

Tobias Käppler

Prozessintensivierung durch feldunterstutzte Bioseparation

Elektrofiltration und *in situ* Magnetseparation



universitätsverlag karlsruhe

Tobias Käppler

Prozessintensivierung durch feldunterstützte Bioseparation

Elektrofiltration und *in situ* Magnetseparation

Prozessintensivierung durch feldunterstützte Bioseparation

Elektrofiltration und *in situ* Magnetseparation

von
Tobias Käßler



universitätsverlag karlsruhe

Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)

Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, 2008

Impressum

Universitätsverlag Karlsruhe
c/o Universitätsbibliothek
Straße am Forum 2
D-76131 Karlsruhe
www.uvka.de



Dieses Werk ist unter folgender Creative Commons-Lizenz
lizenziert: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/>

Universitätsverlag Karlsruhe 2008
Print on Demand

ISBN: 978-3-86644-305-1

**Prozessintensivierung durch
feldunterstützte Bioseparation**
Elektrofiltration und *in situ* Magnetseparation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik der
Universität Fridericiana Karlsruhe (TH)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Ing. Tobias Käßler
aus Stuttgart

Referent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Korreferent: Prof. Dr.-Ing. habil. Hermann Nirschl

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2008

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik, sowie am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik.

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten für die Möglichkeit danken, dass ich diese Arbeit in der Gruppe Bioverfahrenstechnik durchführen konnte. Die fruchtbaren Diskussionen mit Ihnen, Ihre kreativen Anregungen und Ihre motivierende Unterstützung und die vertrauensvoll gewährten Freiheiten haben dazu geholfen, neue Ideen zu entwickeln, denen ich immer wieder nachgehen konnte. Sie haben mir in der Zeit auch die Möglichkeit gegeben, an zahlreichen Dienstreisen ins Ausland teilzunehmen und auf Projektmeetings sowie auf Konferenzen meinen wissenschaftlichen aber auch persönlichen Horizont zu erweitern.

Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. Hermann Nirschl danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Weiterhin danke ich der Gruppe Bioverfahrenstechnik. Die gute Arbeitsatmosphäre und das freundliche Miteinander haben Spaß gemacht und werden daher wohl dauerhaft in Erinnerung bleiben. Insbesondere Christian Steinweg möchte ich danken, der Lösungen für die technische Umsetzung stets schneller als man erwarten könnte gefunden hat und immer kreative Ideen im Labor parat hatte. Weiterhin möchte ich Dr. Meike Dössel für die Unterstützung in chemischen Fragestellungen und bei der Analytik danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik möchte ich für alle Unterstützung bei konstruktiven und messtechnischen Aufgaben danken. Der elektrischen und der mechanischen Werkstatt danke ich für die sehr schnelle Umsetzung in Fertigung und Reparatur von Anlagenteilen.

Insbesondere Herrn Dipl.-Ing. Friedhelm Flügel habe ich viel zu verdanken, was konstruktive Fragestellungen betraf. Durch seine Schulung konnte ich sicherheitstechnisch und praktisch viel lernen.

Herrn Andreas Lumppp möchte ich herzlich für die Hilfe bei der Konstruktion der Hochgradienten-Magnetseparationsanlage danken. Herrn Hans Guigas danke ich für die Hilfe in konstruktiven Fragestellungen.

Den Projektpartnern des EU-Projekts NanoBioMag möchte ich für alle Anregungen danken. Insbesondere die gute Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. Mathias Stolarski war fruchtbar und hat viel Freude bereitet. PD Dr.-Ing. Matthias Franzreb möchte ich herzlich für alle Hilfestellungen bei der Errichtung der HGMS-Anlage danken. Special thanks to Prof. Tim Hobley, Kim Ottow and Trine Petersen for the good interworking during the EU project. I am very grateful for the possibility of very good exchange in research and for your help to produce magnetic particles.

Den Projektpartnern in Clausthal-Zellerfeld Prof. Dr.-Ing. Urs Peuker, Birgit Hickstein, Tobias Banert danke ich für die konstruktive, freundschaftliche Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern der Firma Lenser danke ich für die gute Zusammenarbeit im Bereich der Elektrofiltration, insbesondere Claus Bäurle, Thomas Kaufmann und Dr.-Ing. Ulrich Hüsgen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei allen Studenten bedanken, die im Rahmen von Studien-, Diplom-, Hiwi- oder Praktikumsarbeiten mitgeholfen haben, die Forschung im Bereich der Magnetseparation und Elektrofiltration zu vertiefen. Dies waren: Aziz el Aoussi, Maya Atanasova, Marco Brose, Robert Burgert, Martin Cerff, Wenqing Cui, Patrick Diederich, André Eichler, Melanie Gerlitzki, Iris Hippen, Veronika Holderied, Sibylle Kachel, Micha Kirchgeßner, Marine Lefalher, Karin Moss, Katie Murray, Cecilia Peralta, Anelyia Petrova, Colin Olsen, Heike Sandler, Kristina Schleining, Hongyan Shi, Julia Weberling.

Herzlichen Dank auch an meine Eltern für alle Unterstützung.

Dir, Olga, danke ich für alle Ermutigung, Stärkung, Unterstützung, Motivation und Freude, die das Arbeiten stets begleitet und erleichtert haben.

Karlsruhe, Juni 2008

Tobias Käßpler

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Ausgangssituation.....	5
1.2	Zielsetzung dieser Arbeit.....	6
2	Theoretische Grundlagen.....	9
2.1	Elektromagnetismus.....	9
2.1.1	Grundlagen – Maxwellgleichungen.....	9
2.1.2	Elektrisches Feld.....	10
2.1.3	Elektrophorese.....	12
2.1.4	Magnetisches Feld.....	14
2.1.5	Magnetische Materialien.....	15
2.1.6	Kraft auf Partikel im Magnetfeld.....	17
2.2	Extrazelluläre Proteinproduktion.....	19
2.2.1	Bioprozesskinetiken.....	19
2.2.2	Sekretierung von Proteinen.....	21
2.2.3	<i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i> als Produzenten extrazellulärer rekombinanter Proteine.....	24
2.3	Wechselwirkungen von Proteinen.....	25
2.3.1	Protein-Protein Wechselwirkungen.....	25
2.3.2	Adsorption von Proteinen.....	26
2.3.3	Einfluss von extrazellulären Proteinen auf den Bioprozess.....	29
2.4	Grundlagen der Elektrofiltration.....	30
2.4.1	Filtration in der Biotechnologie.....	30
2.4.2	Fraktionierung von Proteinen mit Ultrafiltration.....	35
2.4.3	Elektrofiltration von Biopolymeren.....	38
2.5	Grundlagen der Magnetseparation als ISPR Methode.....	41
2.5.1	ISPR-Methoden.....	41
2.5.2	Magnetseparation in der Biotechnologie.....	42
3	Material und Methoden.....	47
3.1	Materialien.....	47
3.1.1	Kultivierungsmedien.....	47
3.1.2	Proteine und Enzyme.....	48
3.1.3	Materialien für die Elektrofiltrationsuntersuchungen.....	49

3.1.4	Materialien im Bereich der Magnetseparation	51
3.2	Magnetpartikel.....	53
3.2.1	Herstellungsverfahren der Magnetpartikel	53
3.3	Analytische Methoden.....	61
3.3.1	Kolorimetrische Analysemethoden.....	61
3.3.2	Sonstige Analytikmethoden.....	64
3.4	Durchführung der Kultivierungen.....	66
3.4.1	Verwendeter Organismus	66
3.4.2	Schüttelkolbenkultivierungen.....	66
3.4.3	Kultivierungen im Bioreaktor	66
3.5	Elektrofiltrationsuntersuchungen	68
3.5.1	Aufbau der Elektrofiltrationsanlage	68
3.5.2	Durchführung der Elektrofiltrationsversuche	70
3.5.3	Auswertung der Elektrofiltrationsversuche	71
3.6	<i>In-situ</i> -Magnetseparations- (ISMS) Untersuchungen	72
3.6.1	ISMS-Anlage.....	73
3.6.2	Durchführung der ISMS-Versuche	75
3.6.3	Auswertung der ISMS-Versuche.....	77
4	Wachstum und Produktbildung von <i>B. licheniformis</i> DSM 1969.....	79
5	Ergebnisse der Elektrofiltrationsversuche	95
5.1	Elektrofiltration zur Konzentrierung von Biomasse in der Primärseparation.....	95
5.1.1	Modellhafte Beschreibung der Elektrofiltration zur Untersuchung des Anteils der Elektrophorese am Effekt der Elektrofiltration	99
5.2	Einsatz der Elektro-Ultrafiltration zur Konzentrierung von Proteinen.....	102
5.3	Fraktionierung von Proteinen mittels Elektro-Ultrafiltration.....	104
5.3.1	Betrachtung der Zerstörung von Enzymen bei direktem Elektrodenkontakt während der fraktionierenden Elektro-Ultrafiltration.....	110
6	Untersuchung der ISMS	113
6.1	Separation von Modellproteinen mit Ionentauscher-Magnetpartikeln.....	113
6.2	Untersuchung zur Stabilisierung der Amylaseproduktion mittels Abtrennung von Proteasen mittels ISMS.....	122
6.3	Untersuchung der Protease-Produktionssteigerung durch ISMS im	

Schüttelkolben.....	126
6.4 Untersuchung und Optimierung der ISMS im Bioprozess	130
6.4.1 Abtrennung der Magnetpartikel mittels HGMS	130
6.4.2 Adsorptionsleistung der Magnetpartikel in der Biosuspension	138
6.4.3 Elution der abgetrennten Protease.....	141
6.4.4 Integrierte Komplettfermentation mit <i>in-situ</i> Abtrennung zur experimentellen Bestimmung der Ausbeutesteigerung im Bioreaktor.....	147
7 Simulation der ISMS.....	157
7.1 Simulation der Kultivierung von <i>Bacillus licheniformis</i> zur Produktion von Protease	157
7.1.1 Aufstellung des Bioprozessmodells für <i>Bacillus licheniformis</i>	157
7.1.2 Simulation des Bioprozesses zur Proteasenproduktion mit <i>Bacillus licheniformis</i>	162
7.1.3 Berechnung eines Bioprozesses zur Produktion von Glutaminsäure unter Produktinhibierung mit integrierter ISMS	169
8 Zusammenfassung und Ausblick.....	173
8.1 Zusammenfassung.....	173
8.2 Ausblick.....	175
9 Literaturverzeichnis	177
10 Anhang	189
10.1 Daten der HGMS.....	189
10.2 Daten zu den Analysemethoden	193
10.2.1 Daten zur Lowry-Analytik	193
10.2.2 Daten zur Ermittlung der Proteaseaktivität mittels Azocasein	193
10.2.3 Daten zur Alpha-Amylasebestimmung	194
10.2.4 Daten zur Lysozymaktivitätsbestimmung	194
10.2.5 Daten zur SDS-PAGE	195
10.3 Sonstige Versuchsdaten	197
10.4 Formelzeichen und Abkürzungen.....	198
10.5 Publikationen, Studien- und Diplomarbeiten	203

1 Einleitung

1.1 Ausgangssituation

Die verfahrenstechnische Optimierung der Bioproduktaufarbeitung wurde lange Zeit vernachlässigt. Das sogenannte Downstream Processing nach einer Bioreaktion ist jedoch ein mit einem hohen Aufwand verbundener Teil der Bioproduktion, der bis zu 80 Prozent der Gesamtkosten bei der Herstellung von Proteinen ausmachen kann. Begründet ist dies durch die geringe Konzentration der Bioprodukte, der Vielzahl von Nebenprodukten mit ähnlichen Größen, geringe Dichteunterschiede, teilweise hohe Viskositäten und die Sensitivität der Produkte. Daher müssen oft eine Vielzahl von Verfahrensschritten, bestehend aus verschiedenen Unit Operations, zusammengeschaltet werden, um das Produkt in der gewünschten Reinheit, Konzentration und Aktivität zu erhalten. Jeder Schritt ist jedoch neben den Investitions- und Betriebskosten auch mit einem gewissen Produktverlust verbunden, der in der Summe einen erheblichen Anteil an der produzierten Menge ausmacht.

Eine vielversprechende Möglichkeit, die Zahl der Verfahrensschritte zu reduzieren, bzw. die einzelnen Schritte zu intensivieren ist es, hybride Prozesse zu entwickeln, bei denen mehr als ein Trenncharakteristikum der Produkte genutzt werden. Durch die Anwendung von elektrischen und magnetischen Feldern wird ein zusätzlicher Freiheitsgrad für einen Trennprozess gegeben, der zu verbesserter Kinetik, erhöhter Ausbeute und mehr Selektivität führen kann. Die elektrischen und magnetischen Felder können von außen einem Prozess überlagert werden, wodurch sich neue Gestaltungsmöglichkeiten ergeben. Während die meisten Biomoleküle an sich eine elektrische Ladung aufweisen, die sie für elektrische Kräfte adressierbar machen, müssen zum Einsatz von magnetischen Kräften zusätzliche Strukturen in die Suspension eingebracht werden, z.B. in Form von magnetisierbaren Mikropartikeln.

Die Elektrofiltration, also die mit einem elektrischen Feld überlagerte Filtration, und die Magnetseparation, ein Adsorptionsprozess an magnetisch funktionalisierten Mikropartikeln, stellen Prozesse dar, die derzeit noch nicht in großem industriellen Maßstab verwendet werden, jedoch hohes Potential für die wachsende Zahl biotechnologisch produzierter Güter besitzen.

Die Elektrofiltration ist ein Verfahren, das für die Konzentrierung von Biopolymeren bereits gut charakterisiert wurde und auch schon im Pilotmaßstab eingesetzt wurde. Es ist jedoch zu betrachten, ob die Elektrofiltration auch für die Primärseparation,

also die Abtrennung von Biomasse geeignet ist. Weiterhin sind mechanistisch noch Fragen offen, wodurch das elektrische Feld die kinetische Beschleunigung des Filtrationsprozesses bewirkt. Auch die Anwendung im Proteinbereich ist noch kaum beleuchtet, vor allem wurde die Elektrofiltration bisher für die Fraktionierung von Proteingemischen nicht untersucht.

Neben der Nutzung von hybriden Verfahren an sich ist die Integration der Aufarbeitung mit der eigentlichen Reaktion von entscheidender Bedeutung. Nur durch die Beachtung der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Teilschritten kann eine optimale Ausbeute erzielt werden. Eine Form der Integration stellt die *in-situ* Produktabtrennung dar, bei welcher das Wertprodukt direkt aus der Fermentationsbrühe separiert wird und durch die reduzierte Verweilzeit im Reaktionsraum positive Effekte erzielt werden, die über die Verringerung der Aufarbeitungskette hinaus gehen. Generell werden *in-situ* Verfahren in der Bioproduktion eingesetzt, jedoch bisher sehr limitiert. Extraktive und adsorptive Verfahren sind bei der *in-situ*-Proteinaufreinigung einsetzbar.

Die Magnetseparation wurde bereits in verschiedenen Forschungsvorhaben für ihre Einsetzbarkeit nach einer Fermentation, z.B. für Zellaufschlüsse, untersucht. Dabei zielt die derzeitige Forschung vor allem auf die Produktion von geeigneten Partikelsystemen, die für die Separation geeignet und in kostengünstiger Weise zu produzieren sind. Weiterhin stehen die Verbesserung von Fest-Flüssig-Abtrennprozessen zur Separation von Biosuspension und Magnetpartikeln, welche eine Grundvoraussetzung für die Anwendung im Großmaßstab darstellen, im verfahrenstechnischen Mittelpunkt. Allerdings wurde bisher noch kein Ansatz erarbeitet, die Magnetseparation auch als *in-situ* Verfahren zu verwenden. Die Anwendung der Magnetseparation als *in-situ* Verfahren bietet eine Chance, die Produktion von Proteinen in Bioreaktoren zu intensivieren, indem der durch die Magnetkraft vereinfachte Fest-Flüssig-Trennprozess mit der selektiv-adsorptiven Funktionalität der Partikel verbunden wird, um somit Produkte spezifisch aus dem Reaktionsraum zu fischen.

1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, hybride Verfahren zu charakterisieren, neue Einsatzmöglichkeiten dieser hybriden Methoden zu etablieren und die Prozesse zu

optimieren, bei denen verfahrenstechnische Separationsschritte zur Aufreinigung von Proteinen mit elektrischen und magnetischen Feldern überlagert werden.

Zu diesem Zweck soll ein Bioprozesssystem als Untersuchungsobjekt dienen, das geeignet ist, extrazelluläre Proteine zu produzieren und bei dem der Einsatz einer integrierten Produktabtrennung sinnvoll ist. Das bakterielle System *Bacillus licheniformis* produziert extrazelluläre Enzyme, wie Proteasen und Amylasen, und soll über die aus der Literatur bekannten Eigenschaften hinaus charakterisiert werden, was die Produktbildung eines extrazellulären Produktenzyms betrifft. Dieser Organismus soll dann während bzw. nach der Kultivierung als System für den Einsatz der Separationstechnologien dienen.

Nach einer Fermentation soll in der Primärseparation der Einsatz der Elektrofiltration untersucht werden, mit dem Ziel, die Effekte des elektrischen Feldes zu analysieren. Vor allem soll die Analyse dem Verständnis des Abtrennvorgangs dienen und die Wirkungen des elektrischen Feldes auf die Kinetik bestimmt werden.

Neben diesem vertiefenden Verständnis der Elektrofiltration soll die Asymmetrie innerhalb der Filterkammer bei der Elektrofiltration ausgenutzt werden, um Proteingemische selektiv zu transportieren und damit zu fraktionieren. Dieses neue Einsatzgebiet soll auf den dadurch erzielbaren Nutzen evaluiert und durch prozesstechnische Verbesserung optimiert werden. Eine mögliche Enzymschädigung während der Filtration ist dabei zu untersuchen. Insgesamt soll die Elektrofiltration für weitere Anwendungsgebiete untersucht werden, damit eine industrielle Anwendung begünstigt werden kann.

Die bisher nach einer Bioreaktion untersuchte Magnetseparation soll für die *in-situ* Applikation etabliert werden. Dabei soll an dem Beispielsystem *Bacillus licheniformis* die Nutzenbringung des Verfahrens dargestellt werden. Hierzu soll auch eine neue Generation von Kompositpartikeln eingesetzt werden, die eine kostengünstige und flexible Herstellung der Magnetpartikel ermöglichen kann. Diese Partikel sollen zur Abtrennung von Proteinen aus Fermentationsbrühen untersucht und charakterisiert werden. Weiterhin soll auch ein im Bioprozess produziertes Produkt aus der Fermentation heraus separiert werden, wozu Affinitätspartikel eingesetzt werden sollen. Dies soll vor allem auch für den Bioreaktormaßstab durchgeführt werden. Dazu muss ein Scale-up durchgeführt werden, bei dem eine Magnetseparationstechnologie wie die Hochgradienten-Magnetseparation an einen Bioprozess angebunden wird, wobei dabei eine monoseptische Betriebsweise erhalten bleiben soll.

Nach der erfolgreichen Inbetriebnahme soll der Gesamtprozess in seinen Einzelkomponenten optimiert werden und weiterhin soll ein Erkenntnisgewinn darüber erhalten werden, wo die Limitierungen des Einsatzes der *in-situ* Magnetseparation liegen.

Der Nutzen der Magnetseparation soll evaluiert werden. Dies wird zum einen experimentell, zum anderen aber auch durch Modellbildung geschehen, indem die kinetischen Vorgänge der physiologischen Ebene mit der Reaktorebene verknüpft werden und so eine Simulation des Gesamtprozesses ermöglicht wird. Die Simulation soll neben der Prozess-Bewertung auch zur Veranschaulichung der Machbarkeit für Bioprozesse generell verwendbar sein, so dass für mögliche Anwendungsfälle schnell eine Entscheidung über den Nutzen der *in-situ* Magnetseparation getroffen werden kann. Weiterhin soll die Simulation eine Prozessführung der *in-situ* Separationsschritte aufzeigen, so dass diese möglichst optimal angewendet werden.

Zusammenfassend ist das Ziel dieser Arbeit die Stärkung von feldunterstützten Methoden, um die in Zukunft zunehmende Zahl von Aufgabenfeldern in der Bioseparation besser, schneller, gezielter und vor allem flexibler gestaltbar zu machen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Elektromagnetismus

2.1.1 Grundlagen – Maxwellgleichungen

In der heutigen Physik wird zwischen vier Kräften unterschieden (Henke 2007). Diese sind die starke Wechselwirkung, die schwache Wechselwirkung, die Gravitationskraft und die elektromagnetische Kraft. Die beiden ersten spielen in der alltäglichen Erfahrung kaum eine Rolle. Der Zusammenhalt von Protonen und Neutronen ist auf die starke Wechselwirkung zurückzuführen, während die schwache Wechselwirkung bei radioaktiven Zerfallsprozessen beteiligt ist. Die Gravitation ist eine schwache Wechselwirkung, die allerdings aufgrund der großen Masse der Erde für uns eine fundamentale Bedeutung hat. Abgesehen von der Gravitation, sind alle uns bewusst begegnenden Kräfte elektromagnetischer Natur, ob es sich um Lorentzkräfte, elektrostatische Kräfte, hydrodynamische Kräfte oder van-der-Waals Kräfte handelt. Die elektromagnetische Kraft ist daher wesentliche Grundlage der Ingenieur-Forschung. Die Theorie, die den Elektromagnetismus umfassend beschreibt, geht auf James Clerk Maxwell zurück. Sie wird vor allem in den vier Maxwell-Gleichungen dargestellt, welche in ihrer differentiellen Form wie folgt lauten (Bergmann und Schaefer 1999):

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = \frac{\rho_q}{\varepsilon_0} \quad 2.1$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad 2.2$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{d\mathbf{B}}{dt} \quad 2.3$$

$$\nabla \times \mathbf{B} = \mu_0 \left(\mathbf{j} + \varepsilon_0 \frac{d\mathbf{E}}{dt} \right) \quad 2.4$$

Die aufgeführten Gleichungen wurden in dieser oder leicht veränderter Form auch durch andere Forscher als Maxwell entdeckt und sind daher auch unter den Begriffen Gaußsches Gesetz (2.1), Faradaysches Induktionsgesetz (2.3) und Ampèresches Gesetz (2.4) bekannt.

2.1.2 Elektrisches Feld

Gleichung 2.1 wird in der integralen Form auch Gaußsches Gesetz genannt. Durch Anwendung des Gaußschen Satzes wird diese integrale Form erreicht. Aus dieser Gleichung kann mit der Annahme einer kugelsymmetrischen Fläche um eine Punktladung, folgendes elektrisches Feld erhalten werden:

$$\mathbf{E} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q}{a^2} \cdot \mathbf{e} \quad 2.5$$

Ein elektrisches Feld ist als die Kraftwirkung definiert, die eine ruhende Probeladung an einem bestimmten Ort erfährt:

$$\mathbf{E} = \frac{\mathbf{F}}{q} \quad 2.6$$

Das bekannte Coulombsche Gesetz kann durch Gleichsetzen von Gleichung 2.5 und 2.6 erhalten werden.

Ein wichtiger Begriff bei der Betrachtung elektrischer Felder ist der des Potentials. Das elektrische Potential ist mit dem elektrischen Feld ähnlich verknüpft wie der Weg mit der Geschwindigkeit in der Mechanik. Für konservative Kraftfelder, wie das elektrostatische, existiert ein Potential. Dieses ist die potentielle Energie pro Ladungseinheit. Die Potentialdifferenz heißt Spannung.

$$U_{ab} = \Delta\varphi = -\int_a^b \mathbf{E} \cdot d\mathbf{x} \quad 2.7$$

Das Potential der in Gleichung 2.5 bereits beschriebenen Punktladung, welche auch modellhaft für ein kleines geladenes Partikel oder Molekül stehen kann, ist dann

$$\varphi = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q}{a}, \quad 2.8$$

wenn Gleichung 2.5 in 2.7 eingesetzt wird und für das Potential im Unendlichen der Wert null angenommen wird (Halliday et al. 2003).

Möchte man die Bewegung kleiner Teilchen in wässrigen Medien beschreiben, wird das Zetapotential als entscheidender Parameter verwendet. Dieses beschreibt das Potential in der Scherebene zwischen Partikel und Fluid. Es kann aus der elektrophoretischen Mobilität der Teilchen bestimmt werden, welche definiert ist als

$$u_{em} = \frac{V_{em}}{E} \quad 2.9$$

Für sehr kleine Teilchen kann für die hydrodynamische Widerstandskraft die Stokes'sche Beziehung verwendet werden ($Re \ll 1$):

$$F_w = -6\pi\eta r_h v \quad 2.10$$

Nimmt man für ein kleines Teilchen kugelförmige Gestalt an, so ergibt sich aus Kombination von Gleichung 2.6, 2.8 und 2.10 für das Zetapotential

$$\zeta = \frac{3\eta v}{2\varepsilon E} \quad 2.11$$

unter der Annahme, dass dieses mit dem Sternpotential gleichzusetzen ist. Gleichung 2.11 wird auch als Hückel-Onsager-Gleichung bezeichnet. Diese ist nur für geringe Ionenstärken gültig, wenn gilt: $\kappa r_h \ll 1$. Für $\kappa r_h \gg 1$ gilt die veränderte Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung, bei welcher der Faktor 3/2 aus Gleichung 2.11 weggelassen wird (Pfeuffer 2006).

Das Oberflächenpotential, das anhand von Gleichung 2.8 auf der Oberfläche eines 3,6 nm großen kugelförmigen Systems (z.B. für das Protein BSA) herrschen würde ist in Abhängigkeit der freien Elektronen in Abbildung 2.1 dargestellt. Wie zu erkennen ist, kann ein relativ hohes Zetapotential mit nur wenigen freien Ladungen erreicht werden.



Abbildung 2.1: Abhängigkeit des Oberflächenpotentials von der Zahl freier Elektronen bei einem runden Partikel mit 3,6 nm Durchmesser in wässrigem Medium

2.1.3 Elektrophorese

Die Mobilität von Proteinen in elektrischen Feldern kann über die Beziehungen aus Kapitel 2.1.2 abgeschätzt werden. Allerdings sind die Vereinfachungen, welche in jenem Kapitel vorausgesetzt wurden, teilweise nicht ausreichend für eine gute Approximation der Realität. Als Kräfte, die auf ein gelöstes bzw. suspendiertes Teilchen unter dem Einfluss eines E-Felds wirken, sind neben der in Gleichung 2.6 gegebenen elektrischen Kraft und der hydrodynamischen Widerstandskraft (Gleichung 2.10) auch die Retardationskraft und die Kraft des Relaxationseffekts zu erwähnen. Die Retardationskraft kommt durch die elektroosmotisch wandernden Gegenionen der Doppelschicht zustande, die die elektrophoretische Wanderung des Teilchens durch ihre Reibung vermindern. Der Relaxationseffekt entsteht durch die Deformierung des bei ruhendem Teilchen punktsymmetrischen elektrischen Feldes um das (runde) Partikel. Die Wanderung hat eine Polarisierung des Feldes in Bewegungsrichtung zur Folge, welche der Bewegung entgegengesetzt wirkt. Abbildung 2.2 zeigt die Bewegung eines Teilchens und die eben genannten Kräfte modellhaft.

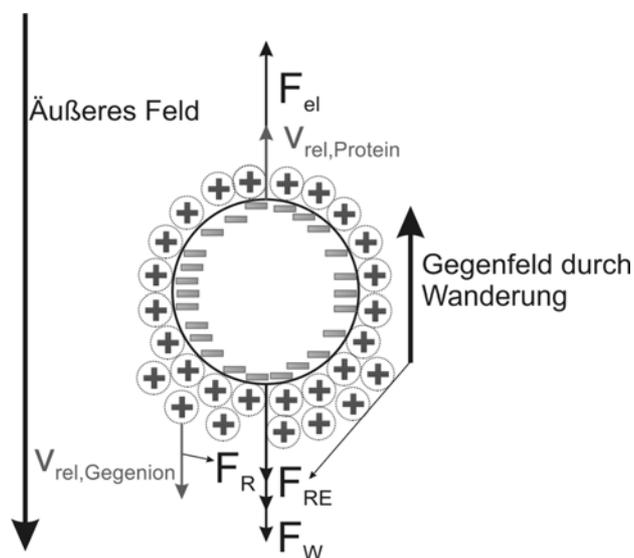


Abbildung 2.2 Retardationskraft und Relaxationseffekt können die elektrophoretische Wanderung mindern (Hydrodynamische Widerstandskraft F_W , elektrische Feldkraft F_{el} , Retardationskraft F_R , Kraft des Relaxationseffekts F_{RE})

Im Kräftegleichgewicht gilt:

$$F_{Ei} + F_W + F_R + F_{RE} = 0 \quad 2.12$$

Für bestimmte Vorgänge kann der Relaxationseffekt auch positiv sein. Dies ist der Fall für trivalente Coionen in der Region $0,01 < \kappa r_h < 1$. Bei sehr großen Feldstärken kann dann das Partikel seine Gegenionenatmosphäre komplett verlassen. Dieses Phänomen wird Wien-Effekt genannt und führt zu hohen elektrophoretischen Mobilitäten (Wien 1927). Für $\kappa r_h \ll 1$, $\kappa r_h \gg 1$ oder kleine Werte für das Zetapotential ($\zeta \ll 25$ mV) kann der Relaxationseffekt jedoch vernachlässigt werden. Bei Fermentationsbrühen ist dies der Fall. In dem in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Medium ist die Ionenstärke etwa 0,5 mol/l und so die Debyelänge $\kappa^{-1} \approx 13$ nm. Also ist für Bakterien ($\sim 1 \mu\text{m}$) κr_h deutlich größer als eins.

Für den Retardationseffekt kann die von Hückel ermittelte Gleichung angesetzt werden:

$$F_R = (\varepsilon \zeta r_h - q)E \quad 2.13$$

Durch Einsetzen der Gleichungen 2.6, 2.10 und 2.13 in Gleichung 2.12 kann eine erste Abschätzung für die Geschwindigkeit im Kräftegleichgewicht gefunden werden. Um die Abweichung der Proteine von der Kugelform zu berücksichtigen, kann auch eine Asymmetriefunktion (f/f_0) eingeführt werden. Ein möglicher Ansatz für die elektrophoretische Mobilität, der in der Literatur erwähnt wird, sei im folgenden gegeben (Abramson et al. 1942):

$$u_{em} = \frac{v_{em}}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r_h} \cdot K(\kappa r_h) \cdot \frac{1 + \kappa r_i}{1 + \kappa r_h + \kappa r_i} \cdot \frac{f}{f_0} \quad 2.14$$

Hierbei ist K die Funktion, die den Unterschied zwischen dem Ansatz von Helmholtz-Smoluchowski und jenem von Hückel-Onsager integriert. Der Radius r_i steht für den durchschnittlichen Radius der Ionen in der Ionenatmosphäre.

Für eine Vorhersage der elektrophoretischen Mobilität können auch theoretische Ansätze verwendet werden, durch welche die Ladung des Proteins q ermittelt wird. Dies hat den Vorteil, dass das Zetapotential dann nicht gemessen werden muss, was häufig mit Schwierigkeiten verbunden ist. Die Ladung q kann über die Valenz ermittelt werden, welche durch theoretische Ansätze, z.B. Erweiterungen der Henderson-Hasselbalch-Gleichung, zugänglich ist. Hierin werden die Säure- und Basekonstanten der sauren und basischen Aminosäuren einbezogen und aus ihnen eine Gesamtladung errechnet (Sillero und Ribeiro 1989). Weiterhin nötig für die Be-

rechnung der elektrophoretischen Mobilität ist die Größe der Proteine. Diese kann mit dem Molekulargewicht in Relation gesetzt werden. So kann für die elektrophoretische Mobilität gefunden werden, dass gilt:

$$u_{em} \propto \frac{q}{M_w^s} \quad 2.15$$

Hierbei gilt für den Exponenten $1/3 < s < 2/3$ (Adamson und Reynolds 1997).

Der isoelektrische Punkt pI gibt den pH-Wert an, bei welchem ein Protein oder Peptid keiner elektrophoretischen Bewegung im E-Feld unterliegt. Über die Unterscheidung dieses pI vom pH-Wert kann die Ladung des Proteins qualitativ abgeschätzt werden. In Proteingemischen ist auch die Beeinflussung der Proteine untereinander bzgl. ihrer elektrophoretischen Eigenschaften zu beobachten (Douglas et al. 1995).

Die Elektrophorese wird technisch in verschiedenartigen Verfahren eingesetzt. Hierbei wird nach Größe, isoelektrischem Punkt oder elektrophoretischer Mobilität separiert. Eine wichtige Methode zur Proteintrennung ist die SDS-PAGE. Dabei werden Proteingemische nach ihrer Größe aufgetrennt. Diese Technik wird vor allem für analytische Zwecke angewendet. Für weitere analytische Methoden wie die isoelektrische Fokussierung oder die Kapillarelektrophorese sei auf die Literatur verwiesen (Harrison et al. 2003).

Für die Aufreinigung von Proteinen kann auch die Free-Flow-Elektrophorese eingesetzt werden, bei welcher die elektrophoretische Mobilität das Trennkriterium darstellt (Krivankova und Bocek 1998; Melin und Poggel 2005).

Ein weiteres Einsatzgebiet der elektrokinetischen Effekte ist die Elektrofiltration, welche in Kapitel 2.4 detailliert erläutert wird.

2.1.4 Magnetisches Feld

Das magnetische Feld kennt, wie aus Gleichung 2.2 zu entnehmen ist, keine magnetischen Monopole. Darum lässt sich die für das Magnetfeld analog zu \mathbf{E} benutzte Größe der magnetischen Flussdichte \mathbf{B} , oder kurz des Magnetfelds, nicht analog zu \mathbf{E} definieren. Das Magnetfeld \mathbf{B} wird in Tesla angegeben und es herrscht ein Magnetfeld von einem Tesla, wenn auf einen Leiter der Länge 1 m, durch den ein Ampère Strom fließt, senkrecht zu Leiter und Feld die Kraft von einem Newton herrscht:

$$\mathbf{F} = I \mathbf{L} \times \mathbf{B} \quad 2.16$$

Diese Gleichung kann leicht aus der Lorentzkraftgleichung ermittelt werden (Tipler 2000):

$$\mathbf{F} = q(\mathbf{v} \times \mathbf{B}), \text{ oder allgemein } \mathbf{F} = q(\mathbf{E} + \mathbf{v} \times \mathbf{B}) \quad 2.17$$

Über das Lorentzkraftgesetz werden Elektrodynamik und Mechanik verknüpft. Das magnetische Feld wird neben der magnetischen Flussdichte \mathbf{B} auch mit der magnetischen Feldstärke \mathbf{H} charakterisiert. Die beiden Größen stehen über die folgende Beziehung in Zusammenhang:

$$\mathbf{B} = \mu_r \mu_0 \mathbf{H} \quad 2.18$$

μ_r in Gleichung 2.18 ist die Permeabilitätszahl. Sie ist abhängig vom Material und von der magnetischen Feldstärke (siehe Kapitel 2.1.5)

2.1.5 Magnetische Materialien

Unterschiedliche Materialien reagieren in verschiedener Weise auf eine Einführung in ein magnetisches Feld. Ein magnetisches Moment, das auf eine stromdurchflossene Leiterspule im Magnetfeld wirkt, kann auch für die kleinen Ströme im subatomaren Aufbau der Atome angenommen werden.

Das Magnetische Moment der Leiterschleife ist

$$\mathbf{m}_m = NI\mathbf{A}\mathbf{n} \quad 2.19$$

Hierbei ist \mathbf{n} der Normalenvektor, der sich aus der Rechten-Hand-Regel ergibt, wenn sie auf den in der Leiterschleife zirkulierenden Strom angewendet wird (Tipler 2000). Die Elektronen führen Bewegungen um den Kern durch und haben einen Spin. Beide Eigenschaften führen zu einer Wechselwirkung mit einem äußeren Magnetfeld. Je nach Atom ist die Summe der Wechselwirkungen zum größeren Feld hin oder aus ihm heraus gerichtet.

In Stoffen mit einer abgeschlossenen Schalenstruktur summieren sich die permanenten magnetischen Momente zu Null. Jedoch wird aufgrund der Lenz'schen Regel in jedem Elektron durch ein äußeres Magnetfeld ein diesem Feld entgegengesetztes Feld induziert. Die induzierten magnetischen Momente lassen sich summieren und makroskopisch bestimmen. Man spricht von diamagnetischem Verhalten. Diamagnetismus ist im Vergleich zu den anderen magnetischen Verhaltensweisen deutlich schwächer.

Bei den paramagnetischen Stoffen sind auf atomarer Ebene permanente magnetische Dipolmomente vorhanden. Diesen wirkt die thermische Eigenbewegung entgegen. Bringt man einen paramagnetischen Stoff in ein äußeres Magnetfeld, so richten sich die Momente tendenziell parallel zum Feld aus.

Bei den ferromagnetischen Substanzen gibt es starke gegenseitige Beeinflussungen der magnetischen Momente innerhalb des Materials. Benachbarte Atome richten sich in kleinen Raumeinheiten untereinander aus. Der Grund ist der quantenphysikalische Effekt der Austauschkopplung. Dieser verursacht eine Wechselwirkung der Elektronenspins benachbarter Atome. Diese ausgerichteten Raumeinheiten sind auch ohne externes Magnetfeld vorhanden und werden auch magnetische Domänen oder Weiß'sche Bezirke genannt. Oberhalb einer kritischen Temperatur (Curie-Temperatur) ist die thermische Bewegung so groß, dass die einheitliche Ausrichtung der Domänen verschwindet. Der Stoff verhält sich dann paramagnetisch.

Des Weiteren seien die antiferromagnetischen und ferrimagnetischen Stoffe erwähnt. Diese kann man sich als zwei ineinander verwobene Gitter mit unterschiedlicher Richtung des magnetischen Moments vorstellen. Beim Antiferromagnetismus sind die beiden Momente vom Betrag her gleich, beim Ferrimagnetismus unterscheiden sie sich. Unterhalb einer kritischen Temperatur ist der Ferrimagnetismus ähnlich dem Ferromagnetismus. Magnetit (Fe_3O_4) ist beispielsweise ein ferrimagnetisches Material (Bergmann und Schaefer 1999; Gerthsen et al. 1986). Die verschiedenen magnetischen Verhaltensweisen sind qualitativ in Abbildung 2.3 dargestellt.

Bei ferromagnetischen Materialien interagieren nicht nur die benachbarten Atome, sondern auch die Weiß'schen Bezirke untereinander. Somit tritt bei einer im Magnetfeld magnetisierten Substanz der Effekt der Remanenz auf. Es gibt eine verbleibende Magnetisierung, da die Domänen ausgerichtet bleiben, auch wenn das äußere Feld entfernt wird.

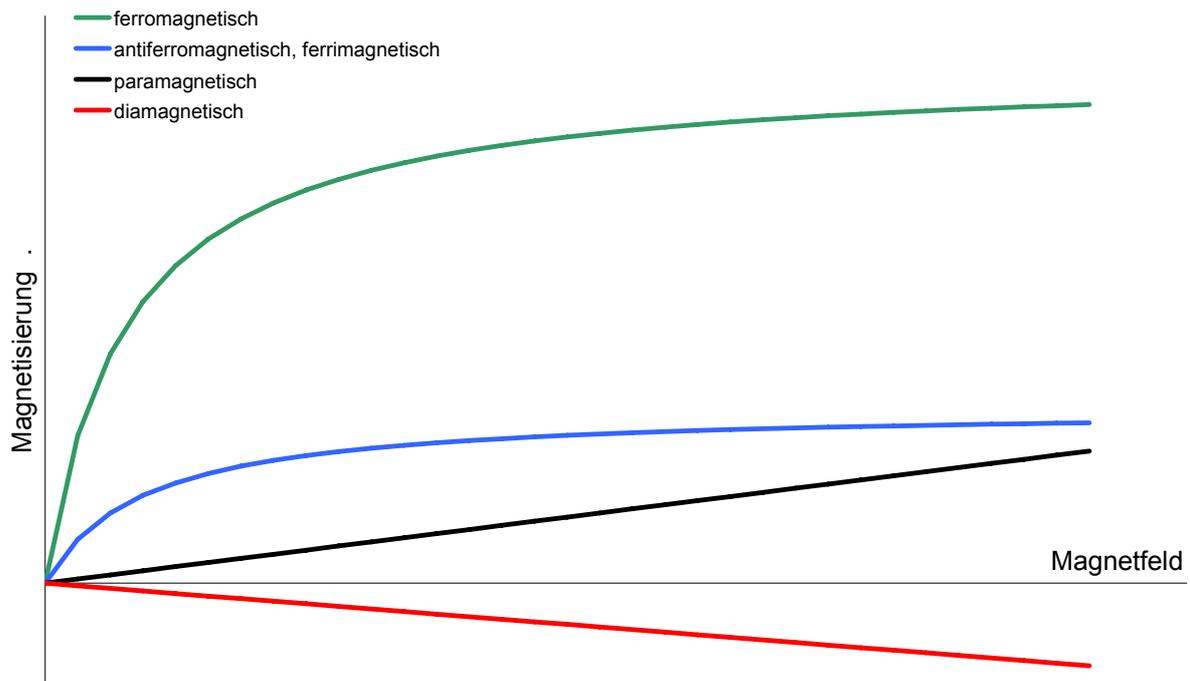


Abbildung 2.3: Magnetisierungskurve für verschiedene magnetische Materialien (Svoboda 1987)

Werden magnetische Partikel besonders klein, so zeigt sich das Phänomen des Superparamagnetismus, das als weitere magnetische Verhaltensweise beschrieben wird. Hierbei zeigen Materialien, die gewöhnlich ferro- oder ferrimagnetische Eigenschaften haben, paramagnetisches Verhalten. Wenn die Partikel kleiner als ein kritischer Durchmesser sind, so bilden sie nur eine Domäne. Beim Abschalten des magnetischen Feldes ist die thermische Eigenbewegung in der Lage, die Ausrichtung der Domäne zu verändern, wodurch ein mit superparamagnetischen Kristallen gefülltes Kompositpartikel nach außen hin nicht mehr magnetisch ist. Somit ist keine Remanenz zu beobachten. Der kritische Wert für die Größe, bei dem superparamagnetisches Verhalten zu beobachten ist, liegt für Eisen bei 14 nm, für Magnetit bei 128 nm (Dormann 1981; LesliePelecky und Rieke 1996).

2.1.6 Kraft auf Partikel im Magnetfeld

Aus den Maxwell'schen Gleichungen kann die bereits erwähnte Lorentzkraft (Gleichung 2.17) aus dem Faraday'schen Induktionsgesetz (Gleichung 2.3) hergeleitet werden (Houser 2002). Ausgehend von dieser Gleichung können die Kräfte auf Materie im Magnetfeld bestimmt werden.

Für das magnetische Drehmoment gilt der mit dem magnetischen Moment (Gleichung 2.19) berechnete Zusammenhang (Halliday et al. 2003):

$$\boldsymbol{\tau}_m = \mathbf{m}_m \times \mathbf{B} \quad 2.20$$

Im Magnetfeld hat ein Materieteilchen, das ein magnetisches Moment trägt, eine potentielle Energie. Diese lässt sich in Analogie zur mechanischen Arbeit, die für eine Drehbewegung benötigt wird, folgendermaßen ausdrücken:

$$V_{\text{pot}} = -\mathbf{m}_m \cdot \mathbf{B} \quad 2.21$$

Für konservative Kräfte gilt:

$$\mathbf{F} = -\nabla V_{\text{pot}} \quad 2.22$$

Daher gilt für die Magnetkraft auf ein magnetisiertes Partikel (Jackson 1999):

$$\mathbf{F}_{\text{mag}} = \nabla(\mathbf{m}_m \cdot \mathbf{B}) \quad 2.23$$

Für den vereinfachten eindimensionalen Fall lässt sich für die Kraft in eine Richtung folgender Zusammenhang aufstellen:

$$F_z = M_p V_p \frac{\partial B_x}{\partial x} \quad 2.24$$

Gleichung 2.24 wird in der Literatur auch in folgender Form geschrieben (Franzreb 2003):

$$\mathbf{F}_{\text{mag}} = \mu_0 V_P \mathbf{M}_P \nabla \mathbf{H} \quad 2.25$$

Die Kraft ist also sowohl von der Magnetisierung abhängig, welche von der Stärke des Magnetfelds abhängt, als auch vom Gradienten des Magnetfeldes.

Anwendungen findet die magnetische Feldkraft in der Natur beispielsweise bei magnetotaktischen Bakterien, die durch das gebeugte Erdmagnetfeld in tiefere Sedimentschichten gelangen können (Blakemore und Frankel 1981). In der Messtechnik wird die paramagnetische Eigenschaft von Sauerstoff zur Konzentrationsbestimmung dieses Gases ausgenutzt (Hill 1972). Überlegungen der Forschung schließen auch ein, die Kraftwirkung bei paramagnetischen Stoffen zu nutzen, beispielsweise zur Einflussnahme auf das Kristallisationsverhalten (Miura et al. 2004).

Die Nutzung der magnetischen Kraft zur biotechnologischen *in-situ* Separation eines Wertprodukts während der Kultivierung wurde in dieser Arbeit entwickelt (siehe Kapitel 6).

2.2 Extrazelluläre Proteinproduktion

Die extrazelluläre Proteinproduktion ist generell von verfahrenstechnischem Vorteil. Zum einen muss nach einer Bioproduktion kein Verfahren zum Zellaufschluss angewendet werden, zum anderen sind die Produkte, welche extrazellulär produziert werden, weit weniger kontaminiert, da nicht alle Komponenten des Zellinneren auch ausgeschleust werden. Zusätzlich zu diesen das Verfahren erleichternden Umständen, kann die Sekretion von Proteinen zu einer erhöhten biologischen Aktivität des Proteins führen, die Produktstabilität und Löslichkeit ist meist besser und darüber hinaus ist der N-Terminus eines rekombinanten Proteins authentisch. Der letztgenannte Punkt ist für die Produktion von Pharmaproteinen von Bedeutung. Bei einer extrazellulären Produktion kann das am N-Terminus befindliche Methionin durch Signal-Peptidasen abgetrennt werden, was bei intrazellulären Proteinen einen zusätzlichen Aufwand im Aufarbeitungsprozess darstellt (Angkawidjaja et al. 2006; Choi und Lee 2004; Lodish 2004; Mergulhao et al. 2005).

Allerdings sind nicht alle biologischen Systeme zur extrazellulären Sekretion gleichermaßen in der Lage.

2.2.1 Bioprozesskinetiken

Die Beschreibung eines Bioprozesses in der Ingenieurwissenschaft wird anhand von Modellen durchgeführt, die das Produktionssystem Zelle im Reaktor mathematisch beschreibbar machen. Hierbei unterscheidet man strukturierte und unstrukturierte Modelle, wobei unstrukturierte Modelle die Zelle als Black Box erscheinen lassen. Weiterhin werden segregierte und unsegregierte Ansätze unterschieden. Bei segregierten Modellen werden die Zellen als unterschiedliche Individuen betrachtet, bei welchen eine Mittelwertbildung nicht mehr statthaft ist.

Ein empirisches, unstrukturiertes Modell zur Beschreibung des Zellwachstums geht auf Jaques Monod zurück (Monod 1949). Es wird ein Zusammenhang zwischen Wachstum und Substratkonzentration gegeben:

$$\mu = f(c_s) \quad 2.26$$

Nach Monod kann $f(c_s)$ folgendermaßen beschrieben werden:

$$f(c_S) = \mu_{\max} \frac{c_S}{c_S + k_M} \quad 2.27$$

Diese einfache Beschreibung geht von einer enzymatisch regulierten Substrataufnahme aus, weshalb sie im Prinzip eine Michaelis-Menten-Kinetik darstellt. Für die Substrataufnahme gilt:

$$r_s = r_{s,\max} \frac{c_S}{c_S + k_S} \quad 2.28$$

Die Monod'sche Beschreibung kommt natürlich schnell an ihre Grenzen, liefert aber in vielen Situationen zufrieden stellende Ergebnisse.

Um ein geschlossenes Modell zu bilden, wird die Substrataufnahme mit der Biomasse über den Ausbeutekoeffizienten $y_{X/S}$ verknüpft, wobei auch der Erhaltungstoffwechsel berücksichtigt werden kann (Pirt 1965):

$$\mu = r_s y_{X/S} - \mu_E \quad 2.29$$

Neben diesem einfachen Modell sind in der Literatur eine Vielzahl von Ansätzen beschrieben, die das Wachstum und den Substratverbrauch während eines Bioprozesses beschreiben und unter anderem auch Inhibierungen berücksichtigen (Chmiel 2006; Mulchandani und Luong 1989; Nielsen und Villadsen 1992).

Das Monod-Modell geht auf die Produktbildung nicht direkt ein. An das Monod-Modell angelehnte Beschreibungen von Wachstum und Produktbildung lassen sich meist auf den von Luedeking und Piret ermittelten Ansatz zurückführen (Luedeking und Piret 1959):

$$r_p = \alpha + \beta \cdot \mu \quad 2.30$$

Die Produktbildung ist also in einen wachstumsabhängigen und wachstumsunabhängigen Term aufgeteilt. Zellen bilden Produkte, die eng mit dem Stoffwechsel gekoppelt sind, etwa Ethanol, Substanzen des primären Anabolismus, etwa Aminosäuren, aber auch Sekundärmetaboliten, wie Antibiotika, die durch Regulation in Zeiten starken Wachstums nicht gebildet werden. Für die verschiedenen Zwecke der Produktion ist jeweils eine logische Kinetik zu finden. Transformationsprodukte sind ebenfalls zu erwähnen. Abbildung 2.4 zeigt verschiedene Ansätze zur Produktbildungskinetik.

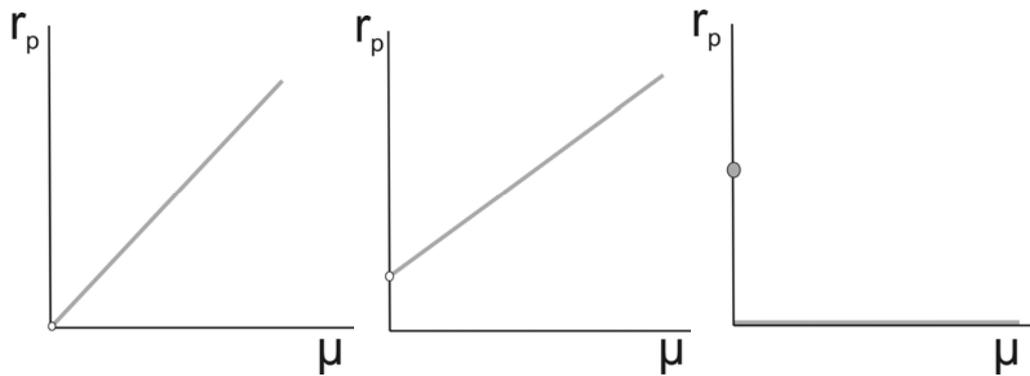


Abbildung 2.4 Verschiedene Ansätze der Produktbildungsraten (Chmiel 2006)

Enzyme werden je nach Bedarf gebildet und ihre Bildung unterliegt einer starken Regulation. Ihre spezifische Funktion im Stoffwechsel bestimmt die Assoziation von Wachstum und Produktbildung. Daher sind auch andere Ansätze als der nach Gleichung 2.30 gegebene denkbar, beispielsweise der Ansatz in Abbildung 2.4 rechts. Die Bildungskinetik gibt noch keinen Aufschluss über die Dynamik der Bildung oder über möglicherweise notwendige Induktoren, ohne die eine Produktbildung ausbleibt.

Für die Bildung enzymatischer Produkte wird dennoch sehr häufig ein Ansatz nach Gleichung 2.30 angenommen (Thilakavathi et al. 2007).

Produkte, die sich im Medium ansammeln, können mit dem Mikroorganismus, mit Mikroorganismenteilen oder anderen extrazellulären Molekülen wechselwirken. Dadurch sind negative Folgen für Wachstum und Produktbildung möglich. Für die verschiedenen Ansätze, die für Inhibierungen durch Substrat und Produkt auf einen Mikroorganismus angenommen werden, sei auf die Literatur verwiesen (Mulchandani und Luong 1989).

2.2.2 Sekretierung von Proteinen

Die verschiedenen Produktionsorganismen, welche biotechnologisch für die Proteinproduktion genutzt werden können, sind sowohl Eukaryoten, wie Hefen, tierische oder pflanzliche Zellen oder auch Insektenzellen, als auch Prokaryoten, hier vor allem die Domäne der Bakterien. Da in dieser Arbeit hauptsächlich mit Bakterien des Genus *Bacillus* gearbeitet wurde, wird im folgenden die Sekretion bei Bakterien beleuchtet.

Bakterien werden unter anderem durch die Gramfärbung charakterisiert, da eine große Gruppe der grampositiven Bakterien sich durch diese Färbung von den

anderen Bakterien unterscheiden lässt. Die Unterschiede der Gramfärbung sind durch den Aufbau der Zellwand zu erklären. Grampositive Zellen haben eine relativ einfach strukturierte Zellwand. Diese besteht im wesentlichen aus einer einzigen Art von Molekül. Sie ist im Vergleich zu gram-negativen deutlich dicker. Die gramnegative Zellwand ist vielschichtig und komplex aufgebaut (Madigan et al. 2001). Der Aufbau der Zellhüllen ist in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt.

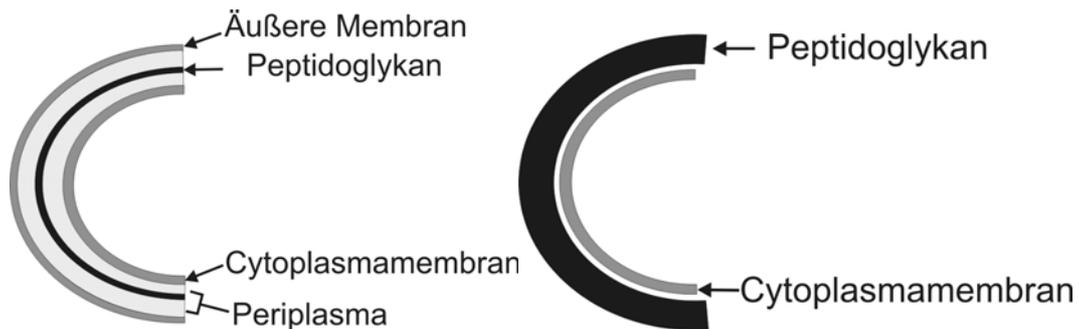


Abbildung 2.5: Aufbau der Zellhülle bei gramnegativen und grampositiven Bakterien

Nach Abbildung 2.5 gibt es mehrere Zielorte einer Sekretion: Zum einen das extrazelluläre Medium, aber auch die Zellmembran selbst oder im Falle von gramnegativen Wirten das Periplasma.

Die Sekretion wird durch N-terminale Signalsequenzen determiniert. Diese Signalsequenz ist meist hydrophob und wird durch die Zellmembran geschleust. Das Abtrennen der Signalsequenz geschieht außerhalb der Zellmembran. Signalpeptidasen führen diese posttranslationale Modifikation durch.

Die Proteinlokation wurde intensiv von Günter Blobel untersucht, der für seine Arbeiten im Jahr 1999 den Nobelpreis erhielt (Blobel 2000).

Bei gram-negativen Organismen ist ein Überwinden der Zellmembran durch mehrere Sekretionsmechanismen zu unterscheiden. Es gibt Sekretionstypen, bei denen das Protein über die Cytoplasmamembran transportiert wird, dann gefaltet und weiter ins äußere Medium gebracht. Auch bekannt sind Mechanismen bei denen Membranproteine beide Membranen überspannen und die Sekretion in einem Schritt vollzogen wird.

Eine wichtige Translokations-Maschinerie bei *E. coli* ist der Sec-Pfad. Er sei hier zur Überwindung der Plasmamembran erläutert, da auch für *Bacillus sp.* ein analoger Pfad existiert (Simonen und Palva 1993).

Abbildung 2.6 zeigt die Sekretion über die Zellmembran, die durch SecA betrieben wird. SecA bindet an das membranintegrierte Translokationsprotein auf der Cytoplasmaseite. Außerdem bindet es an das zu transportierende Protein. Durch ATP-Hydrolyse erfährt SecA eine Konformationsänderung, die das Protein durch die Transmembranstruktur schiebt. Die Wiederholung des Vorgangs führt zur vollständigen Proteinsekretion. Das Protein wird vom Signalprotein befreit und erhält seine korrekte Faltung. Für eine genauere Beschreibung des Vorgangs und anderer Sekretionsmechanismen sei auf die Literatur verwiesen (Lengeler et al. 1999; Lodish 2004; Mergulhao et al. 2005; Simonen und Palva 1993).

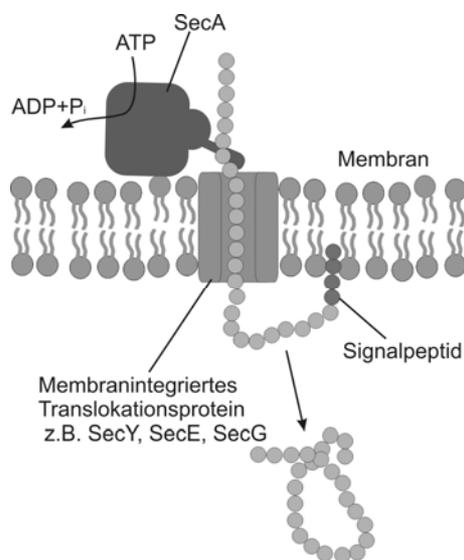


Abbildung 2.6: SecA getriebene Sekretion eines Proteins

Für *Bacillus subtilis* werden neben dem Sec-SRP-Pfad, welcher dem oben beschriebenen analog ist, noch der Twin-Arginin-Translokations- (TAT-) Pfad erwähnt. Bei diesem wird, im Gegensatz zu den Sec-Pfaden, ein bereits gefaltetes Protein transloziert. Der Transport vollzieht sich über den ABC (ATP-Bindungs-Kassette)-Transporter, mit dem für die anderen Pfade nicht kompatible Proteine sekretierbar sind. Der Sec-SRP-Pfad arbeitet mit einem Signalerkennungspartikel (SRP) und ist der von *Bacillus subtilis* hauptsächlich genutzte Translokationspfad. Das SRP bindet an das Signalpeptid der Proteinvorstufe und hat eine hohe Affinität zu SecA (Fu et al. 2007).

Die Sekretionsmechanismen der Gattung *Bacillus* wurde hauptsächlich an *Bacillus subtilis* sp. untersucht. Die Ergebnisse sind jedoch auf andere Arten dieser Gattung übertragbar, beispielsweise *Bacillus licheniformis* (Simonen und Palva 1993).

2.2.3 *E. coli* und *B. subtilis* als Produzenten extrazellulärer rekombinanter Proteine

Das wachsende Verständnis genetischer Zusammenhänge führt zu einem Anstieg an extrazellulärer Proteinproduktion. Natürliche extrazelluläre Proteine werden von Mikroorganismen vor allem zum Abbau von Substraten gebildet, die beispielsweise unlöslich oder schwer ins Zellinnere zu transportieren sind. Hauptsächlich industriell genutzt wird dies zur Produktion von Hydrolasen, wie zum Beispiel Proteasen für die Waschmittel- oder Amylasen für die Lebensmittelindustrie. Die Gattung *Bacillus* dominiert hierbei die industrielle Anwendung, wobei auch andere Organismen eingesetzt werden (Gupta et al. 2002; Gupta et al. 2003; Gupta et al. 2004).

Um *Bacillus* auch für die Produktion rekombinanter Proteine einsetzen zu können, müssen fünf Limitierungen überwunden werden: Die Transkription (v.a. durch die 17 Sigmafaktoren, die *Bacillus* nutzt), die Proteinfaltung (Chaperone, Isomerasen), die Translokation, der Signalpeptidprozess und die Proteolyse (Lam et al. 1998).

Schwierigkeiten entstehen dadurch, dass die natürlich exprimierten Proteine bei den fünf genannten Vorgängen von verschiedensten Faktoren unterstützt werden, z.B. die Transkription durch Sigmafaktoren oder die Faltung durch Chaperone. Diese Funktionen müssen meist auch für die heterologe Proteinproduktion gesichert werden.

Nichtsdestotrotz gibt es Anlass, dass zahlreiche Forschungsaktivitäten der letzten Jahre darauf ausgerichtet sind, *Bacillus* als Produktionswirt stärker nutzbar zu machen (Fu et al. 2007; Lam et al. 1998; Li et al. 2004; Simonen und Palva 1993; Terpe 2006; Vitikainen et al. 2005; Westers et al. 2006; Westers et al. 2004). Die Gründe für dieses Engagement sind mehrere Vorteile, die *Bacillus* gegenüber den etablierten Produktionsorganismen, beispielsweise *E. coli*, hat. Diese sind, dass *Bacillus subtilis* nicht pathogen ist, keine Endotoxine produziert und als GRAS (generally recognized as safe) Organismus eingestuft ist, weiterhin eine hohe natürliche Kapazität zur Proteinsekretion vorhanden ist, *Bacillus* weitläufig als industrieller Produktionsorganismus genutzt wird, *Bacillus* ein zugänglicher Wirt ist, für den einige genetische Werkzeuge entwickelt wurden, das Genom sequenziert ist, und schließlich keine Beschränktheit der Codon-Nutzung vorhanden ist. Somit ist *Bacillus* eine interessante Gattung zur Verwendung als industrieller Produktionsstamm.

E. coli ist jedoch der am weitesten verbreitete prokaryotische Organismus zur rekombinanten Proteinproduktion. Bei *E. coli* zielen laufende Forschungsarbeiten darauf ab, diesen Organismus verstärkt zur extrazellulären Proteinsekretion zu bringen, was die unter 2.2 genannten verfahrenstechnischen Vorteile hätte (Angkawidjaja et al. 2006; Badyakina und Nesmeyanova 2005; Choi und Lee 2004; Jarvis und Kaper 1996; Majander et al. 2005; Mergulhao et al. 2005). Weiterer Nutzen kann darin gesehen werden, dass extrazelluläre Proteine bei *E. coli* der geringsten proteolytischen Aktivität ausgesetzt sind, die Proteinfaltung verbessert ist (keine Inclusion bodies) (Makrides 1996). Es ist jedoch die geringe natürliche Sekretion zu überwinden. Diese ist u.a. durch die äußere Zellmembran bedingt. Jedoch kann sich der Nachteil geringer natürlicher Sekretion bei einer erfolgreichen Entwicklung von Sekretierungstechnologien auch zum Vorteil entwickeln, da das zu produzierende rekombinante Protein dann im Medium wenig kontaminiert wäre. Die beiden Entwicklungen zeigen, dass die extrazelluläre Proteinproduktion möglich ist, stark vorteilhaft und in Zukunft eine größere Rolle spielen wird.

2.3 Wechselwirkungen von Proteinen

2.3.1 Protein-Protein Wechselwirkungen

Für die Beschreibung von Bioproduktaufarbeitungsprozessen ist die Kenntnis der thermodynamischen Grundsätzlichkeiten wichtig. Die Wechselwirkungen zwischen Proteinen spielen beispielsweise bei Agglomerationen eine Rolle, welche den folgenden Aufarbeitungsprozess beeinflussen. Beispielsweise wird dadurch der Transport des Agglomerats durch eine Filtrationsmembran oder die Bewegung im elektrischen Feld verändert.

In der Partikeltechnologie ist die auf vier Forscher des zwanzigsten Jahrhunderts zurückgehende DLVO-Theorie ein häufig verwendeter Ansatz zur Beschreibung von Partikel-Partikel-Wechselwirkungen. Generell werden vier Kräfte unterschieden, die zwischen Oberflächen oder Partikeln wirken. (a) Die van der Waals Kräfte, (b) die abstoßenden elektrostatischen Doppelschichtkräfte, (c) Solvatationskräfte und (d) entropische Kräfte. Letztere sind eine Ursache für die hydrophoben Kräfte, die durch die Verdrängung von Wassermolekülen aus der Zusammenlagerung hydrophober Moleküle oder Molekülteile entstehen. In verdünnten Proteinlösungen werden die Proteinwechselwirkungen jedoch von den elektrostatischen Kräften und van der Waals-Kräften dominiert. Hierfür liefert die DLVO-Theorie eine gute Beschreibung

der Realität (Curtis und Lue 2006). Das anziehende van der Waals-Potential zwischen zwei kugelförmigen Partikeln kann folgendermaßen beschrieben werden (Lyklema 1991):

$$V_{\text{vdW}} = -\frac{A_H}{6} \left(\frac{1/2 d_P^2}{a^2 - d_P^2} + \frac{1/2 d_P^2}{a^2} + \ln \frac{a^2 - d_P^2}{a^2} \right) \quad 2.31$$

Dem wird als abstoßendes Potential das elektrostatische Potential entgegengesetzt. Dieses ist (Curtis und Lue 2006):

$$V_{\text{el}} = \frac{q^2}{\epsilon a} \frac{\exp(-\kappa(a - d_P))}{(1 + \kappa d_P / 2)^2} \quad 2.32$$

Hierbei ist der Debye-Hückel-Parameter verwendet worden:

$$\kappa = \sqrt{\frac{1}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T} \sum_{j=1}^N z_j^2 e^2 c_{j,\infty}} \quad 2.33$$

Die beiden Potentiale können gegenübergestellt werden und so ein Gesamtpotential gefunden werden, welches den thermodynamisch günstigen Abstand der Partikeln bietet und so Rückschlüsse auf das Agglomerationsverhalten zulässt.

Ein weiterer Weg, das Wechselwirkungsverhalten von Proteinen zu beschreiben ist es, nicht die van der Waals-Kräfte und die elektrostatischen Kräfte der Partikel zu betrachten und dann auf Proteine zurück zu schließen, sondern die Wechselwirkungsparameter aus der Virialgleichung direkt zu bestimmen. Es wird also von den thermodynamischen Grundlagen auf molekularer Ebene ausgegangen. Die Wechselwirkungsparameter können z.B. durch statische Lichtstreuung oder Osmometrie erhalten werden (Moon et al. 2000).

Für den entscheidenden zweiten Virialparameter kann folgender Zusammenhang zum Gesamtwechselwirkungspotential angenommen werden:

$$B_2 = -\frac{N_A}{2M_W^2} \int_0^\infty (e^{-V_{\text{ges}}/k_B T} - 1) 4\pi a^2 da \quad 2.34$$

V_{ges} ist die Summe der einzelnen Wechselwirkungspotentiale und kann aus dieser Gleichung bestimmt werden.

2.3.2 Adsorption von Proteinen

Für die Adsorption von Proteinen sind sowohl die Wechselwirkungen innerhalb des Proteinmoleküls, als auch zwischen Protein und umgebendem Elektrolyten und zwischen Protein und dem Adsorbens entscheidend. Die Struktur von Proteinen in wässrigen Lösungen ist meist kugelförmig oder ellipsoid. Die Größe reicht von

einigen bis zu mehr als zehn Nanometern. Hierbei sind geladene Aminosäurereste meist auf der Oberfläche, unpolare Reste hingegen im Inneren des Proteins zu finden. Die Struktur entsteht durch einen Wettbewerb der verschiedenen Wechselwirkungen und kann daher durch leichte Veränderungen in der Umgebung, z.B. durch die Änderung des pH oder der Ionenstärke, stark variiert werden.

Die Proteinadsorption an eine feste Matrix kann als zweistufiger Prozess aufgefasst werden. Zunächst muss das Protein über Diffusion oder Konvektion an die Oberfläche des Sorbens gelangen. Hier kann dann in einem zweiten Schritt die Anhaftung stattfinden. Berücksichtigt man diese beiden Mechanismen, so kann für die Kinetik der Adsorption folgender Term ermittelt werden (Lyklema 2005):

$$\frac{d\Gamma}{dt} = \frac{c_b - c_{eq}}{\frac{1}{k_{tr}} + \frac{1}{k_a(1-\Theta)}} \quad 2.35$$

Hierbei ist c_b die Bulkkonzentration, c_{eq} die Proteinkonzentration im Gleichgewicht, k_{tr} der Transportkoeffizient bzgl. des Transportes zur Oberfläche, k_a der Adsorptionskoeffizient.

Zur Beschreibung der Adsorption werden verschiedene Ansätze unterschieden. Die Adsorption ist eine Funktion der Konzentration der zu adsorbierenden Substanz. Der einfachste Ansatz beschreibt das Verhalten der adsorbierten Menge als linear abhängig von der in der Umgebung befindlichen Konzentration. Dieser Ansatz ist für geringe Drücke bzw. geringe Konzentrationen gültig und wird auch Henry-Adsorption genannt. Etwas allgemeiner ist der empirische Ansatz nach Freundlich, der berücksichtigt, dass auf Oberflächen mit bereits adsorbierter Substanz eine weitere Adsorption weniger begünstigt ist. Es gilt (Kast 1988):

$$Q_i = k_H c_i^b \quad 2.36$$

Dabei gilt für die genannten beiden Ansätze: Henry: $b=1$; Freundlich $b<1$. Der für die Beschreibung der Proteinadsorption neben dem Freundlich-Ansatz meist verwendete Ansatz ist nach Langmuir (Young et al. 1988). Hierbei wird von einer monomolekularen Adsorptionsschicht ausgegangen, wobei sich die Substanzen nicht gegenseitig beeinflussen und die Adsorptionsplätze alle gleich sind (Langmuir 1918). Adsorption und Desorption befinden sich nach einer bestimmten Zeit im dynamischen Gleichgewicht. Der Zusammenhang zwischen Beladung und Konzentration im Gleichgewicht lautet:

$$Q^* = Q_{\max} \frac{c^*}{c^* + k_D}$$

2.37

Die vorausgesetzten Annahmen dieses Ansatzes sind bei der Proteinadsorption in der Regel nicht erfüllt. Dennoch beschreibt er die Proteinadsorption häufig ausreichend gut (Franzreb et al. 2006).

Abhängig ist die Proteinadsorption vor allem von Eigenschaften des Adsorbens wie der Oberflächenzusammensetzung, der Oberflächenenergie, den elektrochemischen Eigenschaften und der Struktur (Wahlgren und Arnebrant 1991).

Für globuläre Proteine ist eine Adsorptionsmenge, die einer dicht gepackten Monoschicht entspricht, möglich und realistisch. Jedoch werden auch häufig Mehrschichtadsorptionen beobachtet. Diese sind dadurch zu erklären, dass die der Oberfläche abgewandten Proteinseiten mit weiteren Proteinen in Wechselwirkung treten können. Hierdurch ist es auch möglich, dass Zellkomponenten oder gar Zellen an eine solche mit Proteinen beschichtete Oberfläche anhaften.

Adsorption wird in vielen Verfahren der Bioproduktaufarbeitung genutzt, vor allem bei der Chromatographie. Hier ist jeweils nach der Adsorption von entscheidender Bedeutung, das Adsorbat wieder von der Oberfläche zu desorbieren. Dies kann durch einen Elutionsschritt erfolgen, wobei vier Elutionsarten zu unterscheiden sind. Zum einen ist eine Verdünnung bei reversibler Adsorption möglich. Jedoch wird dadurch keine Konzentrierung des Wertprodukts erreicht, was verfahrenstechnisch nicht optimal wäre. Weiterhin ist die Änderung des pH-Wertes ein Mittel zur Desorption, die durch eine Konformationsänderung der Adsorbate thermodynamisch begünstigt wird. Der Austausch des Proteins mit Substanzen geringen Molekulargewichts, z.B. Elektrolyte, ist ebenfalls möglich. Im Falle der Elektrolyte ist dies vor allem dann sinnvoll, wenn der Hauptbindemechanismus in den elektrostatischen Wechselwirkungen zu sehen ist. Als letzte Möglichkeit sei der Austausch gegen andere in Lösung befindliche Proteine erwähnt (Norde et al. 1986). Die Desorption ist jedoch häufig mit Problemen verbunden. Es ist zu beobachten, dass die Proteinadsorption, anders als beim Langmuir-Ansatz angenommen, oft nicht reversibel ist. Dies liegt an Konformationsänderungen, die die Proteine auf der Oberfläche eingehen und somit ihren Zustand stabilisieren (Czeslik 2004). Für gute Adsorptions- und Elutionseigenschaften sollte die Dissoziationskonstante in Gleichung 2.37 zwischen 10^{-3} und 10^{-7} M liegen. Für Affinitätschromatographien ist das Finden eines geeigneten Elutionspuffers keine triviale Aufgabe, da häufig der

Wechselwirkungsmechanismus zwischen Ligand und Protein nicht vollständig bekannt ist. Es ist dennoch möglich, Strategien zu entwickeln, die das Finden eines geeigneten Elutionspuffers ermöglichen (Fierer 2001).

Für die Adsorption von Proteinen ist die Größe der Oberfläche von entscheidender Bedeutung, da sie die spezifische Bindekapazität limitiert. Jedoch sind hohe spezifische Oberflächen nur bei kleinen oder porösen Partikeln zu erreichen. Poröse Partikel haben jedoch den Nachteil, stark anfällig für Fouling zu sein und daher eine begrenzte Einsatzzeit oder aufwendige Regenerationsschritte erfordern (O'Brien et al. 1996). Weiterhin ist der Stoffübergang durch die Poren häufig limitierend, sodass nur geringe Adsorptionskinetiken möglich sind (Lee 1997). Für eine hohe Adsorptionskinetik bei gleichzeitig hoher spezifischer Adsorptionskapazität müssen sehr kleine Partikel verwendet werden.

2.3.3 Einfluss von extrazellulären Proteinen auf den Bioprozess

Es ist bekannt, dass Zellen auf extrazelluläre Gegebenheiten wie Nährstoffkonzentration bzw. Gradienten der Konzentration (Chemotaxis), Temperatur (Thermotaxis) oder Licht (Phototaxis) reagieren können. Somit haben sie Sensoren, um sich an ihre Umgebung anpassen zu können. Es sind aber auch für Bakterien Zell-Zell-Kommunikationssysteme vorhanden, durch die beispielsweise die Anzahl sich in der Umgebung befindlichen Zellen ermittelt werden kann. Dies ist zum Beispiel für pathogene Organismen von Vorteil, für die ein Angriff nur dann Sinn macht, wenn genügend Angreifer vorhanden sind. Dieses Phänomen wird als Quorum Sensing bezeichnet (Miller und Bassler 2001). Extrazelluläre Substanzen können über Sensormoleküle, die in das umgebende Medium ragen, erkannt werden. Hierbei wird das Sensormolekül in seiner Konformation verändert und dadurch die Information über die Zellwand übertragen. Die Signaltransduktion enthält auch Verstärkungsmechanismen, wodurch ein ausgeklügeltes System der Informationsverarbeitung auch bei prokaryotischen Organismen ermöglicht wird.

Die Information aus der Umgebung hat dann Einfluss auf den Metabolismus. Dies kann sich auch auf die Produktivität auswirken. Es sind inhibierende Effekte möglich wie Substratinhibierung oder auch Produktinhibierungen (Han und Levenspiel 1988). Auch für Proteine ist ein Wechselwirkungsmechanismus mit der Zelloberfläche denkbar. Für die Regulation von Enzymen werden auch ihre Stoffwechselprodukte genutzt. Beispielsweise werden Protease verstärkt in Anwesenheit von Proteinen im

Medium gebildet. Jedoch kann durch Fütterung einer Mischung von Aminosäuren eine Inhibierung der Produktion beobachtet werden (Levisohn und Aronson 1967). Da Proteasen im extrazellulären Medium zur katalytischen Bildung von Aminosäuren beitragen, kann man bei der Proteaseproduktion von einer Produktinhibierung sprechen (Priest 1977). Jedoch wird auch berichtet, dass die Proteasen nicht unspezifisch auf die Aminosäuren reagieren, sondern bestimmte Aminosäuren inhibierend, andere jedoch steigernd wirken (Calik et al. 2003).

Generell hat die extrazelluläre Enzymproduktion für den Mikroorganismus einige Probleme, bzw. Nachteile. Zum einen können die Umweltbedingungen für die enzymatische Aktivität des ausgeschlossenen Enzyms nicht förderlich sein, z.B. bei Anwesenheit inhibierender Substanzen oder extremer pH-Bedingungen. Falls sie jedoch ihre Aktivität ausüben, werden die katalysierten Produkte auch für konkurrierende Mikroorganismen vorhanden sein. Daher ist es wahrscheinlich, dass im Laufe der Evolution ein ausgeklügeltes Regulationssystem der Sekretion von Enzymen entwickelt wurde (Lengeler et al. 1999).

2.4 Grundlagen der Elektrofiltration

2.4.1 Filtration in der Biotechnologie

Filtrationen sind ein effizienter Weg zur Volumenreduktion im Bereich des Downstream Processing. Sie werden eingesetzt, um Zellen abzutrennen, zur Zellrückhaltung, aber auch zur Aufkonzentrierung von molekularen Produkten oder präzipitierten Substanzen und zu Sterilisationszwecken. Je nach Partikelgröße, bzw. Molekulargewicht der abzutrennenden Substanz unterscheidet man verschiedene Filtrationsarten (siehe Abbildung 2.7).

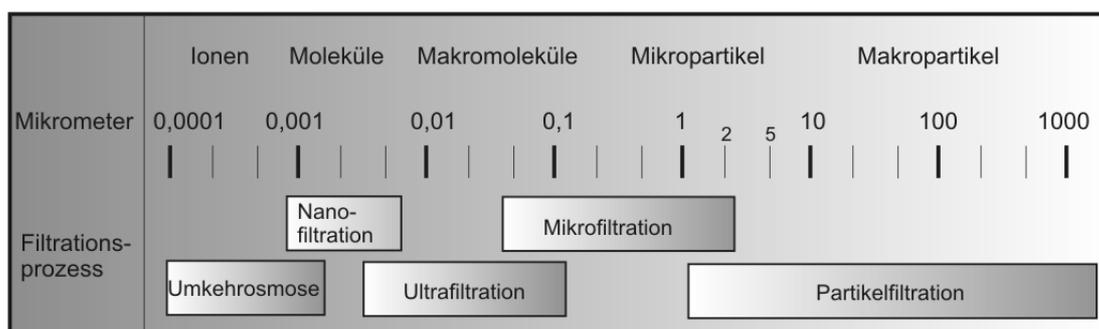


Abbildung 2.7: Unterscheidung der Filtrationsarten nach der Ausschlussgröße

Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf die Ultrafiltration, können zum Teil aber auch für Mikrofiltrationen angewendet werden.

Filtrationen nehmen bezüglich des Filtratflusses mit der Zeit ab. Dies ist vor allem auf die Konzentrationspolarisation, die durch die zurückgehaltenen Substanzen verursacht wird und reversibel stattfindet, des weiteren auf ein Fouling zurückzuführen, welches oft irreversibel ist und durch adsorptive und Poren-verstopfende Vorgänge verursacht wird.

Bei der Prozessführung von Filtrationen unterscheidet man zwischen konventioneller oder Dead-End-Filtration und Querstrom- bzw. Crossflow-Filtration. Bei der Dead-End-Filtration ist die Strömungsrichtung des Feedstroms senkrecht zur Membranfläche. Bei der Querstromfiltration ist sie quer zur Membranfläche und somit quer zur Filtratströmung (siehe Abbildung 2.8).

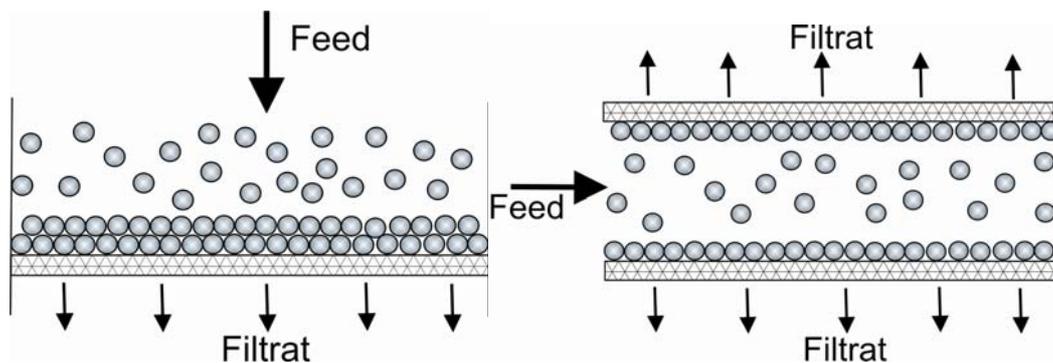


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Dead-End-Filtration (links) und der Querstromfiltration (rechts)

Die Dead-End-Filtration zeichnet sich durch die einfache Prozessführung, eine hohe mögliche Endkonzentration des Retentats und geringe Scherkraftbelastung der konzentrierten Substanzen aus. Die Querstromfiltration kann im Gegensatz zur konventionellen Filtration den Filtratstrom durch das begrenzte Anwachsen der Filterkuchenschicht auf hohem Niveau halten und ist daher mit einer besseren Performance ausgestattet. Allerdings ist keine hohe Produktkonzentration zu erzielen.

Zur Beschreibung der Konzentrationspolarisation unterscheidet man vor allem drei Modelltypen: Widerstandsmodelle, Gel-Polarisationsmodelle und Modelle des osmotischen Drucks (Vandenberg und Smolders 1990). Diese können auf der Kuchenfiltrationstheorie oder auf der Filmtheorie aufbauen. Die Konzepte der

Kuchenbildungstheorie und der Filmtheorie sind schematisch in Abbildung 2.9 dargestellt.

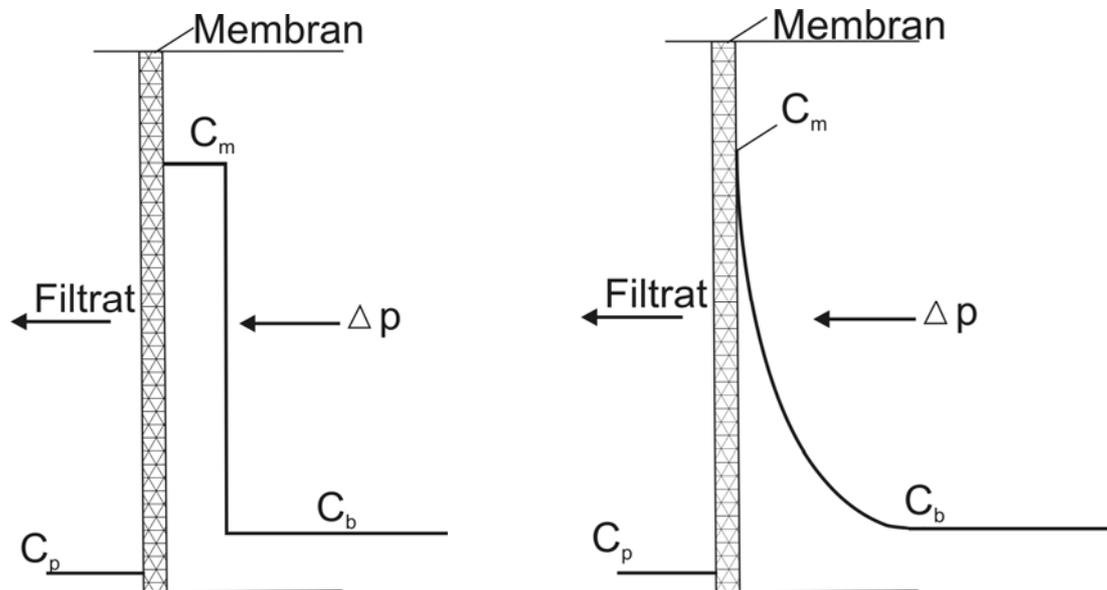


Abbildung 2.9 Kuchenaufbau nach Kuchenfiltrationstheorie (links) und Filmtheorie (rechts)

Für die Durchströmung eines Filterkuchens, der als Haufwerk von Partikeln angesehen werden kann, gilt die durch das Gesetz von Darcy beschriebene Gleichung:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p A}{\eta R} \quad 2.38$$

Dabei ist R der Filtrationswiderstand, der sich aus der Summe mehrerer Widerstände zusammensetzt (siehe Abbildung 2.10)

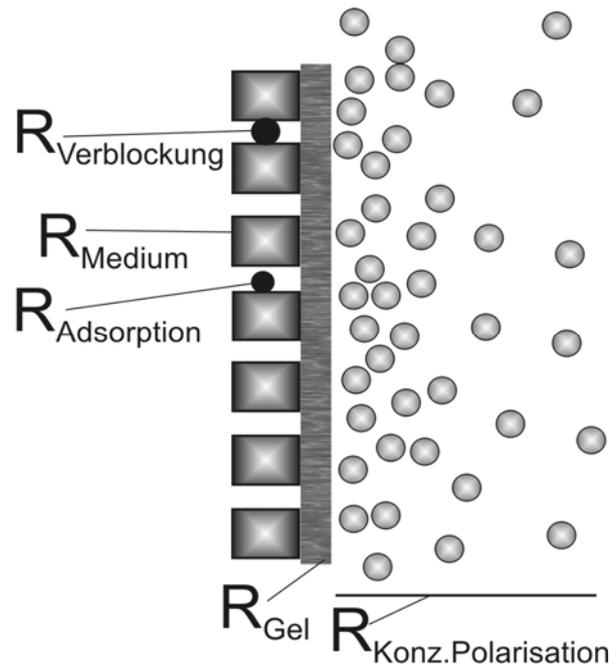


Abbildung 2.10: Mögliche Filtrationswiderstände

Bei der Kuchenbildungstheorie werden von den in Abbildung 2.10 genannten Widerständen der Filtermedienwiderstand R_m und der Filterkuchenwiderstand bzw. der Widerstand der Deckschicht R_c betrachtet und als dominant angenommen. Für R_c gilt:

$$R_c = m_c \frac{\alpha_F}{A} = c(V_{\text{Filtrat}} + V_c) \frac{\alpha_F}{A} \approx cV_{\text{Filtrat}} \frac{\alpha_F}{A} \quad 2.39$$

Hierbei wird angenommen, dass das Filtratvolumen viel größer als das Volumen des gebildeten Filterkuchens ist. Für eine isobare Filtration kann bei konstantem massenspezifischen Filterkuchenwiderstand die folgende Beziehung erhalten werden:

$$\frac{t}{V/A} = \frac{\eta \alpha_F c}{2\Delta p} (V/A) + \frac{\eta R_M}{\Delta p} \quad 2.40$$

Die Auftragung $t/(V/A)$ über (V/A) liefert den spezifischen Kuchenwiderstand α_F , welcher aus der Steigung der Kurve resultiert. Als Modellansatz für ein Widerstandsmodell sei hier die Bestimmung von α_F aus dem Carman-Kozeny-Ansatz erwähnt, der den Widerstand abhängig von Porosität und Teilchengröße ermittelt. Hierin wird der höhenspezifische Kuchenwiderstand r_c , der α_F unter Einbeziehung der Dichte entspricht, folgendermaßen ermittelt:

$$r_c = 180 \frac{(1 - \varepsilon_{\text{Por}})^2}{d_p^2 \varepsilon_{\text{Por}}^3} \quad 2.41$$

Weitere Modelle stellen Zusammenhänge zwischen Durchströmbarkeit und Sedimentationsverhalten des Kolloids her. Es sei hier auf die Literatur verwiesen (Mijnliep und Jaspers 1971).

Der Ansatz der Kuchenfiltration ist sowohl für die Beschreibung im Bereich der Mikrofiltration als auch für die Ultrafiltration üblich. Für Ultrafiltrationen werden aber auch Ansätze nach der Filmtheorie verwendet. Hierbei wird auch die Bewegung durch die Rückdiffusion der Retentatmoleküle berücksichtigt und es gilt:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + J \frac{\partial c}{\partial x} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad 2.42$$

In Gleichung 2.42 ist angenommen, dass der Diffusionskoeffizient konstant sei.

In Gelpolarisationsmodellen wird eine Gelschicht direkt auf der Membran angenommen, die eine maximale Konzentration hat. Dieser Schicht schließt sich eine diffusionsabhängige Übergangsschicht an. Das Modell ist somit eine Kombination aus Kuchenfiltrations- und Filmtheorie. Der Fluss kann in diesem Modell in folgender Gleichung ausgedrückt werden, unter der Annahme eines konstanten Konzentrationsverlaufs außerhalb des Gels (Trettin und Doshi 1980):

$$J = \left[\frac{c_{\text{Gel}} - c_{\text{Bulk}}}{c_{\text{Gel}} - c_{\text{Permeat}}} \right] \left[\frac{c_{\text{Gel}} - c_{\text{Permeat}}}{c_{\text{Bulk}} - c_{\text{Permeat}}} \right]^{0,5} \left[\frac{nD}{2(n+1)t} \right]^{0,5} \quad 2.43$$

Dabei ist n ein Faktor für den gilt: $n = f(c_g, c_p, c_b)$; $n > 0$.

Modelle des osmotischen Drucks gehen von den Eigenschaften in Lösung befindlicher Stoffe aus. Durch die van't Hoff-Gleichung wird der osmotische Druck beschrieben, der in idealer Lösung vorliegt:

$$\pi = R \cdot T \cdot c / M_w \quad 2.44$$

Bei realen Lösungen ist die Virialgleichung zu verwenden:

$$\pi = R \cdot T / M_w \cdot (c + B_2 c^2 + B_3 c^3 + \dots) \quad 2.45$$

Die Virialkoeffizienten B_2 und B_3 sind experimentell zugänglich, bzw. ableitbar, beispielsweise über Donnan-Effekte (Vandenberg et al. 1987; Vilker et al. 1981).

Als Ausgangsgleichung für die Filtration kann eine Abhängigkeit der Filtrationsgleichung vom osmotischen Druck gegeben werden (analog zu Gleichung 2.38):

$$J = \left(\frac{\Delta p - \sigma \Delta \pi}{\eta R_M} \right) \quad 2.46$$

σ ist hierbei der Reflektionskoeffizient, der den von der Membran reflektierten Anteil der Retentatsubstanz angibt.

Mit den genannten Modellansätzen kann eine Filtration vorausberechnet werden und somit die Performance abgeschätzt werden. Es werden dadurch auch Möglichkeiten erkennbar, die Prozessführung optimal zu gestalten.

Generell zeichnen sich Filtrationen durch den hohen Durchsatz und die Fähigkeit aus, leicht einem Scale-up unterzogen zu werden. Jedoch sind Filtrationen im Hinblick auf die Selektivität eingeschränkt, vor allem wenn es um Trennung von Mischungen ähnlich großer Substanzen geht.

2.4.2 Fraktionierung von Proteinen mit Ultrafiltration

Fraktionierungen mit Ultrafiltrationen durchzuführen ist bei Molekülgemischen ähnlicher Proteingröße schwierig. Für eine effektive Auftrennung wird meist ein Faktor zehn im Molekulargewichtsunterschied vorausgesetzt (Vaneijndhoven et al. 1995). Die Auftrennung von Proteingemischen wird in zahlreichen Untersuchungen behandelt, um eine Verbesserung des derzeitigen Standes zu erreichen (Bellara et al. 1997; Cheang und Zydney 2003; Ghosh und Cui 1998; Mukai et al. 1998; Vaneijndhoven et al. 1995). Hierbei soll eine Fraktion der Proteine zurückgehalten werden und eine Fraktion die Membran passieren. Oft werden Modellprotein-gemische (meist binär) verwendet, mit denen Transmissions- und Retentionsverhalten des Prozesses untersucht wird. Transmission und Retention sind hierbei nicht nur von der Membranporengröße abhängig, sondern auch von der Prozessführung, den Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und zwischen diesen und der Membran.

Um die Transmission von gelösten Substanzen durch Ultrafiltrationen zu beschreiben, gibt mehrere Ansätze. Ein sehr früher Ansatz von Ferry betrachtet die sterischen Verhältnisse beim konvektiven Transport (Ferry 1935). Die Transmission wird definiert über:

$$\tau = \frac{C_{i,\text{Filtrat}}}{C_{i,\text{Bulk}}} \quad 2.47$$

Es ist $\tau=0$, wenn der Porendurchmesser d_{Pore} der Membran kleiner als derjenige der gelösten Substanz d_{Substanz} ist. $\tau < 1$ bei $d_{\text{Pore}} > d_{\text{Substanz}}$ und $\tau \approx 1$ für $d_{\text{Pore}} \gg d_{\text{Substanz}}$ (siehe Abbildung 2.11). Unter der Annahme eines laminaren Strömungsprofils durch

eine Pore, bei dem die Substanz nur dann die Pore durchqueren kann, wenn sie nicht sterisch an der Porenwand zurückgehalten wird, kann die Transmission folgendermaßen abgeschätzt werden:

$$\tau = 2 \left(\frac{d_{\text{Pore}}^{(*)} - d_{\text{Substanz}}}{d_{\text{Pore}}^{(*)}} \right)^2 - \left(\frac{d_{\text{Pore}}^{(*)} - d_{\text{Substanz}}}{d_{\text{Pore}}^{(*)}} \right)^4 \quad 2.48$$

Hierbei kennzeichnet der Stern, dass der Porendurchmesser durch Adsorptionsvorgänge im Vergleich zum Ausgangszustand kleiner sein kann.

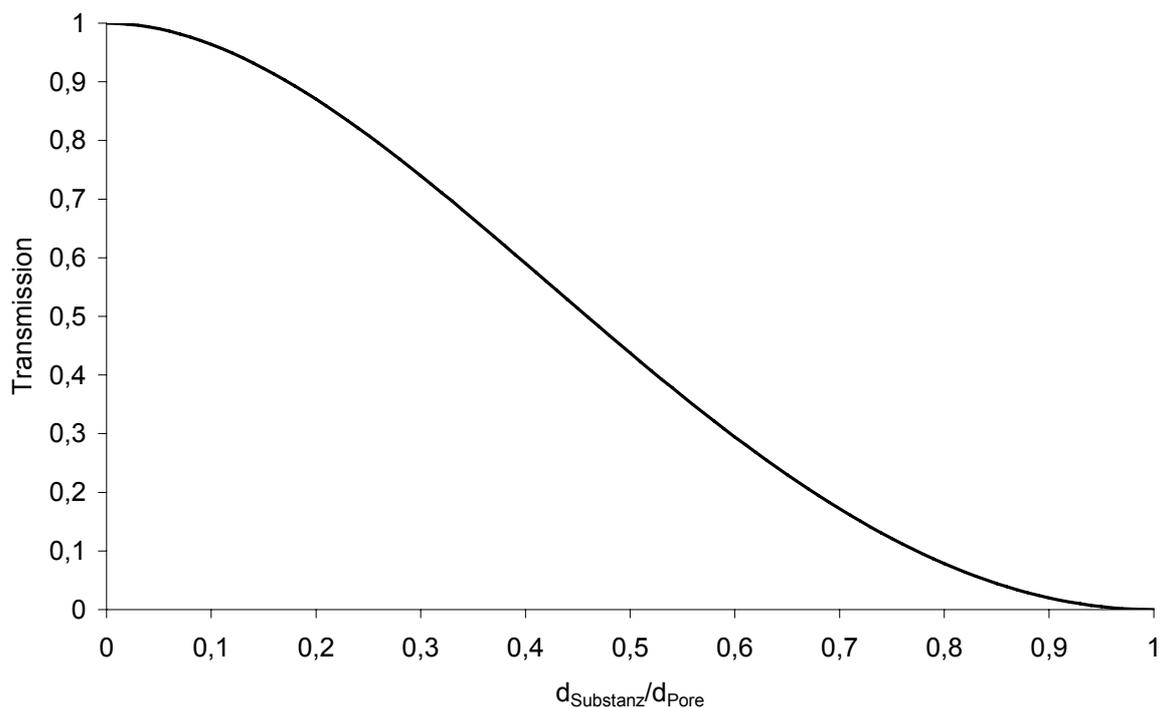


Abbildung 2.11: Transmission in Abhängigkeit von den Größenverhältnissen von gelöster Substanz zu Pore

Weiterhin werden Ansätze zum Transport von Stoffen durch Membranen unterschieden, die aus Prinzipien der irreversiblen Thermodynamik abgeleitet sind (z.B. (Kedem und Katchalsky 1958)) und solchen, die von hydrodynamischen Modellen ausgehen (z.B. (Anderson und Quinn 1974; Deen 1987)). Die hydrodynamischen Modelle basieren auf den in Abbildung 2.12 dargestellten Situation (laminare Strömung durch eine im Verhältnis zum Substanzdurchmesser langen Pore).

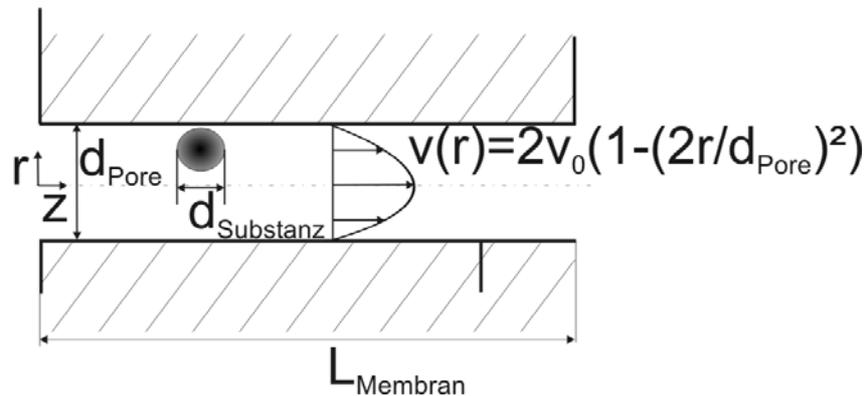


Abbildung 2.12: Modellhafte Vorstellung bei der Transmission von Poren: Substanz tritt durch Pore mit zylindrischer Form hindurch

Generell gilt für den Transport einer Substanz durch eine Pore, dass für den Transport sowohl konvektive als auch diffusive Einflüsse vorhanden sind (Opong und Zydney 1991):

$$\dot{N}_{\text{Subst}} = f_k v c_{\text{Subst}} - f_d D_\infty \frac{dc_{\text{Subst}}}{dx} \quad 2.49$$

Hierbei sind f_k und f_d die Konstanten, die die Behinderung des Transportes berücksichtigen, beispielsweise durch die Porenwände.

Für den Siebkoeffizienten, der das Verhältnis der Konzentration an der Membran c_{Membran} und im Filtrat c_{Permeat} angibt, kann folgender Zusammenhang, basierend auf der Transportgleichung (Gleichung 2.49), ermittelt werden:

$$S = \frac{c_{\text{Permeat}}}{c_{\text{Membran}}} = \frac{S_\infty \exp(\text{Pe}_{\text{Membran}})}{S_\infty + \exp(\text{Pe}_{\text{Membran}}) - 1} \quad 2.50$$

Hierbei ist S_∞ der asymptotische Wert für den Siebkoeffizienten bei sehr hohen Filtratströmen, bzw. Pecletzahlen. Die Pecletzahl charakterisiert das Verhältnis von Konvektionsfluss und Diffusion nach folgender Beziehung:

$$\text{Pe}_{\text{Membran}} = \frac{f_k}{f_d} \frac{v L_{\text{Membran}}}{D_\infty} = \text{Re} \cdot \text{Sc} \quad 2.51$$

Der beobachtete Siebkoeffizient S_{Beob} , der das Verhältnis von Permeat- und Bulkkonzentration angibt, kann aus dem tatsächlichen Siebkoeffizienten folgendermaßen ermittelt werden:

$$S_{\text{Beob}} = \tau = \frac{c_{\text{permeat}}}{c_{\text{bulk}}} = \frac{S \exp(J/k)}{1 - S(1 - \exp(J/k))} \quad 2.52$$

Der Siebkoeffizient kann somit durch Prozessparameter (Filtratfluss J) verändert werden. Es ist jedoch auch eine Verbesserung durch die Optimierung der physikochemischen Parameter möglich. Beispielsweise ist die Transmission bei $\text{pH} = \text{pI}$ am höchsten, da im ungeladenen Zustand des Proteins die Hydrathülle kleine Dimensionen hat (Ghosh 2003b). Hierbei ist die Selektivität ein entscheidender Parameter, denn bei gegebener Proteinmischung soll nur ein Protein oder eine Fraktion ins Filtrat gelangen. Für die Selektivität des Prozesses gilt:

$$\Psi = \frac{S_{i,\text{Beob}}}{S_{\text{Rest,Beob}}} = \frac{c_{\text{permeat},i} / c_{\text{bulk},i}}{c_{\text{permeat,Rest}} / c_{\text{bulk,Rest}}} \quad 2.53$$

Die Selektivität kann durch Optimierung des pH , der Salzkonzentration, der Feedkonzentration, aber auch durch Membranvorbehandlung oder durch Prozessbedingungen vergrößert werden.

Eine Übersicht über die zahlreichen Untersuchungen zur Fraktionierung von Proteinen und deren Verbesserung aus binären aber auch komplexen Proteingemischen gibt Ghosh (Ghosh 2003b).

Für eine hochselektive Trennung ist die gleichzeitige Adressierung von Größe und Ladung von großem Vorteil.

2.4.3 Elektrofiltration von Biopolymeren

Um den Filtratfluss zu erhöhen, werden vor allem vier Ansatzmöglichkeiten gewählt: 1. Die Prozessbedingungen werden auf die Ausstattung angepasst. 2. Die Bedingungen in der Lösung /Suspension werden variiert. 3. Die Membran wird verändert oder vorbehandelt und 4. zusätzliche Maßnahmen werden ergriffen, um den Fluss zu erhöhen.

Die Konzentrationspolarisationsschicht hat neben der fluss-vermindernden Wirkung auch eine Verminderung der Selektivität zur Folge, bzw. führt zu ungewünschten Selektivitäten. Daher sind die Maßnahmen zur Reduktion der Konzentrationspolarisation, bzw. zur Erhöhung des Flusses besonders von Vorteil.

Eine dieser Maßnahmen ist es, der Filtration ein elektrisches Feld so zu überlagern, dass die elektrische Kraft die zurückzuhaltenden Substanzen vom Filtrationsmedium weg hält, wie in Abbildung 2.13 dargestellt.

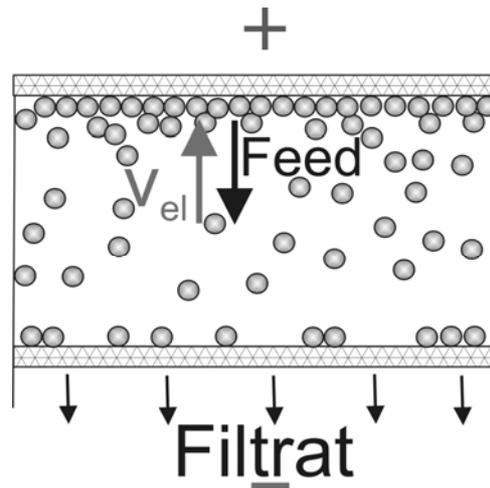


Abbildung 2.13: Schema der Elektrofiltration; dargestellt ist die Filtration mit einer negativ geladenen Substanz

Das Überlagern einer Filtration mit einem elektrischen Feld führt zu elektrophoretischen Wanderungen der gelösten, bzw. suspendierten Substanzen, aber auch zu elektroosmotischen Effekten, sowohl an den Membranen als auch an den Filterkuchen, die sich bilden (Moulik 1971). Je nach Zetapotential der Materialien ist die Richtung der Bewegung vorgegeben.

Bei einem Ansatz nach der Kuchenfiltrationstheorie unter Vernachlässigung der Diffusion gilt für die Bilanz der gelösten Substanz bei vollständigem Rückhalt durch die Membran:

$$\frac{dm_{\text{Substanz}}}{dt} = (v_{\text{Filtrat}} - v_{\text{em}})A \cdot c_{\text{Substanz}} \quad 2.54$$

Der elektrophoretische Rückfluss v_{em} ist durch die Beziehung in Gleichung 2.14 gegeben.

Diese Massenbilanz ändert die Verhältnisse im Filterkuchen im Vergleich zur gewöhnlichen Filtration. Weiterhin muss die Darcygleichung (2.38) durch den elektroosmotischen Fluss modifiziert werden. Hierfür wird in der Literatur die Einführung des elektroosmotischen Drucks erwähnt, der dem hydraulischen Druck zuaddiert wird (Iritani et al. 1992). Es kann jedoch auch ein elektroosmotischer Fluss dem Gesamtfluss zuaddiert werden:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p A}{\eta R} + q_{\text{eo}} = \frac{\Delta p A}{\eta R} + q_{\text{eo,Membran}} + q_{\text{eo,Filterkuchen}} \quad 2.55$$

Die Einbeziehung des elektrophoretischen Effekts wird durch Yukawa in einem Term berücksichtigt, der ein kritisches elektrisches Feld enthält, welches dann erreicht ist,

wenn die elektrophoretische Geschwindigkeit, die entgegen der Filtrationsrichtung gerichtet ist, gleich der Filtratgeschwindigkeit ist und somit keine Gelöstsubstanz mehr zum Kuchen hinzukommt (Yukawa et al. 1976). Der Kuchenwiderstand wird dann analog zu Gleichung 2.39 folgendermaßen verändert:

$$R_c = \left(1 - \frac{E}{E_{\text{krit}}}\right) m_c \frac{\alpha_F}{A} \quad 2.56$$

Das kritische elektrische Feld ist jedoch abhängig von der Filtrationsgeschwindigkeit, welche während des Dead-End-Prozesses variiert. Daher sollte besser in Berechnungen direkt die Massenbilanz aus Gleichung 2.54 in den Widerstandsterm in Gleichung 2.55 einbezogen werden.

Elektrofiltrationen wurden für ihren Einsatz zur Konzentrierung von Polysacchariden untersucht, wobei eine zweiseitige Filtration mit gespülten Elektroden entwickelt wurde (Hofmann 2005). Für die Konzentrierung von Xanthan konnte die Filtrationszeit durch den Einsatz des E-Feldes erheblich gesenkt werden (Hofmann und Posten 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Elektrofiltration für den Industriemaßstab skalierbar ist (Hofmann et al. 2006).

Neben Arbeiten mit Polysacchariden gibt es zahlreiche Arbeiten, die zeigen, dass auch im Bereich der Proteinfiltration, bzw. Enzymkonzentrierung, aber auch für die Abtrennung von Biomasse, also die Primärseparation in der Bioproduktaufarbeitung, das elektrische Feld zur Verbesserung der Kinetik genutzt werden kann (Brors et al. 1992; Enevoldsen et al. 2007a; Enevoldsen et al. 2007b; Wakeman 1998; Yukawa et al. 1983). Teilweise wurde dabei auch einer Querstromfiltration ein elektrisches Feld überlagert. Die Nutzung der Querstrom-Elektrofiltration für die Fraktionierung von Proteinen wurde nur in wenigen Arbeiten untersucht (Bargeman et al. 2002); hierbei ist zu sagen, dass es durch die in der Strömung vorhandene Turbulenz zu einer Aufhebung der räumlichen Ordnung kommt, welche durch das elektrische Feld geschaffen werden könnte. Daher ist die Querstromelektrofiltration für die fraktionierende Proteintrennung weniger geeignet.

Für den Einsatz im Bereich empfindlicher Proteine ist es ein wichtiger Aspekt, zu betrachten, ob Enzyme im elektrischen Feld geschädigt werden. Untersuchungen mit verschiedenen Enzymen konnten zeigen, dass die Aktivität der untersuchten Substanzen bei kurzen Spannungsimpulsen erst ab E-Feld-Stärken über 10 kV/cm verringert wurde (Yang et al. 2004). Dieser Wert wird bei der Elektrofiltration weit unterschritten.

Direkt an der Elektroden, wo die Elektrolyse stattfindet, fällt in einer sehr dünnen Schicht im Bereich von Moleküldurchmessern die für die Elektrolyse notwendige Spannung und die dafür nötige Überspannung ab. Somit sind die Feldstärken hier sehr hoch. Es ist daher von Vorteil, keine Produkte für lange Zeit an den Elektroden entlang zu führen.

2.5 Grundlagen der Magnetseparation als ISPR Methode

2.5.1 ISPR-Methoden

In-situ Produktentfernung (*in-situ* product removal ISPR) ist eine Methode, die bei einer Reihe von Produktionsprozessen verfahrenstechnische Vorteile hat. Es wird dabei allgemein die Verweilzeit der Produkte im reaktiven Medium drastisch gesenkt. Bei chemischen Reaktionen kann die Ausbeute durch das Abziehen des Produktes nach Le Chatelier erhöht werden. Auch in der Bioverfahrenstechnik wird diese Methode angewendet. Durch ISPR-Technologie können inhibitorische Effekte oder Limitierungen vermieden werden, welche durch die Akkumulation eines Produktes entstehen. Des Weiteren können ungünstige Gleichgewichtswerte verschoben werden und Produktverluste, etwa durch Degradation oder unkontrolliertem Verlust, verhindert werden. Schließlich wird die Produktaufarbeitung im allgemeinen weniger aufwendig, da die Zahl der Separationsschritte stark reduziert werden kann. All diese Effekte führen letztlich zu erhöhten Ausbeuten pro Substrat und pro Biokatalysator und zu einer verbesserten volumetrischen Produktivität (Lye und Woodley 1999).

Die Konfiguration eines ISPR-Verfahrens wird eingeteilt in Verfahren mit interner Abtrennung, bei denen die Abtrennphase innerhalb des Bioreaktors ist (z.B. durch Kompartimentierung des Reaktionsraums mit einer Membran), und solchen mit externer Abtrennung, bei denen die Fermentationsbrühe in einem außerhalb des Reaktors stattfindenden Separationsprozess bezüglich des gebildeten Produkts abgereichert wird. Weiterhin werden Verfahren mit direktem Kontakt zwischen aufnehmender Phase (z.B. Extraktionsphase oder Adsorberpartikel) und Mikroorganismen mit solchen ohne den direkten Kontakt unterschieden. Der direkte Kontakt kann durch Membranen oder die Immobilisierung der Mikroorganismen vermieden werden (Stark und von Stockar 2003).

Die möglichen Trennverfahren, die zur ISPR genutzt werden können, sind Verdampfung, Extraktion, Filtration, Adsorption und Fällung. Je nach Eigenschaften

der Produkte (wie z.B. Größe, Hydrophobizität, Flüchtigkeit, Ladung) können die jeweils geeigneten Verfahren angewendet werden. Für *in-situ* Proteinabtrennungen sind die wichtigsten Verfahren die Extraktion (vor allem wässrige zwei-Phasen-Systeme) und die Adsorption.

Wässrige zwei Phasen-Verfahren konnten bisher selten in industriellen Prozessen eingesetzt werden (Sinha et al. 2000). Die Gründe hierfür sind die hohen Kosten für das phasenbildende Polymer, das geringe theoretische Verständnis der für die Verteilung der Substanzen verantwortlichen Mechanismen und die Einarbeitungszeit für dieses Verfahren (Rito-Palomares 2004).

Auch der Einsatz adsorptiver Verfahren als *in-situ* Separationsmethode für Proteine hat industriell noch keinen Durchbruch geschafft. Der geringe Einsatz von ISPR kann vor allem dann überwunden werden, wenn das Trennverfahren mit hohen Selektivitäten, großen Kapazitäten und extremer Robustheit ausgestattet ist. Affinitätsadsorption ist ein hochselektives Verfahren, das als Methode hier in Frage kommt. Jedoch sind Adsorberpartikel, die in chromatographischen Verfahren oder bei der „Expanded Bed Adsorption“ eingesetzt werden, porös und somit für Fouling anfällig, wenn sie in ungeklärten Biosuspensionen eingesetzt würden. Zur Verringerung dieses Nachteils wäre der Einsatz nicht-poröser Partikeln ideal, die jedoch nur in sehr kleinen Dimensionen eine genügend hohe Adsorptionskapazität aufweisen. Solche kleinen Partikel lassen sich wiederum schwer mit klassischen Fest-Flüssig-Trennverfahren abtrennen. Es bedarf einer zusätzlichen Kraft wie der magnetischen.

2.5.2 Magnetseparation in der Biotechnologie

Die Magnetseparation ist ein Verfahren, das erstmals von Dunnill als biotechnologische Separationsmethode erwähnt wurde (Dunnill und Lilly 1974). Hierbei werden Adsorberpartikel so hergestellt, dass sie magnetisierbare superparamagnetische Substanzen enthalten. Die Adsorptionsleistung auf der Oberfläche kann entsprechend der Funktionalisierung gewählt werden. Durch die magnetischen Eigenschaften ist es möglich, die Partikel nach Gleichung 2.25 auch noch bei sehr kleiner Partikelgröße abzutrennen, wenn das magnetische Feld einen besonders hohen Gradienten aufweist. Dieser kann durch Einfügen von magnetisierbaren Drahtmatrizen in ein homogenes Magnetfeld hervorgerufen werden (Oberteuffer 1974). Die Hochgradientenmagnetseparation (HGMS) ermöglicht Feldgradienten von

bis zu 100.000 T/m (Franzreb et al. 2006). Je nach Drahtmatrize ist die Abtrennung von Partikeln im Mikrometermaßstab möglich.

Bei Gegebenheiten wie in Abbildung 2.14 dargestellt, kann die magnetische Kraft (Gleichung 2.25) folgendermaßen abgeschätzt werden (Svoboda 1987):

$$F_{\text{Mag}} = -\frac{8}{3} \pi \mu_0 \kappa_m r_{\text{Partikel}}^3 \left(H_0 + H_0 \frac{r_{\text{Draht}}^2}{a^2} \right) H_0 \frac{r_{\text{Draht}}^2}{a^3} \quad 2.57$$

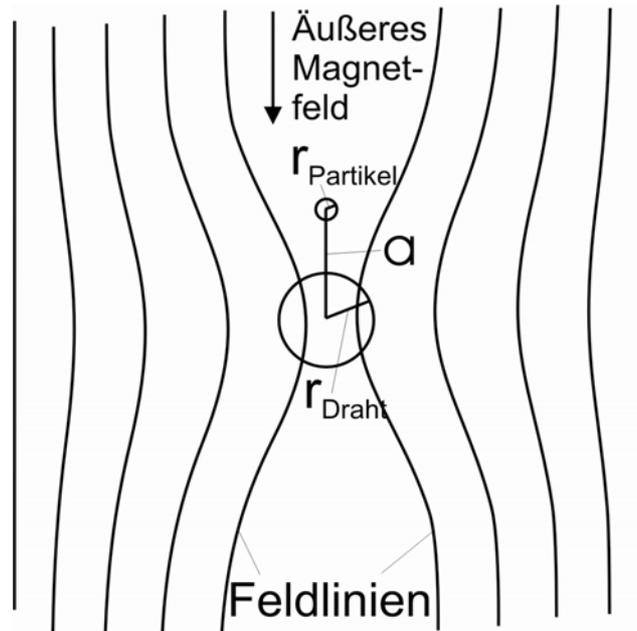


Abbildung 2.14: Draht mit anströmendem Partikel im Magnetfeld; Feldlinien werden durch Draht gebündelt und erzeugen so Magnetfeldgradienten

Für eine fixe Geometrie von $r_{\text{Draht}}=3 r_{\text{Partikel}}$ ist die Magnetkraft maximal und es gilt:

$$F_{\text{Mag}} = -\frac{16}{27} \pi \mu_0 \kappa_m r_{\text{Partikel}}^2 H_0^2 \quad 2.58$$

Abbildung 2.15 zeigt die Kräfte im Vergleich, welche für FFT-Separationen von Bedeutung sind. Es ist zu erkennen, dass die Magnetkraft im Mikromaßstab dominieren kann.

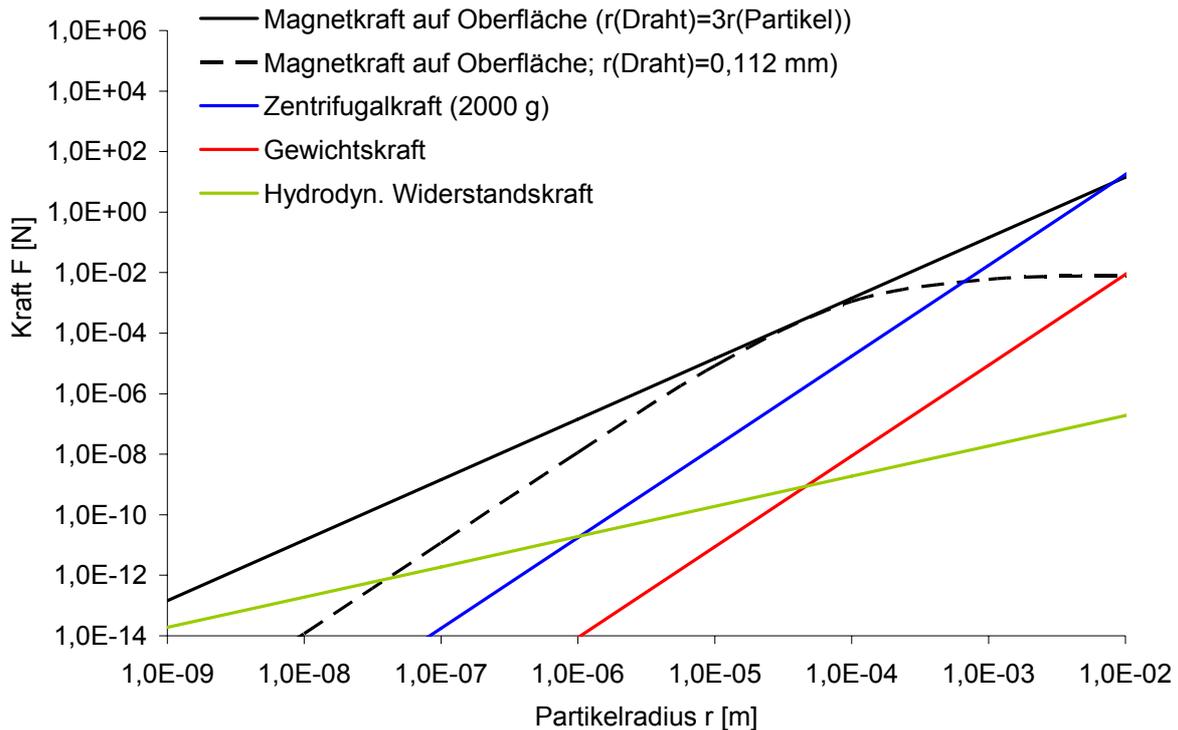


Abbildung 2.15: Konkurrierende Kräfte bei der Magnetseparation im Vergleich; Dichte Partikel 1700 kg/m^3 ; $H_0=320000 \text{ A/m}$

Die Abtrennung der Adsorptionsmatrix durch die Magnetkraft ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Suspension komplex, mit Feststoffpartikeln behaftet, oder viskos ist, so dass alternative Trennverfahren wie Filtration oder Festbett nicht in Frage kommen. Weiterhin ist der Vorteil von geringen Scherbelastungen zu nennen, die zu Zellschädigungen führen können. Diese können beispielsweise bei Zentrifugationsprozessen mit hohen Drehzahlen nicht ausgeschlossen werden.

Die magnetischen Partikel sind nicht-porös und daher wenig anfällig für Fouling und ermöglichen deshalb hohe Adsorptionskinetiken. Des weiteren sind sie sehr klein (Mikrometermaßstab) und weisen dadurch eine hohe massenspezifische Oberfläche auf (Schügerl und Hubbuch 2005).

Für die Anwendung der Magnetseparation zur Abtrennung von Substanzen aus Fermentationsbrühen eignen sich Partikel mit Durchmessern von etwa 1 Mikrometer. Nicht-poröse Partikel dieser Größenordnung weisen vergleichbare spezifische Oberflächen auf wie typischerweise eingesetzte poröse nicht-magnetische Adsorberpartikel von 100-200 μm Durchmesser (Ahuja 2000; OBrien et al. 1996). Daher ist sowohl eine genügend große Beeinflussung der Fest-Flüssig-Trennung

(FFT) durch die Magnetkraft (siehe Abbildung 2.15) als auch eine hohe spezifische Oberfläche möglich.

Magnetische Adsorberpartikel werden auf unterschiedliche Arten hergestellt (Cocker et al. 1997; Khng et al. 1998). Prinzipiell wird meist ein anorganisches magnetisches Material (z.B. Magnetit) mit einer organischen Komponente verbunden, auf welches dann auf der Oberfläche spezifische Liganden gebunden werden, die die Adsorption der Zielkomponente ermöglichen. Tabelle 2.1 zeigt gängige Funktionalisierungen für Magnetpartikel.

Tabelle 2.1: Funktionalisierungsmöglichkeiten magnetischer Partikel zur Adsorption bestimmter Zielmoleküle

Ligand	Zielsubstanzen
Kationentauscher (-SO ₃ H, -COOH)	Moleküle mit positiver Nettoladung
Anionentauscher (-NR ₂ ⁺ , DEAE)	Moleküle mit negativer Nettoladung
Streptavidin	Biotinylierte Proteine
Protein A, Protein G	Monoklonale Antikörper
Metall-Chelat	His-Tag-Proteine

Die Anwendung dieser funktionalisierten Magnetpartikel in der Biosuspension wird auch als „High Gradient Magnetic Fishing“ (HGMF) bezeichnet (Heeboll-Nielsen et al. 2003; Hubbuch et al. 2001). Hierbei werden mehrere Schritte aneinandergefügt, die eine Substanz aus einem Mehrkomponentengemisch „herausfischen“ lassen:

Adsorption – Waschung der Adsorber – Elution der Zielkomponente – Regeneration der Magnetpartikel. Jeweils zwischen den Schritten wird ein Magnetseparations-schritt (FFT-Schritt) eingefügt, um die umgebende Flüssigkeit auszutauschen. Beim optimalen HGMF-Prozess wird eine Komponente selektiv und vollständig abgetrennt und liegt im Elutionspuffer in konzentrierter, aktiver Form vor. Im Mikroliter-Maßstab ist diese Technik bereits etabliert, ein Scale-up ist jedoch nicht ohne Weiteres möglich. Industrielle Pilotprozesse sind bisher noch nicht etabliert.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Kultivierungsmedien

Für die Kultivierungen wurden im Wesentlichen zwei Medien verwendet. Ein komplexes und ein synthetisches Medium (siehe Tabelle 3.1). Das synthetische Medium wurde als Standardmedium genutzt; Bei Abweichungen werden diese erwähnt.

Tabelle 3.1: Bestandteile der Medien

Bezeichnung Medium	Komponente	Konzentrat ion (Std.)	Bezugs quelle	Literatur
Synthetisches Medium	Glucose, reinst Ph. Eur.	30 g/l	Roth	(Zhang et al. 1983)
	Natriumcitrat p.A.	1 g/l	Roth	
	Ammoniumsulfat p.A.	10 g/l	Merck	
	KH ₂ PO ₄ p.A.	3,7 g/l	Merck	
	K ₂ HPO ₄ p.A.	6,8 g/l	Merck	
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O p.A.	0,2 g/l	Merck	
	CaCl ₂ >95 %	2,2 mg/l	Roth	
	Na ₂ MoO ₄ p.A.	0,24 mg/l	Sigma-	
	FeSO ₄ ·7 H ₂ O p.A.	5,2 mg/l	Aldrich	
	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O p.A.	7,2 mg/l	Merck	
	MnCl ₂ ·4 H ₂ O p.A.	10 mg/l	Merck	
CuCl ₂ ·2 H ₂ O p.A.	0,85 mg/l	Merck Merck		
Komplexes Medium	Pepton	5 g/l	Roth	DSMZ
	Fleischextrakt	3 g/l	Roth	
	Glucose*	30 g/l	Roth	
LB (Luria Bertani) Medium	Trypton	10 g/l	Roth	DSMZ
	Hefeextrakt	5 g/l	Roth	
	NaCl p.A.	10 g/l	Roth	

*nicht bei allen Versuchen wurde Glucose dem komplexen Medium zugesetzt

3.1.2 Proteine und Enzyme

Modellproteine BSA und Lysozym

Für die Untersuchungen der Elektrofiltration wurden die Proteine BSA und Lysozym (LZ) verwendet. BSA wird aus Rinderserum, Lysozym aus Hühnereiweiß gewonnen. Die Eigenschaften der beiden Proteine sind in Tabelle 3.2 zu finden.

Tabelle 3.2: Eigenschaften von BSA und Lysozym (Ghosh et al. 1998)

Eigenschaft	BSA	Lysozym
Molekulargewicht (g/mol)	69.000	14.400
Isoelektrischer Punkt	4,7 – 4,9	11,0
Zetapotential bei pH 7 in 10 mM PO ₄ -Puffer (mV)	-16	9
Stokes-Einstein Radius (nm)	3,6	2,0

Enzym Alpha-Amylase

Amylasen sind hydrolytisch wirksame Enzyme, die in Alpha-, Beta- und Glucoamylasen unterschieden werden. Alpha-Amylasen wurden in dieser Arbeit produziert. Sie werden auch industriell mikrobiell hergestellt und extrazellulär gebildet. Es handelt sich um Endoenzyme, die Alpha-1,4-D-glykosidische Verbindungen zufällig innerhalb von Amylosemolekülen spalten. Amylasen sind eines der wichtigsten großtechnisch hergestellten Enzyme und finden Anwendung in der Lebensmittel-, der Textil-, der Biotechnologie- und Papierindustrie (Pandey et al. 2000).

Enzym Subtilisin

Subtilisin ist eine alkalische Serinprotease, die Proteine bei Vorhandensein von Tyrosin, Phenylalanin oder Leucin auf der Carboxylseite der zu trennenden Bindung spalten. Sie sind Endoenzyme. Subtilisin wird in *Bacillus* sp. produziert. Der optimale pH für maximale Aktivität ist 10.

Alkalische, mikrobielle Proteasen dominieren den technischen Enzymweltmarkt. Sie finden hauptsächlich in der Waschmittelindustrie Verwendung. Zwei wichtige Untergruppen sind Subtilisin Carlsberg und Subtilisin Novo, die beide ein Molekular-

gewicht von 27,5 kDa haben und durch *Bacillus licheniformis*, bzw. durch *Bacillus amyloliquefaciens* synthetisiert werden (Rao et al. 1998).

3.1.3 Materialien für die Elektrofiltrationsuntersuchungen

Membranen

Membranen sind dünne Schichten oder dünne Filme, durch die Lösungsmittel und gelöstes Gut unterschiedlich selektiv transportiert werden. Für Ultrafiltrationszwecke können Membranen aus organischen Polymeren wie Polysulfon, Polyethersulfon (siehe Abbildung 3.1), Celluloseacetat oder Polyacrylnitril, aber auch aus anorganischem Material wie Aluminiumoxid, Borsilikatglas oder auch rostfreiem Stahl verwendet werden. Die Polymermembranen werden in größerem Maße eingesetzt, da sie kostengünstig, flexibel, leicht und chemisch einfach modifizierbar sind. Sie werden meist durch Fällungsprozesse hergestellt, aber auch durch andere Verfahren, wie Ätz- oder Dehnmethode. Anorganische Membranen werden wegen ihrer Robustheit, Reinigbarkeit und Sterilisierbarkeit für die Wasserreinigung und zur Filtration in der chemischen Industrie verwendet. Sie können durch Sinter- oder Auslaugprozeduren hergestellt werden.

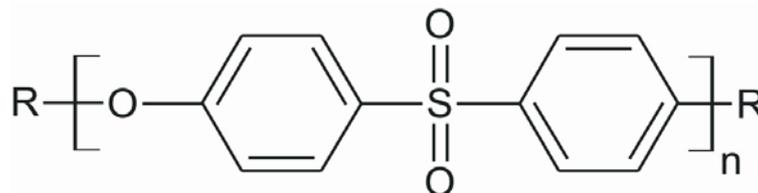


Abbildung 3.1: Struktur von Polyethersulfon

Poröse und nicht-poröse Membranen können unterschieden werden. Nicht-poröse, dichte Membranen werden zur Dialyse und zur Pervaporation benutzt; ihre Transmission geschieht durch Löslichkeits- und Diffusionsmechanismen (Ghosh 2003b). In dieser Arbeit wurden lediglich asymmetrische Polymermembranen aus Polyethersulfon benutzt, welche porös waren (siehe Abbildung 3.2). Ultrafiltrationsmembranen sind generell porös.

In Tabelle 3.3 sind die Eigenschaften der Membranen zu finden, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Dabei sind auch die Ausschlussgrenze (molecular weight cut off MWCO) und der Reinstwasserfluss (pure water flux PWF) angegeben.

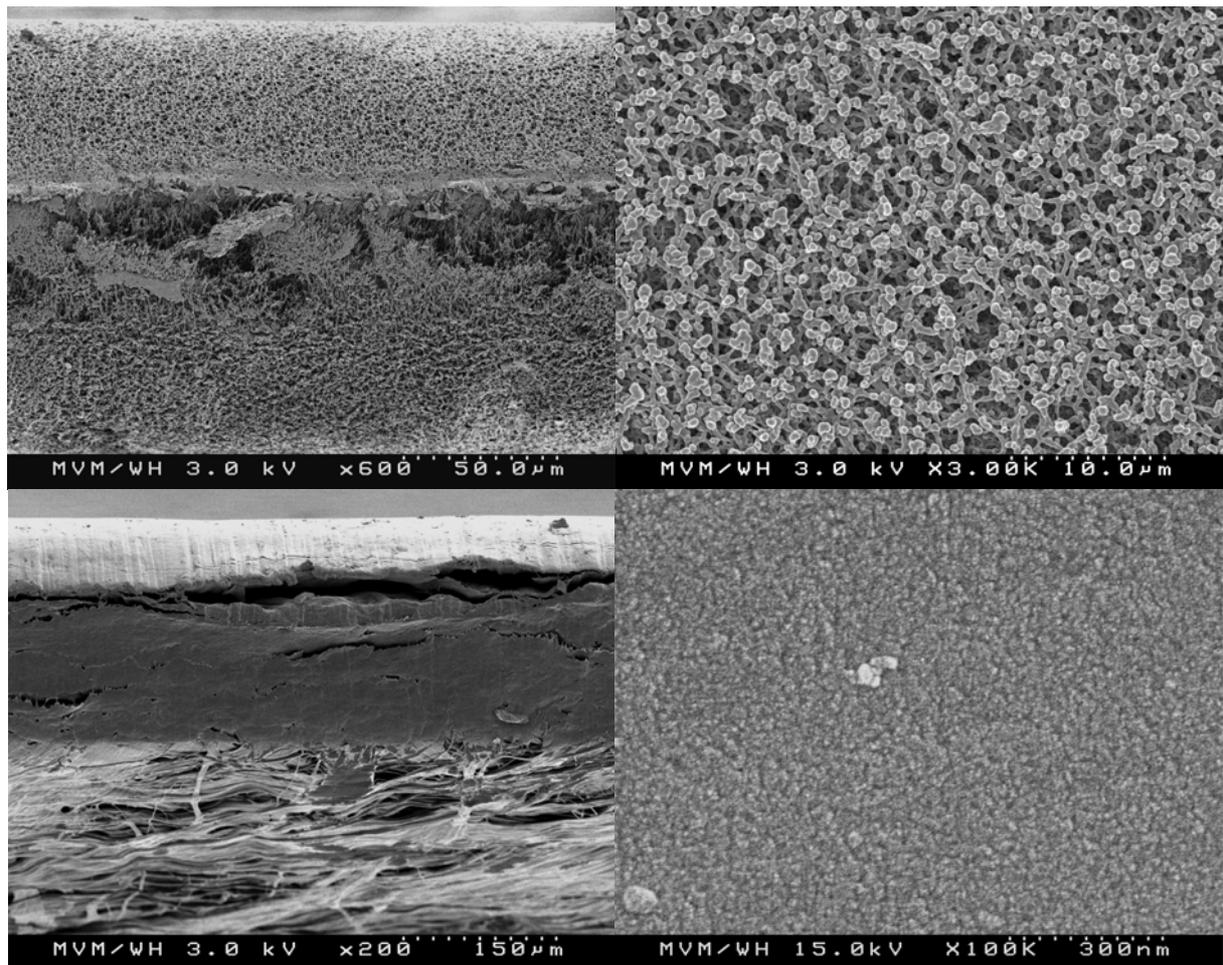


Abbildung 3.2: REM-Aufnahmen der benutzten Membranen: 0,1 µm-PES-Membran (oben), 50 kDa-PES-Membran (unten); Schnitt links; Draufsicht rechts

Tabelle 3.3: Eigenschaften der verwendeten Membranen

Hersteller	Material	MWCO [kDa] bzw.	PWF [ml/cm ² /min]
		Porengröße* [µm]	bei 1 bar
Sartorius	Polyethersulfon	10	0,13
Schleicher & Schuell	Polyethersulfon	50	1,01
Schleicher & Schuell	Polyethersulfon	100	1,23
Pall	Polyethersulfon	50	0,62-1,22
Pall	Polyethersulfon	100	1,35-3,78
Pall	Polyethersulfon	0,1*	5,5
Pall	Polyethersulfon	0,45*	58 **

** bei einem Druck von 0,7 bar

3.1.4 Materialien im Bereich der Magnetseparation

Hochgradienten-Magnetseparations(HGMS)-Zelle

Für die Hochgradienten-Magnetseparations-Versuche wurde eine HGMS-Zelle konstruiert (siehe Abbildung 10.1 im Anhang), in der mehrere übereinander gelagerte Gitter und jeweils ein Platzhalter gestapelt werden konnten. Die Gitter waren für die Verzerrung des homogenen Magnetfelds verantwortlich, wodurch hohe Magnetfeldgradienten entstehen. Die Drahtmatrizen hatten unterschiedliche Geometrien (siehe Abbildung 3.3). Sie wurden bezogen bei Haver&Boecker (Oelde, Deutschland) und waren aus nicht-remanentem Edelstahl (1.4016, X6Cr17) gefertigt. Die Abmessungen waren: Gesamtdurchmesser 55 mm; Drahtdurchmesser 0,224 mm bzw. 0,5 mm und Drahtabstand 1 mm bzw. 3,15 mm. Bei den feinen Geweben betrug der Anteil der offenen Fläche an der Gesamtsiebfläche 67 %, bei den groben Geweben 74,5 %.

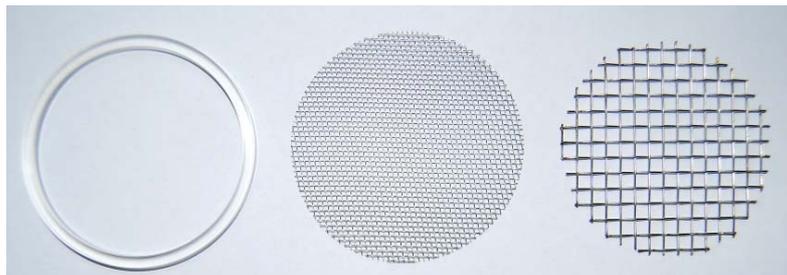


Abbildung 3.3: Drahtmatrizen in der HGMS; Abstandhalter aus PMMA (links)

Der Unterschied in den Drahtgeometrien hatte den Grund darin, die Verluste durch Sekundärfiltereffekte zu vermeiden. Bei der Filtration von Magnetpartikeln unter Verwendung der Drähte mit geringem Durchmesser und Abstand würde sich ein Filterkuchen auf den untersten Ebenen bilden, der dann nichtmagnetische Partikel, z.B. Biomasse, abtrennen könnte. Daher wurden die weiteren Gitter zusätzlich verwendet.

Der Aufbau der HGMS-Zelle ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

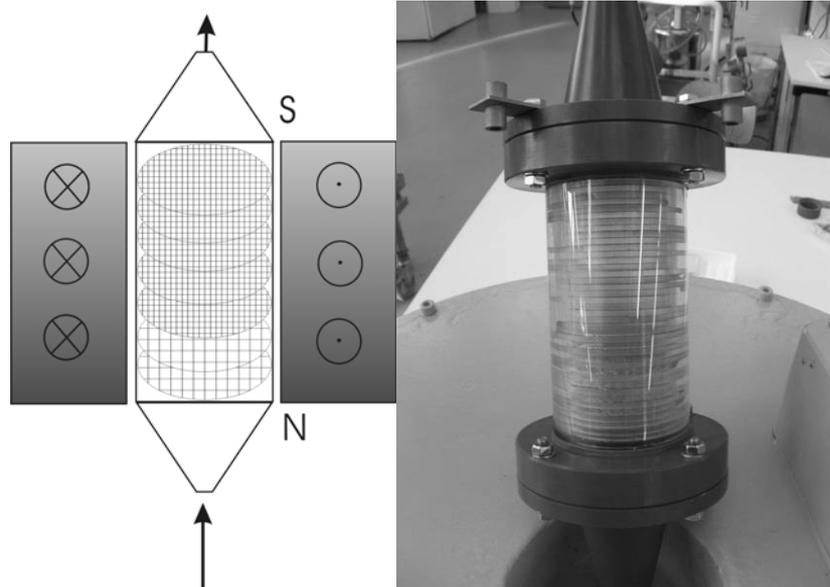


Abbildung 3.4: Aufbau der HGMS: Schema (links): Drahtgewebe sind in einer Säule; Außen ist der Schnitt durch eine Magnetspule mit Stromrichtung angedeutet, Bild (rechts): HGMS-Säule aus Elektromagnetbohrung herausgehoben

Eingesetzt wurde die HGMS-Zelle in einem Bohrloch eines Elektromagneten (s.u.).

Magnetische Zentrifuge MEC

Als FFT-Magnetseparationseinheit wurde neben der HGMS auch mit einer magnetische Zentrifuge (MEC) gearbeitet, die eine Weiterentwicklung der HGMS darstellt und den Einsatz im kontinuierlichen Betrieb im großen Maßstab ermöglichen könnte. Diese wurde am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik im Rahmen der Dissertation von Mathias Stolarski entwickelt.

Abbildung 3.5 zeigt den prinzipiellen Aufbau der MEC. Hierbei strömt von oben die Biosuspension mit Magnetpartikeln an, die Magnetpartikel werden auf den Drahtrotor-Matrizen (sternförmig) abgetrennt (die Abbildung zeigt nur eine Lage; es wurden in dieser Arbeit jeweils drei Lagen benutzt). Durch die Zentrifugalwirkung wandern die abgeschiedenen magnetischen Adsorberpartikel gleitend auf dem Draht nach außen und werden gegen die Wand abgeschleudert.

Die MEC wurde in dieser Arbeit in der Batchbetriebsweise verwendet. Der Austrag der Magnetpartikel wurde durch Öffnen der Apparatur vollzogen.

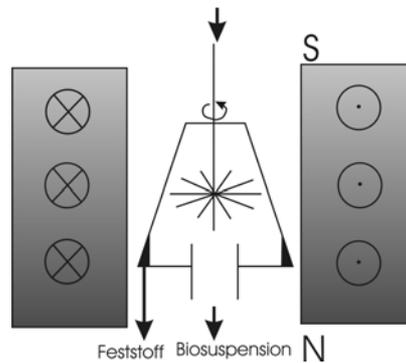


Abbildung 3.5: Schema der MEC, die sich in einer Elektromagnetbohrung befindet

Elektromagnet

Sowohl die HGMS-Säule als auch die MEC wurden in einem Elektromagneten der Firma Steinert (Köln, Deutschland) eingesetzt. Dieser hat in seiner Bohrung ein magnetisches Feld (siehe Anhang (Abbildung 10.2)). Die Spulendaten sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildung 10.3; Abbildung 10.4). Die Bohrung der Spule ermöglichte ein Einbringen von HGMS-Zelle oder MEC, sodass ein äußeres Magnetfeld den in den Apparaten stattfindenden Prozessen überlagert wurde.

Analytische Magnetseparation

Zur Magnetseparation im kleinen Maßstab (Eppendorf-Reaktionsgefäß- oder Becherglasmaßstab) wurden Permanentmagnete verwendet. Für die Eppendorf Reaktionsgefäße wurde das magnetische Gestell „Chemagic“ der Firma Chemagen (Baesweiler, Deutschland) benutzt, für größere Gefäße Permanentmagnete aus einer Neodym-Eisen-Bor-Legierung der Firma Webcraft (Uster, Schweiz).

3.2 Magnetpartikel

3.2.1 Herstellungsverfahren der Magnetpartikel

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Typen von Magnetpartikeln genutzt. Zum einen wurden Partikel verwendet, die durch Suspensionspolymerisation hergestellt wurden und mit einer Bacitracin-Funktionalisierung ausgestattet waren. Zum anderen wurden Kompositpartikel mit einer Ionentauscherfunktionalisierung (IEX) benutzt, die durch einen Sprühtrocknungsprozess produziert wurden. Auf die Herstellung, die mit

bzw. durch Kooperationspartner durchgeführt wurde, wird im folgenden eingegangen.

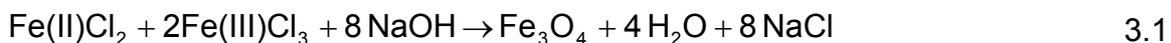
Weiterhin wurde ein Verfahren zur Funktionalisierung von Magnetpartikeln etabliert, welches auf kommerziell erhältlichen PVA-beschichteten Magnetpartikeln basiert. Diese Grundpartikel wurden von der Firma Chemagen bezogen (M-PVA 01x).

Bacitracin-funktionalisierte Polyglutaraldehyd-Partikel

Die Magnetpartikel, die in diesem Kapitel beschrieben werden, nutzen die Wechselwirkung der Protease Subtilisin, welche als Zielprodukt der Kultivierungen produziert wurde, mit Bacitracin. Bacitracin ist ein Oligopeptid, das aus zehn Aminosäuren besteht und mit Subtilisin einen Protein-Inhibitor-Komplex eingeht und damit zur Anbindung bzw. Immobilisierung dieser Protease genutzt werden kann (Vitkovic und Sadoff 1977). Diese Partikel wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Timothy Hobley (Biocentrum, DTU, Kopenhagen) hergestellt.

Herstellung der Grundmagnetpartikel

Zunächst wurden Grundpartikel hergestellt, welche die magnetischen Eigenschaften der Gesamtadsorbentien ermöglichen sollten. Dazu wurde zunächst Eisenoxid in einer Fällungsreaktion hergestellt (siehe Gleichung 3.1). Hierzu reagierten Eisen(II)- und Eisen(III)-Chloride in wässriger Lösung nach Zugabe von Natronlauge bei pH 11-12 zu Magnetit (Fe_3O_4) (Misawa et al. 1974). Das molare Verhältnis Fe(III)/Fe(II) betrug hierbei 2. NaOH wurde im Überschuss zugegeben (etwa die dreifache stöchiometrische Menge).



Reines Magnetit besteht zu 72 Massen-% aus Eisen. Das im Fällungsschritt entstandene Magnetit weist aufgrund der schnellen Fällungsreaktion nur wenig kristalline Strukturen auf und dabei können andere Eisenoxide wie Maghämmit (Fe_2O_3) entstehen (Cornell und Schwertmann 1996). Daher liegt die Sättigungsmagnetisierung des produzierten Magnetits unter der von reinem Magnetit. Weiterhin kann durch Wassereinlagerung aus Magnetit auch Goethit (FeO(OH)) entstehen. Das gewonnene Magnetit wurde im nächsten Schritt mit einer Aminosilanschicht versehen.

Modifizierung der Matrix-Oberfläche

Bei hohen Temperaturen reagiert 3-Aminopropyltriethoxysilan (II) mit Sauerstoffatomen an der Oberfläche des Magnetits (I). Des Weiteren bilden sich Silizium-Sauerstoff-Brücken zu einem dichtem Netzwerk mit freien Aminogruppen am Ende (del Campo et al. 2005). In Abbildung 3.6 ist die Reaktion schematisch dargestellt.

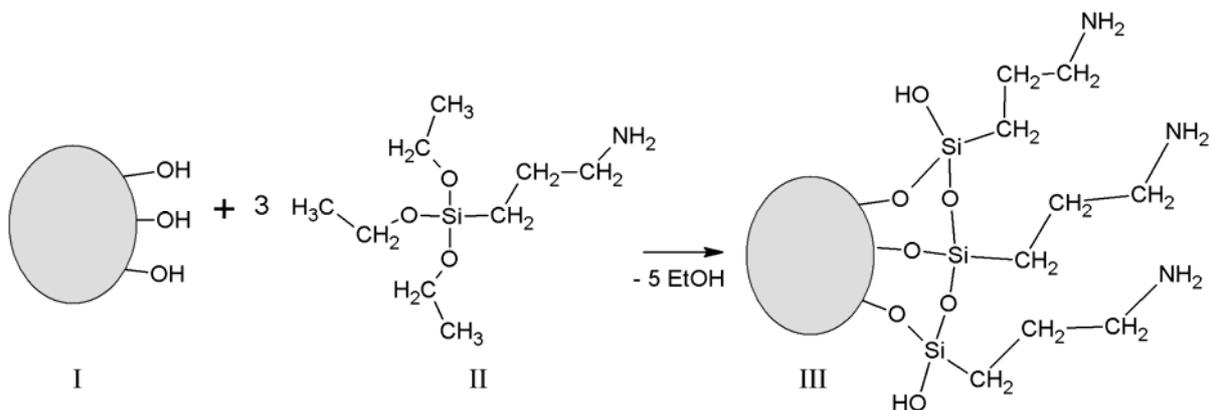


Abbildung 3.6: Aminosilanisierung des gefällten Eisenoxids

Die modifizierten Partikel (III) werden mit Glutaraldehyd (IV) umgesetzt. Glutaraldehyd wird unter Wasserabspaltung gebunden (siehe Abbildung 3.7) (Halling und Dunnill 1979). Dabei wird ein Imin gebildet. Auf die Anbindung des Glutaraldehyds könnte verzichtet werden, jedoch ist es aus Stabilitätsgründen vorteilhaft, zunächst eine Glutaraldehydschicht auf der Oberfläche zu vernetzen. Die Bindung des Aktivators Divinylsulfon (DVS) (siehe nächster Abschnitt) an Glutaraldehyd ist stabiler als an den modifizierten Partikel (III) (Halling und Dunnill 1980).

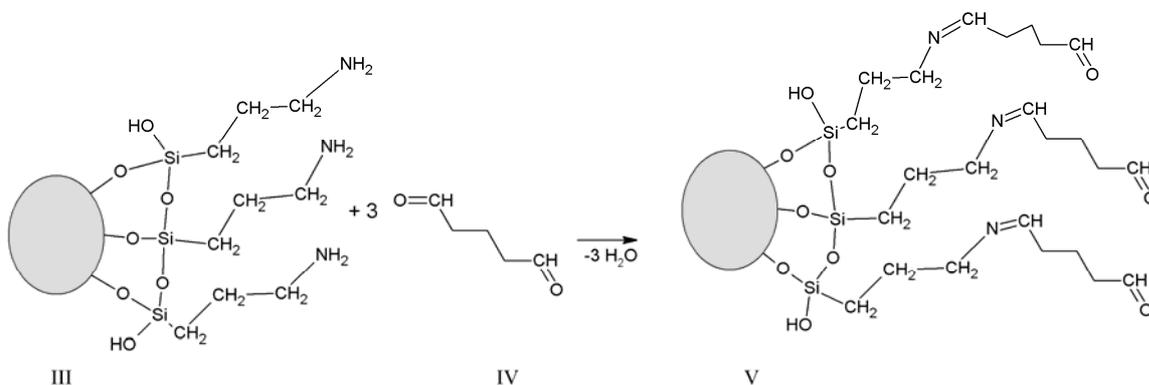


Abbildung 3.7: Anbindung des Glutaraldehyds an die silanisierte Matrix

Anbindung des Bacitracin-Peptids an die aktivierte Partikeloberfläche

Die Aktivierung der Matrix erfolgt mittels DVS (VI). DVS reagiert mit der Carbonylfunktion der Oberfläche und wird reduktiv (mittels NaBH_4) an diese gekuppelt (siehe Abbildung 3.8) (Hermanson et al. 1992). Anschließend wird auch das Bacitracin reduktiv an die Vinyl-Sulfonyl-Einheit des DVS gebunden (nicht dargestellt).

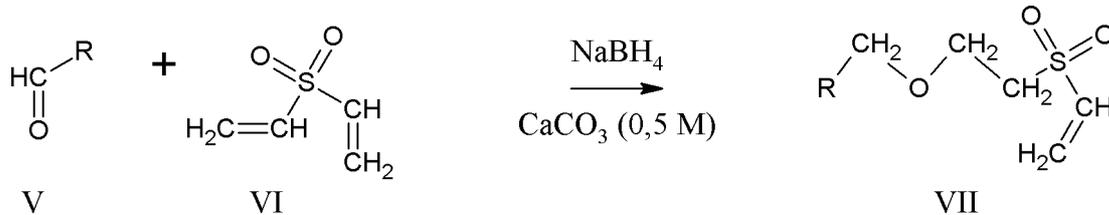


Abbildung 3.8: Divinylsulfonaktivierung der Glutaraldehydpartikel (Hermanson 1992)

Die detaillierte Prozedur für die Herstellung der bacitracinfunktionalisierten Magnetpartikel ist der am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik durchgeführten Diplomarbeit von Martin Cerff zu entnehmen (Cerff 2007).

Charakterisierung der Bacitracin-funktionalisierten Magnetpartikel

Die wichtigsten Eigenschaften der hergestellten Magnetpartikel waren ihre Magnetisierbarkeit und ihre adsorptiven Eigenschaften.

Zur Bestimmung der Magnetisierungskurve wurde das AGM-Verfahren (alternating gradient magnetometer) verwendet. Die Magnetisierungskurve ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Wichtige Kenndaten der Partikel sind in Tabelle 3.4 gegeben. Für die Adsorptionskapazität und die Dissoziationskonstante wurden Adsorptionsisothermen vermessen. Diese wurden mit Subtilisin in Tris-Puffer aufgenommenen und sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Die beiden Isothermen sind für die beiden Herstellung-Chargen von Partikeln aufgenommen worden, wobei die eine Charge für die Schüttelkolbenversuche, die andere Charge für die Bioreaktorversuche verwendet wurde.

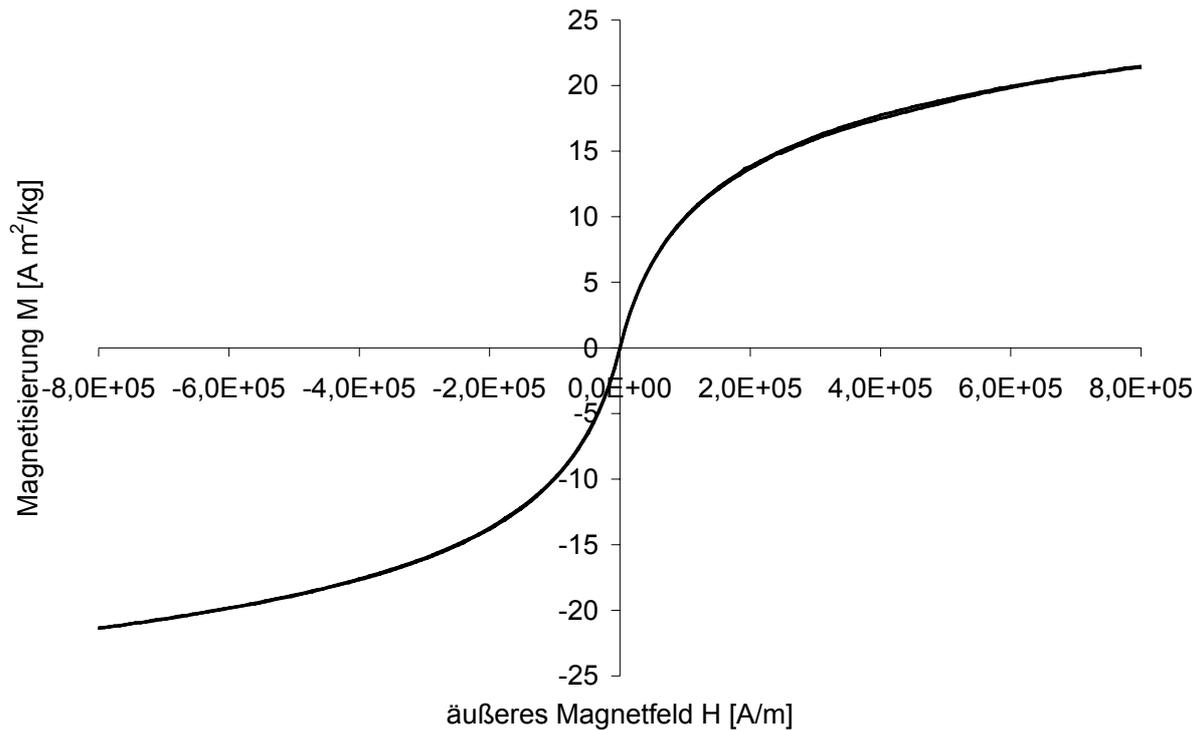


Abbildung 3.9: Magnetisierungskurve Bacitracin-funktionalisierter Magnetpartikel

Tabelle 3.4: Kenndaten der Bacitracin-Magnetpartikel

Eigenschaft	Wert
Sättigungsmagnetisierung	21 A m ² /kg
Remanenzmagnetisierung	0,025 A m ² /kg
Koerzitivfeld	135 A/m
Spezifische Oberfläche	44 m ² /g (aus BET-Analyse)
Partikelgröße	4,6 µm (nach 120 s Ultraschallbehandlung)
Sättigungsbeladung	0,298 g/g
Dissoziationskonstante K _d	3,2 · 10 ⁻⁷ mol/l
Sättigungsbeladung*	0,231
Dissoziationskonstante K _d *	8,3 · 10 ⁻⁷ mol/l

*Werte für einen zweiten Batch von Partikeln, die für die Schüttelkolbenversuche verwendet wurden

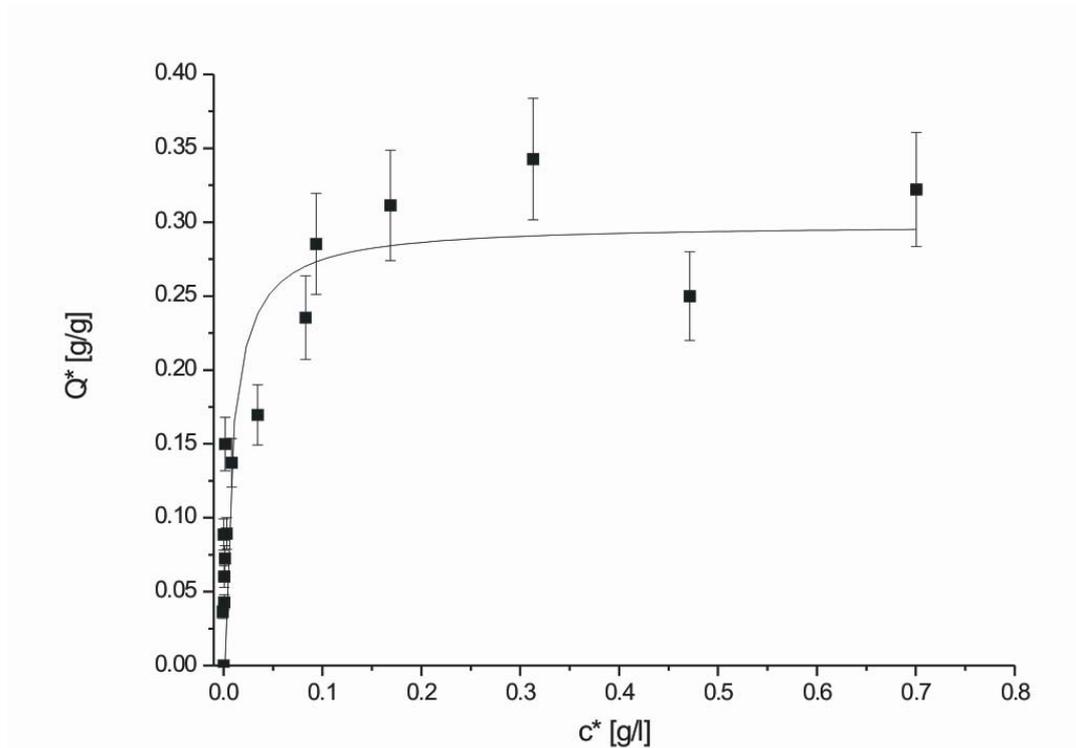


Abbildung 3.10: Adsorptionsisotherme der Bacitracin-funktionalisierten Magnetpartikel; aufgenommen bei pH 7,5 in 50 mM Tris-Puffer mit kommerziell erhältlichem Subtilisin von *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich, Hamburg)

Ionentauscher-Kompositpartikel mittels Sprühtrocknung

Die Ionentauscher-Kompositpartikel (IEX) wurden durch einen Projektpartner der Universität Clausthal-Zellerfeld hergestellt (Arbeitsgruppe Prof. Urs Peuker, Institut für Chemische Verfahrenstechnik). Für die Produktion dieser Partikel wurde zunächst Magnetit ähnlich dem oben genannten Verfahren (Abschnitt „Herstellung der Grundmagnetpartikel“) hergestellt. Die gefällten Magnetitpartikel werden aus der wässrigen Phase in eine Dichlormethanolösung (DCM) überführt, in welcher die Nanopartikel durch Ölsäure als Detergenz stabilisiert sind. Somit kann die Partikelgröße von unter 20 nm garantiert werden (Banert und Peuker 2006).

Weiterhin wurden nanoskalige Polymerpartikel hergestellt, die aus verschiedenen Materialien bestehen können. Diese Polymerpartikel wurden mit einer Ionentauscherfunktionalisierung versehen. Es wurden die Monomere Styrol für Kationentauscher und Vinylbenzylchlorid (VBC) für Anionentauscher verwendet. Divinylbenzol (DVB) wurde jeweils als Quervernetzer verwendet. Zunächst wurden Polymerpartikel durch Miniemulsions-Polymerisation hergestellt, wobei die Partikel durch SDS stabilisiert wurden und durch Hexadekan die Ostwaldreifung reduziert wurde. Die entstehenden

Nanopartikel hatten eine Größe von 100-200 nm (Kaeppeler et al. 2008). Eine detaillierte Beschreibung der Polymerisationsprozedur ist in der Literatur gegeben (Hickstein und Peuker 2008). Für die Funktionalisierung wurden die getrockneten Polystyrolpartikel (PS) mit Chlorsulfonsäure behandelt, um eine Sulfongruppe anzubinden. Die Poly-VBC-Partikel wurden in Toluolphase mit Trimethylamin zur Reaktion gebracht, wodurch ein quartäres Amin auf der Oberfläche gebunden wurde. Sowohl die PS- als auch die Poly-VBC-Ionenaustachernanopartikel sind unlöslich in DCM und konnten so in die DCM-Phase, die das Magnetit enthielt, überführt werden. Zur Synthese der Gesamtpartikel wurde ein Matrixpolymer (Polyvinylbutyral (PVB) oder Polymethylmethacrylat (PMMA) in DCM gelöst. Diese Lösung wurde mit der DCM-basierten Suspension, welche die Magnetit- und die Ionenaustacherteilchen enthielt, vermischt. Anschließend wurde diese Suspension durch Sprühtrocknungsverfahren vom Lösungsmittel DCM befreit und so die Gesamtpartikel produziert. Die Ölsäure wurde durch Waschung mit Petrolether entfernt. Die Gesamt-Kompositpartikel sind schematisch in Abbildung 3.11 dargestellt; weitere Daten können Tabelle 3.5 entnommen werden. Abbildung 3.12 zeigt REM-Aufnahmen der Partikel.

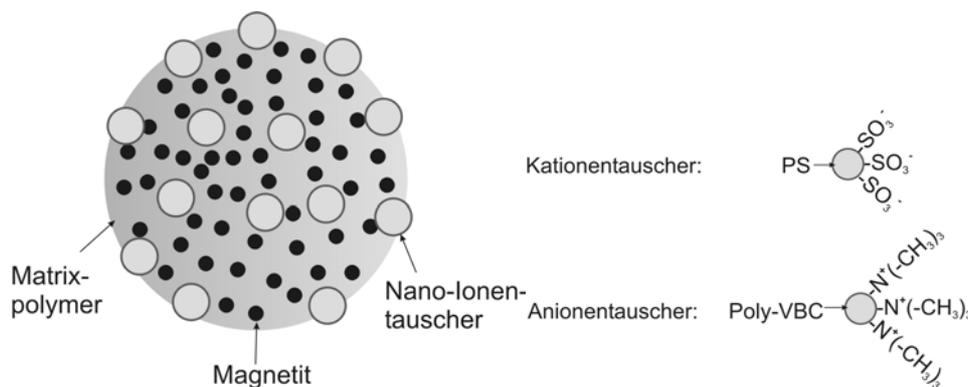


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Ionenaustacherkompositpartikel

Tabelle 3.5: Daten über die verwendeten Ionenaustacherkompositpartikel

Bezeichnung	Matrix-Polymer	Massenanteile [%]: Matrix, Magnetit, IEX	Partikel- durchmesser d_{mod} [μm]	IEX-Gruppe
PVB-am	PVB	50, 30, 20	2,1	Aminiertes VBC
PMMA-am	PMMA	50, 30, 20	1,8	Aminiertes VBC
PVB-s	PVB	40, 20, 40	2,1	Sulfoniertes PS

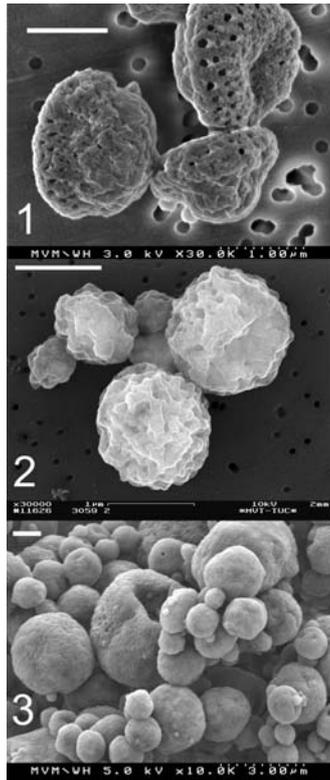


Abbildung 3.12: REM-Aufnahmen der verwendeten Ionentauscher-Magnetpartikel; (1) PMMA-am; (2) PVB-am; (3) PVB-s. Balken: 1 μm

Ionentauscherpartikel mit Acrylsäure

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Magnetpartikelproduktionsverfahren, welche relativ aufwendig sind und bei welchen noch hohes verfahrenstechnisches Optimierungspotential vorhanden ist, wurde ein Weg zur Funktionalisierung käuflicher Polyvinylalkohol (PVA)-Partikel etabliert, welche mit einer Kationentauschfunktionalisierung ausgestattet wurden, indem Acrylsäure an die Partikel gebunden wurde. Die Apparatur zur Partikelherstellung wurde im Institut aufgebaut und darin die Herstellung durchgeführt.

Zunächst wurden mPVA Partikel von Chemagen (Baesweiler, Deutschland) gründlich mit einer mehrstufigen Prozedur gewaschen. Folgende Lösungen werden dafür sukzessive verwendet: 100% Azeton; 50% Azeton/50% Methanol; 100% Methanol; 50% Methanol/50% Reinstwasser, 100% Reinstwasser. Die Magnetpartikel wurden dann mit einer durch Cer(IV) initiierten Reaktion auf der Oberfläche in einer verzweigten Polyacrylsäureform gebunden. Dieser Ansatz wurde durch Brown et al beschrieben (Brown et al. 2006). 150 mg Partikel wurden mit Wasser (O_2 -frei) gewaschen und dann mit 9 ml solchen Wassers suspendiert. 450 μl Cer-Ammoniumnitratlösung wurde hinzu gegeben und diese Mischung gevortext.

Anschließend wurden 450 µl Acrylsäure zugegeben und die Mischung drei Stunden heftig auf dem Vortex geschüttelt. Die Partikel wurden nach der Reaktion mit Natriumsulfidlösung (0,2 M) gewaschen und in reinem Wasser gelagert. Alle Schritte wurden mit stickstoffbegasteten Lösungen durchgeführt, bei denen der Sauerstoff ausgetrieben war.

Die so erzeugten Partikel konnten Lysozym mit einer maximalen Bindekapazität von 350 mg/g adsorbieren.

Es kann gesagt werden, dass weitere Funktionalisierungen an diese oder ähnliche Partikel von kommerziellen Anbietern möglich und mit geringem Aufwand machbar sind. Beispielsweise können NHS-aktivierte (N-Hydroxysuccinimid) Partikel erworben werden, an welche ein Anbringen eines Peptids (z.B. auch Bacitracin) möglich ist.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Kolorimetrische Analysemethoden

Gesamtproteinanalytik

Zur Gesamtproteinanalyse wurden vor allem kolorimetrische Tests mit käuflichen Kits verwendet. Die Zahl dieser Methoden hat sich in den letzten Jahrzehnten stark vermehrt, was in einem Anstieg an Empfindlichkeit und Genauigkeit resultierte. Ein Überblick über diese Methoden bietet Sapan et al (Sapan et al. 1999).

„Advanced Protein Assay“

Der „Advanced Protein Assay“ (APA) von Fluka (Büchs, Schweiz) ist ein kommerziell gehandelter Proteintest. Er kombiniert laut Hersteller die besten Eigenschaften der Methoden nach Bradford, Lowry und Fujita (Bradford 1976; Fujita et al. 1995; Lowry et al. 1951). Die Abweichungen zwischen unterschiedlichen Proteinen sind gering und die Nachweisgrenze liegt bei kleinen Konzentrationen. Für die genaue Durchführung sei auf eine am Institut durchgeführte Diplomarbeit verwiesen (Kaepler 2004).

Proteinanalytik nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf zwei Reaktionen. Zunächst wird ein Komplex zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung gebildet (Biuret-Reaktion), wobei sich eine purpur-violette Farbe bildet. Anschließend

reduziert dieser Komplex das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz. Bei 750 nm wurde der reduzierte Komplex photometrisch vermessen.

Es wurde ein kommerzielles Test-Kit von Sigmaaldrich nach der Modifikation nach Peterson verwendet (Peterson 1977).

Die Vorgehensweise für den Lowrytest ist dem Anhang (Kapitel 10.2.1) zu entnehmen.

Proteinanalytik mit dem „Protein Assay ESL“

Ein weiteres genutztes, kommerziell erhältliches Analyseverfahren war der „Protein Assay ESL“ von Roche (Basel, Schweiz). Dieser basiert auf dem Nachweis von überschüssigem Cu^{2+} , welches nicht mit Protein komplexiert wird (Biuret-Komplex). Dieses Cu^{2+} kann nach Reduktion zu Cu^+ durch Ascorbinsäure mit Bathocuproin einen photometrisch nachweisbaren Komplex bilden. Es handelt sich bei diesem Test um einen umgekehrten Biuret-Test (Matsushita et al. 1993).

Die genaue Durchführung ist in einer am Institut durchgeführten Arbeit beschrieben (Kaepler 2004).

Enzymaktivitätsbestimmungen

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden ebenfalls kolorimetrische Analysemethoden verwendet, wobei jeweils eine Reaktion des Enzyms für eine bestimmte Zeit mit einer Analysesubstanz durchgeführt wurde, deren Produkt photometrisch nachweisbar war.

Im Großteil dieser Arbeit werden die Enzyme in den Diagrammen in Konzentrationen angegeben. Durch die Kalibrierung mit reinem Enzym ist es möglich, die Aktivität in eine Konzentration umzurechnen. Allerdings wird durch die Analytik nur das aktive Enzym vermessen, die Konzentrationsangaben beziehen sich somit bei den Enzymen auf die Menge an aktivem Enzym.

Proteaseaktivität mittels Dimethylcasein

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde eine Methode der Firma Novozymes verwendet. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, bei dem die zu untersuchende Lösung bei 50°C mit NN-Dimethylcasein reagieren kann, bzw. dieses zersetzen kann. Die dabei entstehenden Bruchstücke niedermolekularer Peptide und freier Aminogruppen reagieren mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure zu einem gelbfarbenen

Komplex. Für die Kalibrierkurve wurde Savinase® 6.0T von Novozymes erstellt, das eine bekannte Aktivität von 6 kNPU/g hatte.

Details über die Durchführung können einer am Institut erstellten Diplomarbeit entnommen werden (Kaeppeler 2004).

Proteaseaktivität mittels Azocasein

Azocasein ist ein chromophores Protein-Derivat, welches durch Kuppeln von Diazo-Arylaminen an Casein entsteht. Bei einer Vermischung mit Proteasen werden Chromophor-tragende Reste abgespalten. Durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) und anschließender Zentrifugation bleiben lediglich die rotfarbigen gelösten Reste übrig, welche nach NaOH-Zugabe orange werden (Charney und Tomarelli 1947). Die Kalibrierung wurde mit Subtilisin von *Bacillus licheniformis* durchgeführt (Sigma-Aldrich). Durchführung: Siehe Anhang (Kapitel 10.2.2).

Bestimmung der Alpha-Amylaseaktivität

Zur Bestimmung der α -Amylaseaktivität wurde eine Prozedur von Novozymes übernommen, bei welcher eine modifizierte, unlösliche Stärke (Phadebas, Magle Life Sciences, Lund, Schweden) mit der zu untersuchenden Lösung vermischt wird. In der enzymatischen Spaltreaktion werden blaue Reste, die kovalent an die Stärke gebunden ist, vom unlöslichen Rest abgespalten und somit löslich. Nach Abtrennung des Feststoffs kann die Blaufärbung detektiert werden. Zur Kalibrierung wurde Alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* verwendet (Sigma-Aldrich). Details zur Prozedur: siehe Anhang (Kapitel 10.2.3).

Lysozymaktivitätsbestimmung

Für die Lysozymaktivität wurde ein Verfahren verwendet, bei dem die Abnahme der optischen Dichte einer Suspension von *Micrococcus lysodeicticus* über der Zeit bestimmt wurde (Ruckenstein und Zeng 1997). Kalibriert wurde mit Lysozym von Roth (Karlsruhe, Deutschland). Details zur Lysozymaktivitätsbestimmung können dem Anhang entnommen werden (Kapitel 10.2.4)

Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Biomassekonzentration wurde über Trockenmassebestimmungen durchgeführt, bei welchen der gewaschene Bodensatz (nach Zentrifugation) einer 20 ml Probe

nach Trocknung gewogen wurde. Eine Korrelation zur optischen Dichte bei 550 nm ermöglichte die ständige, einfache Messung der Biomassenkonzentration.

Glucosekonzentrationsbestimmung

Die Glucose-Konzentrationen der Kultivierungsproben wurden mit einem enzymatischen Testkit „Glucose liquicolor®“ (GOD-PAP Methode ohne Enteiweißung) der Firma Human (Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Hierbei wird Glucose durch Glucoseoxidase zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Wasserstoffperoxid reagiert mit 4-Aminophenazon und Phenol unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase zu Chinonimin weiter, welches photometrisch vermessen wird (Trinder 1969). Reine Glucose von Roth (Karlsruhe, Deutschland) wurde für die Kalibrierung verwendet.

Details über die Durchführung können der vom Kit-Hersteller mitgelieferten Anleitung entnommen werden.

Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Ammonium befindet sich in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit gelöstem Ammoniak. Durch pH-Verschiebung ins stark alkalische, ist der Stickstoff des Ammoniums hauptsächlich in der Form von Ammoniak vorhanden, welches mit Hypochloritionen zu Monochloramin reagiert. Monochloramin reagiert dann mit substituiertem Phenol zu einem blauen Indophenol-Derivat weiter, welches photometrisch nachgewiesen wird. Diese Methode ist Grundlage des NH_4^+ -Tests „Spectroquant“ von Merck (Darmstadt, Deutschland), welcher in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Kalibrierung wurde mit reinem Ammoniumsulfat von Roth (Karlsruhe, Deutschland) erarbeitet.

Die genaue Durchführung kann der vom Kit-Hersteller mitgelieferten Anleitung entnommen werden.

3.3.2 Sonstige Analytikmethoden

HPLC-Analytik

Bei dieser Arbeit wurde das SEC-Prinzip (Größenausschlusschromatographie) angewendet. Hier findet die flüssigchromatographische Trennung polymerer Vielstoffgemische durch Größenausschluss an makroporösen Gelen statt: Die Moleküle werden entsprechend ihres hydrodynamischen Volumens eluiert. Diese Methode wurde angewendet, um Proteinmischungen (wie Mischungen aus BSA und

Lysozym) zu quantifizieren. Hierzu wurde eine Säule mit TSK-Gel 4000 SW von Tosoh Bioscience (Montgomeryville, USA) verwendet. Der pH lag zwischen 7,2 – 7,5, der Eluent bestand aus KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 bei pH 7. Zur Kalibrierung wurde reines BSA, reines Lysozym und Mischungen von beiden verwendet. Die Detektorwellenlänge war bei 220 bzw. 275 nm. Die Nachweisgrenze für BSA lag bei 0,25 mg/l. Für die Fraktionierungsuntersuchungen war diese geringe Konzentration wichtig, da das BSA für hohe Selektivitäten in sehr geringer Filtratkonzentration vorliegt. Bei Proben, bei denen kein BSA nachweisbar war, wurde für die Selektivitätsberechnung die Nachweisbarkeitsgrenze von 0,25 mg/l angenommen.

SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteingemischen wurde auch mit SDS-PAGE durchgeführt (Laemmli 1970). Hierbei wurde ein Apparat von Bio-Rad (Hercules, USA) verwendet. Details zur Durchführung sind im Anhang dargelegt (Kapitel 10.2.5).

Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopaufnahmen wurden am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik durchgeführt. Dazu wurde der FE-SEM-Apparat „4500/I“ der Firma Hitachi (Tokio, Japan) verwendet. Die Proben wurden mit Platin bzw. Palladium durch Kathodenzerstäubung gesputtert. Partikelproben wurden vor der Präparation mit Ultraschall dispergiert, so sie dafür ausreichende Stabilität besaßen.

Magnetisierungskurven

Die Partikelmagnetisierung wurde am FZK bei der Arbeitsgruppe von PD Dr. Matthias Franzreb Institut für Technische Chemie mit dem Gerät „Micromag 2900“ der Firma PMC (Princeton, USA) in Abhängigkeit der angelegten Feldstärke vermessen (siehe auch Kapitel 3.2.1).

3.4 Durchführung der Kultivierungen

3.4.1 Verwendeter Organismus

Bacillus licheniformis

Bacillus licheniformis ist eine Spezies aus der Gattung *Bacillus* und eng verwandt mit *Bacillus subtilis*. *B. licheniformis* ist gram-positiv, bildet Endosporen und hat eine hohe Proteinsekretionskapazität. Er wird daher in industriellen Prozessen, z.B. zur Produktion von Amylasen, eingesetzt (Deboer et al. 1994). 89 extrazelluläre Proteine wurden für *B. licheniformis* DSM 13 nachgewiesen, welche hauptsächlich für den Mureinabbau, die Mobilität, den Transport niedermolekularer Moleküle und für die Erschließung alternativer Substrate verwendet werden (Voigt et al. 2006).

In dieser Arbeit wurde der Stamm *B. licheniformis* DSM 1969 eingesetzt, der von der DSMZ (Braunschweig, Deutschland) bezogen wurde. Dieser Stamm produziert extrazelluläre Proteasen und Amylasen (Takac et al. 2000).

3.4.2 Schüttelkolbenkultivierungen

In Schüttelkolben wurden zum einen Vorversuche zur Medienoptimierung durchgeführt, aber auch Versuche im kleinen Maßstab. Dazu wurde von einer Agar-Platte eine Kolonie (teilweise auch die Hälfte der Kolonien einer Platte) des Bakteriums in ein steriles Falcon-Röhrchen mit 4-8 ml Medium überführt. Diese Vorkultur wurde nach 24 h Inkubation in einen Schüttelkolben überführt, der mit 200 ml Medium befüllt war. Die Schüttelkolbenversuche wurden dann mit der im Kolben wachsenden Biosuspension durchgeführt. Schüttelkolben dienten auch als Inokulum für Versuche im Bioreaktor. Der anfängliche pH-Wert im Schüttelkolben betrug durch den Phosphatpuffer 6,5.

3.4.3 Kultivierungen im Bioreaktor

Aufbau des Bioreaktors

Der Aufbau des Bioreaktors ist schematisch in Abbildung 3.13 zu erkennen. Es wurde ein Reaktor der Firma Bioengineering (Wald, Schweiz) verwendet, der ein Gesamtvolumen von 3,7 l hatte. Das Arbeitsvolumen betrug maximal 2,3 l. Es wurden zwei Scheibenrührer verwendet. Die Prozesskontrolle wurde mit dem am Institut für Bio- und Lebensmittel entwickelten Labview-Programm BioProCon durchgeführt. Die pH-Elektrode war von Bioengineering (Wald, Schweiz), die pO₂-

Elektrode von Mettler-Toledo (Gießen, Deutschland). Der Sauerstoffanteil in der Gasphase wurde über paramagnetische Messung, der CO_2 -Anteil über einen nicht-dispersiven Infrarot-Photometer, jeweils von Maihak (Reute, Deutschland) bestimmt.

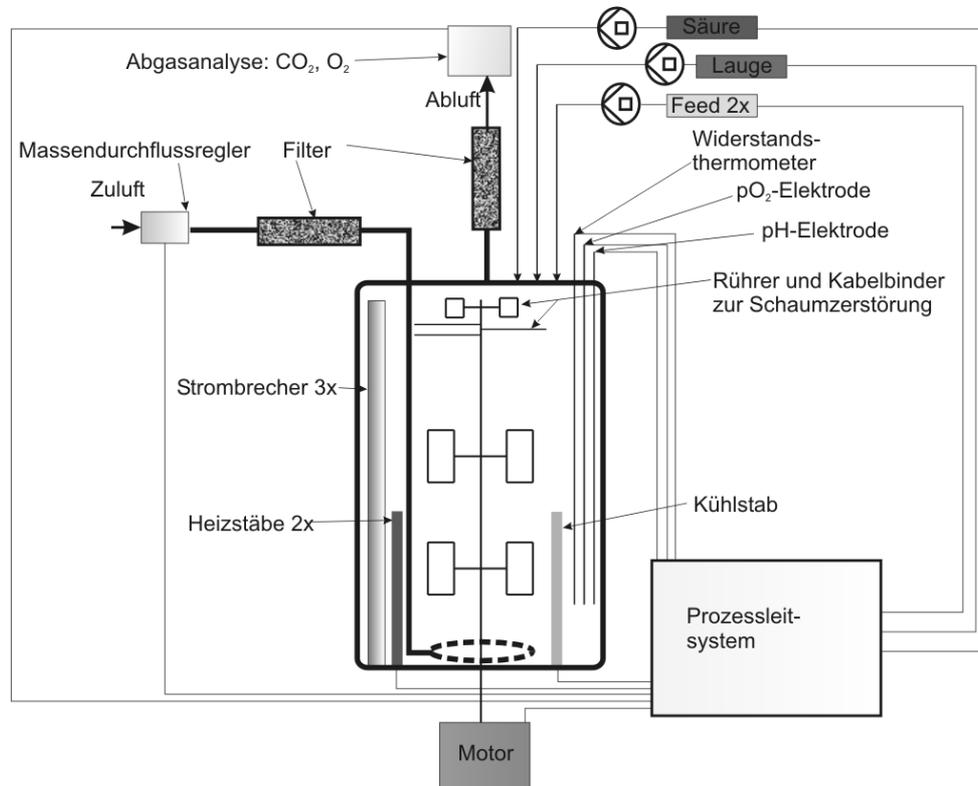


Abbildung 3.13: Bioreaktor mit Einbauten, Messeinrichtungen und peripheren Einrichtungen

Es wurden sowohl Batchversuche, meist jedoch Fed-Batch-Experimente durchgeführt. Dabei wurde sowohl Glukose als auch Ammoniumsulfat als limitierendes Substrat gewählt. Um möglichst geringe Volumensteigerungen bzw. Verdünnungsraten zu gewährleisten, wurden die Fed-Batch-Medien hoch konzentriert mit bis zu 600 g/l Glukose bzw. 300 g/l Ammoniumsulfat verwendet.

Bioreaktorversuch

Nach Sterilisation des Reaktors durch Autoklavieren wurde dieser für die Kultivierung vorbereitet, indem die gewünschten Wachstumsbedingungen eingestellt wurden. Dies waren jeweils 37°C und pH 7,5. Die Kultivierung wurde durch Animpfen eines 200 ml Inokulums gestartet. Danach wurden Proben gezogen, am Tag bzw. bei Anwesenheit etwa jede Stunde eine. Diese konnten auf Biomasse-, Protein-, Protease-, Glucose- und Ammoniumkonzentration untersucht werden. Die Analyse wurde mit Ausnahme der Biomassenkonzentration (über OD) erst nach den

Versuchen durchgeführt, weshalb ein sofortiges auf Eis stellen und Einfrieren nach der Zentrifugation nötig war.

Die Zuluft wurde auf 1-2 vvm gestellt und die Rührerdrehzahl zwischen 400 und 1000 RPM geregelt.

3.5 Elektrofiltrationsuntersuchungen

3.5.1 Aufbau der Elektrofiltrationsanlage

Für die Untersuchungen zur Elektrofiltration wurde eine am Institut vorhandene Laborapparatur, welche aus einer Vorgängerarbeit vorhanden war, verwendet (Hofmann 2005). Sie wurde mit einer Kühlung ausgestattet, um die Temperatur während der Versuche konstant auf 15°C zu halten. Das Herz der Anlage war die Filterkammer. Diese ist schematisch in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Proteinlösung oder Biosuspension wurde unter Überdruck (0,7-4 bar) in die Kammer eingeleitet. Diese war auf beiden Seiten mit Membranen begrenzt. Diese beiden Membranen wurden in Proteinfractionierungsversuchen unterschiedlich gewählt, um die im System durch das E-Feld vorhandene Anisotropie auszunutzen. Hinter der Membran lag die Spülkammer, welche die Elektrolysegase entfernt, den Aufbau eines pH-Gradienten verhindert und zur Temperierung der Kammer genutzt wird.

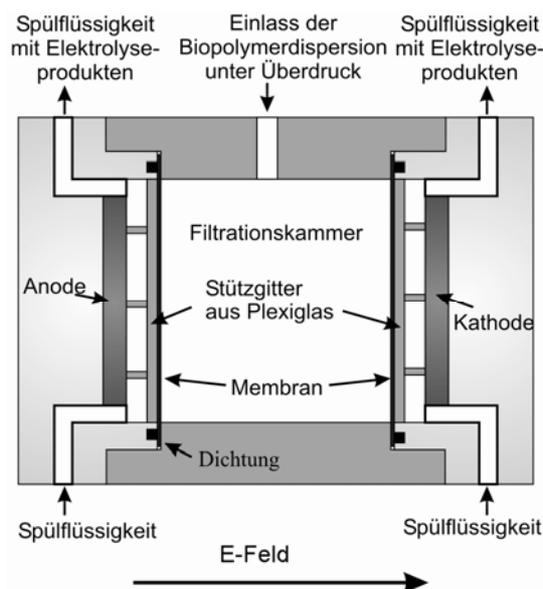


Abbildung 3.14: Aufbau der Filterkammer in der Elektrofiltrationsapparatur (Hofmann und Posten 2003)

Die beiden Spülkreisläufe für Anoden- und Kathodenspülung wurden zusammengeführt, um den pH zu neutralisieren. Dadurch konnte der pH während der Versuche konstant gehalten werden. Er änderte sich während der Versuche nur unwesentlich (wenige Zehntel pH). Die Anbindung der Filterkammer in die Gesamtanlage ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

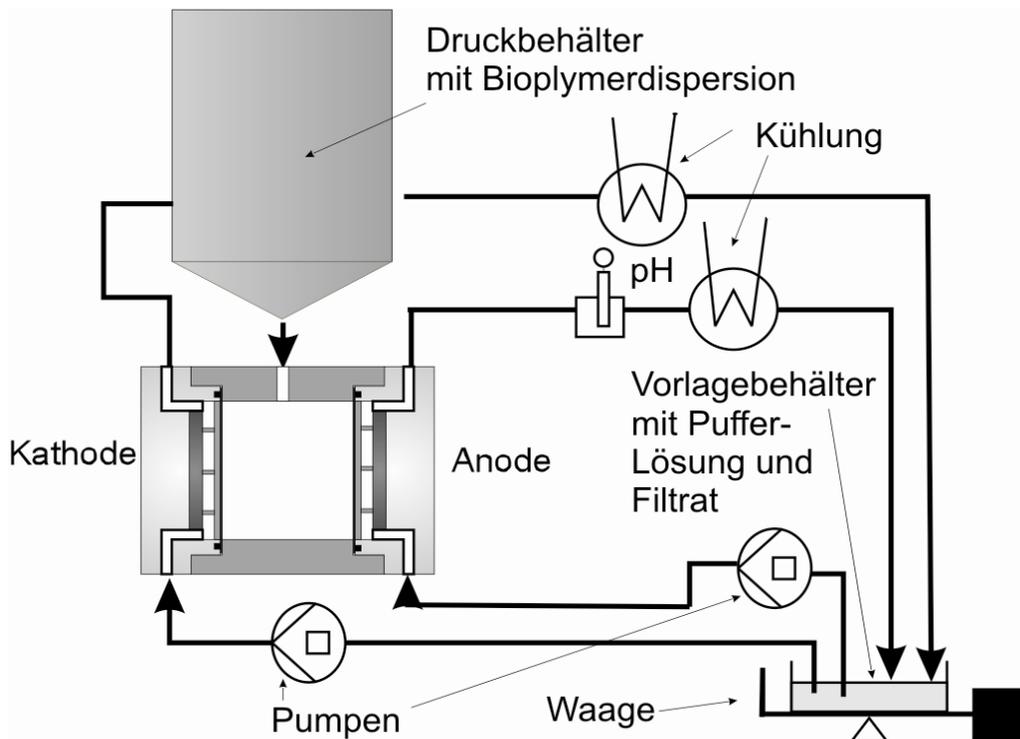


Abbildung 3.15: Elektrofiltrationsanlage (Hofmann et al. 2006)

In der Anlage wurden alle Filtrationsversuche als statische Filtration, also Dead-End-Filtration, durchgeführt. Zum Scale-up wird die Filterpressentechnologie verwendet, an welche die Elektrofiltrationskonstruktion angelehnt ist. Es wurden auch Versuche in einer Filterpresse (Pilotappatur) durchgeführt, jedoch lediglich mit einer Kammer. Tabelle 3.6 zeigt die Daten der beiden verwendeten Apparaturen.

Das elektrische Feld in der Elektrofiltrationsanlage, das sich innerhalb der Kammer ergibt, lässt sich aus folgender Gleichung bestimmen:

$$E_{\text{eff}} = \frac{I}{\kappa A} \quad 3.2$$

Dieses Feld ist kleiner als das an den Elektroden angelegte gesamte E-Feld, da Spannung an Membranen, Elektroden und in der Spülkammer nicht gleichmäßig abfällt.

Tabelle 3.6: Daten bezüglich der verwendeten Elektrofiltrationsapparaturen

	Laborapparatur	Pilotapparatur
Kammervolumen	10,2 ml	338 ml
Fläche pro Membran	10,2 cm ²	225 cm ²
Abstand Membranen	10 mm	15 mm
Abstand Elektroden	20 mm	21 mm
Elektrodenmaterial Anode	IrO ₂ -beschichtetes Titan	IrO ₂ -beschichtetes Titan
Elektrodenmaterial Kathode	V4A-Stahl	V4A-Stahl

Der Strom, der während einer Filtration fließt, variiert leicht. Daher wird in den Diagrammen die äußere angelegte Spannung genannt, welche aus folgender Gleichung ermittelt wird:

$$E_{\text{angelegt}} = \frac{U_{\text{angelegt}}}{a_{\text{Elektroden}}} \quad 3.3$$

3.5.2 Durchführung der Elektrofiltrationsversuche

Zur Durchführung der Elektrofiltrationsversuche mit Modellproteinen wurden diese in Pufferlösungen aus äquimolarem KH₂PO₄ und K₂HPO₄ gelöst. Die Spülflüssigkeit wurde ebenfalls mit diesen Puffersubstanzen angesetzt und so eingestellt, dass die Leitfähigkeit der Ausgangslösung und der Spülflüssigkeit gleich groß waren. Der erwähnte Phosphatpuffer war der verwendete Puffer für Filtrationen bei pH 6-8. Die Fraktionierungen wurden bei pH=7 durchgeführt.

Die Filterkammer wurde vor dem Versuch mit Ausgangslösung vorgefüllt. Anschließend wurde die Spülflüssigkeit vorgelegt (Laboreinheit 250-300 ml; Pilotanlage 1-2 l). Die Spülflüssigkeit wurde im Kreislauf geführt. Als Messdaten wurden die Filtratmasse, der Stromfluss, die angelegte Spannung über der Zeit ermittelt. Die Messdatenerfassung wurde angeschaltet und dann die Spannung angelegt; sofort danach wurde das System mit dem über ein Manometer exakt eingestellten Differenzdruck durch Öffnen eines Ventils beaufschlagt. Nun fand die Filtration statt. Während der Filtration wurden Proben aus dem Sammelbehälter mit einer Spritze gezogen, um den Verlauf der Proteintransmission zu determinieren. Am Ende der Filtration wurden Proben aus dem Filterkammerinhalt gezogen, um den Vorgang der Aufkonzentrierung messtechnisch zu verfolgen. Hierbei war zu

beachten, dass durch Konzentrationspolarisation ein Konzentrationsgradient in der Kammer vorhanden war. Vor der Probenahme muss der Kammerinhalt gut vermischt werden. Dazu wurde der Inhalt und die Membranen in eine exakt abgemessene Pufferlösung überführt und dort vermischt. Die Proben wurden jeweils sofort auf Eis gestellt.

Für die Filtrationen mit Biomasse wurde der Behälter mit der Ausgangssuspension teilweise in ein Eisbad gestellt, um die Eigenschaften der Suspension konstant zu halten. Für die Proteinlösungen, die in der Laborapparatur filtriert wurden, war dies nicht nötig.

3.5.3 Auswertung der Elektrofiltrationsversuche

Zur Auswertung der Ergebnisse musste zunächst eine Korrektur der Filtratmenge vorgenommen werden. Durch die Kühlschlange, die in den Sammelbehälter von oben eingeführt war, kam es zu einer Verdrängung dieser Lösung. Bei neu ankommendem Filtrat wurde auch das Differenzvolumen verdrängt, wodurch das Waagensignal erhöht wurde. Deshalb mussten 8 % der Filtratmenge (bei den gegebenen Geometrien von Kühlschlange und zylindrischem Filtratsammelbehälter) abgezogen werden. Die Versuche wurden so durchgeführt, dass die Kühlschlange von Anfang bis Ende teilweise in die Flüssigkeit eingetaucht war, also nie vollständig oder gar nicht.

Die Entnahme der Proben verfälschte das Ergebnis der folgenden Proben, was einen nicht zu vernachlässigenden Fehler verursacht. Daher wurden die Konzentrationen des Filtrats anhand der Probenkonzentration und deren Volumina folgendermaßen korrigiert. Für die erste Probe gilt:

$$c_{\text{Filtrat},1} = \frac{c_{\text{Probe},1} \cdot (V_{\text{Filtrat},1} + V_{\text{Spüflüssigkeit}})}{V_{\text{Filtrat},1}} \quad 3.4$$

Für die folgenden Proben müssen dann die bereits gezogenen Proben folgendermaßen berücksichtigt werden:

$$c_{\text{Filtrat},n} = \frac{c_{\text{Probe},n} \cdot (V_{\text{Filtrat},n} + V_{\text{Spüflüssigkeit}}) + \sum_{j=1}^{n-1} c_{\text{Probe},j} \cdot V_{\text{Probe},j}}{V_{\text{Filtrat},n} + \sum_{j=1}^{n-1} V_{\text{Probe},j}} \quad 3.5$$

Für die Transmission, die bei einem Experiment beobachtet wird, wird Gleichung 2.47 verwendet. Hierbei wird angegeben, welcher Anteil des Proteins von der

Bulklösung insgesamt im Filtrat angekommen ist. Die Selektivität wird dann nach Gleichung 2.53 bestimmt.

Zur Evaluation der Fraktionierungsleistung wurde ein Fraktionierungskoeffizient eingeführt. Dieser berücksichtigt sowohl die Ausbeute und Selektivität als auch die Kinetik. Der Fraktionierungskoeffizient ist folgendermaßen definiert:

$$\Phi_i = \tau_i \cdot \Psi_i \cdot \bar{J} \quad 3.6$$

Er kann bei der vergleichenden Analyse verschiedener Verfahren ein erstes Indiz für die Güte des Trennprozesses geben. Für den gemittelten Filtratfluss gilt:

$$\bar{J} = \frac{V_{\text{Filtrat,gesamt}}}{A \cdot t_{\text{gesamt}}} \quad 3.7$$

3.6 *In-situ*-Magnetseparations- (ISMS) Untersuchungen

Die ISMS ist ein Konzept, das die adsorptive Magnet-Bioseparation als ISPR-Methode an den Bioprozess anbringt. Dazu wurde ein Konzept entwickelt, bei welchem eine direkte, externe ISPR Methode verwendet wurde (Siehe Kapitel 2.5.1). Die prinzipielle Anordnung der ISMS wird in Abbildung 3.16 gezeigt.

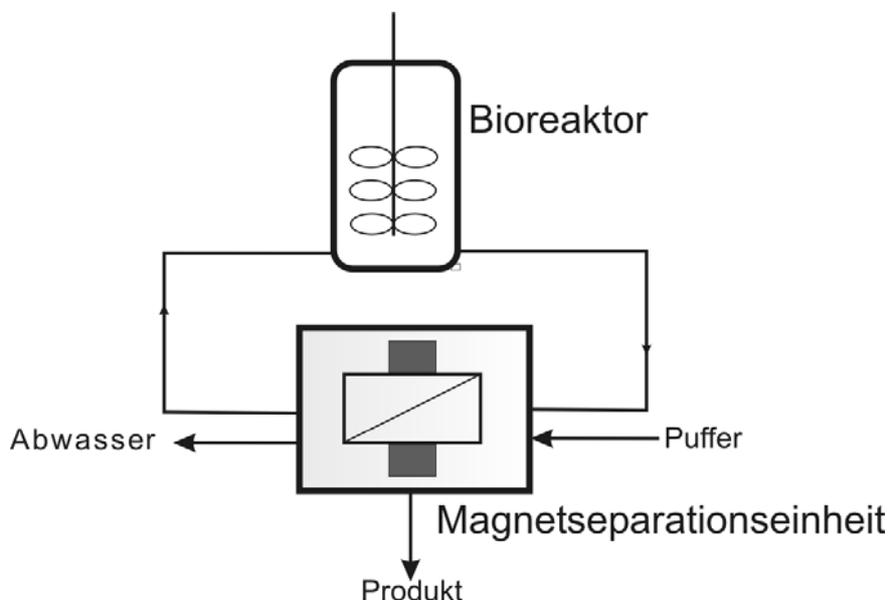


Abbildung 3.16: Grundidee der ISMS: Produkt wird auf magnetischen Partikeln adsorbiert und extern von der Biosuspension separiert; Anschließend werden die Partikel gewaschen und vom Produkt eluiert

3.6.1 ISMS-Anlage

Aufbau der ISMS-Anlage

Die für die ISMS taugliche Anlage musste zunächst eine Verbindung zwischen Bioreaktor und Magnetseparationseinheit schaffen, mit welcher eine monoseptische Kultivierung auch nach einem Magnetseparationsschritt gewährleistet werden kann. Dazu wurde die Magnetseparationseinheit (Kapitel 3.1.4) mittels Ventilsystemen an den Bioreaktor angeschlossen. An die Ventilsysteme wurden neben dem Reaktor noch die Wasch- und Elutionslösungen, bzw. Produkt- und Abwassersammelbehälter angeschlossen. Die Biosuspension konnte so von den Magnetpartikeln befreit werden und die Partikel auch innerhalb der Separationseinheit gewaschen und das Produkt eluiert werden. Zwischen den Wasch- und Elutionsschritten ist jeweils ein Magnetseparations-FFT-Schritt zum Austausch der Flüssigkeiten vorgesehen. Hierzu konnte die vorhandene HGMS-Einheit verwendet werden. Abbildung 3.17 zeigt den Aufbau der Gesamtanlage, Abbildung 3.18 ein Foto des Aufbaus. Neben Wasch- und Elutionslösungen mussten auch Ethanol, steriles Wasser und Luft ins System eingebracht werden, vor allem für die Keimreduktion.

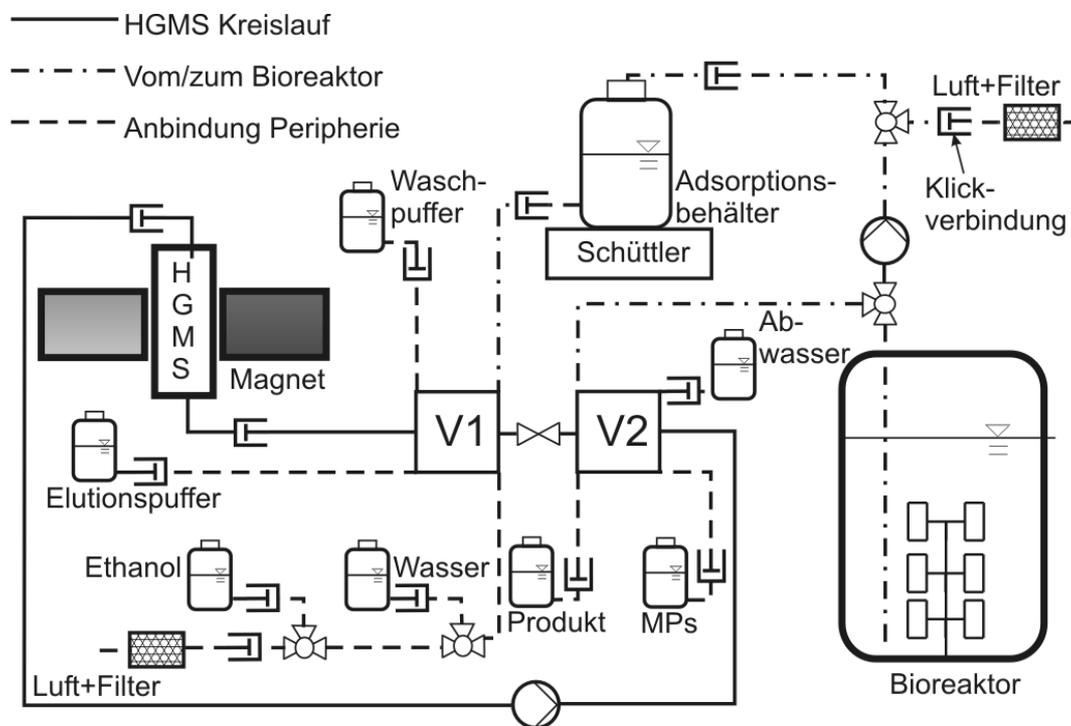


Abbildung 3.17: ISMS-Gesamtanlage: Kreislauf mit zwei Ventilsystemen, die Bioreaktor und HGMS-Einheit verbinden. Wasch- und Elutionsschritte können im HGMS-Kreislauf durchgeführt werden

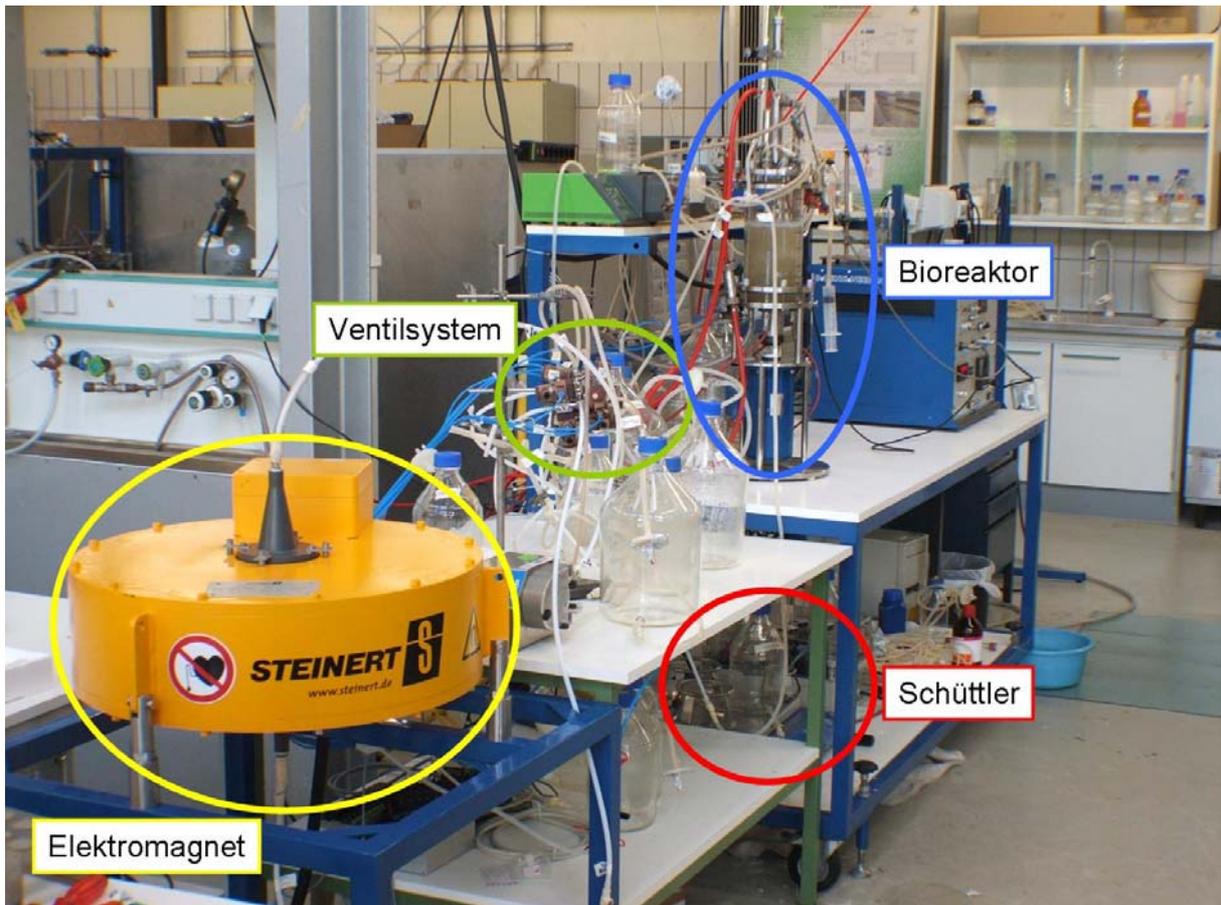


Abbildung 3.18: Foto der Gesamtanlage: I: Elektromagnet mit HGMS-Zelle; II: Ventilsystem und Flaschen; III: Bioreaktor.

Sterilisation der ISMS-Anlage

Um eine kontaminationsfreie Versuchsdurchführung zu gewährleisten, wurden Teile der Anlage autoklaviert, beispielsweise für alle Flaschen, für die Schläuche und auch für das Ventilsystem war dies möglich. Die HGMS-Zelle wurde jedoch nicht dampfautoklaviert. Diese und die übrigen nicht autoklavierten Teile der Anlage wurden mit Ethanol durchspült. Anschließend wurden diese Teile mit sterilem Wasser gespült und dieses am Ende aus der Anlage gepumpt und durch Luft (sterilfiltriert) ersetzt. Zur Anbindung der verschiedenen Teile (autoklaviert – Ethanol-behandelt) wurden Klickverbindungen verwendet, welche in Ethanol getaucht und anschließend zusammengesteckt wurden. Somit konnten sämtliche Versuche ohne Kontamination durchgeführt werden.

3.6.2 Durchführung der ISMS-Versuche

Die ISMS-Versuche im Schüttelkolbenmaßstab konnten durchgeführt werden, ohne eine ausgeklügelte Magnetseparationsapparatur zu verwenden. Die Magnetpartikel, welche für 20 min mit der Biosuspension gemischt wurden, konnten mit einem Permanentmagneten abgetrennt werden. Die Vermengung von Magnetpartikeln und Biosuspension wurde in einem sterilen Kolben durchgeführt, welcher nur für die Magnetseparation, nicht für die gesamte Bioreaktion genutzt wurde. Dies war nötig, um die Biosuspension nach der ISMS-Prozedur wieder frei von Magnetpartikeln zu bekommen. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

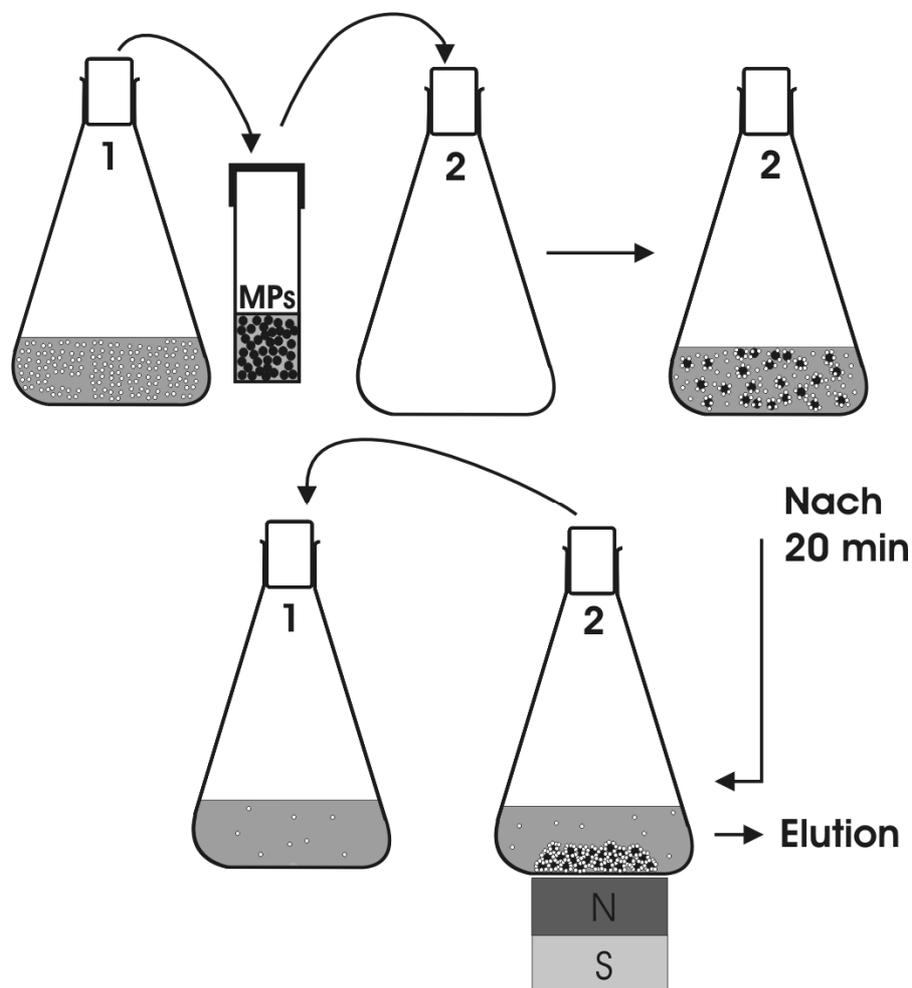


Abbildung 3.19: Durchführung der ISMS-Versuche im Schüttelkolbenmaßstab

Schüttelkolbenversuche sind zwar gut für erste Erkenntnisse, allerdings ist die Präzision und Reproduzierbarkeit stark eingeschränkt, da pH oder pO_2 nicht kontrolliert werden oder auch ein Fed-Batch nicht möglich und der Sauerstoff-

übergang nicht optimal ist. Daher sollten Versuche in der oben beschriebenen ISMS-Anlage (Abbildung 3.17) durchgeführt werden

Für die Versuche im Bioreaktormaßstab wurde während der Kultivierung die ISMS-Apparatur wie oben beschrieben an den Reaktor angeschlossen. Es wurden jeweils ein, maximal zwei ISMS-Schritte während einer Kultivierung durchgeführt. Vor Beginn des ISMS-Schritts wurde eine Probe vom Bioreaktor gezogen. Anschließend wurde der Reaktorinhalt (2,25 l bei BR 8, sonst 1,2-1,3 l) mit 4 g Magnetpartikeln, welche vorher mit Ethanol behandelt und gewaschen worden waren, zusammen in eine Adsorptionsflasche gegeben. Diese wurde für ca. 20 min geschüttelt. Danach wurde die gesamte Suspension durch die Magnetseparationseinheit geleitet, wobei der Magnet angeschaltet war und die Magnetpartikel abgetrennt werden konnten. Die Biosuspension wurde in den Reaktor zurückgepumpt. Um eine ausreichende Pumpleistung zu gewährleisten, wurde direkt mit Waschlösung verdrängt, da mit Luft das Rückpumpen nicht möglich war. Durch diese Verdrängung war eine gewisse Rückvermischung nicht zu vermeiden, welche jedoch sehr gering war. Der Reaktor wurde nach dem ISMS-Schritt mit dem Volumen befüllt, welches auch bei der Adsorption an Biosuspension vorhanden war.

Die in der HGMS zurückgehaltenen Magnetpartikel konnten nun in dieser gewaschen werden (Kreislauf über das Ventil zwischen V1 und V2 in Abbildung 3.17, ohne Magnetfeld) anschließend wurden sie wieder aus der Flüssigkeit abgetrennt (Kreislauf über das Ventil zwischen V1 und V2 in Abbildung 3.17, mit Magnetfeld) und die Flüssigkeit durch Elutionspuffer ersetzt.

Die Zusammensetzung von Wasch- und Elutionspuffer ist Tabelle 3.7 zu entnehmen. Die Elution ermöglicht die Rückgewinnung des aktiven Produktes. Nach Abtrennung des Produkts wurden die Partikel aus dem System gespült. Hierzu war es nötig, die HGMS-Zelle mit Wasser bis zur Hälfte und den Rest mit Luft zu befüllen. Heftiges Schütteln der Zelle ermöglichte dann die Austragung der Partikel. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis keine Partikel mehr gewonnen werden konnten.

Alternativ zu dem Verfahren mit Waschung und Elution innerhalb des ISMS-Systems, wurde teilweise auch extern gewaschen und eluiert. Dazu wurden die nach der Adsorption mit der HGMS abgetrennten Partikel direkt ausgetragen und außerhalb des Systems in Kolben mit Hilfe von Permanentmagneten gewaschen und eluiert. Diese Prozedur wurde auch durchgeführt, wenn bei den Versuchen die MEC-Apparatur verwendet wurde.

Tabelle 3.7: Wasch- und Elutionspufferzusammensetzung

Waschpuffer	Elutionspuffer
0,1 M Tris 0,02 M CaCl ₂ pH=7,5 mit 4 M NaOH	0,005 M Succinat (Di-Natrium-Salz) 0,05 M Natriumtetraborat 0,001 M CaCl ₂ pH=6 mit 3 M HCl
	50 % (v/v) des obigen Succinatpuffers mit 50 % (v/v) Propandiol

Die Biosuspension, welche nach der Adsorption wieder in den Reaktor geführt wurde, wurde dort weiter kultiviert. Nach der Rückführung wurde eine Probe gezogen.

3.6.3 Auswertung der ISMS-Versuche

Zur Analyse der ISMS-Versuche wurden vor allem die Konzentrationen der am Ende vorliegenden Lösungen (Biosuspension, Wasch- und Elutionslösung) vermessen. Eine genaue Kenntnis des Volumens war nötig, um die gesamte Massenbilanz aufzustellen. Weiterhin wurde die Magnetpartikelbilanz durch Trockenmassebestimmungen ermittelt. Diese Schritte wurden durchgeführt, da es wichtig ist zu erkennen, ob die Partikel vollständig aus der Biosuspension abgetrennt werden können und weiterhin, ob eine vollständige Rückgewinnung der Partikel möglich ist.

4 Wachstum und Produktbildung von *B. licheniformis* DSM 1969

Für die Untersuchungen der Bioproduktaufarbeitung mit Magnetseparation und Elektrofiltration war die Etablierung und Charakterisierung eines Bioprozesssystems notwendig, das für diese Untersuchungen geeignet war. Es wurde die Produktion von extrazellulären Enzymen mit *Bacillus licheniformis* gewählt. Dieses Kapitel beschreibt die Erkenntnisse, welche bei der Charakterisierung dieses Systems für die Kultivierung und Produktion von Proteasen und Amylasen gewonnen wurden.

Das im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebene Medium geht auf eine Recherche zurück, in der *B. licheniformis* auf einigen synthetischen Medien in Schüttelkolbenkultur bzgl. seines Wachstum untersucht wurde. Das mit der besten Wachstumskinetik wurde für die weiteren Versuche verwendet.

Es wurden sieben Medien getestet, mit welchen Amylase oder Protease mit einem *Bacillus licheniformis* Stamm produziert wurde. Es folgen die Referenzen der Medien: 1 (Atkinson und Mavituna 1991) 2 (Zhang et al. 1983) 3 (Kole et al. 1988) 4 (Giesecke et al. 1991) 5 (Frankena et al. 1985) 6 (Yoon et al. 2000) 7 (Skolpap et al. 2004). Medium 2 zeigte nach Schüttelkolbenversuchen die beste Wachstumskinetik und wurde daher wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben in dieser Arbeit als synthetisches Medium verwendet. Die darin enthaltene Stickstoffquelle in Form von Ammoniumsulfat ist selbst in molaren Konzentrationen nicht toxisch für *Bacillus licheniformis* (Muller et al. 2006).

Das synthetische Medium sollte der Definiertheit und der Reproduzierbarkeit dienen. Allerdings wurde auch teilweise ein komplexes Medium benutzt. Abbildung 4.1 zeigt Wachstumskurven, die mit synthetischem Medium im Schüttelkolben ermittelt wurden. Die Konzentration an Ammoniumsulfat war jedoch nicht immer gleich, weshalb es zu unterschiedlich früh beginnenden Limitierungen kam ($c_{x,max}$). Es ist zu erkennen, dass das Wachstum nur dann exponentiell stattfinden kann, wenn die spezifische Wachstumsrate nicht besonders hoch ist. Bei hoher Wachstumsrate kommt es im Schüttelkolben bereits bei geringen Biomassekonzentrationen zu Sauerstofflimitierung. Weiterhin ist die Reproduzierbarkeit im Schüttelkolben eingeschränkt. Die verwendeten Kolben waren in ihrer Geometrie nicht völlig identisch und daher war der Sauerstoffübergang aufgrund sich unterscheidender Sherwoodzahlen, die sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit ergaben, ebenfalls nicht immer

gleich. Schüttelkolben 2 (Abbildung 4.1) wurde über einen Zeitraum von 33 h vermessen. Es ist zu erkennen, dass die optische Dichte sinkt sobald eine Limitierung eintritt. In diesem Fall war dies eine Stickstofflimitierung. Die Abnahme der OD bei Limitierung wurde in mehreren Versuchen beobachtet und ist als Reaktion der Organismen durch den limitierenden Stress zu erklären. Dieser kann zu Agglomeration, Sporulation oder morphologischen Veränderungen führen, welche die Lichtstreuung bei der OD-Messung beeinflussen.

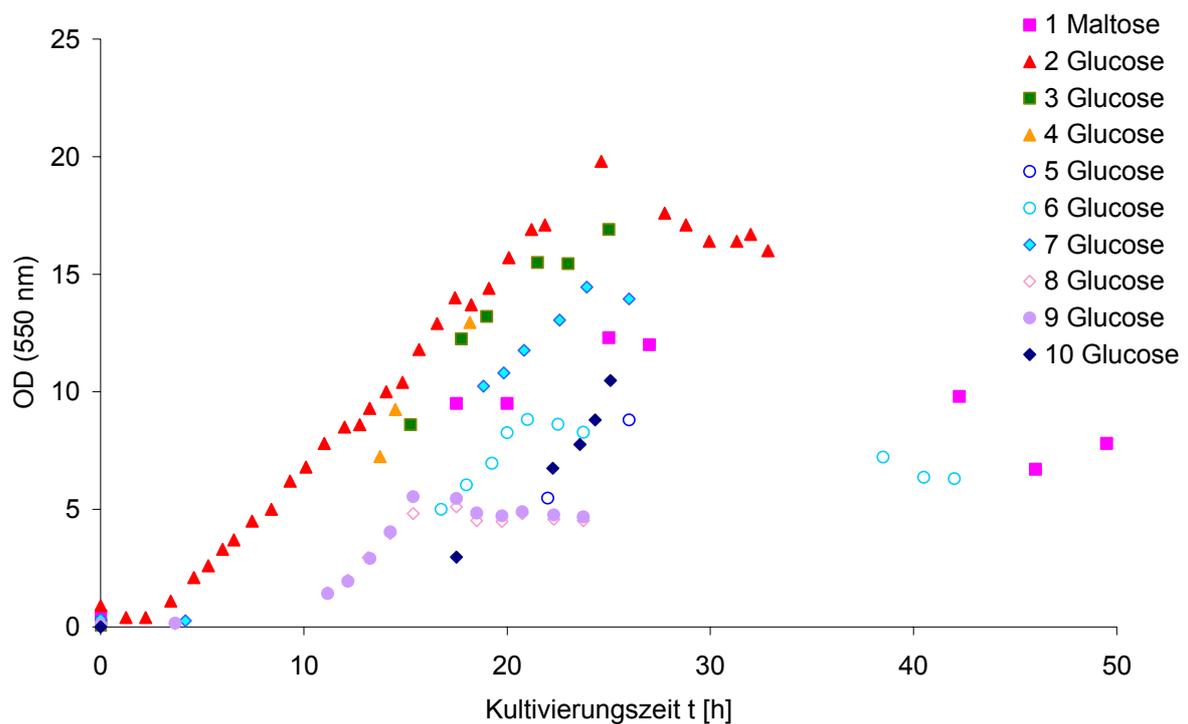


Abbildung 4.1: Wachstum von *Bacillus licheniformis* auf synthetischem Medium im Schüttelkolben

Da die Versuche im Schüttelkolben deutlich weniger aufwendig waren, wurden diese als erste Tests für gewisse Fragestellungen durchgeführt. Dies war zum Beispiel für die Auswahl des Mediums oder auch die Gewinnung erster Aussagen über die Produktbildung der Fall. Für Schüttelkolben 2 beispielsweise sank die spezifische Wachstumsrate μ von über $0,4 \text{ h}^{-1}$ auf unter $0,05 \text{ h}^{-1}$ bevor die Limitierung durch Stickstoff eintrat. Dieser Abfall ist durch eine Sauerstofflimitierung zu erklären. Bei den Versuchen, bei denen μ konstant blieb, schwankte diese jedoch trotzdem um den Wert von $0,3 \text{ h}^{-1}$, wobei auch kleinere Werte möglich waren. Einige ermittelte Parameter aus den Schüttelkolbenkultivierungen sind in Tabelle 4.1 dargelegt. Die

Parameter stammten von Kultivierungen, bei denen Messungen in der exponentiellen Phase vorliegen. Die Lag-Phase war in der Regel unter 3 h, konnte jedoch auch bis zu zwölf Stunden lang sein.

Tabelle 4.1: Parameter der Schüttelkolbenkultivierungen

Nummer in Abbildung 4.1	μ_{\max} [h ⁻¹]	t_{lag} [h]
2	>0,34	3
8	0,30	1,9
9	0,31	1,7

Im Bioreaktor lassen sich stabile Verhältnisse einstellen, die das Wachstum der Bakterien stark begünstigen. Der pH sank im Schüttelkolben beispielsweise in 48 h von 6,5 auf etwa 4,5; im Bioreaktor wurde er auf 7,5 geregelt. Weiterhin ist der Sauerstoffübergang deutlich besser. In Abbildung 4.2 ist das Wachstum von *B. licheniformis* für einige Kultivierungen im Bioreaktor in der Batchphase dargestellt. Die Zeitachse beginnt jeweils mit dem Beginn der exponentiellen Phase. Die Lag-Phasen-Zeit wurde durch logarithmische Auftragung der OD ermittelt. Bei ungenügend vielen Datenpunkten innerhalb der exponentiellen Phase wurden CO₂-Daten verwendet, wobei ein linearer Zusammenhang zwischen Wachstum und CO₂-Produktion nach folgender Gleichung angenommen wurde:

$$r_{\text{CO}_2} \propto y_{\text{CO}_2/x} \cdot \mu \quad 4.1$$

Es ergaben sich maximale spezifische Wachstumsraten von etwa $\mu_{\max}=0,44 \text{ h}^{-1}$. Eine Übersicht über die Lag-Phasen-Zeit und die maximale spezifische Wachstumsrate einiger Kultivierungen gibt Tabelle 4.2. Die Abweichungen resultieren aus Unterschieden in der Vorkultur, den geringfügig differierenden Prozessparametern (z.B. durch die Unterschiede beim Aufbau durch leichte Variation der Sondenanordnung oder Rührerstellung) und durch Messfehler in der Analytik.

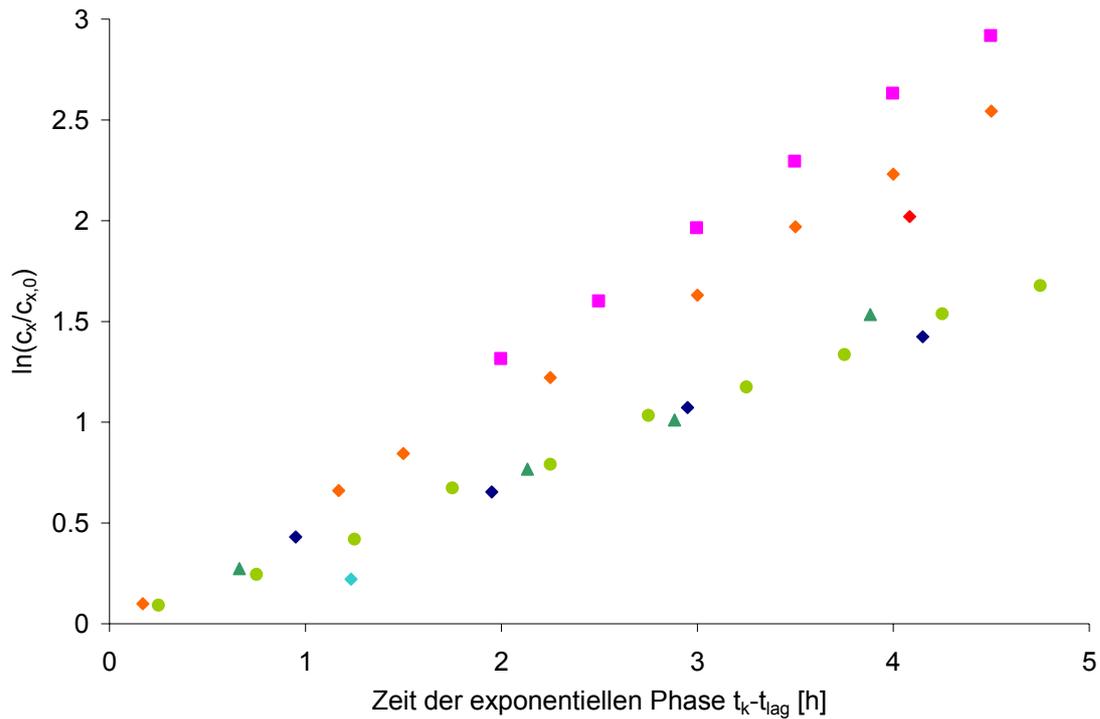


Abbildung 4.2: Wachstum von *Bacillus licheniformis* auf synthetischem Medium im Bioreaktor

Tabelle 4.2: Parameter bei den Bioreaktorkultivierungen (BR)

BR-Nummer	μ_{max} [h^{-1}]	t_{lag} [h]
1	0,32	5,0
2	0,65	3,8
3	0,56	1,0
4	0,36	4,8
5	0,44	3,6
6	0,45	3,7
7	0,36	8,2
8	0,4	6,5
9	0,37	5,0
10	0,42	16,8*
11	0,5	11,4*
12	0,51*	8,3*
13	0,45	7,3
14	0,45	5,6

15	0,32	2,7
16	0,47	0,9
Mittelwert (Standardabw.)	0,44 (0,1)	5,9 (4)

*Die Werte waren bei der Bestimmung mit CO₂-Daten deutlich niedriger

Die OD-Werte dienen der einfachen Messung der Biotrockenmassekonzentration, welche mit diesen korreliert wurden. Dazu wurden in den Reaktorkultivierungen BR 1-BR 9 jeweils die OD-Werte mit den gemessenen BTM-Werten aufgetragen und daraus eine Steigung ermittelt (pro Kultivierung bis zu neun BTM-Werte, mindestens zwei). Die Steigungen wurden dann gemittelt, um die Überbewertung einer Kultivierung zu vermeiden. In Abbildung 4.3 sind die Werte der 9 Kultivierungen dargestellt. Der gemittelte Faktor wurde für alle weiteren Kultivierungen zur BTM-Bestimmung benutzt und betrug 3,7 OD/(g·l⁻¹).

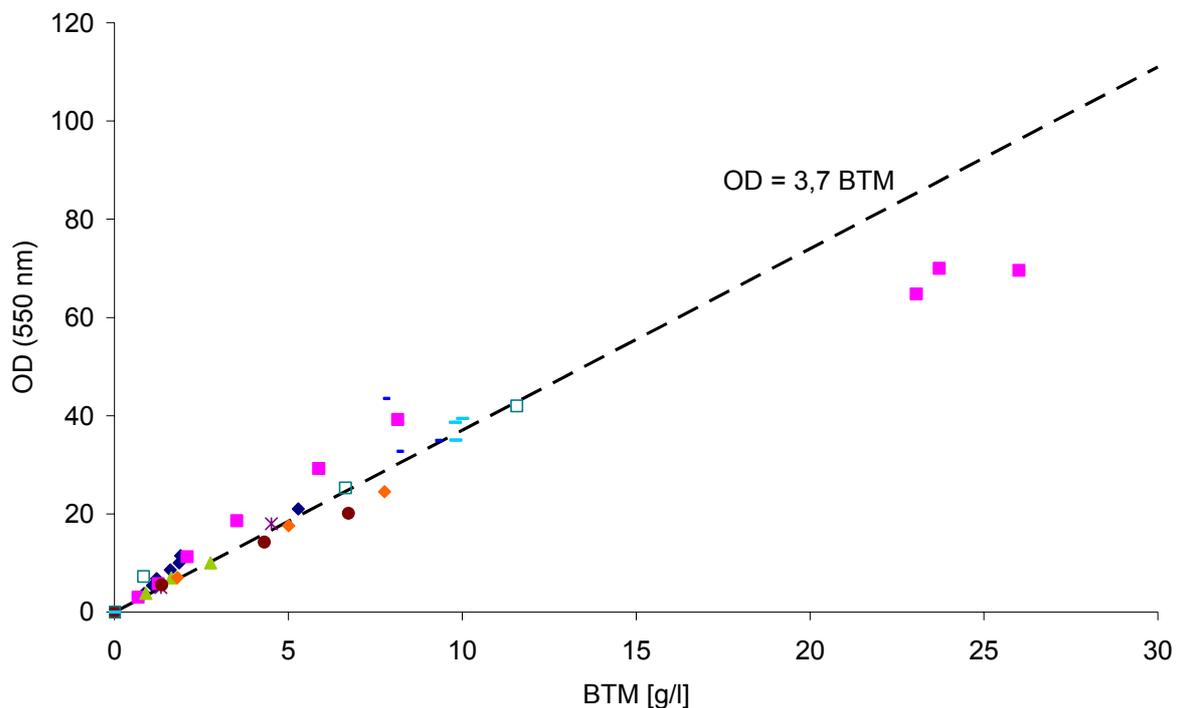


Abbildung 4.3: Korrelation zwischen OD und BTM für *Bacillus licheniformis*

Auch der Laugen-Verbrauch kann mit dem Biomassewachstum korreliert werden (siehe Abbildung 4.4). Zum einen wird das Medium durch das aufgenommene Ammoniumion angesäuert (Burkovski 2003). Zum anderen produziert *Bacillus*

licheniformis auch Komponenten, die zur Ansäuerung des Mediums führen, wie z.B. Acetat, Lactat, Formiat oder Pyruvat (Bulthuis et al. 1991). Diese Stoffe werden vor allem als Überschussmetaboliten bei hohen Substratkonzentrationen gebildet. Der in Abbildung 4.4 dargestellte Verlauf des berechneten Laugenverbrauchs wurde durch die Annahme ermittelt, dass bei der Aufnahme von Stickstoff aus Ammonium eine Gegentitration erfolgen musste. Die Aufnahme von Stickstoff aus Ammonium erfolgt meist durch die Diffusion des ungeladenem NH_3 , welches mit dem Ammonium-Ion im Gleichgewicht steht (Burkovski 2003). Der im Diagramm dargestellte berechnete NaOH-Verbrauch ist anhand einer stöchiometrischen Titration berechnet worden, wobei ein hoher Massenanteil von 20 % Stickstoff in der Biomasse angenommen wurde. Es ist zu erkennen, dass selbst unter diesen Annahmen die für die Titration benötigte NaOH-Menge deutlich geringer ist als die tatsächlich zugegebene. Dies ist mit der Produktion organischer Säuren zu erklären, welche durch die Natronlauge ausgeglichen werden mussten.

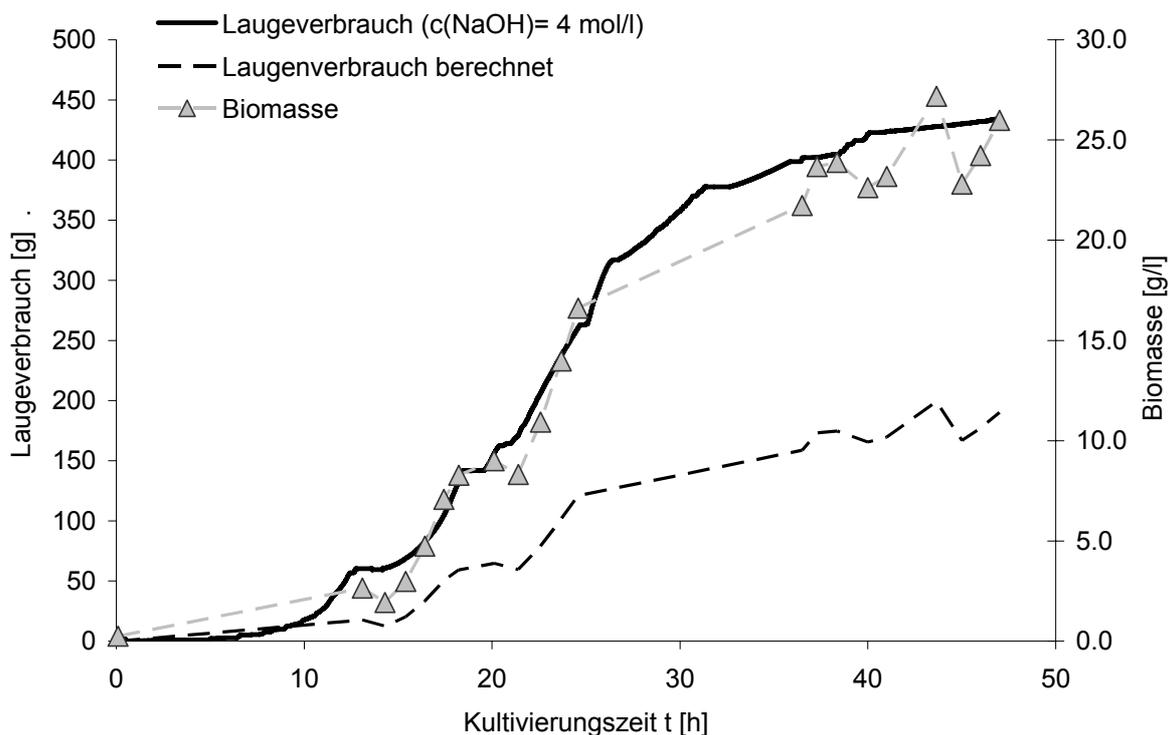


Abbildung 4.4: Korrelation der verbrauchten Lauge mit dem Wachstum des Organismus bei einer Kultivierung (BR 16)

Ziel der Kultivierungen war die Produktion extrazellulärer Enzyme, welche dann in der Bioproduktaufarbeitung als Zielprodukt angesehen wurden. Die von dem

verwendeten Stamm gebildeten Enzyme sind unter anderem eine extrazelluläre Alpha-Amylase und eine alkalische Serinprotease (Subtilisin). Diese sollten durch die geeignete Prozessführung in ausreichendem, möglichst großem Maße produziert werden.

Sowohl Protease als auch Amylase dienen dem Mikroorganismus bei extrazellulärer Bildung dazu, Substrate aus der Umgebung zu erschließen. Es war zu vermuten, dass durch die Anwesenheit zu erschließender Substrate, also Proteine für Proteasen und Stärke für Amylasen, die Bildung erhöht bzw. angeregt wird. Die Substratinduktion von extrazellulären Enzymen ist laut Literatur möglich (Priest 1977). Abbildung 4.5 zeigt, dass sowohl auf einem Stärkemedium als auch beim Maltosemedium (Glucose ist im syn. Medium durch Stärke, bzw. Maltose ersetzt) die Proteaseproduktion durch die Induktion mit Casein stark erhöht wird. Für andere Stämme der Spezies *B. licheniformis* wird berichtet, dass die C-Quelle erheblichen Einfluss auf die Produktion der Proteasen hat (Ferrero et al. 1996). Stärke als Substrat erhöht die Produktion deutlich im Vergleich zur Nutzung von Maltose. Bei den dargestellten Kultivierungen ist dieser Effekt erkennbar. Bei beiden Medien steigt die Proteaseaktivität deutlich nach Zugabe von Proteinen.

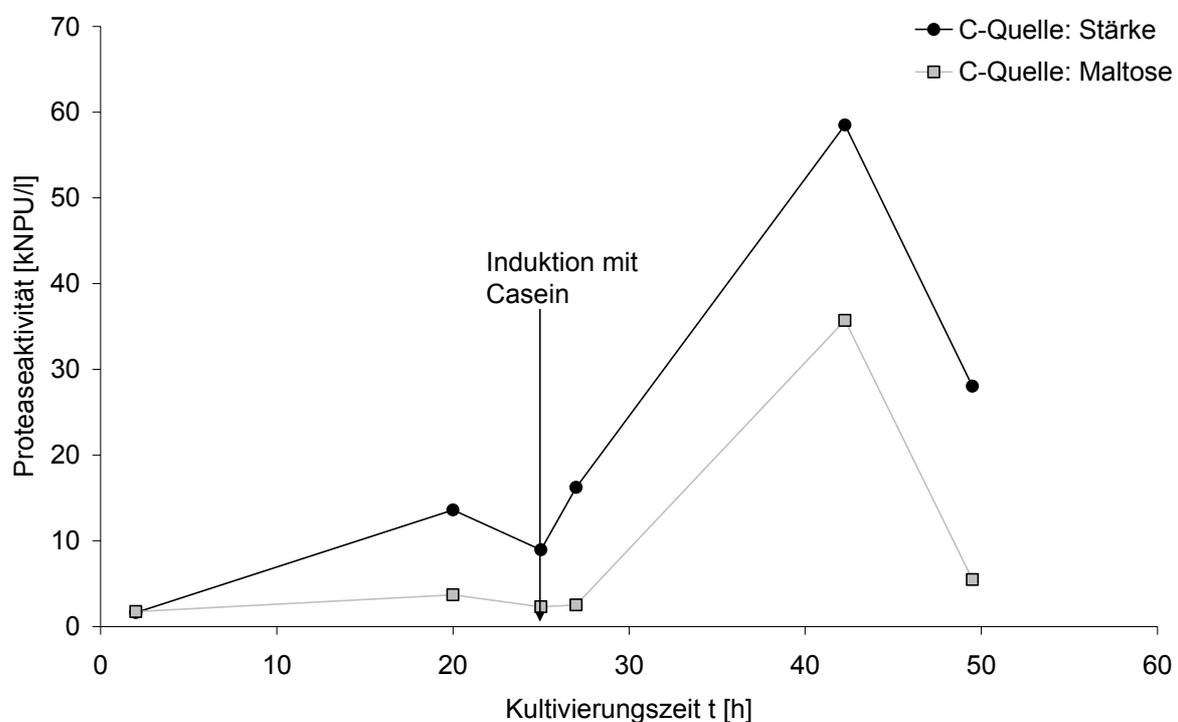


Abbildung 4.5: Bildung von Protease nach Induktion mittels Casein bei der Kultivierung auf synthetischem Medium im Schüttelkolben

Der letzte Datenpunkt ist jeweils deutlich niedriger als der maximal gemessene. Es kann also das einmal gebildete Produkt wieder zerstört werden. Dies ist zu erklären durch eine Degradation, der alle Enzyme ausgesetzt sind, aber auch durch proteolytische Eigenverdauung, bzw. die Zerstörung durch andere proteolytisch wirksame Enzyme. Die in Kapitel 6 dargestellte ISMS ist eine Methode, mit der dieser Verlust durch *in-situ* Abtrennung minimiert werden kann.

Für die Bildung von Alpha-Amylase ist nach einer Wachstumsphase auf Glucose im Bioreaktor das Feed-Medium mit Stärke als Substrat zudosiert worden. Wie in Abbildung 4.6 zu erkennen ist, wurde die Amylase nach Zufütterung verstärkt gebildet. Auch die Amylase ist nicht stabil. Der letzte Datenpunkt ist wie bei der Protease deutlich niedriger als die zuvor ermittelten. Dies hat auch die Ursache in destabilisierenden Wirkungen durch andere in der Biosuspension vorhandene Substanzen, beispielsweise mitgebildete Proteasen. Der Abbau von Amylase und Protease ist ein Grund, warum eine ISMS-Abtrennung dieser Stoffe die Ausbeute erhöhen könnte.

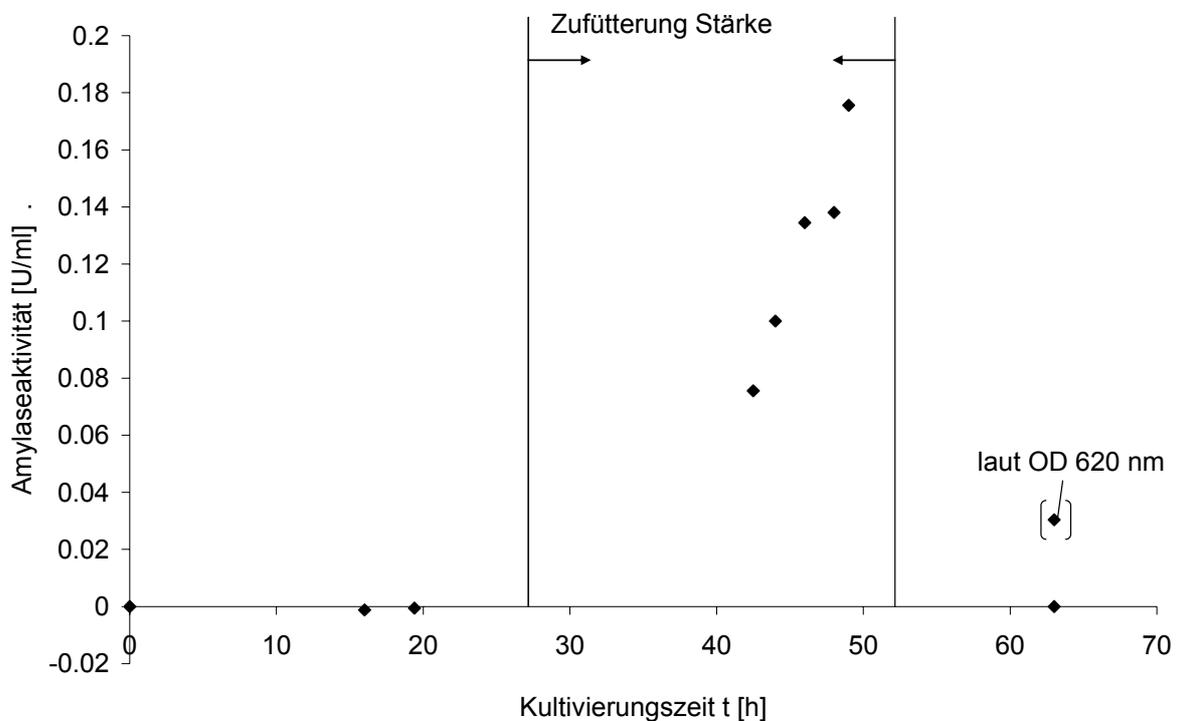


Abbildung 4.6: Bildung von Alpha-Amylase nach Zufütterung von Stärke im Fed-Batch im Bioreaktor

Um weitere Erkenntnisse für die Proteasebildung im synthetischen Medium zu erhalten, wurden Versuche durchgeführt, die die Untersuchung der eingesetzten Stickstoffquelle für die Produktion der Proteasen zum Ziel hatten. Es wurde auf synthetischem Medium im Schüttelkolben kultiviert, wobei zusätzlich zu standardmäßig kultivierten Kolben auch zwei Ansätze durchgeführt wurden, bei denen das normalerweise verwendete Ammoniumsulfat durch das Protein BSA ersetzt wurde. Hierbei wurde die Menge des BSA so gewählt, dass bei beiden Ansätzen die gleiche Menge elementaren Stickstoffs zur Verfügung stand. Abbildung 4.7 zeigt den Verlauf des Biomassewachstums und der Proteasebildung im Vergleich zwischen den beiden genutzten N-Quellen. Es ist jeweils eine Kurve von zwei Parallelansätzen, die jedoch annähernd den gleichen Verlauf hatten, dargestellt.

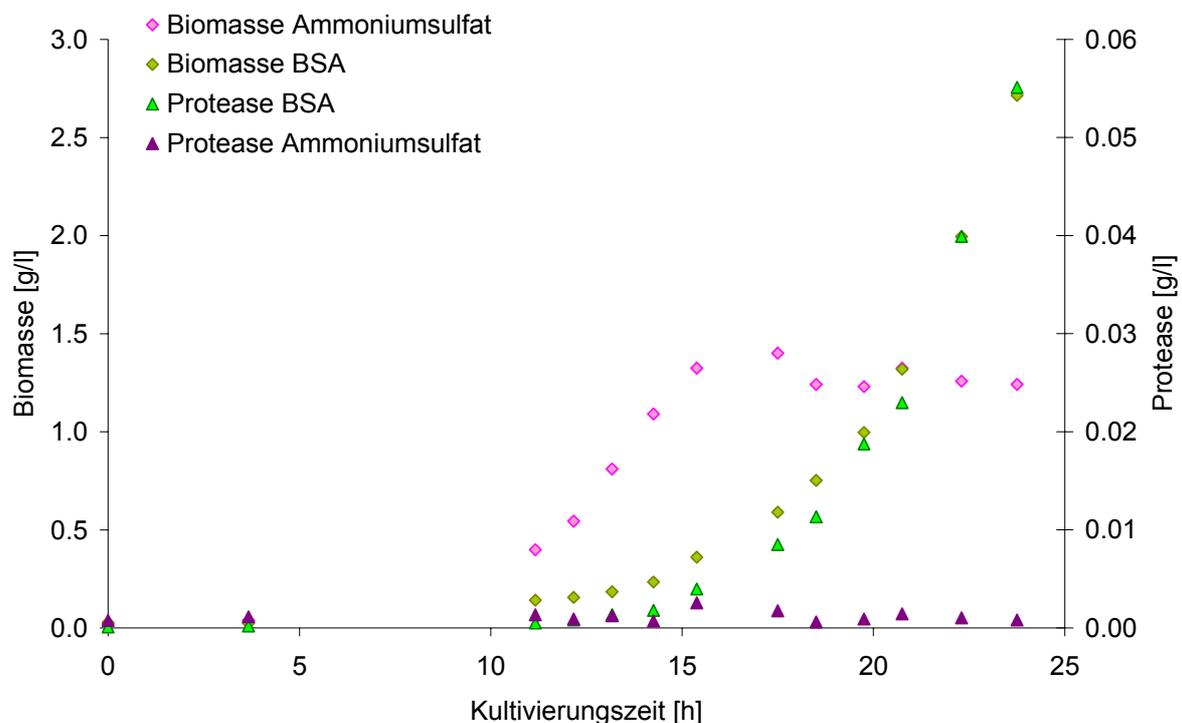


Abbildung 4.7: Wachstum und Proteasebildung bei Verwendung verschiedener Stickstoffquellen im Schüttelkolben; die stöchiometrische Menge an Stickstoff ist in beiden Medien gleich

Es ist zu erkennen, dass beim Ammoniumsulfat-Medium fast keine Proteasen gebildet wurden, wie es auch in Abbildung 4.5 beim Maltosemedium der Fall war. Bei der Nutzung von BSA als Stickstoffquelle jedoch wurde die Protease wie ein klassischer Primärmetabolit, also wachstumsproportional, gebildet. Die Aktivität steigt

mit der Biomasse exponentiell an. Es kann also gesehen werden, dass das Vorhandensein von Proteinen im Medium zu einer Produktion von Proteasen führt und somit diese Information auch von den Mikroorganismen ermittelt werden kann.

Es fällt jedoch auf, dass die Wachstumsrate für das BSA-Medium deutlich geringer ist. Es scheint also kinetisch günstiger, Stickstoff direkt aus Ammoniumionen aufzunehmen und daraus Zellbestandteile wie Aminosäuren und Proteine zu bilden als Proteasen zu bilden und dann die nach deren Sekretion entstehenden Aminosäuren direkt ein- bzw. umzubauen. Der erreichte Endwert bzw. die Ausbeute an Biomasse wiederum ist bei der BSA-Nutzung deutlich höher, obwohl Stickstoff stöchiometrisch in gleicher Menge bei beiden Versuchen zugegeben wurde. Ein Verlust von Ammoniak beim Autoklavieren wurde experimentell ausgeschlossen. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist, dass das Vorhandensein von Aminosäuren im Medium die Ausbeutekoeffizienten deutlich verändert, etwa durch eingesparte Stoffwechselenergie. Beispielsweise kann die Ausbeute an Biomasse pro aufgenommenem Sauerstoff durch die Anwesenheit von Aminosäuren deutlich erhöht werden (Hernandez und Johnson 1967). BSA wurde als N-Quelle zugeführt und dieses wird proteolytisch gespalten. Die Degradation des BSA ist auf dem in Abbildung 4.8 dargestellten Gel zu erkennen, wobei bereits nach 13 Stunden Fermentationszeit Peptide unterhalb einer Größe von 12 kDa vorhanden sind, also vermutlich auch Aminosäuren.

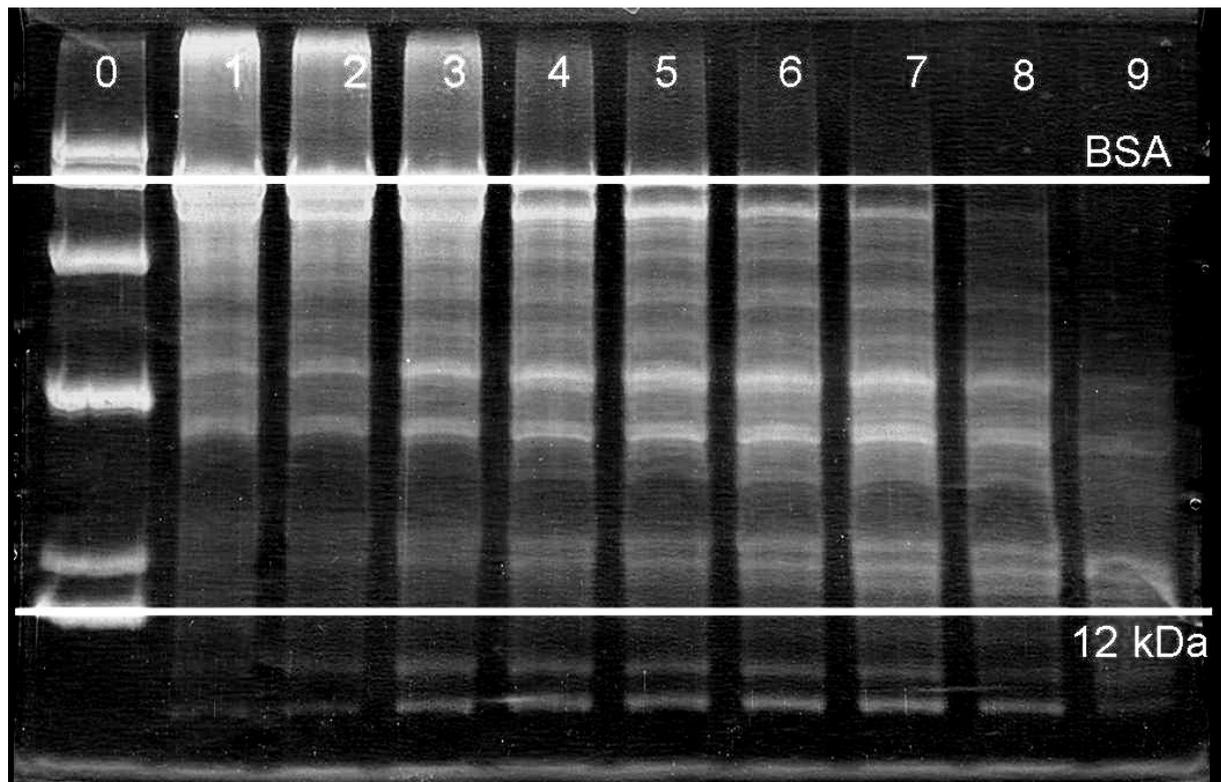


Abbildung 4.8: SDS-PAGE der Kultivierung mit BSA als N-Quelle, von 13 h (Spalte 1) bis 23 h (Spalte 9); Spalte 0 ist der Standard

Neben der Nutzung von BSA als Stickstoffquelle wurde auch ein komplexes Medium verwendet, das die Produktion der Proteasen, wie in Abbildung 4.9 zu sehen, im Gegensatz zum synthetischen Medium, ermöglichte. Es ist zu erkennen, dass die Produktion der Proteasen vor allem dann verstärkt wird, wenn das Wachstum geringer wird. Bei Wachstum auf diesem komplexen Medium, dem auch Glucose zugesetzt war, war das Produktionsverhalten im Gegensatz zum Wachstum auf synthetischem Medium mit BSA als N-Quelle, nicht wie das eines Primärmetaboliten.

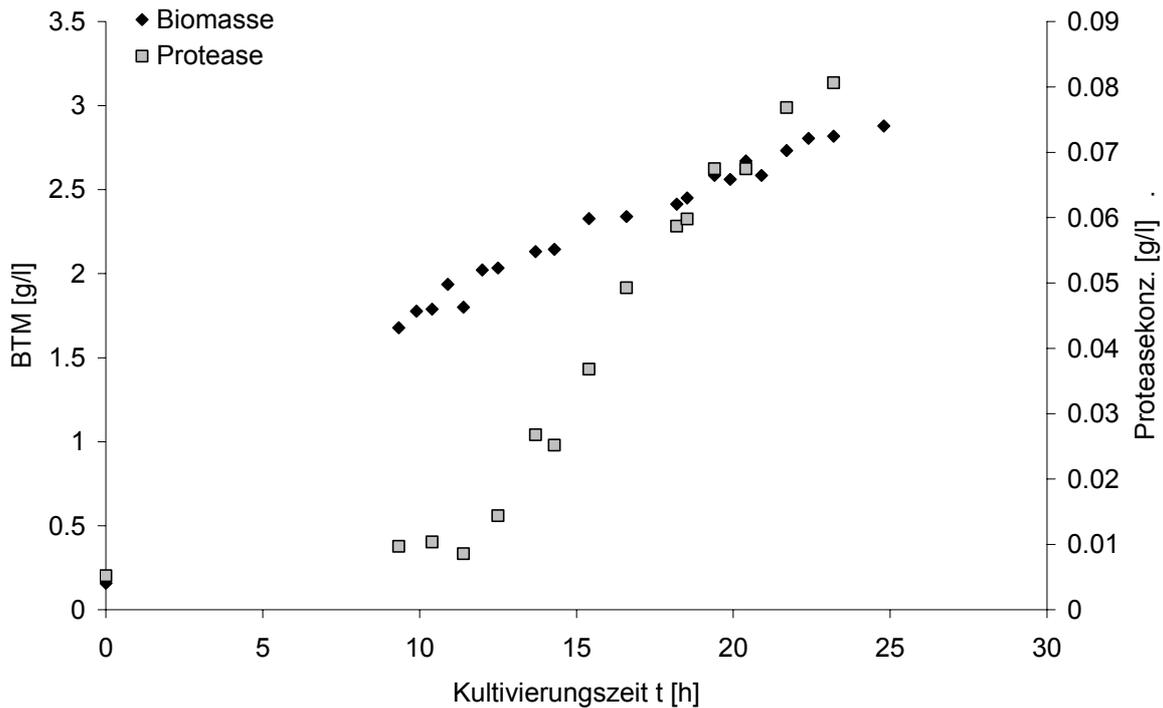


Abbildung 4.9: Wachstum und Proteasekonzentration im Schüttelkolben bei Verwendung des komplexen Mediums (mit Glukose)

Für die Produktion von Proteasen im Bioreaktormaßstab sollte trotz der geringen Produktbildung im Schüttelkolben das synthetische Medium mit Ammoniumsulfat als N-Quelle verwendet werden. Stickstoffüberschuss reprimiert die Proteaseproduktion, weshalb eine Fed-Batch-Strategie auch für das synthetische Medium eine Produktion erbringen könnte. Um dies zu untersuchen, wurde *B. licheniformis* im Fed-Batch kultiviert. Abbildung 4.10 zeigt einen typischen Verlauf der Kultivierung im Bioreaktor bei einem Fed-Batch-Prozess. Zunächst ist eine Wachstumsphase (Batchphase) zu erkennen, in der die Biomasse exponentiell ansteigt, jedoch kaum Protease produziert wird. In der Fed-Batch-Phase, also unter limitierenden Bedingungen findet dann die Proteaseproduktion statt. Durch die Nutzung dieser Fed-Batch-Strategie konnten dann hohe Proteasekonzentrationen von bis zu 1 g/l erzielt werden.

Ein zweistufiger Prozess mit getrennter Wachstums- und Produktionsphase ist für die technische Umsetzung günstig, da zum einen die Stoffwechselenergie bei einer Produktionsphase hauptsächlich ins Produkt gehen soll und zum anderen die Verweilzeit der Produkte im Reaktor verringert wird, im Vergleich zu einem Ansatz mit paralleler Wachstums- und Produktbildungsphase.

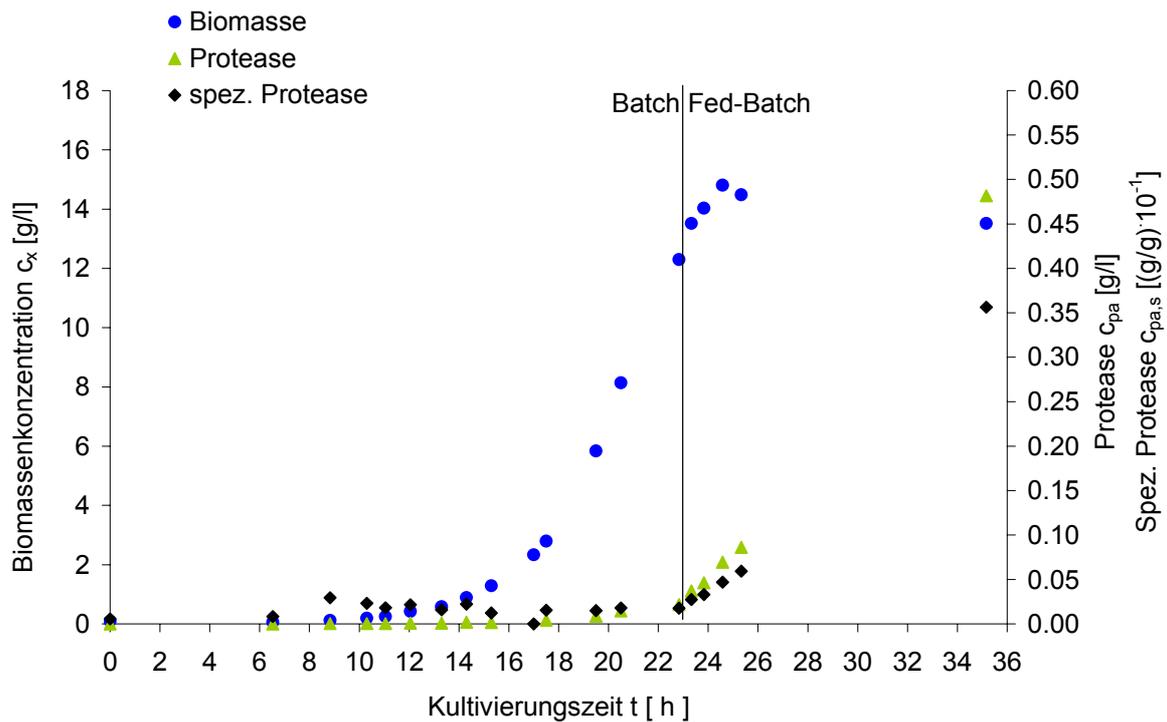


Abbildung 4.10: Proteasebildung bei Fed-Batch-Untersuchungen; Feedrate (linearisiert): 25 ml/h ($c_{Feed}(\text{Glucose})=527$ g/l; $c_{Feed}(\text{Ammoniumsulfat})=5$ g/l)

Zur Bestimmung der genauen Produktbildungskinetik muss jedoch beachtet werden, dass die Protease, wie bereits erwähnt, einem Degradationsprozess unterliegt. Betrachtet man nur die Konzentration des Produktes unter Berücksichtigung der verdünnenden Wirkung des Fed-Batch-Mediums, so wird lediglich die effektive Bildungskinetik bestimmt, nicht die reale. Um die reale zu quantifizieren, muss zunächst die abbauende Wirkung untersucht werden. Hierzu wurden sowohl Bio-reaktorproben mit Protease als auch reine *Subtilisin*proben über die Zeit bei 37°C vermessen. Es ergab sich eine sinkende Aktivität, also war ein Abbauprozess zu beobachten. Die Abbaukinetik wurde in mehreren Ansätzen mit unterschiedlichen Anfangskonzentrationen gemessen. In Abbildung 4.11 ist die logarithmische Auftragung von mehreren Abbaukurven dargestellt, wobei sich die Berechnung auf die jeweilige Anfangsproteasekonzentration bezog. Es ergab sich eine Kinetik erster Ordnung, wobei die Steigung als Abbaukonstante genutzt werden konnte.

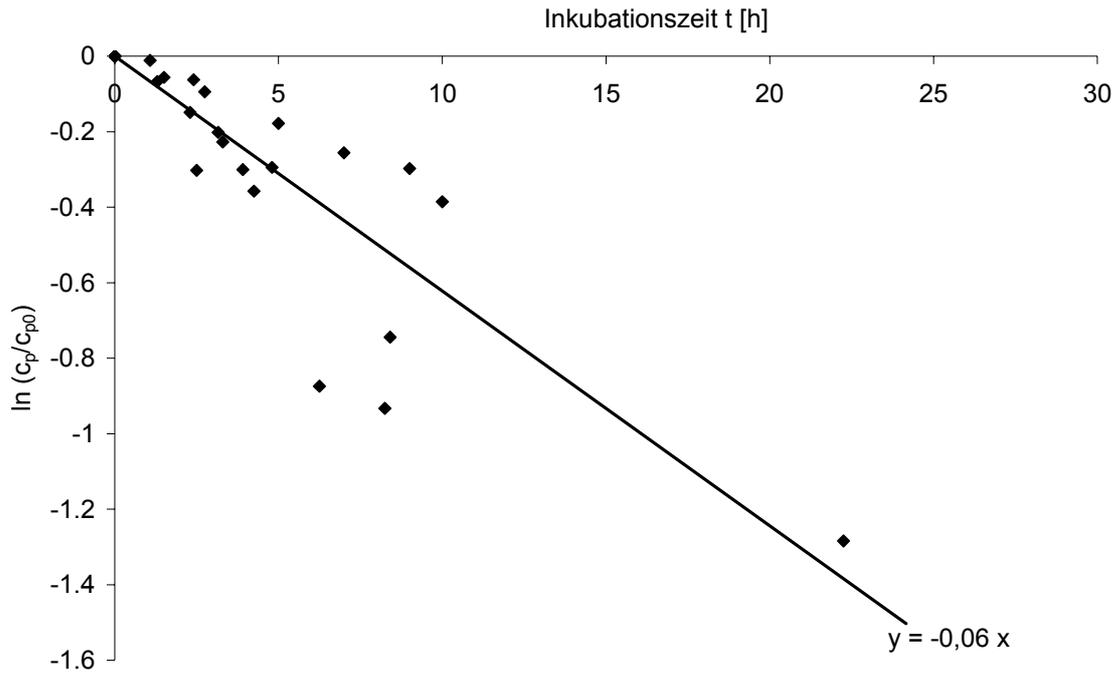


Abbildung 4.11: Bestimmung der Degradationskinetik der von *B. licheniformis* gebildeten Proteasen

Um nun die spezifische Produktionsrate zu bestimmen, muss für eine Phase konstanten Wachstums ($\mu = \text{const.}$) der gemessene Proteasebildungsverlauf mit folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\frac{dc_P}{dt} = r_P c_X - k_{\text{deg}} c_P - D_V c_P \quad 4.2$$

Der zweite Term der rechten Seite berücksichtigt den Abbau der Protease, der dritte die Verdünnung durch das Medium.

Aus gemessenen Kurvenverläufen bei konstanter spezifischer Wachstumsrate kann durch Parameterschätzung die Differentialgleichung gelöst werden. Das Bioprozessmodell wird ausführlich im späteren Kapitel 7 behandelt. Dieses Modell wurde so genutzt, dass, mit Hilfe eines Parameterschätz-Tools, r_P so variiert wurde, dass der Verlauf der Proteasekonzentration mit der geringsten Summe der Fehlerquadrate an die Messwerte angepasst werden konnte. Somit konnte für mehrere Versuchsbedingungen r_P bestimmt werden. Diese Versuchsabschnitte wurden so gewählt, dass μ innerhalb des untersuchten Abschnittes etwa konstant war. Die spezifische Bildungsrate ist in Abbildung 4.12 über der spezifischen Wachstumsrate dargestellt. Wie bereits diskutiert, wurden bei hohen

Wachstumsraten, wie in der Batchphase, wenig Proteasen produziert, wohingegen bei sinkender Wachstumsrate die Produktivität stieg.

Es wurde auch gekennzeichnet, welche Komponente (Sauerstoff, Glucose oder Stickstoff) limitierend war. Hierbei kann keine eindeutige Tendenz festgestellt werden, lediglich, dass bei Stickstofflimitierung teilweise sehr hohe Produktivitäten erzielt wurden. Für die spätere Modellierung des Prozesses wurde das Ergebnis nach dem Ansatz von Luedeking und Piret (siehe Gleichung 2.30) linearisiert, wobei β in unserem Fall negativ war.

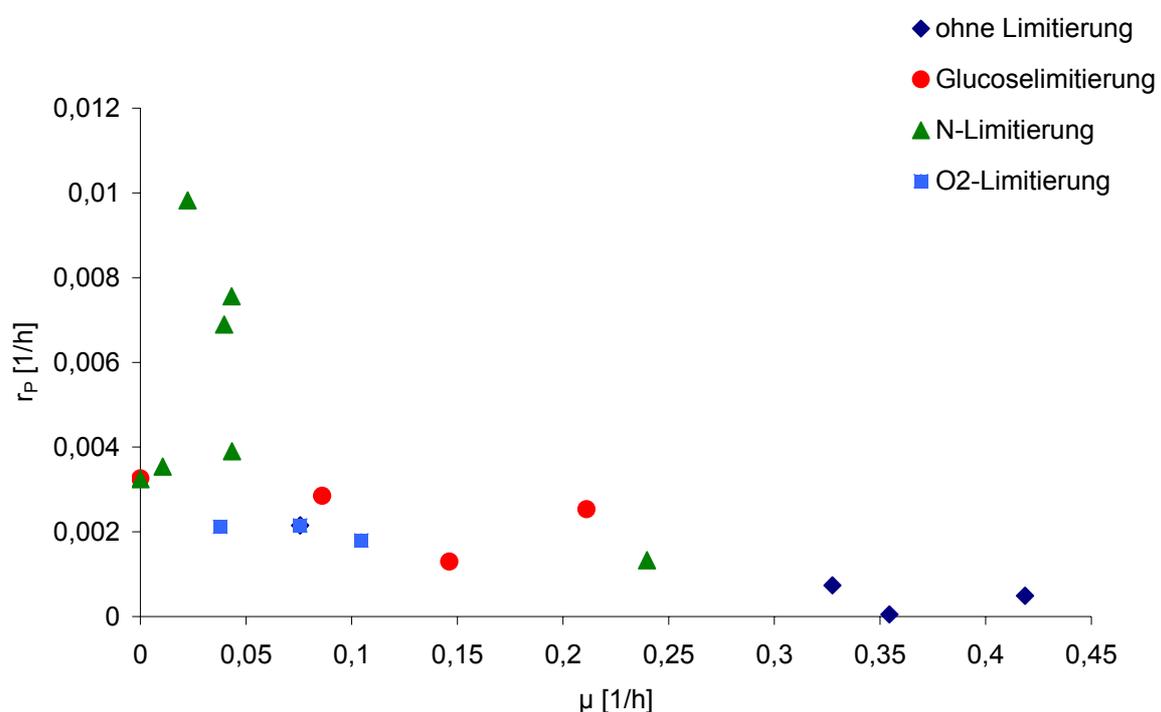


Abbildung 4.12: Spezifische Produktbildungsrate in Abhängigkeit der Wachstumsrate bei verschiedenen Limitierungen

Eine Erklärung ist, dass die extrazellulären Proteasen vor allem in Zeiten von geringer Verfügbarkeit von Substrat benötigt werden und dadurch vor allem in Phasen geringen Wachstums gebildet werden. Bei Nullwachstum könnten noch im Maintenancesstoffwechsel Gene zur Proteaseproduktion aktiv sein.

5 Ergebnisse der Elektrofiltrationsuntersuchungen

Die Elektrofiltration ist ein Verfahren, mit dem die den Biopolymeren und biologischen Produkten inne liegende Eigenschaft der Ladung ausgenutzt werden kann. Es wird durch das elektrische Feld eine spezifische Kraft ins System integriert. Dadurch ist ein spezifischer Transport des gewählten Stoffes möglich. Die Elektrofiltration wurde in dieser Arbeit vor allem nach einer Bioproduktion eingesetzt. Zunächst werden die Ergebnisse dargelegt, die bei der Primärseparation, also der Biomasseabtrennung (und Konzentrierung), erreicht wurden. Des Weiteren konnte die Elektrofiltration auch bei der Enzymkonzentrierung eingesetzt werden. Bei der Fraktionierung von Proteinen, bei der die Größe und die Ladung von Proteinen im Elektro-Ultrafiltrationsverfahren ausgenutzt werden, ist die Elektrofiltration ein viel versprechendes Instrument.

5.1 Elektrofiltration zur Konzentrierung von Biomasse in der Primärseparation

Für die Konzentrierung von Biomasse mittels Elektrofiltration sollte zunächst der generelle Einfluss des elektrischen Feldes untersucht werden. Biomasse wurde in einer Kultivierung zu 5 g/l Biomasse im Bioreaktor kultiviert, wobei Stärke als C-Quelle diente. Nach der Kultivierung wurde die Suspension filtriert. Hierbei wurde zunächst kein elektrisches Feld genutzt, dieses jedoch im Verlauf der Filtration zugeschaltet. Abbildung 5.1 zeigt den Verlauf des Filtratvolumens über der Zeit. Es ist zu erkennen, dass die Nutzung des E-Feldes einen deutlichen Effekt hervorruft. Der un stetige Anstieg der Steigung lässt darauf schließen, dass das E-Feld auch zu einer spontanen Erhöhung der Permeabilität führt, wenn bereits auf beiden Filterkammerseiten ein Kuchen aufgebaut wurde. Die beiden Membranen waren jeweils gleich auf beiden Seiten mit einer Porengröße von 0,45 μm .

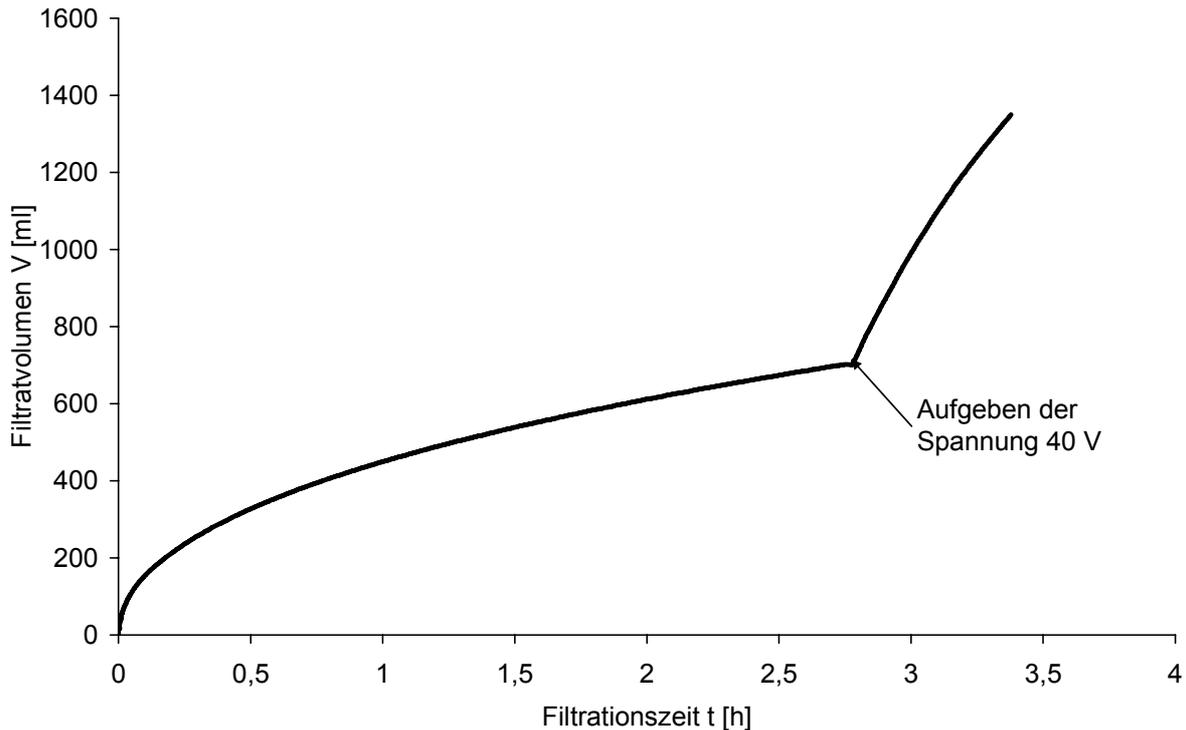


Abbildung 5.1: Effekt des Einsatzes eines E-Feldes bei der Filtration einer Biosuspension von *Bacillus licheniformis* ($\Delta p=2$ bar; $c_0=5$ g/l; $\kappa=7,5$ mS/cm; $U=0$ V bzw. 40 V; $A_{\text{Anode}}=A_{\text{Kathode}}=225$ cm²; Membran: 0,45 μ m PES; pH=7)

Die Suspension wurde auch in Filtrationsversuchen, die nur mit andauernd konstantem und ohne elektrischem Feld durchgeführt wurden, untersucht. Das Ergebnis ist in Form einer t/V über V Kurve vergleichend in Abbildung 5.2 dargestellt. Die Steigung dieser Form der Darstellung gibt in der klassischen Pressfiltration Aufschluss über den spezifischen Kuchenwiderstand der Suspension. Durch das E-Feld wird dieser scheinbar gesenkt, wie an der reduzierten Steigung deutlich zu erkennen ist. Diese Senkung kann jedoch durch die Reduktion des Filterkuchens auf einer Seite zu erklären sein, nicht unbedingt durch eine wirkliche Änderung der Kuchenstruktur und damit des spezifischen Kuchenwiderstands. Dieser Zusammenhang wird in Kapitel 5.1.1 diskutiert.

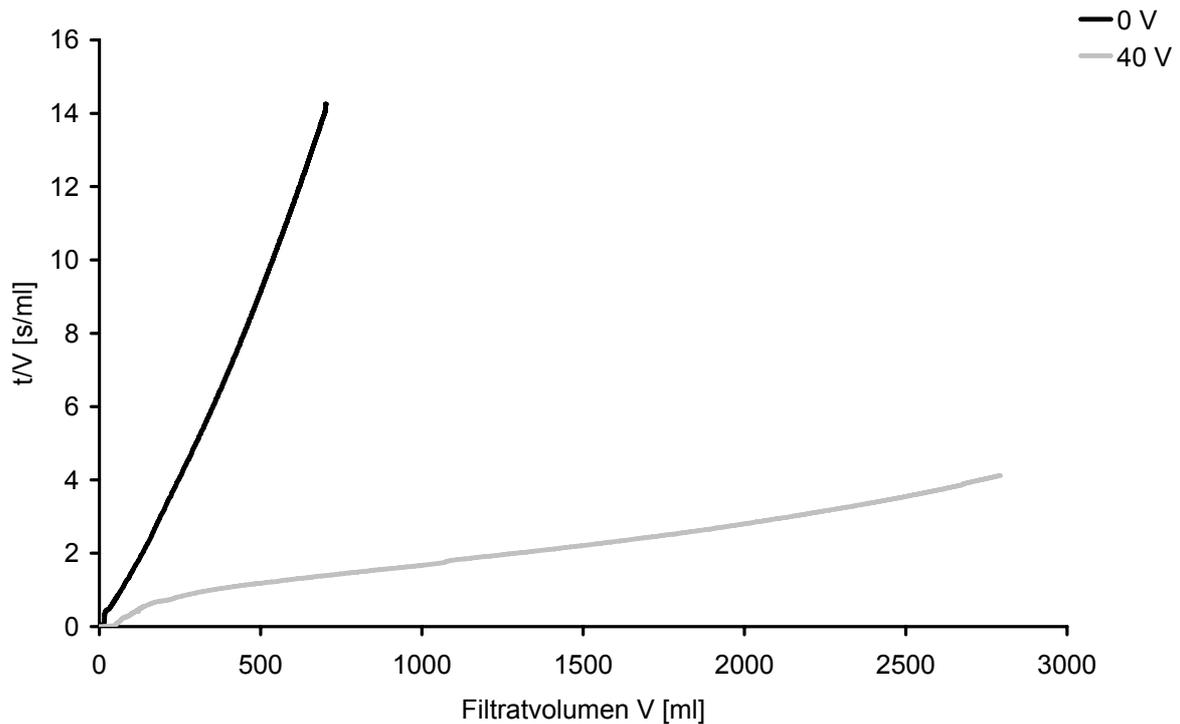


Abbildung 5.2: t/V über V Diagramm für eine Filtration von *Bacillus licheniformis* mit und ohne elektrischem Feld ($\Delta p = 2$ bar; $c_0 = 5$ g/l; $\kappa = 7,5$ mS/cm; $U = 0$ V bzw. 40 V; $A_{\text{Anode}} = A_{\text{Kathode}} = 225$ cm²; Membran: 0,45 μ m PES; pH=7)

Für eine im Schüttelkolben kultivierte Biosuspension (Glucose als Substrat, synthetisches Medium) wurden mehrere Versuche bei unterschiedlichen elektrischen Feldstärken durchgeführt. Das elektrische Feld, das bei der Betrachtung berücksichtigt werden muss, ist gegeben durch:

$$E_{\text{eff}} = \frac{I}{\kappa_L \cdot A} \quad 5.1$$

Abbildung 5.3 zeigt den Verlauf der Steigung (im linearen Bereich) der $t/(V/A)$ über V/A -Kurven für die durchgeführten Versuche über dem effektiven E-Feld. Es ist ein linearer Zusammenhang zu erkennen. Die Werte aus den obigen in der Pilotanlage durchgeführten Versuchen sind ebenfalls abgebildet. Es ist ein deutlicher Unterschied sichtbar, der auf die unterschiedlichen Ionenstärken zurückzuführen ist. Diese werden durch die Leitfähigkeit angegeben. Bei hoher Leitfähigkeit (Ionenstärke) sinkt der Einfluss des elektrischen Feldes (verringerte Steigung). Es ist jedoch ebenfalls zu erkennen, dass der Filtrationswiderstand ohne E-Feld bei hoher Ionenstärke niedriger ist. Dies könnte durch eine Agglomeration der Bakterien durch das mit der Ionenstärke sinkende Zetapotential zu erklären sein. Es kommt zu einer für die

Filtration wirksamen größeren Partikelgröße, die dem Kuchen eine höhere Porosität und damit Permeabilität verleiht. Der Effekt, dass eine geringere Debye-Länge der Mikroorganismen (bei höherer Ionenstärke) zu einer kompakteren Kuchenstruktur führt, welcher weniger permeabel ist, war hier also nicht dominant.

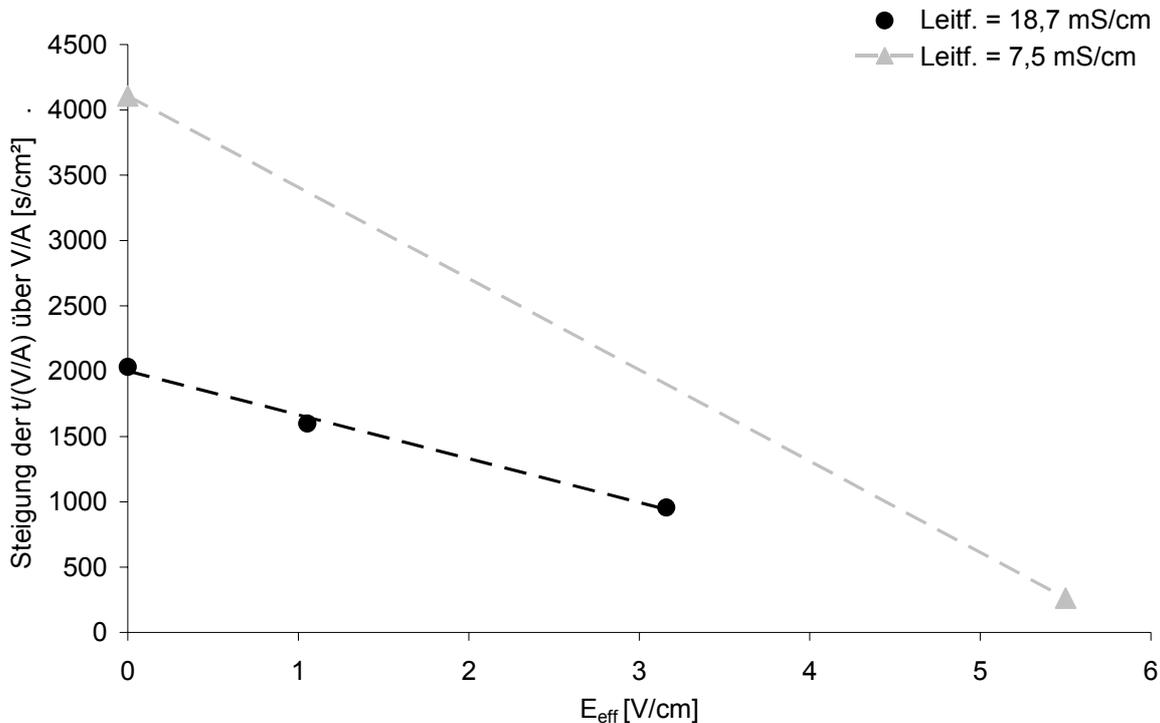


Abbildung 5.3: Steigung der $t/V/A$ über V/A Diagramme für die Filtrationen einer Biosuspension mit verschiedenen Feldstärken; Vergleichend die Steigungen bei einer Suspension mit deutlich höherer Leitfähigkeit

Betrachtet man die Kosten der Elektrofiltration, so ist die Leitfähigkeit mit hohem Stromverbrauch verbunden und darum weniger rentabel. Zusätzlich ist, wie gesehen, (Abbildung 5.3) der elektrokinetische Effekt geringer, der die Filtrationskinetik verbessert, was an der geringeren Steigung gesehen werden kann. Somit ist für die wirtschaftliche Anwendung der Einsatz bei Suspensionen niedriger Leitfähigkeit sinnvoll. Ein Bioprozess kann dahingehend auch in einer Medienoptimierung verändert werden, indem Salze, die nicht nötig sind, für die Kultivierung weggelassen werden.

5.1.1 Modellhafte Beschreibung der Elektrofiltration zur Untersuchung des Anteils der Elektrophorese am Effekt der Elektrofiltration

Im vorangehenden Abschnitt wurde der Effekt des elektrischen Feldes bei der Biomassekonzentrierung besprochen. Es sind drei kinetische Verbesserungsursachen durch das elektrische Feld gegeben. Diese sind (a) eine reduzierte Kuchenhöhe auf einer Membran, also ein ungleich verteilter Filterkuchen auf Anoden- und Kathodenseite, (b) eine veränderte Kuchenstruktur durch Ausrichtung der Mikroorganismen im E-Feld und (c) elektroosmotische Wirkungen. Bei der zweiseitigen Elektro-Mikrofiltration wurde der letztgenannte Effekt nachgewiesen, wenn keine Spülflüssigkeit die Elektrolyseprodukte entfernt und sich somit ein pH-Gradient in der Filterkammer einstellt, der einen positiven elektroosmotischen Filtratfluss zur Folge hat (Saveyn et al. 2005). Bei gespülten Elektroden sollte dieser Effekt jedoch klein sein, da bei gleichem pH-Wert die elektroosmotischen Flüsse durch die beiden Membranen auf beiden Seiten entgegengesetzt und gleich groß sein müssten. Da der elektroosmotische Fluss nicht von der Kuchenmasse abhängig ist, sondern lediglich von deren Porosität und dem Zetapotential der Partikel, ist bei gleichen pH-Bedingungen kein Effekt zu erwarten.

Der Effekt der durch die elektrophoretische Bewegung verursachten unterschiedlichen Kuchenhöhe kann über die Darcy-Gleichung bei unterschiedlichen Anteilen der Gesamtkuchenverteilung folgendermaßen bestimmt werden:

$$J_{\text{asymmetrisch}} = J \cdot \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{1}{x} + \frac{1}{1-x} \right) \quad 5.2$$

Hierbei gilt für den Anteil x der Masse auf der reduzierten Seite bezogen auf die Gesamtkuchenmasse: $0 < x \leq 0,5$. $J_{\text{asymmetrisch}}$ ist hierbei der sich durch die nicht-Gleichverteilung des Filterkuchens ergebende Filtratfluss, wenn J der Fluss bei Gleichverteilung also ohne E-Feld ist, wobei hier der Filtermedienwiderstand vernachlässigt wird. In Abbildung 5.4 ist der Verlauf des Faktors $J_{\text{asymmetrisch}}/J$ über dem Anteil des Filterkuchens auf der reduzierten Seite (Pol, der die Ladung der zurückgehaltenen Substanz hat) abgebildet.

$$x = \frac{m_{\text{reduzierte_Seite}}}{m_{\text{Filterkuchen,gesamt}}} \quad 5.3$$

Die Kurve ohne Vernachlässigung des Medienwiderstands läuft im gezeigten Intervall genau auf der dargestellten Kurve.

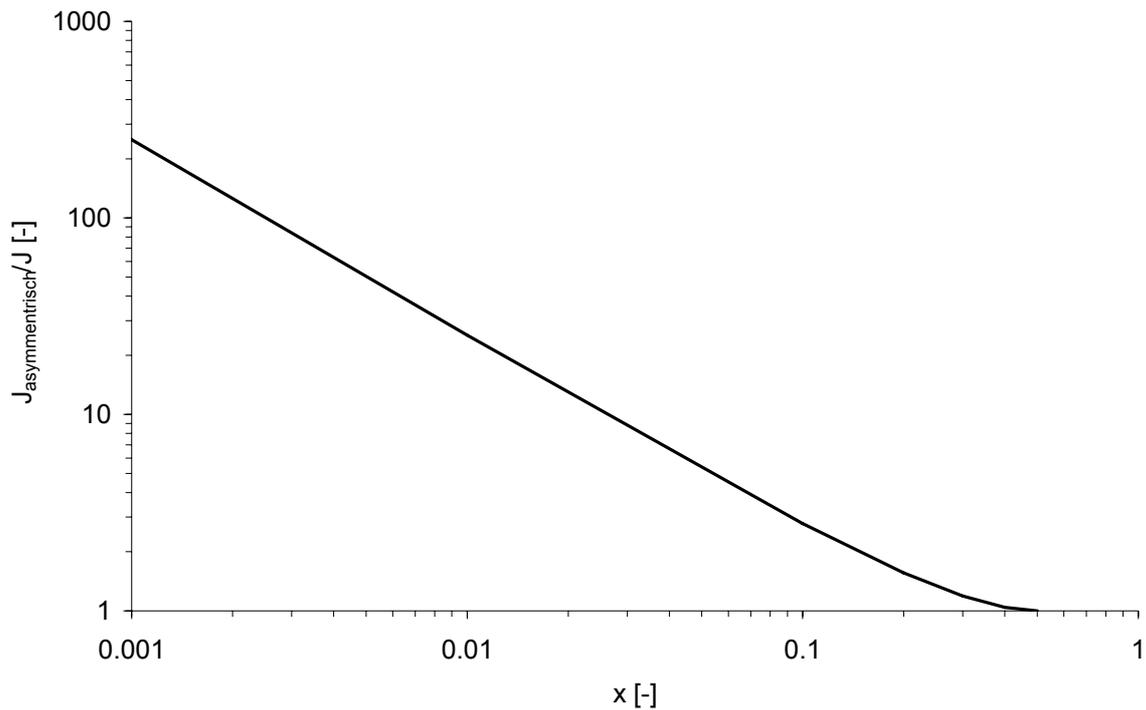


Abbildung 5.4: Verlauf des Steigerungsfaktors des Filtratflusses in Abhängigkeit des Filterkuchenanteils auf einer Seite

Ein Sedimentationseffekt, also ein größerer Filterkuchen am Kammerboden war bei den Filtrationsversuchen mit Biomasse nicht zu beobachten. Die Filterkuchen wurden nach den Versuchen teilweise gewogen. Es war teilweise ein deutlicher Unterschied der konsolidierten Feuchtmasse zu beobachten, jedoch unterschieden sich die Filterkuchenmassen maximal um den Faktor 7 (Kaepler et al. 2006). Abbildung 5.5 gibt einen optischen Eindruck. Bei diesem Faktor müsste laut Gleichung 5.1 der Filtratfluss 2,3 mal größer sein als bei der Pressfiltration. Da jedoch der durch die Elektrofiltration erzielte Effekt teilweise deutlich größer war (vergleiche Abbildung 5.2), muss der Effekt der Vergrößerung der Permeabilität durch das E-Feld ebenfalls eine wesentliche Rolle spielen.

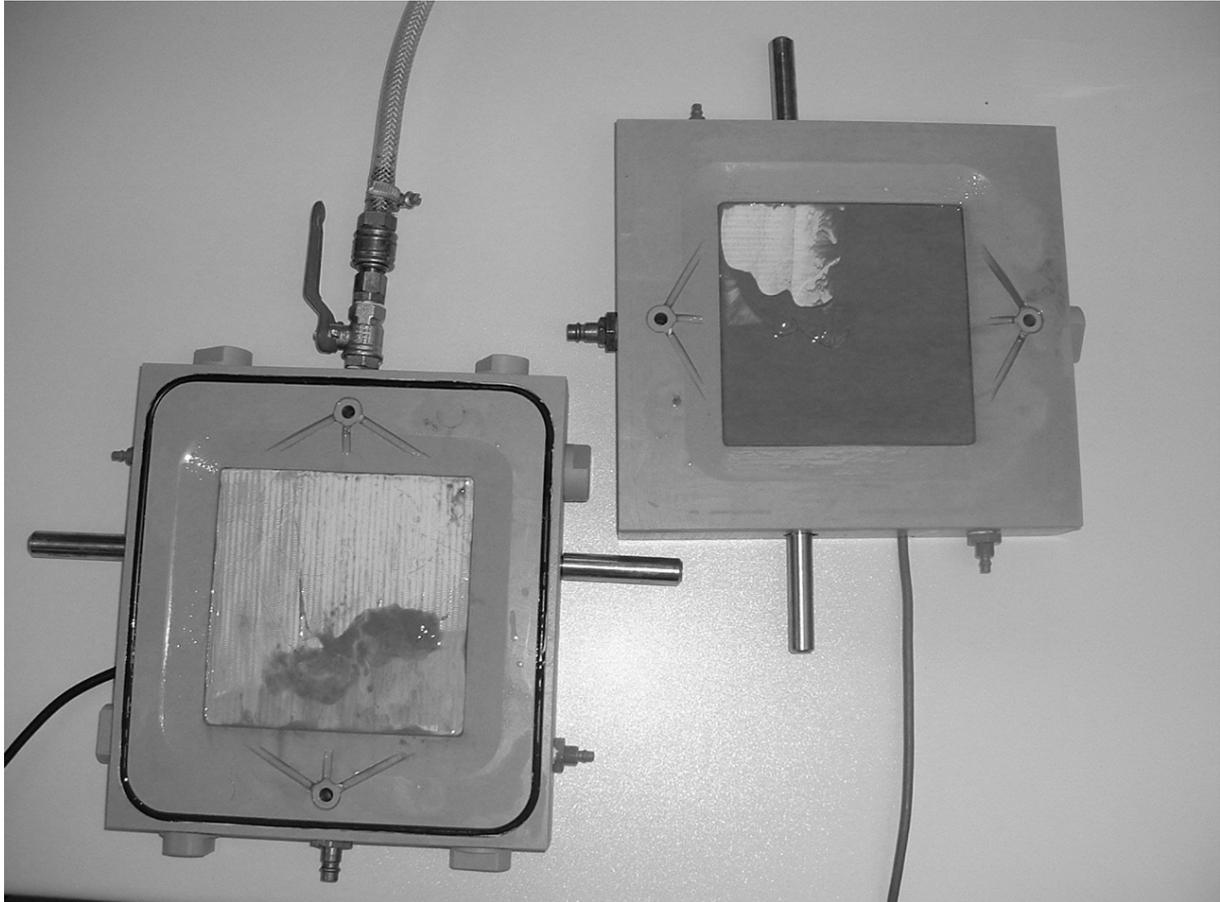


Abbildung 5.5: Filterkuchen der Anoden- und der Kathodenseite bei der zweiseitigen Elektrofiltration von *Bacillus licheniformis*

Für den Versuch, der in Abbildung 5.2 dargestellt ist, wurde eine Modellierung anhand der Gleichungen 2.54 und 2.55 durchgeführt. Die elektroosmotischen Flüsse wurden für die beiden Seiten als gleich groß und damit sich aufhebend betrachtet. Die für die Berechnung verwendeten Werte sind in Tabelle 5.1 dargelegt. Abbildung 5.6 zeigt den Vergleich zwischen simuliertem Verlauf und den tatsächlichen Messwerten mit und ohne elektrischem Feld. Die Filtratmasse bei der Elektrofiltration übersteigt deutlich die simulierten Werte bei beiden angenommenen Zetapotentialen. Für *Bacillus licheniformis* wurde meist ein Zetapotential zwischen -20 mV und -30 mV gemessen. Die dem Modell zugrunde liegende Annahme, dass die zweiseitige Elektrofiltration lediglich durch elektrophoretische Wanderungen beeinflusst wird, ist somit nicht ausreichend für die Beschreibung der Realität. Somit ist auch dies ein Hinweis für die verändernde Wirkung des E-Felds auf die Struktur des Filterkuchens, der die Filtration stark beeinflusst. Weiterhin könnten sonstige Stoffe, wie Proteine oder Polysaccharide, welche sich in der Suspension befinden,

eine Rolle spielen. Diese können eine von den Bakterien verschiedene elektro-phoretische Mobilität und auf den Filterkuchenwiderstand deutlichen Einfluss haben.

Tabelle 5.1: Simulationsparameter für die Betrachtung des Filtratflusses

Parameter	Wert	Quelle
R_M	$1,1 \cdot 10^{11} \text{ m}^{-1}$	Über Messung PWF der Membran
α_F	$3,3 \cdot 10^{15} \text{ m/kg}$	Bestimmung aus Pressfiltrationsversuch
ζ	-20 mV / -30 mV	Bestimmung mittels Zetasizer
v_{em}	$-5,2 \cdot 10 / -7,8 \cdot 10 \text{ } \mu\text{m/s}$	Gleichung 2.11
η	1 mPa s	Wert von Wasser

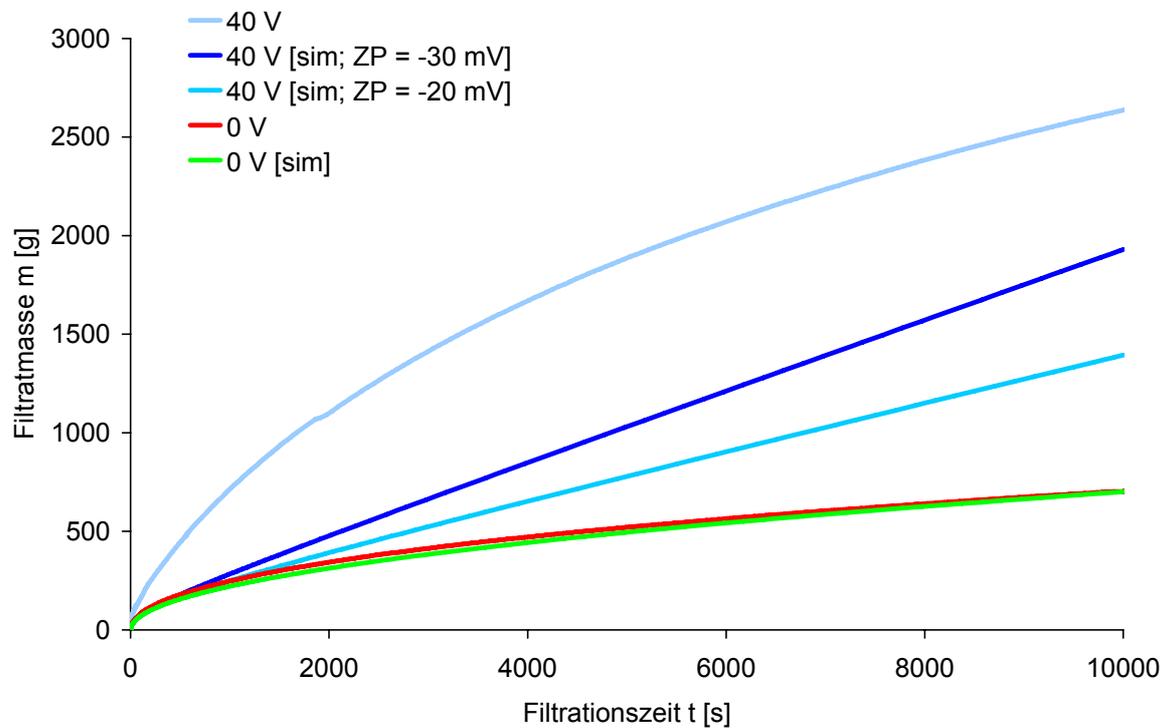


Abbildung 5.6: Berechnung des Filtratflusses über der Zeit für das beschriebene Modell; Vergleich mit der Messung

5.2 Einsatz der Elektro-Ultrafiltration zur Konzentrierung von Proteinen

Proteine werden häufig mit Ultrafiltrationsschritten aufkonzentriert. Auch hier ist ein Einsatz der Elektrofiltration möglich. Am Beispiel der Konzentrierung von BSA soll

hier der Unterschied zu den Vorgängen bei der Elektro-Mikrofiltration im vorigen Kapitel aufgezeigt werden. Abbildung 5.7 zeigt eine t/V über V Kurven für eine BSA-Filtration mit und ohne elektrischem Feld. Es ist zu erkennen, dass die Filtrationskinetik durch das E-Feld verbessert wird. Allerdings ist im Unterschied zu der Bakterienmikrofiltration auch ein Abflachen der Kurve der Filtration ohne E-Feld zu erkennen. Dieses hat seinen Grund in der Rückdiffusion, welche hier ebenfalls eine Rolle spielt (siehe Gleichung 2.49). Für BSA wird auch ein Sedimentationseffekt beschrieben, der bei senkrecht zur Schwerkraft stehender Filteroberfläche einen die Filtration begünstigenden Effekt auslöst (Iritani et al. 2002). Teile des Filterkuchens, die an der Membran gelartige Struktur besitzen können, sedimentieren bei einer bestimmten Konzentration zum Filterkammerboden und geben so Membranfläche für die Filtration frei. Es wurde bei den Versuchen eine optisch sich stark unterscheidende Schicht, die während der Filtration unten in der Filterkammer entstand, beobachtet. Diese besteht aus der sedimentierten konzentrierten BSA-Lösung.

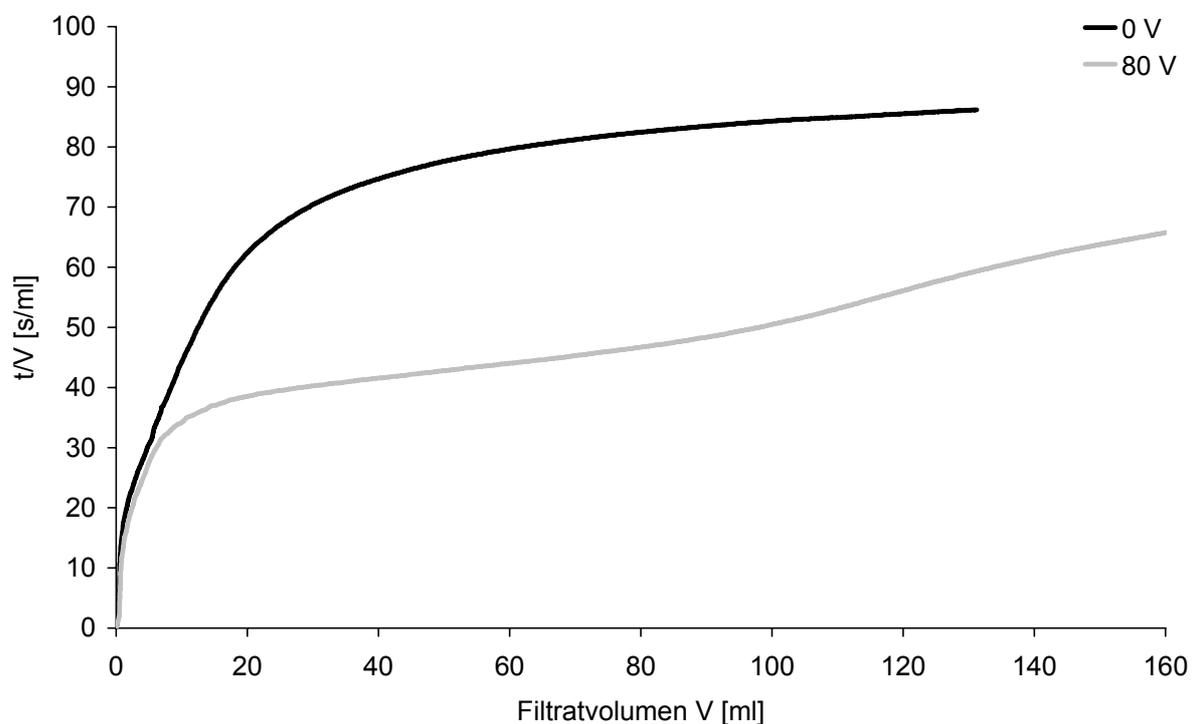


Abbildung 5.7: Filtratmenge über der Zeit bei einer Filtration von BSA ($c_0 = 1$ g/l); Membran: 10 kDa PES; pH=7

Auch für die Filtration industrieller Enzyme wurde der stabilisierende Effekt der Rückdiffusion in Versuchen beobachtet.

5.3 Fraktionierung von Proteinen mittels Elektro-Ultrafiltration

Beim Einsatz der Elektrofiltration zur fraktionierenden Filtration von Proteinen werden die Trennprinzipien Größe und Ladung zur selektiven Trennung von einander benutzt. Das Gemisch BSA und Lysozym dient in vielen Untersuchungen zur Evaluation von Ultrafiltrationsverfahren als häufig gewähltes Modellsystem für die Fraktionierung von Proteinen (Bellara et al. 1997; Ghosh und Cui 1998; Ghosh et al. 1998; Iritani et al. 1995; Mukai et al. 1998). BSA und LZ unterscheiden sich in ihrer Ladung. Die Größe ist jedoch nicht stark unterschiedlich, wie aus Tabelle 3.2 zu entnehmen ist. Normalerweise wird für den fraktionierenden Einsatz der Ultrafiltration ein Größenunterschied der zu trennenden Komponenten von einer Größenordnung vorausgesetzt (Ghosh 2003a). Um auch bei geringerem Unterschied eine ausreichende Selektivität zu erreichen, wurde das Konzept der zweiseitigen Elektrofiltration derart modifiziert, dass auf den beiden Seiten unterschiedliche Membranen gewählt wurden. Die Grundidee ist in Abbildung 5.8 dargestellt.

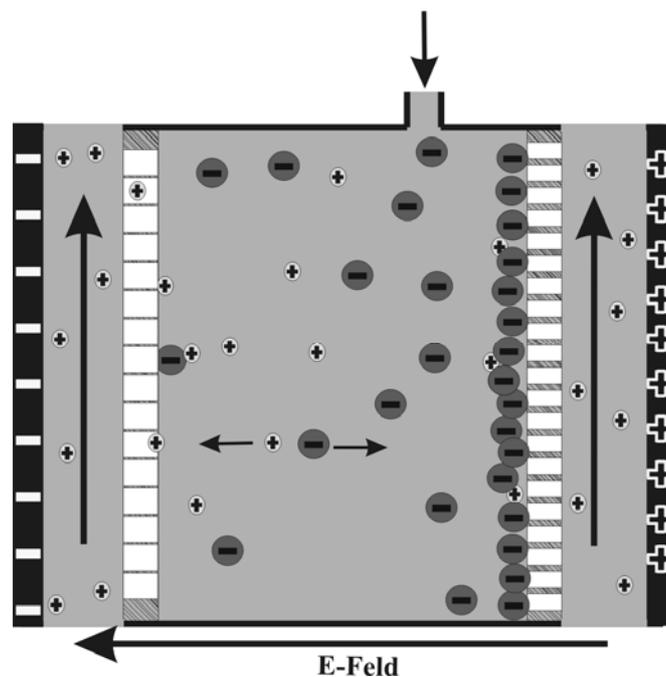


Abbildung 5.8: Schematische Darstellung der Vorgänge in der Filterkammer bei der zweiseitigen Elektro-Ultrafiltration; rechts 10 kDa-Membran; links 50 kDa-Membran; (+ Anode; - Kathode)

Für die Filtrationsversuche wurde eine 10 kDa-Membran auf der Anodenseite angebracht. Hier sollte das negativ geladene BSA abgeschieden werden. Auf der Kathodenseite wurde eine 50 kDa Membran genutzt. Auf dieser Seite sollte hauptsächlich das positiv geladene LZ die Membran passieren. Somit sollte die Membranplatzierung auch der mit dem E-Feld eingeführten Anisotropie entsprechen. Bei den Versuchen sollte Lysozym die Membran passieren, also eine hohe Transmission zeigen, BSA hingegen zurückgehalten werden, also einen geringen Transmissionswert aufweisen. Abbildung 5.9 zeigt den Verlauf der Transmissionen vergleichend mit und ohne elektrischem Feld bei einer geringen Leitfähigkeit von 0,156 mS/cm. Ohne elektrisches Feld wurden bei gleicher Versuchszeit geringere Filtratvolumina erreicht. Bei etwa 30 ml können die Werte verglichen werden. Hier konnten ohne E-Feld nur 6 % der LZ-Moleküle ins Filtrat gelangen. Dieser Wert konnte durch das E-Feld auf über 50 % gesteigert werden. Auch die BSA-Werte unterschieden sich. Mit E-Feld gelangten nur 0,3 % ins Filtrat, während dieser Wert bei 0,5 % ohne E-Feld lag. Es ist also deutlich die elektrophoretische Wirkung zu erkennen, die zu einer örtlichen Separation vor der Trennung an der Membran führt. Die erreichte mittlere Transmission von 60 % ist sicherlich noch verbesserungsfähig, jedoch ist aus Abbildung 2.11 zu erkennen, dass für das Verhältnis Lysozym und Membran ($MW_{LZ}/MW_{CO}=0,28$) etwa 77 % Transmission beim Reinstoff realistisch sind. In diesem Licht betrachtet sind die erreichten 60 % sehr gut.

Die Auswirkung auf die Selektivität ist in Abbildung 5.10 zu erkennen. Es können sehr hohe Werte der Selektivität erreicht werden. Für in der Literatur beschriebene Verfahren zu Trennung von BSA und Lysozym im Cross-Flow ist lediglich eine maximale Selektivität von 220 erwähnt (Ghosh und Cui 1998). Durch das E-Feld konnten Werte über 800 erreicht werden. Dies entspricht etwa einer molekularen Selektivität von 4000, also pro BSA-Molekül, das die Membran passiert, gelangen 4000 LZ Moleküle ins Filtrat.

Zum Vergleich der Elektro-Ultrafiltration mit anderen Verfahrensansätzen sei auf die Literatur verwiesen (Kaepler und Posten 2007).

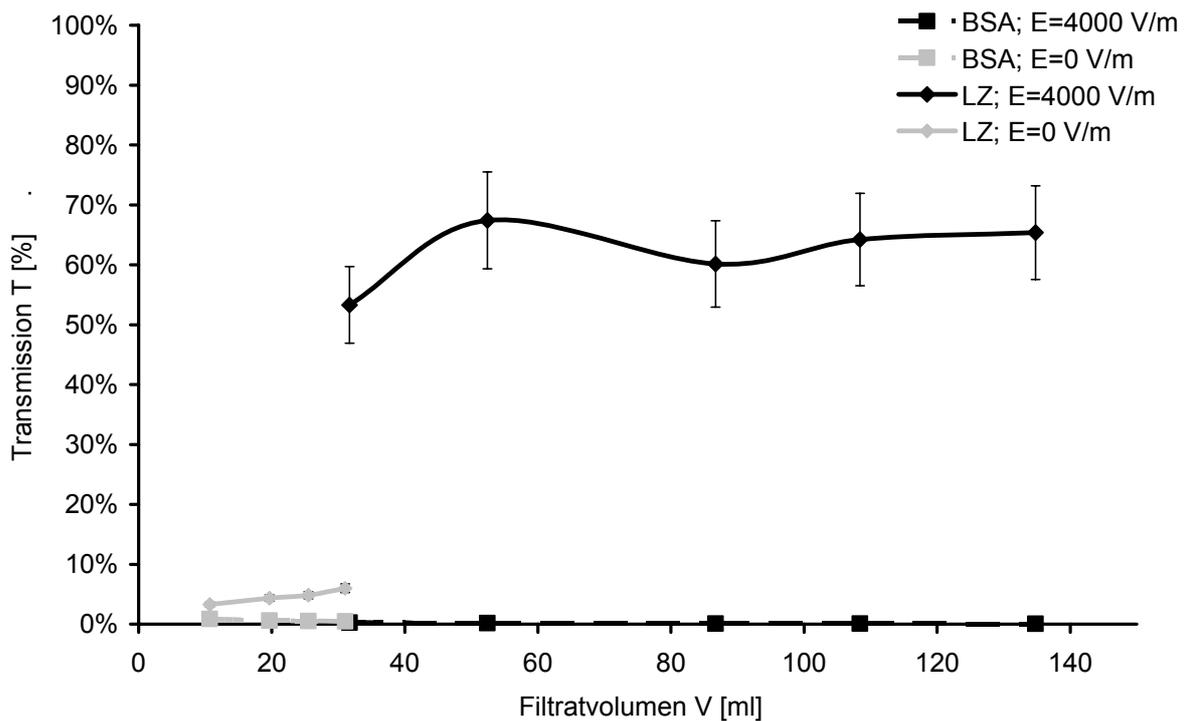


Abbildung 5.9: Transmission von BSA und LZ bei einer fraktionierenden Elektro-Ultrafiltration mit angelegter Spannung von 80 V und 0 V; ($c_{0,BSA}=1$ g/l; $c_{0,LZ}=1$ g/l; $\kappa=0,156$ mS/cm; Membran Anode: 10 kDa PES; Membran Kathode: 50 kDa PES)

Neben der Selektivität soll das fraktionierende Elektrofiltrationsverfahren auch die Kinetik der Filtration auf hohem Niveau ermöglichen. Abbildung 5.11 zeigt beispielhaft den spezifischen Filtratfluss einer Filtration mit und ohne elektrischem Feld. Es ist zu erkennen, dass dieser deutlich durch die Nutzung des elektrischen Feldes hoch gehalten werden kann. Bei einer Aufkonzentrierung des BSA auf über 10 g/l konnte ein durchschnittlicher Filtratfluss von 52 l/(m² h) erreicht werden (bezogen auf die kathodenseitige Membran). Die Wanderung von BSA zur Anodenseite bewirkt einen verringerten Deckschichtaufbau auf der Kathodenseite, der neben LZ auch die Filtratströmung weniger behindert.

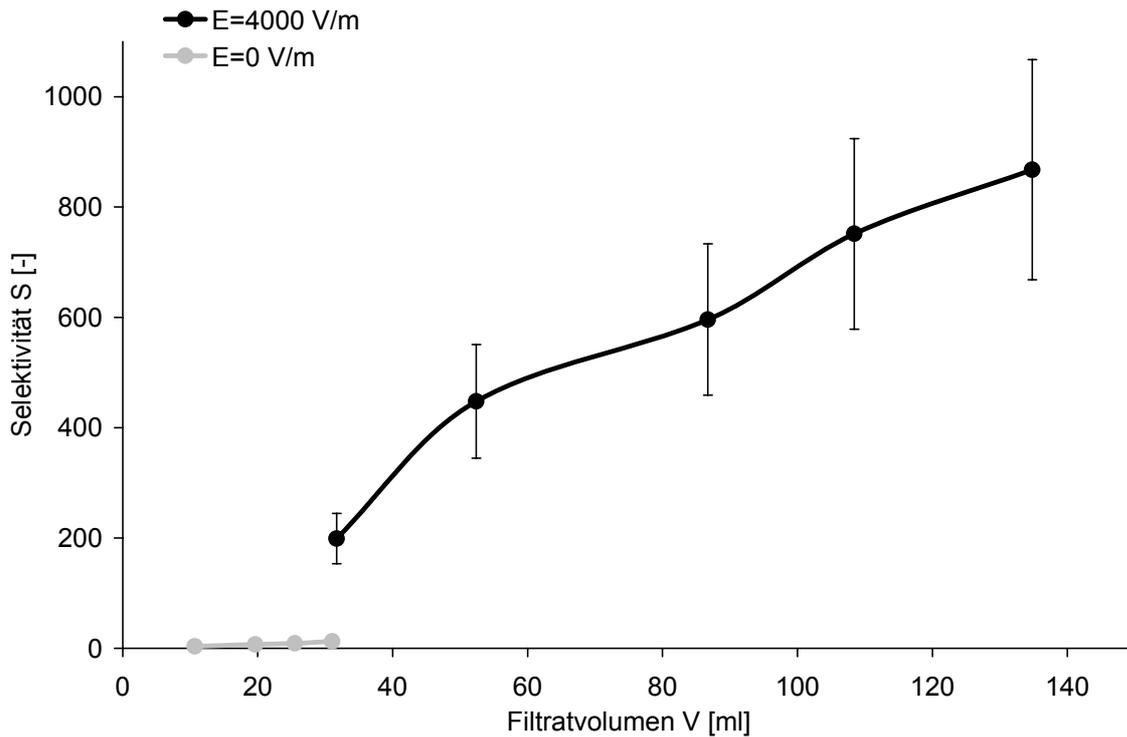


Abbildung 5.10: Selektivität über dem Filtratvolumen; für die letzten vier Werte mit elektrischem Feld war die LZ-Konzentration unter der Nachweisgrenze von 0,25 mg/l; diese wurde zur Berechnung verwendet

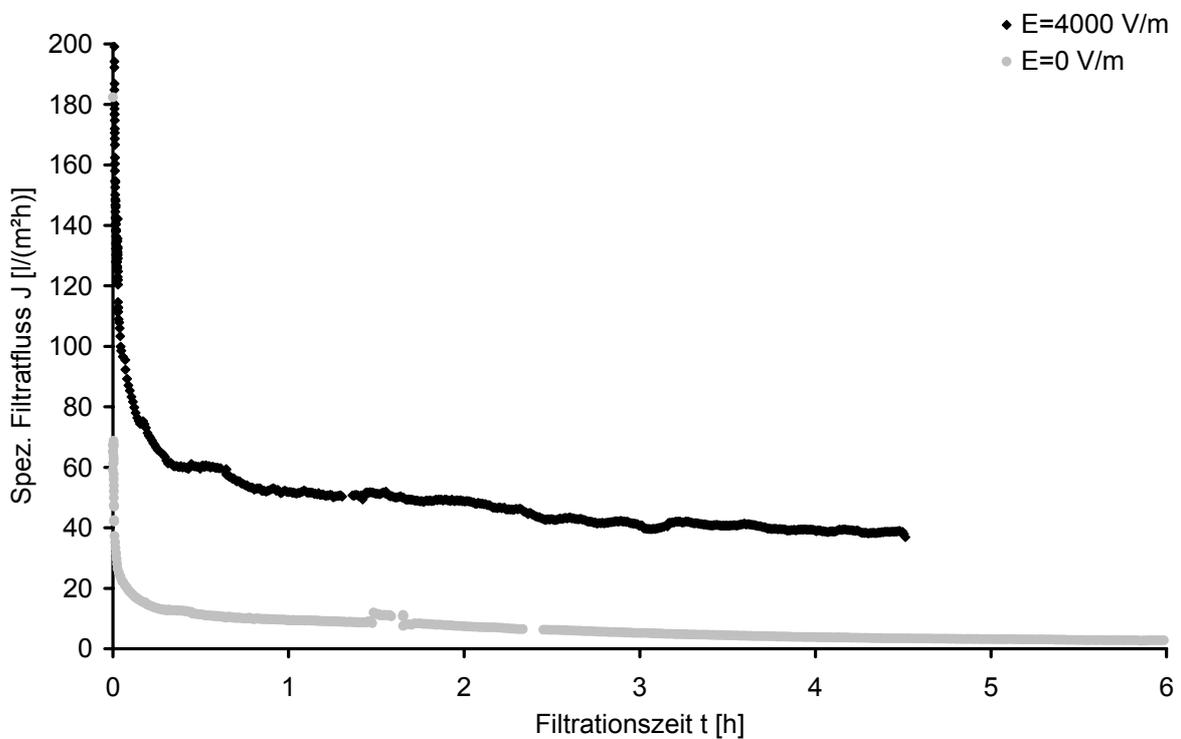


Abbildung 5.11: Spezifischer Filtratfluss über der Filtrationszeit bei der fraktionierenden Elektro-Ultrafiltration von BSA ($c_0=0,5$ g/l) und LZ ($c_0=0,4$ g/l); Membran Anode: 10 kDa PES; Membran Kathode: 50 kDa PES

Der positive Einfluss des E-Feldes ist auch dann vorhanden, wenn beispielsweise kein Einfluss des angelegten Druckes festzustellen ist. Abbildung 5.12 zeigt die Filtratmassen über der Zeit bei Versuchen, welche sich lediglich in den E-Feldern und im angelegten Druck unterschieden. Die Erhöhung von ein auf zwei bar bewirkt keinen Effekt, während das Anlegen des E-Feldes die Performance der Filtration deutlich steigert. Bei dieser Mischung aus BSA und LZ war wohl eine Kompressibilität des Filterkuchens gegeben, welche den Effekt der Druckerhöhung hinsichtlich des Filtratflusses hinfällig werden ließ.

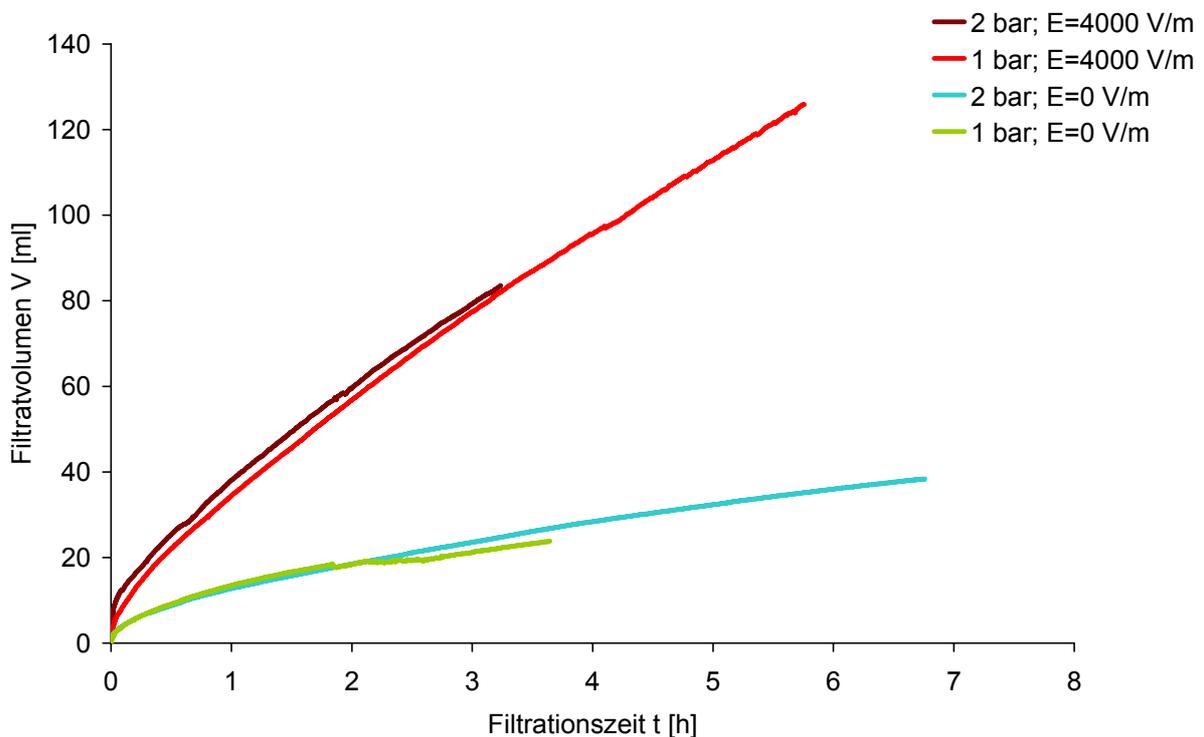


Abbildung 5.12: Filtratvolumen über der Zeit bei unterschiedlich großem angelegtem Druck; mit und ohne elektrischem Feld; Membran Anode: 10 kDa PES; Membran Kathode: 50 kDa PES

Die Elektrofiltration ist also ein geeignetes Mittel zur Fraktionierung von Proteinen, das auch dann eingesetzt werden kann, wenn andere Prozessparameter kaum eine Verbesserung ermöglichen.

Allerdings können Prozessparameter auch entscheidenden Einfluss auf die Effektivität des E-Feldes haben. So ist in Abbildung 5.13 der Einfluss der Leitfähigkeit zu erkennen. Bei 0 V ist zwischen der Lösung mit hoher Leitfähigkeit und derjenigen mit niedriger anders als bei der Mikroorganismenfiltration kaum ein Unterschied

festzustellen. Jedoch unterscheiden sich die Kurvenverläufe deutlich beim Anlegen von 80 V Spannung (4000 V/m). Hierbei sind wohl die anziehenden Wechselwirkungen zwischen BSA und LZ bei geringen Ionenstärken entscheidend. Die zusammengelagerten Moleküle können die Membran nicht passieren und sind vor allem durch das E-Feld weniger beeinflussbar. Somit kann der E-Feld-Effekt bei höherer Ionenstärke in diesem Fall besser greifen als dies bisher diskutiert wurde (siehe Kapitel 5.1). Eine hohe Ionenstärke bei einem Einstoffsystem hat eine geringere Oberflächenladung zur Folge, welche den E-Feld-Einfluss generell mindert. Bei der Fraktionierung gibt es zwei gegenläufige Tendenzen, wenn man die Ionenstärke der Lösung betrachtet. Zum einen wird mit steigender Ionenstärke die Ladung vermindert und damit der elektrophoretische Effekt verkleinert, was für die Effizienz des E-Feldes negativ ist. Zum anderen wird jedoch auch die Zusammenlagerung von Proteinen verringert, welche durch die gegensätzliche Ladung der beiden Proteine begünstigt wird. Diese Auswirkung erhöht die Selektivität der Elektro-Ultrafiltration. Tabelle 5.2 zeigt die Fraktionierungsdaten der vier Versuche im Vergleich.

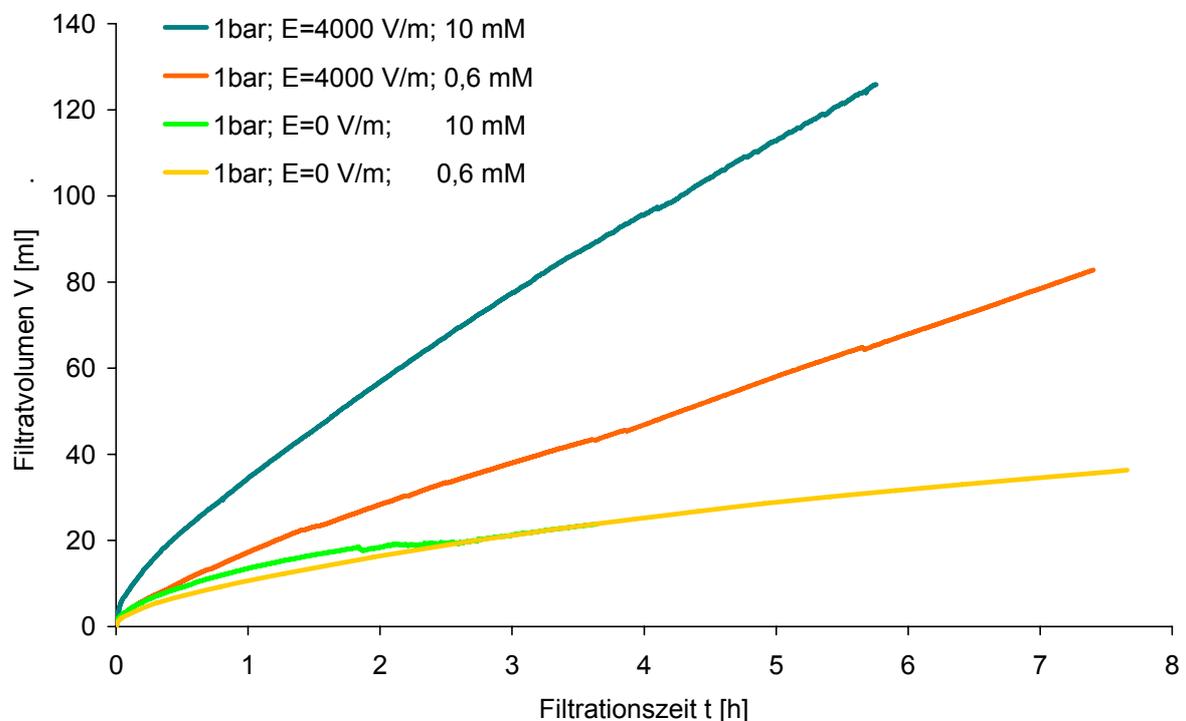


Abbildung 5.13: Einfluss der Leitfähigkeit auf den Effekt des elektrischen Feldes; Membran Anode: 10 kDa PES; Membran Kathode: 50 kDa PES

Tabelle 5.2: Daten bzgl. der Untersuchungen des Einflusses der Ionenstärke auf die fraktionierende Elektro-Ultrafiltration

E-Feld (angelegt)	Pufferkonz.*	T (LZ)	T (BSA)	S_{LZ/BSA}	Filtratfluss J [l/(m²h)]
4000 V/m	1,2 mM	43,5 %	1,0 %	44	12,9
0 V/m	1,2 mM	3,1 %	1,1 %	2,7	5,4
4000 V/m	20 mM	53,3 %	0,26 %	199	36,5
0 V/m	20 mM	5,9 %	0,47 %	12,7	6,4

*Phosphatpuffer; äquimolar

5.3.1 Betrachtung der Zerstörung von Enzymen bei direktem Elektrodenkontakt während der fraktionierenden Elektro-Ultrafiltration

Bei der Fraktionierung von Proteinen mittels Elektro-Ultrafiltration kommen die LZ-Moleküle in direkten Kontakt mit den Elektroden, da sie im Spülkreislauf geführt werden. Somit ist die Frage, ob es zu einer Schädigung der Enzyme an den Elektroden kommt. Hohe E-Felder, die eine Schädigung der Enzyme erwarten lassen, sind lediglich in direkter Elektrodennähe zu erwarten. Die Helmholtzschicht, innerhalb welcher die Reaktion stattfindet, ist um mehrere Zehnerpotenzen kleiner als der Elektroden-Spülraum. Eine Schädigung der Enzyme sollte zunächst einen Unterschied zwischen gemessener Aktivität und Konzentration erwarten lassen, da die Proteine auch im denaturierten Zustand durch die Proteinkonzentrationsanalytik nachweisbar sind. In Abbildung 5.14 sind die Werte für Versuche mit und ohne E-Feld dargestellt, die mittels Aktivitätstest und mittels Proteinanalytik erhalten wurden. Die Unterschiede sind im Bereich der Messabweichungen und somit ist keine signifikante Zerstörung durch das E-Feld erkennbar.

Allerdings ist für die Verarbeitung von Enzymen, die hochrein sein müssen, beispielsweise im Pharmabereich, eine zusätzliche Trennung der Elektrode vom Spülkreislauf durch eine Membran sinnvoll.

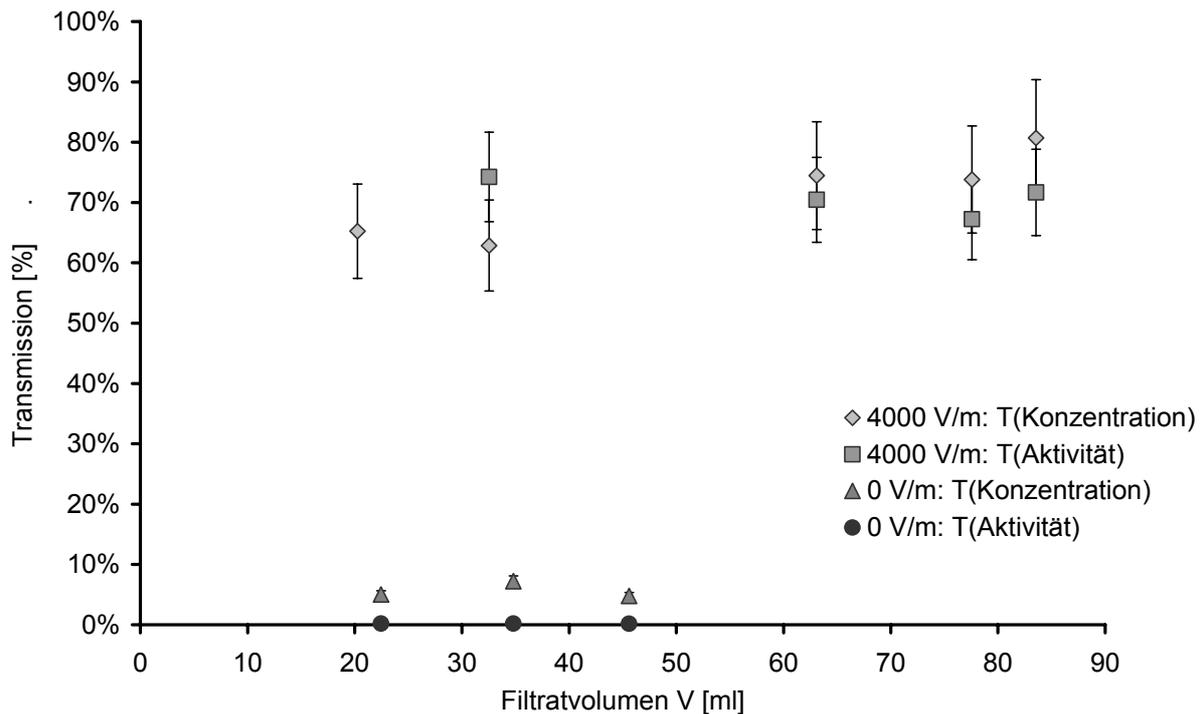


Abbildung 5.14: Transmissionswerte bei der Filtration mit und ohne elektrischem Feld anhand der Proteinkonzentrationsbestimmung und anhand der Aktivitätsbestimmung

Betrachtet man eine Elektrofiltration mit 20 mM Phosphatpuffer, bei der ein Strom von 200 mA für 6 h in der Laborapparatur fließt und dabei die Wasserspaltung die einzige Elektrolysereaktion sei, so werden durch die Elektrolyse insgesamt 0,4 g Wasser gespalten. Bei dem vorhandenen Spülpuffer von 200 ml bedeutet dies, dass etwa 0,2 % gespalten werden. Überträgt man diesen Wert auf das Protein, so kann man sehen, dass die zerstörte Menge Protein innerhalb der Abweichungen der Messungen ist. Man muss Verluste in diesem Größenbereich jedoch bei direktem Elektrodenkontakt berücksichtigen, wenn die Anwendung für hochreine Produkte dienen soll. Eine quantitative Aussage über die Menge zerstörten Enzyms ist durch die genaue Analyse der dabei entstehenden Spaltprodukte möglich.

6 Untersuchung der ISMS

Die *in-situ* Magnetseparation (ISMS) ist ein neuartiges Verfahren, das die Magnetseparation als ISPR-Methode nutzt. Hierbei werden mit Hilfe von magnetisierbaren Adsorptionspartikeln Wertprodukte oder Störstoffe direkt aus der Biosuspension während der Produktion abgetrennt.

6.1 Separation von Modellproteinen mit Ionentauscher-Magnetpartikeln

Es wurden in dieser Arbeit Ionentauscher-Komposit-Magnetpartikel verwendet, wie sie in Kapitel 3.2.1 beschrieben sind. Die Ionentauschfunktionalisierung lässt keine hochselektive Adsorption zu, wenn neben dem abzutrennenden Stoff weitere gleich geladene Komponenten vorhanden sind. Weiterhin ist die Oberfläche der Partikel nicht vollständig mit funktionellen Gruppen belegt (siehe Abbildung 3.11). Trotz dieser Punkte haben die Partikel Vorteile gegenüber herkömmlich produzierten Magnetpartikeln und somit sollte der Einsatz in der Bioseparation untersucht werden. Die Methode zur Fabrikation von Ionentauscher-Magnetpartikeln mittels Sprühtrocknung zeichnet sich im Vergleich zu Alternativverfahren durch den flexiblen Einsatz aus, da die funktionelle Gruppe leicht ausgetauscht werden kann und durch die Skalierbarkeit des Herstellungsverfahrens in der Sprühtrocknung (Kaepler et al. 2008). Weiterhin ist denkbar, dass es vorteilhaft sein kann, dass bei diesen Kompositpartikeln die Oberflächen-Eigenschaften durch zwei Komponenten bestimmt werden. Dadurch wird den Partikeln die adsorptive Funktionalität, aber auch die Möglichkeit einer Anreicherung in einer bestimmten Phase (durch das Matrixpolymer) gegeben. Dies könnte beispielsweise für eine wässrige zwei-Phasen-Magnetextraktion von Vorteil sein, die eine Kombination von Magnetseparation und zwei-Phasen-Extraktion darstellt (Becker und Franzreb 2007).

Um die neuen Magnetpartikel für den Einsatz in der Bioseparation zu qualifizieren, wurden zunächst ihre Adsorptionskapazitäten für Modellproteine untersucht. Die für die untersuchten Partikel ermittelten Adsorptionsisothermen sind in Abbildung 6.1 dargestellt. Sie wurden jeweils in 20 mM Phosphatpuffer aufgenommen, bei einem pH-Wert, bei dem Partikel und Protein entgegengesetzt geladen sind.

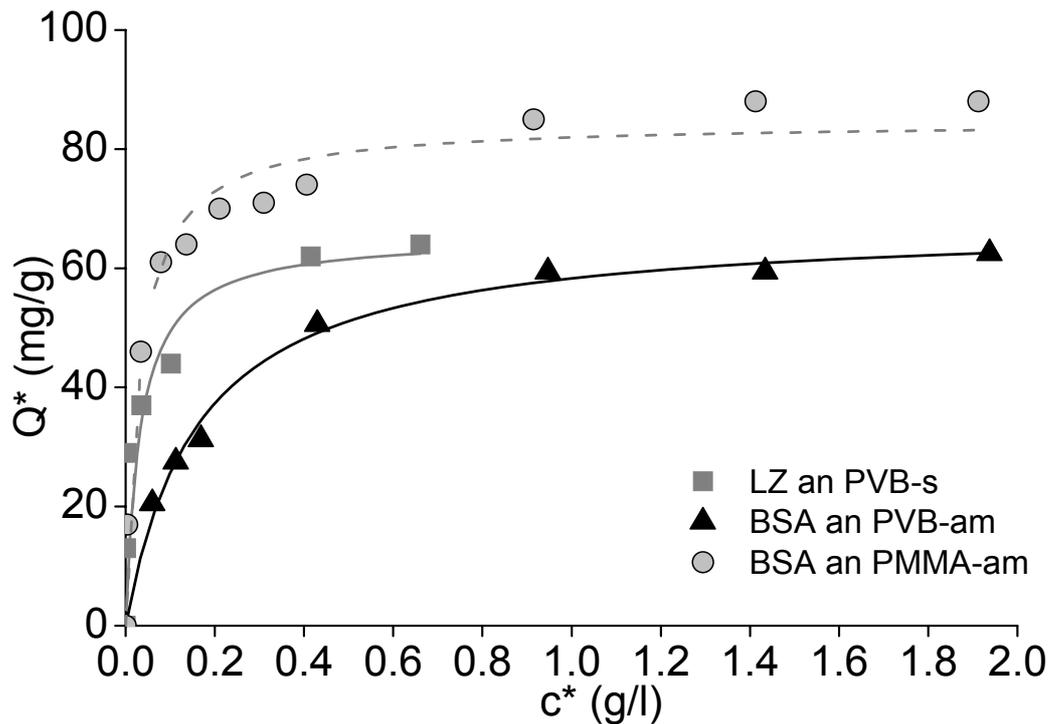


Abbildung 6.1: Adsorptionsisothermen der Ionenaustauscher mit den Modellproteinen Lysozym und BSA

LZ an PVB-s Partikel; (pH 7; 20 mM PBS): K_d : 33 mg/l, Q_{max} : 65 mg/g;

BSA to PVB-am beads (pH 6; 20 mM PBS): K_d : 163mg/l Q_{max} : 68 mg/g;

BSA to PMMA-am beads (pH 5; 20 mM PBS): K_d : 32 mg/l, Q_{max} : 85 mg/g

Die maximale Beladung (Q_{max}) ist vergleichbar mit Literaturwerten von Magnetpartikeln ähnlicher Größe (Franzreb et al. 2006). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bei der Annahme eines ideal kugelförmigen Magnetpartikels der Platzbedarf für die Proteine in der ermittelten Menge (siehe Abbildung 6.1) in einer Monolayer deutlich höher ist als auf der Kugel möglich. Abbildung 6.2 zeigt, wie viel Protein maximal in einer Monolayer adsorbiert werden kann, bei der Annahme kugelförmiger Magnetpartikel und kugelförmiger Proteine. Die Proteine sind hierbei dicht gepackt, so dass das Verhältnis maximal einnehmbarer Protein-Projektionsfläche zur Gesamtfläche folgendermaßen gegeben ist:

$$\frac{A_{\text{Protein}}}{A_{\text{Part.oberfl. max}}} = \frac{\pi}{2\sqrt{3}} \approx 0,91$$

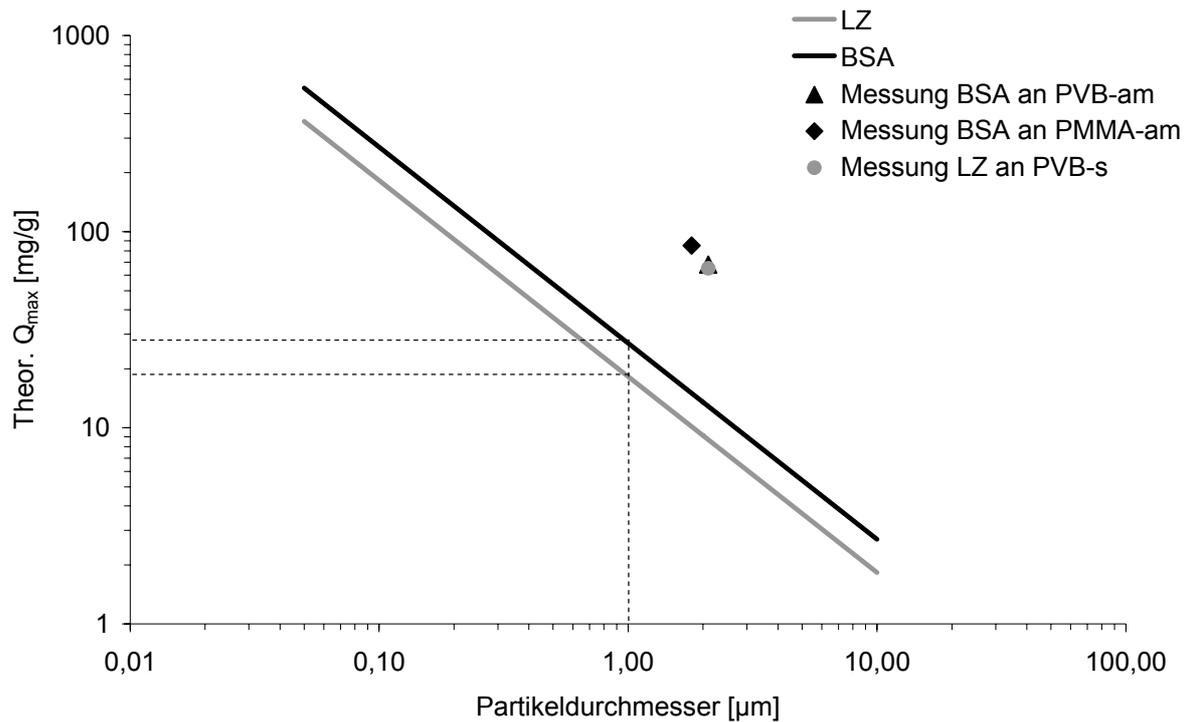


Abbildung 6.2: Anhand des Platzbedarfs berechnete theoretische maximale Beladung von LZ und BSA auf kugelförmigen Magnetpartikeln; Dichte der Partikel $2,5 \text{ g/cm}^3$; Die drei Messpunkte aus der Adsorptionsisotherme (Q_{max}) sind als Vergleich eingetragen

Es ist also zu erkennen, dass die Adsorption auf den verwendeten etwa $2 \text{ }\mu\text{m}$ großen Partikeln höher ist als nach Abbildung 6.1 zu erwarten, wobei die Partikeloberfläche nicht nur aus funktionellen Gruppen besteht. Der Anteil an funktioneller Oberfläche ist abzuschätzen über den Massenanteil an funktionellen Ionentauschern in den Partikeln (Tabelle 3.5). Die Übertragbarkeit des Massenanteils auf den Oberflächenanteil wurde durch Ionentauschkapazitäts-Bestimmungen bestätigt. Die Adsorption in der gegebenen Größenordnung ist jedoch dadurch höher als bei den getroffenen Annahmen bestimmt, dass die Partikel eine gewisse Porosität bzw. Oberflächenrauhigkeit besitzen und des Weiteren der hydrodynamische Radius des Proteins nach Adsorption durch Konformationsänderungen und Reduktion der Hydrathülle verringert werden kann (Norde et al. 1986). Auch ist die Annahme für kugelförmige Partikel wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, nicht vollständig gegeben. Dies führt zu einer Erhöhung der Oberfläche. Die BET-Werte für PMMA-Partikel beispielsweise sind mit $9,6 \text{ m}^2/\text{g}$ sieben mal so groß wie für runde Partikel zu erwarten.

Weiterhin ist eine Mehrschichtenadsorption nicht auszuschließen. Die unspezifische Adsorption an die nicht-funktionelle Oberfläche wurde hingegen als sehr klein bestimmt, indem die Adsorption an Partikeln untersucht wurde, die lediglich aus Magnetit und Matrixmaterial bestanden, also der Massenanteil der Ionentauscher Null war.

Zum Einsatz der Ionentauschermagnetpartikel in Bioprozessen müssen diese einer Sterilisations- oder Desinfektionsprozedur unterzogen werden. Jedoch sind die aminierten Partikel nicht durch Hitze, die PVB-Partikel nicht durch Ethanol sterilisierbar. Da die Partikel extremen pH-Werten (1-14) ausgesetzt werden können und anschließend wieder ihre Funktionalität erhalten, kann durch einen extremen pH-Wert zumindest eine Keimreduktion durchgeführt werden. Für die großtechnische Anwendung wäre auch eine sterile Produktion und die anschließende Lieferung an den Anwender in steriler Form möglich.

Zur Dispergierung der Partikel wurde ein Ultraschallbad genutzt. Allerdings zeigte sich eine Reduktion der Adsorptionskapazität durch lange Behandlung im Ultraschallbad (im Minutenbereich). Diese Effekte wurden nicht bei kurzzeitigen Behandlungen (bis zu 30 s) beobachtet.

Für den Einsatz der Ionentauscher-Magnetpartikel wurde eine Voruntersuchung mit reinem Ionentauscher durchgeführt, welcher nicht magnetisch ist und eine hohe Beladungskapazität hat. Dieser wurde einer Biosuspension im Schüttelkolben in großer Menge (1 g) zugesetzt, welcher auch LZ zudosiert war, bzw. anschließend zudosiert wurde. Abbildung 6.3 zeigt den Verlauf der Lysozymkonzentration und der optischen Dichte, also der Biomasse, über der Zeit. Hierbei wurde ein Schüttelkolben verwendet, dem für die drei Untersuchungen innerhalb von drei Stunden der Kultivierung jeweils 20 ml Biosuspension entnommen wurde und dieser Probe die Partikel und das Lysozym zugegeben wurde. Der ersten entnommenen Suspension wurde zunächst LZ zugegeben, anschließend die Partikel. Daher steigt die LZ-Konzentration zunächst an, sinkt jedoch innerhalb kürzester Zeit unter die Nachweisgrenze ab. Der zweiten Suspensionsmenge wurde nur LZ zugegeben ohne Partikel. Daher steigt die LZ-Konzentration dauerhaft auf einen Wert an, der der zugegebenen LZ-Menge entspricht, welche für eine Konzentration von 0,1 g/l sorgen müsste. Der dritten Probe wurden zuerst die Magnetpartikel zugegeben, weshalb hier bei LZ-Zugabe kein Anstieg, bzw. nur ein sehr geringer zu bemerken ist. In den Proben mit Partikeln steigt die OD bedingt durch die Partikel, welche diese erhöhen,

an, sinkt jedoch danach nicht. Bei der zweiten Probe (ohne Partikel) jedoch sinkt die OD, da die Enzymmoleküle zur Zellyse führen. Die Partikel haben also eine protektive Wirkung für die Bakterien. Weiterhin kann diesem Versuch entnommen werden, dass Lysozym prinzipiell mit einer sehr hohen Menge (50 g/l) an den Ionenaustauschpartikeln auch aus Biosuspension, welche eine hohe Ionenstärke hat, gewonnen werden kann.

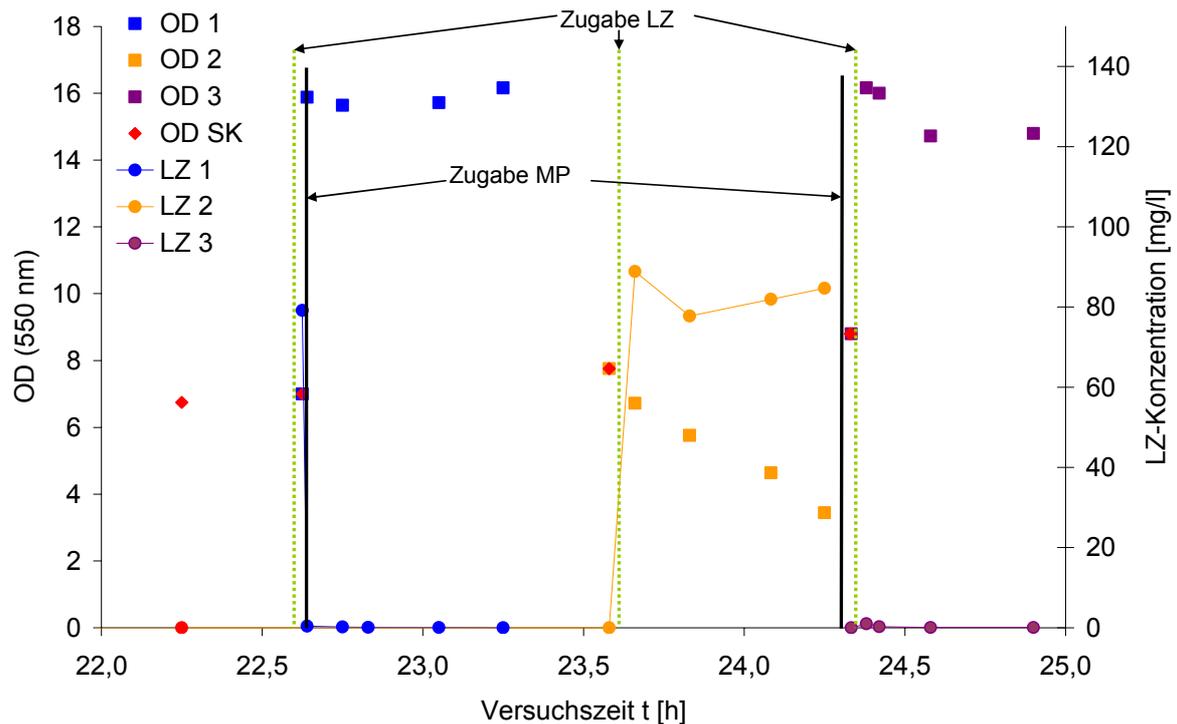


Abbildung 6.3 Abtrennung von LZ aus Schüttelkolbenkultivierungen mit reinen Ionenaustauschpartikeln in drei Versuchen

Die Ionenaustauscher-Magnetpartikel wurden ebenfalls in Schüttelkolben eingesetzt. Hier wurde die Konzentration der Partikel deutlich geringer gewählt und die Menge an zugegebenem Protein erhöht. Abbildung 6.4 zeigt den Verlauf der Protein- und LZ-Konzentration in zwei Versuchen beim Einsatz von Magnetpartikeln PVB-s. Diesen wurde LZ zugegeben. Die Daten zeigen den Verlauf der Protein- und LZ-Konzentration über einen Zeitraum von 1,4 h nach der Partikelzugabe. Danach blieben die Werte konstant (angedeutet durch die Linien). LZ wurde so zugegeben, dass sich eine Konzentration von 0,5 g/l bzw. 0,1 g/l einstellen müsste. Allerdings erreichen die Konzentrationen diesen Wert nicht, da das LZ von den Partikeln adsorbiert wird und daher nicht gemessen werden kann. Bei der Zugabe von 0,1 g/l LZ steigt die

Konzentration des LZ kurzzeitig an, jedoch wird es schnell adsorbiert und der Wert sinkt auf Null ab. Im Falle der Zugabe von mehr Protein (0,5 g/l) wurde nur 80 % adsorbiert. Es konnte jedoch im Vergleich zum Kolben ohne Magnetpartikel eine deutliche protektive Wirkung für die Mikroorganismen festgestellt werden, wenn man den Verlauf der OD betrachtet (Abbildung 6.5). Der relative Abfall der optischen Dichte zeigt, dass bei der Zugabe von 0,5 g/l LZ dreißig Prozent weniger Bakterien durch Zellyse zerstört werden, wenn Magnetpartikel zugegeben werden. Auch die Proteinkonzentration ist ein Indiz für diesen Schutz. Bei der Zugabe von LZ ohne Magnetpartikel steigt die Gesamtproteinkonzentration auf über 0,8 g/l und bleibt auf diesem Niveau (nicht im Diagramm eingezeichnet). Diese Erhöhung der Konzentration um 0,2 g/l ($c_{\text{Protein},0}=0,1 \text{ g/l}$; $c_{\text{LZ,Zugabe}}=0,5 \text{ g/l}$) ist durch die Proteine zu erklären, die bei der Zellyse freigesetzt werden.

Die adsorbierte Menge LZ war 25 mg/g bei der Zugabe von 0,5 g/l LZ und 10 mg/g bei der Zugabe von 0,1 g/l LZ, wobei im zweiten Fall das Lysozym vollständig entfernt wurde.

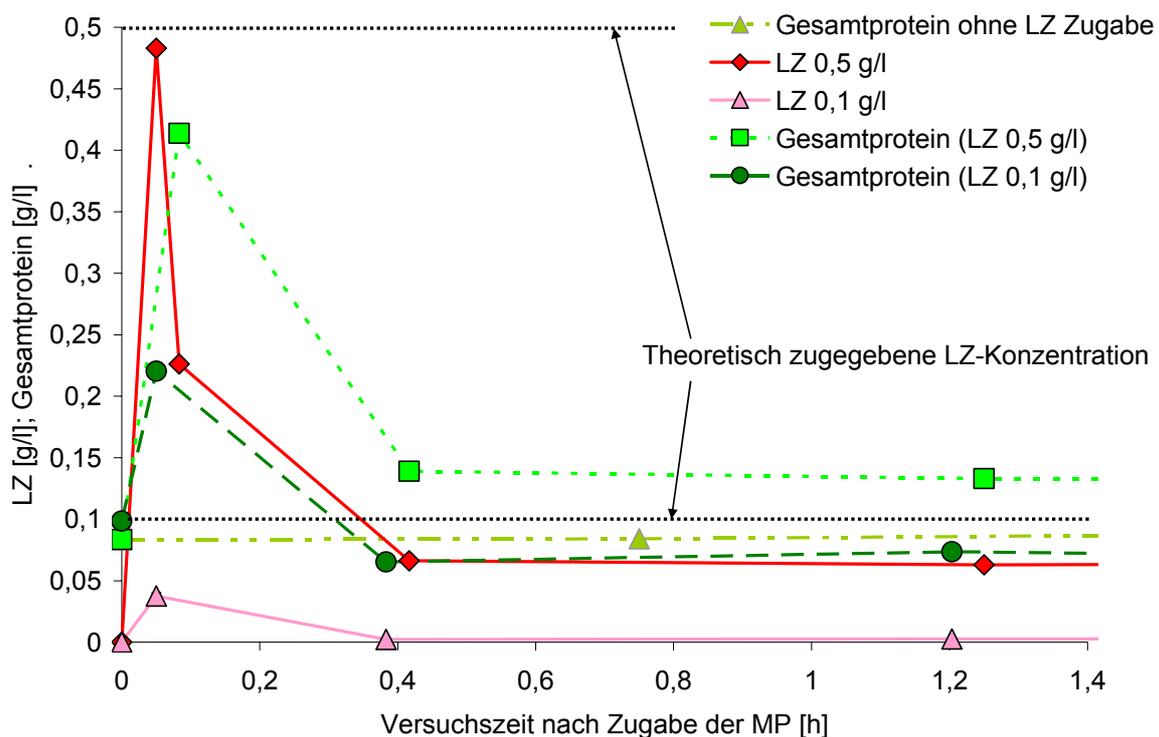


Abbildung 6.4: Lysozymabtrennung aus Schüttelkolbenkultivierungen mit Ionenaustauscher-Magnetpartikeln; Verlauf der Lysozym- und Gesamtproteinkonzentration

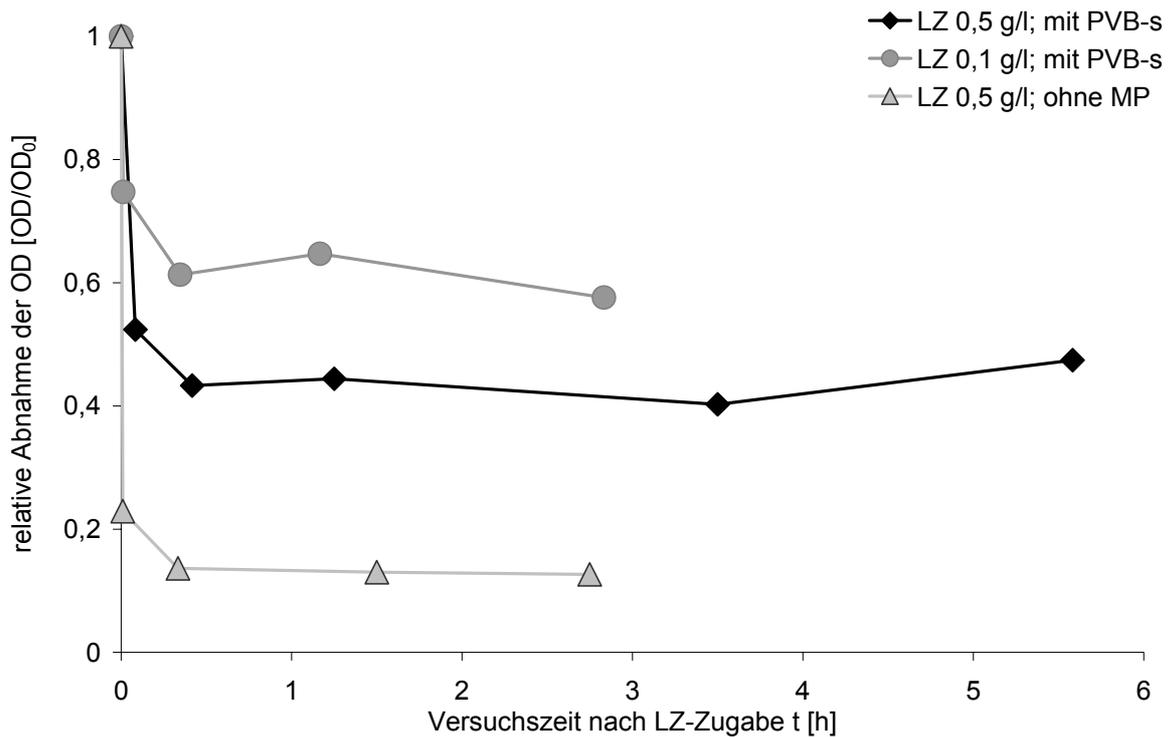


Abbildung 6.5: Verlauf der optischen Dichte bei Zugabe von LZ in An- bzw. Abwesenheit von Ionentauscher-Magnetpartikeln

Auch BSA konnte aus Schüttelkolben mit PVB-am Partikeln abgetrennt werden. Hierbei wurde das BSA ebenfalls Schüttelkolbenkultivierungen zugegeben. Abbildung 6.6 zeigt die BSA-Konzentration nach Zugabe von BSA und Magnetpartikeln. Bei Zugabe von Magnetpartikeln sinkt die BSA Konzentration rasch auf Null ab. Beim Ansatz ohne MP war ebenfalls ein Absinken der BSA-Konzentration zu beobachten, der durch proteolytische Wirkungen von gebildeten Proteasen zu erklären ist.

Bei diesem Ansatz wurden 6 mg/g adsorbiert. In einem weiteren Versuch wurden 0,6 g/l BSA zudosiert, wobei die Adsorptionskapazität lediglich 11 mg/g ergab. Diese geringe Adsorption ist durch die hohe Ionenstärke der Biosuspension zu erklären. Bei gleicher BSA-Menge in der Adsorptionsisotherme war der Wert bei etwa 40 mg/g. Jedoch war die Ionenstärke des Mediums etwa viermal so groß wie beim Puffer der Adsorptionsisotherme. Dadurch ist die Debye-Länge ($1/\kappa$ aus Gleichung 2.32) im Puffer etwa doppelt so groß wie im Medium.

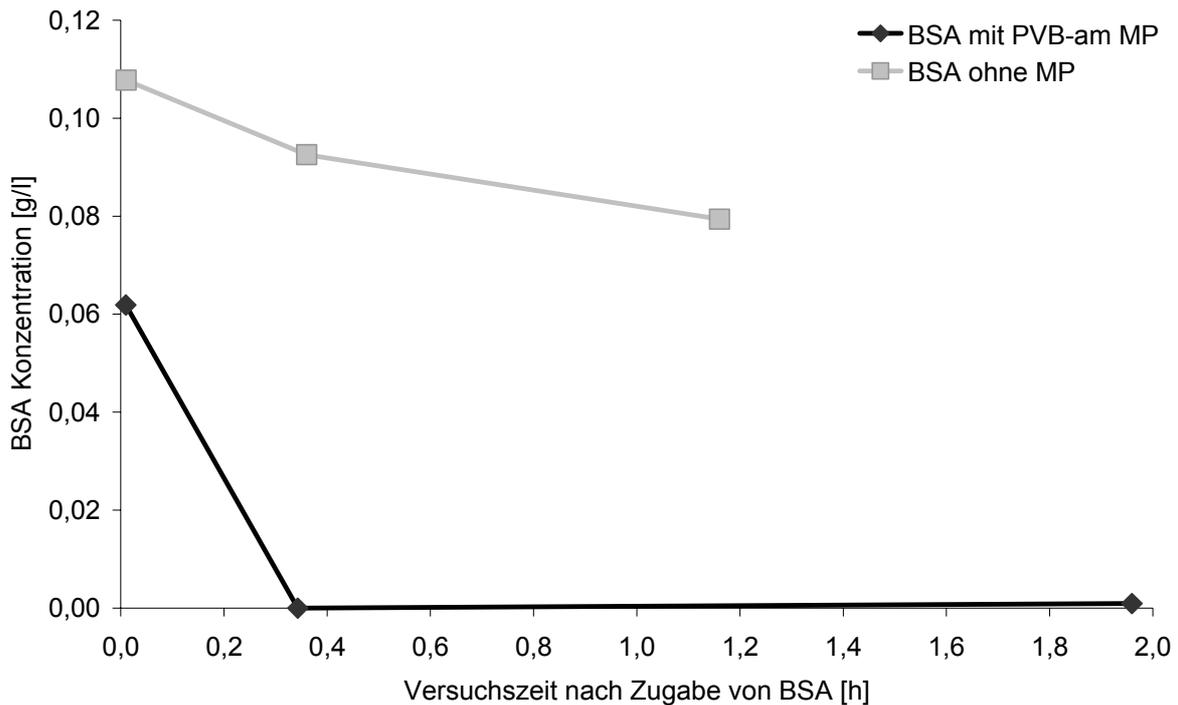


Abbildung 6.6: Verlauf der BSA-Konzentration aus Schüttelkolbenkultivierungen mit bzw. ohne Ionentauscher-Magnetpartikeln

Neben der adsorbierten Menge ist für die Abtrennung von Proteinen aus Kultivierungsbrühen auch die Selektivität der Abtrennung entscheidend. Bei der Abtrennung mittels Ionentausch-Magnetpartikeln ist zu erwarten, dass auch Proteine abgetrennt werden, welche die gleiche Ladung wie das Zielprotein tragen. Diese müssen dann nach der Elution in folgenden Aufarbeitungsschritten vom Wertprodukt abgetrennt werden. Dies ist zwar ein erheblicher Nachteil, jedoch kann bei der Produktion von rekombinanten Proteinen das Zielprotein einen erheblichen Anteil der gesamten gebildeten Proteinmasse ausmachen (30-50 %) (Badyakina und Nesmeyanova 2005). Bei extrazellulären Proteinen ist dieser Anteil noch höher einzuschätzen.

Bei den Untersuchungen im Schüttelkolben waren neben dem zugegebenen Proteinen BSA und LZ auch vom Bacillus selbst produzierte vorhanden. Abbildung 6.7 zeigt ein Bild von einem Gel, das mit Proben aus den Versuchen der Abtrennung von BSA und LZ erstellt wurde. Die Bahnen 2-6 sind von Proben bei der Zugabe von LZ, die Bahnen 7-10 zeigen Proben der BSA-Versuche. Es ist zu erkennen, dass jeweils ein Protein neben den zugegebenen bei 30-45 kDa extrazellulär in größerem Maße gebildet wurde. Dieses extrazelluläre Protein wurde bei der Abtrennung von LZ

mittels PVB-s-Partikeln ebenfalls abgetrennt. Die Bande verschwindet nach der Magnetpartikelzugabe (Bahn 6) ebenso wie das LZ. Die Abtrennung von LZ wurde bereits diskutiert. Es scheint, dass das extrazelluläre Protein ebenfalls eine positive Ladung trägt und sich dadurch wie das LZ an die Partikel anlagert. Dadurch ist auch zu erklären, dass die Gesamtproteinkonzentration bei der Abtrennung von LZ (bei 0,1 g/l Zugabe) unter die anfängliche Gesamtproteinkonzentration sinkt (siehe Abbildung 6.4). Es wird sowohl das gesamte LZ als auch Teile des bereits vorher vorhandenen Proteins abgetrennt. Die SDS-PAGE wurde mit Coomassie-Färbung durchgeführt, weshalb Proteine nur ab einer bestimmten Größenordnung sichtbar sind, also nicht unbedingt nur dieses eine extrazelluläre Protein vorhanden ist.

Im Falle der BSA-Abtrennung (das Gel zeigt ebenfalls den Versuch bei Zugabe von 0,1 g/l BSA) wird das BSA vollständig abgetrennt. Das extrazelluläre Protein jedoch, das wir als positiv geladen vermuten, verbleibt nach der Abtrennung in der Biosuspension und damit sichtbar auf dem SDS-PAGE-Gel (Bahn 10). Somit kann für die Selektivität der Ionentauscher-Magnetpartikel gesagt werden, dass hier das gesamte extrazelluläre Proteom betrachtet werden muss. Werden nur wenige Proteine produziert, so kann eine Abtrennung eines Zielproteins dann sinnvoll mit Ionentausch durchgeführt werden, wenn dieses Protein sich in seiner Ladung von den übrigen unterscheidet.

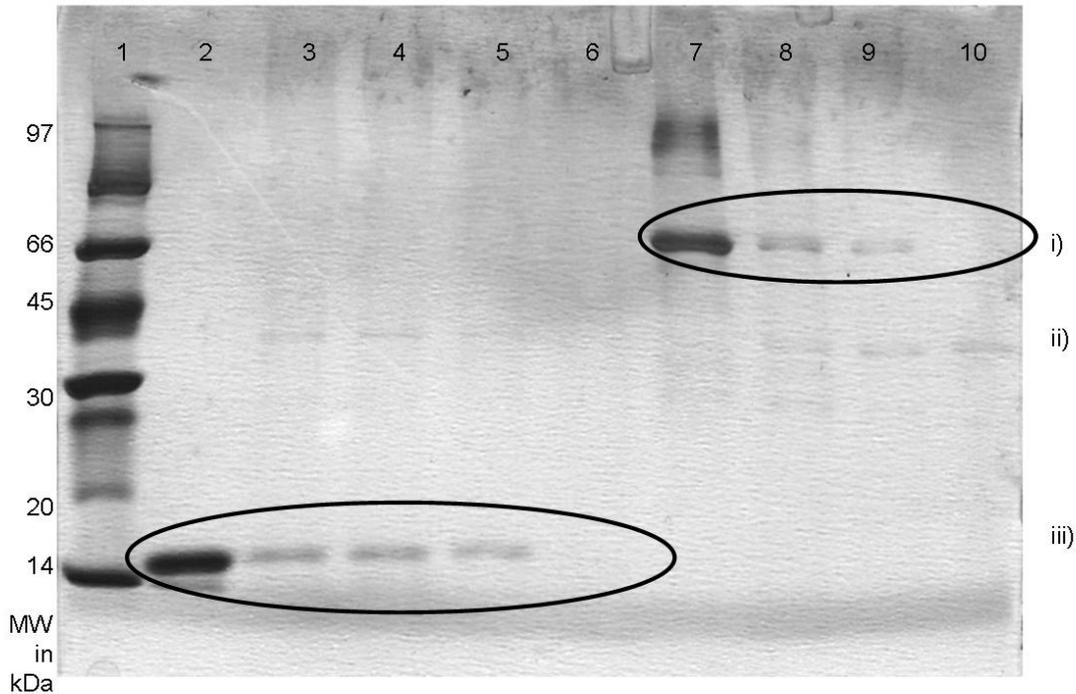


Abbildung 6.7: SDS-PAGE bei der Abtrennung von BSA und LZ aus Schüttelkolbenkultivierungen mit Banden für BSA (i), extrazelluläres Protein (ii), und LZ (iii): Protein Standard (1); LZ Standard (2); nach Zugabe von LZ (3); nach Zugabe von LZ (4); direkt nach Zugabe von MP (5); 20 min nach Zugabe von MP (6); BSA Standard (7); nach Zugabe von BSA (8); direkt nach Zugabe von MP (9); 20 min nach Zugabe von MP (10)

6.2 Untersuchung zur Stabilisierung der Amylaseproduktion mittels Abtrennung von Proteasen mittels ISMS

In den Untersuchungen zur Produktion von Enzymen mit *B. licheniformis* wurde gezeigt, dass einmal gebildetes Enzym mit der Zeit seine Aktivität verliert (siehe Kapitel 4). Dies kann beispielsweise an proteolytisch wirksamen Enzymen in der Biosuspension liegen, welche das Enzym angreifen. Durch die Abtrennung der Proteasen, welche extrazellulär gebildet wurden, sollte ein Wertprodukt geschützt werden, welches ebenfalls durch den Organismus produziert wird. Das Enzym Alpha-Amylase wurde als dieses Wertprodukt in Untersuchungen zur Protektion definiert. Für den Schutz von BSA wird in der Literatur ein solcher Ansatz erwähnt, welcher zeigt, dass Proteine durch die Abtrennung von Proteasen während einer Kultivierung stabilisierbar sind (Ottow et al. 2007).

Für die Abtrennung der Proteasen wurden in dieser Arbeit die Bacitracin-Magnetpartikel (siehe Kapitel 3.2.1) verwendet.

In diesem Ansatz wurde als Medium das synthetische Medium gewählt, bei welchem jedoch die Stärke als Substrat (statt Glucose) verwendet wurde. Dadurch kam es zur Amylaseproduktion.

Die synthetisierten Magnetpartikel in Biosuspensionen einzusetzen warf die Fragestellung auf, ob die Vermischung und Abtrennung der Partikel mit der Suspension keine negativen Folgen für das Wachstum des Organismus haben könnte. Wie jedoch in Abbildung 6.8 zu erkennen ist, verlaufen die Wachstumskurven von Schüttelkolbenansätzen fast gleich, wobei in einem die Magnetseparation durchgeführt wurde, während weitere Kolben als Referenz dienten. Lediglich während des Magnetseparationsschritts selbst sinkt die OD leicht im Kolben mit der Magnetseparation, was darauf deutet, dass es einen gewissen Biomasseverlust durch die ISMS gab. Die Abtrennung der Magnetpartikel (2 g aus 200 ml Biosuspension) erfolgte, wie in Abbildung 3.19 dargestellt, mit einem Permanentmagneten. Der Verlust könnte von einem Einschluss von Biomasse innerhalb des durch den Magneten hervorgerufenen Partikelsediments gekommen sein. Wichtiger ist wahrscheinlich noch eine mögliche Adsorption von Biomasse an Partikel oder an das auf den Partikeln befindliche Protein.

Die im Kolben vorhandene Protease von etwa 40 mg/l konnte durch die Magnetseparation auf unter 10 mg/l gesenkt werden, also zu mehr als 75 % abgetrennt werden. Allerdings war die Wirkung bezüglich der Amylasestabilisierung nicht signifikant. Abbildung 6.9 zeigt die Bildung der Amylase über der Kultivierungszeit. Es sind nur geringe Unterschiede, welche im Rahmen der Messungengenauigkeiten liegen, zu erkennen. Um diesen Sachverhalt genauer zu betrachten, wurden Überstände der Kultivierungsbrühe, welche sowohl Proteasen als auch Amylasen enthielten, untersucht. Abbildung 6.10 zeigt den Verlauf der Proteasen- und Amylasenaktivität über der Zeit für Lösungen, denen Magnetpartikel für 20 min zugesetzt wurden im Vergleich zu einer nicht-behandelten Lösung.

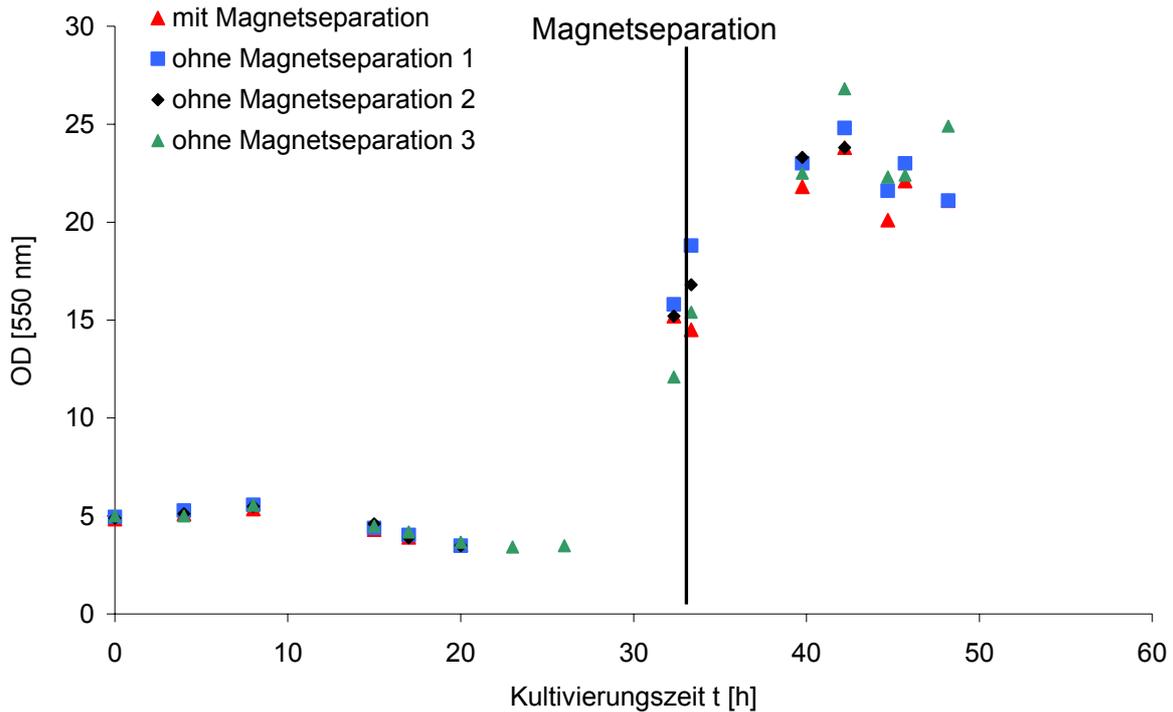


Abbildung 6.8: Wachstum von *B. licheniformis* auf synthetischem Medium mit Stärke als Substrat mit bzw. ohne Magnetseparation

Die Proben waren jeweils 15 ml und es wurden 150 mg Partikel zudosiert. Für die Proteasekonzentration zeigt sich ein klarer Effekt. Sie sinkt auf einen Wert von unter 5 mg/l, was einer adsorbierten Menge von etwas mehr als 90 % entspricht. Im Fall ohne Zugabe von Magnetpartikeln ist ebenfalls ein Abfall über der Zeit zu beobachten, welcher durch die Autodegradation der Protease begründet werden kann. Betrachtet man nun die Amylasekonzentration, so ist zu bemerken, dass diese bei beiden Ansätzen über die gesamte Versuchszeit von sieben Stunden etwa konstant bleibt. Es ist also keine Degradation der Amylasen gegeben, welche durch die Proteasen verursacht wird. Daher kann von einer Proteaseabtrennung in diesem System keine protektive Wirkung ausgehen.

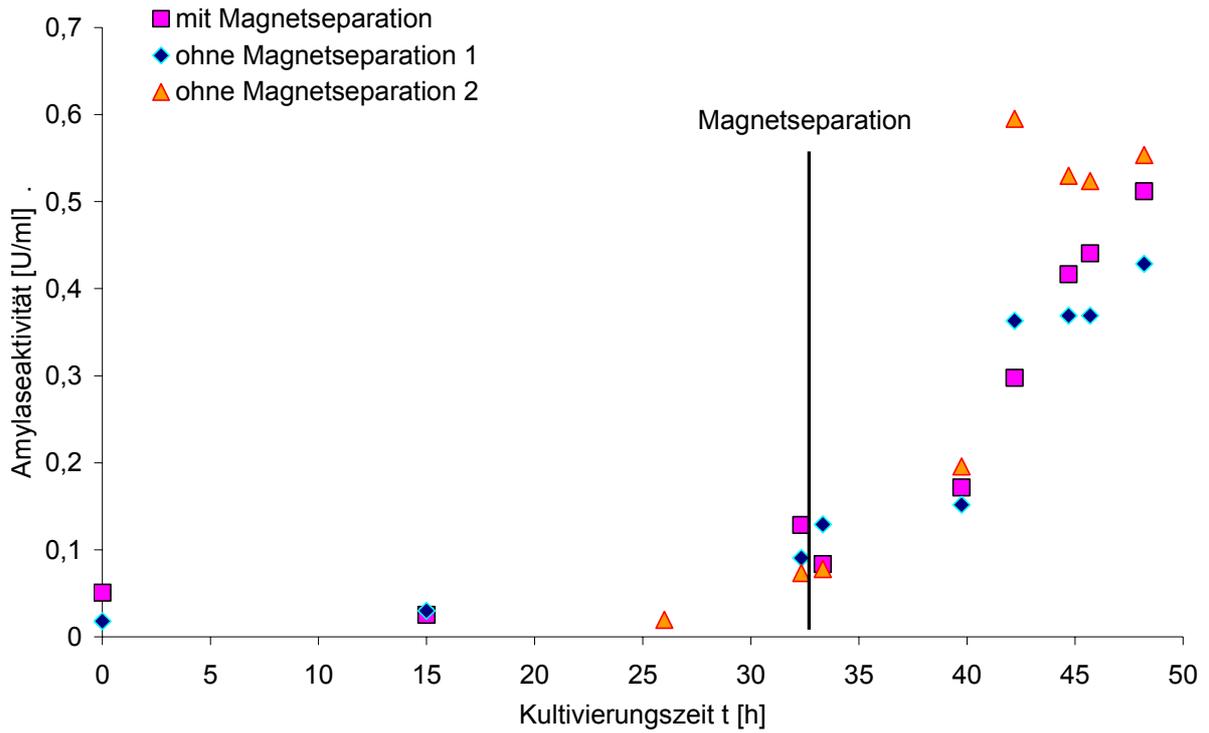


Abbildung 6.9: Verlauf der Amylaseaktivität während der Abtrennung von Protease mittels Magnetseparation

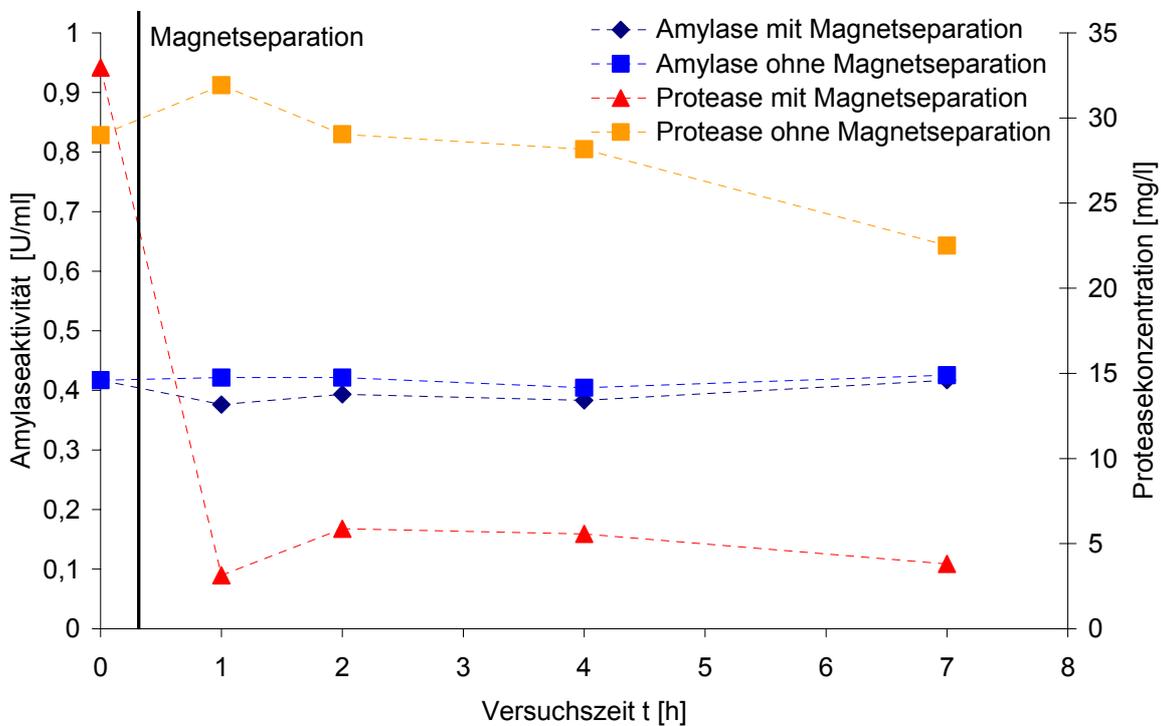


Abbildung 6.10: Verlauf der Aktivität von Protease und Amylase bei der Magnetseparation, durchgeführt mit Kultivierungsüberstand

Dass die Amylaseaktivität in Biosuspensionen allerdings trotzdem sinkt, kann auch durch auf der Zellwand sitzenden Proteasen verursacht sein, welche nicht in das umgebende Medium entlassen werden (Stephenson und Harwood 1998). Diese Proteasen sind beim Überstand abgetrennt. Die Resistenz der Amylasen gegenüber den extrazellulären Proteasen ist jedoch auch ein Phänomen, das von den Umgebungsbedingungen abhängig ist (Stein und Fischer 1958).

6.3 Untersuchung der Protease-Produktionssteigerung durch ISMS im Schüttelkolben

Proteasen sind die in größter Menge produzierten Enzyme. Sie sind also auch ein Produkt, dessen Ausbeute bei der Produktion zu steigern Sinn macht. In Untersuchungen im Schüttelkolben sollte die Ausbeute erhöht werden, indem die Proteasen während der Kultivierung abgetrennt wurden. Dazu wurden die für Proteasenadsorption geeigneten Bacitracin-Magnetpartikel verwendet. In Schüttelkolbenkultivierungen sollte die Abtrennung der Proteasen in der Produktionsphase erfolgen (siehe Kapitel 4). Es wurde auf komplexem Medium mit Glucose kultiviert. Die Versuche wurden durchgeführt, indem jeweils zwei Schüttelkolben vergleichend kultiviert wurden und jeweils nur in einem die *in-situ* Magnetseparation vollzogen wurde. Der Verlauf der Proteasekonzentration eines Versuchs ist in Abbildung 6.11 zu sehen. Die beiden Verläufe sind zunächst parallel für die beiden Kolben, was eine gute Vergleichbarkeit ermöglicht. Nach etwa 18 Stunden wurden dem einen Kolben Magnetpartikel zugeführt und eine Adsorption mit anschließender Magnetseparation durchgeführt. Der nächste Datenpunkt stammt aus dem Kolben nach Partikelabtrennung und zeigt an, dass eine signifikante Menge Proteasen abgetrennt werden konnte. Anschließend steigt die Proteasekonzentration weiter in beiden Kolben an, jedoch ist ein deutlicher Unterschied in der Steigung zu beobachten. Mit Magnetseparation wurden deutlich mehr Proteasen pro Zeit gebildet, obwohl die beiden Biomassekonzentrationen etwa gleich groß waren. Am Ende des Versuches konnte sogar die Konzentration des Referenzkolbens ohne Magnetseparation erreicht bzw. überholt werden. Da die abgetrennte Protease auf den Magnetpartikeln nicht verloren ist, sondern nach einem Elutionsschritt gewonnen werden kann, wurde im Diagramm die Gesamtproteasemenge dargestellt, also die Summe aus abgetrennter und im Schüttelkolben vorhandener Menge. Insgesamt wurde durch die Magnet-

separation also mehr als 60 Prozent Ausbeutesteigerung erreicht (geschweifte Klammer). Der Anstieg der spezifischen Produktivität war reproduzierbar, wie der Verlauf eines weiteren Versuchs (Abbildung 6.12 zeigt die spezifische Proteasekonzentration dieses Versuchs über der Kultivierungszeit) zeigt. Hier konnte die Steigung der Produktion deutlich um mehr als 30 Prozent gesteigert werden. Bei diesem Versuch war jedoch der Anstieg vor der Magnetseparation, also bei gleichen Bedingungen, nicht völlig identisch. Man sieht, dass die spezifische Proteasekonzentration des Kolbens ohne Magnetseparation vor der Magnetseparation etwas höher liegt als beim Kolben, in dem die ISMS durchgeführt wird. Entscheidend für den Vergleich ist allerdings die Situation nach der Magnetseparation, in der sich die Tendenz umkehrt und im Kolben mit Magnetseparation deutlich mehr Protease pro Zeiteinheit produziert wird.

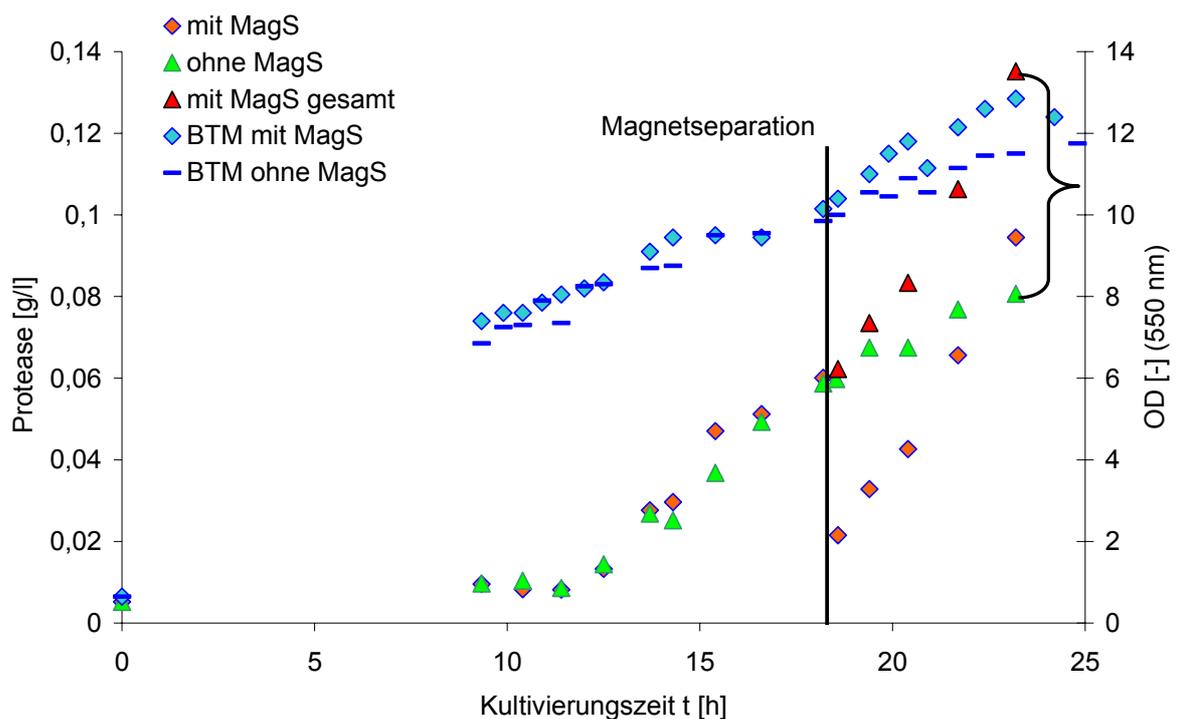


Abbildung 6.11: ISMS bei einer Schüttelkolbenkultivierung mit Bacitracin-Magnetpartikeln;

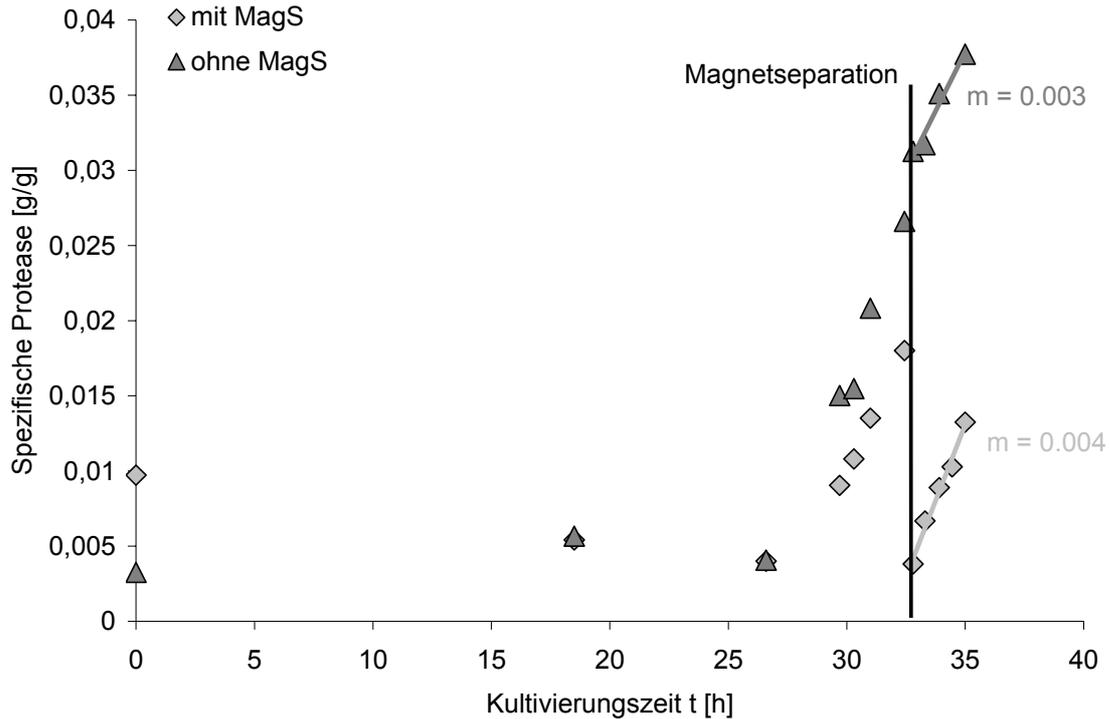


Abbildung 6.12: Verlauf der spezifischen Proteasekonzentration über der Kultivierungszeit bei Durchführung eines ISMS-Schrittes

Tabelle 6.1 zeigt die Daten der Schüttelkolbenkultivierungen mit ISMS.

Tabelle 6.1: Schüttelkolben ISMS; Übersicht der Versuchsdaten

Versuch	Abbildung 6.10	Abbildung 6.11
Volumen Biosuspension	30 ml	30 ml
Masse Magnetpartikel	35 mg	63 mg
Q*	33 mg/g	15 mg/g
Abgetrennte Protease	64 %	79 %
Spez. Produktivität vor und [nach] MagS [mg/(g h)]	2,0; [5,3]	2,4; [4,1]

Die spezifische Produktivität wurde für diese Schüttelkolbenversuche nach Integration der Massenbilanz für die Produkte nach folgender Gleichung unter Vernachlässigung des Abbaus für ein Zeitintervall konstanter spezifischer Wachstumsrate berechnet:

$$r_P = \frac{(C_{P,2} - C_{P,1})\mu}{C_{X,1} \cdot (e^{\mu \cdot \Delta t} - 1)} \quad 6.2$$

Die Gründe für die Erhöhung der Ausbeute durch eine Magnetseparation können zum einen in dem bereits erwähnten Abbau der Proteasen gefunden werden. Möglicherweise kommt es dabei zu einem Abbau der Protease durch sich selbst (Autoproteolyse). Definitiv wird sie allerdings inaktiviert und vermutlich auch wieder degradiert und aufgenommen. Allerdings kann ein Abbau nicht erklären, warum die Proteasekurve mit Magnetseparation in Abbildung 6.11 die andere Kurve „überholt“, da die Biomasse in etwa gleich groß war. Es muss also noch ein weiterer Effekt für diese Beobachtung vorhanden sein. Dieser Effekt könnte eine Produktinhibierung der Proteasen sein, also eine direkte oder indirekte Inhibierung der Neubildung durch sich selbst. Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, können Produktinhibierungen bei Proteasen angenommen werden. Diese stehen mit den Proteolyseprodukten im extrazellulären Medium in Verbindung. Abbildung 6.13 zeigt die möglichen Zusammenhänge bei der Proteaseproduktion. Die gebildeten Proteasen stehen als Katalysator des Proteinabbaus zur Verfügung, wobei die Bildung der Proteasen einen Energieaufwand für die Zelle darstellt. Daher ist zu vermuten, dass die Proteasebildung einer ausgefeilten Regelung unterstellt ist, da die Produktion, wie in Kapitel 4 gesehen, erst durch einen Bedarf angeregt wird (z.B. Proteine im Medium oder Ammonium-Mangel). Allerdings sorgen reichlich vorhandene Aminosäuren wiederum für eine Reduktion der Produktion. Die Aufnahme von Aminosäuren und somit auch deren intrazelluläre Konzentration ist abhängig von der Aminosäurekonzentration im Medium. Diese wiederum ist abhängig von der Proteasekonzentration. Um ein Optimum der Proteaseproduktion zu etablieren, dürfte der Bacillus im Laufe der Evolution eine Regelung entwickelt haben, die ein energetisch ideales Verhältnis zwischen Output und Input liefert. Daher ist zu unterstellen, dass ein Abzug des Enzyms Protease eine Störgröße im System verursacht, welche wiederum zu einer Erhöhung der Produktion der Proteasen führt. Es ist also anzunehmen, dass die ISMS eine Erhöhung der Produktivität verursacht. Somit wird die Ausbeute sowohl durch Regelung aufgrund von Produktinhibierung als auch durch die verminderte Degradation erhöht. Weiterhin ist es möglich, dass ein weiterer inhibierender Stoff bei der ISMS unspezifisch abgetrennt wurde, welcher zu dem beobachteten Anstieg der Produktivität führte. Hierfür gibt es jedoch kein Indiz.

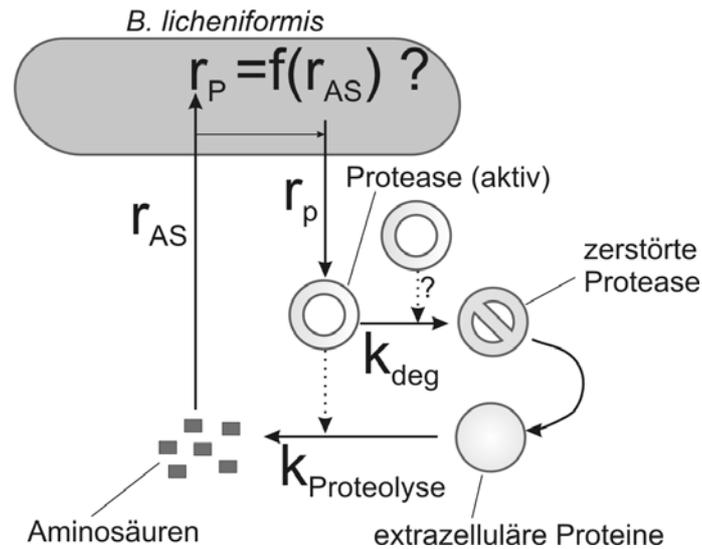


Abbildung 6.13: Schematische Darstellung der Effekte bei der Produktion von Proteasen von *B. licheniformis*

6.4 Untersuchung und Optimierung der ISMS im Bioprozess

6.4.1 Abtrennung der Magnetpartikel mittels HGMS

Die in den Schüttelkolben durchgeführten Versuche waren relativ einfach zu handhaben, da das Magnetfeld eines Permanentmagneten ausreichend für eine vollständige Abtrennung der Magnetpartikel war. Für den Scale-up auf den Bioreaktormaßstab wurde, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, die Hochgradientenmagnetseparation eingesetzt. Es wurde auch die Magnetische Zentrifuge MEC verwendet. Der Einsatz in der MEC wird in diesem Kapitel nicht näher beleuchtet, da dieser bei Einsatz stets eine HGMS nachgeschaltet und die magnetische FFT für die Bioprozessführung nicht relevant war. Es wird im Folgenden auf Versuche mit der HGMS eingegangen, die in dieser Arbeit konstruiert wurde.

Für den Einsatz eines magnetischen FFT Schritts, bei dem die magnetisierbaren Adsorberpartikel von einer Suspension abgetrennt werden müssen, ist zunächst entscheidend, diesen Trennschritt mit ausreichender Abtrennleistung, also vollständiger Entfernung der Magnetpartikel zu ermöglichen, wobei des Weiteren auch die Selektivität möglichst hoch sein sollte, um wenig andere Stoffe aus der Suspension, beispielsweise Biomasse, zu verlieren.

In Vorversuchen mit kommerziellen Magnetpartikeln konnte gezeigt werden, dass diese annähernd vollständig aus einer Wasserlösung abtrennbar waren, wenn diese einmal durch die HGMS bei maximalem Feld ($B_{\max}=0,4 \text{ T}$) gepumpt wurden. In den

Versuchen mit Biosuspension wurden die erwähnten Bacitracin-Magnetpartikel verwendet. Diese zeigten im Vergleich zu kommerziellen Partikeln eine deutlich geringere Magnetisierbarkeit, was bereits in Kleinversuchen mit Permanentmagneten sichtbar war. Die Ergebnisse der HGMS-Versuche sind in Abbildung 6.14 dargestellt. Abbildung 6.15 gibt einen optischen Eindruck der Effizienz der HGMS. Die Versuche unterscheiden sich mitunter, zeigen jedoch eine insgesamt sehr gute Abtrennleistung. Bei Versuchen, in denen im Bioreaktor keine Magnetpartikel nachweisbar waren, wurden also alle Magnetpartikel in der HGMS-Anlage zurückgehalten. Bei den ersten beiden Säulen (BR 8a und BR 8b, ein Bioreaktorversuch mit zwei ISMS-Schritten) sind noch deutliche Verluste an Partikeln vorgekommen. Diese Versuche wurden mit neuen Partikeln durchgeführt. Bei wiederholtem Einsatz dieser Partikel bei weiteren Versuchen (BR 10 und BR 11) zeigte sich, dass diese vollständig abgetrennt werden konnten. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Partikel nach ihrer Herstellung nicht gleichverteilt magnetisierbar waren. Es könnten sich auch Partikel darin befinden, welche nicht magnetisierbar waren und daher nicht in der HGMS zurückgehalten werden konnten. Allerdings wurden in den Versuchen BR 9 und BR 16 ebenfalls alle Magnetpartikeln abgetrennt, obwohl auch diese noch nicht benutzt waren. Der klassierende Effekt des einmaligen Benutzens kommt dadurch zustande, dass nur die in der HGMS zurückgehaltenen Partikel auch in den folgenden Versuchen verwendet wurden.

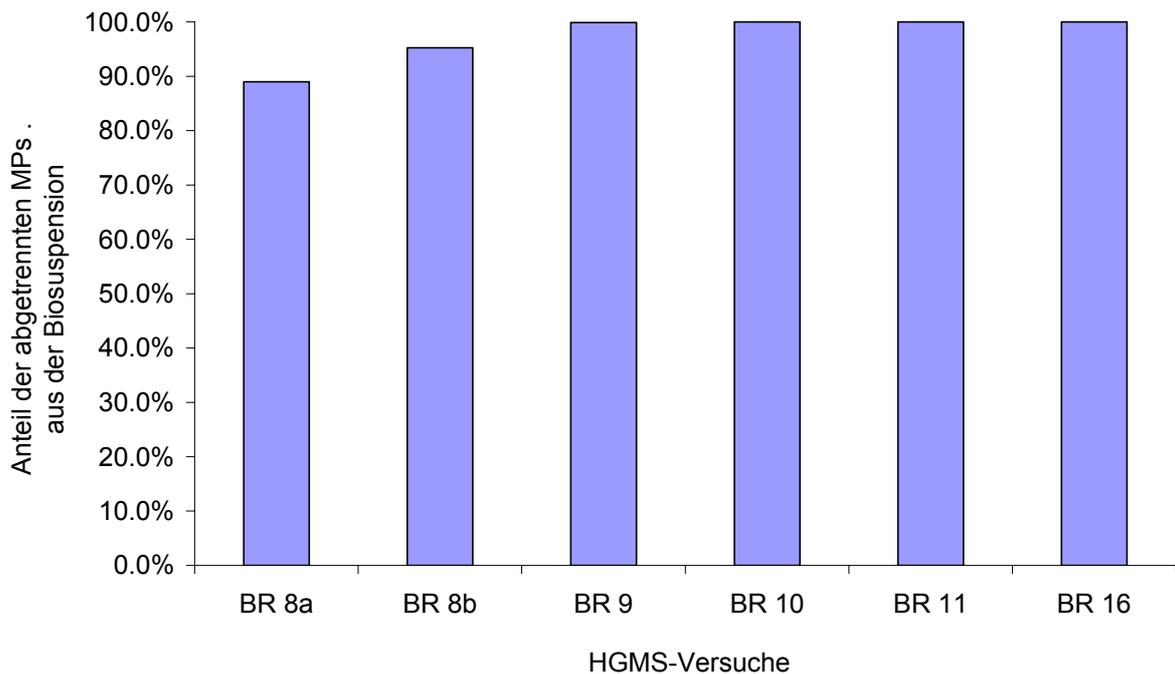


Abbildung 6.14: Anteil der Magnetpartikel die mittels HGMS von der Biosuspension abgetrennt werden konnten

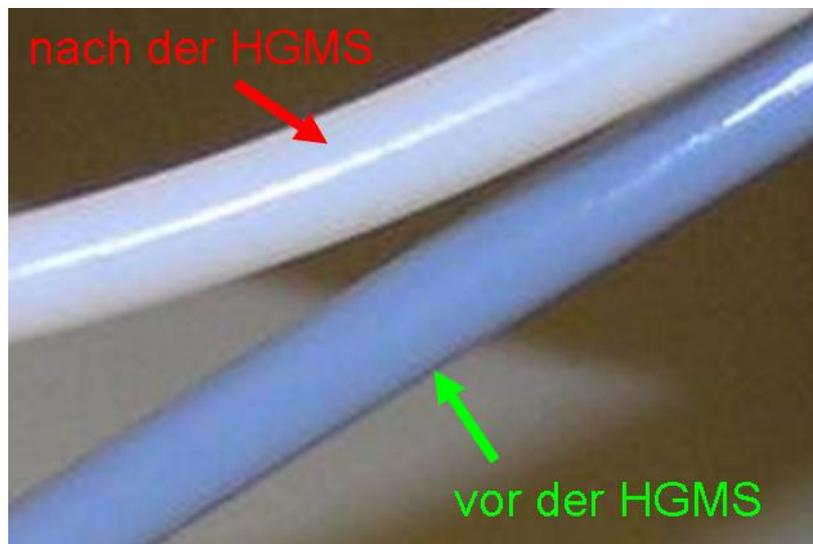


Abbildung 6.15: Bild der Leitung zur HGMS und der Leitung von der HGMS weg

Die sehr guten Ergebnisse bzgl. der Separation der Magnetpartikel waren jedoch getrübt durch hohe Verlusten an Biomasse durch die HGMS-Prozedur. Für die oben erwähnten Versuche sind die prozentualen Werte des Biomasseverlusts in Tabelle 6.2 dargestellt. Der Verlust war signifikant und kann durch drei Ursachen erklärt werden. Zum einen wurde beobachtet, dass bei der Verwendung von feinen

Gittern (siehe Kapitel 3.1.4) auf den untersten Schichten eine relativ dichte Magnetpartikelschicht entstand. Auf den ersten Lagen wurden fast sämtliche Magnetpartikel abgetrennt. Dieser Kuchen kann einen Sekundärfiltereffekt ausüben, wodurch auch Biomasse in der HGMS-Zelle zurückgehalten wird. Weiterhin ist eine Adsorption der Biomasse an Magnetpartikeln oder an den auf ihr gebundenen Proteinmolekülen denkbar. Dieser Effekt wurde in einer Bioreaktion deutlich beobachtet, bei welcher allerdings nicht mit der HGMS-Zelle abgetrennt wurde, sondern die FFT mit der MEC-Anlage durchgeführt wurde. Die starke Wechselwirkung ist abhängig vom Zustand der Biomasse, beispielsweise ihrer Neigung zu Agglomeration. Der dritte Effekt könnte durch eine Verdünnung kommen. Die Biosuspension wurde durch die HGMS-Zelle mittels Waschpuffer gepumpt. Innerhalb der Zelle könnte es daher zu Rückvermischungen der beiden Flüssigkeiten kommen. Allerdings ist dieser Effekt als eher gering im Vergleich zu den vorherigen zu betrachten, da der Volumenstrom und die damit verbundene Strömungsgeschwindigkeit in der Zelle sehr gering war (0,3 l/min; entspricht 2 mm/s in der Zelle). Bei diesen Geschwindigkeiten ist die Reynoldszahl, welche durch folgende Gleichung gegeben ist,

$$\text{Re}_{\text{HGMS}} = \frac{\rho_l v d_{\text{Draht}}}{\eta_l} \quad 6.3$$

für beide Drahtgeometrien unter bzw. knapp über eins (0,56 für die feinen, 1,25 für die groben Drähte) und damit kann die Strömung als schleichende betrachtet werden, also ohne Rückvermischungen. Die Viskosität einer Biosuspension wurde gemessen von einer Probe, welche 20 g/l BTM-Konzentration hatte. Es ergab sich newtonisches Verhalten (Schergeschwindigkeit maximal 100 s^{-1}) und eine Viskosität von $1,6 \text{ mPa s}$ bei 37°C . Dieser Wert wurde in Gleichung 6.3, ebenso wie eine Dichte des Fluids von 1 g/cm^3 , eingesetzt.

Zur Verbesserung der Verluste nach BR 8 wurden auch grobe Gitter eingesetzt. Dieser Einsatz dient der Reduktion eines sich aufbauenden Kuchens. Die folgenden Versuche zeigten jeweils eine Reduktion des Verlusts, allerdings scheint die Adsorption von Biomasse an Partikeln immer noch eine wesentliche Rolle zu spielen. Um Vorhersagen treffen zu können, wie weit man bei der Nutzung der weitmaschigen Gitter gehen kann, wurde ein Modell zur Berechnung der Magnetseparations-Abscheideeffizienz etabliert. Dieses geht von der Berechnung eines Einfangradius aus, der von der Mittellinie der Drähte bis zu dem Abstand, bei

welchem in einer angenommenen Potentialströmung des Fluids die paramagnetischen Partikel eingefangen werden, geht. Partikel, die einen größeren Abstand haben, werden am Draht vorbeiströmen. Bildlich ist diese Vorstellung in Abbildung 6.16 dargestellt.

Tabelle 6.2: Biomasseverlust bei den HGMS-Versuchen bei den unterschiedlichen Gitteranordnungen

Versuch	Verlust Biomasse [%]	Anordnung der Gitter
BR 8a	27	10 x A*, 23 x fein
BR 8b	27	10 x A, 23 x fein
BR 9	19	7 x A, 6 x grob (2A), 17 x fein (2A)
BR 10	24	6 x grob (1A), 23 x fein (2A)
BR 11	15	6 x grob (1A), 23 x fein (2A)
BR 16	20	24 x grob (1A), 7 x fein (2A)

*A=Abstandshalter

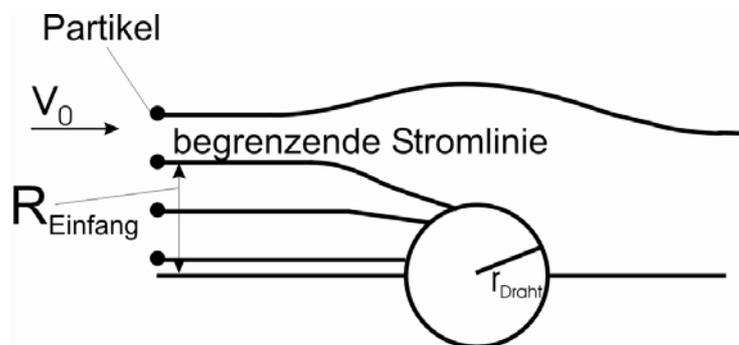


Abbildung 6.16: Einfangradius für kleine Paramagnetische Partikel (links) (Svoboda 1987)

Für den Einfangradius ist zunächst die magnetische Geschwindigkeit zu berechnen, für welche gilt:

$$v_{\text{mag}} = \frac{2\mu_0(\kappa_P - \kappa_L)M \cdot H_0 \cdot r_P^2}{4,5\eta \cdot d_{\text{Draht}}} \quad 6.4$$

Diese ist ein Parameter, der die Relativgeschwindigkeit eines Partikels in unmittelbarer Drahtnähe ermittelt (Hoffmann 2003). Je nach Verhältnis von v_{mag} und der Anströmgeschwindigkeit v_0 wird der Einfangradius berechnet. Für den vorliegenden Fall gilt für den Einfangradius:

$$R_{\text{Einfang}} = \frac{d_{\text{Draht}}}{2} \cdot 1,3 \left(\frac{v_{\text{mag}}}{v_0} \right)^{1/3} - (0,87 + 0,052 \cdot K) \left(\frac{v_{\text{mag}}}{v_0} \right)^{-1/3} \quad 6.5$$

Hierbei ist K ein Parameter der wie folgt definiert ist:

$$K = \frac{M}{2H_0} \quad 6.6$$

Allerdings gilt dies nur für $M < 2H_0$. Ansonsten ist $K=1$, wie es in unserem Fall gegeben war.

Die Berechnung von R_{Einfang} ermöglicht nun eine Abschätzung der angeströmten Flächen, durch welche Partikel das Drahtgewebe passieren und der Fläche, wo sie eingefangen werden. Das Verhältnis der Flächen gibt die Transmission an. In Abbildung 6.17 sind die geometrischen Verhältnisse der Flächen dargestellt.

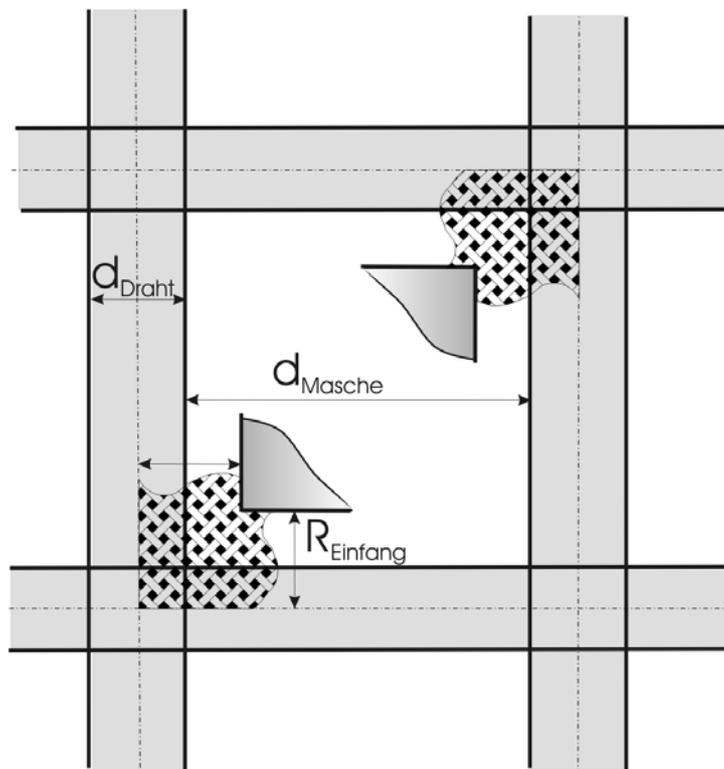


Abbildung 6.17: Darstellung der Modellflächen für die Berechnung des Abscheideverhältnisses

Partikel, die auf der Fläche, welche vom Draht aus mit der Breite des Einfangradius gebildet wird, anströmen, werden abgefangen. Der Rest kann passieren. Daher gilt:

$$E_{\text{Drahtgewebe},i} = 1 - \frac{m_{\text{Partikel,eingefangen},i}}{m_{\text{Partikel,gesamt},i}} = 1 - \frac{(d_{\text{Masche},i} + d_{\text{Draht},i} - 2 \cdot R_{\text{Einfang},i})^2}{(d_{\text{Masche},i} + d_{\text{Draht},i})^2} \quad 6.7$$

Hierbei steht i für das jeweilige Drahtgewebe und es gilt, für die Partikelmasse nach dem i -ten Gewebe: $m_{\text{Partikel},i} = m_{\text{Partikel},i-1} - m_{\text{Partikel,eingefangen},i}$. Es wurde eine Berechnung des gesamten Verhältnisses für die verschiedenen Gitteranordnungen, die in Tabelle 6.2 beschrieben sind, durchgeführt. Die für die Berechnung verwendeten Daten können Tabelle 6.3 entnommen werden. Die Drahtgeometrien waren gegeben. Der Partikeldurchmesser wurde mit $1 \mu\text{m}$ gewählt, da dies die aus REM-Aufnahmen abgeschätzte Primärpartikelgröße war. Die Partikelgrößenverteilung zeigte einen mittleren Durchmesser von $4,5 \mu\text{m}$ in der q_3 -Verteilung. Jedoch ist dabei die Vermutung nahe, dass Agglomerate zu diesen größeren Partikeln führen. H_0 ergab sich aus der Annahme, dass ein mittleres magnetisches Feld von $0,35 \text{ T}$ vorhanden war (siehe dazu Abbildung 10.2 im Anhang). Die Magnetisierung M ist jene des Drahtes, die sich aus einer Magnetisierungskurve des Drahtmaterials ergab. Die Suszeptibilität der Partikel wurde aus der Steigung der Magnetisierungskurve ermittelt; für diejenige des Fluids wurde der Literaturwert von Wasser verwendet.

Tabelle 6.3: Berechnungsdaten für die Abscheidung an den Drahtgeweben innerhalb der HGMS

Größe	Wert	Einheit
d_{Draht} (feine Gewebe)	$2,24 \cdot 10^{-4}$	m
d_{Draht} (grobe Gewebe)	$5 \cdot 10^{-4}$	m
d_P	$1,0 \cdot 10^{-6}$	m
H_0	280000	$\text{A} \cdot \text{m}^{-1}$
M	800000	$\text{A} \cdot \text{m}^{-1}$
v_0	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
η_l	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$\text{Pa} \cdot \text{s}$
κ_f	$-8,00 \cdot 10^{-6}$	-
κ_P	0,15	-

Mit der Annahme einer nach jedem Gitter sich vollständig homogenisierenden Suspension wird der gesamte abgeschiedene Anteil nach einem Gitter mit dem folgenden Zusammenhang berechnet:

$$E_{\text{gesamt},n} = \prod_{i=1}^n E_{\text{Drahtgewebe},i}$$

Die Annahme der vollständigen Homogenität nach jedem Gitter ist zwar an sich nicht erfüllt, da aber die Gitter jeweils zufällig angeordnet waren, also nicht Lücke auf Lücke standen, kann diese Annahme als realistisch angesehen werden.

Abbildung 6.18 zeigt den Verlauf von E_{gesamt} für die verschiedenen Anordnungen.

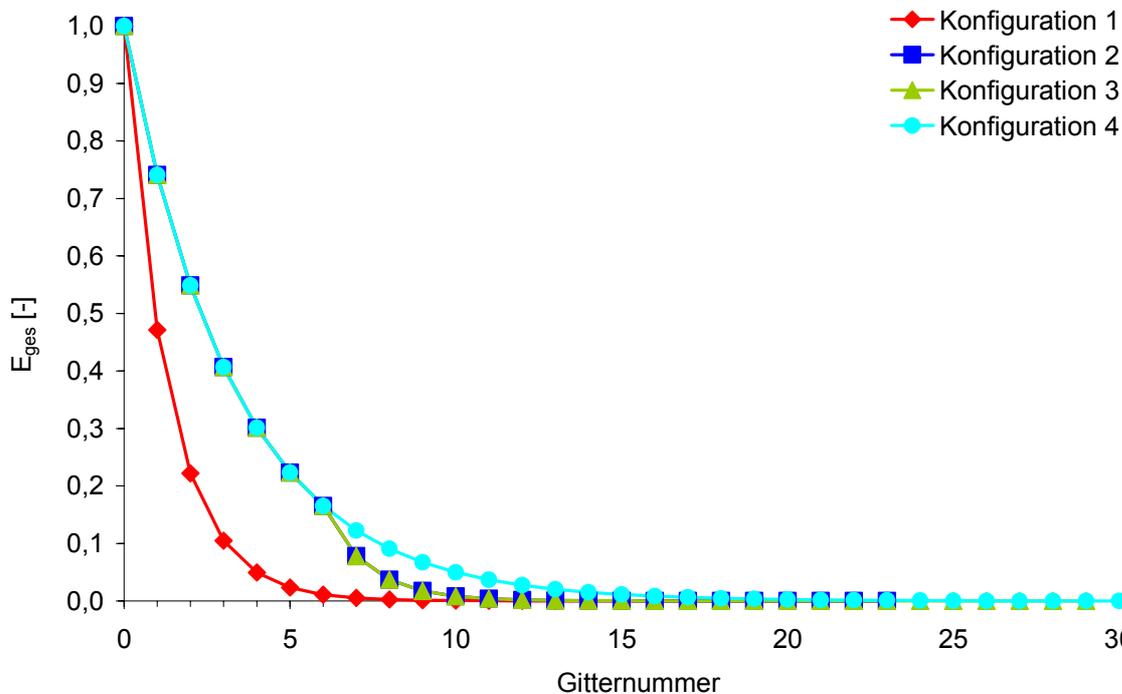


Abbildung 6.18: Abnahme des transmittierenden Anteils an Magnetpartikeln über der Gewebeanzahl für verschiedene Anordnungen; Die Konfigurationen entsprechen der Reihenfolge, wie sie in Tabelle 6.2 erwähnt sind

Die logarithmische Auftragung bzw. die rechnerischen Werte zeigen, dass in jeder der Konfigurationen mehr als sechs Zehnerpotenzen an Partikeln zurückgehalten werden, also prinzipiell bei allen Anordnungen alle Partikel abgetrennt werden. Dass dies nicht immer der Fall war, liegt an der bereits erwähnten fehlenden Magnetisierung einiger Partikel.

In Experimenten wie BR 16, bei dem die Gitteranordnung so gewählt wurde, dass die ersten 24 Schichten nur grobe Gitter waren, sollte der Sekundärfiltereffekt reduziert sein. Jedoch erbrachte diese Optimierung keine signifikante Reduktion des Biomasseverlusts. Daher ist die Annahme wahrscheinlich, dass es zwischen den Partikeln und der Biomasse zu starken Wechselwirkungen kommt, welche durch das Schütteln während der Adsorption kommen kann, was teilweise manuell durchgeführt

wurde. In Versuchen mit Schüttelkolben wurde gezeigt, dass diese Wechselwirkung auf dem Schüttler, wo das Schütteln nicht so heftig war, nicht in gleichem Maße auftreten.

6.4.2 Adsorptionsleistung der Magnetpartikel in der Biosuspension

Für die Abtrennung des Zielprodukts aus Biosuspension muss die Adsorptionsleistung auch in dieser komplexen Matrix gewährleistet sein. In einigen Bioreaktorversuchen wurden jeweils 4 g Magnetpartikeln verwendet, um aus meist 1,2 l Biosuspension die Protease abzutrennen. Anhand der Adsorptionsisotherme müsste diese Menge ausreichen, um eine Menge Protease von mehr als 1 g/l zu mehr als 90 Prozent aus der Biosuspension abzutrennen. Abbildung 6.19 zeigt, wie viel bei den verschiedenen ISMS-Versuchen abgetrennt wurde. Diese Werte liegen deutlich unter jenen der Adsorptionsisotherme (vergleiche Abbildung 3.10). Jedoch konnte die Proteasemenge in den Versuchen in signifikantem Umfang, durchschnittlich 50 Prozent, abgetrennt werden. Tabelle 6.4 ist eine Wertetabelle, die die Daten für die abgetrennte Proteasemenge liefert.

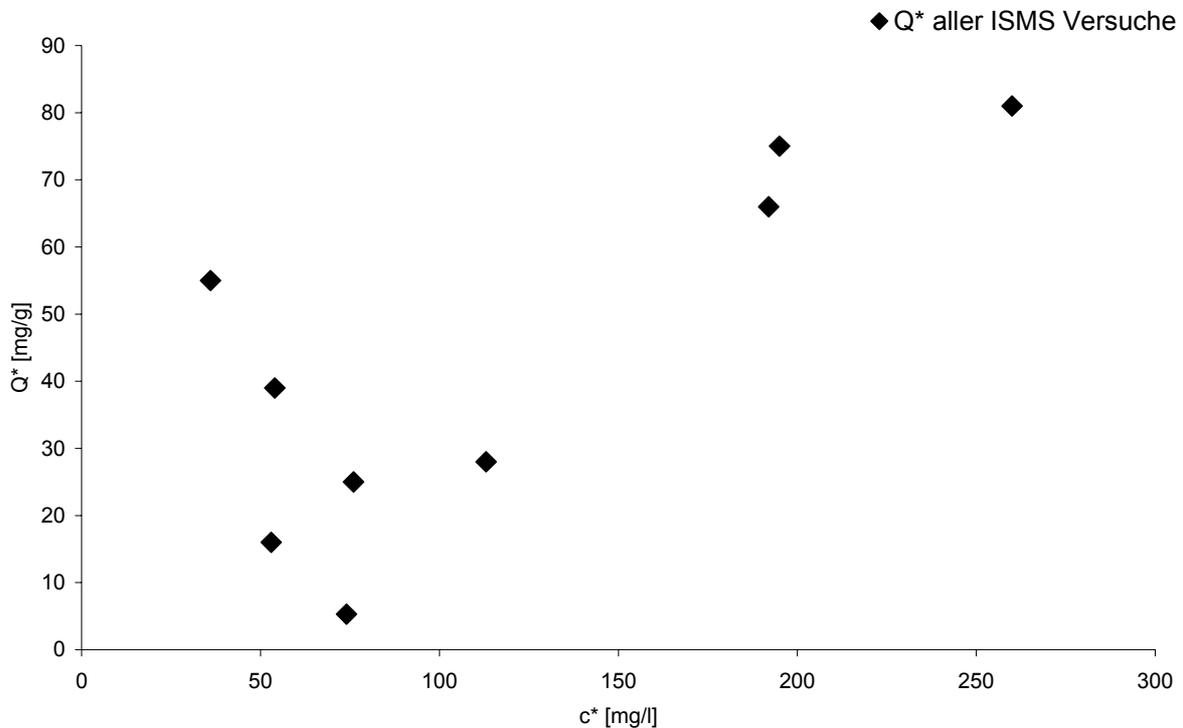


Abbildung 6.19: Ermittelte Gleichgewichtsbeladungen bei den verschiedenen BR-ISMS-Versuchen

Tabelle 6.4: Abtrennung der Proteasen: ISMS-Versuchswerte

Versuchsbezeichnung	Proteasekonzentration vor der Abtrennung [mg/l]	Abgetrennte Menge [%]
BR 8a	329	37
BR 8b	533	58
BR 9	90	20
BR 10	221	84
BR 11	112	52
BR 12	159	52
BR 13	186	40
BR 14	195	72
BR 16	521	50

Der Grund für die Abweichung der Adsorption von reinem Subtilisin, das in Trispuffer gelöst war, und der Adsorption von Protease, die im Bioreaktor neben einer Vielzahl anderer Moleküle vorliegt, ist in eben diesen anderen Molekülen, die ebenfalls kompetitiv die Plätze auf dem Adsorber einnehmen können, zu sehen. Daher ist die Beladung mit Produkt deutlich geringer als es theoretisch möglich wäre. Weiterhin führt die höhere Ionenstärke im Bioreaktor evtl. zu einer leicht veränderten Konformation der Proteasen, was ebenfalls zu einer Veränderung in den Adsorptionseigenschaften führen kann.

Eine Isotherme, die mit dem Überstand einer Biosuspension aus BR 8 durchgeführt wurde, ist in Abbildung 6.20 dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass die Adsorptionskapazität deutlich geringer ist als die der Isotherme im Puffer. Weiterhin in dieser Abbildung dargestellt ist die Isotherme für Partikel, welche in Versuchen benutzt worden waren und anschließend mit mehreren Waschschrinen wieder aufbereitet wurden. Diese Prozedur und auch der Kontakt mit der Biosuspension führte zu einem gewissen Verlust an Kapazität. Die Bacitracinmoleküle sind Peptide und können somit in Biosuspension, aber auch bei den Waschschrinen zu einem bestimmten Teil verändert werden. Aus diesem Grund wurden die Partikel maximal zweimal genutzt. Für industrielle Prozesse wäre ein robustes Partikelsystem wichtig, welches innerhalb des Systems zur vollen Funktionsfähigkeit regeneriert werden kann.

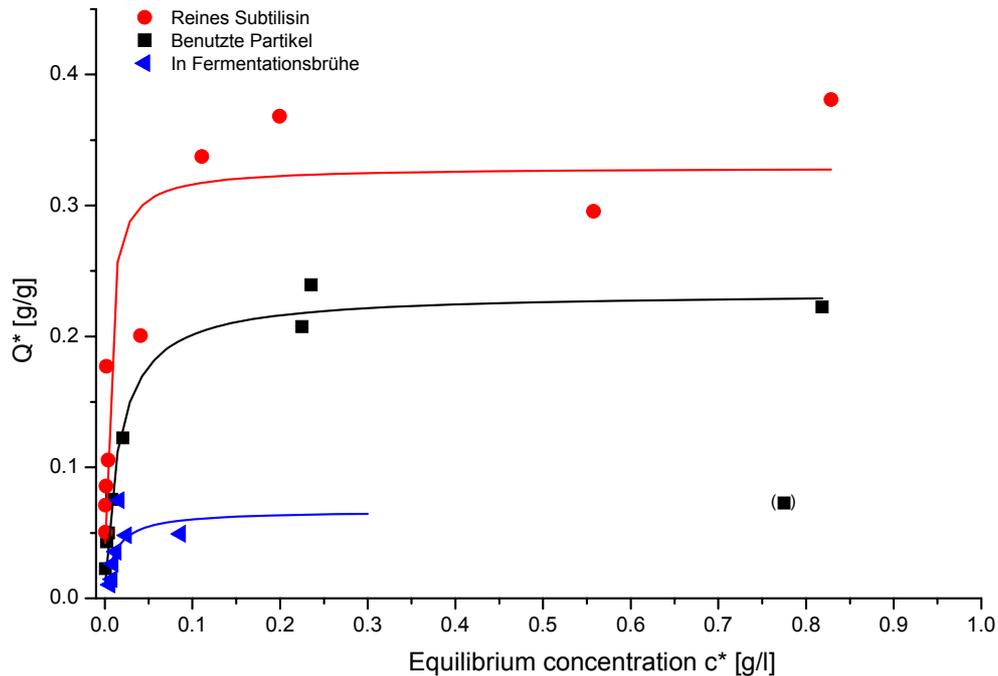


Abbildung 6.20: Adsorptionsisothermen im Vergleich; Reines Subtilisin in Tris-Puffer mit frischen und gebrauchten Partikeln; Isotherme in Biosuspensionsüberstand

Die Partikel haben noch Optimierungspotential, waren aber für die Zwecke der Untersuchung der Wirkungen einer *in-situ*-Abtrennung ausreichend. Die Selektivität ist ein weiterer Aspekt von Magnetpartikeln. Wie erwähnt, gibt es kompetitive Substanzen, unter anderem auch Proteine, welche sich an die Glutaraldehyd-Oberfläche anlagern können. Da die Proteinkonzentration im Bioreaktor deutlich höher als die Proteasekonzentration ist (teilweise Faktor 4), ist die Betrachtung der Selektivität von Bedeutung. Für die Versuche BR 13, 14 und 16 wurde dies durchgeführt. Die Ergebnisse sind Tabelle 6.5 zu entnehmen.

Tabelle 6.5: Selektivität der Magnetseparationsabtrennung

Versuchs- bezeichnung	Abgetrennte Protease (% $P_{a,abg}$)	Abgetrenntes Protein (% $P_{i,abg}$)	Selektivität (% $P_{a,abg}$ / % $P_{i,abg}$)
BR 13	40	20	2,0
BR 14	72	22	3,3
BR 16	50	34	1,5

Es ist zu sehen, dass die Selektivität deutlich größer als eins ist, also eine deutliche Affinität der Partikel zur Protease zu verzeichnen ist. Allerdings ist diese Selektivität für ein Affinitätsverfahren im allgemeinen relativ klein. Der Grund ist die bereits erwähnte unspezifische Adsorption an Stellen der Partikel, an denen kein Bacitracin gebunden ist. Weiterhin ist davon auszugehen, dass die große Menge Protein, die beispielsweise bei der Isotherme adsorbiert (maximal etwa 300 mg/g), nur durch eine Mehrschichtadsorption zu erklären ist. Die Situation bei den Bacitracin-Magnetpartikeln ist ähnlich anzusehen wie es für die Ionentauscher-Magnetpartikeln in Kapitel 6.1 diskutiert wurde. Die erste adsorbierte Schicht hat dann jedoch eine deutlich geringere Affinität zu den Proteasen. Somit ist es möglich, dass die Magnetpartikel in der ersten Schicht auf der Oberfläche vor allem Proteasen tragen, während auf weiter außen liegenden Schichten auch andere Stoffe zur Anlagerung kommen. Im Anhang ist ein Bild eines SDS-PAGE-Gels mit Proben vor und nach der ISMS (siehe Abbildung 10.5). Neben dem eluierten Protein (Protease) werden auch andere Banden nach der ISMS geschwächt.

6.4.3 Elution der abgetrennten Protease

Die Elution des aktiven Produkts dient dazu, das adsorbierte Enzym in eine nutzbare Form zu bringen. Hierzu ist zunächst wichtig, das Enzym von der Matrix zu lösen. Anschließend kann es einer aktivierenden Behandlung unterzogen werden oder in einen Puffer gebracht werden, in welchem es stabil ist. Eine Elution, die das Enzym in vollständig aktiver Form bereitstellt und diesem Stabilität gewährleistet, wäre das Optimum.

Die Wahl des Elutionspuffers ist daher eine entscheidende Fragestellung für die ISMS. Die Auswahl wird häufig empirisch durch Erfahrung durchgeführt (Firer 2001). In unserer Arbeit wurde der in Kapitel 3.6.2 genannte Elutionspuffer verwendet. Die Auswahl erfolgte aufgrund der Erfahrung eines Projektpartners (Arbeitsgruppe Prof. Timothy Hobley, DTU, Kopenhagen), der diesen Puffer bereits eingesetzt hatte.

In den ISMS-Versuchen im Bioreaktor konnte die Elution direkt in der Magnetseparationsanlage durchgeführt werden. Alternativ wurden die Magnetpartikel nach der Abtrennung des Wertprodukts aus dem System entfernt und extern in Bechergläsern der Elutionsprozedur unterzogen.

Die für die BR-Versuche gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 6.6 zusammengefasst. Darin ist zu erkennen, dass maximal etwa 50 % des Enzyms in aktiver Form wiedergewonnen werden konnten. Die im Waschschrift vor der Elution

verloren gegangene Enzymmenge war meist vernachlässigbar, allerdings wurden in zwei Experimenten bis zu 6 Prozent der abgetrennten Proteasemenge in der Waschflüssigkeit in aktiver Form determiniert. Abgesehen von dieser geringen Menge, konnte ein signifikanter Teil der abgetrennten Proteasen nicht eluiert werden. Eine Deaktivierung im Elutionspuffer wurde experimentell ausgeschlossen.

Für die Versuchsergebnisse bei interner Elution kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Magnetpartikel nicht ausreichend mit der Elutionsphase vermischt waren. Für die Versuche bei externer Elution könnte eine nicht optimale Stoffübertragung ebenfalls ein Grund für die unvollständige Elution sein.

Um die Elution genauer zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, bei welchen im kleinen Maßstab Überstände von Kultivierungen und reine Enzymlösung mit Partikeln zur Adsorption gebracht wurde. Die Elutionsprozedur wurde im Anschluss durchgeführt.

Tabelle 6.6: Elutionsergebnisse bei den Bioreaktorversuchen; Basis für die Berechnung ist das aktive Enzym

Versuchs- bezeich- nung	Adsorbierte Gesamt- menge [mg]	Ex- /intern	Elutions- schritt 1 [%]	Elutions- schritt 2 [%]	Elution, gesamt [%]
BR 8	272	Intern	25	24	50
BR 9	22	Intern	43	10	53
BR 10	220	Intern	35	11	46
BR 11	64	Intern	39	13	52
BR 13	112	Extern	27	2	30
BR 14	156	Extern	43	4	47
BR 16	324	Extern	9	1	10

Für die Elution der Protease bei reiner Proteasenadsorption wurde die Protease vollständig in der Elutionslösung gewonnen. Es wurde sogar mehr aktives Enzym eluiert als adsorbiert war. Dies ist auf Messabweichungen zurückzuführen, da die Elutionsuntersuchungen mit analytischer Ungenauigkeit behaftet sind. Diese Ungenauigkeiten werden durch Fehlerfortpflanzung noch erhöht.

Eine weitere Fehlerquelle könnte die Änderung der spezifischen Aktivität im Elutionspuffer sein. Das würde bedeuten, dass die Aktivität in diesem Puffer pro Masse Protease höher ist als in Kultivierungsmedium. Durch Einwaage des Enzyms konnte dieser Effekt allerdings nicht bestätigt werden, da die Aktivität der Lösung der eingewogenen Menge im Tris-Puffer entsprach.

Abbildung 6.21 zeigt die Elution von reinem Subtilisin. Hierbei sind die Werte auf die eingewogene Menge an Protein bezogen, wodurch die beschriebene Überelution verdeutlicht wird. Es wurde also etwa soviel eluiert wie vorhanden war, was unwahrscheinlich ist, da nicht vollständig adsorbiert wurde. Es ist jedoch zu erkennen, dass die prozentualen Werte der eluierten Menge, die mittels Proteinanalytik (Lowry) bzw. mit dem Enzymaktivitätstest bestimmt wurden, lediglich im Rahmen der Messungenauigkeit von einander abweichen. Darum kann als Grund für die geringe Elution eine Deaktivierung der Protease auf der Magnetpartikeloberfläche, beispielsweise durch eine Konformationsänderung, welche in der Literatur beschrieben sind, ausgeschlossen werden (Wahlgren und Arnebrant 1991).

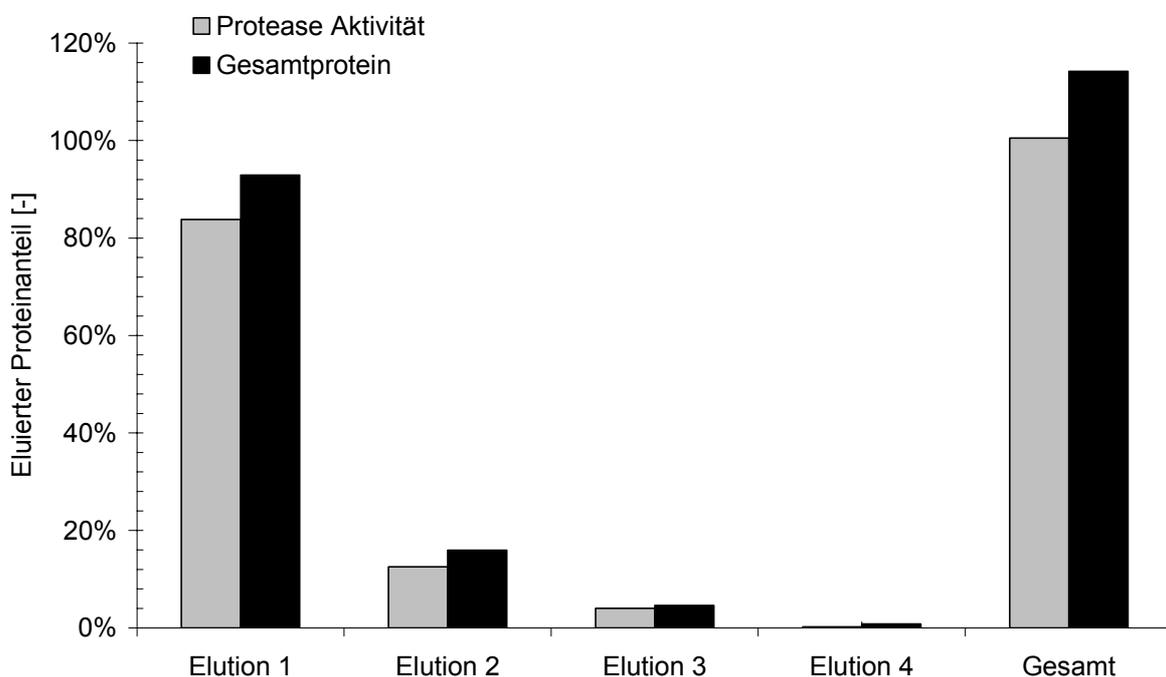


Abbildung 6.21: Elution pro Elutionsschritt bei der Adsorption von reinem Subtilisin

Auch für Versuche mit Biosuspensionsüberstand konnten teilweise die Enzyme vollständig aktiv nach der Elution wiedergewonnen werden. Auch hier ergaben sich

analytische Schwierigkeiten, wie oben erwähnt. Abbildung 6.22 zeigt den Verlauf der gesamten eluierten Protein- bzw. Proteasenmenge bei einer Untersuchung, bei der die Elutionstemperatur 37°C und die Elutionsdauer 30 Minuten betrug. Es ist zu erkennen, dass, wie bei den Bioreaktorversuchen, die eluierte Menge an Protease fast vollständig in den ersten beiden Elutionsschritten gewonnen wird. Die Proteine jedoch werden auch in Folgeschritten weiter eluiert. Proteasen konnten hier fast vollständig aktiv wiedergewonnen werden. Der Unterschied zu den Versuchen im Bioreaktor ist in der verbesserten Durchmischung zu sehen. Es wurden kleine Proben von 0,7 Milliliter in einem Reaktionsgefäß mit 700 µg Magnetpartikeln versetzt, was eine sehr gute Vermischung auf einem Schüttler ermöglicht. Dadurch kann die Kinetik der Desorption verbessert werden und auch auf der Oberfläche gebundenes, durch Konformationsänderungen stabilisiertes Enzym, zur desorbierbaren Konformation gebracht werden.

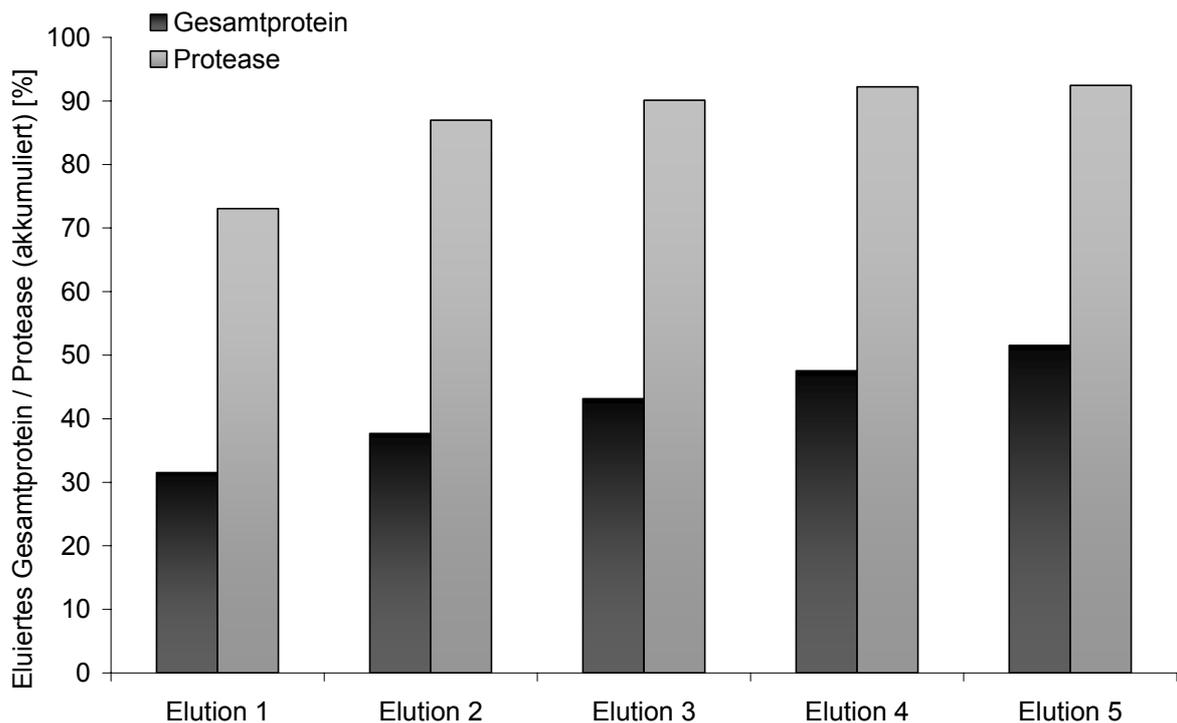


Abbildung 6.22: Elution von Subtilisin nach einer Adsorption des Kultivierungsüberstands in fünf Elutionsschritten ($c_{0, \text{Protein}} = 1,2 \text{ g/l}$; $c_{0, \text{Protease}} = 0,3 \text{ g/l}$)

Weiterhin ist die Menge an kompetitivem Protein entscheidend. Der geringe Elutionswert für BR 16 deutet auf einen Einschluss des Wertprodukt Protease durch die anderen Proteine an. Diesem muss ein optimierter Adsorptionsprozess entgegen-

gesetzt werden. In unserem Fall wurde der Adsorption mehr als 20 min Zeit gegeben. Da die Adsorptionskinetik für die Proteasen schnell war (Q_{\max} wurde innerhalb von 5 min erreicht), konnte in der Folgezeit vor allem auch anderes Protein angelagert werden. Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 6.23 eine Modellvorstellung gezeigt, die die Situation auf den Magnetpartikeln beleuchtet. Die erste Schicht ist vermutlich durch das Bacitracin selektiv für Proteasen; die Folgeschichten dann allerdings nicht mehr. Bei einer Elution können Proteasen im Bioprozess durch die Anwesenheit der Proteine sterisch an der Desorption gehindert sein.

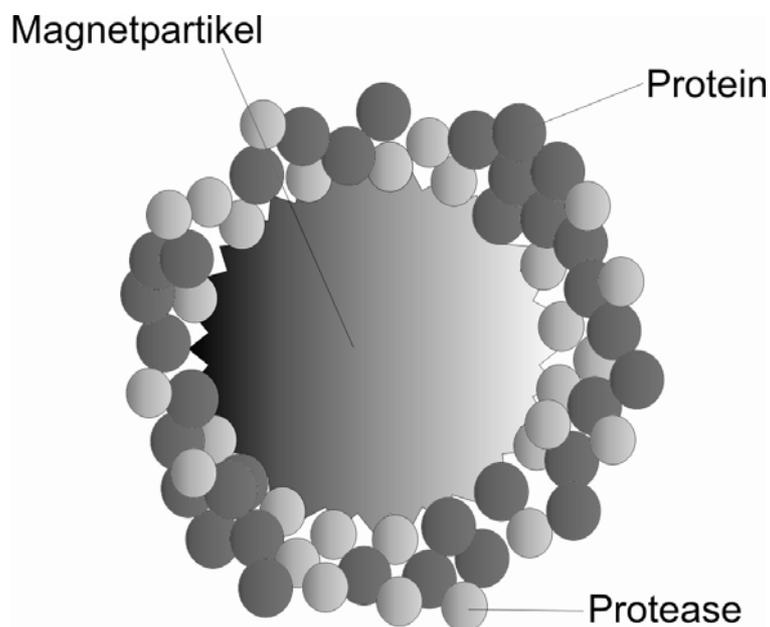


Abbildung 6.23: Modellhafte Vorstellung der Adsorption von Proteinen und Proteasen auf den Magnetpartikeln

Für die Elution kann insgesamt festgestellt werden, dass diese für den industriellen Einsatz optimiert werden muss, jedoch für das in dieser Arbeit untersuchte Modellenzym Protease prinzipiell eine vollständige Elution in aktiver Form von den magnetischen Funktionspartikeln möglich war.

Redispergierung der Magnetpartikel

Die Redispergierung der Magnetpartikel wurde bereits in den Elutionsversuchen als problematisch thematisiert. Nur mit einer reinen Spülung der Matrix mit Flüssigkeit ist bei den gegebenen Strömungsgeschwindigkeiten nicht mit einer vollständigen Ablösung der Magnetpartikeln von der Matrix zu rechnen. Ansätze zur Lösung der

Redispergierung sind zum einen in innovativen konstruktiven HGMS-Bauweisen zu sehen. Beispielsweise kann eine Rotor-Stator-Lösung, bei der die Gitter abwechselnd auf einer Welle und am Gehäuse fixiert sind, zur vollständigen Rückgewinnung der Magnetpartikel führen. Diese Methode wird am Forschungszentrum Karlsruhe derzeit etabliert (Franzreb und Reichert 2006).

Da eine solche Rotor-Stator-Lösung nicht in den Versuchen zur Verfügung stand, wurde eine Vorgehensweise gewählt, die der Rückgewinnung der Partikel diene, jedoch keine technische Lösung für die Redispergierung darstellt. Die Durchführung in den Versuchen wurde durch eine Füllung der HGMS-Matrix, in der sich die zu dispergierenden Partikel befanden, mit einem Luft-Flüssigkeits-Gemisch bewerkstelligt. Die HGMS-Säule mit diesem Gemisch wurde manuell geschüttelt. Dadurch konnten die Magnetpartikel vollständig zurückgewonnen werden. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 6.24 dargestellt. Es sind die Massen an Magnetpartikeln abgebildet, die bei einem HGMS-BR-Versuch in den verschiedenen Puffern nachgewiesen wurden. Der größte Anteil der gesamten Magnetpartikel ist dispergiert worden, also durch die soeben beschriebene Methode gewonnen worden. In Elutions- und Waschflüssigkeiten befanden sich nur geringe Mengen an Magnetpartikeln. Abbildung 6.25 unterstreicht diese Messungen optisch.

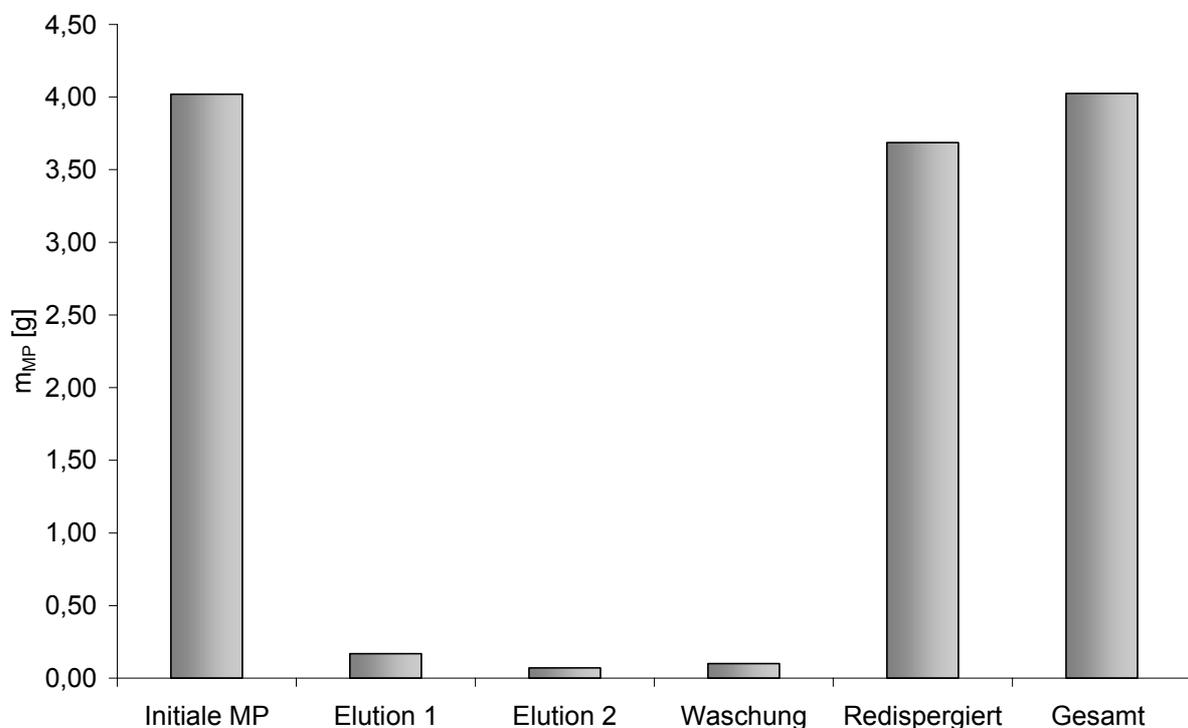


Abbildung 6.24: Gemessene Menge der Magnetpartikel in den verschiedenen Flüssigkeiten

Das manuelle Vorgehen mit einem Luft-Wasser-Gemisch hat den Nachteil, dass es für empfindliche Enzyme nicht geeignet sein könnte. Enzyme können bei Scherbeanspruchung unter der Anwesenheit einer Luft-Flüssigkeits-Phasengrenze leichter degradiert werden (Charm und Wong 1981). Allerdings konnten diese Effekte für die Proteasen nicht beobachtet werden. Diese sind auch im allgemeinen sehr stabil, wie auch an ihrer Anwendung als Waschmittelagenz gesehen werden kann.



Abbildung 6.25: Bild der Schottflaschen mit den verschiedenen Flüssigkeiten nach der ISMS (von links: Wasch-, 2x Elutions, 2x Redispergierungsflaschen)

6.4.4 Integrierte Komplettermentation mit *in-situ* Abtrennung zur experimentellen Bestimmung der Ausbeutesteigerung im Bioreaktor

Wie in den Versuchen im Schüttelkolben gezeigt werden konnte, ist die ISMS eine Möglichkeit, die Ausbeute an Protease zu steigern. Dies sollte auch im Bioreaktor nachgewiesen werden. Hier ergab sich allerdings die experimentelle Schwierigkeit, dass die Versuche nicht wie im Schüttelkolben in zwei baugleichen Reaktoren

zeitgleich mit und ohne ISMS durchgeführt werden konnten. Es können also nur die Vergleiche zwischen Versuchen, die hintereinander durchgeführt wurden, gezogen werden. Im folgenden werden die Ergebnisse, die dabei gewonnen wurden diskutiert und die Erkenntnisse dargelegt.

Versuch BR 8 ist in Abbildung 6.26 dargestellt. Nach der Wachstumsphase kommt es zur Produktionsphase, vor allem im Fed-Batch. Nach etwas über 25 Stunden wird die ISMS durchgeführt. Dies führt zu einer starken Abnahme der Proteasekonzentration im Bioreaktor nach der Trennungsprozedur. Anschließend ist eine Steigerung der Proteasekonzentration zu beobachten, die in etwa derjenigen vor der Magnetseparation entspricht. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Biomasse durch die Magnetseparation reduziert wurde. Die Frage ist, ob wie im Schüttelkolben eine Steigerung der Produktivität zu verzeichnen ist. Dazu soll zunächst ein Vergleich gezogen werden zwischen BR 7 und BR 8. Abbildung 6.27 zeigt die Verläufe der spezifischen Proteasekonzentration der beiden Versuche im Vergleich. Hierbei wurde die Zeitachse so verschoben, dass der Beginn der Produktionsphase übereinstimmend war.

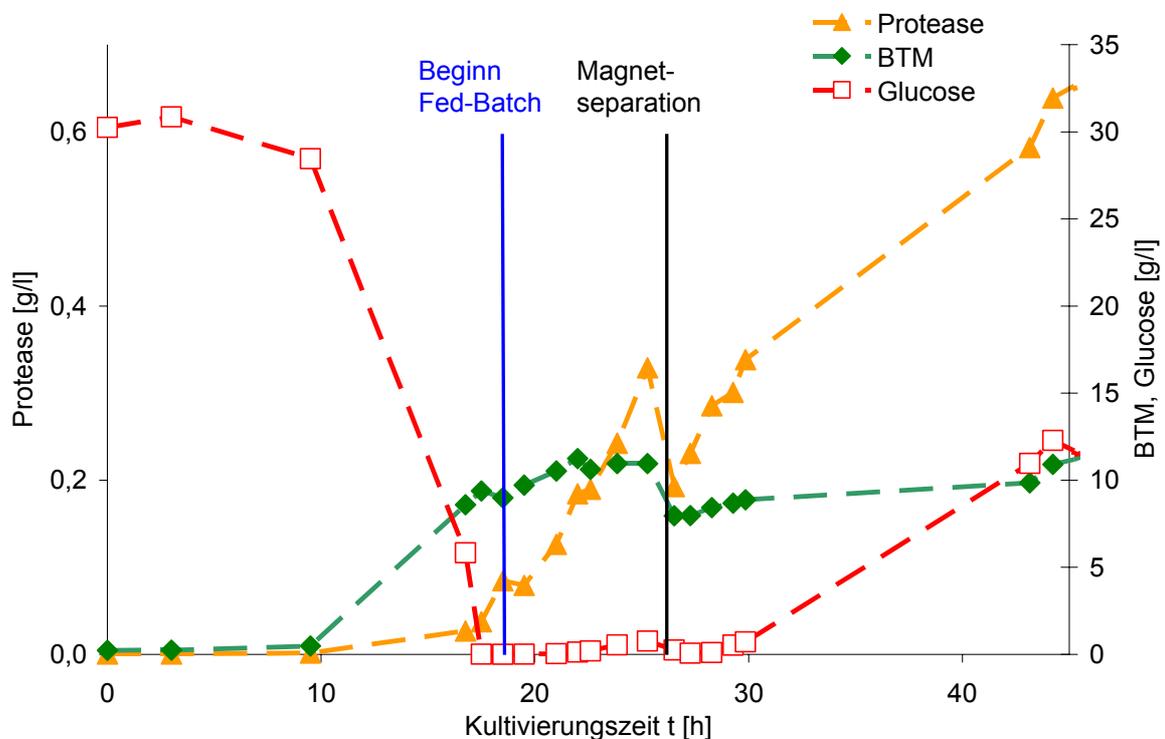


Abbildung 6.26: Übersicht des Versuchs BR 8; Feedrate: 6 ml/h ($c_{\text{Feed}}(\text{Glucose})=527$ g/l; $c_{\text{Feed}}(\text{Ammoniumsulfat})=5$ g/l)

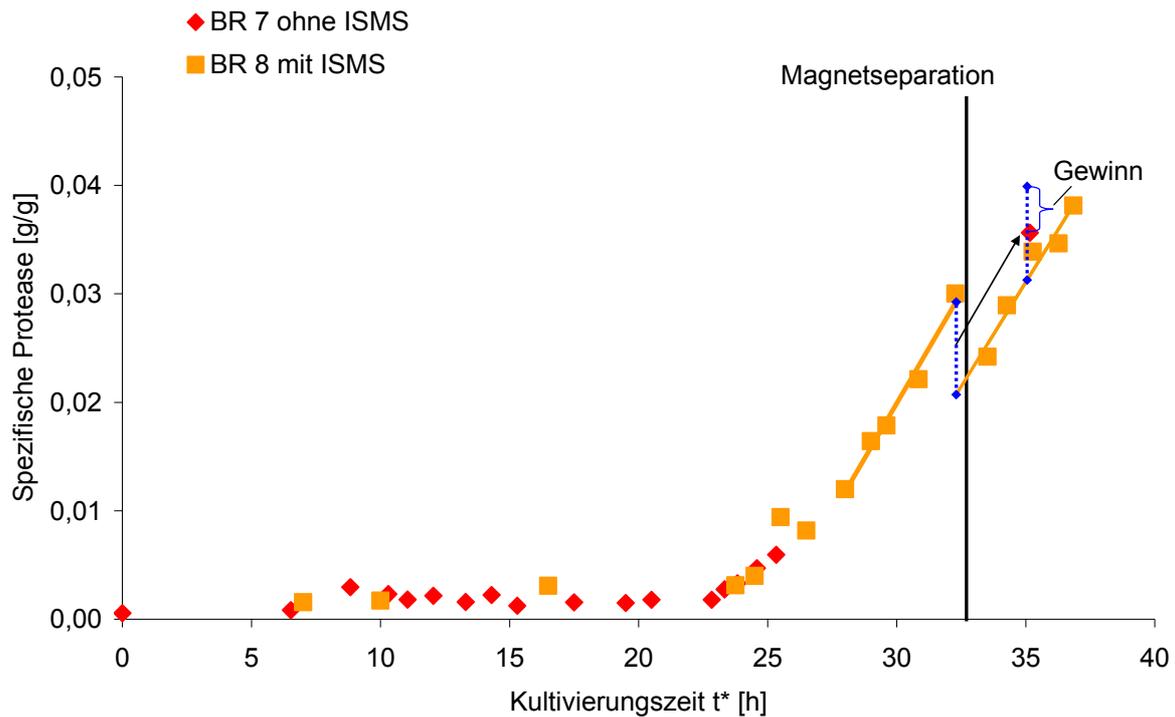


Abbildung 6.27: Vergleich der spezifischen Proteasekonzentration bei einer Kultivierung mit ISMS (BR 8) und einer ohne ISMS (BR 7); t^* ist die angepasste Kultivierungszeit

In BR 8 wurde, wie erwähnt, die Magnetseparation durchgeführt und ein erheblicher Anteil Produkt abgetrennt, der nach einer Elution als gewonnen angenommen werden kann. Somit kann der Differenzbetrag der produzierten Menge zuaddiert werden. Wird dies an der Stelle getan, wo eine Messung für BR 7 vorliegt, so kann eine erste Ausbeutesteigerung durch wiederholende Experimente ermittelt werden. Hierbei muss für den Zeitraum der Magnetseparation selbst eine Produktivität zwischen derjenigen nach der Magnetseparation und derjenigen vor der ISMS angenommen werden. Die ermittelte Ausbeutesteigerung von 15 % wird durch die geschweifte Klammer verdeutlicht. Dieses Verfahren ist allerdings kritisch zu betrachten, da von Versuch zu Versuch starke Variationen auftreten können, die durch geringe Änderungen innerhalb der Versuche (Rührerstellung, Sondenanordnung oder Vorgeschichte in der Vorkultur) verursacht werden.

Betrachtet man Abbildung 6.28, wo der Versuch BR 9 dargestellt ist, so kann gesehen werden, dass nach der Magnetseparation ohne signifikantes Biomassewachstum die Proteaseproduktion deutlich stärker ansteigt als vor der Abtrennung, also eine merkliche Erhöhung der spezifischen Produktivität zu beobachten ist.

Allerdings wurde bei diesem Versuch nur eine geringe Menge an Protease abgetrennt. Von dieser geringen Konzentrationsreduktion ist nicht zu erwarten, dass sie zu merklicher Reduktion an Proteasedegradation oder Produktinhibierung führt.

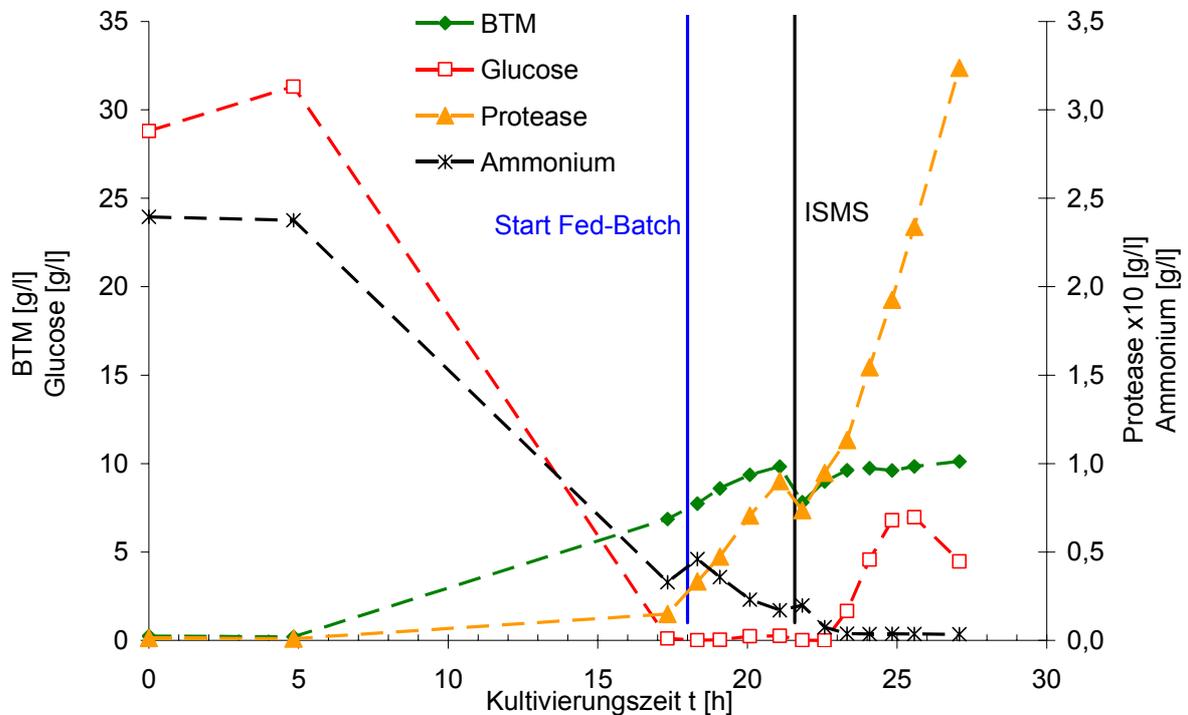


Abbildung 6.28: Übersicht Bioreaktorversuch BR 9; Feedrate: 5 ml/h ($c_{\text{Feed}}(\text{Glucose})=527 \text{ g/l}$; $c_{\text{Feed}}(\text{Ammoniumsulfat})=5 \text{ g/l}$)

Als Grund für den Anstieg der Proteasekonzentration ist hier die Prozessführung zu betrachten. Nach Fed-Batch-Beginn produziert der Organismus zunächst unter Glucoselimitierung. Nach der ISMS ist zu erkennen, dass die Limitierung von Stickstoff einsetzt. Unter der Glucoselimitierung konnte in der Phase zwischen dem Fed-Batch-Beginn und der ISMS ein deutliches Biomassewachstum beobachtet werden. Dies war nach der ISMS unter Stickstofflimitierung nicht mehr der Fall. Wie in Abbildung 4.12 dargestellt wurde, ist die Produktbildungsrate von der spezifischen Wachstumsrate abhängig. Daher ist hier der Anstieg der Produktivität auch durch diesen Umstand zu erklären. Deshalb ist es wichtig, bei der Betrachtung der Ausbeutesteigerung die Prozessführung und die anderen die Produktivität beeinflussenden Faktoren zu berücksichtigen. Weiterhin könnte die Stickstofflimitierung bei gleichem μ zu höherer Produktbildung führen. Dieser Umstand wird in Abbildung 4.12 angedeutet, kann jedoch nicht als nachgewiesen betrachtet werden. Abbildung

6.29 zeigt nach ca. 28 h auch ein Ansteigen der Glucosekonzentration. Dieser Anstieg deutet auf eine dann einsetzende Stickstofflimitierung ein. Im Folgenden steigt die Produktivität der Protease stark an.

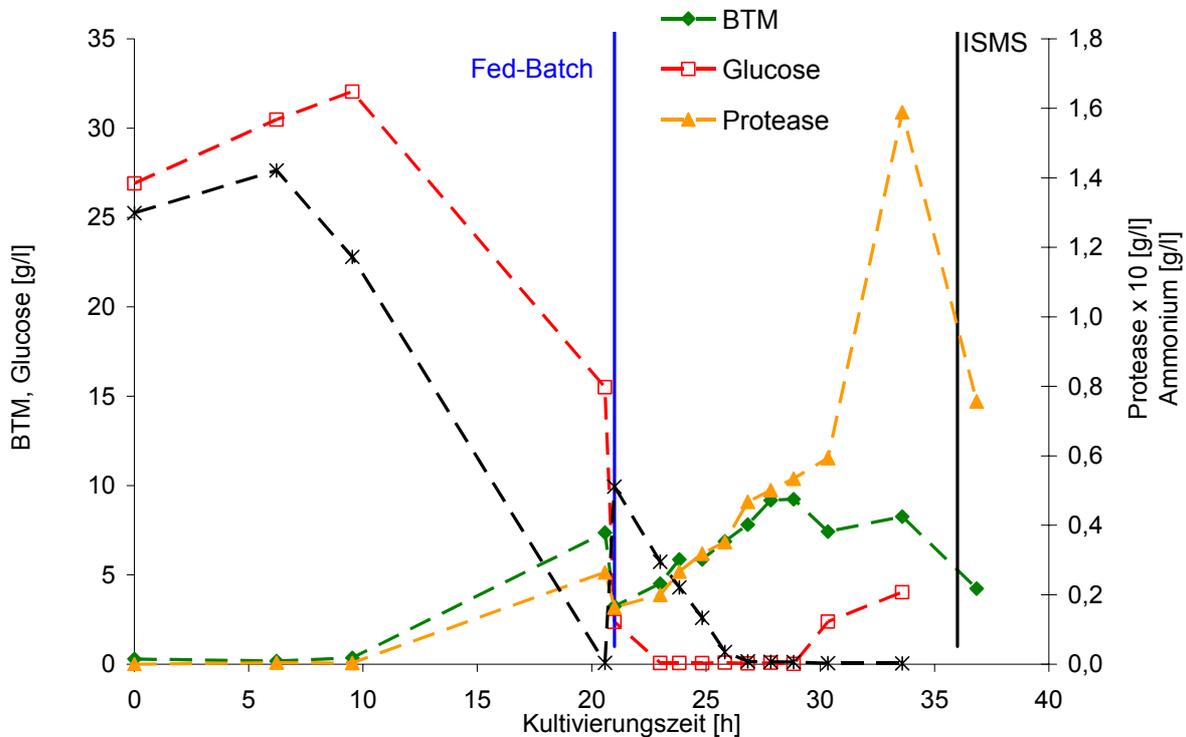


Abbildung 6.29: Übersicht BR 12; Feedrate (linearisiert): 5 ml/h ($c_{\text{Feed}}(\text{Glucose})= 560$ g/l; $c_{\text{Feed}}(\text{Ammoniumsulfat})=10$ g/l)

Auch in BR 14 kann der Zusammenhang zwischen Wachstum und Produktbildung sehr deutlich erkannt werden (Abbildung 6.30). Nach der ISMS fand ein Biomassewachstum statt, das durch eine zu hohe Zudosierung von Fed-Batchmedium begründet war. Nachdem dann dieses Wachstum aufgrund der eintretenden Stickstofflimitierung beendet ist und die Wachstumsrate stark reduziert wird, kommt es zu einem starken Anstieg der Produktivität. Der Unterschied der Produktivität ist hier nicht direkt vor und nach der ISMS zu erkennen, sondern in den Phasen vor und nach der ISMS, in der das Wachstum stark reduziert war. Nach der ISMS scheint hier die spezifische Produktivität vergleichbar mit derjenigen vor der Abtrennung ab Fed-Batch-Beginn, wenn man die Phase des limitierten Wachstums betrachtet.

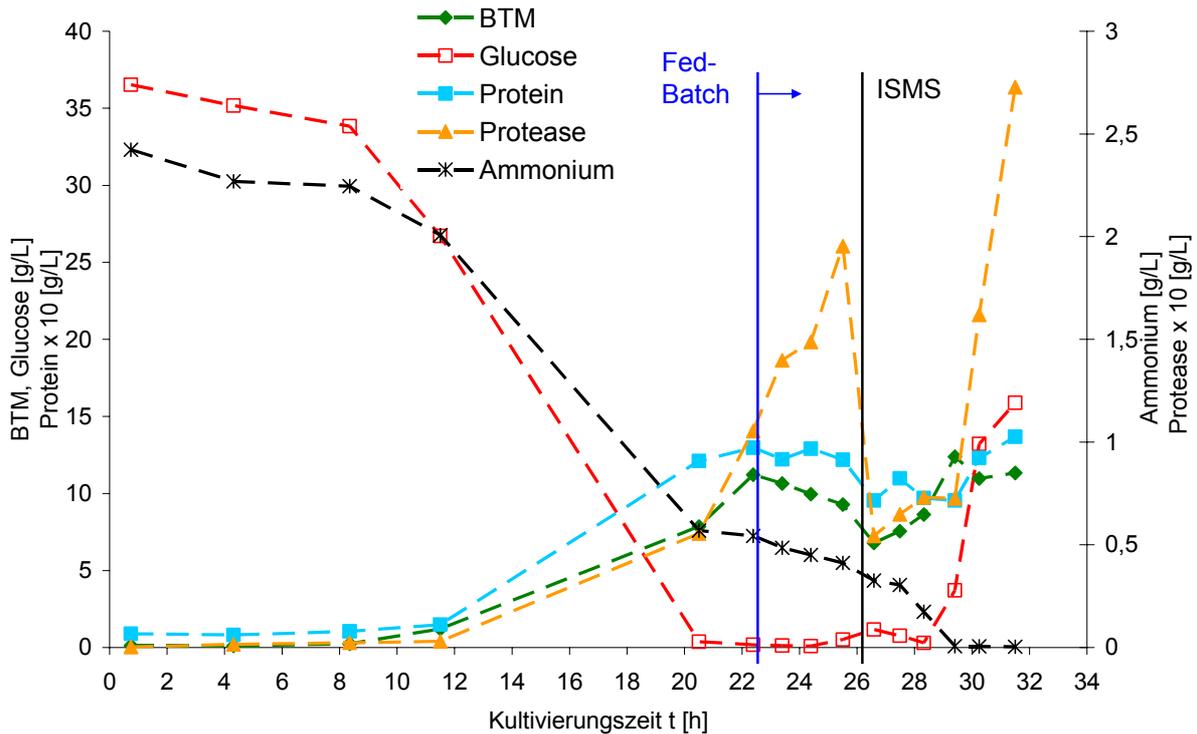


Abbildung 6.30: Übersicht BR 14; Feed: Stoßweise Zugabe von wenigen Millilitern bei $t=22,4$ und $t=24$; Feedregelung für $\mu=0,01 \text{ h}^{-1}$ ab $t=24,5$; Feedregelung für $\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$ ab $t=27,3$ ($c_{\text{Feed}}(\text{Glucose})=126 \text{ g/l}$; $c_{\text{Feed}}(\text{Ammoniumsulfat})=5 \text{ g/l}$)

Abbildung 6.31 zeigt den Verlauf einer Fed-Batchkultivierung (BR 15), in der keine Magnetseparation durchgeführt wurde. In dieser wurden unterschiedlich starke Stickstofflimitierungen durch das Fütterungsprofil realisiert. Glucose ist nicht dargestellt, da die Konzentration der Glucose immer so hoch gehalten wurde, dass keine Limitierung auftreten konnte. Der eigentliche Vergleich, der zwischen den Versuchen mit und ohne Magnetseparation durchgeführt werden muss, kann durch die Betrachtung der Produktivitäten geschehen, die bereits in Abbildung 4.12 gegeben sind.

Abbildung 6.32 zeigt die r_P -Werte, die aus den Bioreaktorversuchen gewonnen wurden. Hierbei ist der Abbau durch die Protease bereits berücksichtigt, das heißt, die Werte beziehen sich allein auf die Produktivität. Es ist zu erkennen, dass die Werte, die nach einer ISMS ermittelt wurden, über denen vor der ISMS bzw. aus Versuchen ohne ISMS waren. Auch der Vergleich zwischen den Versuchen ohne ISMS mit denen nach der ISMS zeigen eine Tendenz zu höheren Produktivitäten nach der ISMS. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Produktivität durch den Abzug des Produktes gesteigert wurde, unabhängig von der Degradation, also allein auf einen

Produktinhibierungseffekt zurückgeführt werden kann (vgl. Abbildung 6.13). Es konnte also in der Komplettfertmentation mit integrierter in-situ Abtrennung die Produktivität der Mikroorganismen gesteigert werden.

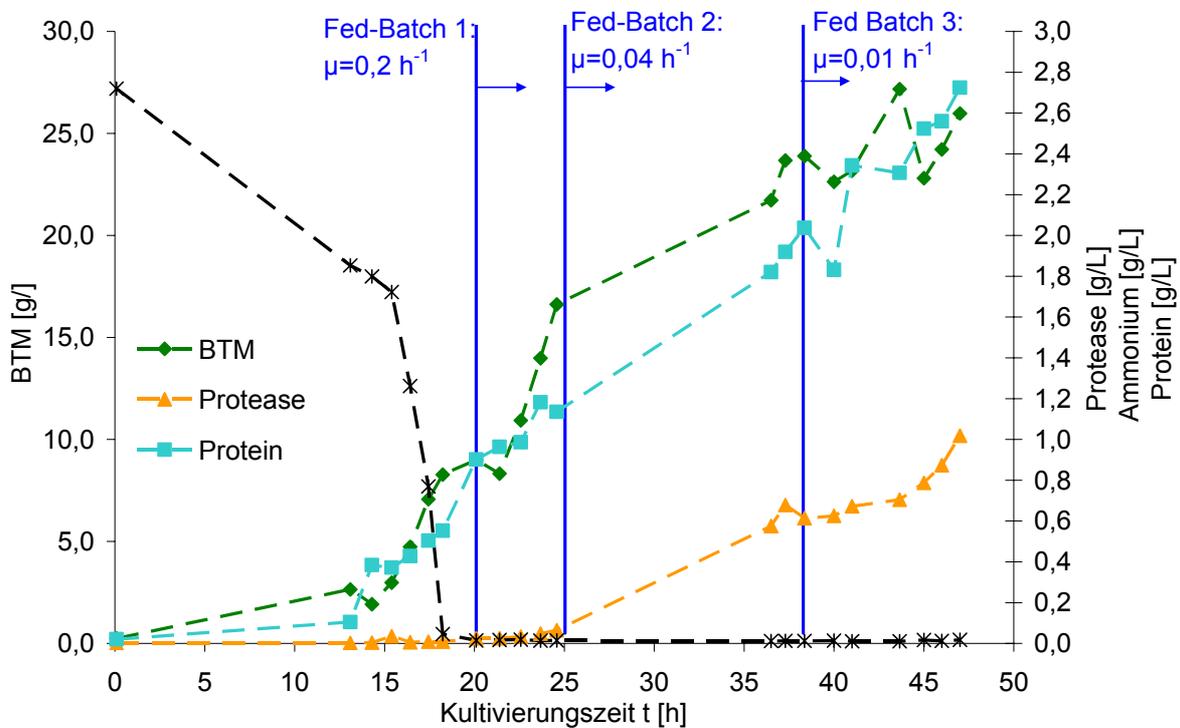


Abbildung 6.31: Übersicht des Bioreaktorversuchs BR 15; Feedrate für unterschiedliche Wachstumsraten geregelt ($C_{\text{Feed}}(\text{Glucose})=600 \text{ g/l}$; $C_{\text{Feed}}(\text{Ammoniumsulfat})=150 \text{ g/l}$)

Die Annahme der Produktinhibierung, die dazu führt, dass durch die ISMS die Produktivität gesteigert werden kann, kann durch die Auftragung der spezifischen Produktivität über der mittleren Konzentration im betrachteten Zeitraum nicht belegt werden. Abbildung 6.33 stellt diesen Zusammenhang dar. Es kann gesehen werden, dass die Produktivität bei großen Proteasekonzentrationen eher tendenziell abnimmt. Eine Produktinhibierung ist daher möglich, allerdings durch diese Darstellung nicht wirklich nachgewiesen.

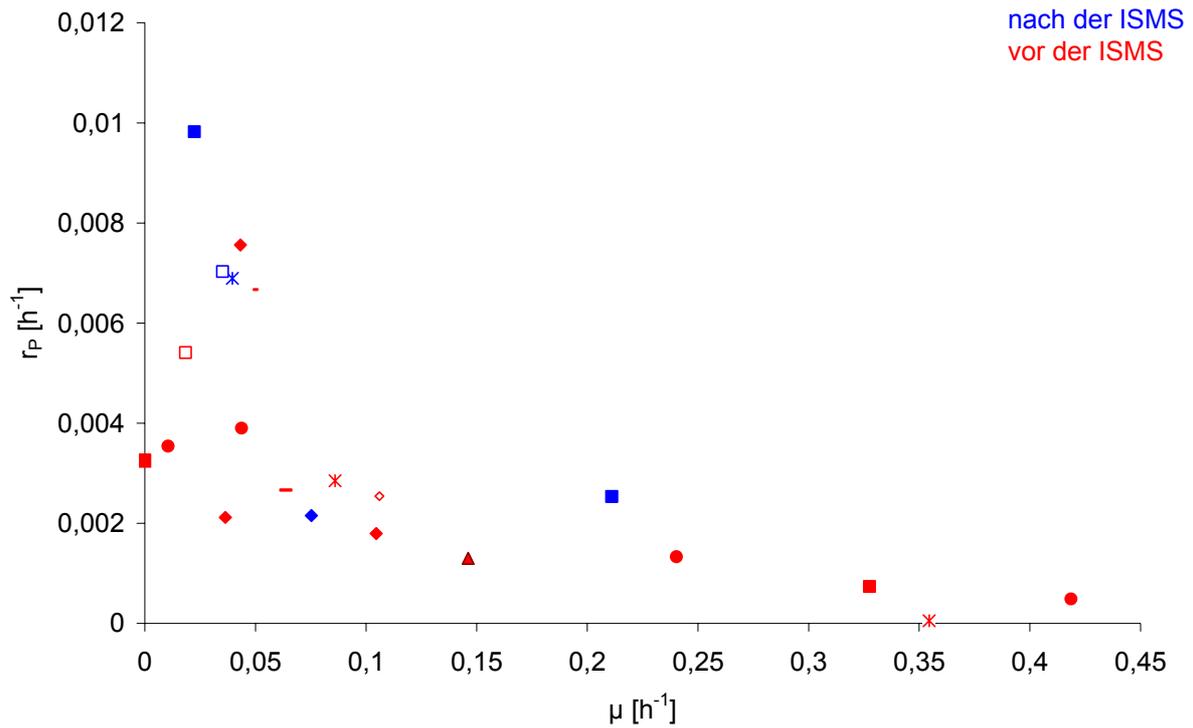


Abbildung 6.32: r_P -Werte für die gezeigten BR-Versuche; Daten aus einem Versuch haben das gleiche Symbol

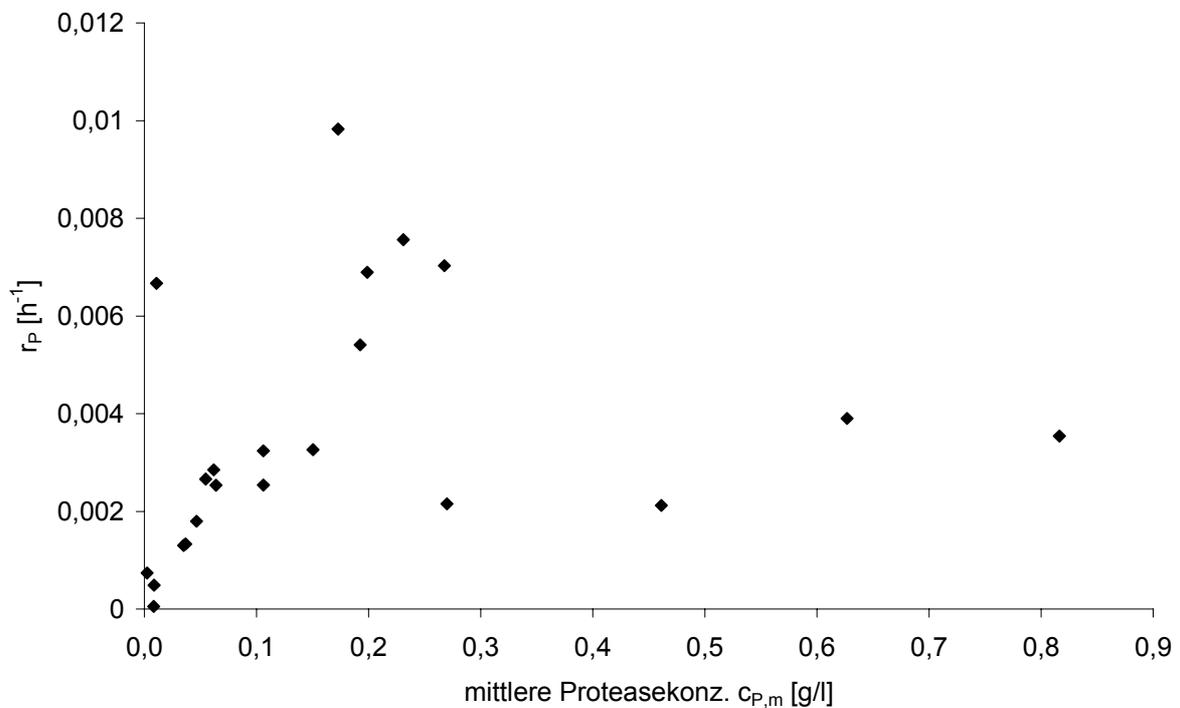


Abbildung 6.33: Abhängigkeit der spezifischen Produktivität von der mittleren Proteasekonzentration

Für die Berechnung der Gesamtausbeutesteigerung durch die ISMS muss neben der gesteigerten Produktivität auch die verringerte Degradation berücksichtigt werden. In diesem Kapitel wurde gezeigt, wie die Ausbeutesteigerung experimentell nachweisbar ist. Die quantitative Analyse muss allerdings durch rechnerische Betrachtung vollzogen werden. Hierauf wird im folgenden Kapitel 7 eingegangen, in welchem der Bioprozess mit und ohne ISMS simuliert wird.

Die in diesem Kapitel gezeigte erfolgreiche erstmalige Etablierung der in-situ Magnetseparation in einem Bioprozess, bei welchem kontaminationsfrei die Produktivität gesteigert werden und im Kreislauf das Produkt abgetrennt werden kann, muss technisch weiterentwickelt werden. Die Machbarkeit und Anwendbarkeit, vor allem jedoch der durch die ISMS entstehende Nutzen konnte dargelegt werden.

7 Simulation der ISMS

7.1 Simulation der Kultivierung von *Bacillus licheniformis* zur Produktion von Protease

Durch das Aufstellen eines Modells und die anschließende Simulation eines Prozesses können die Erkenntnisse über die Zusammenhänge deutlich verbessert werden. Es werden experimentell schwer zugängliche Sachverhalte durchdrungen und weiterhin kann eine Optimierung der Prozessführung stattfinden. Aus diesen Gründen wurde für die ISMS ein Modell aufgestellt, bei welchem der Bioprozess inklusive der Abtrennung der Proteasen während des Prozesses abgebildet wird.

Die Modellierung diene bei der Anwendung für die ISMS zur Beschreibung der Effekte, bzw. zur Evaluation der Ausbeutesteigerung.

7.1.1 Aufstellung des Bioprozessmodells für *Bacillus licheniformis*

Das Modell für die Produktion von Proteasen mittels *Bacillus licheniformis* sollte ein schwach strukturiertes Modell sein, bei welchem keine Änderung der Biomassezusammensetzung vorgesehen ist. Ein segregiertes Modell, bei welchem die Differenzierungsstadien wie sporuliert, nicht-sporuliert und bestimmte aktive Zustände bzw. der Übergang zwischen den Zuständen betrachtet wird, wäre experimentell aufwendig und auch für die eigentliche Zielsetzung einer Darstellung des Gewinns aus der ISMS bzw. für die beschreibende Darstellung der Prozessoptimierung der ISMS durch Simulation wenig hilfreich. Strukturierende Elemente sind lediglich die Stöchiometrien und Bilanzen, so dass eine Mittelung über die gesamte Biomasse möglich ist.

Die Substrataufnahme wird nach Gleichung 2.28 als maßgeblicher fundamentaler Schritt für die folgenden metabolischen Vorgänge angesehen:

$$r_s = r_{s,\max} \frac{c_s}{c_s + k_s} \quad 2.28$$

Diese ist motiviert aus der Annahme der für die Substrataufnahme geltenden Michaelis-Menten-Kinetik, welche als limitierend für die Substratnutzung angesehen wird.

Das Substrat ist die Grundlage für die Bildung von sämtlichen Stoffen. Die Verteilung der Stoffflüsse im Organismus (Abbildung 7.1) ist stark stöchiometrisch determiniert. Weiter bildet die Energiebilanz eine starke Kopplung zwischen Anabolismus und

Katabolismus, wie in Abbildung 7.1 zu erkennen ist. Nun kann für den Zusammenhang von Wachstum und Substrataufnahme ein einfacher Zusammenhang angenommen werden:

$$\mu = y_{X,S} \cdot r_S$$

7.1

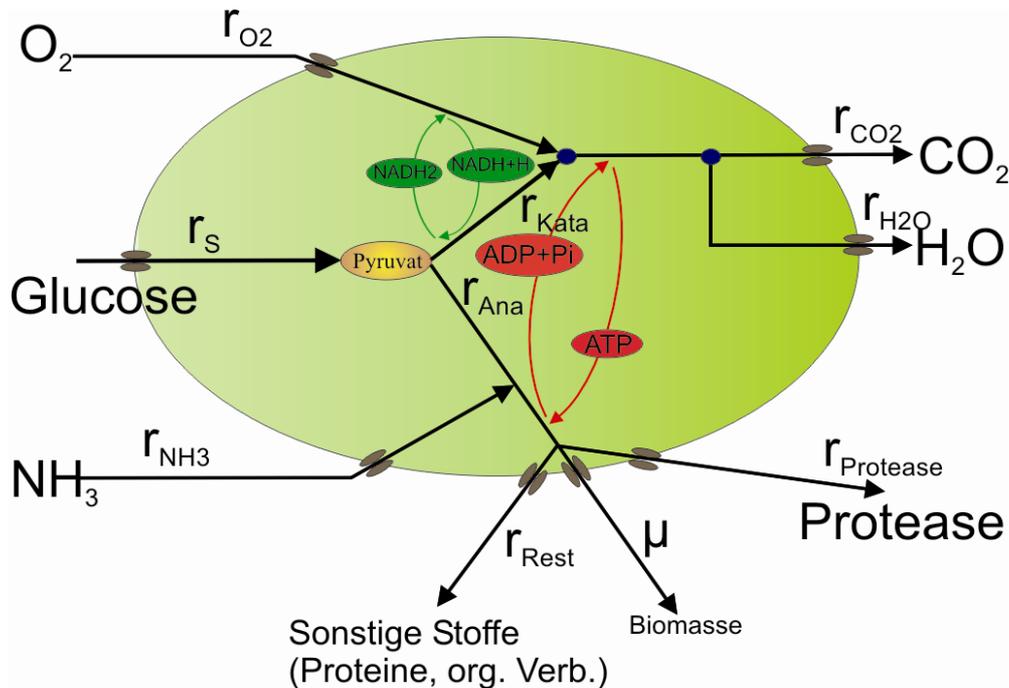


Abbildung 7.1: Stoffwechselströme bei *Bacillus licheniformis* bei der Produktbildung von extrazellulären Proteasen unter Aufnahme von Glucose

Jedoch ist bereits in Gleichung 2.29 nach Pirt eine Abweichung durch den Maintenance integriert, mit der diese einfache Stöchiometrie verlassen wird:

$$\mu = r_S y_{X/S} - \mu_E \quad 2.29$$

Wie später gezeigt wird, konnte kein Maintenance beim Glucoseverbrauch ermittelt werden, weshalb in dieser Arbeit Gleichung 7.1 verwendet wurde.

Weiterhin muss die Produktbildung, so diese nach Gleichung 2.30 bestimmt wird, einbezogen werden (Hong 1989).

$$r_p = \alpha + \beta \cdot \mu \quad 2.30$$

Bei Stickstofflimitierung ist das Wachstum des Organismus analog zur Glucoselimitierung zu sehen und es gilt:

$$r_{\text{NH}_4^+} = r_{\text{NH}_4^+, \text{max}} \frac{C_{\text{NH}_4^+}}{C_{\text{NH}_4^+} + k_{\text{S,N}}} \quad 7.2$$

Die Aufnahme von Stickstoff ist im limitierenden Fall wieder mit dem Wachstum gekoppelt:

$$\mu = y_{\text{X,N}} \cdot r_{\text{NH}_4^+} \quad 7.3$$

Für die gegebenen Ammonium- oder Glucosekonzentrationen wurden die jeweils entsprechenden Wachstumsraten berechnet und die niedrigere der beiden verwendet.

Das physiologische Teilmodell setzt sich also aus den Gleichungen 2.28, 2.30, 7.1, 7.2 und 7.3.

Der durch die Produktbildung verursachte Substratverbrauch wird in Modellen teilweise vernachlässigt, was jedoch nicht vollständig konsistent ist (Hong 1989).

Die Messung von Produktkonzentrationen wurde für Protein und Protease durchgeführt, die weiteren Substanzen jedoch nicht gemessen. Weiterhin ist die Stöchiometrie nicht exakt bekannt, da die Nebenprodukte nicht vollständig bestimmt wurden. Die Bestimmung des Maintenance in Abhängigkeit von der Wachstumsrate ist komplex, wenn beispielsweise darin neben dem Energiebedarf für den Aufbau und die Erhaltung des transmembranen Ionengradienten auch weniger klar zum Maintenance zugehörige Vorgänge dem Anabolismus bzw. Nicht-Maintenance oder eben dem Erhaltungsstoffwechsel zuzuordnen sind. Dies ist beispielsweise beim Turnover oder bei der Proteinsynthese schwierig (intrazelluläre Proteine erhöhen die Biomasse). Beispielsweise könnte der pro polymerisiertem Aminosäurerest erhöhte Energieverbrauch auch dem Maintenance zugeschlagen werden (Bulthuis et al. 1989). In strukturierten Modellen kann man Schwierigkeiten des Maintenances begegnen und die Phänomene unterschiedlicher Zellzusammensetzungen erklären, beispielsweise durch die Annahme, dass Zellen bei geringem Wachstum in entwicklungsfähige und nicht-entwicklungsfähige Zellen eingeteilt werden. Überblicke über strukturierte Bioprozessmodelle sind in der Literatur zu finden (Fredrickson 1976; Nielsen et al. 1991a; Nielsen et al. 1991b; Nikolajsen et al. 1991).

Für die unstrukturierte Modellierung mussten Vereinfachungen getroffen werden. Zunächst werden im Folgenden einige Beobachtungen beschrieben, welche durch die Messungen ermittelt wurden.

Die CO₂-Produktion ist in Abhängigkeit von der Wachstumsrate in Abbildung 7.2 dargestellt. Es wurde beobachtet, dass auch bei geringem Wachstum CO₂ produziert wurde, also sozusagen ein Maintenance zu beobachten war. Allerdings konnte dieser Maintenance nicht aus der Glucose-Verbrauchsrate ermittelt werden. Abbildung 7.3 zeigt ermittelte Werte für die spezifische Glucoseverbrauchsrate über dem Biomassenwachstum. Der CO₂-Verbrauch kann jedoch für den Mikroorganismus *Bacillus licheniformis* dadurch erklärt werden, dass er bei hohem Wachstum und hoher Substratkonzentration einen Überschussmetabolismus entwickelt, durch welchen vermehrt Stoffe gebildet werden, die später wieder verbraucht werden können, beispielsweise organische Säuren (Bulthuis et al. 1991). Die Werte bei geringem μ wurden in späten Phasen der Kultivierungen ermittelt, wo diese vorher gebildeten Überschussmetaboliten also vorhanden waren.

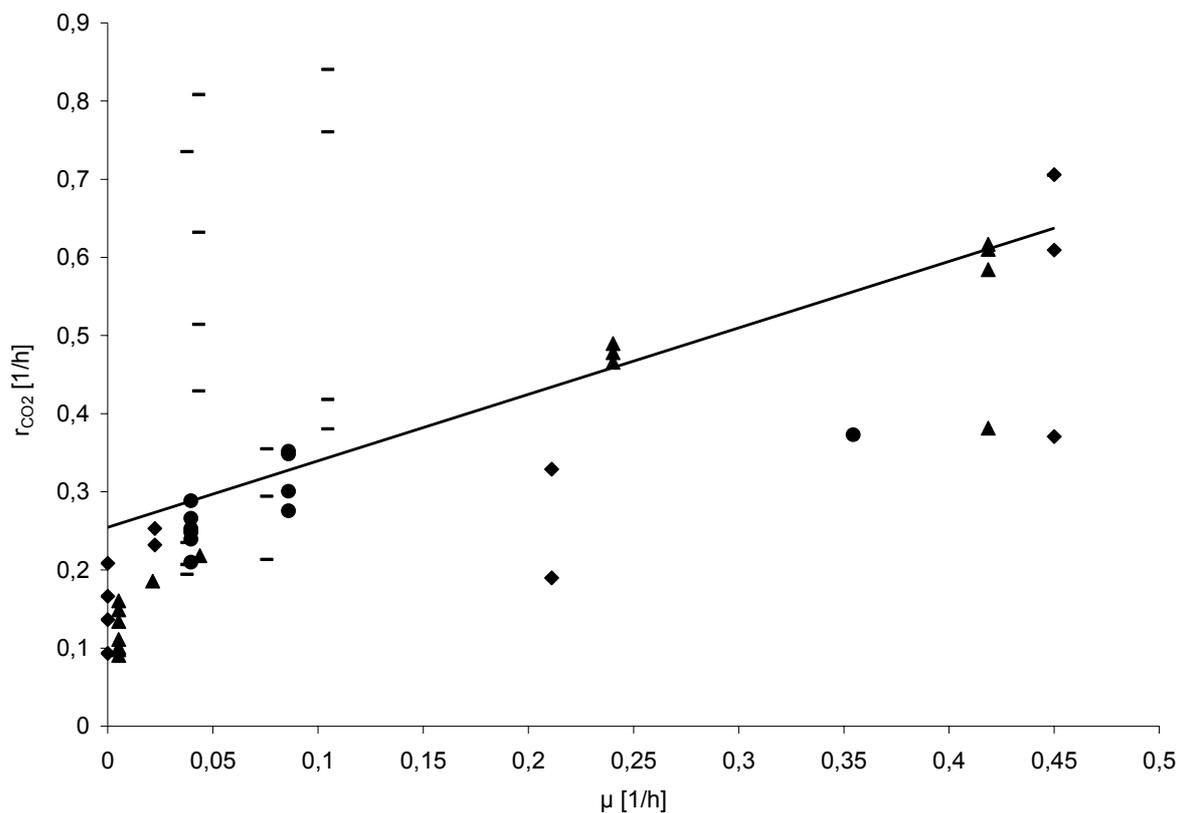


Abbildung 7.2: Spezifische CO₂-Produktionsrate in Abhängigkeit von der spezifischen Wachstumsrate für mehrere Kultivierungen

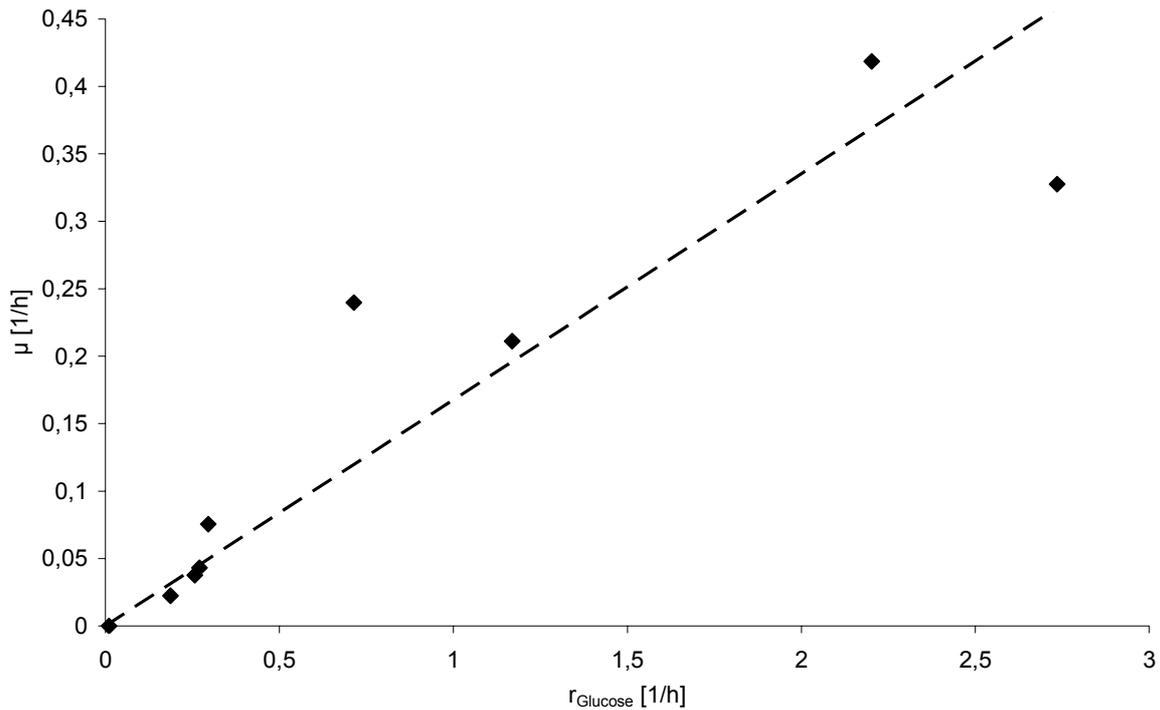


Abbildung 7.3: Spezifische Glucoseaufnahme über der spezifischen Wachstumsrate für drei Kultivierungen (BR 14-16)

Der in Abbildung 4.12 dargestellte Zusammenhang zwischen Proteaseproduktion und Biomassewachstum wurde verwendet, indem der Ansatz nach Luedeking und Piret (Gleichung 2.30) benutzt wurde. Hierbei wurde ein negativer Wert für den wachstumsabhängigen Parameter β verwendet.

Es wurden folgende Differentialgleichungen verwendet, die die Massenbilanz im Bioreaktor darstellen:

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X - D_V \cdot c_X \quad 7.4$$

$$\frac{dc_P}{dt} = r_P \cdot c_X - D_V \cdot c_P - k_{\text{deg}} \cdot c_P \quad 7.5$$

$$\frac{dc_S}{dt} = -r_S \cdot c_X - D_V \cdot c_S + D_V \cdot c_{S,f} \quad 7.6$$

$$\frac{dV}{dt} = q_{S,f} \quad 7.7$$

$$D_V = \frac{q_{S,f}}{V} \quad 7.8$$

Diese Bilanzen wurden mit den physiologischen Teilmodellgleichungen (2.28, 2.30, 7.1, 7.2 und 7.3) unter Vernachlässigung eines Erhaltungsstoffwechsels verknüpft und so der Bioprozess modelliert.

Die Modellierung diente der Darstellung des Gewinns an Protease. Die bei diesem schwach strukturierten Modell getroffenen Vereinfachungen nehmen jedoch Phänomene wie das Entkoppeln von Anabolismus und Katabolismus, Energievergeudung durch Leerlaufreaktionen oder auch Überschussmetabolismen nicht in Betracht. Auch metabolische Verschiebungen sind während einer Fermentation zu erwarten. Beispielsweise können *Bacillus sp.* sporulieren (Priest 1977). Diese Effekte könnten in einer strukturierten, segregierten Modellierung berücksichtigt werden.

7.1.2 Simulation des Bioprozesses zur Proteasenproduktion mit *Bacillus licheniformis*

Um die Berechnung des Nutzens der ISMS durchzuführen, wurde die Modellierung durchgeführt, wobei hier keine Magnetseparation integriert wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 7.4 dargestellt. Die verwendeten Parameter sind Tabelle 7.1 zu entnehmen.

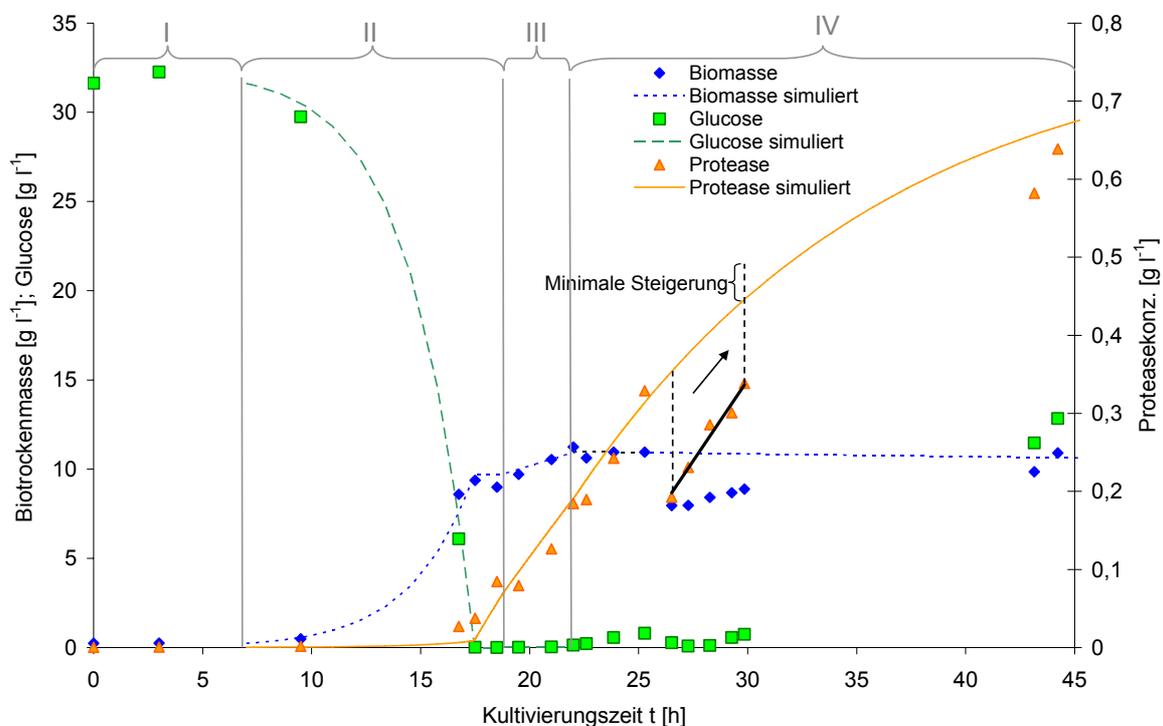


Abbildung 7.4: Simulation der Produktion der Protease im Vergleich zu den Messergebnissen der Kultivierung BR 8

Tabelle 7.1: Parameter der Simulation für BR 8 ohne Magnetseparation

Parameter	Bestimmungsmethode	Wert
μ_{\max}	aus Daten geschätzt	$0,36 \text{ h}^{-1}$
$r_{S,\max}$	aus Daten geschätzt	$1,2 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$r_{N,\max}$ (*)	aus Daten geschätzt	$0,1 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$y_{X,S}$	aus Daten geschätzt	$0,3 \text{ g g}^{-1}$
$y_{X,N}$ (*)	aus Daten geschätzt	$3,55 \text{ g g}^{-1}$
$k_S, k_{S,N}$	Größenordnung geschätzt	$0,1 \text{ g l}^{-1}, 0,01 \text{ g l}^{-1}$
k_{deg}	aus Daten geschätzt	$0,064 \text{ h}^{-1}$
α	aus Daten geschätzt	$0,005 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
β	aus Daten geschätzt	$-0,013 \text{ g g}^{-1}$

(*) N bezieht sich jeweils auf NH_4^+ , welches als Konzentration bestimmt wurde.

Bei der Simulation wurde die Lag-Phase von 7 h nicht berechnet (Phase I). Phase II ist die Batchphase, Phase III die Fed-Batchphase, in welcher Glucose limitiert, in Phase IV limitiert der Stickstoff das Wachstum, da dieser in deutlich geringerer Konzentration im Fed-Batch-Medium vorlag. Die Stickstoffkonzentration wurde in diesem Versuch nicht gemessen, allerdings ist aus der Glucosekonzentration, dem Wachstum und Vergleichsversuchen mit Ammoniummessung zu ermitteln, wo die Stickstofflimitierung einsetzt (Beginn Phase IV). Der Verlauf der Glucose wurde nur bis zum Ende der Phase II simuliert, danach wurde Glucose als nicht limitierend und Stickstoff in der Simulation als das limitierende Substrat angenommen. Die Ausbeutesteigerung, welche durch die geschweifte Klammer angedeutet ist, betrug 10 %. Hierbei wurde dem linearisierten Proteaseverlauf am Endpunkt nach der ISMS die abgetrennte Differenz zuaddiert. Der Gesamtwert wird mit dem simulierten Kurvenverlauf, welcher die Kurve ohne Abtrennung darstellt, verglichen. Diese Ausbeutesteigerung entspricht dem minimalen Gewinn, da bei diesem Versuch die Magnetseparation nicht optimal selektiv war und somit auch Biomasse verloren ging. In der Simulation (ohne ISMS) wird der Verlustterm nicht berücksichtigt. Die Verbesserung der Selektivität wird in Kapitel 6.4.1 thematisiert. Bei einer Reduktion des Verlustes ist gleichermaßen eine Steigerung des Gewinns zu erwarten, da die absolute Produktivität von der Organismenmenge abhängt.

Um auch die Adsorption zu integrieren, wurde diese ins Modell integriert, indem während der Separation ein Abflussterm für die Proteasen verwendet wurde, welcher der realen Adsorption entsprach. Kinetische Untersuchungen zeigen, dass die Adsorption nach einigen Minuten abgeschlossen ist (siehe Abbildung 7.5). Ebenfalls integriert wurde der Verlust von Biomasse, der experimentell bei den Versuchen vorhanden war, aber auch als Aufwand angesehen werden kann, den eine Magnetseparation mit sich bringt. Es werden immer gewisse Kosten durch dieses Verfahren verursacht, so dass ein gewisser Verlustterm eine Andeutung der ökonomischen Verhältnisse widerspiegelt.

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X - D \cdot c_X - z \cdot c_X \quad 7.9$$

$$\frac{dc_P}{dt} = r_P \cdot c_X - D \cdot c_P - k_{deg} \cdot c_P - \frac{d\Gamma}{dt} \frac{a_{spez,Partikel} m_{Partikel}}{V_{Reaktor}} \quad 7.10$$

Hierbei ist z ein anzupassender Parameter, der so gewählt wurde, dass der Biomasseverlust den experimentellen Werten bzw. deren Mittelung entsprach. Γ ist die Oberflächenbeladung der Partikel in g/m^2 und $a_{Partikel}$ deren spezifische Oberfläche in m^2/g .

Für die Adsorptionskinetik von Proteinen gilt Gleichung 2.35. Diese kann vereinfacht werden, wenn der limitierende Schritt von der Adsorption an sich oder dem Transport zur Oberfläche bestimmt wird (Norde et al. 2005). In den Adsorptionsversuchen wurde festgestellt, dass der limitierende Schritt der Adsorption durch den Transport hervorgerufen wird, weshalb vereinfachend folgende Gleichung für die Adsorptionskinetik angenommen werden kann:

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k_{Tr} (c_{P,bulk} - c_P^*(\Theta)) \quad 7.11$$

Für c_P^* wurde die Langmuir-Gleichung (2.37) eingesetzt, wobei Θ ($0 < \Theta < 1$) die relative Beladung also Q/Q_{max} ist. Die Langmuirgleichung wurde von der massenspezifischen auf die flächenspezifische Form gebracht, indem die spezifische Oberfläche anhand der abgeschätzten Dichte (1700 kg/m^3) und der aus der Partikelgrößenverteilung berechneten spezifischen Oberfläche von $2 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$ verwendet wurde. Die an die Messwerte mit Parameterschätzung angepasste Adsorptionskinetik ist in Abbildung 7.5 dargestellt. Das daraus ermittelte k_{Tr} ($0,004 \text{ m/h}$) wurde für die Abtrennung während der Simulation genutzt, wobei hier nur die Größenordnung für das Simulationsergebnis relevant war.

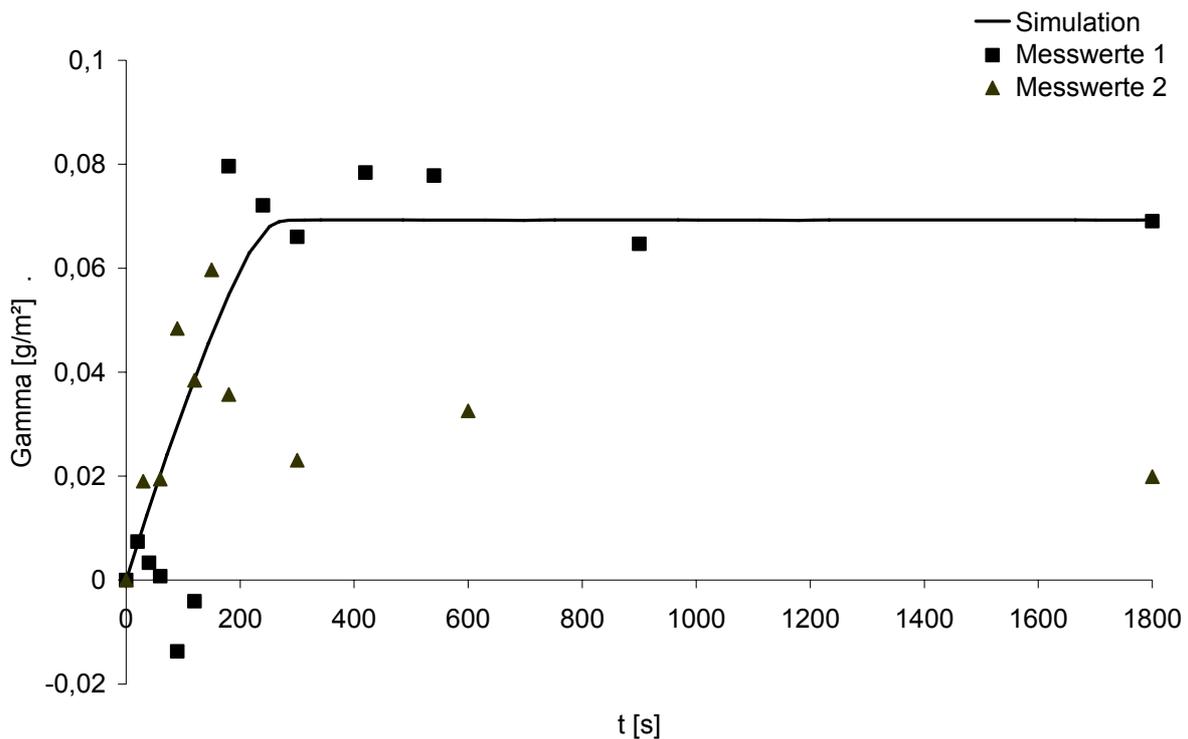


Abbildung 7.5: Adsorptionskinetik bei der Adsorption von Subtilisin an Bacitracin-Magnetpartikel

Abbildung 7.6 zeigt den Verlauf der Simulation von Biomasse und Protease bei integrierter Abtrennung der Protease und Verlust von Biomasse. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach der Abtrennung der Anstieg der Proteasekonzentration deutlich höher ist als in der Simulation vorausgesagt. Die insgesamt abgetrennte Proteasemenge ergibt sich anhand der Adsorptionsisotherme (Abbildung 6.20), welche mit Kultivierungsüberstand erstellt wurde. Es ist zu erkennen, dass in diesem Fall die Adsorption der Protease etwas höher war als für die Isotherme bestimmt, was an gewissen Unterschieden der Zusammensetzung der beiden Suspensionen liegen kann. Der Umstand jedoch, dass die gemessenen Werte der Protease deutlich stärker ansteigen als es anhand der Produktionskinetik zu erwarten wäre, ist ein weiteres Indiz für mögliche Produktinhibierung bei der Protease. Nach der Abtrennung steigt die Biomasse, anders als durch die Simulation berechnet, an. Dies kann daran liegen, dass während der Batchphase Überschussmetaboliten oder auch Protein gebildet werden, die dann wieder aufgenommen und verstoffwechselt werden können. Bei Versuchen wurden extrazelluläre Proteine von bis zu 0,2 g/g_{BTM} gemessen.

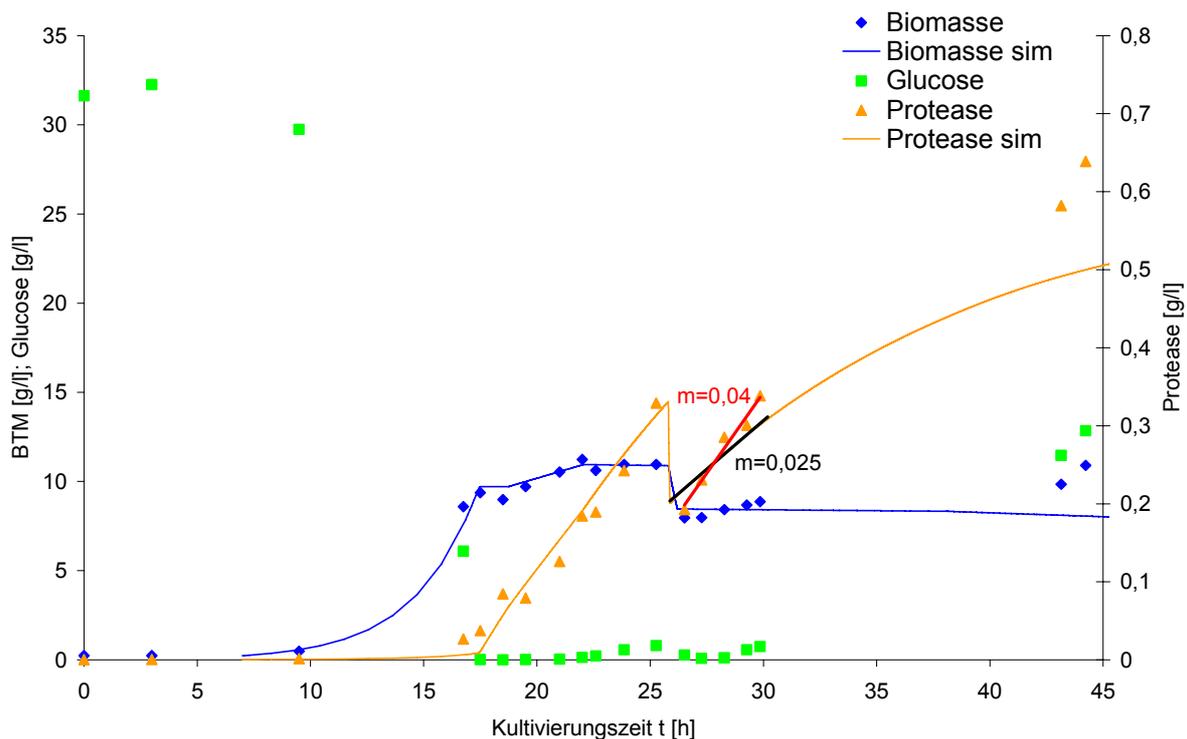


Abbildung 7.6: Simulation der Kultivierung BR 8 mit integrierter ISMS unter Berücksichtigung des Biomasseverlusts

Durch mehrfache Abtrennung kann die Ausbeute weiter optimiert werden. Allerdings ist dies bei gegebenem Biomasseverlust nur begrenzt bezüglich der Häufigkeit der Einsetzbarkeit möglich. In Abbildung 7.7 sind die Simulationen von Kultivierungen von *Bacillus licheniformis* dargestellt, bei welchen nach 20 h im Fed-Batch bis zu 10 ISMS-Schritte in den letzten 10 h durchgeführt wurden. Es kann daraus entnommen werden, dass durch den Biomasseverlust die Produktivitäten absolut immer weiter sinken und auch bei geringen Produktkonzentrationen die Adsorptionskapazität der Partikel nicht mehr gut ausgenutzt werden kann. Diese Effekte wirken den positiven Effekten der verringerten Proteasedegradation entgegen. Ebenfalls in der Abbildung sind die Ausbeutesteigerungen im Vergleich zur Kultivierung ohne ISMS dargestellt. Bei zwei Separationen ist das Maximum, das jedoch nur leicht höher ist als bei einer Separation. Bei 10 Separationen ist die Produktivität geringer als ohne Separation. Die Simulation kann hier zur Prozessoptimierung genutzt werden und man würde hier zwei Separationen durchführen, um die optimale Proteaseausbeute zu erhalten.

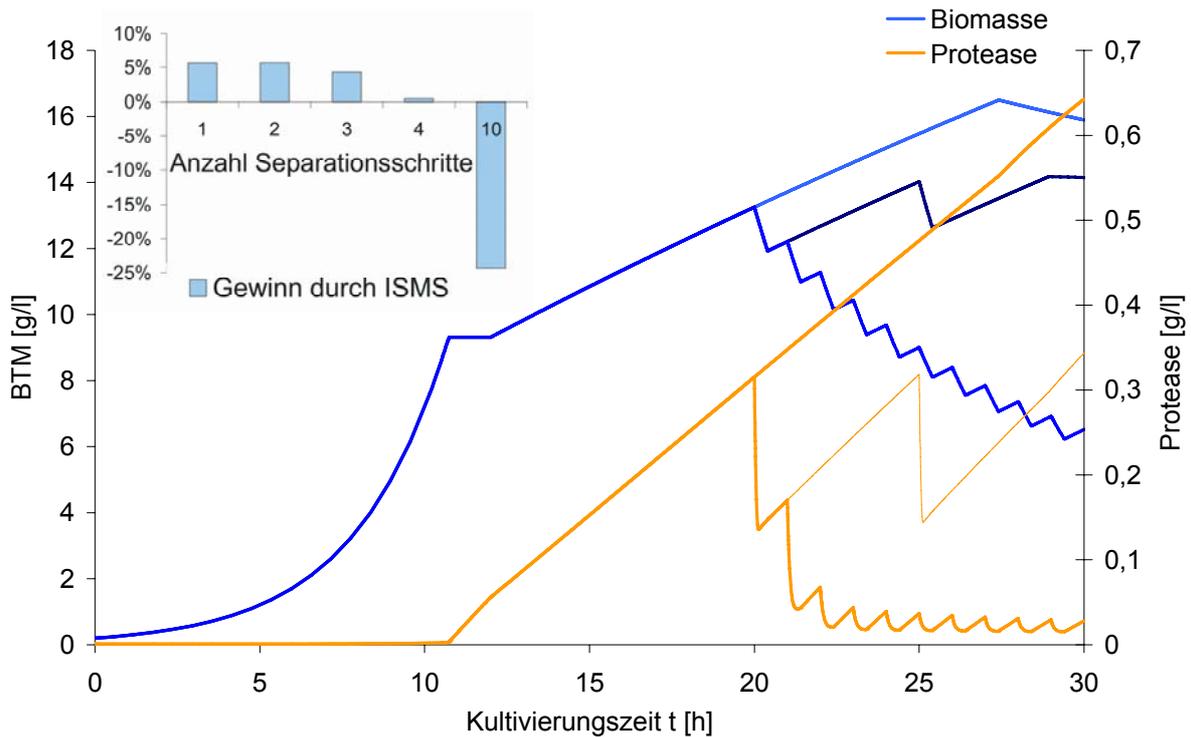


Abbildung 7.7: Simulation des Prozesses mit mehreren Abtrennschritten unter Berücksichtigung des Biomasseverlusts; links oben ist der Nutzen der ISMS im Vergleich dargestellt; auch bei optimierter Selektivität der HGMS repräsentiert der Biomasseverlust einen immer vorhandenen Aufwand der ISMS

Eine Inkonsistenz des Modells kann am Ende der Biomassekurve ohne Abtrennung gesehen werden. Hier sinkt die Biomasse bei gleichzeitiger Produktion. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Produktionsgleichung (2.30) auch bei geringem Wachstum gilt. Bei Verbrauch aller C-, bzw. N-Quellen wird die Biomasse zur Erhaltung der Bilanz verbraucht, die Simulation ermöglicht also kryptisches Wachstum.

Die Ausbeutesteigerung in Abbildung 7.7 bezieht sich auf die Gesamtmasse des Produktes. Wenn man den Prozess optimieren will, so ist die Maximierung verschiedener Größen als ökonomisch sinnvoll möglich. Abbildung 7.8 zeigt den Verlauf verschiedener Größen über der Wachstumsrate, welche im Fed-Batch einstellbar ist.

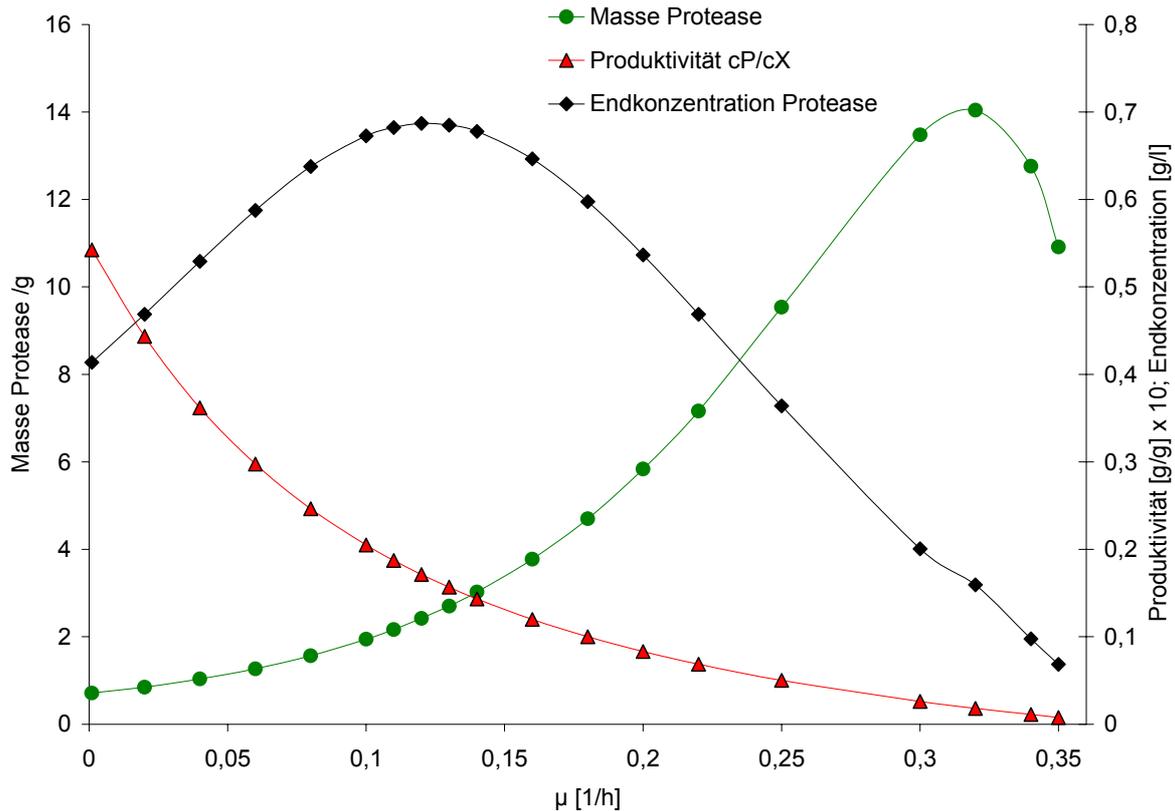


Abbildung 7.8: Maximierung verschiedener Parameter zur Veranschaulichung des Einflusses der wirtschaftlichen Faktoren auf die Gestaltung des Bioprozesses; Beispiel einer Kultivierung von *B. licheniformis* für 20 h im Fed-Batch; dargestellt sind jeweils die Endpunkte der Simulation

Die Produktmassenausbeute hat ihr Maximum etwas unter der maximalen spezifischen Wachstumsrate von $0,36 \text{ h}^{-1}$, bei etwa $0,32 \text{ h}^{-1}$. Dann ist aber, wie im Diagramm ersichtlich, die Endkonzentration relativ gering bzw. das Suspensionsvolumen sehr hoch, so dass die nachfolgenden Trennschritte negativ beeinflusst werden. Weiterhin dargestellt ist die Produktivität, welche die für die Biomasse eingesetzten Rohstoffe in Betracht nimmt. Die eingesetzte Rohstoffmenge wird bei geringen Wachstumsraten optimiert. Die mit dieser Darstellung verdeutlichten Zusammenhänge sind auch für die Optimierung der ISMS von Bedeutung, da die ISMS auch ein Werkzeug zur Erhöhung der jeweiligen Zielgröße darstellt und daher bei der wirtschaftlichen Verbesserung des Prozesses sowohl der Bioprozess als auch die integrierte Separation berücksichtigt werden muss.

7.1.3 Berechnung eines Bioprozesses zur Produktion von Glutaminsäure unter Produktinhibierung mit integrierter ISMS

Die bisherige Betrachtung fokussierte sich auf die Ausbeuteerhöhung eines Prozesses zur Proteaseproduktion mit *Bacillus licheniformis*. Es konnte gezeigt werden, dass dabei eine Ausbeutesteigerung durch ISMS möglich ist, jedoch ist dieses System wohl nicht der geeignetste Anwendungsfall dieser Technologie. Um zu zeigen, dass diese Technologie weit höhere Ausbeutesteigerungen in Fällen mit eindeutiger Produktinhibierung des Wachstums erbringen kann, wurde anhand von Literaturwerten der Produktion von L-Glutaminsäure mit *Corynebacterium glutamicum* eine Simulation mit integrierter Magnetseparation durchgeführt (Khan et al. 2005). Glutaminsäure wird als Geschmacksverstärker eingesetzt und im Millionen-Tonnen-Maßstab hergestellt. Da die Glutaminsäure eine geladene Aminosäure ist, mit pK_S -Wert von 4, also der einer schwachen Säure, kann diese mit Ionentausch abgetrennt werden, beispielsweise mit Partikeln wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurden (siehe Kapitel 6.1).

Das Produkt verringert das Wachstum des Bakteriums, wobei die Produktbildung ans Wachstum gekoppelt ist. Das bedeutet, dass auch die Produktbildung mit steigender Produktkonzentration verringert wird ($\alpha=0$ in Gleichung 2.30). Die Inhibierung kann nach Levenspiel folgendermaßen beschrieben werden und stellt damit eine Erweiterung von Gleichung 2.28 dar (Levenspiel 1980):

$$r_S = r_{S,max} \frac{C_S}{k_S + C_S} \left(1 - \frac{C_{Produkt}}{k_I}\right) \quad 7.12$$

Die Werte für die Parameter wurden der oben genannten Literatur nach Khan et al. entnommen ($k_I=11,5$ g/l). Es wurde die ISMS mit fiktiven Magnetpartikeln durchgeführt, die gute adsorptive Eigenschaften (etwa wie die Partikel in Abbildung 3.10) hatten und in realistischer Konzentration eingesetzt wurden (10-15 g/l). In Abbildung 7.9 ist zu erkennen, dass bei der 40-stündigen Kultivierung bereits bei einem Abtrennschritt wieder die gleiche Produktendkonzentration erreicht wird. Die Ausbeutesteigerungen sind in Abbildung 7.10 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass durch drei Separationen eine Steigerung von 88 Prozent erreicht wird. Diese Steigerung wurde trotz eines hoch angenommenen Biomasseverlusts von 20 Prozent pro Separationsschritt erzielt.

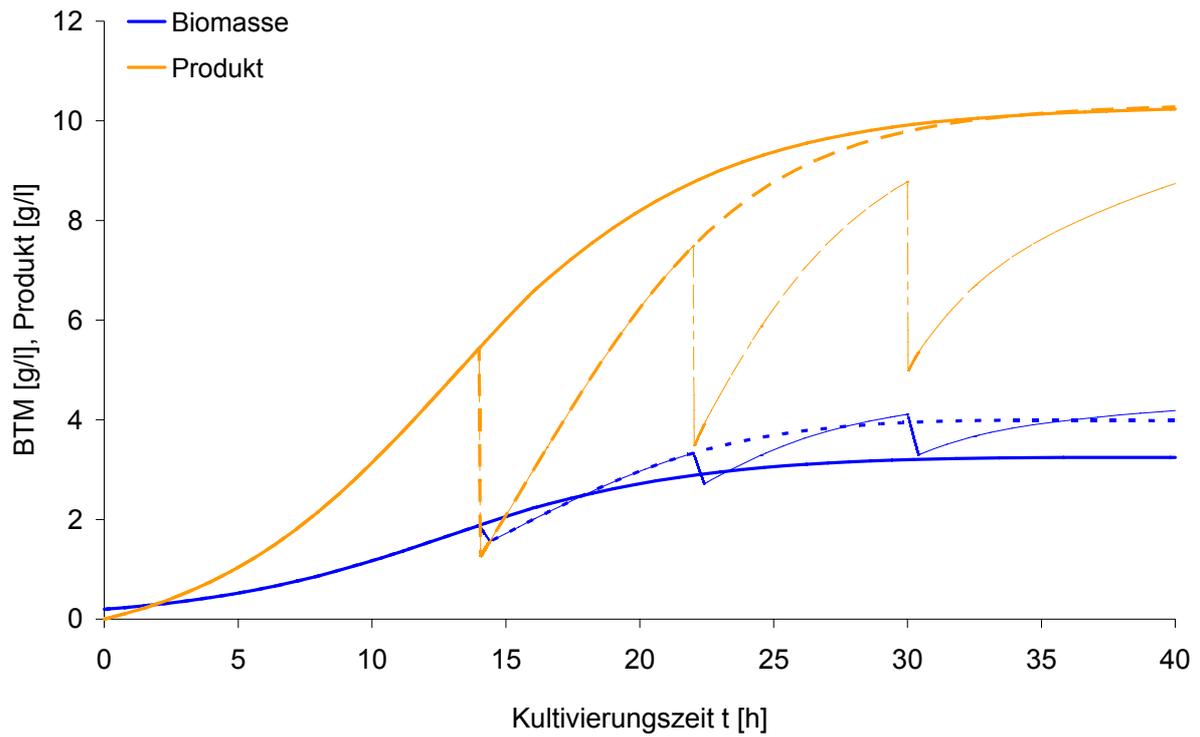


Abbildung 7.9: Verlauf der Biomasse und der Produktkonzentration bei Produktinhibierung

Dieses gewählte Beispiel zeigt das Potential von ISMS an. Der Einsatz bei wachstumshemmenden Produkten ist besonders sinnvoll.

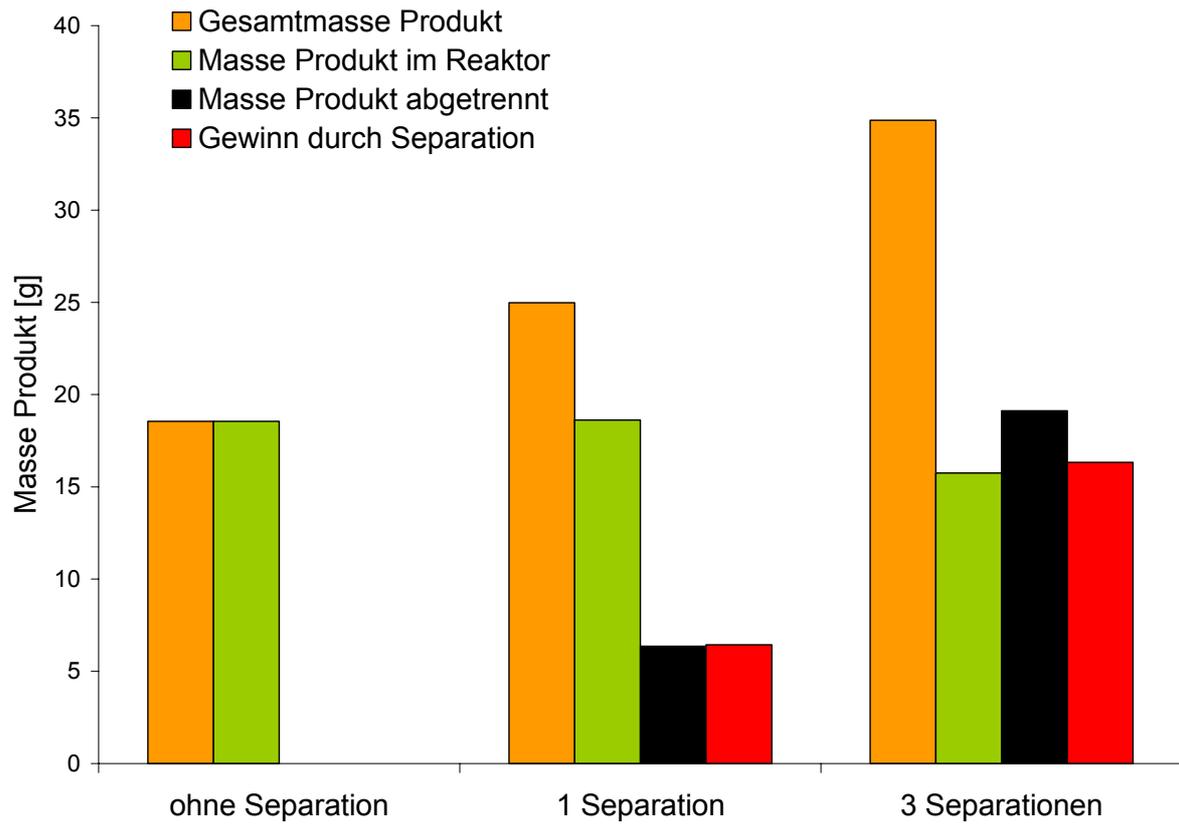


Abbildung 7.10: Berechnung der Ausbeutesteigerung bei der Produktion unter Produktinhibierung bei unterschiedlicher Anzahl der Separationsschritte

8 Zusammenfassung und Ausblick

8.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden statische elektrische und magnetische Felder zur Intensivierung von Bioprozessen bzw. deren Teilschritten eingesetzt, untersucht und etabliert. Im Zentrum stand dabei der Einsatz der neuartigen Anwendung einer Elektrofiltration zur Fraktionierung von Proteinen und die Etablierung des innovativen *in-situ* Verfahrens zur magnetischen Produktabtrennung.

Bacillus licheniformis wurde als Organismus für die Untersuchungen genutzt und dabei konnten Erkenntnisse über diesen Wirtsorganismus gewonnen werden, unter welchen Bedingungen Proteasen durch diesen produziert werden. Die Produktion wird durch im Medium vorhandene Proteine angeregt, ist aber auch durch eine Limitierung beispielsweise der Stickstoffquelle möglich. Die Produktbildung unterliegt jedoch einem abfließenden Term, da die Protease in einer Reaktion erster Ordnung abgebaut wird. Daher ist eine schnelle Abtrennung sinnvoll.

Elektrofiltrationsverfahren sind eine Möglichkeit der Kinetikverbesserung innerhalb des Downstream Processing. Es konnte gezeigt werden, dass Mikroorganismen in einer Primärseparation deutlich schneller mit einem überlagerten elektrischen Feld filtriert werden können. Hierbei war es eine wesentliche Erkenntnis, dass die kinetische Verbesserung durch das E-Feld, welche bis zu einer Größenordnung betrug, nicht allein durch die elektrophoretische Bewegung der partikulären Organismen zur anodenseitigen Membran erklärbar ist, sondern hierfür auch strukturelle Ursachen im Filterkuchen vorhanden sein müssen. Sowohl die Messung der Filterkuchenmasse als auch die Modellierung des Prozesses belegen diese Aussage.

Neben der vertieften Erkenntnis, die im Elektrofiltrationsbereich erbracht werden konnte, wurde auch ein neuer Verfahrensansatz etabliert, bei welchem die Anisotropie durch das E-Feld in der Filterkammer ausgenutzt wird, indem Membranen unterschiedlicher Porengröße verwendet wurden. Dadurch konnten die Modellproteine BSA und Lysozym in hochselektiver Weise, wie es für einen Ultrafiltrationsprozess bisher nicht möglich war, getrennt werden. Neben der hohen Selektivität war auch die Kinetik des Prozesses mit der industriell eingesetzten Querstromfiltrationen vergleichbar. Der direkte Kontakt mit der Elektrode zeigte dabei keine Degradation des Enzyms, so dass dieses aktiv gewonnen werden konnte.

Die *in-situ* Separation von Proteinen aus *Bacillus licheniformis* Biosuspension konnte aus dem synthetischen Medium auch für Ionenauschpartikel etabliert werden. Hierbei wurde eine neue Generation von Komposit-Magnetpartikeln eingesetzt, welche sehr gute Adsorptionskapazitäten aufwiesen und im Schüttelkolben jeweils selektiv die engengesetzt geladenen Proteine abtrennen konnten.

Ebenfalls im Schüttelkolben wurde eine dort produzierte Protease abgetrennt. Dies wurde mit Bacitracin-Magnetpartikeln durchgeführt, welche eine Affinität für die Protease besitzen. Das Ergebnis dieser Abtrennung war eine deutlich höhere spezifische Produktbildung. Diese kann durch die bei Proteasen beschriebene indirekte Produktinhibierung erklärt werden, welche durch die Aminosäuren im Medium bewirkt wird.

Das Konzept der *in-situ* Magnetseparation wurde in dieser Arbeit erstmals genutzt. Es wurde das *in-situ* Separationsverfahren einem Scale-up in den Bioreaktormaßstab unterzogen, bei dem der Bioreaktor mit einer Hochgradienten-Magnetseparationseinheit über ein Ventilsystem gekoppelt wurde. Dadurch war der gesamte Abtrennprozess, samt Waschung und Elution der Partikel parallel zur Kultivierung möglich. Die Hochgradienten-Magnetseparation wurde durch eine Modellierung der Abscheidegrade hinsichtlich der Selektivität verbessert, da es möglich war, weitmaschige Drahtmatrizen zu benutzen.

Es wurde im Fed-Batch-Prozess während der Produktionsphase die Protease abgetrennt, wodurch sich auch im Bioreaktor eine höhere Produktbildung bzw. eine höhere Ausbeute ergab. Diese betrug experimentell etwa zehn Prozent. Durch die modellierende Simulation des Bioprozesses konnte dieser Effekt aufgrund der sich abbauenden Protease erklärt werden. Die Simulation des Prozesses lässt auch zu, den Bioprozess mit *in-situ* Magnetseparation zu optimieren, um möglichst die optimale Prozessführung zu ermöglichen.

Die Anwendung der Simulation auf einen anderen in der Literatur beschriebenen, industriell wichtigen Prozess zur Glutaminsäureproduktion konnte zeigen, dass der Nutzen der *in-situ* Magnetseparation deutlich über den im Modellsystem *Bacillus licheniformis* ermittelten Werten sein kann und somit eine breite Möglichkeit des Einsatzes vor allem bei inhibierenden Produkten oder solchen, die einer starken Degradation unterliegen, gegeben ist.

8.2 Ausblick

Die Elektrofiltration ist bereits ein im Pilotmaßstab untersuchtes Verfahren, das für den Industriemaßstab einer ersten Nutzung bedarf. Hierbei ist die Optimierung des Prozesses vor allem im Hinblick auf die Energieeffizienz nötig. Bei bekannten Produkteigenschaften, bei denen sich der Einsatz prinzipiell lohnt, muss die Filterkammer so optimiert werden, dass möglichst geringe Widerstände dem elektrischen Feld entgegenwirken vor allem bezüglich seines effektiven Wirkungsorts an der Membran. Dazu kann die Verkleinerung der Spülkammern, aber auch der Kammer dienen, die an den zu bildenden Kuchen angepasst werden muss. Weiterhin ist die Nutzung eines inhomogenen E-Feldes bei zylindriger Filterflächenanordnung denkbar.

Neben diesen konstruktiven Verbesserungen ist eine Optimierung der Betriebskostengrößen E-Feld und Druck möglich, die nach ökonomischen Betrachtungen ein Optimum ermöglichen.

Beim Einsatz zur fraktionierenden Elektro-Ultrafiltration sind mechanistische Aufklärungen über die genauen Abläufe und Wanderungen der Substanzen in der Filterkammer zu ermitteln, um durch das vertiefte Verständnis, beispielsweise über den Aufbau der ersten Filterkuchenschicht und deren Konzentrationsverlauf, weitere Optimierungen des Verfahrens zu ermöglichen.

Generell sollte das fraktionierende Elektro-Ultrafiltrationsverfahren in marktgerechter Weise umgesetzt und vertrieben werden. Der Einsatz im Pharmabereich muss durch tiefgreifende Untersuchungen über elektrochemische Veränderungen der mit der Elektrode in Kontakt kommenden Stoffe begleitet werden. Eine zusätzliche Membran vor der Elektrode kann hier im Falle unerwünschter Reaktionen eine Lösungsmöglichkeit darstellen.

Der Einsatz der Elektrofiltration im Bereich der Primärseparation ist einer Wirtschaftlichkeitsanalyse zu unterziehen. Für die Abtrennung von Lactat produzierenden Mikroorganismen bei gleichzeitiger elektrodialytischer Abtrennung des Lactats spricht, dass die eingeführte elektrische Energie hier besonders effizient eingesetzt wird, falls die Organismen ein ausreichend hohes Zetapotential besitzen.

Zum Einsatz der Magnetseparation als integriertes Separationsverfahren ist vor allem die nötige Entwicklungsarbeit im Bereich der Partikel zu nennen. Diese müssen hochselektive adsorptive Eigenschaften, mit effektiver Elutionsmöglichkeit

haben und robust, bzw. stabil für eine Wiederverwendbarkeit sein. Diese Forderungen können spezifisch für den Anwendungsfall auf ein attraktives Wertprodukt entwickelt werden.

Weiterhin ist auch bei der Magnetseparation die Optimierung der Energieeffizienz ein wichtiger Schritt in Richtung praktischer Anwendung. Durch die Nutzung von schaltbaren Permanentmagneten oder mit Supraleitern könnten die Betriebskosten auf ein niedriges Niveau gesenkt werden.

Die *in-situ* Magnetseparation muss auch im kontinuierlichen Prozess, bei welchem das Produkt in wiederholter Weise immer wieder abgezogen wird, etabliert werden. Hierbei ist die bereits erwähnte Wiedereinsetzbarkeit der Partikel wichtig, aber auch die Sicherstellung eines kontaminationsfreien Betriebs über eine lange Nutzungszeit. Ebenfalls entscheidend ist eine Entwicklung eines technisch anwendbaren effektiven Redispergierungsverfahrens der Magnetpartikel, so dass die Magnetpartikel automatisiert den verschiedenen Prozessstufen Elution, Waschung, Regenerierung und Adsorption zugeführt werden können. Die selektive Abtrennung der Magnetpartikel von der Biosuspension muss ebenfalls verfahrenstechnisch optimiert werden.

Durch weiterführende Bioprozesssimulationen kann auch mit der Nutzung wirtschaftlicher Kenngrößen eine Optimierung des *in-situ* Magnetseparationsverfahrens verwirklicht werden. Sie könnte dann auch als Verfahren zur Abtrennung kleiner organischer Moleküle, wie das gezeigte Beispiel der Glutaminsäure, untersucht werden, wobei hier auch die neuartigen Ionentauscher-Komposit-Magnetpartikel eingesetzt werden könnten.

Es ist denkbar, dass der Einsatz der *in-situ* Magnetseparation die rekombinante Produktion von Proteinen mit *Bacillus* ermöglicht, was bisher vor allem an den proteolytisch wirksamen Proteasen dieses Organismus gescheitert war. Weiterhin ist es möglich, die extrazelluläre Produktion von Proteinen in Bakteriensystemen wie *E. coli* weiter zu unterstützen, was eine Vielzahl verfahrenstechnischer Vorteile mit sich bringen würde.

9 Literaturverzeichnis

- Abramson HA, Moyer LS, Gorin MH. 1942. Electrophoresis of Proteins. New York: Reinhold.
- Adamson NJ, Reynolds EC. 1997. Rules relating electrophoretic mobility, charge and molecular size of peptides and proteins. *Journal of Chromatography B* 699(1-2):133-147.
- Ahuja S. 2000. Handbook of bioseparations. San Diego: Acad. Press. 722 p.
- Anderson JL, Quinn JA. 1974. Restricted Transport in Small Pores - Model for Steric Exclusion and Hindered Particle Motion. *Biophysical Journal* 14(2):130-150.
- Angkawidjaja C, Kuwahara K, Omori K, Koga Y, Takano K, Kanaya S. 2006. Extracellular secretion of *Escherichia coli* alkaline phosphatase with a C-terminal tag by type I secretion system: purification and biochemical characterization. *Protein Engineering Design & Selection* 19(7):337-343.
- Atkinson B, Mavituna F. 1991. Biochemical engineering and biotechnology handbook. Basingstoke: Macmillan [u.a.]. XXIX, 1271 p.
- Badyakina AO, Nesmeyanova MA. 2005. Biogenesis and secretion of overproduced protein in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 40(2):509-518.
- Banert T, Peuker U. Synthesis of functional nano-composite particles for bio-separation; 2006; Orlando, Florida.
- Bargeman G, Houwing J, Recio I, Koops GH, van der Horst C. 2002. Electro-membrane filtration for the selective isolation of bioactive peptides from an alpha(s2)-casein hydrolysate. *Biotechnology and Bioengineering* 80(6):599-609.
- Becker J, Franzreb M. A new concept to combine aqueous two-phase partitioning and magnetic separation for downstream processing of biological material; 2007 17.-20. Juni.; Lisbon.
- Bellara SR, Cui ZF, Pepper DS. 1997. Fractionation of BSA and lysozyme using gas-sparged ultrafiltration in hollow fiber membrane modules. *Biotechnology Progress* 13(6):869-872.
- Bergmann L, Schaefer C. 1999. Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 2: Elektromagnetismus. Berlin u.a.: de Gruyter. 970 p.
- Blakemore RP, Frankel RB. 1981. Magnetic Navigation in Bacteria. *Scientific American* 245(6):58-&.
- Blobel G. 2000. Protein targeting (Nobel lecture). *ChemBiochem* 1(2):87-102.

- Bradford MM. 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Brors A, Kroner KH, Deckwer WD. 1992. Cross-Flow Electrofiltration of Microorganisms. *Chemie Ingenieur Technik* 64(6):536-538.
- Brown G, Patel C, Thomas ORT. Fimbriated magnetic cation exchangers for protein recovery by high-gradient magnetic fishing; 2006; Krems, Österreich.
- Bulthuis BA, Koningstein GM, Stouthamer AH, Vanverseveld HW. 1989. A Comparison between Aerobic Growth of *Bacillus-Licheniformis* in Continuous Culture and Partial-Recycling Fermenter, with Contributions to the Discussion on Maintenance Energy Demand. *Archives of Microbiology* 152(5):499-507.
- Bulthuis BA, Rommens C, Koningstein GM, Stouthamer AH, Vanverseveld HW. 1991. Formation of Fermentation Products and Extracellular Protease During Anaerobic Growth of *Bacillus-Licheniformis* in Chemostat and Batch-Culture. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 60(3-4):355-371.
- Burkovski A. 2003. Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. *Fems Microbiology Reviews* 27(5):617-628.
- Calik P, Bayram A, Ozdamar TH. 2003. Regulatory effects of alanine-group amino acids on serine alkaline protease production by recombinant *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37:165-171.
- Cerff M. 2007. Modellierung der in-situ-Abtrennung eines extrazellulären Enzyms von *Bacillus licheniformis* mittels Magnetseparation [Diplomarbeit]: Universität Karlsruhe. 100 p.
- Charm SE, Wong BL. 1981. Shear Effects on Enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 3(2):111-118.
- Charney J, Tomarelli RM. 1947. A Colorimetric Method for the Determination of the Proteolytic Activity of Duodenal Juice. *Journal of Biological Chemistry* 171(2):501-505.
- Cheang B, Zydney AL. 2003. Separation of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin using membrane ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering* 83(2):201-209.
- Chmiel H. 2006. Bioprozesstechnik. München: Elsevier GmbH.
- Choi JH, Lee SY. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(5):625-635.
- Cocker TM, Fee CJ, Evans RA. 1997. Preparation of magnetically susceptible polyacrylamide/magnetite beads for use in magnetically stabilized fluidized bed chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 53(1):79-87.

- Cornell RM, Schwertmann U. 1996. The iron oxides : structure, properties, reactions, occurrence and uses. Weinheim u.a.: VCH Verlagsges. 573 p.
- Curtis RA, Lue L. 2006. A molecular approach to bioseparations: Protein-protein and protein-salt interactions. *Chemical Engineering Science* 61(3):907-923.
- Czeslik C. 2004. Factors ruling protein adsorption. *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics* 218(7):771-801.
- Deboer AS, Priest F, Diderichsen B. 1994. On the Industrial Use of *Bacillus-Licheniformis* - a Review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40(5):595-598.
- Deen WM. 1987. Hindered Transport of Large Molecules in Liquid-Filled Pores. *Aiche Journal* 33(9):1409-1425.
- del Campo A, Sen T, Lellouche JP, Bruce IJ. 2005. Multifunctional magnetite and silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1):33-40.
- Dormann JL. 1981. Superparamagnetism Phenomenon. *Revue De Physique Appliquee* 16(6):275-301.
- Douglas NG, Humffray AA, Pratt HRC, Stevens GW. 1995. Electrophoretic Mobilities of Proteins and Protein Mixtures. *Chemical Engineering Science* 50(5):743-754.
- Dunnill P, Lilly MD. 1974. Purification of Enzymes Using Magnetic Bio-Affinity Materials. *Biotechnology and Bioengineering* 16(7):987-990.
- Enevoldsen AD, Hansen EB, Jonsson G. 2007a. Electro-ultrafiltration of amylase enzymes: Process design and economy. *Chemical Engineering Science* 62(23):6716-6725.
- Enevoldsen AD, Hansen EB, Jonsson G. 2007b. Electro-ultrafiltration of industrial enzyme solutions. *Journal of Membrane Science* 299(1-2):28-37.
- Ferrero MA, Castro GR, Abate CM, Baigori MD, Sineriz F. 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45(3):327-332.
- Ferry JD. 1935. Statistical Evaluation of sieve constants in Ultrafiltration. *Journal of General Physiology* 20:95-104.
- Fireer MA. 2001. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49(1-3):433-442.
- Frankena J, Vanverseveld HW, Stouthamer AH. 1985. A Continuous Culture Study of the Bioenergetic Aspects of Growth and Production of Exocellular Protease in *Bacillus-Licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22(3):169-176.

-
- Franzreb M. 2003. *Magnettechnologie in der Verfahrenstechnik wässriger Medien*. Karlsruhe: Fzka. 212 p.
- Franzreb M, Reichert C; 2006. Hochgradienten-Magnetabscheider. European Union patent EP 1 616 627 A1.
- Franzreb M, Siemann-Herzberg M, Hogley TJ, Thomas ORT. 2006. Protein purification using magnetic adsorbent particles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70(5):505-516.
- Fredrickson AG. 1976. Formulation of Structured Growth Models. *Biotechnology and Bioengineering* 18(10):1481-1486.
- Fu LL, Xu ZR, Li WF, Shuai JB, Lu P, Hu CX. 2007. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnology Advances* 25(1):1-12.
- Fujita Y, Mori I, Matsuo T. 1995. Spectrophotometric Determination of Protein with Pyrocatechol Violet-Tin(IV) Complex. *Bunseki Kagaku* 44(10):733-738.
- Gerthsen C, Kneser HO, Vogel H. 1986. *Physik*. Berlin u.a.: Springer. 920 p.
- Ghosh R. 2003a. Protein bioseparation using ultrafiltration. London: Imperial College Press. 166 p.
- Ghosh R. 2003b. Protein Bioseparation using ultrafiltration: Theory, Application and New Developments. London: Imperial College Press. 166 p.
- Ghosh R, Cui ZF. 1998. Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane pretreatment. *Journal of Membrane Science* 139(1):17-28.
- Ghosh R, Li QY, Cui ZF. 1998. Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: Effect of gas sparging. *Aiche Journal* 44(1):61-67.
- Giesecke UE, Bierbaum G, Rudde H, Spohn U, Wandrey C. 1991. Production of Alkaline Protease with *Bacillus-Licheniformis* in a Controlled Fed-Batch Process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35(6):720-724.
- Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(4):381-395.
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. 2003. Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 38(11):1599-1616.
- Gupta R, Gupta N, Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(6):763-781.
- Halliday D, Resnick R, Walker J. 2003. *Physik*. Weinheim: Wiley-VCH. 1388 p.

- Halling PJ, Dunnill P. 1979. Improved Non-Porous Magnetic Supports for Immobilized Enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* 21(3):393-416.
- Halling PJ, Dunnill P. 1980. Magnetic Supports for Immobilized Enzymes and Bioaffinity Adsorbents. *Enzyme and Microbial Technology* 2(1):2-10.
- Han K, Levenspiel O. 1988. Extended Monod Kinetics for Substrate, Product, and Cell-Inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 32(4):430-437.
- Harrison GH, Todd P, Rudge SR, Petrides DP. 2003. *Bioseparations science and engineering*. New York: Oxford University Press. 405 p.
- Heeboll-Nielsen A, Choe WS, Middelberg APJ, Thomas ORT. 2003. Efficient inclusion body processing using chemical extraction and high gradient magnetic fishing. *Biotechnology Progress* 19(3):887-898.
- Henke H. 2007. *Elektromagnetische Felder Theorie und Anwendung*. Berlin u.a.: Springer. XV, 477 p.
- Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK. 1992. *Immobilized affinity ligand techniques*. San Diego u.a.: Academic Press. XIII, 454 p.
- Hernandez E, Johnson MJ. 1967. Energy Supply and Cell Yield in Aerobically Grown Microorganisms. *Journal of Bacteriology* 94(4):996-&.
- Hickstein B, Peuker U. 2008. Characterization of Protein Capacity of Nanocation Exchanger Particles as Filling Material for Functional Magnetic Beads for Bioseparation Purposes. *Biotechnology Progress* accepted.
- Hill RW. 1972. Determination of Oxygen-Consumption by Use of Paramagnetic Oxygen Analyzer. *Journal of Applied Physiology* 33(2):261-&.
- Hoffmann C. 2003. *Einsatz magnetischer Separationsverfahren zur biotechnologischen Produktaufarbeitung [Dissertation]*. Karlsruhe: FZK. 188 p.
- Hofmann R. 2005. *Prozesstechnische Entwicklung der Presselektrofiltration als innovatives Verfahren zur Abtrennung von Biopolymeren [Dissertation]*. Düsseldorf: Karlsruhe. 169 p.
- Hofmann R, Kaeppler T, Posten C. 2006. Pilot-scale press electrofiltration of biopolymers. *Separation and Purification Technology* 51(3):303-309.
- Hofmann R, Posten C. 2003. Improvement of dead-end filtration of biopolymers with pressure electrofiltration. *Chemical Engineering Science* 58(17):3847-3858.
- Hong J. 1989. Yield Coefficients for Cell Mass and Product Formation. *Biotechnology and Bioengineering* 33(4):506-507.
- Houser WP. *Deriving the Lorentz Force Equation from Maxwell's Equations*; 2002; Columbia, SC. p 422-425.

- Hubbuck JJ, Matthiesen DB, Hobley TJ, Thomas ORT. 2001. High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: a first principle comparison. *Bioseparation* 10(1-3):99-112.
- Iritani E, Mukai Y, Hagihara E. 2002. Measurements and evaluation of concentration distributions in filter cake formed in dead-end ultrafiltration of protein solutions. *Chemical Engineering Science* 57(1):53-62.
- Iritani E, Mukai Y, Murase T. 1995. Upward Dead-End Ultrafiltration of Binary Protein Mixtures. *Separation Science and Technology* 30(3):369-382.
- Iritani E, Ohashi K, Murase T. 1992. Analysis of Filtration Mechanism of Dead-End Electroultrafiltration for Proteinaceous Solutions. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 25(4):383-388.
- Jackson JD. 1999. *Classical electrodynamics*. New York u.a.: Wiley. 808 p.
- Jarvis KG, Kaper JB. 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infection and Immunity* 64(11):4826-4829.
- Kaeppler T. 2004. *Fraktionierung von Biopolymeren mittels Presselektrofiltration [Diplomarbeit]*. Karlsruhe: Karlsruhe. 97 p.
- Kaeppler T, Hickstein B, Peuker U, Posten C. 2008. Characterization of magnetic ion exchange composites for protein separation from bio suspensions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105(6).
- Kaeppler T, Hofmann R, Posten C. 2006. Elektrofiltration - Einsatzgebiet Enzymproduktion. *Chemie Ingenieur Technik* 78(3):261-266.
- Kaeppler T, Posten C. 2007. Fractionation of proteins with two-sided electro-ultrafiltration. *Journal of Biotechnology* 128(4):895-907.
- Kast W. 1988. *Adsorption aus der Gasphase : ingenieurwissenschaftliche Grundlagen und technische Verfahren*. Weinheim u.a.: Vch. 279 p.
- Kedem O, Katchalsky A. 1958. Thermodynamic Analysis of the Permeability of Biological Membranes to Non-Electrolytes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 27(2):229-246.
- Khan NS, Mishra IM, Singh RP, Prasad B. 2005. Modeling the growth of *Corynebacterium glutamicum* under product inhibition in L-glutamic acid fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 25(2):173-178.
- Khng HP, Cunliffe D, Davies S, Turner NA, Vulfson EN. 1998. The synthesis of sub-micron magnetic particles and their use for preparative purification of proteins. *Biotechnology and Bioengineering* 60(4):419-424.
- Kole MM, Draper I, Gerson DF. 1988. Protease Production by *Bacillus-Subtilis* in Oxygen-Controlled, Glucose Fed-Batch Fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 28(4-5):404-408.

- Krivankova L, Bocek P. 1998. Continuous free-flow electrophoresis. *Electrophoresis* 19(7):1064-1074.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227(5259):680-&.
- Lam KHE, Chow KC, Wong WKR. 1998. Construction of an efficient *Bacillus subtilis* system for extracellular production of heterologous proteins. *Journal of Biotechnology* 63(3):167-177.
- Langmuir I. 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society* 40:1361-1402.
- Lee WC. 1997. Protein separation using non-porous sorbents. *Journal of Chromatography B* 699(1-2):29-45.
- Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG. 1999. *Biology of the procaryotes*. Stuttgart: Thieme Verlag. 955 p.
- LesliePelecky DL, Rieke RD. 1996. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of Materials* 8(8):1770-1783.
- Levenspiel O. 1980. The Monod Equation - a Revisit and a Generalization to Product Inhibition Situations. *Biotechnology and Bioengineering* 22(8):1671-1687.
- Levisohn S, Aronson AI. 1967. Regulation of Extracellular Protease Production in *Bacillus Cereus*. *Journal of Bacteriology* 93(3):1023-&.
- Li WF, Zhou XX, Lu P. 2004. Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology* 155(8):605-610.
- Lodish HF. 2004. *Molecular cell biology*. New York: Freeman. 973 p.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-275.
- Luedeking R, Piret EL. 1959. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation - Batch Process at Controlled Ph. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1(4):393-412.
- Lye GJ, Woodley JM. 1999. Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic processes. *Trends in Biotechnology* 17(10):395-402.
- Lyklema H. 1991. *Fundamentals of interface and colloid science*. Amsterdam u.a.: Elsevier Academic Press.
- Lyklema J. 2005. *Fundamentals of interface and colloid science*. Volume V: Soft colloids. Amsterdam: Elsevier. p 844.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Brock TD. 2001. *Mikrobiologie*. Heidelberg u.a.: Spektrum. XX, 1175 p.

- Majander K, Anton L, Antikainen J, Lang H, Brummer M, Korhonen TK, Westerlund-Wikstrom B. 2005. Extracellular secretion of polypeptides using a modified *Escherichia coli* flagellar secretion apparatus. *Nature Biotechnology* 23(4):475-481.
- Makrides SC. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 60(3):512-&.
- Matsushita M, Irino T, Komoda T, Sakagishi Y. 1993. Determination of Proteins by a Reverse Biuret Method Combined with the Copper-Bathocuproine Chelate Reaction. *Clinica Chimica Acta* 216(1-2):103-111.
- Melin T, Poggel M. 2005. Protein separation on a technical scale using a radial symmetric free flow zone electrophoresis cell. *Chemical Engineering Science* 60(23):6574-6583.
- Mergulhao FJM, Summers DK, Monteiro GA. 2005. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances* 23(3):177-202.
- Mijnlieff PF, Jaspers WJM. 1971. Solvent Permeability of Dissolved Polymer Material - Its Direct Determination from Sedimentation Measurements. *Transactions of the Faraday Society* 67(582):1837-&.
- Miller MB, Bassler BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55:165-199.
- Misawa T, Hashimoto K, Shimodai S. 1974. Mechanism of Formation of Iron-Oxide and Oxyhydroxides in Aqueous-Solutions at Room-Temperature. *Corrosion Science* 14(2):131-149.
- Miura A, Kusanagi A, Kobayashi S, Tokairin S, Jin Z. 2004. Effect of static magnetic field on crystallization of triacylglycerols. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity* 14(2):1588-1591.
- Monod J. 1949. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology* 3:371-394.
- Moon YU, Curtis RA, Anderson CO, Blanch HW, Prausnitz JM. 2000. Protein-protein interactions in aqueous ammonium sulfate solutions. Lysozyme and bovine serum albumin (BSA). *Journal of Solution Chemistry* 29(8):699-717.
- Moulik SP. 1971. Physical Aspects of Electrofiltration. *Environmental Science & Technology* 5(9):771-&.
- Mukai Y, Iritani E, Murase T. 1998. Fractionation characteristics of binary protein mixtures by ultrafiltration. *Separation Science and Technology* 33(2):169-185.
- Mulchandani A, Luong JHT. 1989. Microbial Inhibition-Kinetics Revisited. *Enzyme and Microbial Technology* 11(2):66-73.
- Muller T, Walter B, Wirtz A, Burkovski A. 2006. Ammonium toxicity in bacteria. *Current Microbiology* 52(5):400-406.

- Nielsen J, Nikolajsen K, Villadsen J. 1991a. Structured Modeling of a Microbial System .1. A Theoretical-Study of Lactic-Acid Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 38(1):1-10.
- Nielsen J, Nikolajsen K, Villadsen J. 1991b. Structured Modeling of a Microbial System .2. Experimental-Verification of a Structured Lactic-Acid Fermentation Model. *Biotechnology and Bioengineering* 38(1):11-23.
- Nielsen J, Villadsen J. 1992. Modeling of Microbial Kinetics. *Chemical Engineering Science* 47(17-18):4225-4270.
- Nikolajsen K, Nielsen J, Villadsen J. 1991. Structured Modeling of a Microbial System .1. Growth on Mixed Substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 38(1):24-29.
- Norde W, Buijs J, Lyklema H. 2005. Adsorption of globular proteins. In *Fundamentals of Interface and Colloid Science*. Lyklema J, editor. Amsterdam: Elsevier Ltd. 844 p.
- Norde W, Macritchie F, Nowicka G, Lyklema J. 1986. Protein Adsorption at Solid Liquid Interfaces - Reversibility and Conformation Aspects. *Journal of Colloid and Interface Science* 112(2):447-456.
- Oberteuffer JA. 1974. Magnetic Separation - Review of Principles, Devices, and Applications. *Ieee Transactions on Magnetics* MA10(2):223-238.
- OBrien SM, Thomas ORT, Dunnill P. 1996. Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption. *Journal of Biotechnology* 50(1):13-25.
- Opong WS, Zydney AL. 1991. Diffusive and Convective Protein-Transport through Asymmetric Membranes. *Aiche Journal* 37(10):1497-1510.
- Ottow K, Lutken-Petersen T, Bukowska M, Kaeppler T, Posten C, Brask J, Villadsen J, Hobley T. 2007. Avoiding proteolysis during fermentation by using high gradient magnetic fishing. *Journal of Biotechnology* 131(2):169-169.
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 31:135-152.
- Peterson GL. 1977. Simplification of Protein Assay Method of Lowry Et Al - Which Is More Generally Applicable. *Analytical Biochemistry* 83(2):346-356.
- Pfeuffer A. 2006. Mechanismus der alkalischen Partikelentfernung und die Übertragung der Ergebnisse auf saure Reinigungen [Dissertation]. Kiel: Christian-Albrechts-Universität. 156 p.
- Pirt SJ. 1965. Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 163(991):224-&.
- Priest FG. 1977. Extracellular Enzyme-Synthesis in Genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews* 41(3):711-753.

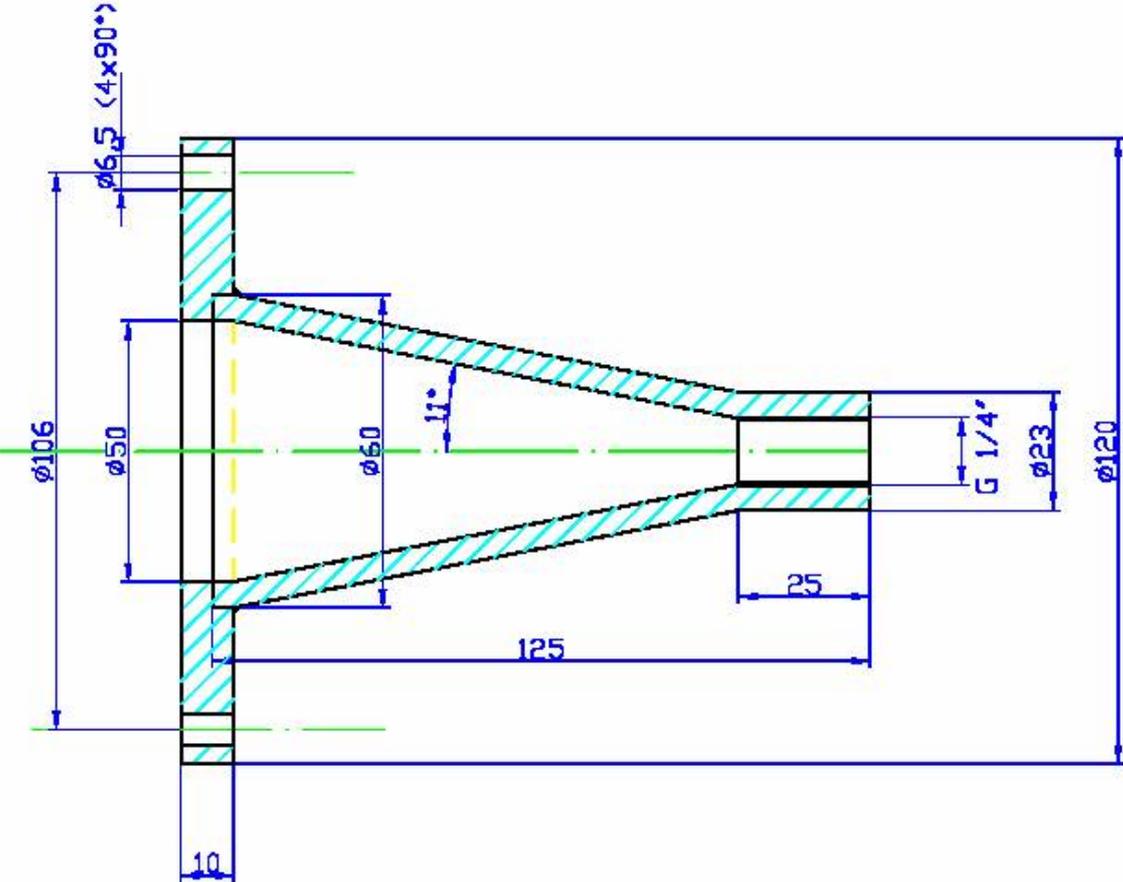
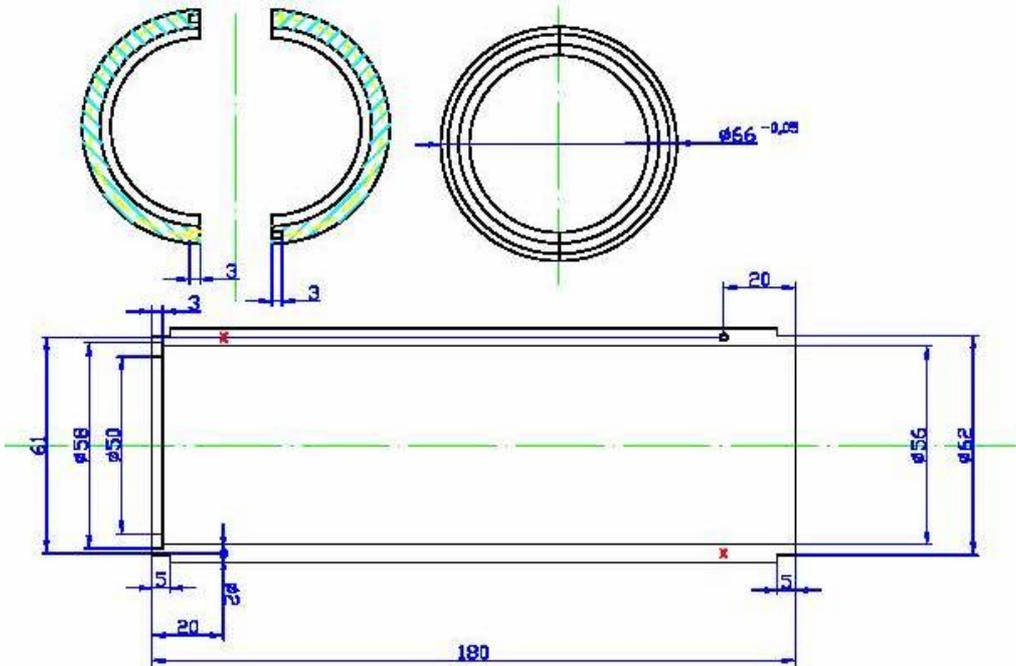
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3):597-+.
- Rito-Palomares M. 2004. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B* 807(1):3-11.
- Ruckenstein E, Zeng XF. 1997. Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation. *Biotechnology and Bioengineering* 56(6):610-617.
- Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. 1999. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29:99-108.
- Saveyn H, Van der Meeren P, Hofmann R, Stahl W. 2005. Modelling two-sided electrofiltration of quartz suspensions: Importance of electrochemical reactions. *Chemical Engineering Science* 60:6768-6779.
- Schügerl K, Hubbuch J. 2005. Integrated bioprocesses. *Current Opinion in Microbiology* 8(3):294-300.
- Sillero A, Ribeiro JM. 1989. Isoelectric Points of Proteins - Theoretical Determination. *Analytical Biochemistry* 179(2):319-325.
- Simonen M, Palva I. 1993. Protein Secretion in *Bacillus* Species. *Microbiological Reviews* 57(1):109-137.
- Sinha J, Dey PK, Panda T. 2000. Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(4):476-486.
- Skolpap W, Scharer JM, Douglas PL, Moo-Young M. 2004. Fed-batch optimization of alpha-amylase and protease-producing *Bacillus subtilis* using Markov chain methods. *Biotechnology and Bioengineering* 86(6):706-717.
- Stark D, von Stockar U. 2003. In Situ Product Removal (ISPR) in Whole Cell Biotechnology During the Last Twenty Years. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 80:149-175.
- Stein EA, Fischer EH. 1958. Resistance of Alpha-Amylases Towards Proteolytic Attack. *Journal of Biological Chemistry* 232(2):867-879.
- Stephenson K, Harwood CR. 1998. Influence of a cell-wall-associated protease on production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(8):2875-2881.
- Svoboda J. 1987. *Magnetic methods for the treatment of minerals*. Amsterdam [u.a.]: Elsevier. 692 p.
- Takac S, Elmas S, Calik P, Ozdamar TH. 2000. Separation of the protease enzymes of *Bacillus licheniformis* from the fermentation medium by crossflow ultrafiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75(6):491-499.

- Terpe K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(2):211-222.
- Thilakavathi M, Basak T, Panda T. 2007. Modeling of enzyme production kinetics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(5):991-1007.
- Tipler PA. 2000. Physik. Heidelberg u.a.: Spektrum. 1522 p.
- Trettin DR, Doshi MR. 1980. Ultrafiltration in an Unstirred Batch Cell. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* 19(2):189-194.
- Trinder P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry* 6(Pt. 1-2):24-7.
- Vandenberg GB, Hanemaaijer JH, Smolders CA. 1987. Ultrafiltration of Protein Solutions - the Role of Protein Association in Rejection and Osmotic-Pressure. *Journal of Membrane Science* 31(2-3):307-320.
- Vandenberg GB, Smolders CA. 1990. Flux Decline in Ultrafiltration Processes. *Desalination* 77(1-3):101-133.
- Vaneijndhoven RHCM, Saksena S, Zydney AL. 1995. Protein Fractionation Using Electrostatic Interactions in Membrane Filtration. *Biotechnology and Bioengineering* 48(4):406-414.
- Vilker VL, Colton CK, Smith KA. 1981. The Osmotic-Pressure of Concentrated Protein Solutions - Effect of Concentration and Ph in Saline Solutions of Bovine Serum-Albumin. *Journal of Colloid and Interface Science* 79(2):548-566.
- Vitikainen M, Hyrylainen HL, Kivimaki A, Kontinen VP, Sarvas M. 2005. Secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* can be improved by engineering cell components affecting post-translocational protein folding and degradation. *Journal of Applied Microbiology* 99(2):363-375.
- Vitkovic L, Sadoff HL. 1977. Purification of Extracellular Protease of *Bacillus-Licheniformis* and Its Inhibition by Bacitracin. *Journal of Bacteriology* 131(3):891-896.
- Voigt B, Schweder T, Sibbald MJJB, Albrecht D, Ehrenreich A, Bernhardt J, Feesche J, Maurer KH, Gottschalk G, van Dijk JM and others. 2006. The extracellular proteome of *Bacillus licheniformis* grown in different media and under different nutrient starvation conditions. *Proteomics* 6(1):268-281.
- Wahlgren M, Arnebrant T. 1991. Protein Adsorption to Solid-Surfaces. *Trends in Biotechnology* 9(6):201-208.
- Wakeman RJ. 1998. Electrically enhanced microfiltration of albumin suspensions. *Food and Bioproducts Processing* 76(C1):53-59.

- Westers L, Dijkstra DS, Westers H, van Dijl JM, Quax WJ. 2006. Secretion of functional human interleukin-3 from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology* 123(2):211-224.
- Westers L, Westers H, Quax WJ. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1694(1-3):299-310.
- Wien M. 1927. Deviations from Ohm's law in electrolytes. *Annalen der Physik (Berlin, Germany)* 83:327-61.
- Yang RJ, Li SQ, Zhang QH. 2004. Effects of pulsed electric fields on the activity of enzymes in aqueous solution. *Journal of Food Science* 69(4):C241-C248.
- Yoon SH, Hwan Do J, Lee SY, Nam Chang H. 2000. Production of poly-gamma-glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters* 22(7):585-588.
- Young BR, Pitt WG, Cooper SL. 1988. Protein Adsorption on Polymeric Biomaterials .1. Adsorption-Isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science* 124(1):28-43.
- Yukawa H, Kobayashi K, Tsukui Y, Yamano S, Iwata M. 1976. Analysis of Batch Electrokinetic Filtration. *Journal of chemical Engineering of Japan* 9:396-401.
- Yukawa H, Shimura K, Suda A, Maniwa A. 1983. Cross Flow Electro-Ultrafiltration for Colloidal Solution of Protein. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 16(4):305-311.
- Zhang QX, Tsukagoshi N, Miyashiro S, Udaka S. 1983. Increased Production of Alpha-Amylase by *Bacillus-Amyloliquefaciens* in the Presence of Glycine. *Applied and Environmental Microbiology* 46(1):293-295.

10Anhang

10.1 Daten der HGMS



<u>Ergebnisse der Spulenberechnung</u>			
Magnettyp :	AME 60 13 19 So	Kommission :	A106 0012
Teile-Nr :	B0ME 00081	Angebot :	O1050532 Pos. 10
Warmstrom :	62 A (Spule stromgeregelt)	Kaltstrom :	83 A (siehe Berechnung)
Spulen-Absoluttemperatur : 105°C, d.h. Spulen-Übertemperatur : 85°C			
Rundspule / Al Band 129 * .3 (mm)			
Eingegebene Spulendaten			

Innendurchmesser	di (mm)	=	143
Aussendurchmesser	da (mm)	=	558
Hoehe	h (mm)	=	129
Leiter in A	sA (mm)	=	129
Leiter in B	sB (mm)	=	.3
Spannung	U (V)	=	45
Ergebnisse			

Gesamte Spulenhoehe	(mm)	=	131
Mittl. Leiterlaenge lm	(m)	=	1.101
Windungen gesamt	()	=	680
Windungen pro Lage	()	=	0
Anzahl der Lagen	()	=	0
Widerstand	(Ohm)	=	.542
Strom	(A)	=	83.025
Durchflutung	(Aw)	=	56484
Leistung	(KW)	=	3.73
Leitergewicht	(Kg)	=	78.276

Abbildung 10.4: Daten der Spule

10.2 Daten zu den Analysemethoden

10.2.1 Daten zur Lowry-Analytik

Vorgehensweise:

- a) 1000 µl Probenlösung in Eppi geben
- b) 100 µl Na-Desoxycholat-Lsg (0,15 %) zugeben und vortexen
- c) 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- d) 100 µl wässrige TCA (Trichloressigsäure)-Lsg (72 %) zugeben und vortexen
- e) Zentrifugieren (12.000 g, 10 min, 20 °C)
- f) Überstand verwerfen (vorsichtig)
- g) Zu Rückstand 1000 µl Lowry-Reagenz zugeben; Vortexen.
- h) Eppi-Inhalt in Küvette umfüllen und Eppi mit 1000 µl dest. H₂O spülen und ebenfalls in die Küvette geben
- i) 20 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- j) 500 µl Folin & Ciocalteu Reagenz zugeben und mischen (sofortiges, schnelles Mixen erforderlich!)
- k) 30 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- l) OD bei 750 nm gegen Wasser messen

Für die Kalibrierung wird die Prozedur mit BSA durchgeführt, das in 10 mM PBS gelöst ist.

10.2.2 Daten zur Ermittlung der Proteaseaktivität mittels Azocasein

- a) 0,05 M Tris/HCl Puffer (pH 7.5) wird hergestellt
- b) 5 % Azocasein (5 g / 100 ml) in dem in a) hergestellten Tris/HCl-puffer wird angesetzt
- b) 0,2 ml 5 % Azocasein-Lösung werden mit mit 0,7 ml Tris/HCl-Puffer und 0,1 ml Probelösung (oder Standard) vermischt; Vortexen
- c) 30 min Inkubation bei 37°C
- d) Nach den 30 min wird die Probe aus dem Bad genommen und 1 ml TCA (10 %) zudosiert (Abbruch der Reaktion; Fällung der Proteine); Die Lösung wird durch Schütteln gemischt und für 20 min auf Eis gestellt
- e) Die Suspension wird 10 min bei 13000 g und 4°C zentrifugiert

f) 0,8 ml des Zentrifugationsüberstands werden mit 0,2 ml 1,8 N NaOH in einer Küvette vermischt. Die Farbe ändert sich von gelb zu orange.

g) Messung der Absorption bei 420 nm;

Nach Zugabe von NaOH bleibt die Absorption für etwa 5 min konstant.

10.2.3 Daten zur Alpha-Amylasebestimmung

a) 1 ml Lösung (Enzymstandard* oder Probe) wird in ein Röhrchen pipettiert

b) 5 ml Puffer (KH_2PO_4 2,59 g/l; Na_2HPO_4 14,42 g/l; Na_2SO_3 20,0 g/l; pH 7,4) werden hinzugefügt

c) 10 μl CaCl_2 -Lösung (0,1 M) werden hinzugefügt; Vortexen

d) Zu jedem Röhrchen wird eine Phadebas-Tablette im Abstand von 30 Sekunden hinzugegeben. Vortexen für 15 Sekunden. Das Röhrchen wird in ein Wasserbad (37 °C) gesetzt.

e) Exakt 15 min nach der Tablettenzugabe wird die das Röhrchen aus dem Wasserbad genommen und die Reaktion mit 1 ml 1 M NaOH-Lösung gestoppt. Vortexen.

f) Durch Filtrieren/Zentrifugieren wird der Feststoff von der Lösung abgetrennt. (Beim Zentrifugieren (12.000 g, 10 min, 4 °C) gilt besondere Vorsicht bzgl. der Re-dispergierung des Sediments in der Lösung)

g) Die Absorption der Lösung wird bei 620 nm gemessen (max. 1 h nach dem Fest-Flüssig-Trennschritt)

* mit Enzymstandard wird vor den eigentlichen Messungen eine Kalibrierkurve erstellt. Diese wurde mit Amylase von *B. licheniformis* durchgeführt (von Sigma-Aldrich; 519 U/mg) und ergab: 1 Unit entspricht einem OD-Unterschied von 1,68 bei der vorhandenen Apparatur.

10.2.4 Daten zur Lysozymaktivitätsbestimmung

a) Puffer herstellen KH_2PO_4 66 mM (9,2 g/l); pH auf 6,24 mit 1 M KOH-Lösung einstellen

b) In 100 ml Puffer werden 10,72 mg *Micrococcus lysodeikticus* suspendiert. Die OD bei 450 nm sollte zwischen 0,6 und 0,7 liegen.

c) Zu 2,5 ml Suspension werden 100-500 µl lysozymhaltige Probe (je nach Kalibrierung und erwarteter Enzymaktivität) zugegeben (für eine Variation der Probenmenge muss eine eigene Kalibrierkurve erstellt werden).

d) Die OD-Abnahme wird bei 450 nm über die Zeit aufgenommen (Rate-Modus). Die Steigung ist das Maß für die Enzymaktivität.

Die Kalibrierkurve wird mit reinem Lysozym in Probenpuffer erstellt.

10.2.5 Daten zur SDS-PAGE

a) Zunächst wird der Probenpuffer hergestellt (siehe Tabelle 10.1).

b) Proben (oder Standard) im Verhältnis 1:1 mit dem Probenpuffer vermischen und Mischung 10 min kochen (Kochen wurde teilweise nicht durchgeführt)

c) Herstellen des Trenngels (Tabelle 10.2) (Vermischung der Komponenten; sofortiges Überführen in die Gießvorrichtung direkt nach Zugabe von Temed; dort fest werden lassen (dauert ca. 20 min). Die Gießvorrichtung etwa zu 3/4 füllen, damit das Sammelgel noch Platz hat

d) Herstellen des Sammelgels (entsprechend des Trenngels). Nach Einfüllen in die Gießvorrichtung Kamm einführen. Nach Gelierung Kamm herausnehmen.

e) Einsetzen der Gele in die Kammer; Einfüllen des Laufpuffers (SDS-Puffer von Roth (Karlsruhe, Deutschland))

f) Einfüllen der Proben (2-20 µl) in die Geltaschen

g) Start der Elektrophorese (15 mA für ca. 30 min; danach auf 25 mA erhöhen bis zum Ende (ca. 2 h)) Ende ist sichtbar, wenn blauer Marker den unteren Bereich erreicht)

h) Gele Herausnehmen und vorsichtig Glasplatte abnehmen und Gel in Färbelösung (Mischung aus 0,25 g Coomassie blau R250, 100 ml Ethanol und 100 ml Wasser) überführen; 2 h auf Schüttler stellen

i) Überführen in Entfärbelösung (400 ml Essigsäure, 400 ml Ethanol, mit Wasser bis 1000 ml auffüllen); 30 min schütteln; Entfärbung insgesamt zwei Mal durchführen

j) Gel in Wasser überführen und über Nacht stehen lassen

k) Gel scannen

Tabelle 10.1: Zusammensetzung des Probenpuffers

Substanz	Menge
1,5 M TRIS (pH 6,8)	1 ml
10 % SDS	0,6 ml
Glycerin	3 ml
Bromphenolblau	4 mg
DTT*	24 mg

*wurde teilweise weggelassen

Tabelle 10.2: Zusammensetzung der Gele (Trenngel 12 %ig)

Substanz	Sammelgel [ml]	Trenngel [ml]
VE-Wasser	1,65	0,7
30 % Acryl-Bisacrylamid Mix	2	0,165
1,5 M TRIS-HCl Puffer pH=8,8	1,25	0,125
10 % SDS	0,05	0,01
10 % Ammoniumpersulfat	0,05	0,01
TEMED	0,004	0,002

10.3 Sonstige Versuchsdaten

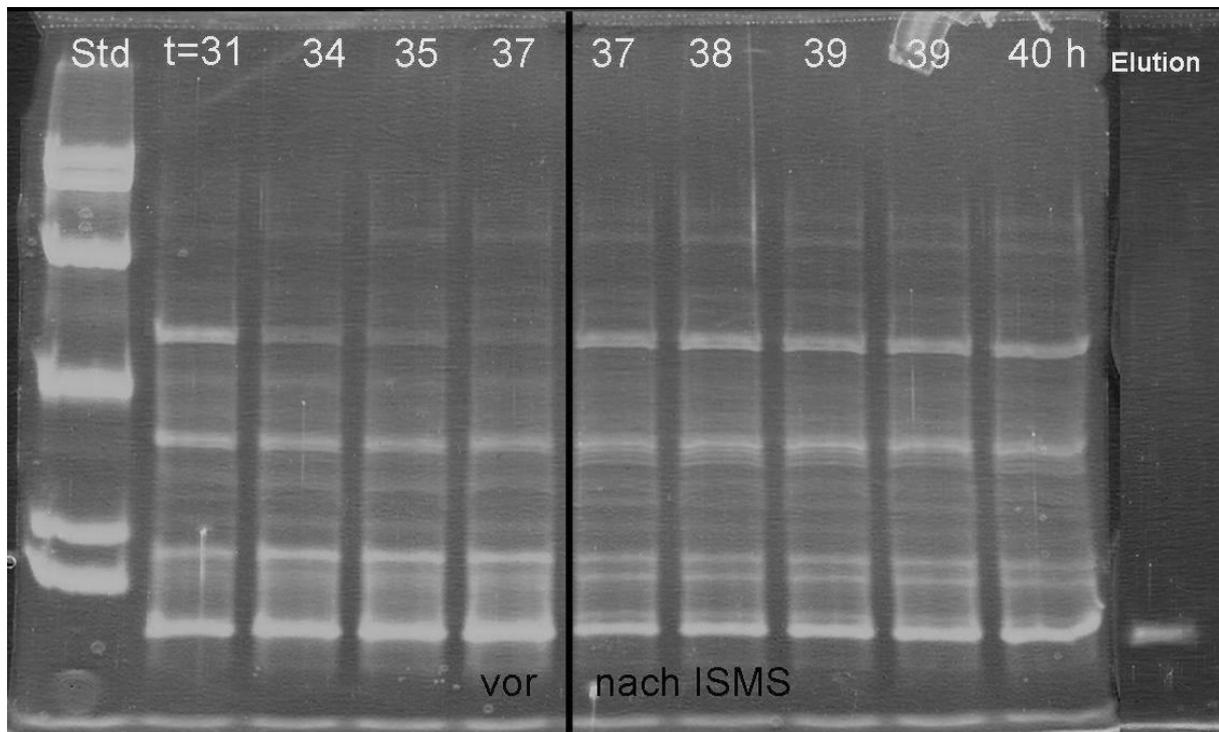


Abbildung 10.5: SDS-PAGE mit Proben vor und nach der ISMS, Probe der Elution; Das eluierte Protein liegt bei etwa 10 kDa; Zeitangabe der Probennahme im Bild oben

10.4 Formelzeichen und Abkürzungen

Abkürzungen

AGM	Alternating gradient magnetometry
BET	Methode zur Messung der spez. Oberfläche nach Brunauer, Emmet und Teller
BR	Bioreaktorkultivierung
BSA	Rinderserumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
DCM	Dichlormethan
DEAE	Diethylaminoethyl
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DVS	Divinylsulfon
DVB	Divinylbenzol
FE-SEM	Field emission scattering electron microscopy
FFT	Fest-Flüssig-Trennung
GFP	Green fluorescent protein
GRAS	Generally recommended as safe
HGMF	High gradient magnetic fishing
HGMS	Hochgradienten-Magnetseparation
IEX	Ionentausch
ISMS	<i>In-situ</i> -Magnetseparation
LZ	Lysozym
MEC	Magnetically enhanced centrifuge
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NPU	Novozymes Protease Unit
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatpufferlösung
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
PVB	Polyvinylbutyral
PWF	Pure water flux
SK	Schüttelkolben

SRP	Signalerkennungspartikel
VBC	Vinylbenzylchlorid

Formelzeichen

Konstanten

e	Elementarladung	$1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$
k_B	Boltzmannkonstante	$1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
N_A	Avogadrokonstante	$6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
R_{allg}	Allgemeine Gaskonstante	$8,314 \text{ [J (mol K)}^{-1}]$
ε_0	Permittivität des Vakuums	$8,85 \cdot 10^{-12} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$
μ_0	Magnetische Feldkonstante	$1,2566 \cdot 10^{-7} \text{ N A}^{-2}$

Lateinische Formelzeichen

a	Abstand	[m]
a_{spez}	spezifische Oberfläche	$[\text{m}^2 \text{ g}^{-1}]$
A	Fläche	$[\text{m}^2]$
A_H	Hamakerkonstante	[J]
B	Magnetische Flussdichte	[T]
B_2	zweiter Virialkoeffizient	$[\text{m}^3 \text{ mol}^{-1}]$
c	Konzentration	$[\text{g l}^{-1}]$
D	Diffusionskoeffizient	$[\text{m}^2 \text{ s}^{-1}]$
d	Durchmesser	[m]
D_V	Verdünnungsrate	$[\text{h}^{-1}]$
E	Abscheideeffizienz	[-]
\mathbf{e}	Einheitsvektor	[-]
E	Elektrisches Feld	$[\text{V m}^{-1}]$
F	Kraft	[N]
f_d	Hinderungsfaktor der Diffusion	[-]
f_k	Hinderungsfaktor der Konvektion	[-]
f/f_0	Asymmetriefunktion	[-]
H	Magnetische Feldstärke	$[\text{A m}^{-1}]$
I	Strom	[A]
J	Flächenspezifischer Filtratfluss	$[\text{m s}^{-1}]$
j	Stromdichte	$[\text{A m}^{-2}]$

K	Funktion	
k	Massentransferkoeffizient	[m s ⁻¹]
k _a	Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante	[m s ⁻¹]
k _I	Inhibierungskonstante	[g l ⁻¹]
k _D	Dissoziationskonstante	[g l ⁻¹]
k _{deg}	Degradationskonstante	[h ⁻¹]
k _H	Adsorptionskoeffizient	[l g ⁻¹]
k _M	Monod-Konstante	[g l ⁻¹]
k _S	Michaelis-Menten-Konstante	[g l ⁻¹]
k _{tr}	Transportkonstante	[m s ⁻¹]
L	Länge	[m]
M	Magnetisierung	[A m ⁻¹]
m	Masse	[kg]
m _m	Magnetisches Moment	[A m ²]
M _W	Molekulargewicht	[g mol ⁻¹]
N	Anzahl	[-]
n	Normalenvektor	[-]
\dot{N}	Flächenspezifischer Massenstrom	[kg m ⁻² s ⁻¹]
p	Druck	[Pa]
Pe	Pecletzahl	[-]
Q	Beldadung	[g g ⁻¹]
q	Ladung	[C]
q	Volumenstrom	[m ³ s ⁻¹]
R	Filtrationswiderstand	[m ⁻¹]
r	Radius	[m]
r _c	höhenspezifischer Widerstand	[m ⁻²]
Re	Reynoldszahl	[-]
r _N	spez. Ammoniumaufnahme	[g (g h) ⁻¹]
r _P	spez. Produktbildungsrate	[g (g h) ⁻¹]
r _S	spez. Substrataufnahmerate	[g (g h) ⁻¹]
S	Siebkoefizient	[-]
Sc	Schmidtzahl	[-]
t	Zeit	[s]
T	Temperatur	[K]

U	Spannung	[V]
u_{em}	Elektrophoretische Mobilität	[m ² s V ⁻¹]
v	Geschwindigkeit	[m s ⁻¹]
V	Volumen	[m ³]
V_{Pot}	Potentielle Energie	[J]
x	Wegstrecke	[m]
y	Ausbeutekoeffizient	[g g ⁻¹]
z_i	Valenz	[-]
z	Parameter	[h ⁻¹]

Griechische Formelzeichen

α	wachstumsunabhängiger Koeffizient	[g (g h) ⁻¹]
α_F	Massenspezifischer Deckschichtwiderstand	[m kg ⁻¹]
β	wachstumsabhängiger Koeffizient	[g g ⁻¹]
Γ	oberflächenspezifische Beladung	[g m ⁻²]
ε	Permittivität	[A s V ⁻¹ m ⁻¹]
ε_{Por}	Porosität	[-]
ε_r	Permittivitätszahl	[-]
ζ	Zetapotential	[mV]
η	Viskosität	[Pa s]
Θ	relative Beladung	[-]
κ_L	Leitfähigkeit	[S cm ⁻¹]
κ	Debye-Hückel-Parameter	[m ⁻¹]
κ_m	Suszeptibilität	[-]
μ_r	Permeabilitätszahl	[-]
μ	Spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
π	osmotischer Druck	[Pa]
ρ_q	Raumladungsdichte	[V m ⁻³]
ρ	Dichte	[kg m ⁻³]
σ	Reflektionskoeffizient	[-]
τ	Transmission	[-]
τ_m	Magnetisches Drehmoment	[N m]

φ	Potential	[V]
Φ	Fraktionierungskoeffizient	[l m ⁻² h ⁻¹]
Ψ	Selektivität	[-]
Indizes		
*	im Gleichgewicht	
(*)	verändert im Vergleich zum Anfangszustand	
b	Bulkphase	
Beob	beobachtet	
c	Filterkuchen	
E	Erhaltungs-	
EI	elektrisch	
em	elektrophoretisch	
eo	elektroosmotisch	
eq	im Gleichgewicht	
ges	gesamt	
h	hydrodynamisch	
i	Ion	
l	Flüssigkeit	
M	Filtrationsmedium	
m	mittlerer	
mag	magnetisch	
N	Ammonium	
P	Partikel (auch Protease oder Produkt)	
Pa	Protease	
Pi	Protein	
R	retardierend	
RE	den Relaxationseffekt betreffend	
S	Substrat	
Subst	Substanz	
vdW	van der Waals	
W	Widerstand	
X	Biomasse	

10.5 Publikationen, Studien- und Diplomarbeiten

Im Rahmen der Dissertation wurden Teile der dargestellten Ergebnisse in Zeitschriften oder als Buchbeitrag veröffentlicht. Die Veröffentlichungen sind unten dargestellt. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit Studien- und Diplomarbeiten erstellt, welche unten aufgelistet sind.

Referierte Publikationen

R. Hofmann, T. Kaepler, C. Posten, Pilot-scale press electrofiltration of biopolymers, *Separation and Purification Technology* 51 (2006) 303.

T. Kaepler, R. Hofmann, C. Posten, Elektrofiltration - Einsatzgebiet Enzymproduktion, *Chemie Ingenieur Technik* 78 (2006) 261.

T. Kaepler, C. Posten, Fractionation of proteins with two-sided electro-ultrafiltration, *Journal of Biotechnology* 128 (2007) 895.

K. Ottow, T. Lutken-Petersen, M. Bukowska, T. Kaepler, C. Posten, J. Brask, J. Villadsen, T. Høbley, Avoiding proteolysis during fermentation by using high gradient magnetic fishing, *Journal of Biotechnology* 131 (2007) 169.

T. Kaepler, B. Hickstein, U. Peuker, C. Posten, Characterization of magnetic ion exchange composites for protein separation from bio suspensions, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105 (2008).

R. Hofmann, T. Kaepler, C. Posten, in E. Vorobiev, N. Lebovka (Editors), *Electrotechnologies for Extraction from Plant Foods and Biomaterials*, Springer, Berlin (2008).

T. Kaepler, K. Ottow, T. Høbley, C. Posten, In-situ magnetic separation for extracellular protein production, *Biotechnology and Bioengineering* (2008); in press

Studien- und Diplomarbeiten

Prozesstechnische Optimierung der Fraktionierung von Biopolymeren mittels Presselektrofiltration, Diplomarbeit Aziz el Aoussi

Untersuchung der Elektroultrafiltration für den Einsatz in der Enzymproduktion, Studienarbeit Melanie Gerlitzki

Untersuchungen zur Einsetzbarkeit von Magnetpartikeln zur In-situ-Abtrennung von extrazellulär gebildeten Proteinen aus der Biosuspension, Studienarbeit André Eichler

Kultivierung von *Bacillus licheniformis* und Abtrennung eines extrazellulären Enzyms mit Magnetseparation, Studienarbeit Wenqing Cui

In-Situ-Magnetseparation von Amylase, BSA und Lysozym aus Schüttelkolbenkultivierungen, Studienarbeit Kristina Schleining

Charakterisierung von funktionalisierten Magnetpartikeln zum Einsatz in der Bioseparation, Studienarbeit Iris Hippen

Kultivierung von *Escherichia coli* zur Produktion und Charakterisierung von GFP im Hinblick auf die Untersuchung von Magnet-Bioseparation, Studienarbeit Hongyan Shi

Modellierung der In-Situ-Abtrennung eines extrazellulären Enzyms von *Bacillus licheniformis* mittels Magnetseparation, Diplomarbeit Martin Cerff

In-situ-Magnetseparation zur Steigerung der Produktausbeute eines extrazellulären Enzyms: Anbindung und Optimierung von Magnetseparationstechnologie, Diplomarbeit Micha Kirchgessner

Kontinuierliche Kultivierung von *Bacillus licheniformis* mit in-situ-Produktabtrennung mittels Magnetseparation, Diplomarbeit Marco Brose

Simulation der Produktion und der In-situ-Magnetseparation des extrazellulären Enzyms Subtilisin aus einer Fed-Batch-Kultivierung mit *Bacillus licheniformis*,
Diplomarbeit Sibylle Kachel

ISBN: 978-3-86644-305-1

www.uvka.de