbervolumen von 470 ml, einer Fluidgeschwindigkeit von 57 ml/min und einem Auftrag von 1250 ml Homogenat, konnte reproduzierbar eine Ausbeute von 80% und eine Reinheit des Enzyms von 94% ($6,0 \pm 0,4$ U/mg) erzielt werden.

Der zweite Schritt der Maßstabsvergrößerung war die Aufreinigung einer 10 l Kultivierung über eine Streamline 200 Säule (20 cm Ø). Die abgesetzte Betthöhe betrug 23,2 cm (Adsorbervolumen 7,3 L), es wurden 19 l 10%iges Homogenat aufgetragen bei einer Fluidgeschwindigkeit von 3 cm/min. Die Ergebnisse sind in Tab 9 zusammengefaßt

Tab. 9: Zusammenfassung der 19L Homogenataufreinigung

	Volumen [L]	Volumetrische Aktivität [U/ml]	Gesamtprotein-konzentration [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Wiederfindung [%]
Auftrag	19	6,1	7,9	0,77	
Durchlauf	20	n.m.	n.m.	n.m.	
1. waschen	40	0,1	2,7	0,04	3,5
2. waschen	50	0,5	0,3	1,7	21
Elution	40	2,25	0,6	3,8	78

Es zeigt sich erneut eine Ausbeute von 80% bei einer Reinheit des Enzyms von hier nur 63 %. Da es nur einmal möglich war den Versuch durchzuführen kann an dieser Stelle nicht geklärt werden ob eine Wiederholung und ein präziseres Arbeiten anhand der zuvor gesammelten Daten nicht zu einem besseren Ergebnis führen kann. Die Elution wurde hier abweichend zu den Versuchen vorher nicht mit 50 mM KPi sondern 50 mM Tris/HCl Puffer durchgeführt, was ebenfalls einen Einfluß haben kann. In Hinblick auf den nachfolgenden Membranchromatographieschritt war dies jedoch erforderlich. Zum industriellen Einsatz würde die Reinheit von 63 Prozent ausreichen.

5.3.5 Membranchromatographie als zweiter Aufreinigungsschritt

Zur Kristallisation oder eventuell anderen Untersuchungen muß das betreffende Protein rein vorliegen. Aus diesen Gründen und um den Aufreinigungsprozess abzuschließen, wurde die FDH mittels eines Membrananionentauschers im zweiten Chromatographieschritt aufgereinigt.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.3.5.1 Durchbruchskurven: Eluat EBA auf einer Aniontauschermembran

Um die dynamische Kapazität der Membran zu bestimmen, wurden Durchbruchskurven der FDH (Eluat EBA) mit einem selbstopackten Modul vorgenommen. Die Anströmfläche betrug hierbei $0,78 \text{ cm}^2$. Die Ausgangslösung war das Eluat der EBA mit $4 \text{ U/ml Tris/HCl pH } 8,5$, $1,2 \text{ mS/cm}$ in $50 \text{ mM Tris/HCl pH } 8,5$. Die Durchbruchskurven wurden bei drei verschiedenen Volumenströmen von 10 , 15 und 30 ml/min aufgenommen. (Abb. 37)

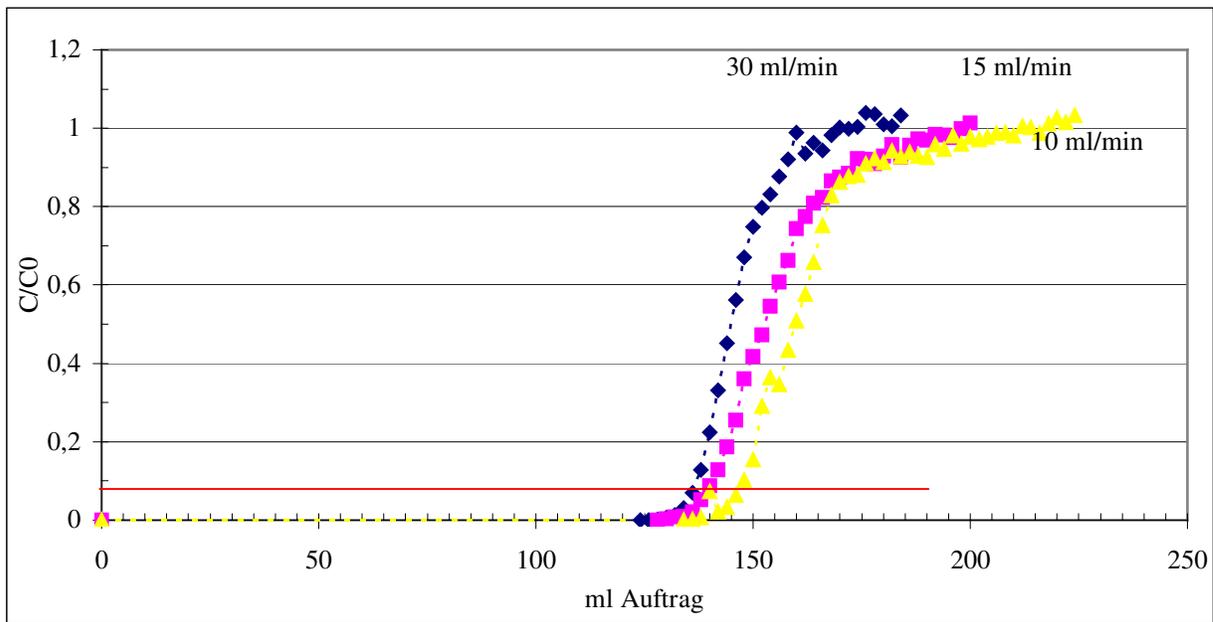


Abb. 37: Durchbruchskurven: Eluat Streamline© Red auf Q-Membran von Satorius, Anströmfläche von $0,78 \text{ cm}^2$ (Volumen entspricht 2 ml Gel)

Es zeigt sich ein steiler Verlauf der Durchbruchskurven, die mit steigendem Volumenstrom nach links verschoben werden. Die dynamische Kapazität sinkt von 73 U/ml bei 10 ml/min über 70 U/ml (15 ml/min) auf 67 U/ml bei 30 ml/min ab. Eine Verdreifung des Volumenstroms bewirkt somit nur eine Minderung der Kapazität um ca. 8% . Dies zeigt eindeutig, die FDH Adsorption an dem Membranionenaustauscher ist wie erwartet nicht diffusionslimitiert (s. Abschnitt 3.3.3.1.3.1)

5. Ergebnisse und Diskussion

5.3.5.2 Aufreinigung der FDH über ein Sartorius Anionenauschermembranmodul

Zur weiteren Aufreinigung der FDH aus dem EBA Eluat wurde ein 500 cm² Anionenauscher Modul (Q) von Sartorius verwendet (s. Abb. 38, 39)

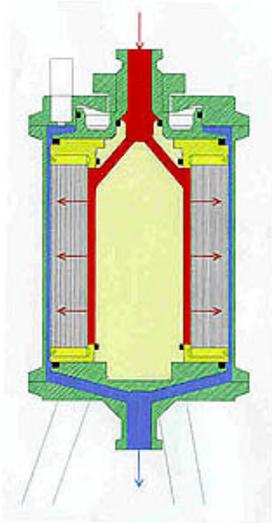


Abb. 38: schematischer Querschnitt des Sartorius Membranadsorber Moduls (Bild von Sartorius AG)



Abb 39: Schnitt in das 500 cm² Anionenauschermodul von Sartorius (Bild von Sartorius AG)

Die Abbildungen 38 und 39 (Sartorius AG) verdeutlichen den Aufbau des Sartobind® Ionenaustauscher Moduls. Die Membranen, in Abbildung 38 grau dargestellt, sind in einzelnen Lagen aufgewickelt. Das eigentliche Membranmodul stellt eine Röhre mit entsprechendem Innenraum dar. Der Innenraum wird zum großen Teil von einem, mit Kanälen durchzogenen, Kern ausgefüllt (s. Abb. 39). Dieses Kanalsystem soll dazu dienen die über den Kern einströmende Flüssigkeit auf die Länge des Moduls zu verteilen. Idealerweise durchströmt die Flüssigkeit die Membranschichten in horizontaler Richtung. Ein Scale up des Moduls erfolgt zunächst durch hinzufügen von Membranlagen und einer Verkleinerung des Kerns. Ist dies aus Konstruktionsgründen nicht mehr möglich wird das Membranmodul verlängert.

5. Ergebnisse und Diskussion

Die Fluidgeschwindigkeit bei den Membranionenaustauscherläufen betrug 39 cm/min (1,5 l/min.) bei einer Anströmfläche von 50 cm². Je 6,5 l des EBA-Eluates wurden in zwei Läufen aufgetragen und mit einem Salzgradienten von 0 – 0,5 m NaCl in 30 Säulenvolumen (1 Säulenvolumen entspricht 100 ml) eluiert.

Tabelle 10 zeigt exemplarisch die Daten für einen Lauf der FDH

Tab. 10: Ergebnisse eines Laufes EBA-Eluat auf Sartobind© Q Membranionenaustauscher

	Volumen [ml]	Aktivität FDH [U/ml]	Gesamtprotein Konzentration [mg/ml]	Spez. Aktivität [U/mg]	Wiederfindung [%]
Auftrag	6500	1,6	0,3	0,5	
Durchlauf	1500	0,0012	n.m.	n.m.	0,02
Waschen	5000	0,01	n.m.	n.m.	0,5
Eluat 1	280	2,9	0,48	6,0	7,9
Eluat 2	1200	8,15	1,7	4,8	93,9
Eluat 3	1000	0,31	0,13	2,4	3,4

Tabelle 10 verdeutlicht, daß nur bis zu 10% die FDH als reines Enzym eluiert werden, der Großteil von ca. 90% weist eine Reinheit von 80% auf. Diese Angaben wurden durch zwei weitere Membranläufe untermauert. Somit ist es zwar möglich die FDH über das Anionentauschermodul aufzureinigen, aber nur 10 % des Gesamtauftrags erreichen eine 100%ige Reinheit. Die verbleibenden 90 % liegen bei einer FDH-Reinheit von 80 %. Ein Zehntel des gesamten FDH Auftrags liegt nach dem Membranchromatographie Lauf rein in 280 mL vor. Geht man ebenfalls von einem Zehntel des Auftragsvolumen (650 mL) aus, bedeutet dies eine Konzentrierung der FDH um das 2,3 fache.

Neben der geringen Ausbeute wurde ein weiterer Nachteil des Membranmoduls aufgezeigt, das Fouling. Die Anströmfläche der Membran stellt nur ein Fünfzigstel der gesamten Membranfläche dar. Selbst das Streamline© Red Eluat mit einer geringen Proteinkonzentration von 0,3 mg/mL bewirkte ein Fouling auf der Ionenaustauschermembran, zu erkennen durch einen ansteigenden Systemdruck. Nach drei Läufen musste eine Regenerierung der Membran mittels 1 M NaOH durchgeführt werden, um den Systemdruck wieder zu reduzieren, der Ausgangsdruck wurde hierbei jedoch nicht wieder erreicht.

Somit wird die Auftragsmenge hinsichtlich des scale up nicht nur durch die Kapazität der Ionentauschermembran limitiert sondern auch über den Druckaufbau im System, hervorgerufen durch Fouling.

5. Ergebnisse und Diskussion

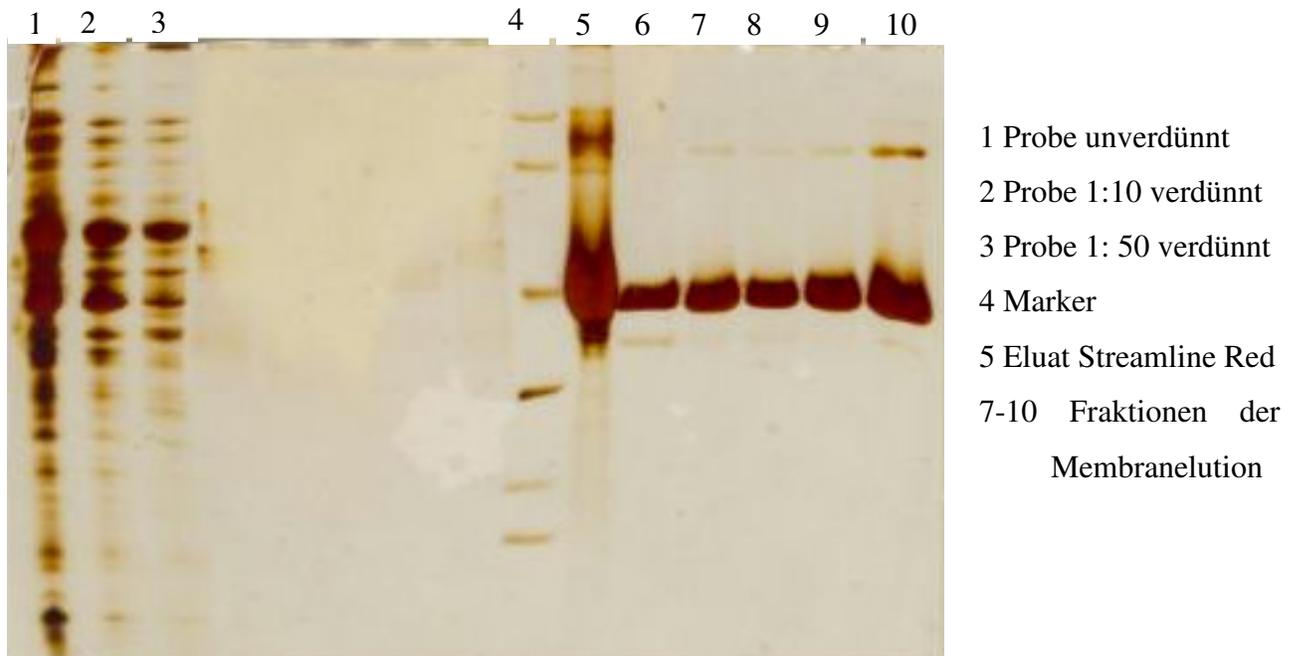


Abb. 40: 12,5 %iges SDS Gel unter reduzierenden Bedingungen nach Blum Silber gefärbt

5.3.5 Alternative Aufreinigungsstrategien der FDH

Neben den in den vorherigen Abschnitten beschriebenen EBA-Prozess zur FDH-Aufreinigung sind viele andere Strategien denkbar. Ausgehend vom 1. Phasensystem des bis dato bestehenden Prozesses könnte man versuchen, die Oberphase direkt auf einen Anionentauscher (Membran) zu geben oder auf gegenüber viskosen Flüssigkeiten besser geeignete `big beads`. Diese kommerziell erhältlichen Adsorberpartikel (Amersham Bioscience) sind speziell für industrielle Anwendung vorgesehen. Aufgrund ihrer Größe (100-300 μm) und der physikalischen Stabilität, resultierend aus einer starken Quervernetzung der Agarose, ist es möglich selbst viskose Lösungen problemlos aufzutragen. Die Trenneigenschaften entsprechen hierbei denen der Sepharose ff (Amersham Bioscience).

Denkbar wäre auch ein Bulkkristallisation aus der PEG-Phase. Diese Ansätze führten jedoch alle leider nicht zum gewünschten Ziel. Zwei mögliche Alternativen zeigen sich jedoch zum EBA-Prozess auf. Ausgehend von der Fest-Flüssigtrennung mittels PEI-Flokkulation unterstützten Fest-Flüssigtrennung ist nach einer 1:5 Verdünnung die Aufreinigung über eine Q-Sepharose Säule möglich. Dies wurde bei der Firma Degussa erfolgreich durchgeführt. Die Aufreinigung liefert eine FDH in einer für den technischen Prozess angemessenen Reinheit.

5. Ergebnisse und Diskussion

Eine weitere Alternative ist nach der Fällung eine hydrophobe Interaktionschromatographie anzuschließen, um den Verdünnungsschritt zu vermeiden.

5.2.5.1 Phenylsepharose

Eine Optimierung der HIC wurde durch Messung der Adsorptionsisothermen und Durchbruchkurven für ein gepacktes Bett vorgenommen.

5.3.5.2 Adsorptionsisotherme

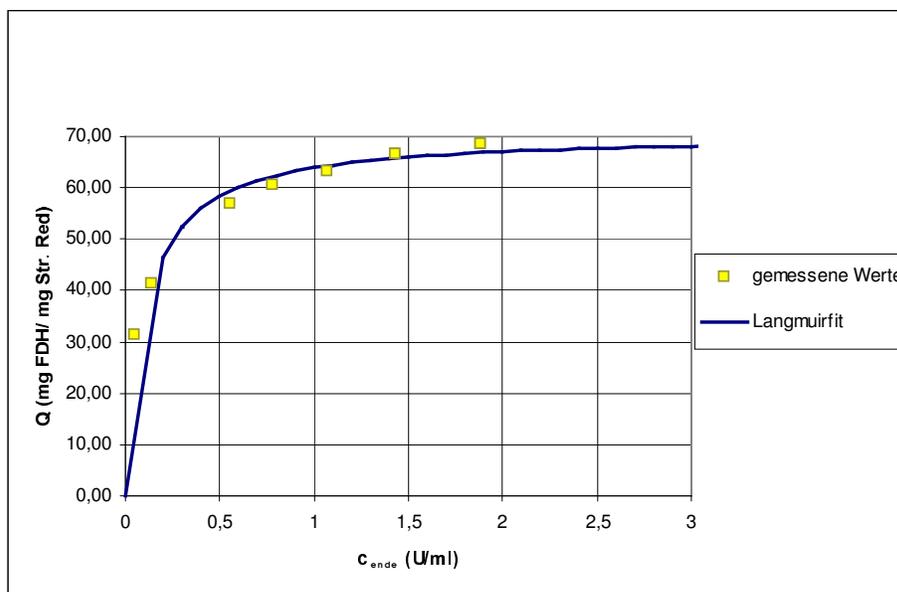


Abb. 41: Adsorptionsisotherme von FDH aus dem PEI-Übertand an Phenylsepharose (1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7,5)

Wie aus Abb. 41 zu entnehmen ist erhält man eine Gleichgewichtskapazität von 120 U/ml Adsorber. Dieser Wert liegt wesentlich über den Ergebnissen von Streamline Phenyl. Dies läßt sich aufgrund der verschiedenen Probenzusammensetzung nach PEI Fällung und im Homogenat, sowie deren unterschiedlichen Viskositäten erklären. Als zweiter Schritt ist die dynamische Kapazität über die Durchbruchkurve zu bestimmen.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.3.5.3 Durchbruchskurve FDH aus dem PEI Überstand auf Phenylsepharose.

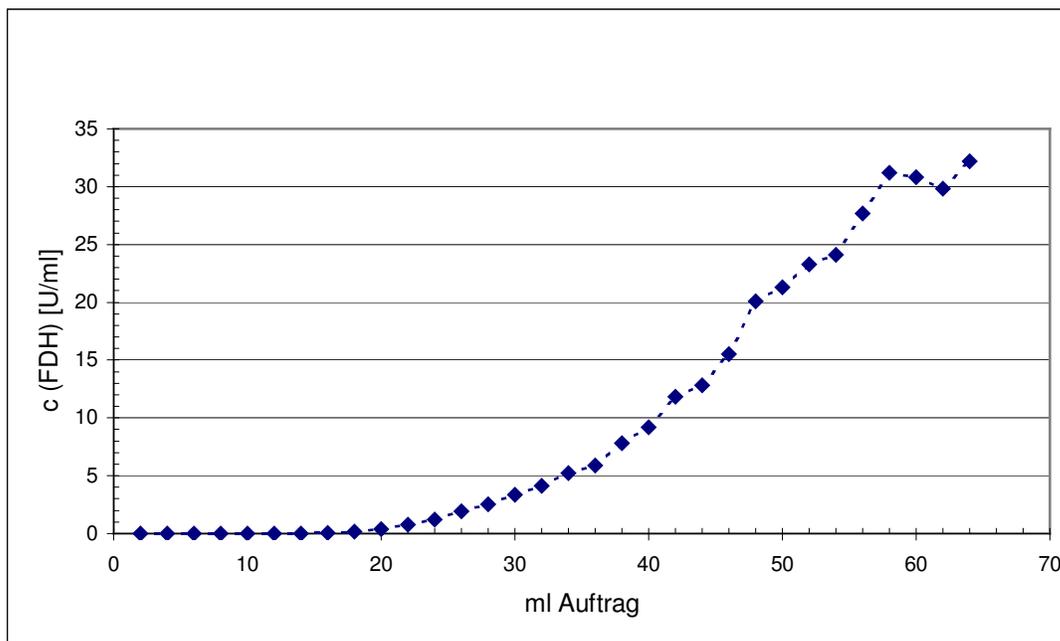


Abb. 42 Durchbruchskurve FDH aus PEI Überstand auf Phenylsepharose.
(1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7,5)

Die Durchbruchskurve (Abb 42.) zeigt eine im Vergleich zu den Membrandurchbruchskurven flachen Verlauf. Der dynamische Durchbruch bei 10% wird erst nach einem Auftrag von 35 U/g Adsorber erreicht. Die hier erzielte Kapazität liegt somit im Rahmen der Kapazität der Q-Sepharose (ca. 50 U/ml im Gleichgewicht) und wesentlich über der Kapazität des Streamline Red Adsorbers von 13 U/ml dynamisch. Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch die hohe Salzfracht, die diese Methode mit sich bringt.

5.2.5.3 Elutionsbedingungen HIC

Im Elutionsprofil (s. Anhang) zeigen sich immer zwei Signale wobei das zweite Signal der sogenannte Salzpeak sein dürfte. Eine Gradientenelution ist anhand dieser Ergebnisse nicht angebracht. Die Elution erfolgt somit in einem Schritt mit 20 mM KPi Puffer pH 7,5, wobei das Enzym bei ca 0,5 mM Ammoniumsulfat eluiert. Man erhält so eine Wiederfindung von 100 % bei einer Ausbeute von 95 % und einer Reinheit des Enzyms von 70%.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.3.6 Zusammenfassung: Strategien der FDH-Aufreinigung bis zur technischen Reinheit

Drei Aufreinigungswege haben sich aus den durchgeführten Experimenten und den daraus resultierenden Ergebnissen für die FDH ergeben (Tab. 11).

Tab 11. Übersicht und Vergleich der möglichen FDH Aufreinigungswege nach Zellaufschluß

Aufreinigung	Dauer [Tage]	Reinheit der FDH [%]	Ausbeute [%]
Phasensysteme., Diafiltration, Anionentauscher	3-4	60	60-70
PEI-Fällung und Anionentauscher	2-3	60	80
PEI-Fällung und HIC	2-3	70	100
EBA	1-2	95	80

Tabelle 11 verdeutlicht die möglichen FDH Aufreinigungsstrategien. Der bis jetzt angewandte Prozess aus Phasensystemen, Diafiltration und anschließenden Ionentauscher dauert 3-4 Tage. In Abschnitt 5.3.1.1 wurde gezeigt, dass die FDH bei RT nicht unbegrenzt stabil ist und nach ca. 18 h eine Aktivitätsabnahme auftritt. Die lange Prozessdauer könnte somit ein Grund für die nur geringe Gesamtausbeute von 60-70% sein. Hinzu kommt eine aufwendige Diafiltration, die nicht unbedingt als enzymeschonend zu bezeichnen ist und sicherlich zu einer weiteren Verminderung der Gesamtausbeute beiträgt. Nach vier Aufreinigungsschritten lässt sich dennoch nur eine Reinheit des Enzyms von ca. 60% erzielen, die jedoch für die industrielle Anwendung ausreicht.

Die PEI-Flokkulation erlaubt eine kontinuierliche Zentrifugation des Homogenats zur Fest-Flüssig-Trennung. Um jedoch geeignete Bedingungen für einen Ionenaustauschchromatographie zu schaffen, muß der geklärte Überstand 1:6 mit Wasser oder Puffer verdünnt werden, wodurch sich das Arbeitsvolumen entsprechend vergrößert. (Angaben Degussa Hüls). Gegenüber der alten Aufreinigungsstrategie, Extraktion mit wässrigen Zwei-

5. Ergebnisse und Diskussion

Phasensystemen, verkürzt sich jedoch die Dauer des Prozesses um einen Tag, bei einer Ausbeute von 80%. Die Gleichgewichtskapazität des Adsorbers liegt mit 50 U/g recht hoch.

Zur Bindung von 100 000 Units (was dem Inhalt einer 10 l Fermentation entspricht) wären bei einer dynamischen Kapazität von 35U/g 2,9 L Adsorbermaterial nötig.

Die Kombination von PEI-Fällung und HIC führt zu einem ähnlichen Ergebnis wie die Kombination PEI-Fällung Ionentauscher. Im Vergleich zum alten Verfahren ist auch hier die Prozessdauer um 1 Tag verkürzt. Die 100% Ausbeute sind jedoch nicht alleine über die Prozessdauer zu begründen. Möglich ist, dass der hohe Salzgehalt, durch die nötige Ammoniumsulfatzugabe von 1 M, zu einer Stabilisierung des Enzyms beiträgt. Die Ausbeute ist optimal bei dieser Strategie, während die dynamische Adsorberkapazität und die Reinheit der FDH vergleichbar zum Ionentauscher sind. Ein Nachteil dieser Methode ist die hohe Salzfracht, die eingebracht werden muß.

Die kürzeste Prozessdauer hat der EBA-Prozess, in dem das 10%ige Homogenat direkt auf die Säule aufgetragen werden kann. Bei einer geringen dynamischen Kapazität von 17 U/g benötigt man, im Vergleich zum HIC-Verfahren, für 100 000 U schon die doppelte Menge an Adsorber (5,9 L). Die geringe Adsorberkapazität könnte man auf die eigene Herstellung des Adsorbers und der damit vielleicht nicht optimalen Ligandenbelegung erklären. Falls eine größere Ligandendicht möglich ist, würde dies natürlich die Kapazität des Adsorbers entsprechend steigern. Die Spezifität dieser Methode ist mit einem Reinheitsgrad der FDH von 95% beeindruckend.

Alle oben aufgeführten Aufreinigungswege führen zum Ziel. Man erhält die FDH nach den entsprechenden Aufreinigungsschritten mit einer Reinheit von mindestens 60%. Die hauptsächlichen Unterschiede liegen in der Prozessdauer, der Effizienz und der Gesamtausbeute. Sowohl bei dem PEI-Anionentauscher-Prozess als auch bei dem EBA-Prozess ist einer Verdünnung des Überstands bzw. Homogenats nötig, was zu einer fünf- bzw. vierfachen Vergrößerung des Arbeitsvolumens führt. Die benötigte Adsorbermengen des EBA-Prozesses ist doppelt so hoch wie bei Ionentauscher oder HIC.

Um alle diese Parameter gegeneinander abwägen zu können und einen Prozess zu favorisieren, ist eine ökonomische Prozessbetrachtung von Vorteil.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.4 Ökonomische Prozeßbetrachtung und Gegenüberstellung der möglichen Aufreinigungsstrategien

Ausgehend von einem 40%igen Zellhomogenat mit 20 U/ml FDH und einer Gesamtaktivität der FDH von 100 000 U (5 L) sind die vier oben angesprochenen möglichen Aufreinigungswege miteinander zu vergleichen (s. Abb. 43)

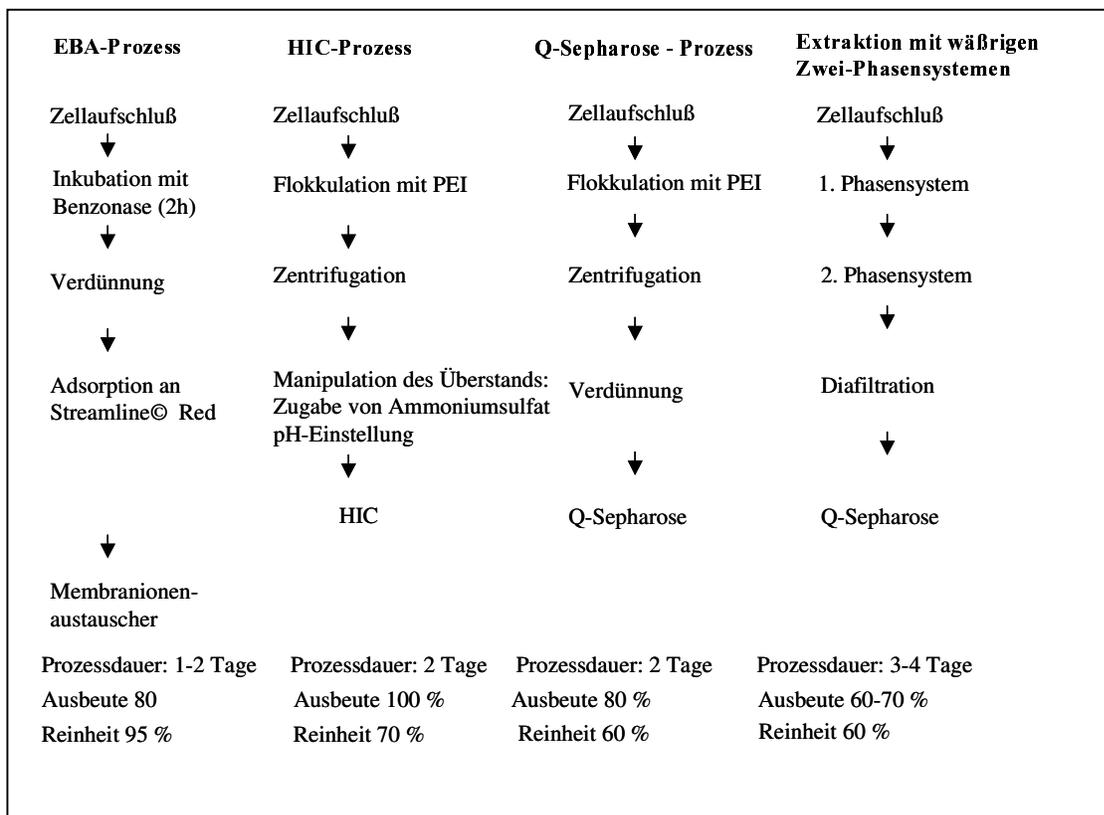


Abb. 43: Fließbilder der vier Aufreinigungsstrategien der FDH aus *E. coli*

In Abbildung 43 sind die Fließbilder der vier möglichen Aufreinigungsprozesse der FDH aus *E. coli* aufgezeigt, sowie die Prozessdauer, die Ausbeute und die zu erzielende Reinheit der FDH mit dem jeweiligen Prozess.

Kommerziell erhältliche Programme wie BIOPRO Designer (Intelligen Bosten, USA) erleichtern die ökonomische Betrachtung dieser Strategien und deren Vergleich. Aufgrund von Rohstoffpreisen und Prozeßdauer ist es möglich so die Produktionskosten für die einzelnen Verfahren zu ermitteln und gegenüber zu stellen.

Hierzu wurden für die Berechnungen reine Arbeitszeit mit 127,82 €/h veranschlagt und reine Wartezeit, z.B. zur Beaufsichtigung von Anlagen, innerhalb derer jedoch auch andere

5. Ergebnisse und Diskussion

Arbeiten ausgeführt werden konnten mit 25,25 €/h, die Chemikalienkosten und Rohstoffpreise sind den Tabellen im Anhang zu entnehmen. Die Produktionskosten setzen sich aus Kosten für Arbeitszeit, Wartezeit, Rohstoffe und Chemikalien zusammen.

Tab.12:Produktionskosten für 1U FDH aus *E. coli*

Aufreinigungsstrategie	Produktionskosten 1 U FDH
Phasensysteme, Diafiltration, Q- Sephrose	0,031 €
PEI Flokkulation, Verdünnung, Q- Sephrose	0,031 €
PEI Flokkulation, HIC, Diafiltration	0,026 €
Streamline Red	0,046 €

Wie aus Tabelle 12 zu entnehmen, sind die Produktionskosten der FDH für alle Alternativstrategien zum Streamlineverfahren günstiger. Es ist jedoch zu bedenken, daß nur mit dem Streamlineverfahren eine Ausbeute von 80 % mit einer 95%ig reinen FDH zu erzielen ist.

Da der Schwerpunkt jedoch auf der industriellen Anwendung der FDH liegt ist eine 60%ige Reinheit ausreichend und die Aufreinigungsstrategie aus PEI Flokkulation, HIC und Diafiltration zu bevorzugen. Hierbei sind jedoch nur die reinen Produktionskosten bestehend aus Chemikalien, Arbeits- und Wartezeit berücksichtigt, keine Anschaffungskosten von Zentrifugen, Ultrafiltrationseinheiten und Säulen.

Der rote Adsorber wurde in diesem Fall selbst modifiziert, mit relativ geringer Ligandendicht. Eine effizientere Modifizierung und einer damit verbunden Erhöhung der Ligandendichte würde sicherlich bei höherer Kapazität auch dieses Verfahren finanziell zu den Alternativen konkurrenzfähig machen.

5. Ergebnisse und Diskussion

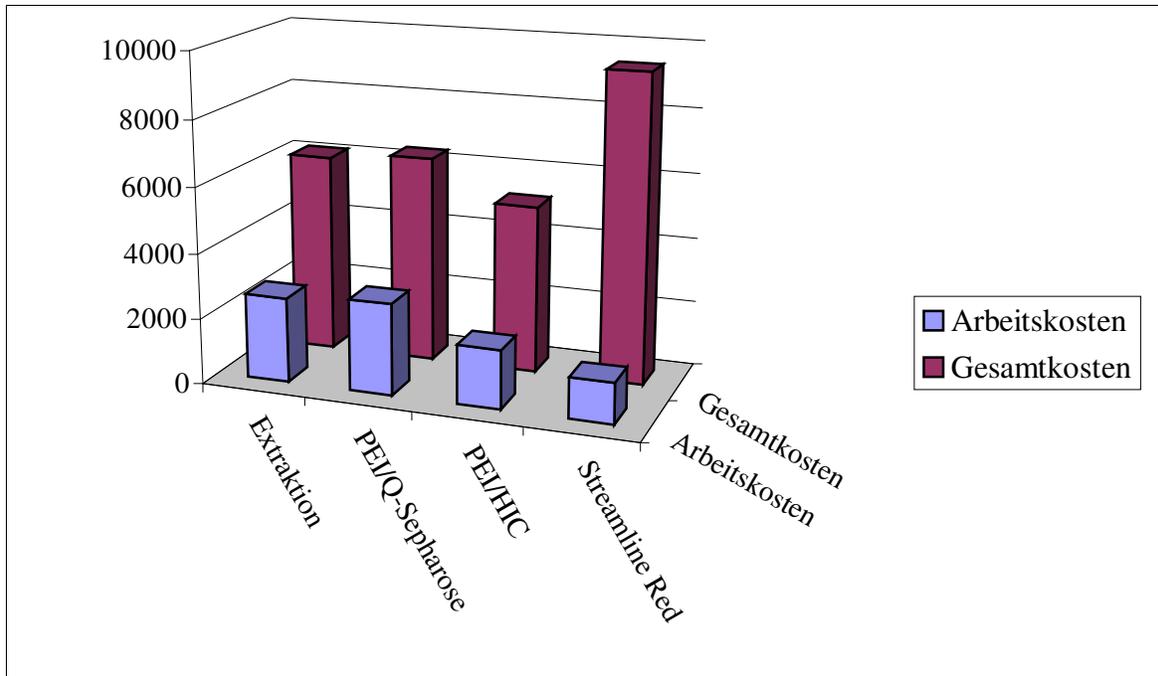


Abb.44: Vergleich der Gesamt- und anteiligen Arbeitskosten zur Aufreinigung von 100000 U FDH aus *E. coli*

Abbildung 44 verdeutlicht den Anteil an Arbeitskosten bezogen auf die Gesamtkosten zur Aufreinigung von 100000U FDH. Auffällig ist hierbei die große Diskrepanz zwischen den Gesamtproduktionskosten und den Arbeitskosten beim Streamline Red EBA Verfahren, während die Gesamtkosten im Vergleich zu den anderen Verfahren am höchsten sind, weisen die Arbeitskosten im Vergleich den niedrigsten Anteil auf. Ist es möglich die Chemikalien- und Rohstoffkosten zu reduzieren, wie oben beschrieben, dürfte dieser Prozess das beste Verhältnis von Arbeitskosten zu Chemikalien- und Rohstoffkosten aufweisen.

Da die Arbeitskosten für die einzelnen Prozesse fix sind, besteht nur die Möglichkeit einer Kostenoptimierung über die Prozesschemikalien. Der Streamline© Red Adsorber bietet hier die besten Ansatzmöglichkeiten.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.5 Konfokal Laser Mikroskopie

Die konfokale Laser Mikroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung von zwei Aspekten verwendet. Zunächst die Überprüfung der homogenen Ligandenbelegung des Streamline Red Adsorbers und des weiteren zur Untersuchung der Protein bzw. FDH Bindung an den Membranadsorber.

5.5.1 Homogenität des Streamline Red Adsorbers

Da der eingelagerte Quarzkern der Streamline Matrix eine konfokale Messung nicht erlaubt, wurde hierzu die Ligandenimmobilisierung unter gleiche Bedingungen an einer Sepharosematrix durchgeführt. Um die homogene Ligandenbelegung der Adsorberoberfläche auszutesten, wurde dieser mit fluoreszenzgelabelter FDH bis zum Adsorptionsgleichgewicht beladen, als Vergleich diente hierbei eine käufliche rote Sepharose von Pharmacia (Deutschland, Freiburg)

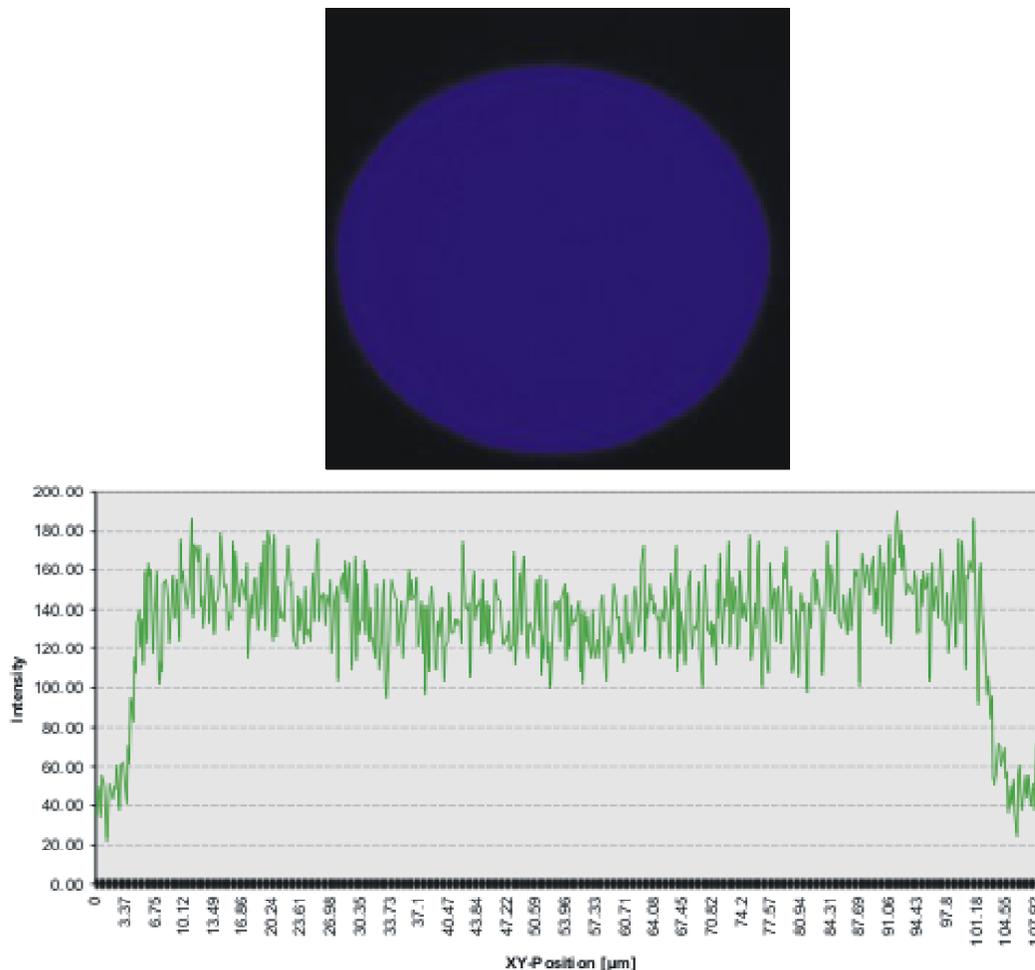


Abb 45: Selbst modifizierter roter Adsorber: Partikelschnitt und Intensitätsprofil

5. Ergebnisse und Diskussion

Wie anhand von Abb. 40 zu sehen ist der Adsorber gleichmäßig mit fluoreszenzmarkierte FDH abgesättigt, was auf eine homogene Ligandendichte schließen lässt. Abb. 41 zeigt den Schnitt durch einen Partikel und das dazugehörige Intensitätsprofil, was sich im Prinzip nicht von dem in Abb. 40 für den selbst modifizierten Adsorber unterscheidet. Eine Quantifizierung der Ligandendichte war bei dieser Methode leider nicht möglich. Die Intensität der Fluoreszenz ist nicht proportional der Proteinkonzentration, die Einstellung am Fluoreszenzphotometer hat direkte Auswirkung auf das Signal.

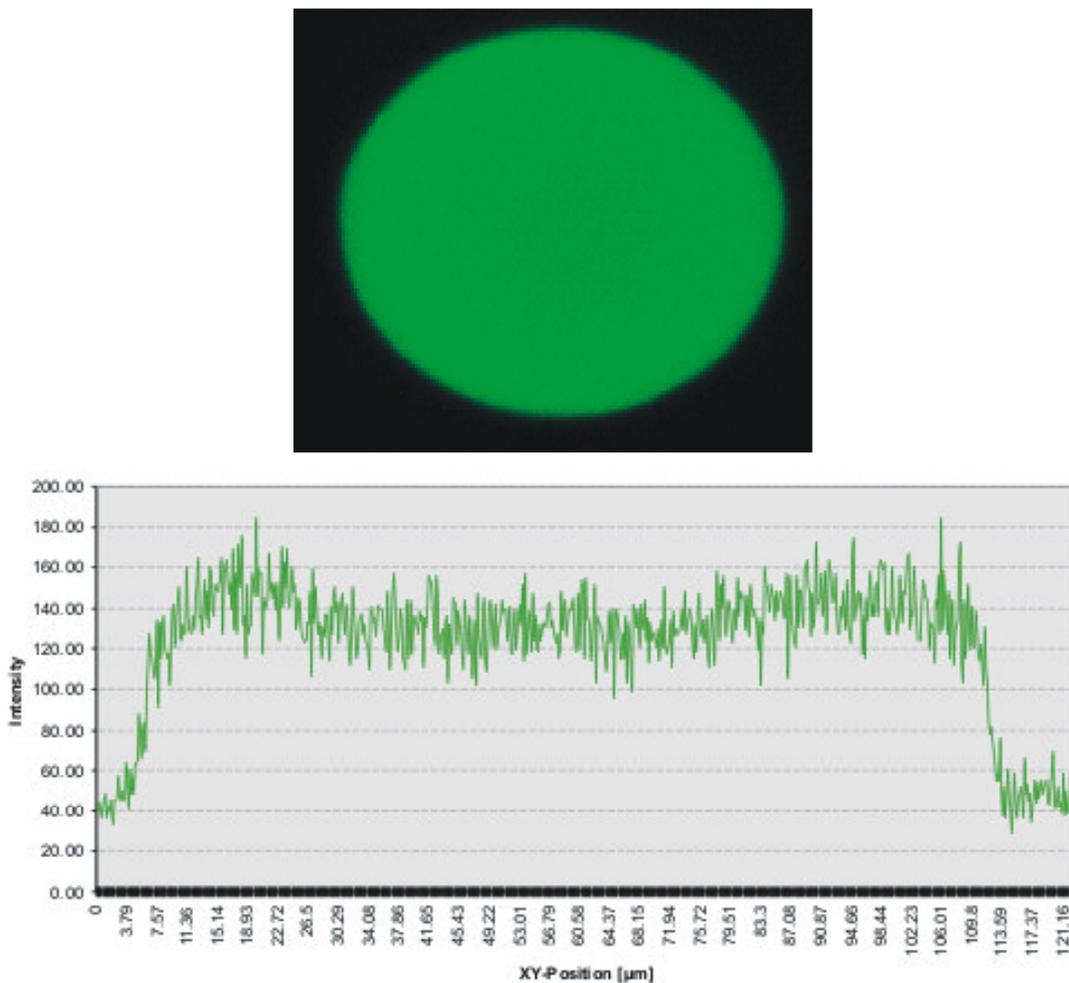


Abb. 41 Schnitt durch einen Partikel und das Intensitätsprofil für einen kommerziellen Adsorber von Pharmacia (Freiburg)

5. Ergebnisse und Diskussion

5.5.2 Messung der Proteinbindung an Ionenaustauschmembranen mit BSA und Lysozym

Der zweite Aufreinigungsschritt um eine 100 % reine FDH nach Streamline Red zu erhalten ist, wie in Abschnitt 5.3.5 beschrieben, eine Ionenaustauschchromatographie an eine Anionenaustauscher Membran. Um die prinzipielle Möglichkeit der konfokalen Messung an diesem Proteinbindungssystem zu testen, wurden zunächst zwei leicht zugängliche Modellproteine, BSA und Lysozym, herangezogen.

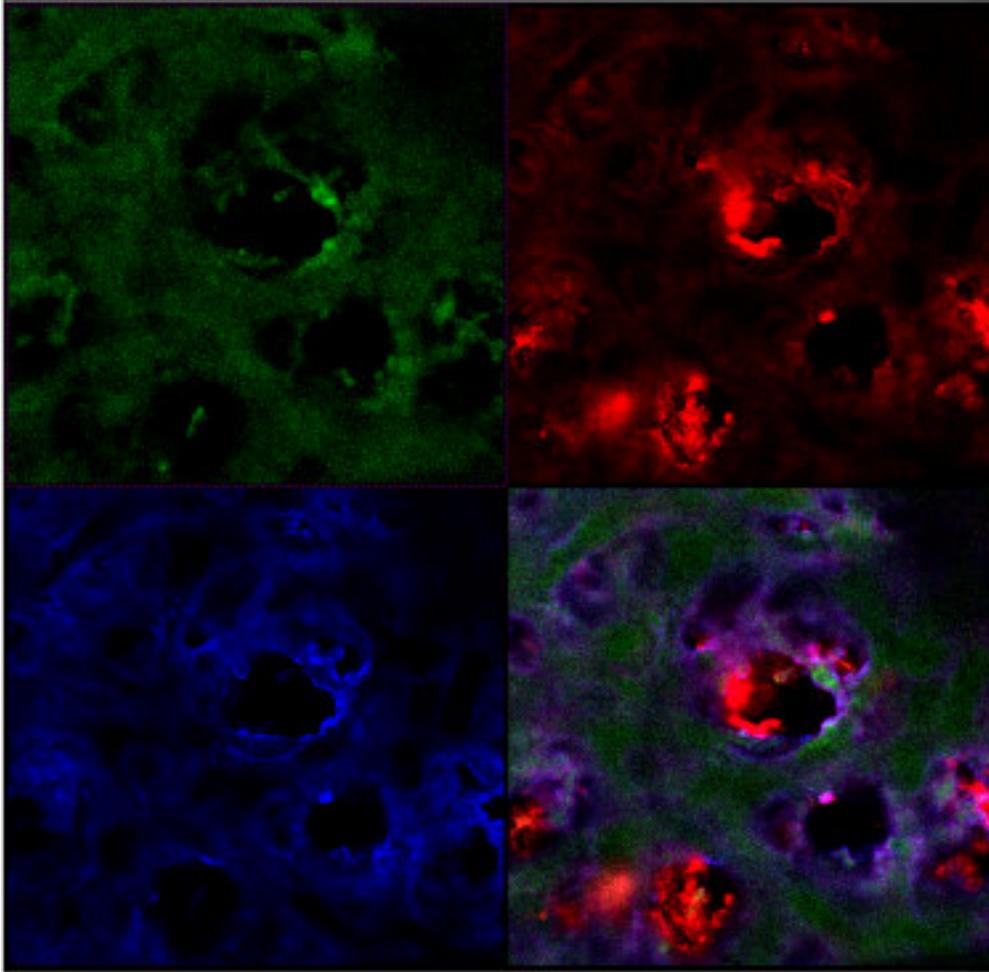


Abb. 47: gleichzeitige BSA (rot) und Lysozym (blau) Bindung in 50 mM Acetat Puffer pH 5,0 an Sartobind S (Sartorius) mit Membranskelettfärbung (grün) im Gleichgewicht

Abbildung 47 verdeutlicht die prinzipielle simultane Messung der Proteinadsorption von zwei Komponenten wie BSA und Lysozym und dem zuvor gefärbten Membranhintergrund. Die schwarzen Löcher im sonst grün gefärbten Bild (Abb. 47 links oben) sind die mit der Ligandenschicht ausgekleideten, unregelmäßigen Poren. Das rote bzw. blaue Signal (Abb. 47 oben rechts und unten links) weist gerade am Saum der Poren die höchste Intensität auf, was

5. Ergebnisse und Diskussion

durch den Overlay (Abb 47rechts unten) verdeutlicht wird. Hier hebt sich der grüne Membranhintergrund deutlich von dem roten oder blauen Proteinsaum am Rand der Pore ab. Eine Messung der Dicke dieser Proteinschicht war leider nicht möglich, da die Auflösung des Konfokalmikroskop dafür nicht ausreichend war. Abzuschätzen ist jedoch, dass es sich nicht um eine Monolayerschicht handelt und somit das Prinzip der Proteinbindung in mehreren Schichten mit Hilfe der Tentakelliganden funktioniert.

Durch die Proteinbindung an der inneren Oberfläche der Membran wird der Porendurchmesser reduziert, was eine Erklärung darstellen kann warum die Ionentauschermembranen auch bei Adsorption aus relativ verdünnten Lösungen leicht verblocken und sich ein hoher Druck aufbaut.

5.5.3 FDH-Bindung an einer Anionentauscher Membran

Nach der erfolgreicher Überprüfung der prinzipiellen Meßmethode, wurde das reale System FDH an Sartobind Q (Anionentauscher Membran von Sartorius) vermessen.

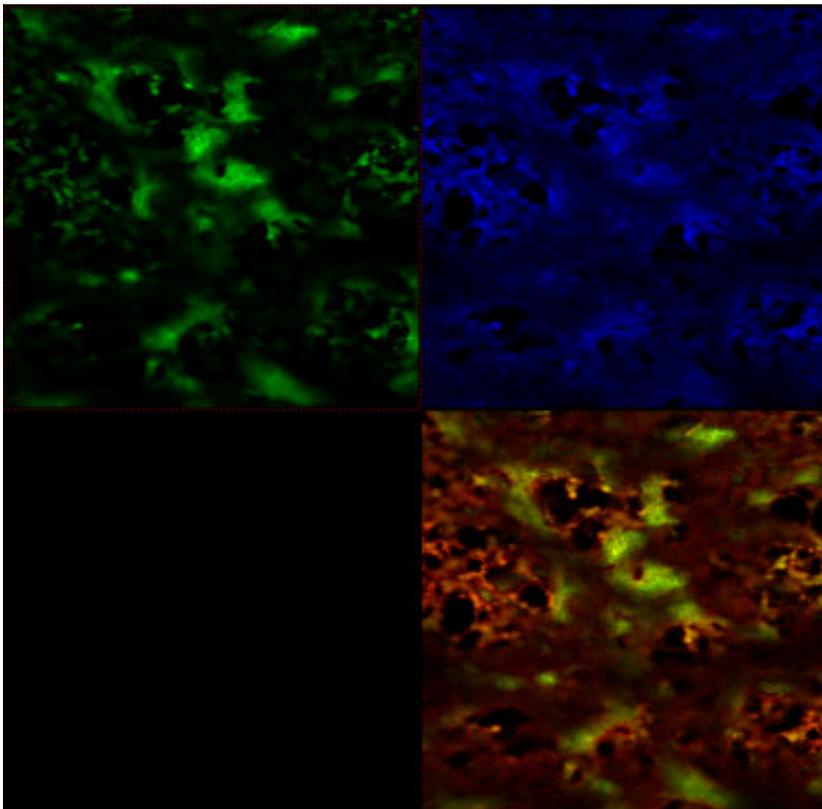


Abb. 48: Bindung der FDH an Sartobind Q (Anionentauschmembran Sartorius), 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 im Gleichgewicht

5. Ergebnisse und Diskussion

Auch bei diesem realen System ist die Proteinbindung am Porenrand (rot) im Overlay (Abb. 48 rechts unten) gut von dem grünen Membranhintergrund zu unterscheiden. Erneut zeigt sich eine Proteinbindung an der inneren Membranoberfläche in mehreren Schichten bedingt durch die Tentakelstruktur der Liganden.

5.5.4 Zusammenfassung Konfokale Messungen

Die konfokalen Messungen konnten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die Ligandenhomogenität des selbst modifizierten Streamline Red Adsorbers der Homogenität eines kommerziell erhältlichen Adsorbers durchaus entspricht. Eine Ligandendichteverteilung konnte hier leider nicht bestimmt werden (s. saure Hydrolyse Abschnitt 4.6.1).

Die Konfokalmikroskopischen Messungen mit Modellproteinen an der Membran zeigen, dass es prinzipiell möglich ist auch diese Proteinadsorption zu visualisieren. Es wurde der Beweis erbracht, dass die Proteinbindung an den Tentakelliganden in mehreren Schichten erfolgt.

Die Bildung dieser Proteinschicht in den Membranporen verringert jedoch den Porendurchmesser, was die oft auftretenden Druckerhöhung während eines Laufes erklären kann.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die NAD^+ abhängige Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* stellt ein ideales Enzym zur Cofaktorregenerierung dar. Das Enzym wird aus den Hefezellen über Extraktion mit wässrigen Zwei-Phasensysteme, Ultrafiltration und anschließender Ionenaustauschchromatographie bis zu einer technischen Reinheit von 50-60% aufgereinigt. In dieser Form kam es bisher zum Einsatz im großtechnischen Prozess zur enzymatischen tert-Leucin Synthese.

Die Klonierung der FDH in *E. coli* und eine produktivere Hochzelldichte Fermentation der rekombinanten *E. coli* Zelle warfen die Frage nach einer effizienteren und ökonomischeren Aufreinigungsmöglichkeit auf.

Die Anforderungen an den neuen Prozeß waren dabei klar definiert:

- problemlose Maßstabsvergrößerung
- maximale Ausbeute
- eine Reinheit von mindestens 60%
- möglichst kurze Prozeßzeiten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden hierzu verschiedene Aufreinigungsstrategien getestet und auf ihre Effizienz, sowie Wirtschaftlichkeit überprüft.

Drei verschiedene Strategien zur Aufreinigung der rekombinanten FDH aus *E. coli* haben sich aus den daraus resultierenden Ergebnissen ergeben (Tab13).

Tab.13. Übersicht der drei möglichen FDH-Aufreinigungswege

Prozess	Dauer [Tage]	Reinheit der FDH [%]	Gesamtausbeute [%]	Gleichgewichtskapazität [u/g]	Produktionskosten [€/U FDH]
Extraktion Diafiltration Anionentauscher	3-4	60	60-70	50	0,031
PEI-Fällung Anionentauscher	2	60	80	50	0,031
PEI-Fällung HIC	2	70	95	70	0,025
EBA	1-2	80	80	25	0,046

Alle in Tabelle 13 aufgenommene Prozesse erzielten eine Reinheit von $\geq 60\%$, welche für den technischen Einsatz des Enzyms ausreichend ist.

Neben dem schon bekannten Aufreinigungsschema von Extraktion, Diafiltration und Anionenaustauscher, ist es möglich, die FDH nach PEI Flokkulation und Zentrifugation mittels HIC oder nach Verdünnung des Überstandes mit einem Anionenaustauscher, sowie einer pseudo Affinitätschromatographie im Fließbett, bis zur gewünschten technischen Reinheit aufzureinigen.

Betrachtet man zunächst die Prozessdauer, so zeichnet sich eine Reihenfolge von EBA über PEI-Fällung in Kombination mit einem Anionenaustauscherschritt oder hydrophober Interaktion zum bekannten Aufreinigungsschema über Extraktion, Diafiltration und Anionenaustauscher ab.

In Abschnitt 5.3.1.1 konnte gezeigt werden, daß die FDH nicht unbegrenzt bei RT stabil ist, nach 18h ist eine deutliche Aktivitätsabnahme zu verzeichnen. Die lange Prozeßdauer dieses Aufreinigungsweges könnte somit ein Grund für die, im Vergleich zu den anderen Möglichkeiten, geringe Gesamtausbeute von 60-70 % sein.

Die Minimalanforderung von 60% Reinheit wird von allen Prozessen erfüllt, doch nur der EBA Prozess zeigt hier eine signifikante Abweichung nach oben und führt zu einem wesentlich reineren Produkt.

Bei der Betrachtung der Ausbeute über den gesamten Prozeß ist die signifikante Abweichung nach oben bei der Kombination PEI-Fällung und hydrophobe Interaktionschromatographie deutlich, obwohl die Ausbeute bei allen drei Alternativen zum ursprünglichen Prozeß deutlich höher liegt.

In seiner Effizienz ist der EBA-Prozess zur FDH-Aufreinigung unbestritten, daher beschäftigt sich ein großer Teil dieser Arbeit mit dem Prozessdesign gerade dieser Aufreinigungsstrategie.

So wurde zunächst der geeignete Adsorber über Bestimmung der FDH-Kapazität und der Biomasse-Adsorberinteraktion ausgewählt. Die Festlegung der Prozessparameter erfolgte nur für den pseudo-Affinitätsadsorber Streamline Red.

Hierzu wurden die Gleichgewichts- sowie die dynamische Kapazität des Adsorbers über Adsorptionsisothermen und Durchbruchkurven im gepackten Bett bestimmt.

Die Integrität der Fluidisierung im expandierten Bett wurde durch Messung der Verweilzeitverteilung überprüft.

Zur Aufstellung des Arbeitsdiagramms und der Festlegung des optimalen Arbeitspunktes, wurde die Bettexpansion bei variierender Biofeuchtmasse gemessen

Der nur aus einem Schritt bestehende EBA-Prozeß liefert eine FDH, die schon eine Reinheit von 95% aufweist. Die Prozessoptimierung dieser pseudo Affinitäts-chromatographie zeigt, dass es möglich ist durch einfache Vorversuche, die logisch aufeinander aufbauen, geeignete Prozessparameter aufzustellen, die auch einen problemlosen Scale up ermöglichen.

Für wissenschaftliche Zwecke (z.B. Kristallisation) ist es möglich die FDH mit einer anschließenden Membranionenaustauschchromatographie hoch rein zu erhalten, jedoch mit starkem Ausbeuteverlust (Ausbeute 100% reine FDH ca. 20%).

Setzt man als letztes Kriterium die Wirtschaftlichkeit der Prozesse, fest gemacht an den Prozeßkosten, so erscheint die Kombination PEI-Fällung und hydrophobe Interaktionschromatographie als bester Prozeß.

Durch konfokale Messungen (Kapital 5.5) konnte gezeigt werden, daß zwar eine gleichmäßige Bindung der FDH an dem selbst modifizierten Adsorber im Gleichgewicht erfolgt, aber die Kapazität des Adsorbers im Vergleich zu kommerziellen Farbstoffliganden Adsorbern ist um den Faktor 10 geringer, was auf eine geringere Ligandendichte zurückzuführen ist. Wäre es möglich die Ligandendicht ,durch Optimierung der chemischen Bindungsreaktion des Farbstoff an die Sepharose beads, zu erhöhen, womöglich um den Faktor Zehn, wäre der EBA Prozeß nicht nur der effizienteste sondern auch der wirtschaftlichste.

Literatur

Al-Dibouni, M. R., Garside, J. (1979)

“Particle mixing and classification in liquid fluidized beds”, Trans. I. Chem. E. 57, 94-103

Allen, S.J. and Holbrook, J. (1995)

“Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast *Candida methylca*”, Gene 162, 99-104

Arve, B. H. und Liapis, A. I. (1987)

“Modeling and Analysis of Biospecific Adsorption in a Finite Bath”, AIChEJ 33, 179-193

Atkins, W. (1995)

„physikalische Chemie“, VCH, Weinheim

Bellot, J. C. and Condoret, J. S. (1991)

“Liquid Chromatography Modelling: A Review”, Process Biochemistry 26, 363-376

Binkele, H. (1995)

“Fließbettadsorption zur Reinigung der Formiatdehydrogenase aus *Candida Boidinii*“, Diplomarbeit Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich

Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987)

“Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels”, Electrophoresis 8, 93-99

Boyer, P. M. and Hsu, J.T. (1992)

“Experimental Studies of Restricted Protein Diffusion in an Agarose Matrix”, AIChEJ 38, 259-272

Bradford, M. M., (1976)

“A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-binding dye”, Anal. Biochem., 72, 248-255

Literatur

Briefs, K.-G. (1996)

“Proteinchromatographie mit modifizierten Membranen“, Forschungsberichte VDI 17, 72

Briefs, K.-G. und Kula, M.-R. (1991)

“Schnelle Proteinchromatographie mit Membranen im analytischen und präparativen Maßstab“, Aachener Membrankolloquium, GVC/VDI Düsseldorf, 393-396

Briefs, K.G., Kula, M.-R. (1991)

“Fast Protein Chromatography on Analytical and Preparative scale using Modified Microporous Membranes“, Chem Eng Sci 47, 141-149

Brommarius, A. S., Drauz, K., Hummel, W., Kula, M.-R. and Wandrey, C. (1992)

“Some new developments in reductive amination with cofactor regeneration“, Biocatalysis 10, 37-47

Brommarius, A.S., Drauz, K., Groeger, U. and Wandrey, C. (1992)

“Membrane bioreactors for the production of enantiomerically pure α -amino acids“, In Chirality in Industry John Wiley & Sons Ltd, New York, pp371-397.

Brommarius, A.S., Schwarm, M., Stingl, K., Kottenhahn, M. Huthmacher, K. and Drauz, K. (1995)

“Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucin“, Tetrahedron: Asymmetry 6 (12), 2851-2888

Carlos, C.R. and Richardson, J.F. (1968)

“Solid movement in liquid fluidized beds- II Measurements of axial mixing coefficients“, Chem Eng. Sci 23, 825-831

Chang, Y.K., Mc Creath, G.E. and Chase H.A. (1995)

“Development of an expanded bed technique for an affinity purification of G6PDH from unclarified yeast homogenates“, Biotech. Bioeng. 48, 355-366

Literatur

Chase, H. A. (1994)

“Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds”, TIBTECH. 12, 296-303

Chilla, R., Doering, K.M., Domagk, G.F. and Rippa M. (1973)

“A simplified procedure for the isolation of a highly active crystalline glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Candida Utilis*”, Arch. Biochem Biophys. 159, 235-239

Chung, S.F. and Wen, C. Y. (1968)

“Longitudinal dispersion of liquid flowing through fixed and fluidized beds”, AIChEJ. 14 (6), 857-866

Cooper:, T. G. (1982)

“Biochemische Arbeitsmethoden“, Walter de Gryter Verlag, Berlin

Cordes, A. and Kula, M.-R. (1986)

“Process Design for Large-Scale Pirification of Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii* by Affionity Partition”, J. Chromatography 376, 375-384

Cowan, G.H., LeVan, M. D. und Tondeur, D. (1989)

“Development of physical and mathematical modelling methods for scale-up of batch stirred tank and packed-bed column adsorption and chromatographic units, Adsorption”, Science and Technology, A.E. Rodrigues, Dordrecht, Netherlends, Kluwer Academic Publisher 158, 517-537

Cuatrecasas, P. Wilchek, M. and Anfnsen, C.B. (1968)

“Selective enzyme purification by affinity chromatography”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61 636

Cutts, L. S., Roberts, P. A., Adler, J., Davies, M. C. und Melia, C. D., (1995)

“Determination of localized diffusion coefficients in gels using confocal scanning laser microscopy”, Microscopy 180, 131-139

Literatur

Daniels, S. L. (1980)

“Mechanisms involved in sorption of microorganisms to solid surfaces in: Adsorption of microorganisms to surfaces”, G. Bitton and K.C. Marshall (ed.) New York, John Wiley & Sons 7-57

Datar, R. V., Rosen, C.-G. (1996)

“Cell and celldebris removal, centrifugation and crossflow filtration”, Biotechnology Vol. 3 Rehm, H.-J., Reed, G. (eds) VCH, Weinheim 472-502

Denk, W., Stricker, J.P. und Webb, W. W. (1990)

“Two-photon laser scanning microscopy”, Science 248, 73-76

Denk, W., Stricker, J.P. und Webb, W. W. (1991)

“Two-photon laser scanning microscopy”, Patent # 5034613 USA, Cornell Research Foundation, Inc.

Dikov, M.M., Osipov, A.P. and Egorov, A.M. (1980)

“Study of the role of sulfhydryl groups in the mechanism of inactivation of bacteria formate dehydrogenase”, Biokh. 45, 1554-1559

Dorfner, K. (1991)

“Ion exchangers“, Berlin, Walter de Gruyter Verlag

Fernández-Lahore, H. M., Geilenkirchen, S., Boldt, K., Nagel, A., Kula, M.-R., Thömmes, J. (2000)

“The influence of cell adsorber interactions on protein adsorption in expanded beds”, J. Chromatogr. A 873,195-208

Fernández-Lahore, H. M., Lin, D., Hubbuch, J., Kula, M.-R., Thömmes, J. (2001)

“The use of ion selective electrodes for evaluating residence time distributions in expanded bed adsorption systems”, Biotechn. Progress

Felber, S. (2001)

Literatur

Dissertation , Institut für Enzymtechnologie, Universität Düsseldorf

Feuser, J. (1999)

Dissertation: “Auslegung und Stabilität von Fließbettadsorptionsverfahren ausgehend von biomassehaltigen Kultursuspensionen“, Institut für Enzymtechnologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Feuser ,J., Walter, J., Kula M.-R., Thömmes, J. (1999)

“Cell-adsorber interaction in expanded bed adsorption of proteins”, Bioseparation 8, 99-109

Feuser, J., Halfar, M., Lütkemeyer, D., Ameskamp, N., Kula, M.-R. and Thömmes, J. (1999)

“Interaction of mammalian cell culture broth with adsorbents in expanded bed adsorption of monoclonal antibodies”, Process Biochemistry 34,159-165

Geahel, I. and Kula, M.-R. (1985)

“Integration of Ion Exchange and Ultrafiltration Steps Studies During Purification of Formate Dehydrogenase Using DEAE Dextran”, Biotechnology Letters 6, 481-486

Gebauer, K. Thömmes, J. and Kula, M.-R. (1997)

“Breakthrough-Performance of High-Capacity Membrane Adsorbents in Protein Chromatography”, Chem. Eng. Sci 52, 405-419

Göppert-Mayer, M. (1931)

“Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen“, Ann. Phys 9, 273

Hall, K. R., Eagelton, L. C., Acrivos, A., Vermeulen, T., (1966)

“Pore- and Solid-Diffusion Kinetics in Fixed-Bed Adsorption under Constant-Pattern conditions”, I&EC fundamentals 5, 212-223

Hanahan, D. (1983)

“Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids”, J. Mol. Biol. 166, 557-568

Literatur

Harrison, R. G. (1993)

“Protein Purification Process Engineering”, Marcel Dekker Inc. Kapitel 3, 39-53

Harrison, R. G., (1993)

“protein purification process engineering”, Marcel Dekker Inc., 210/211

Heim, R. Cubitt, A.B. und Tsien, R.Y. (1995)

“Improvement green fluorescence”, Nature 373, 663-664

Heim, R. und Tdien, R. Y. (1994)

“Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescence protein”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (26), 12501-12504

Heim, R. und Tdien, R. Y. (1996)

“Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelenghts and fluorescence resonance energy transfer”, Curr. Biol. 6, 178-182

Helfferrich, F.G (1990)

“Model and physical reality in ion-exchange kinetics”, Reactive Polymers 13, 191-194

Helfferrich, F.G. und Hwang, Y.-L. (1991)

“Ion exchange kinetics Ion exchangers“, K. Dorfner Berlin, Walter de Gruyter Verlag

Hummel, W. and Kula, M.-R. (1989)

“Dehydrogenasen for the synthesis of chiral compounds”, Eur. J. Biochem. 184, 1-13

Iding, H. (1995)

“Proteinchemische Charakterisierung der NAD⁺-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*. Diplomarbeit, Institut für Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Janson, C.A. und Ryden L., (1998)

“Protein purification”, New York, John Wiley and Sons, Inc.

Jendrisak, J. (1987)

“The use of polyethyleneimine in protein purification”, Protein Purification: Micro to Macro, 75-97

Jones, J. B. (1986)

“Enzymes in organic synthesis”, Tetrahedon 42, (13), 3351-3403

Karau, A. (1998)

“Verfahrenstechnische Grundlagen der Fließbettadsorption in der Proteinaufarbeitung“, Fortschritt-Berichte VDI Reihe 17, Nr 175

Kelly, S.T. and Zydney, A.L. (1994)

“Effects of intermolekular thiol-disulfide interchange reaktionen on BSA fouling during microfiltration”, Biotech. Bioeng. 44, 972-982

Kometani, T., Morita, Y., Furui, H., Yoshii, H., and Matsuno, R. (1994)

“NAD(P)H regeneration using ethanol as an energy source in baker’s yeast-mediated bioreduction”, J. Ferm. Bioeng., 77, 13-16

Kragl, U., Vasic-Racki, D. and Andrey, C. (1992)

“Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen“, Chem. Ing. Tech 64 , 199-509

Krix, G., Brommarius, A.S., Drauz, Kottenhahn, M., Schwarm, M. and Kula, M.-R. (1997)

“Enzymatic reduction of α -keto acids leading to D-or L-hydroxy acids”, J. Biotechnol. 53, 29-39

Kroner, K. H., Krause, S., Deckwer, W. D. (1992)

“Cross-flow Anwendung von Affinitätsmenbranen zur Primarseparation von Proteinen“, BIO forum 12/92, 455-458

Kümmel, R. und Worch, E. 1990

Literatur

- “Adsorption aus wässrigen Lösungen“, Leipzig, Deutscher Verlag für Grundstoffind.
- Kula, M.-R., Brückmann, A. F., Hustedt, H., Kroner, K. H., and Morr M. (1978)
“Aqueous Two-Phase Systems for the Large-Scale Purification of Enzymes”, Enzyme Engineering 4, (Ed. G. Brown, G. Mencke, L.B. Wingard, Jr.) Plenum Press, 55-56
- Kula, M.-R. (1984)
“Aufarbeitung und Reinigung von Enzymen“, J. Pharma Technologie 1, 146-149
- Kula, M.-R. and Schütte, H. (1987)
“Purification of Proteins and the Disruption of Microbial Cells”, Biotechnology Progress 3, 31-42
- Kula, M.-R and Wandrey, C. (1987)
“Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme-Membrane-Reactors with Simultaneous NADH Regeneration”, Methods in Enzymology, Vol. 136, (K. Mosbach, ed) 9-21
- Kula, M.-R, (1988)
“Downstream processing for bioproducts”, J. Chem. Eng. Q 2, 179-183
- Kula, M.-R. (1990)
“Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction”, Bioseparation 1, 181-189
- Kula, M.-R. and Kragel U. (2000)
“Dehydrogenases in synthesis of chiral compounds”, Stereoselective Biocatalysis (ed. R. Patel), Marcel Dekker New York, 839-866
- Kunii, D., Levenspiel, O. (1969)
“Fluidization Engineering”, John Wiley & Sons, New York
- Laemmli, U.K. (1970)
“Cleavage of structural protein assembly of the head of bacteriophage T4”, Nature 227, 680-685

Literatur

Langmuir, I: (1918)

“The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum”, J. Am. Chem. Soc. 40, 1361

Levenspiel, O. (1984)

“Chemical reaktion engineering”, John Wiley and Sons, New York. Kap.9

Lin, D., Fernández-Lahore, H. M , Kula, M.-R., Thömmes, J. (2000)

“Minimising Biomass/Adsorber Interactions in Expanded Bed Adsorption Processes-
A methodological Design Approach”, Bioseparation, in press

Linden, T., Ljunglöf, A., Kula, M.-R. and J. Thömmes (1999)

“Visualising two component protein diffusion in porous adsorbents by confocal scanning
laser microscopy”, Biotechnol. Bioeng., 65, 622.

Linden, T., Ljunglöf, A., Hagel, L., Kula, M.-R., Thömmes, J. (2000)

“Visualising patterns of protein uptake to porous media using confocal scanning laser
microscopy”, Separation Science and Technology, in press

Ljunglöf, A. and Thömmes, J. (1998)

“Visualising intraparticle protein transport in porous adsorbents by confocal
microscopy”, J. Chromatogr. A 813, 387-395

Ljunglöf A. and R. Hjorth, (1996)

“Confocal microscopy as a tool for studying protein adsorption to chromatographic
matrices”, J. Chromatogr. A, 743, 75-83

Ma, Z. Whitley, R.D., Wang, N.-H. L. (1996)

“Pore and surface diffusion in multicomponent adsorption and liquid chromatography
systems”, AIChE Journal 42, 1244-1262

McCreath, G.E., Chase, H.A., Owen, R.O., Lowe, C.R. (1995)

Literatur

- “Expanded bed affinity chromatography of dehydrogenases from beaker’s yeast using dye-ligand perfluoropolymer supports”, Biotechnol. Bioeng. 48, 341-345
- Milburn, P., Bonnerjea, J., Hoare, M. and Dunnill, P. (1990)
“Selective flocculation of nucleid acids, lipids and colloidal particles from a yeast cell homogenate by polyethyleneimine, and its scale up
- Minsky, M. (1957)
“Microscopy apparatus” Patent # 3013467 USA
- Minsky, M. (1988)
“Memoir on inventing the confocal scanning microscope”, Scanning 10, 128-138
- Nelson, P. A., Galloway, T. R. (1975)
“Particle-to-fluid heat and mass transfer in multiparticle systems at low Reynolds numbers”, AIChE Journal 10, 605-611
- Nicoud, R. M. und Seidel-Morgenstern, A. (1996)
- Persson, I. and Lindman, B. (1987)
“Flocculation of cell debris for improved separation by centrifugation, Flocculation in biotechnoloy and Separation Systems, Elsevier Science publisher 457-466
- Pawley, J. B. (1995)
“Handbook of Biological Confocal Microscopy”, New York, Plenum Press
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975)
“Metal chelat affinity chromatography, a new approach to protein fractionation”, Nature 258, 598
- Quadri, S.S. and Easterby, J.S. (1980)
“Purification of skeletal muscle hexokinase by affinity elution chromatography”, Anal. Biochem. 105, 299-303

Literatur

Rabilloud, T. (1992)

“A comparison between low background silver diamine and silver nitrate protein stains”, Elektrophoresis 13, 429-439

Richardson, J.F. and Zaki, W. N. (1954)

“Sedimentation and fluidization: Part I”, Trans. Instn. Chem. Engrs. 32, 35-52

Sahm, H. (1977)

“Methabolism of methanol by yeast”, Adv. Biochem. Eng. 6, 77-103

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989)

“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schmidt, E., Hummel, W. Wandrey, C. and Kula, M.-R. (1987)

“Continuous production of L-phenylalanine from phenylpuruvat using isolated L-phenylalanin dehydrogenase from Rhodococcus sp.”, Proceedings Biochemical Engineering Congress Stuttgart, Fischer Verlag Stuttgart, 487-490

Schütte, H., Flossdorf, J., Sahm, H. and Kula, M.-R (1976)

“Purification and Properties of Formaldehyd Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from Candida boidinii”, Eur. J. Biochem. 62, 151-160

Schütte, H. and Kula, M.-R (1986)

“Einsatz von Rührwerkskugelmühlen und Hochdruckhomogenisatoren für den technischen Aufschluß von Mikroorganismen“, Biotech-Forum 3, 70-79

Schütte, H. and Kula, M.-R (1990)

“Pilot and process scale Techniques for cell disruption”, Biotechnol. Appl. Biochem. 12, 599-620

Scopes, R. (1987)

“Protein Purification Principles and Practice”, Second Edition, Springer Verlag chapter 5.4 Dye Ligand Chromatography, 141-156

Slusarczyk, H. (1997)

“Stabilisierung der NAD⁺-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* mittels gerichteter Mutagenese“, Dissertation, Institut für Enzymtechnologie, Universität Düsseldorf

Slusarczyk, H, Pohl M. and Kula M.-R. (1998)

“Cloning and stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site directed mutagenesis in: Stability and Stabilization of Biocatalysts”, A. Ballesteros, F. J. Plou, J. L. Iborra, P. Halling (eds.) Elsevier, Amsterdam, 331-336

Spalding, B. J. (1991)

“Downstream processing: Key to slashing production costs 100 fold”, Bio/Technology 9, 229-233

Stahlberg, J., Jönsson, B. Horvath, C. (1992)

“Combined Effect of Coulombic and van der Waals Interaction in the Chromatography of proteins”, Anal. Chem. 64, 3118-3124

Sulkowski, E. (1985)

“Purification of proteins by IMAC”, Trends Biotechnol. 3, 1

Svarovsky, L. (1981)

“Solid-Liquid Separation”, Butterworths Kapitel 2, 8-32

Thömmes, J. and Kula M.-R. (1995)

“Membrane chromatography- an integrative concept in the downstream processing of proteins”, Biotechnology Progress 11, 357-367

Thömmes, J. (1997)

“Fluidized bed adsorption as a primary recovery Step in protein purification”, Adv. Biochem. Eng., 58, 185-230

Literatur

Thömmes, J. Habilitationsschrift (1999)

“Zur Fließbettadsorption als Primärschritt in der Proteinaufreinigung“, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf 19-25

Tsuneda, S., Shinano, H., Saito, K., Furusaki, S., Sugo, T. (1994)

“Binding of Lysozyme onto a Cation-Exchange Microporous Membrane Containing Tentacle-Type Grafted Polymer Branches“, Biotechnol. Prog., 10,76-81

Tsuneda, H., Saito, K., Furusaki, S., Sugo, T. (1995)

“High-throughput processing of proteins using a porous and tentacle anion-exchange membrane“, J. Chromat. A 689, 211-218

Tswett, M. S. (1906)

“Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll“, Die Adsorption“, Ber. Deut. Botan. Ges. 25, 319-322

Uhlig, H (1991)

„Enzyme arbeiten für uns. Technische Enzyme und ihre Anwendung“, Carl Hanser Verlag, München

van Deemter, J.J., Zuiderweg, F. J., Klinkenberg, A. (1956)

“Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography“, Chem. Eng. Sci., 5, 271-289

Villiermaux J., van Swaaij, W. P. M. (1969)

“Model representativ de la distribution des temps de sejour dans un reactor semi-infini a dispersion axiale avec zones stagnantes. Application a l'écoulement ruisselant dans des colonnes danneaux rasching“, Chem. Eng. Sci. 24, 1097-1111

Walsdorf, A. Forciniti, D. and Kula, M.-R. (1990)

“Investigation of affinity partition chromatography using formate dehydrogenase as a model“, J. Chromatography 523, 103-117

- Wandrey, C. Wichmann, R., Kula, M.-R. and Brückmann A. F. (1984)
“Enzym-Membran-Reaktor, Technologietransfer: Beispiel Produktion von L-Aminosäuren“, Die Umschau 3, 88-91
- Wandrey, C. Wichmann, R., Berke, W., Morr, M. and Kula, M.-R. (1984)
“Continuous Cofactor Regeneration in Membrane Reactors“, Proceedings 3rd. Eur. Cong. Biotechnology, München, Vol I, 597-605
- Weatherley, L. R. (1994)
“Engineering processes for bioseparations“, Oxford, Butterworth and Heinemann Ltd.
- Wedler, G. (1995)
“physikalische Chemie“, VCH, Weinheim
- Weudter-Botz, D. Paschold, H., Striegel, B. Gieren, H. Kula, M.-R- and Wandrey, C. (1994)
“Continous computer controlled production of formate dehydrogenase (FDH) and isolation on a pilot scale“, Chem. Eng. Technol. 17, 131-137
- Wichmann, R., Wandrey, C. Bückmann, A.F. and Kula, M.-R. (1987)
“Continous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration“, Biotechnol. Bioeng. 23, 2789-2802
- Wittler, J. (1996)
“Entwicklung einer fluoremetrischen Methode zur quantitativen Bestimmung von DNA in Zellkulturüberständen“, Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Bielefeld.
- Wong, C.-H. and Whitesides, G. m. (1981)
“Enzyme-catalysed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration by using glucose-6-phosphate and the glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*“, J. Am. Chem. Soc 103, 4890-4899

Wong, C.-H., Drukhhammer, D.G. and Sweers, H.M. (1985)

“Enzymatic vs. fermentative synthesis: Thermostable glucosedehydrogenase catalyzed regeneration of NAD(P)H for use in enzymatic synthesis“, J. Am. Chem. Soc. 107, 4028-4031

Wright, P. R., Muzzio, F.J. und Glasser, B. J. (1998)

“Batch uptake of lysozyme: Effect of solution viscosity und mass transfer on adsorption“, Biotechnology Progress 14, 913-921

Hochzell dicht Fermentationsmedium

Tabelle: Zusammensetzung des HZD-Batch Mediums

Lösung	Substanz	m [g]	V (Stamm) [mL]	Endkonz [g/L] in 10 L Endvolumen
HZD-Grundlsg pH mit NaOH Plätzchen auf 7,0 titriert	NH ₄ Cl	2	1000	0,2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	20		2
	KH ₂ PO ₄	130		13
	K ₂ PO ₄	100		10
	NaH ₂ PO ₄ * 1 H ₂ O	60		6
Glukose-Lsg.	Glukose * 1 H ₂ O	60	200	6
MgSO ₄ -Lsg.	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	10	50	1
Hefeextrakt-Lsg	Hefeextrakt	30	160	3
Na ₂ -EDTA-Lsg.	Titriplex	0,093	2	0,0093
Vitamin-Lsg. 428 (DSM) Bei pH 12 lösen, dann mit HCl auf pH 7 einstellen	Ribovlavin (Vit. B12)	0,005	50	0,0005
	Thiamin HCl (Vit B1)	0,5		0,05
	Nicotinsäure	0,025		0,0025
	Pyridoxin-HCl (Vit B6)	0,025		0,0025
	Ca-Panthotenal	0,025		0,0025
	Bioten	0,0000		0,000005
	Folsäure	5		0,00001
	Cyanocobalamin (Vit. B12)	0,0001		0,00005
Spurenelement-Lsg. In 5N HCl	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,4	40	0,04
	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,02		0,002
	CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0,01		0,001
	MnSO ₄ * 1 H ₂ O	0,1		0,01
	H ₃ BO ₃	0,07		0,007
	AlCl ₃ * 6 H ₂ O	0,005		0,0005
	Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,1		0,01
	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,02		0,002
		0,4		0,04
Thiamin-Lsg	Thiamin HCl (Vit B1)	1	10	0,1
Ampicilin-Lsg.	Ampicilin	1	10	0,1
IPTG-Lsg.	IPTG	0,01 M	10	1 mM

Anhang

Tabelle Zusammensetzung 4 l Fed Batch Medium

Glukose-Lsg.	Glukose	2400	3500	600
HZD-Grundlsg.	Stammlsg. vom Batch	400		
MgSO ₄ -Lsg	MgSO ₄	48		12
Hefeextrakt-Lsg	Hefeextrakt72			18
Vitamin-Lsg. 428 (DSM)	Stammlsg. vom Batch		20	
Spurenelement-Lsg	Stammlsg. vom Batch		16	
Thiamin-Lsg	Stammlösung vom Batch	4	40	1

Tabelle : Volumenzusammensetzung 10 L Batch Medium

HZD-Grundlsg.	1000 mL
Glukose-Lsg.	125 mL
MgSO ₄ -Lsg	50 mL
Hefeextrakt-Lsg	100 mL
Na ₂ -EDTA-Lsg.	1 mL
Vitamin-Lsg. 428 (DSM)	50 mL
Spurenelement-Lsg	40 mL
Thiamin-Lsg	5 mL
Ampicilin-Lsg.	5 mL
Antischaum	4 mL
Inokulum	100 mL
Aqua dest.	8510 mL

Σ 10000 mL

Tabelle : Volumenzusammensetzung 4 L Fed-Batch Medium

HZD-Grundlsg.	400 mL
Glukose-Lsg.	3044 mL
MgSO ₄ -Lsg	240 mL
Hefeextrakt-Lsg	240 mL
Vitamin-Lsg. 428 (DSM)	20 mL
Spurenelement-Lsg	16 mL
Thiamin-Lsg	40 mL

Σ 4000 mL

Phasensysteme FDH-Aufreinigung

Zusammensetzung Phasensystem I

% w/w

50	Zellhomogenat
18	PEG 400
7	PEG 1500
6	Dikaliumhydrogenphosphat
18,8	Wasser
0,2	Natriumchlorid

Zusammensetzung Phasensystem II

% w/w

50	Topphase System I
1,5	PEG 20000
8	Dikaliumhydrogenphosphat
40,5	Wasser

Anhang

Kostenrechnung

a) Phasensysteme, Ultrafiltration, Q-Sepharose

Phasensystem I

5 kg Homogenat	
1,8 kg PEG 400	42,75 DM
0,7 kg PEG 1500	18,62 DM
0,6 kg K ₂ HPO ₄	82,92 DM
1,88 kg Wasser	0,04 DM
0,02 kg NaCl	0,69 DM
Abwasser 2 l	0,05 DM

Gesamtkosten Chemikalien	145,02 DM
Arbeitszeit 2h	500,00 DM

Betriebskosten 645,07 DM

Wartezeit 5 h 250,00 DM

gesamt **895,07 DM**

Phasensystem II

3kg Topphase	
0,09 kg PEG 20000	5,19 DM
0,48 kg K ₂ HPO ₄	0,48 DM
2,43 kg Wasser	0,05 DM
Arbeitszeit 2h	500,00 DM
Abwasser 1 l	0,026 DM
Wartezeit 3h	150 DM

Betriebskosten **655,75 DM**

Ultrafiltration

KPi Puffer 5 L	6 DM
Filter (0,2 µm) Prozessanlage	250 DM
Abwasser 7,5 l	0,195 DM
Arbeitszeit 1 h	250 DM
Wartezeit 4 h	150 DM
<i>Betriebskosten</i>	656,2

Q-Sepharose

Beladung mit 30U/ml Adsorber bei 90% FDH Ausbeute

Q-Sepharose 3L	3000 DM
KPi Puffer 75 L	90 DM
NaCl 0,58 kg	20 DM
Arbeitszeit 2 h	500 DM
Wartezeit 6 h	300 DM
Abwasser 50 l	1,3 DM
<i>Betriebskosten</i>	3911,3

Gesamtbetriebskosten für den Prozess 6118,32 DM somit betragen die reinen Betriebskosten für die Aufreinigung von 1U FDH 0,06 DM.

b) Polyethyleniminflokkulation, Verdünnung und Q-Sepharose

Polyethyleniminflokkulation

PEI 25 g	15,8 DM
50 mM Tris Puffer 5 L	29,04 DM
Arbeitszeit 1 h	250 DM
Arbeitszeit Zentrifugation 1h	250 DM

Anhang

Wartezeit 1h	50 DM
<i>Betriebskosten</i>	594,84 DM

Verdünnung

Überstand 3 L

Wasser 18 L	0,36 DM
Arbeitszeit 1 h	250 DM
<i>Betriebskosten</i>	250,36

Q-Sepharose

Bei 100 % FDH Ausbeute und einer Kapazität von 30 U/ml Adsorber 3L Überstand

Q-Sepharose 3,4 L	3400 DM
KPi Puffer 68 L	81,6 DM
NaCl 0,58 kg	20 DM
Arbeitszeit 2h	500 DM
Wartezeit 30h	1500 DM
Abwasser 87 L	2,26 DM
<i>Betriebskosten</i>	5503,89

Gesamtbetriebskosten für den Prozess 6349,1 DM somit betragen die reinen Betriebskosten für die Aufreinigung von 1U FDH 0,06 DM.

c) Polyethyleniminflokkulation, HIC und Diafiltration

Polyethyleniminflokkulation

PEI 25 g	15,8 DM
50 mM Tris Puffer 5 L	29,04 DM
Arbeitszeit 1 h	250 DM

Anhang

Arbeitszeit Zentrifugation 1h	250 DM
Wartezeit 1h	50 DM
<i>Betriebskosten</i>	594,84 DM

HIC

Bei 100 % FDH Ausbeute und einer Kapazität von 35 U/ml Adsorber 3L Überstand

Phenylsepharose 2,9 L	2900 DM
Ammoniumsulfat 1,7 kg	50,32 DM
KPi Puffer 75 L	90 DM
Arbeitszeit 2h	500 DM
Wartezeit 7 h	350 DM
Abwasser 75 L	3,75 DM
<i>Betriebskosten</i>	3894,07

Ultrafiltration

KPi Puffer 5 L	6 DM
Filter (0,2 µm) Prozessanlage	250 DM
Abwasser 7,5 l	0,195 DM
Arbeitszeit 1 h	250 DM
Wartezeit 4 h	150 DM
<i>Betriebskosten</i>	656,2

Gesamtbetriebskosten für den Prozess 5145,11 DM somit betragen die reinen Betriebskosten für die Aufreinigung von 1U FDH 0,05 DM.

d) Streamline Red

Bei einer Kapazität von 17 U/ml Adsorber und 15 l 10%iges Homogenat

Streamline Red 5,9 L	5900 DM
Tris Puffer 44.5 L	258,1 DM
KPi Puffer 25 L	30 DM
Natriumsulfat 3,2 g	0,19 DM
Glycerin 2,5 l	151 DM
NAD ⁺ 14 g	1827 DM
Arbeitszeit 5h	1250 DM
Abwasser 75 l 1,95	
<i>Betriebskosten</i>	<hr/> 9418,24

Gesamtbetriebskosten für den Prozess 9418,24 DM somit betragen die reinen Betriebskosten für die Aufreinigung von 1U FDH 0,09 DM.

Anhang

Preisliste

Abwasser	1 L	0,026
Abwasser mit Ammoniumbelastung	1 L	0,05
Ammoniumsulfat	1 kg	69,1 DM
Benzonase	1 U	0,03 DM
Glycerin	1 l	60 DM (Fluka)
K ₂ HPO ₄	1 kg	138,2 DM (Fluka)
50 mM KPi- Puffer	1l	1,20 DM
NaCl	1 kg	34,5 DM (Fluka)
NAD ⁺	1 g	130,5 DM (Fluka)
Natriumsulfat	1 kg	60,2 DM (Fluka)
PEG 400	1 kg	23,75 DM (Fluka)
PEG 1500	1 kg	26,6 DM (Fluka)
PEG 20000	1 kg	57,7 DM (Fluka)
Polyethylenimin	50 mL	31,6 DM (Sigma)
Q-Sepharose	1 mL	1 DM (Parmacia)
Tris	1 kg	968 DM (Fluka)
50 mM Tris Puffer	1L	5,80 DM

Arbeitszeit	1 h	250 DM
Wartezeit	1 h	50 DM

Lebenslauf

Personalien

Name	Ute Reichert
Anschrift	Ellbachstr. 4 52428 Jülich
geboren am	29.08.1967
geboren in	Hagen-Hohenlimburg

Ausbildung

1978 - 1987 03.1987	Gymnasium Letmathe der Stadt Iserlohn allgemeine Hochschulreife
10.1987 - 05.1990 09.1990	Studium Diplom Chemie an der Universität Würzburg Wechsel an die FH-Niederrhein, Studium Diplom Chemieingenieurwesen, wegen des Schwerpunkts Biochemie/Biotechnologie und der mehr technisch, praktischen Ausrichtung
03.1995	<i>Abschluß</i> Diplom Chemieingenieurin (FH) Diplomarbeit: "Biochemische Charakterisierung kaliumabhängiger Enzyme"
10.1995	Studium Diplom Biochemie an der Universität Bielefeld
08.1998	<i>Abschluß</i> Diplom Biochemikerin Diplomarbeit: "Membranionenaustauschchromato- graphie -Teilaufreinigung mono- klonaler Antikörper mittels eines Membrankationenaustauschers vom Labor- bis in den Pilotmaßstab"
seit 08.1998	Promotion am Institut für Enzymtechnologie (IET) der Heinrich Heine Universität Düsseldorf voraussichtlicher Abschluß SS 2001 Thema: Prozessdesign, Prozessoptimierung und scale up am Beispiel des industriell relevanten Enzyms Formiatdehydrogenase aus <i>E. coli</i>

