

# **Einsatz von synthetischen anorganischen Adsorbermaterialien zur Proteinaufreinigung am Beispiel der Molkeproteine**

Vom Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik  
der Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)**

genehmigte  
**Dissertation**

von

Dipl.-Biol. t.o. Christian Staub  
aus Stuttgart

Hauptreferent:	Prof. Dr. rer. nat. R. Ulber
Korreferent:	Prof. Dr.-Ing. S. Ripperger
Vorsitzender:	Prof. Dr.-Ing. H. Hasse
Dekan:	Prof. Dr.-Ing. B. Sauer

Tag der Einreichung:	19. September 2012
Tag der mündlichen Prüfung:	11. Dezember 2012

Kaiserslautern, 2013

D 386



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Januar 2009 bis Dezember 2011 am Lehrgebiet für Bioverfahrenstechnik an der TU Kaiserslautern. Folglich gebührt mein Dank an erster Stelle Prof. Dr. Roland Ulber für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, der technischen Möglichkeiten und für die stets aufschlussreichen und erhellenden Gespräche. Prof. Dr. Hans Hasse und Prof. Dr. Siegfried Ripperger danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und des Korreferats.

Ebenfalls danken möchte ich Dr. Ulrich Sohling und Dr. Kirsten Suck von der Süd-Chemie AG für die Bereitstellung von Adsorbentien und die interessanten Gespräche. Dr. Heinrich Buchholz von der Biolac GmbH & Co.KG danke ich für die Bereitstellung von Molkekonzentrat, dessen Folgeprodukten, und für den persönlichen Einblick in die molkeverarbeitende Industrie.

Vom Lehrgebiet für Bioverfahrenstechnik gilt mein Dank Dr. Nils Tippkötter, Sebastian Wiesen, Benjamin Ludwig, Thomas Hahn, Eugen Arzer und Michael Schlote für die gute Zusammenarbeit, anregenden Gespräche und die aufheiternden Momente. Gesine Wünsch danke ich für die herzliche Aufnahme ins Lehrgebiet und Rat und Hilfe in vielen Belangen.

Vom Institut für Thermische Verfahrenstechnik danke ich Tobias Kiefer für die vielen freundschaftlichen und fachlichen Gespräche, die anregenden Diskussionen und den regen und offenen Gedankenaustausch.

Vom Institut für Mechanische Verfahrenstechnik danke ich Albert Hellmann und Denis Goldnik für fachliche und instrumentelle Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich noch besonders bei Sarah bedanken, für die Unterstützung, die Motivation, die Ablenkung und das „Einfach-Da-Sein“, egal um welche Uhrzeit.



# Zusammenfassung

Seit dem Beginn der Produktion und Veredelung von Nahrungsmitteln im großtechnischen Maßstab steigen nicht nur die Mengen an den Hauptprodukten dieser Prozesse, sondern auch die Mengen der dabei anfallenden Nebenprodukte. Die Entsorgung dieser Nebenprodukte über Flüsse oder Kläranlagen stellte auf Grund deren BOD (biochemical oxygen demand) zunehmend ein Problem dar, dessen Lösung unabdingbar wurde. Eines dieser Nebenprodukte, welches in stets zunehmender Menge anfällt ist Molke, das Hauptnebenprodukt der Käseherstellung. Die produzierte Jahresmenge betrug für das Jahr 2011 alleine in Deutschland geschätzte 11,80 Mio. Tonnen. Das einstige Abfallprodukt Molke wird seit den 1950er Jahren in zunehmendem Maß vorwiegend zu Molkekonzentrat, einer 5 bis 6-fach aufkonzentrierten Molkelösung, und Molkeproteinpulvern mit steigendem Proteinanteil aufgearbeitet. In den 2000er Jahren kamen verstärkt Isolate einzelner Molkeproteine dieser Produktpalette hinzu. Bereits vor 15 Jahren wurde die weltweit produzierte Menge an Molkeproteinkonzentrat auf über 140.000 Tonnen geschätzt. Molkeproteinpulver und  $\alpha$ -Lactalbumin (ALA) wurden zu dieser Zeit in einer geschätzten Menge von 2.300 Tonnen bzw. 230 Tonnen jährlich hergestellt. Mit der zunehmenden Reinheit der Proteinfractionen stieg auch deren Marktwert von etwa 1  $\text{\$}\cdot\text{kg}^{-1}$  für die ersten Molkeproteinpulver in den 1960er Jahren bis auf 600  $\text{\$}\cdot\text{kg}^{-1}$  für Fraktionen einzelner Proteine mit hoher Reinheit. Die überwiegende Mehrheit dieser Produkte findet seinen Einsatz in der Nahrungsmittelindustrie, wie beispielsweise bei der Produktion von Säuglingsnahrung, Sportlernahrung oder als Texturbildner in verschiedensten Nahrungsmitteln des täglichen Konsums. Die am weitesten verbreiteten Prozesse zur großindustriellen Aufarbeitung von Molke sind die Ultrafiltration und die Chromatographie. Andere Verfahren wie Fällungsprozesse oder peptische Hydrolysen kommen mit steigender Prozessgröße immer seltener als alleiniges Aufbereitungsverfahren von Molke zum Einsatz. Viele der beschriebenen und angewendeten Verfahren arbeiten in einem der ersten Schritte mit einer Modifikation des pH-Wertes des Eduktes Molke. Dies ist in dem hier vorgestellten Verfahren nicht der Fall, das Edukt wird ohne Veränderungen oder Modifikationen eingesetzt. Es werden keine einzelnen Komponenten der Molke im Voraus entfernt oder durch z. B. peptische Hydrolyse zerstört. Die eingesetzten Chemikalien sind ungiftig und müssen keinen kostenintensiven Entsorgungsverfahren zugeführt werden. Im Gegensatz zu Verfahren mit Fällungssalzen können die eingesetzten Chemikalien im Produkt durch Neutralisation einfach wieder entfernt werden oder kommen in nur geringen Konzentrationen vor. Es treten im Gegensatz zu chromatographischen Methoden nur geringe Fluidströme, z. B. Waschwasser, auf und der Prozess bedarf keiner massiven Temperaturerhöhung des Eduktes, um beispielsweise die Viskosität zu erhöhen. Die eingesetzten Adsorbentien sind kostengünstig (unter 10  $\text{\$}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) und können im Fall von Siliziumdioxid als restproteinbeladener Tierfutterzusatz entsorgt werden. In dem vorgestellten Prozess können die Hauptkomponenten der Molke  $\alpha$ -Lactalbumin (ALA),  $\beta$ -Lactoglobulin (BLG) und Lactose voneinander getrennt werden, was mit den meisten Membranverfahren im industriellen Maßstab nicht oder nur ungenügend möglich

ist. Im Prozess werden lediglich einfache Rührkessel und Filtrationseinheiten eingesetzt. Des Weiteren ist der Prozess leicht in bestehende Aufbereitungsverfahren integrierbar und/oder durch zusätzliche Verfahren, wie beispielsweise vor- oder nachgeschaltete Membranverfahren, ergänzbar. Dadurch besitzt er ein hohes Potential zur Optimierung und weiteren Kostenersparnis. In dieser Arbeit werden zwei Ansätze zur Aufarbeitung verfolgt, miteinander verglichen und ein Prozessentwurf mit Wirtschaftlichkeitsbetrachtung für den Batch-Ansatz vorgestellt. Für einen chromatographischen Ansatz wird ausgehend von Isothermen und Adsorptions- und Desorptionsversuchen in einer Kleinsäule die Produktivität für ein Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid ermittelt. Für alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien aus Bentonit/Kieselsäure, Siliziumdioxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid werden die Permeabilität der Säulenpackung, deren maximale Bindekapazität und Stabilität angegeben. Der Einfluss einer Reduktion der Partikelgröße auf die Proteinbindekapazität daraus resultierender Adsorbensschüttungen wird ebenfalls betrachtet. Eine gängige Betriebsweise für viskose Fluide mit teilweise ungelöstem Feststoffanteil, wie Molkekonzentrat, stellt die Expanded Bed Chromatographie dar. Eine rechnerische Abschätzung für das Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid ergänzt experimentelle Beobachtungen hinsichtlich der Eignung des Materials für die Expanded Bed Chromatographie. Zur Trennung von ALA und BLG wird ein Ansatz mittels selektiver Adsorption im Durchbruch mit einem Ansatz mittels selektiver Desorption in einem Stufengradienten aus Kaliumphosphat als Eluent verglichen. Für den Batch-Ansatz wird aus den Ergebnissen von Adsorptionsisothermen und einstufigen Batchversuchen eine Stoffstromsimulation auf Grundlage eines verfahrenstechnischen Fließbilds erstellt. Der vorgestellte Prozess besteht aus 6 Rührkesselreaktoren, Filtrationsmodulen zur Fest-Flüssig-Phasen Trennung und zwei Sprühtrocknungseinheiten. Eine Prüfung des vorgestellten Prozesses auf seine Wirtschaftlichkeit wird vor dem Hintergrund möglicher Produktpreise diskutiert.

# Abstract

Since the beginning of large-scale food production raising amounts of main products emerge from these processes as well as their by-products. One of these by-products is whey. It incurs during the cheese making process in an annual amount of about 11.80 million tons solely in Germany in 2011. Historically, whey was not considered as a by-product but as a waste stream of the cheese making process. Early attempts of disposal management of whey consisted in e.g., its use as a fertilizer, animal feed, discharging whey into lakes, rivers, the ocean, or the municipal sewage system. But all these methods could not help handling the large and steadily growing amounts of whey in an economical and ecologically beneficial way. Due to its biological oxygen demand (BOD) the disposal at rivers and clarification plants stated an increasing problem which needed to be solved in alternative ways. Since the 1950s the former waste product whey is progressively processed to whey concentrate, a 5 to 6 times concentrated whey solution, using industrial applications of microfiltration and ultra/diafiltration. Engineering progress, particularly in the areas of liquid and powder handling, led to the development of whey protein powders of increasing protein content and purity since the 1970s. In the 2000s the manufacturing of additional products like isolates of single whey proteins rose. The global amount of produced whey concentrate was already 15 ago projected at more than 140.000 tons. The estimated amounts of whey protein powder and  $\alpha$ -lactalbumin (ALA) accounted for 2.300 tons and 230 tons, respectively. As purity exerts influence on the market rate, prices of whey protein powders ascended from about 1  $\$/\text{kg}^{-1}$  in the 1960s up to 600  $\$/\text{kg}^{-1}$  for high purity protein fractions. Whey protein products are mainly applied in the food processing industry as ingredients for infant formulations, sports nutrition and food products in general. Common processes for large-scale whey processing are ultrafiltration and chromatography, while on the laboratory scale also procedures like precipitation or peptic hydrolysis are described. These procedures mostly include modifications of whey pH. In the current work native whey, whey concentrate and whey powder are applied. Deployed chemicals are non-toxic and remain in the products only in low concentrations or can be withdrawn from these by neutralization. Fluid streams are little compared to chromatography and lactose can be separated from  $\alpha$ -lactalbumin (ALA) and  $\beta$ -lactoglobulin (BLG), which still poses a challenge for ultrafiltration processes. Adsorbents are favourably priced, not exceeding 10  $\text{€} \cdot \text{kg}^{-1}$ , and can be disposed as animal feed as in case of silicon oxide. The work at hand beholds two main strategies of whey processing giving a comparison of their potentials and presents a batch process layout including an economic evaluation. In the chromatographic approach adsorption isotherms as well as adsorption and desorption experiments in a small scale column are presented and results concerning permeabilities, protein binding capacities and stabilities of diverse experimental Süd-Chemie materials are given. When dealing with viscous fluids comprising solid fractions such as whey concentrate a widely-used chromatography variant is the expanded bed chromatography (EBC). Applicability of  $\gamma$ -alumina oxide materials for EBC use is investigated via experiment and

calculation. Selective adsorption and selective desorption for separation of ALA and BLG are examined as well as the the influence of adsorbent particle size on protein binding capacity. Based on adsorption isotherms and results of single stage batch experiments a process model for the batch approach is presented. An additional economic evaluation of the batch process is carried out regarding anticipated product selling prices.



# Abkürzungen

ALA	$\alpha$ -Lactalbumin
BLG	$\beta$ -Lactoglobulin
BOD	biological oxygen demand (biologischer Sauerstoffbedarf)
BSA	bovines Serumalbumin
BV	Bettvolumen
Ca <sup>2+</sup>	Calcium(II)-Ionen
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
EBC	Expanded Bed Chromatographie
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
H <sub>2</sub> O	Wasser
Ig	Immunglobulin
LF	Lactoferrin
LPO	Lactoperoxidase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
pI	isoelektrischer Punkt
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Phosphat
SEC	size exclusion chromatography, Größenausschlusschromatographie
USP	United States Pharmacopoeia
WP	wey protein powder, Molkeproteinpulver
WPC	wey protein concentrate, Molkeproteinkonzentrat
WPI	wey protein isolate, Molkeproteinisolat
$\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	$\gamma$ -Aluminiumoxid

## Formelzeichen

$a_{0,05}$	vordere Peakweite auf 5 % der maximalen Peakhöhe [min]
$a_{0,1}$	vordere Peakweite auf 10 % der maximalen Peakhöhe [min]
$A_c$	Querschnittsfläche der Säule [mm <sup>2</sup> ]
$A_p$	Querschnittsfläche des Partikels [mm <sup>2</sup> ]
$b_{0,05}$	hintere Peakweite auf 5 % der maximalen Peakhöhe [min]
$b_{0,1}$	hintere Peakweite auf 10 % der maximalen Peakhöhe [min]
$B$	Permeabilität der Säule [cm <sup>2</sup> ]
$Bo$	Bodensteinzahl [ ]
$c_{eq}$	Proteinkonzentration in der Flüssigphase am Adsorptionsgleichgewicht [g·l <sup>-1</sup> ]
$c_i$	initiale Proteinkonzentration [g·l <sup>-1</sup> ]
$c_v$	Feststoffvolumenkonzentration
$K_d$	Dissoziationskonstante für die Protein-Adsorbens Interaktion [g·l <sup>-1</sup> ]
$d$	Rührerdurchmesser [cm]
$D$	Behälterdurchmesser [cm]
$D_{ax}$	axialer Dispersionskoeffizient [cm <sup>2</sup> · s <sup>-1</sup> ]
$d_p$	Partikeldurchmesser [mm]
$d_s$	Säulendurchmesser [mm]
$\Delta p$	Druckdifferenz [Psi]
$E_A$	Aktivierungsenergie nach Arrhenius [J · mol <sup>-1</sup> ]
$F$	Kraft [N]
$\dot{F}$	Flussrate [ml · min <sup>-1</sup> ]
$F_p$	am Partikel angreifende Kraft [N]
$F_A$	Auftriebskraft [N]
$F_G$	Gewichtskraft [N]
$Fr$	Froude-Zahl [ ]
$HETP$	theoretische Trennbodenhöhe
$k_0$	spezifische Permeabilität der Säule [cm <sup>2</sup> ]
$K_L$	Gleichgewichtskonstante nach Langmuir [l · g <sup>-1</sup> ]
$L_c$	Säulenlänge [mm]
$m_{Ad}$	Adsorbensmasse [g]
$m_{Fl,Pore}$	Masse der Flüssigkeit in den Poren [g]
$m_L$	Masse der Flüssigkeit [g]
$m_P$	Masse des Partikels [g]
$m_{Pore}$	Masse des Fluids in den Poren [g]
$m_S$	Masse des Feststoffs [g]
$N_i$	Trennbodenzahl
$n$	Rührerdrehzahl [s <sup>-1</sup> ]
$Ne$	Newtonzahl

$O_p$	Partikeloberfläche [m <sup>2</sup> ]
$q$	Konzentration adsorbierten Proteins [mg · g <sup>-1</sup> ]
$q_i$	initiale Konzentration adsorbierten Proteins [mg · ml <sup>-1</sup> ]
$q_{\max}$	Maximalbeladung des Adsorbens [mg · ml <sup>-1</sup> ]
$R$	allgemeine Gaskonstante [J · mol <sup>-1</sup> · K <sup>-1</sup> ]
$Re$	Reynoldszahl [ ]
$T$	Temperatur [K]
$t_{\text{ret}}$	Retentionszeit [min]
$T_{\text{IUPAC}}$	Tailingfaktor nach IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) [ ]
$T_{\text{USP}}$	Tailingfaktor nach USP (United States Pharmacopoeia) [ ]
$t_{1/2}$	Durchbruchzeit äquivalent zur Hälfte der Feedkonzentration [min]
$u$	lineare Strömungsgeschwindigkeit [cm · min <sup>-1</sup> ]
$u_{\text{int}}$	Zwischenkorngeschwindigkeit [cm · min <sup>-1</sup> ]
$u_0$	Leerrohrgeschwindigkeit [cm · min <sup>-1</sup> ]
$V_{\text{Fl,Pore}}$	Volumen der Flüssigkeit in den Poren [ml]
$V_l$	Flüssigvolumen in der Säule [ml]
$V_L$	Volumen der Flüssigkeit [ml]
$V_s$	Säulenvolumen [ml]
$V_S$	Volumen des Feststoffs [ml]
$V_p$	Partikelvolumen [ml]
$w_{0,05}$	Peakweite auf 5 % der maximalen Peakhöhe [min]
$w_{0,1}$	Peakweite auf 10 % der maximalen Peakhöhe [min]
$w_{f0}$	Sinkgeschwindigkeit des Einzelpartikels [m·s <sup>-1</sup> ]
$w_{fs}$	Sinkgeschwindigkeit des Partikelschwarms [m·s <sup>-1</sup> ]
$\epsilon$	Porosität [ ]
$\epsilon_L$	Bettporosität [ ]
$\epsilon_P$	Partikelporosität [ ]
$\eta$	dynamische Viskosität [kg · s · m <sup>-2</sup> ]
$\nu_{\text{Pore}}$	spezifisches Porenvolumen [ml · g <sup>-1</sup> ]
$\rho_L$	Dichte der Flüssigkeit [g·l <sup>-1</sup> ]
$\rho_P$	Dichte des Partikels [g·l <sup>-1</sup> ]
$\rho_{\text{rütt}}$	Rütteldichte der Partikelschüttung [g·l <sup>-1</sup> ]
$\rho_S$	Dichte des Feststoffs [g·l <sup>-1</sup> ]
$\rho_{\text{schein}}$	scheinbare Dichte des Partikels [g·l <sup>-1</sup> ]
$\rho_{\text{wahr}}$	wahre Dichte des Partikels [g·l <sup>-1</sup> ]
$\rho_W$	Nassdichte des Partikels [g·l <sup>-1</sup> ]



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Molke . . . . .	3
2.1.1	Zusammensetzung von Molke . . . . .	3
2.1.2	Majore Molkeproteine . . . . .	5
2.1.3	Minore Molkeproteine . . . . .	8
2.2	Aufarbeitung von Molke . . . . .	9
2.2.1	Membranverfahren . . . . .	9
2.2.2	Chromatographie . . . . .	10
2.2.3	Weitere Aufreinigungsmethoden . . . . .	10
2.3	Entwicklung der Milchmärkte . . . . .	11
2.4	Adsorbentien . . . . .	11
2.4.1	Bentonit/Silica . . . . .	11
2.4.2	Silicate - Darstellung und Einsatz als Proteinadsorbentien . . . . .	13
2.4.3	Proteinadsorption durch Aluminiumoxid . . . . .	15
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1	Analytische Methoden . . . . .	17
3.1.1	BCA Protein Assay . . . . .	17
3.1.2	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	17
3.1.3	Protein-Bestimmung durch UV-Absorption . . . . .	18
3.1.4	HPLC-Protein-Analytik . . . . .	18
3.1.5	Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	19
3.1.6	Lactose-Analytik durch HPLC . . . . .	20
3.2	Verwendete Proteinquellen . . . . .	21
3.2.1	Modellproteine . . . . .	21
3.2.2	Molkekonzentrat . . . . .	21
3.2.3	Molkepulver und Dünnmolke . . . . .	22
3.3	Verwendete Adsorbentien . . . . .	22
3.4	Chromatographie . . . . .	27
3.4.1	Adsorptionsisothermen für die Chromatographie . . . . .	27
3.4.2	Proteinadsorption in der Kleinsäule . . . . .	27
3.4.3	Vergleich mit kommerziellem Adsorbens . . . . .	29
3.4.4	Aufskalierung der chromatographischen Proteinadsorption . . . . .	29
3.4.5	Bestimmung der Beladungskapazitäten der experimentellen Materialien in der Chromatographie . . . . .	30
3.4.6	Untersuchungen zur Stabilität des Chromatographiebettes . . . . .	30

3.4.7	Chromatographische Proteinfractionierung mittels der experimentellen Adsorbentien . . . . .	31
3.5	Proteinadsorption im Rührkessel . . . . .	32
3.5.1	Adsorptionsisothermen für die Proteinadsorption im Rührkessel . . .	32
3.5.2	Voruntersuchungen zur Stabilität der Adsorbentien . . . . .	32
3.5.3	Versuchsaufbau der Proteinadsorption im Rührkessel . . . . .	33
3.5.4	Auslegung Rührkessels . . . . .	34
<b>4</b>	<b>Chromatographie</b>	<b>37</b>
4.1	Einleitung Chromatographie . . . . .	37
4.2	Adsorptionsisothermen für die Chromatographie . . . . .	37
4.3	Proteinadsorption in der Kleinsäule . . . . .	42
4.3.1	Proteinadsorption mit Modellproteinen . . . . .	42
4.3.2	Vergleich mit kommerziellem Adsorbens . . . . .	48
4.4	Aufskalierung der chromatographischen Proteinadsorption . . . . .	56
4.4.1	Kapazitäten der Adsorbentien in der Chromatographiesäule . . . . .	56
4.4.2	Wiederverwendbarkeit der Adsorbentien aus $\gamma$ -Aluminiumoxid in der Chromatographiesäule . . . . .	58
4.4.3	Einfluss der Partikelgröße auf die Proteinbindekapazitäten in der Chromatographie . . . . .	58
4.4.4	Untersuchungen zur Stabilität des Chromatographiebettes . . . . .	60
4.4.5	Abschätzung Expanded Bed Chromatographie (EBC) . . . . .	62
4.4.6	Proteinadsorption mit Modellproteinen . . . . .	65
4.4.7	Selektive chromatographische Proteinadsorption . . . . .	67
4.4.8	Selektive chromatographische Proteindesorption . . . . .	68
4.5	Zusammenfassung Chromatographie . . . . .	70
<b>5</b>	<b>Proteinadsorption im Rührkessel</b>	<b>73</b>
5.1	Einleitung Proteinadsorption im Rührkessel . . . . .	73
5.2	Proteinadsorption im Labormaßstab . . . . .	73
5.2.1	Adsorptionsisothermen . . . . .	73
5.2.2	Verteilung des Gesamtproteins über die Prozessschritte . . . . .	78
5.2.3	Verteilung der Einzelproteine bei der Batchbeladung im Labormaßstab	80
5.3	Proteinadsorption an Adsorbentien in Pulverform . . . . .	90
5.3.1	Proteinadsorption im Rührkessel mit Adsorbentien in Pulverform . .	90
5.3.2	Einfluss des pH-Werts auf die Adsorptionskapazität . . . . .	93
5.4	Proteinadsorption an Adsorbenspartikel . . . . .	95
5.4.1	Voruntersuchungen zur Stabilität der Adsorbentien . . . . .	95
5.4.2	Proteinadsorption im Rührkessel an Adsorbenspartikel . . . . .	95
5.4.3	Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorptionskapazität . . . . .	99
5.4.4	Einfluss der Lactose auf die Adsorptionskapazität . . . . .	101
5.5	Prozesssimulation und Auslegung . . . . .	103
5.6	Zusammenfassung Proteinadsorption im Rührkessel . . . . .	108
<b>6</b>	<b>Abschließende Diskussion und Ausblick</b>	<b>111</b>

<b>Literatur</b>	<b>117</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>127</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>135</b>

## *Inhaltsverzeichnis*



# 1 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Prozesses zur Aufarbeitung von Molkeproteinen aus Molke mittels mineralischer Adsorbentien. Im Gegensatz zu den meisten in der Literatur beschriebenen Adsorptionsverfahren wird in diesem Verfahren der pH-Wert des Eduktes Molke nicht verändert. Im ersten chromatographischen Ansatz wird die Art und Charakteristik der Bindung der Molkeproteine an die Adsorbentien mittels Adsorptionsisothermen untersucht. Hierzu werden Adsorbentien in Pulverform aus Bentonit/Kieselsäure, Siliziumdioxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid mit steigenden Konzentrationen der Modellproteine ALA und BLG beladen. Die Adsorbentien werden anschließend in Chromatographiesäulen gepackt und deren Trennvermögen für die einzelnen Modellproteine und deren Gemische ermittelt. Ausgehend von den Ergebnissen der Untersuchungen in einer Kleinsäule (Bio-Rad Uno1, 1,3 ml Bettvolumen) erfolgt eine Aufskalierung mit Adsorbentien in Form von Granulaten und sphärischen Partikeln. Zudem werden prozessrelevante Größen wie die Permeabilität, Proteinbindekapazität, Anzahl der theoretischen Trennstufen und der axiale Dispersionskoeffizient ermittelt und ein Vergleich mit einem kommerziellen Material gegeben. Verschiedene Ansätze der Prozessführung, wie die Expanded Bed Chromatographie, selektive Adsorption und selektive Desorption werden berechnet und experimentell miteinander verglichen. Abschließend wird die Produktivität eines weiterentwickelten partikulären Materials aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid in der aufskalierten Säule für die Trennung von Molkeproteinen durch selektive Desorption im Phosphat-Stufengradienten ermittelt. Im zweiten Ansatz, der Batch-Adsorption, werden aus Adsorptionsisothermen und den Ergebnissen einstufiger Adsorptionsversuche im Rührkessel mit Adsorbentien in Form von Partikeln und Pulvern die relevanten Prozessparameter ermittelt. Die Materialien werden hinsichtlich ihrer Eignung für den Einsatz in technischen Anlagen geprüft und eine Prozessvariante unter konstant halten des pH-Wertes bei der Proteinadsorption wird getestet. Mit Hilfe dieser Ergebnisse wird eine Stoffstromsimulation erstellt, die Wirtschaftlichkeit des Prozesses abgeschätzt und mit den Ergebnissen aus dem chromatographischen Ansatz verglichen.

## 1 Zielsetzung

# 2 Theoretische Grundlagen

## 2.1 Molke

Molke stellt das Hauptnebenprodukt der Käseherstellung dar und entsteht bei allen Methoden der Caseinfällung. Hierbei sind die häufigsten Arten der Caseinfällung die enzymatische und die saure Fällung. Die enzymatische Caseinfällung erfolgt unter Einsatz von Lab, welches das Casein der Milch spaltet, was zur Zerstörung der micellärer Stabilisierung des Caseins und somit zu dessen Ausfällen aus der Lösung führt. Die entstehende gelbgrüne Flüssigkeit wird als Süßmolke bezeichnet. Die Produktion von Sauermolke geschieht entweder durch den direkten Zusatz von Säure oder durch die bei der mikrobiellen Fermentation von Lactose durch milchsäurebildende Organismen entstehende Milchsäure. Durch die Säuren kommt es zu einer Erniedrigung des pH-Wertes der Milch bis über den isoelektrischen Punkt des Caseins, woraufhin Konformationsänderungen des Proteins auftreten, welche letzten Endes in eine amorphe Form und das Ausfällen des Caseins münden (Wong, 1999). Der Hauptteil der dabei produzierten Molke wird anschließend zu flüssigem Molkekonzentrat aufkonzentriert oder zu Molkepulver verarbeitet (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., 2010).

### 2.1.1 Zusammensetzung von Molke

Nach Ausfällen und Abtrennung des Hauptteils des Caseins enthält die entstandene Molke noch durchschnittlich 6,3 % Feststoff. Dieser Feststoffanteil setzt sich bezogen auf die Molke zusammen aus 0,7 % Molkeproteinen, unter 0,1 % Restcasein, 0,1 % Fett, 4,9 % Lactose und 0,5 % Asche (Smithers, 2008). Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die Inhaltsstoffe von Milch und Molke.

Tabelle 2.1: Übersicht über die Inhaltsstoffe von Milch und Molke (Smithers, 2008)

Inhaltsstoffe	Anteil [% w/v]	
	Milch	Molke
Casein	2,8	< 0,1
Molkeproteine	0,7	0,7
Fett	3,7	0,1
Asche	0,7	0,5
Lactose	4,9	4,9
Feststoff gesamt	12,8	6,3

Die Molkeproteine werden in majore und minore Molkeproteine unterteilt. Zu den majoren

## 2 Theoretische Grundlagen

Molkeproteinen gehören  $\alpha$ -Lactalbumin (ALA),  $\beta$ -Lactoglobulin (BLG), bovines Serumalbumin (BSA) und Immunglobuline (Ig). Unter den Immunglobulinen besitzt IgG die größte Häufigkeit (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Anteil der einzelnen Proteine an der Proteinfraction von Molke (Montagne et al., 1999; Plate, 2008; Kontopidis et al., 2004; Mulsow, 2008; Farrell et al., 2004; Hirayama et al., 1990; Al-Mashikh and Nakai, 1987)

Protein	Anteil [% w/v]	Molekülmasse [kDa]
ALA	18 – 24	14,0
BLG	54 – 60	18,4
BSA	6 – 12	66,4
IgG	12,7	146
Lactoferrin	1,8	76,0
Transferrin	1,8	80 – 95
LPO	0,5	78 – 81

Zu den minoren Molkeproteinen gehören Lactoferrin (bLF), Transferrin (bTF) und Lactoperoxidase (LPO). Die Unterteilung der Molkeproteine in majore und minore Molkeproteine richtet sich hierbei nicht nach deren Größe, sondern nach deren relativer Häufigkeit in Molke. Zusätzlich enthält Molke zahlreiche Mineralien, Spurenelemente und Vitamine. Unter den Vitaminen ist auf Grund seiner gelben Farbe das Vitamin B2 das bekannteste und industriell am häufigsten eingesetzte. Es wird auch als Riboflavin, Lactoflavin oder E 101 bezeichnet und findet in der Lebensmittelindustrie Einsatz als Farbstoff (Ball, 2006). Eine Übersicht über die wichtigsten und häufigsten Mineralien, Spurenelemente und Vitamine in Molke ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Konzentration von Mineralien, Spurenelementen und Vitaminen in Molke (Plate, 2008)

Minerale	Konzentration [g·l <sup>-1</sup> ]	Spurenelemente	Konzentration [g·l <sup>-1</sup> ]	Vitamine	Konzentration [g·l <sup>-1</sup> ]
Natrium	0,5	Eisen	1,5	B <sub>2</sub>	1,5
Kalium	1,5	Kupfer	0,2	B <sub>5</sub>	4,0
Magnesium	0,1	Zink	1,5	B <sub>6</sub>	0,5
Calcium	0,6	Iod	0,5	C	1,5
Chlorid	1,1				
Phosphor	0,7				

## 2.1.2 Majore Molkeproteine

### $\alpha$ -Lactalbumin

ALA ( $\alpha$ -Lactalbumin) ist ein kleines globuläres Protein aus 123 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 14,2 kDa. In dieser Form kommt es strukturell nahezu identisch in sowohl humaner als auch boviner Milch vor (Nitta and Sugai, 1989). Seine Produktion erfolgt in den Milchdrüsen von Säugetieren und wird durch das Hormon Prolactin angeregt (Kleinberg et al., 1983). Mit einem Anteil von ca. 18 – 24 % ist es das zweithäufigste Protein in Molke, in humaner Milch hingegen ist es das häufigste Protein (Montagne et al., 1999; Plate, 2008). Sein isoelektrischer Punkt liegt bei 4,2 – 4,8 (Permyakov and Berliner, 2000a; Stanciuc and Rapeanu, 2010; Wong et al., 1996; Pike et al., 1996; Chatterton et al., 2006; Etzel, 2004). Auf Grund seiner singularär vorhandenen  $\text{Ca}^+$  Bindestelle findet ALA auch häufig Verwendung als einfaches Modellprotein calciumbindender Proteine (Permyakov and Berliner, 2000b). Wie die calciumbindenden Lysozyme besitzt auch ALA eine schwache proteolytische Enzymaktivität, welche über die Evolution der Säugetiere nahezu verloren gegangen ist (Nitta and Sugai, 1989). Die Bindung von Calcium ist auch ein entscheidender Faktor für die Stabilität des Proteins unter dem Einfluss von Hitze. So findet eine Hitzedenaturierung des Proteins erst bei etwa 70° C bei Calciumbindung statt und nicht wie im calciumarmen Zustand bereits bei 20° C (Stanciuc and Rapeanu, 2010). Auch die Rückfaltung des durch Hitze denaturierten Proteins wird durch die Bindung von Calcium positiv beeinflusst (Permyakov and Berliner, 2000a). In nativer Form besteht die Tertiärstruktur von ALA aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Domäne. Die größere  $\alpha$ -Domäne besteht aus drei pH-stabilen  $\alpha$ -Helices, einer pH-abhängigen  $\alpha$ -Helix und drei kurzen  $3_{10}$ -Helices (Pike et al., 1996). Die Struktur von ALA ist in Abb. 2.1 dargestellt.

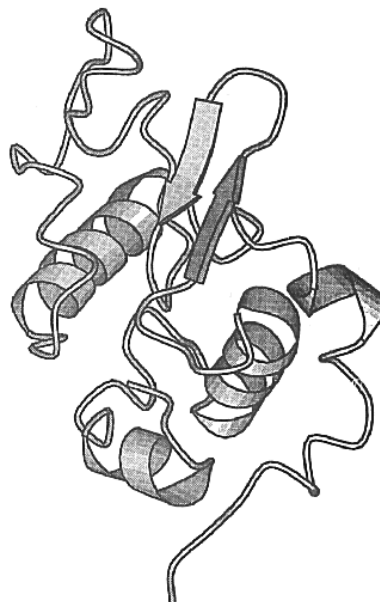


Abbildung 2.1: Struktur von ALA (El-Sayed, 2011)

Die kleinere  $\beta$ -Domäne setzt sich aus einer dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur und einer kurzen  $3_{10}$ -Helix zusammen (Chrysina et al., 2000). Von medizinischem Inter-

esse ist ALA als Therapeutikum für Gehirntumorzellen. So induzierte HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells), ein Derivat von ALA, welches in seiner Tertiärstruktur verändert und mit Ölsäure als Co-Faktor vorlag, die Apoptose einer Vielzahl von Tumorzellen *in vitro* (Fischer et al., 2004).

### $\beta$ -Lactoglobulin

BLG ( $\beta$ -Lactoglobulin) kommt in der Milch nahezu aller Säugetiere vor, eine Ausnahme stellt hierbei die menschliche Muttermilch dar (Chatterton et al., 2006; Lönnerdal, 2003). In Formulierungen zur Säuglingsernährung wird zur besseren Verträglichkeit sein Anteil möglichst gering gehalten (03/055322, 2003), zumal es starke Indizien dafür gibt, dass es hauptverantwortlich für proteinabhängige Allergien auf Kuhmilch und deren Produkte im Kindes- und Erwachsenenalter sein soll (Järvinen et al., 2001). Andererseits wurden immunregulatorische Eigenschaften des Proteins hinsichtlich einer Verminderung der Adhäsion bestimmter Stämme von *Escherichia coli* und *Klebsiella* an menschlichen Darmschleimhäute *in vitro* beschrieben und daraus die Möglichkeit einer frühzeitigen Verhinderung von Darminfektionen durch BLG nahe gelegt (Ouwehand et al., 1997). BLG besteht aus 162 Aminosäuren, sein Molekulargewicht beträgt 18,4 kDa und es besitzt einen stark hydrophoben Charakter (Kontopidis et al., 2004). Der isoelektrische Punkt von BLG liegt bei 5,3 – 5,4 (Chatterton et al., 2006; Etzel, 2004). Mit 54 – 60 % stellt es nach seiner Menge das häufigste Protein in boviner Milch dar (Mulsow, 2008; Plate, 2008). Im Kern besitzt das BLG-Molekül eine achtsträngige  $\beta$ -Faltblattstruktur, welche zuvor lediglich in Retinol bindenden Proteinen gefunden wurde, und ist flankiert von einer  $3_{10}$ -Helix (Papiz et al., 1986). Die Struktur von BLG ist in Abb. 2.2 abgebildet.

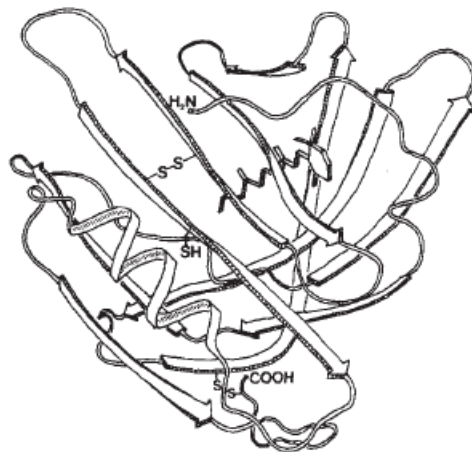


Abbildung 2.2: Struktur von BLG (Papiz et al., 1986)

Es gehört zur strukturell stark konservierten Familie der Lipocaline, welche in Form von Retinol bindenden Proteinen auch im menschlichen Blutserum vorkommen (Greene et al., 2003). Im nativen Zustand liegt das Protein als Homodimer vor (Papiz et al., 1986). Die Stabilität unter Hitzeeinwirkung ist für BLG vergleichbar mit jener des zuvor erwähnten ALA. So liegt die Grenztemperatur für die Hitzedenaturierung von BLG ebenfalls bei 70° C (Chen et al., 2005). Durch Erhitzen und Veränderung des pH-Wertes bildet BLG kurze und

lange Fasern, welche sich zur Gelbildung eignen (Jung et al., 2010). Konzentrate aus Molke angereichert mit BLG finden Einsatz in der Nahrungsmittelindustrie als Texturbildner (WO2004/091306, 2004; Elofsson et al., 1997; Qi and Onwulata, 2011).

### Bovines Serumalbumin

Das dritthäufigste Protein in Molke ist BSA (bovines Serumalbumin) mit einem Anteil von etwa 6 – 12 % (Farrell et al., 2004; Plate, 2008). Bestehend aus 583 Aminosäuren und mit einem Molekulargewicht von 66,4 kDa ist es deutlich größer als ALA oder BLG (Hirayama et al., 1990). Die dreidimensionale Struktur des Proteins wird von drei miteinander über Disulfidbrücken verbundenen Hauptdomänen gebildet, welche selbst aus jeweils zwei helikalen Subdomänen aufgebaut sind (Anfinsen et al., 1994). Der isoelektrische Punkt von BSA liegt bei 4,7 – 5,1 (Schlimme and Buchheim, 1995; Plate, 2008; Etzel, 2004). Es kommt sowohl im Blutserum als auch in der Milch aller Säugetieren vor und es bestehen große Sequenz- und Strukturhomologien zwischen den Serumalbuminen der verschiedenen Säugetierspezies (Anfinsen et al., 1994).

Eine Übersicht über die Eigenschaften der majoren Molkeproteine ist in Tabelle 2.4 gegeben.

Tabelle 2.4: Übersicht über die majoren Molkeproteine und deren Eigenschaften (Montagne et al., 1999; Plate, 2008; Kontopidis et al., 2004; Mulsow, 2008; Farrell et al., 2004; Hirayama et al., 1990; Al-Mashikh and Nakai, 1987)

Eigenschaft	ALA	BLG	BSA	Ig
Anteil [%]	18 - 24	54 - 60	6 - 12	6 - 12
Isoel. Punkt	4,2 – 4,8	5,3 – 5,4	4,7 – 5,1	5,5 – 6,8
Molekülmasse [kDa]	14, 0	18,4	66,4	> 146,0
Aminosäuren	123	162	583	-

### Immunglobuline

Der Anteil der Immunglobuline in Molke beträgt 6 – 12 %. Bei den Immunglobulinen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Antikörpern, welche die humorale (durch Blutserum und Lymphflüssigkeit) Immunität vermitteln. Die Immunglobuline sind alle untereinander verwandt, besitzen jedoch trotzdem eine hohe Diversität. Allen Immunglobulinen gemein ist ihr Grundaufbau aus mindestens vier Untereinheiten, zu welchen zwei identische leichte und zwei identische schwere Peptidketten gehören. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen und einer konstanten Domäne. Wohingegen die schweren Ketten aus einer variablen und drei konstanten Domänen bzw. vier konstanten Domänen bestehen. Durch die Assoziation der schweren Peptidketten entsteht ein Y-förmiges symmetrisches Molekül. Die variablen Domänen einer leichten und schweren Kette bilden die Antigenbindestelle. Über die Variation der Untereinheiten und die Zusammenlagerung der einzelnen Y-Elemente zu Di-, Tri-, oder Multimeren um eine zentrale J-Untereinheit entstehen die

vielen sehr unterschiedlichen Immunglobuline (Voet et al., 2002). In boviner Milch und Molke kommen drei Klassen der Immunglobuline vor: IgG, IgM und IgA (Korhonen et al., 2000). Die häufigste Form darunter ist das IgG, welches in identischer Form im Blutserum aller Säugetiere vorkommt (de Wit, 1998). Der isoelektrische Punkt der Immunglobuline liegt je nach ihrem spezifischen Aufbau zwischen 5,5 – 6,8 (Al-Mashikhi et al., 1988).

### 2.1.3 Minore Molkeproteine

Zu den minoren Molkeproteinen gehören Lactoferrin, Transferrin und Lactoperoxidase. Diese kommen in Molke in Konzentrationen von 25 – 100 mg·l<sup>-1</sup> vor (Etzcel, 2004). Eine Übersicht über die Eigenschaften der häufigsten minoren Molkeproteine ist in Tabelle 2.5 gegeben.

Tabelle 2.5: Übersicht über einzelne minore Molkeproteine und deren Eigenschaften (Aisen and Liebman, 1972; Schlimme and Buchheim, 1995; Pike et al., 1996; Yoshida and Ye-Xiuyun, 1991; Plate, 2008; Righetti and Caravaggio, 1976; Weiß, 1999; Al-Mashikh and Nakai, 1987)

Eigenschaft	Lactoferrin	Transferrin	Lactoperoxidase
Isoel. Punkt	7,9 - 8,8	6,7	9,2 – 10,0
Molekülmasse [kDa]	80 - 95	76,0	78 - 81
Aminosäuren	708	704	712

Lactoferrin, welches früher auch als Lactotransferrin bezeichnet wurde, gehört wie das mit ihm strukturell eng verwandte Transferrin zu den Transportproteinen. Diese eisenbindenden Glykoproteine sind vorwiegend an der Regulation des Eisenhaushaltes in Organismen beteiligt. Die 708 Aminosäuren des Lactoferrins bilden, verbunden durch eine  $\alpha$ -Helix, zwei Schleifenstrukturen, an deren Enden je ein Fe<sup>3+</sup>-Ion koordinativ gebunden werden kann (Adlerova et al., 2008). Hierbei besitzt Lactoferrin eine weitaus höhere Bindungsaffinität zu Eisen als das Transferrin (Aisen and Liebman, 1972). Abhängig von Eisengehalt und Glykosylierungsgrad beträgt das Molekulargewicht von Lactoferrin 80 – 95 kDa. Es kommt in allen Körperflüssigkeiten vor, jedoch ist seine Konzentration in Milch am höchsten. Ein bedeutender Unterschied zwischen diesen eisenbindenden Enzymen besteht in ihrem isoelektrischen Punkt. Für Lactoferrin liegt dieser bei 7,9 – 8,8 (Schlimme and Buchheim, 1995), (Etzcel, 2004; Yoshida and Ye-Xiuyun, 1991), für Transferrin bei 6,7 (Plate, 2008). Ein weiteres Glykoprotein in Molke ist die aus 612 Aminosäuren bestehende Lactoperoxidase (LPO) (Cals et al., 1991). Dieses ist im Gegensatz zu Lactoferrin und Transferrin nicht in der Lage, Eisen zu binden oder zu speichern (Adlerova et al., 2008). Anstatt dessen katalysiert es die Reaktion von Thiocyanaten und Wasserstoffperoxid (Wolfson and Summer, 1993) und besitzt antimikrobielle Eigenschaften (Kussendrager and van Hooijdonk, 2000). Die Molekülmasse des Proteins liegt zwischen 78 und 81 kDa (Yoshida and Ye-Xiuyun, 1991; Etzcel, 2004; Weiß, 1999), sein isoelektrischer Punkt bei 9,2 – 10,0 (Righetti and Caravaggio, 1976; Al-Mashikhi et al., 1988). In weitaus geringeren Konzentrationen enthält Molke des Weiteren Proteine wie Makroglobulin, Butyrophilin, Caeruloplasmin und die Freie Sekretorische Komponente (FSK) (Plate, 2008).



## 2.2 Aufarbeitung von Molke

### 2.2.1 Membranverfahren

Zur kommerziellen Aufarbeitung von Molke werden unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Das häufigste Verfahren ist hierbei die Membranfiltration (Schmidt et al., 1984), wie sie auch bei Biolac (Biolac GmbH, Harbarnsen) in Form eines Ultrafiltrationsverfahrens eingesetzt wird (Biolac GmbH & Co. KG, 2011). Die klassische Membranfiltration (reine Ultrafiltration) zeichnet sich durch hohe Ausbeuten, jedoch auch geringe Reinheit der Produkte, aus (Cheang and Zydney, 2004). Sie findet seit den frühen 1970er Jahren breiten Einsatz in der Milchindustrie und wird für diverse Anwendungen in der Produktkette von der Rohmilch über die Käseherstellung bis hin zur Molkeaufarbeitung eingesetzt. Klassische Verfahrensschritte zur Entwässerung (Evaporation), Entmineralisierung (Elektrodialyse), Fettabtrennung (Zentrifugation) oder Keimkontrolle (Hitzebehandlung) konnten durch Filtrationsverfahren ersetzt werden (Pouliot, 2008). Mittels modernerer Filtrationsverfahren ist es auch möglich, einzelne Komponenten aus den Lösungen abzutrennen und somit neue Produkte zu generieren. Diese Verfahren eignen sich als industrielle Verfahren (Pouliot, 2008). Neuere Membranverfahren kombinieren Ultrafiltration mit Chromatographie über eine Funktionalisierung der Membranoberflächen. Diese Verfahren werden folglich als Mixed-Mode Chromatographieverfahren bezeichnet. Ihre Vorteile gegenüber den klassischen Chromatographieverfahren liegen in niedrigen Rückdruckraten, hohen Flussraten, einem einfachen Scale-up, geringer Gefahr des Verblockens und einem einfachen Aufbau (Saufi, 2010). Hierfür werden auf klassischen Filtrationsmembranen, wie beispielsweise regenerierte Cellulose, mittels chemischer Oberflächenmodifikation z. B. Ionenaustauschergruppen immobilisiert (Bhut et al., 2011; Goodall et al., 2008; Kökpınar et al., 2006; Harkensee et al., 2006). Verfahren dieser Art wurden bereits für die Verarbeitung von Molke untersucht und zeigten großes Potential zur Fraktionierung der darin enthaltenen Proteine (Saufi and Fee, 2009; Ulber et al., 2001; Plate et al., 2006; Bhattacharjee et al., 2006). Mixed-Mode Chromatographieverfahren wurden aber auch mit anderen im industriellen Maßstab weniger verbreiteten Verfahren, wie der peptischen Hydrolyse, kombiniert (Konrad et al., 2001). Allen Membranverfahren ist jedoch auch das Problem des Membranfoulings gemein. Es handelt sich dabei um einen stetig fortschreitenden Prozess, bei welchem es zur Bildung von anorganischen und organischen Ablagerungen auf der Membranoberfläche kommt. Diese Ablagerungen verschlechtern die Filtrationsleistung der Anlagen sukzessive und sind durch eine Änderung der Betriebsparameter nicht mehr zu kompensieren. Ihre Entfernung erfordert den Einsatz spezieller Reinigungs- und Sanitarisierungsmethoden. Dabei kommen Säuren, Laugen, Enzyme, Tenside, Komplexbildner und Desinfektionsmittel zum Einsatz. Bei diesen Methoden fallen somit kostenintensive Abwässer an und sie reduzieren sowohl die Produktivität als auch die Lebensdauer der Membranen (D'Souza and Mawson, 2005).

### 2.2.2 Chromatographie

Eine im Verhältnis zu den Membranverfahren industriell weniger stark verbreitete Aufarbeitungsmethode ist die Chromatographie. Diese wird beispielsweise von Davisco (Davisco Food International, Inc., USA) zur Produktion von hochreinem ALA eingesetzt (Davisco Foods Inc., 2012). Über die hierbei eingesetzten Materialien sind von den Unternehmen meist keine exakten Angaben zu erhalten. Jedoch lässt die Literatur den Schluss zu, dass es sich dabei oftmals um modifizierte synthetische Polymere z.B. auf Basis von polyhydroxyliertem Methacrylat handeln muss. So konnten Gurgel et al. (Gurgel et al., 2001) Fraktionen aus Davisco Molkeproteinisolat, angereichert an den Einzelproteinen von Molke, mit synthetischen Polymersäulen auf Basis von polyhydroxyliertem Methacrylat herstellen. Heddleson et al. (Heddleson et al., 1997) entfernten mittels Kieselgurpartikeln, auf welchen all-trans-Retinal Gruppen immobilisiert waren, BLG aus Sauermolke. El-Sayed und Chase (El-Sayed and Chase, 2010) benutzten ein Material aus Sepharose und konnten über selektive Adsorption gekoppelt mit selektiver Desorption die Hauptproteinkomponenten ALA und BLG in einem zweistufigen Prozess aus Molkekonzentrat aufreinigen. Die Chromatographie mit ihren vielen Varianten, von Ionenaustauschchromatographie (Doultani et al., 2004) bis Affinitätschromatographie (Vyas et al., 2002; Heddleson et al., 1997) und Expanded Bed Chromatographie (Conrado et al., 2005) bietet viele interessante Möglichkeiten der Proteinfractionierung. Unter den Chromatographieverfahren liefert die Ionenaustauschchromatographie die höchsten Ausbeuten bei geringster Reinheit hinsichtlich ALA und BLG als Produkte (El-Sayed, 2011). Geberding et al. oder Doultani et al. konnten bei der Aufarbeitung von ALA und BLG mittels Ionenaustauschchromatographie zwar Ausbeuten zwischen 92 und 100 % erzielen, jedoch war die Reinheit ihrer Produkte sehr gering (Geberding and Byers, 1998; Doultani et al., 2004). Mittels Verfahren wie Affinitätschromatographie oder hydrophober Chromatographie lassen sich im Vergleich zur Ionenaustauschchromatographie Produkte höherer Reinheit herstellen, jedoch sind die Ausbeuten dieser Verfahren auch geringer (El-Sayed, 2011). Dies zeigen beispielsweise Arbeiten von Vyas et al. oder Gurgel et al., in welchen mittels Affinitätschromatographie ALA und BLG in Reinheiten zwischen 80 und 100 % aufgereinigt werden konnten, wobei die Ausbeuten bei 35 - 48 % lagen (Vyas et al., 2002; Gurgel et al., 2001).

### 2.2.3 Weitere Aufreinigungsmethoden

Andere Methoden zur Aufreinigung von Molkeproteinen wurden für den Labormaßstab beschrieben, haben aber häufig Schwächen in ihrer technischen Umsetzbarkeit und bieten oftmals nur ungenügend die Möglichkeit einer Aufskalierung auf einen wirtschaftlich relevanten Bereich. Es handelt sich hierbei oftmals um Fällungsverfahren, welche Salze (Aschaffenburg and Drewry, 1957; Mailliard and Ribadeau-Dumas, 1988) oder spezifische Lösungsmittel benutzten, oder Methoden, bei denen physikalische Parameter wie die Temperatur (Chen et al., 2005; Outinen et al., 1996; Tolkach et al., 2005) oder chemische Einflussgrößen wie der pH-Wert mittels Säuren und Basen (Fox et al., 1967; Caessens and Gruppen, 1997; Kuwata et al., 1985; Al-Mashikh and Nakai, 1987) gezielt verändert werden. Auch die peptische Hydrolyse einzelner Komponenten der Molke wurde beschrieben, wodurch eine einfachere Abtrennung der verbleibenden Komponenten mittels Membranverfahren erreicht wurde (Konrad et al., 2000; Konrad and Kleinschmidt, 2008; Ki-

nekawa and Kitabatake, 1996). Hierbei handelte es sich jedoch nicht um Verfahren zur vollständigen Aufreinigung und Separation der Molkeproteine, da eine oder mehrere Komponenten zerstört oder dem Prozess ohne deren gezielten Gewinnung entzogen werden. Dies macht eine industrielle Nutzung unrentabel.

## 2.3 Entwicklung der Milchmärkte

Der steigende Konsum von Fastfood und Fertiggerichten führt seit Jahren zu einem kontinuierlichen Anstieg der jährlich produzierten Käsemenge. Für das Jahr 2011 betrug die erzeugte Käsemenge allein in Deutschland 2,2 Mio. Tonnen (ZMB Zentrale Milchmarkt Berichterstattung GmbH, 2012). In dieser historischen Höchstmarke besaß Pasta-Filata, zu welcher unter anderen Mozzarella zählt, die höchste Steigerungsrate mit 9,8 % im Gegensatz zum Vorjahr. Damit fällt auch Molke, das Hauptnebenprodukt der Käseherstellung, in immer größeren Mengen an. Der größte Teil dieser Molke wird auch heute noch über Molkekonzentrate zu Molkepulver verarbeitet. Die im Jahr 2011 produzierte Menge an Molkepulver betrug in Deutschland  $371,5 \cdot 10^3$  Tonnen. Produkte aus der Aufarbeitung von Molke finden in den verschiedensten Produkten Anwendung, wie beispielsweise Babynahrung, Getränken oder Nahrungsmitteln wie Brot, Fleischwaren, Süßwaren und Milchzeugnissen (Barth and Behnke, 1997; Rodriguez Furlán et al., 2010; Balagtas et al., 2003).

## 2.4 Adsorbentien

### 2.4.1 Bentonit/Silica

Die eingesetzten Bentonit/Silica Adsorbentien [s. Kap. 3.3] gehören zu den Tonmineralien, welche ubiquitär auf der Erde vorkommen. Tonmineralien besitzen schichtartige Kristallstrukturen und lassen sich prinzipiell in zwei Grundtypen unterteilen, den 1:1 und den 2:1 Schichttyp. Der 1:1 Schichttyp besteht aus einer tetraedrischen Serpentin-schicht ( $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ ) und einer daran gebundenen oktaedrischen Kaolinschicht ( $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ ). Dieser Schichttyp weist keine bzw. kaum Substitutionen für Si bzw. Al in der Tetraederschicht bzw. Oktaederschicht auf, weshalb die Serpentin-Kaolin Tonmineralien auch nur sehr geringe bis keine negativen Schichtladungen tragen. Zwischen den Schichten befinden sich keine Ionen, jedoch kann Wasser interkalieren, was zum Quellen der Materialien führt (Bergaya et al., 2006). Der 2:1 Schichttyp ist aus 2 Tetraederschichten aufgebaut, zwischen welchen eine Oktaederschicht eingebettet vorliegt (Abb. 2.3) (Sposito et al., 1999). Bei diesem Schichttyp treten in unterschiedlichem Umfang Substitutionen durch Silizium- und Aluminiumionen auf, was zu Unterschieden in deren Schichtladungen und über diese auch zur Klassifizierung der Materialien in Talk-Pyrophyllite, Glimmererden, Vermiculite und Smekтите führt (Martin et al., 1991). Zwischen den geladenen Schichten der Tonmineralien des 2:1-Schichttyps befinden sich kompensierende Kationen. Diese sind auf Grund ihrer Größe an der Schichtoberfläche lokalisiert können leicht durch andere Kationen ausgetauscht werden. Zusätzlich können die Tonmaterialien des 2:1 Schichttyps hinsichtlich der Koordination von oktaedrischer zu tetraedrischer Schicht unterschieden werden. Bei dioktaedrischen Tönen stehen zwei dreiwertige Kationen der Oktaederschicht

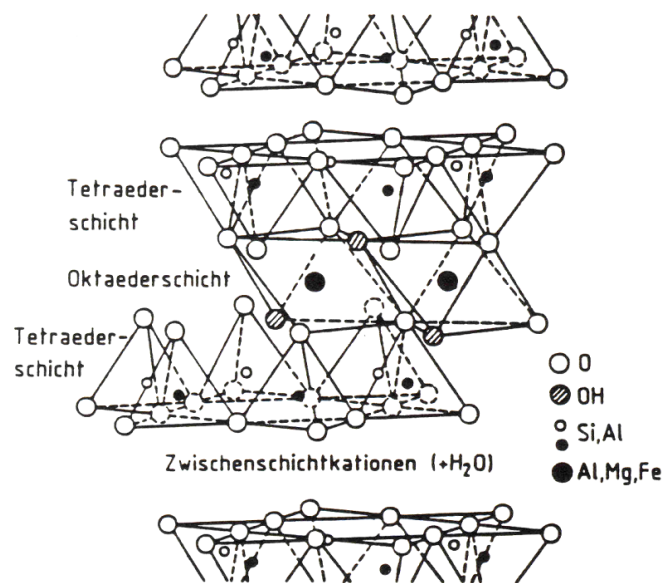


Abbildung 2.3: Schichtstruktur Montmorillonit (Lagaly and Fahn, 1983)

einer  $(\text{Si}_3\text{O}_{10})^{4-}$ -Einheit der Tetraederschicht gegenüber. Durch Austausch von Aluminiumionen durch zweiwertige Ionen in der Oktaederschicht oder Substitution von Silikationen durch Aluminiumionen in der Tetraederschicht kann eine weitere Ladung entstehen, welche einem zusätzlichen Kation der Oktaederschicht gegenübersteht. In diesem Fall handelt es sich dann um einen trioktaedrischen Ton (Bujdák and Rode, 1996). Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Tonmineralien handelt es sich um smektitisches dioktaedrisches Montmorillonit, dem Hauptbestandteil von Bentonit, welches fest in eine Matrix aus amorphem Siliziumdioxid eingebettet vorliegt. Durch die Einlagerung des Bentonits in die Silicastruktur konnte die für chromatographische Verfahren ungewünschte Quelleigenschaft des Montmorillonits minimiert werden. Proteinbindung an diesen Adsorbentientyp kann über elektrostatische (Johnston et al., 2012) oder hydrophobe (Quiquampoix, 2008) Wechselwirkungen erfolgen. Auch Van-der-Waals-Kräfte (Greenland, 1965) oder verbrückende divalente Kationen wie  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$  (Weiss, 1959) werden bei der Bindung von Proteinen an die Materialien beschrieben. Die Proteinbindung erfolgt hierbei in einem weiten Bereich um den isoelektrischen Punkt des Proteins, das Maximum der Bindungskapazität wird am isoelektrischen Punkt des Proteins erreicht (Riechers, 2005). Bedingt durch die Mannigfaltigkeit der Bindungsmechanismen wird auch die irreversible Bindung von Protein an Adsorbentien aus Tonmineralien beobachtet (Quiquampoix, 2008; Stefani and Sequi, 1978). Bei der Bindung der Proteine an die Oberfläche der Adsorbentien finden konformationelle Veränderungen des Proteins statt, welche zur Streckung des Proteins auf der Oberfläche der Adsorbentien führen. Diese Veränderungen sind jedoch meist reversibel (Baron et al., 1999; Gougeon et al., 2003).

### 2.4.2 Silicate - Darstellung und Einsatz als Proteinadsorbentien

Natürliche Silicate stellen die häufigsten Mineralien unserer Erdkruste dar. Sie kommen sowohl in kristalliner Form, als Quarz, Tridymit, Cristobalit, Coesit, Stishovit, als auch in amorpher Form, wie die Edel- und Schmucksteine der Opalgruppe, vor. Die kristalline Form lässt sich als eine dreidimensionale Anordnung von  $(\text{SiO}_4)^{4-}$ - und  $(\text{SiO}_6)^{8-}$ -Einheiten beschreiben. Die bei Raumtemperatur stabilste Form stellt hierbei Quarz dar. Dieser lässt sich über thermische Verfahren in Tridymit und bei höheren Temperaturen in Cristobalit überführen. Für alle drei Silicate existieren temperaturabhängige  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen, die Hochtemperaturformen sind bei Raumtemperatur metastabil. Amorphe Silicate bestehen aus einer zufälligen Anordnung von  $(\text{SiO}_4)^{4-}$ -Einheiten, welche bei den Opalen unterschiedliche Mengen an Wasser enthalten ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ). Synthetische Silicate werden durch die Kondensation von Orthokieselsäure hergestellt. Orthokieselsäure selbst ist darstellbar aus dem sogenannten Wasserglas ( $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3,3\text{SiO}_2$ ) und Schwefelsäure unter Bildung des Nebenprodukts Natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Bregna, 1994; Gan et al., 1996). Aus den nach Kondensation und Phasentrennung entstandenen Keimen entstehen in Abhängigkeit von pH-Wert und Salzkonzentration (z.B. Calciumsalze) entweder Gele durch Aggregation oder Sole durch Wachstum der Keime (Abb. 2.4).

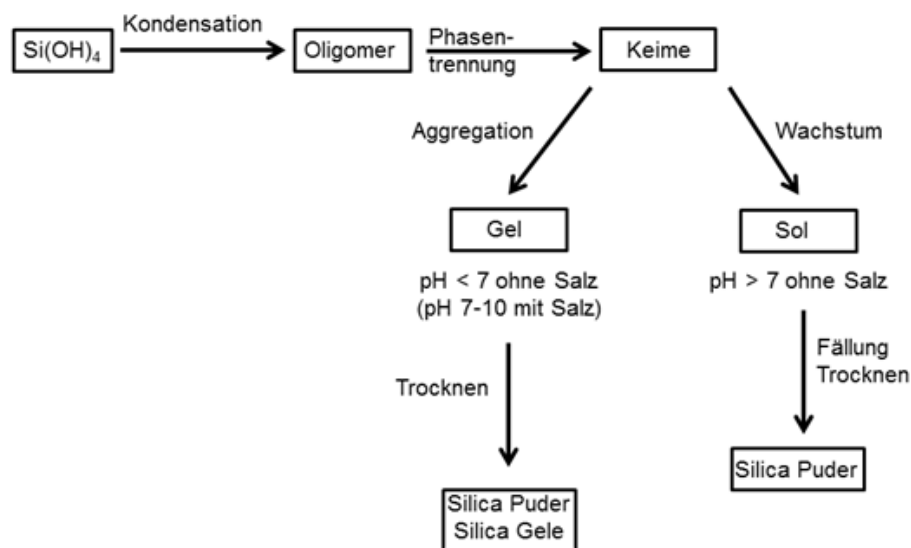


Abbildung 2.4: Darstellung synthetischer Silicate (Bregna, 1994; Schlomach, 2006)

Als Sol wird eine stabile Dispersion fester kolloidaler Partikel bezeichnet, welche kein Sedimentations- oder Agglomerationsverhalten aufweist. Abhängig vom Lösemittel werden Sole dann im Fall von Wasser als Aqua- oder Hydrosole, bei Verwendung organische Lösemittel als Organosole bezeichnet. Bei Gelen hingegen bildet sich ein flexibles Gerüst aus Silicapartikeln bzw. -polymeren, in welchem Wassermoleküle eingelagert vorliegen (Norisuye et al., 2000). Durch Fällung und Trocknung entstehen die kommerziell erhältlichen Silicate in Form von Pulvern oder Gelen. Abhängig von der Partikelgröße sind für den Zusammenhalt der Partikel kovalente Siloxanverbindungen, Natriumionenbrücken und Van-der-Waals-Kräfte verantwortlich (Bregna, 1994). Silicate tragen auf ihren Oberflächen Silanolgruppen (Abb. 2.5), der Nullladungspunkt dieser Materialien liegt zwischen

pH 1,8 und 2,5 (Kosmulski, 2009). Oberhalb dieses pH-Wertes können Silicate als Kationentauscher fungieren. Eine ausschließliche Beschreibung dieser Materialien als Kationen-

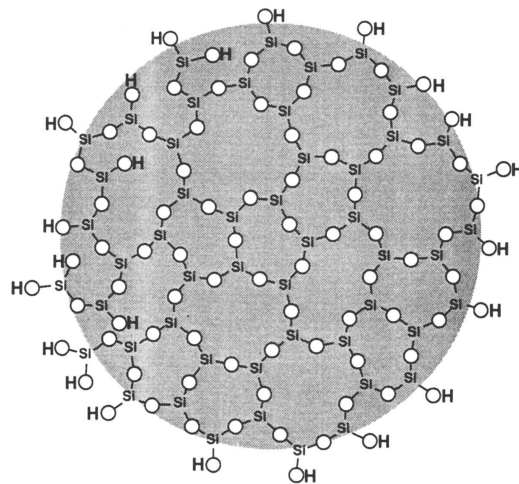


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung eines Silicapartikels, Partikelgröße: 5 bis ca. 1500 nm (Bregna, 1994)

tauscher ist in Bezug auf die Adsorption von Proteinen jedoch nicht vollständig, da auch weitere Kräfte wie hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt sind (Kondo et al., 1996). Zusätzlich treten bei der Adsorption an Silicate Konformationsänderungen der adsorbierenden Proteine auf, welche gegen repulsive elektrostatische Kräfte überwiegen und dadurch selbst die Bindung eines anionischen Proteins an die anionische Oberfläche der Adsorbentien vermitteln können. Nakanishi et al. unterscheiden hierbei die Proteine in „harte“ und „weiche“ Proteine (Nakanishi et al., 2001). „Weiche Proteine“ können unter starken Konformationsänderungen sowohl als Kationen als auch als Anionen an eine anionische Oberfläche von Silikaten adsorbieren. Zu den weichen Proteine zählen z.B. kleine und große weniger strukturstable Proteine wie ALA und BSA. „Harte Proteine“ (z.B. kleine strukturstable Proteine wie BLG) hingegen binden lediglich als Kationen, außer die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein und Adsorbens erlauben auch eine Adsorption des Proteins in anionischer Form. Eine Erhöhung der Ionenstärke des Medium kann zu einer Reduktion der elektrostatischen Abstoßung und somit zu einer Verbesserung der Adsorption „harter Proteine“ führen (Nakanishi et al., 2001). Die Adsorption und Desorption von Proteinen an bzw. von Silicaoberflächen ist stark vom pH-Wert abhängig und kann durch Isothermen des Langmuir-Typs beschrieben werden. Eine Desorption von Protein vom Material ist durch einen Elutionspuffer aus 1 M NaCl und 0.5 M NaOH möglich. So adsorbiert BSA bei pH-Werten unter 4 durch elektrostatische Kräfte stark an  $\text{SiO}_2$ . Seine Adsorption nimmt mit steigendem pH-Wert ab und ist dann vorwiegend noch durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen den Hydroxylgruppen auf der Materialoberfläche und den Protonen auf der Oberfläche von BSA bestimmt (Kondo et al., 1996; van Oss et al., 1995). Nach Überschreiten des isoelektrischen Punkts von BSA um pH 5 nehmen die abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche zu, bis bei einem pH-Wert von 10 keinerlei nennenswerte Adsorption von BSA an die Materialoberfläche mehr zu beobachten ist (Suh et al., 2004).

### 2.4.3 Proteinadsorption durch Aluminiumoxid

Oxide aus Übergangsmetallen wie Aluminium oder Silizium finden vor allem in der Petrochemie breiten Einsatz als Katalysatoren (Trombetta et al., 1998; Peri, 1965c,b). Die dabei eingesetzten Aluminiumoxide werden in thermischen Dehydroxylierungsverfahren hergestellt. Ausgehend von dem Rohstoff Aluminiumoxihydroxid ( $\text{AlOOH}$ ), wie Boehmit, entstehen bei der thermischen Behandlung zunächst die Übergangsphasen  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\theta$ -Aluminiumhydroxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Als letztes entsteht das stabile und im Gegensatz zu den vorangegangenen Übergangsoxiden katalytisch inaktive  $\alpha$ -Aluminiumhydroxid. Für diesen Prozess werden Temperaturen von 873 bis zu 1573 K benötigt. Nach 24 Stunden bei 873 K ist Boehmit vollständig in  $\gamma$ -Aluminiumoxid umgewandelt. Dieses besitzt eine Spinelstruktur mit Defekten und restlich verbliebene Hydroxylgruppen auf seiner Oberfläche (Boumaza et al., 2009; Peri, 1965a). Zur Steigerung der katalytischen Aktivität können dreiwertige Aluminiumionen der Oberfläche gegen vierwertige Siliziumionen ausgetauscht werden. Dabei kommt es zur Erhöhung der Lewis-Säure Aktivität und zur Bildung verbrückender Hydroxylgruppen, ähnlich jenen der Zeolite (Chizallet and Raybaud, 2009). Durch Erhöhung des Substitutionsgrades mit Siliziumionen bilden sich unterschiedliche Mischschichten aus  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Al-Si-Oxid und  $\text{SiO}_2$  auf der Oberfläche des Materials aus (Abb. 2.6).

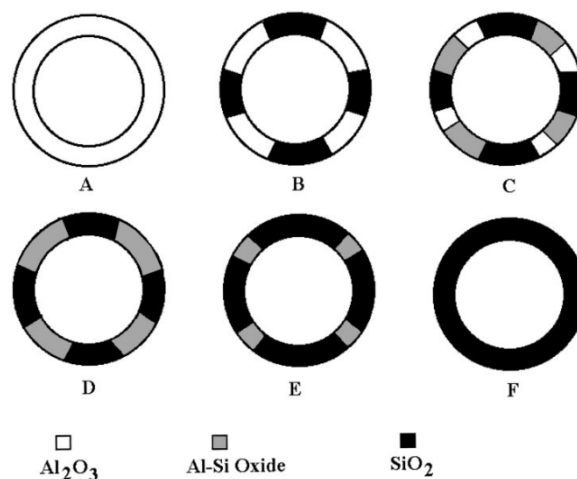


Abbildung 2.6: Modell der Oberflächenveränderung von  $\text{Al}_2\text{O}_3$  durch Substitution von Al durch Si. Reines  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (A), 1,5 – 5 %  $\text{SiO}_2$  (B), 10 – 20 %  $\text{SiO}_2$  (C), 30 – 40 %  $\text{SiO}_2$  (D), 60 – 80 %  $\text{SiO}_2$  (E) und 90 – 100 %  $\text{SiO}_2$  (F). (Daniell et al., 2000)

Ab einem Substitutionsgrad von 40 % liegt das Material als Core-Shell Partikel aus Al-Si-Oxid und  $\text{SiO}_2$  vor, reines  $\text{Al}_2\text{O}_3$  befindet sich nur noch im Kern des Materials. Bei diesem Substitutionsgrad wird auch die höchste Azidität des Materials erreicht (Daniell et al., 2000). Weitere Erhöhungen der Azidität können darüber hinaus durch Supplementierung des Materials mit Kobalt oder Kupfer, besonders aber durch Eisen, erzielt werden (Belik et al., 2009). Partikel aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid besitzen positive Oberflächenladungen bis zu pH-Werten zwischen 8,0 und 9,6 (Nullladungspunkt) (Wang et al., 2002; Kosmulski, 2004). Die Abweichungen in den ermittelten Werten sind in den unterschiedlichen Herstellungsmethoden der Materialien und Messmethoden begründet (Kosmulski, 2009). Für Materialien

aus  $\text{Al}_2\text{O}_3$  und  $\text{SiO}_2$  sinkt der Nullladungspunkt mit zunehmendem  $\text{SiO}_2$ -Anteil. So liegt er bei einem Anteil von 30 %  $\text{Al}_2\text{O}_3$  beispielsweise bei pH 4,6 (Janusz et al., 2007). In wässriger Lösung interagieren Materialien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid mit Wasser und es bilden sich weit unterhalb des Nullladungspunktes verstärkt  $\equiv\text{Al}(\text{OH}_2)_2^+$  Ionen und weit oberhalb des Nullladungspunktes zunehmend  $\text{AlO}^-$  Ionen an der Materialoberfläche (Wang et al., 2002). Kationische Aminosäuren können über Carbonylgruppen Wasserstoff-Brücken zu den  $\text{Al-OH}_2^+$  Ionen der Materialoberfläche ausbilden und somit an das Material adsorbieren. Bei anionischen Aminosäuren kommt es zur Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Aminogruppen der Aminosäuren und den Hydroxylgruppen auf der Materialoberfläche. Für zwitterionische Aminosäuren oder Proteine können zwei Mechanismen beobachtet werden. Zum einen findet eine Wasserstoffbrückenbildung zwischen Aminosäuren-Carboxylgruppen und Oberflächen- $\text{OH}_2^+$  statt, zum anderen die dominierenden intermolekularen Interaktionen zwischen den Amino- und Carboxyl-Gruppen der Aminosäuren (Garcia et al., 2007; Urano and Fukuzaki, 1997). Inkubation des Materials mit Citrat- oder Phosphatpuffer führt zu signifikanten Änderungen in der Oberflächenladung von Aluminiumoxiden. Die Citrat- bzw. Phosphatanionen belegen die kationische Oberfläche des Adsorbens, was zu einer Reduktion der positiven Oberflächenladung des Adsorbens bis hin zur Ladungsumkehr führen kann. Bereits an die Materialoberfläche gebundenes Protein kann sowohl durch diesen Effekt, als auch durch das Binden der Salzanionen an die Carboxylgruppen des Proteins, von der Oberfläche des Adsorbens eluiert werden (Garcia et al., 2007).



# 3 Material und Methoden

## 3.1 Analytische Methoden

### 3.1.1 BCA Protein Assay

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen von Gemischen oder der Konzentration von Modellproteinen wird ein BCA-Assay-Kit (Novagen, Merck-Group, Merck KGaA, Darmstadt) verwendet. Vor der Bestimmung der Proteinkonzentrationen werden die Proben vorbehandelt. Hierzu werden die Proben mit einem ProFill-Filter aus regenerierter Cellulose (MedChrom GmbH, Flörsheim-Dalsheim) mit einem Porendurchmesser von  $0,45\ \mu\text{m}$  filtriert. Der Testansatz in 96-well-Mikrotiterplatten erfolgt mittels eines Packard Multiprobe II-Pipettierroboters (PerkinElmer, Waltham, USA). Anschließend werden die Proben in einem Perkin Elmer Victor II (PerkinElmer, Waltham, USA) photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm vermessen. Das Gesamtvolumen des Testansatzes beträgt  $225\ \mu\text{l}$ . Im Test eingesetzt werden  $200\ \mu\text{l}$  einer Arbeitslösung, einer Mischung aus Pufferlösung und 4 % Kupfersulfat-Lösung in einem Verhältnis von 1:5, und  $25\ \mu\text{l}$  Probe bzw. Modellproteinlösung. Die Pufferlösung besteht aus Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M NaOH-Lösung (Angaben: Novagen, Merck-Group, Merck KGaA, Darmstadt). Der Assay ist sehr anfällig für Störungen durch Lactose. Er bietet die Möglichkeit, Proteinkonzentrationen exakt und schnell zu bestimmen, sofern die Lactosekonzentrationen in den Proben konstant sind oder in der Kalibrierung berücksichtigt werden. Dies trifft auf Proben der Proteinquellen oder Elutionsproben zu, jedoch nicht auf Beladungs-/Durchbruchproben, bei welchen neben starken Veränderungen in der Lactosekonzentration zusätzlich je nach Adsorbens Änderungen in der Einzelproteinkomposition zu beobachten sind.

### 3.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Auch bei der Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford handelt es sich um einen sehr schnellen und einfachen Assay, welcher auf Mikrotiterplattenmaßstab skalierbar ist. Für die Proteinbestimmung nach Bradford können dieselben Geräte wie für den BCA-Assay verwendet werden. Die Probenvorbereitung erfolgt analog zu jener, welche bereits in Kap. 3.1.1 beschrieben wurde. Es wird eine gebrauchsfertige Reaktionslösung von AppliChem (Bestell-Nr. A6932,0500) verwendet, die Coomassie Brilliant Blue G-250, Phosphorsäure und Ethanol enthält. Der Probenansatz besteht aus  $20\ \mu\text{l}$  Probe bzw. Modellproteinlösung (Standard) und  $200\ \mu\text{l}$  Reaktionslösung. Die photometrische Bestimmung erfolgt ohne vorherige Inkubation der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm. Hierbei stellte sich durch Absorptionsmessungen von Modellproteinen heraus, dass Störungen der Messwerte durch Lactose gering sind, der Assay für BLG jedoch eine wesentlich geringere Sensitivität als für die anderen majoren Proteinen ALA und BSA

besitzt. Folglich ist auch diese Bestimmungsmethode nicht geeignet zur Proteinbestimmung in Beladungs-/Durchbruchproben. Bedingt durch die Empfindlichkeit der Methode und die hohen zu messenden Proteinkonzentrationen in den Proben bedarf es hoher Verdünnungsstufen, welche eine zusätzliche Fehlerquelle darstellen. Zudem zeigte die Reaktionslösung auch bei konsequenter Lagerung im Kühlschrank Alterungseffekte, die durch Filtration kurzfristig minimierbar waren, jedoch mit weiterem Fortschreiten des Alterungsprozesses über 3-4 Wochen irreversibel wurden.

#### 3.1.3 Protein-Bestimmung durch UV-Absorption

Die Protein-Bestimmung durch UV-Absorption zeichnet sich zum einen durch ihre Einfachheit und Schnelligkeit, zum anderen durch eine in Bezug auf die Proben adäquate Empfindlichkeit und einen weiten linearen Messbereich von  $0,1 - 1,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  aus. Proben können in den meisten Fällen entweder direkt ohne vorherige Verdünnung oder in Verdünnungen von bis zu 1:10 vermessen werden. Die Probenvorbereitung, -verdünnung und Messung der Absorptionen erfolgt mit den in Kap. 3.1.1 beschriebenen Geräten. Die Absorptionsmessung erfolgt bei einer Wellenlänge von 280 nm in  $200 \mu\text{l}$  Proben in Mikrotiterplatten (96-well microplate, UV-Star®, VWR Best.-Nr. 736-0231). Als Standard dient ein Gemisch aus den majoren Molkeproteinen im selben Verhältnis zueinander, wie sie auch in Molkekonzentrat vorliegen (unter Berücksichtigung ihrer Reinheit im Bestell-/Anlieferzustand). Der Proteinstandard besteht aus 22,2 mg BLG, 5,3 mg ALA, 0,9 mg BSA und wurde in je 10 ml des entsprechenden Auftrage- und Elutionspuffers angesetzt. Auch bei dieser Methode treten bei nicht konstanten Proteinzusammensetzungen Messungenauigkeiten auf Grund der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der Proteine bei der Messwellenlänge von 280 nm auf. Diese Methode ist jedoch auf Grund ihrer hohen Probendurchsatzgeschwindigkeit von 4800 Proben pro Stunde, der Unempfindlichkeit gegenüber Störungen durch Lactose und der nicht vorhandenen Notwendigkeit des Einsatzes von Reagenzien die Methode der Wahl zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Beladungs- und Elutionsversuchen.

#### 3.1.4 HPLC-Protein-Analytik

Die quantitative Bestimmung der Einzelkomponenten von Proteingemischen erfolgt über eine Reversed Phase HPLC-Methode (Waters 2695 Separator Module) nach Elgar et al. (Elgar et al., 2000). Hierzu wird eine PLRS-100 Säule (Polymer Laboratories, Varian-Group, Varian Inc., Palo Alto, USA) mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm und einer Länge von 250 mm verwendet. Als Laufmittel dient ein Wasser-Acetonitril Gemisch. Dieses wird als Gradient aus zwei Pufferlösungen appliziert. Puffer A enthält Wasser und Trifluoressigsäure (0,1 % TFA), Puffer B Wasser, Acetonitril (HPLC-Grade, Mallinckrodt Baker, USA) und Trifluoressigsäure (90 % Acetonitril, 0,09 % TFA). Die zur Auftrennung des Gemisches verwendete Flussrate beträgt  $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Die Detektion der Komponenten erfolgt bei  $20^\circ \text{C}$  über einen Diodenarraydetektor (Waters 2998 Photodiode Array Detector). Hierbei wird eine Wellenlänge von 280 nm für die Peakflächenbestimmung verwendet. Ein Chromatogramm eines Standardgemischs ist in Abb. 3.1 dargestellt. Die Probenvorbereitung erfolgt analog zu jener, welche bereits in Kap. 3.1.1 beschrieben wurde. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über die Peakflächenbestimmung von Standardlösungen

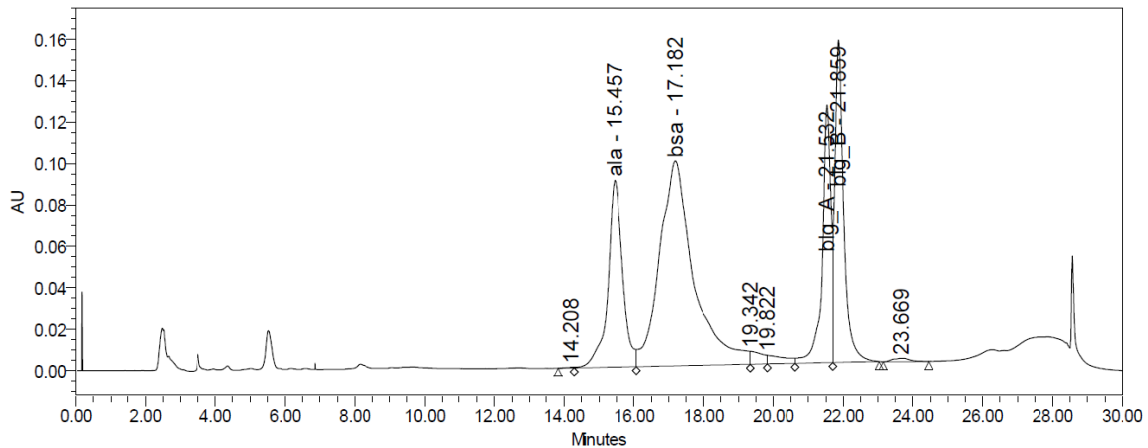


Abbildung 3.1: Chromatogramm eines Standardgemisches aus 30  $\mu\text{g}$  ALA, 120  $\mu\text{g}$  BLG, und 300  $\mu\text{g}$  BSA, Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{l}$ , Flussrate: 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Eluent: Wasser, Trifluoressigsäure, Acetonitril, Säule: PLRS-100 Polymer Laboratories

aus Modellproteinen, welche vor jeder Messung ebenfalls mit demselben Filter filtriert werden. Der Messbereich des Gerätes reicht für ALA bis 1  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , für BLG bis 2  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  und für BSA bis 5  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Die Proteine werden in 50 mM Kaliumacetatpuffer pH 6 gelöst. Diese Methode findet Verwendung zur genauen Bestimmung der Konzentrationen der majoren Molkeproteine in Proben. Es konnte kein Einfluss von Lactose auf die Messwerte beobachtet werden. Die lange Messzeit von 30 min vermindert jedoch die Einsetzbarkeit der Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in großen Probenanzahlen, wie sie bei Kapazitätsbestimmungen auftreten. Hierfür wird die Protein-Bestimmung durch UV-Absorption (Kap. 3.1.3) heran gezogen.

### 3.1.5 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Auf Grund der sehr unterschiedlichen Konzentrationen von majoren und minoren Proteinen in den Proteinquellen und der Überlagerung der Peaks minorer und majorer Molkeproteine lassen sich mit der eingesetzten HPLC-Anlage lediglich die majoren Proben eindeutig identifizieren und quantifizieren. Für eine vollständige Identifikation der Proteinzusammensetzung in einer Probe wird die SDS-PAGE eingesetzt. Hierbei ist zu beachten, dass die Methode in diesem Fall nur qualitative und nicht quantitative Aussagekraft besitzt. Das Trenngel besteht aus 3,33 ml 30 %iger Acrylamidlösung, 2,5 ml Trenngelpuffer, 5,77 ml demineralisiertem Wasser, 50  $\mu\text{l}$  APS (Ammoniumpersulfat) und 5  $\mu\text{l}$  TEMED (Tetramethylethylendiamin). Das Sammelgel beinhaltet 1,67 ml 30 %ige Acrylamidlösung, 2,5 ml Sammelgelpuffer, 6,67 ml demineralisiertes Wasser, 50  $\mu\text{l}$  APS und 1  $\mu\text{l}$  TEMED. Der Trenngelpuffer enthält 18,8 g TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) und 0,4 g SDS (Natriumdodecylsulfat), der Sammelgelpuffer 3 g TRIS und 0,2 g SDS. Beide Puffer werden in demineralisiertem Wasser angesetzt und auf pH 8,8 bzw. 6,8 eingestellt. Das Gel wird in zwei Teilschritten gegossen, die Auspolymerisationszeit pro Gelelement beträgt 20 min. Es werden 20  $\mu\text{l}$  einer Probe mit 10  $\mu\text{l}$  Probenpuffer versetzt und für 10 min im Heizblock bei 95 °C inkubiert. Der Probenpuffer enthält 0,5 ml Glycerin, 1 ml

### 3 Material und Methoden

Solubilisierungstammlösung und 3 – 4 Kristalle Bromphenolblau. In der Solubilisierungstammlösung sind 2,4 g TRIS, 0,15 g SDS und 0,2 ml Mercaptoethanol enthalten, diese wird in 40 ml demineralisiertem Wasser angesetzt. Nach 10 min Abkühlen bei Raumtemperatur wird die Probe in das Gel eingebracht und bei 150 V im Sammelgel fokussiert. Nach dem Eindringen der Proben in das Trenngel wird die Spannung auf 200 V erhöht. Die Auftrennung wird beendet kurz bevor die Bromphenolbande das Gelende erreicht hat. Die Elektrophoresekammer ist mit Elektrodenpufferlösung gefüllt, welche 3 g·l<sup>-1</sup> TRIS, 14,4 g·l<sup>-1</sup> Glycin und 1 g·l<sup>-1</sup> SDS enthält. Das Gel wird mit 0,1 %iger Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung bedeckt und drei Mal für je 30 s bei 360 W in der Mikrowelle inkubiert. Anschließend wird das gefärbte Gel mittels einer Entfärbe/-Fixierlösung entfärbt und fixiert. Die Entfärbe/-Fixierlösung enthält 30 % Methanol und 10 % Essigsäure.

Eine Übersicht über die Einsatzmöglichkeiten und Messbereiche der verschiedenen Methoden zur Proteinbestimmung gibt Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Übersicht über die Methoden zur Proteinbestimmung in Molkeproteinlösungen und Versuchsproben

Method	Messzeit [Proben pro h]	Probenvor- -bereitung [h]	Mess- bereich [g·l <sup>-1</sup> ]	Gestört durch Lactose	Einfluss Proteinzusam- mensetzung
BCA	4800	1,25	0,1 – 2	+	+
Bradford	4800	2,5	0,1 – 1	-	+
UV	4800	1	0,1 – 1,4	-	+
HPLC	2	1	0,1 – 5	-	-
SDS-PAGE	7	2	-	-	-

#### 3.1.6 Lactose-Analytik durch HPLC

Lactose wird mittels einer HPLC-Methode bestimmt. Hierbei wird eine Reprogel Ca<sup>++</sup>-Säule (Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen) mit 300 mm Länge und 8 mm Durchmesser verwendet. Dieser ist eine Vorsäule, gefüllt mit demselben Material, mit der Länge 20 mm und dem Durchmesser 8 mm vorgeschaltet. Die HPLC-Anlage besteht aus einem Midas Autosampler (Spark Holland, Emmen, Niederlande) und einem RID-6 Brechungsindexdetektor (Shimadzu, Kyoto, Japan). Die restlichen Komponenten wie Pumpe (Economy 2/ED), Degaser (Degasus Populaire) und Säulenofen (Jetstream 2+) stammen von Techlab (Techlab, Erkerode). Betrieben wird die Säule mit demineralisiertem Reinstwasser (Leitwert: 0,055  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) bei einer Flussrate von 0,5 ml·min<sup>-1</sup>. Die Temperatur des Säulenofens beträgt 80 °C. Die Probenvorbereitung erfolgt analog zu jener, welche bereits in Kap. 3.1.1 beschrieben wurde.

## 3.2 Verwendete Proteinquellen

### 3.2.1 Modellproteine

Lösungen aus Modellproteinen werden sowohl in chromatographischen Versuchen als auch in Versuchen im Satzverfahren eingesetzt. In der Chromatographie werden mit Hilfe der Modellproteinlösungen z.B. Retentionszeiten, Tailingfaktoren, Anzahl und Höhe theoretischer Trennstufen und axiale Dispersionskoeffizienten bestimmt. Bei Versuchen im Satzverfahren werden die Modellproteinlösungen zur Bestimmung von Maximalbelastungen  $q_{max}$  und Gleichgewichtskonstanten zwischen Adsorption und Desorption  $K_L$  der Adsorbentien eingesetzt. Des Weiteren werden Lösungen dieser Proteine zur Kalibrierung der Nachweisverfahren für Molkeproteine verwendet. Die hierfür benutzten Modellproteine ALA, BLG und BSA wurden als Lyophilisate von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze) bezogen. Eine Übersicht über die eingesetzten Modellproteine, deren Molekülmassen und Reinheiten ist in Tab. 3.2 gegeben.

Tabelle 3.2: Aufstellung der verwendeten Modellproteine

Proteinstandard	Molekülmasse [kDa]	Bestellnummer	Reinheit
BLG	18,4	L3908	90 %
ALA	14,0	L6010	85 %
BSA	66,0	A9647	96 %
Immunglobulin-G	146,0	I5506	95 %

### 3.2.2 Molkekonzentrat

Molkekonzentrat wird in dieser Arbeit direkt oder als Grundstoff zur Herstellung von Dünnmolke eingesetzt. Es findet sowohl in chromatographischen Verfahren als auch bei Satzverfahren Verwendung. Bei dem Molkekonzentrat handelt es sich um eine 5-fach aufkonzentrierte Molkesuspension aus Süßmolke. Die Aufkonzentrierung von Molke zu Molkekonzentrat ist ein übliches Verfahren bei der Käseherstellung im industriellen Maßstab. Diese Aufkonzentrierung der Molke zu Molkekonzentrat dient der Reduktion von Transportkosten zwischen den Orten der Entstehung und der Weiterverarbeitung von Molke. Das in dieser Arbeit eingesetzte Molkekonzentrat wurde von der Biolac GmbH & Co. KG (Biolac, Harbarnsen) zur Verfügung gestellt. Es enthält durchschnittlich  $34 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gesamtprotein und  $289 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Lactose. Die relative Verteilung der Einzelproteine entspricht der von Dünnmolke (s. Kap. 2.1.2 Tab. 2.4). Da dieses Molkekonzentrat mit Lactose übersättigt vorliegt, wird es bei späteren chromatographischen Versuchen für 45 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in einer Heraeus-Kühlzentrifuge (Laborfuge 400 R, Heraeus, DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, UK) bei 4500 rpm ( $3.939g$ ) zentrifugiert, um den bei chromatographischen Prozessen sich als störend auswirkenden auskristallisierten Feststoffanteil zu reduzieren.

### 3.2.3 Molkepulver und Dünnmolke

Die in dieser Arbeit eingesetzten Dünnmolkelösungen entstammen unterschiedlichen Ursprungs. Zum einen wird Dünnmolke (Süßmolke) von Hochwald (Hochwald Nahrungsmittel-Werke GmbH, Hünfeld) zur Verfügung gestellt. Diese Dünnmolke wird ohne Vorbehandlung direkt in den Testverfahren eingesetzt. Zum anderen wird Dünnmolke aus Molkekonzentrat durch 5-fach Verdünnung mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Dieses Molkekonzentrat aus Süßmolke wurde von BIOLAC (BIOLAC, Harbarnsen) zur Verfügung gestellt und die daraus hergestellten Dünnmolkelösungen weisen keine signifikanten Unterschiede in Zusammensetzung oder Eigenschaften zu der von Hochwald bezogenen Dünnmolke auf. Bedingt durch die geringe Lagerstabilität von Dünnmolke und Molkekonzentrat von nur 3 bis 4 Tagen im Haus wird zusätzlich mit Suspensionen aus Ultralac 35 Proteinpulver (BIOLAC, Harbarnsen) gearbeitet. Eine Übersicht über die Zusammensetzung von Ultralac 35 ist in Tabelle 3.3 gegeben.

Tabelle 3.3: Inhaltsstoffe von Ultralac 35 Proteinpulver und deren Massenanteil

Bestandteil	Massenanteil [%]
Protein	35
Lactose	48
Fett	< 4
Mineralien	< 8
Restfeuchte	< 5

Ultralac 35 (UL35) unterscheidet sich von Dünnmolke oder Molkekonzentrat hauptsächlich in seinem wesentlich geringeren Verhältnis von Lactose zu Protein. Auch die Suspensionen aus UL35 werden vor den Chromatographieversuchen abzentrifugiert, wobei in diesem Fall auf Grund des geringeren Lactosegehaltes der Suspensionen eine kürzere Zentrifugationszeit von 20 min gewählt wurde.

## 3.3 Verwendete Adsorbentien

Die untersuchten Adsorbentien bestehen aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid, Siliziumoxid und Montmorillonit oder stellen ein Gemisch daraus dar. Die Adsorbentien wurden von der Süd-Chemie AG (Süd-Chemie AG, Moosburg) zur Verfügung gestellt. Die Bandbreite der Materialien reicht von Pulvern über Granulate und Extrudate bis hin zu sphärischen Partikeln. Montmorillonit lag in Form von Bentonit/Silica sowohl in Pulverform (EX M 1221), als auch in Form eines Granulates (EX M 1717) vor. Siliziumoxid konnte in Form eines Pulvers (EX M 1991), eines Granulates (EX M 1871) und als sphärische Partikel (EX M 1907) untersucht werden. Für  $\gamma$ -Aluminiumoxid (Aktivtonerden) existierten Pulver (EX M 1986), Granulat (EX M 1997) und zwei in ihrer Größe unterschiedliche sphärische Partikel (EX M 2070 und EX M 2181). Alle weiteren Adsorbentien stellen Gemische dieser Komponenten dar und lagen in Form von Granulaten bzw. Extrudaten vor. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Materialien, deren chemische Zusammensetzungen, physikalische Eigenschaften und Einsatzbereiche gibt Tabelle 3.4.

Tabelle 3.4: Übersicht über die untersuchten Adsorbentien, deren chemische Zusammensetzung, Partikelform, BET-Oberfläche und Testumgebungen

Name	Anteil Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [%]	Anteil SiO <sub>2</sub> [%]	Bentonit/ Silica [%]	Partikel- klasse	Partikel- größe [mm]	BET- Oberfläche [m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	Chromato- graphie	Batch	Rühr- kessel
EX M 1221	-	-	100	Pulver	> 0,045	219	X	X	
EX M 1991	-	100	-	Pulver	< 0,02	160	X	X	X
EX M 1986	94	-	-	Pulver	< 0,03	172	X	X	X
EX M 1717	-	-	100	Granulat	0,3 - 1,0	134	X		
EX M 1871	-	100	-	Granulat	0,4	149		X	
EX M 1997	95	-	-	Granulat	0,43	150	X		
EX M 1998	62	38	-	Granulat	1,43	425	X	X	
EX M 1907	-	100	-	Sphären	1,12	157	X	X	X
EX M 1908	-	-	100	Granulat	0,3 - 1,0	131	X		
EX M 2070	97	-	-	Sphären	1,26	95	X	X	X
EX M 2073	59	41	-	Extrudat	1,16 x 3,50	175	X		
EX M 2181	97	-	-	Sphären	0,3	157	X		

### 3 Material und Methoden

Bentonite besitzen für gewöhnlich eine wahre Dichte von  $2200 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , ihre scheinbaren Dichten betragen zwischen  $1600 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  und  $1700 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  (Bathen and Breitbach, 2001). Die Kornporositäten liegen bei 0,2 - 0,35. BET-Oberflächen von Bentoniten betragen  $120 - 300 \text{ m}^3\cdot\text{g}^{-1}$  und die Porenvolumina  $0,35 - 0,95 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$ . Wie für Bentonite beträgt die wahre Dichte von Silicapartikeln  $2200 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ . Ihre scheinbaren Dichten sind mit  $750 - 1250 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  deutlich geringer als für Bentonite und sie besitzen wesentlich höhere Kornporositäten mit Werten zwischen 0,45 und 0,65. BET-Oberflächen werden literaturseitens von  $100 \text{ m}^3\cdot\text{g}^{-1}$  bis zu  $850 \text{ m}^3\cdot\text{g}^{-1}$  angegeben und Porenvolumina betragen  $0,35 - 0,95 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$ . Die wahren Dichten von Aktivtonerden liegen zwischen  $3000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  und  $3100 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , die scheinbaren Dichten bei  $1200 - 2400 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ . Literaturwerte für die Kornporositäten von Aktivtonerden betragen 0,13 - 0,6. Diese Materialien können BET-Oberflächen von  $100 - 400 \text{ m}^3\cdot\text{g}^{-1}$  besitzen, ihre Porenvolumina liegen zwischen  $0,35 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$  und  $0,60 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$ . Die scheinbare Dichte eines porösen Partikels  $\rho_{\text{schein}}$  ist gegeben durch das Verhältnis seiner Masse  $m_P$  zu der Summe seines Porenvolumens  $V_{\text{Pore}}$  und seinem Feststoffvolumen  $V_S$  (Bathen and Breitbach, 2001).

$$\rho_{\text{schein}} = \frac{m_P}{V_{\text{Pore}} + V_S}, \quad (3.1)$$

Durch Division der Gleichung 3.1 durch die Partikel(trocken)masse  $m_P$  und unter Einbezug des spezifischen Porenvolumens  $\nu_{\text{Pore}}$

$$\nu_{\text{Pore}} = \frac{V_{\text{Pore}}}{m_P}, \quad (3.2)$$

sowie der wahren Dichte des Partikels  $\rho_{\text{wahr}}$

$$\rho_{\text{wahr}} = \frac{m_P}{V_S}, \quad (3.3)$$

lässt sich Gleichung 3.1 zu Gleichung 3.4 umschreiben.

$$\rho_{\text{schein}} = \frac{1}{\nu_{\text{Pore}} + \frac{1}{\rho_{\text{wahr}}}}, \quad (3.4)$$

In Flüssigkeiten kommt es zur teilweisen oder vollständigen Befüllung der Poren mit Flüssigkeit der Dichte  $\rho_L$ . Dadurch kommt es zur Veränderung der Partikeldichte, welche dann als Nassdichte  $\rho_W$  bezeichnet wird. Die Nassdichte  $\rho_W$  ist gegeben durch das Verhältnis der Summe der Partikelrockenmasse  $m_P$  und der Masse der Flüssigkeit in den Poren  $m_{\text{Fl,Pore}}$  zu der Summe der Volumina von Poren  $V_{\text{Pore}}$  und Feststoff  $V_S$  (Bathen and Breitbach, 2001).

$$\rho_W = \frac{m_P + m_{\text{Fl,Pore}}}{V_{\text{Pore}} + V_S}, \quad (3.5)$$

In der Nassdichte ist die scheinbare Dichte (Dichte in Luft) enthalten (s. Gleichung 3.1), folglich lässt sich Gleichung 3.5 zu Gleichung 3.6 umschreiben.

$$\rho_W = \rho_{\text{schein}} + \frac{m_{\text{Fl,Pore}}}{V_{\text{Pore}} + V_S}, \quad (3.6)$$



Die Masse der Flüssigkeit in den Poren  $m_{\text{Fl,Pore}}$  ist das Produkt aus der Dichte der Flüssigkeit  $\rho_L$  und dem Volumen  $V_{\text{Fl,Pore}}$ , welches die Flüssigkeit in den Poren einnimmt.

$$\rho_W = \rho_{\text{schein}} + \rho_l \cdot \frac{V_{\text{Fl,Pore}}}{V_{\text{Pore}} + V_S}, \quad (3.7)$$

Unter der Annahme, dass die Flüssigkeit annähernd das gesamte Porenvolumen ausfüllt und nach partieller Division von Gleichung 3.7 durch  $m_P$  lässt sich für die Nassdichte folgende Näherung angeben

$$\rho_W \approx \rho_{\text{schein}} + \rho_l \cdot \frac{\nu_P}{\nu_P + \frac{1}{\rho_{\text{wahr}}}}, \quad (3.8)$$

Eine alternative Schreibweise von Gleichung 3.8 unter Einbezug von Gleichung 3.4 ist durch Gleichung 3.9 gegeben.

$$\rho_W \approx \rho_{\text{schein}} + \rho_l \cdot \rho_{\text{schein}} \cdot \nu_P, \quad (3.9)$$

Mit Hilfe der Partikeldichten ist die Berechnung der Porositäten möglich. So lässt sich die Kornporosität  $\epsilon_P$  aus der scheinbaren Porosität  $\rho_{\text{schein}}$  und der wahren Porosität des Partikels  $\rho_{\text{wahr}}$  nach Gleichung 3.10 berechnen (Bathen and Breitbach, 2001).

$$\epsilon_P = 1 - \frac{\rho_{\text{schein}}}{\rho_{\text{wahr}}}, \quad (3.10)$$

Die Berechnung der Bettporosität einer Säulenpackung aus den Partikeln  $\epsilon_L$  kann aus deren Rütteldichte  $\rho_{\text{rütt}}$  und deren scheinbarer Dichte  $\rho_{\text{schein}}$  erfolgen (Bathen and Breitbach, 2001).

$$\epsilon_L = 1 - \frac{\rho_{\text{rütt}}}{\rho_{\text{schein}}}, \quad (3.11)$$

Eine Übersicht über die Dichten und spezifischen Porenvolumina für eine Auswahl der untersuchten Adsorbentien ist in Tab. 3.5 gegeben. Die wahren Dichten der Materialien, deren spezifische Porenvolumina und Rütteldichten wurden von der Süd-Chemie AG ermittelt.

Tabella 3.5: Dichten und Porositäten einer Auswahl der verwendeten Adsorbentien

Adsorbens	wahre Dichte $\rho_{\text{wahr}}$ [kg·m <sup>-3</sup> ]	spezif. Porenvolumen (Hg) $V_p$ [ml·g <sup>-1</sup> ]	scheinb. Dichte $\rho_{\text{schein}}$ [kg·m <sup>-3</sup> ]	Kornmassdichte $\rho_w$ [kg·m <sup>-3</sup> ]	Rütteldichte $\rho_{\text{rütt}}$ [kg·m <sup>-3</sup> ]	Kornporosität $\epsilon_p$ [ ]	Bettporosität $\epsilon_L$ [ ]
EX M 1221	2400	0,83	802	1468	392	0,67	0,51
EX M 1991	2100	1,15	615	1322	220	0,71	0,64
EX M 1986	3200	0,80	899	1618	420	0,72	0,53
EX M 1907	2100	0,97	691	1362	343	0,67	0,50
EX M 2070	3111	0,76	925	1627	580	0,70	0,37
EX M 2081	3111	0,42	1349	1915	810	0,57	0,40

## 3.4 Chromatographie

### 3.4.1 Adsorptionsisothermen für die Chromatographie

Zur Bestimmung von Adsorptionsisothermen werden 10 mg des Adsorbens in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß eingewogen und mit 1 ml Modellproteinlösung in einem neoLab Überkopfschüttler (neoLab, Heidelberg) für 30 min bei 25 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Adsorbens durch Zentrifugation (VWR Galaxy 16 DH, VWR International GmbH, Darmstadt) entfernt (10 min, 13.300 rpm, 16.000g). Der Überstand wird durch einen ProFill-Filter aus regenerierter Cellulose (MedChrom, GmbH, Flörsheim-Dalsheim) mit einem Porendurchmesser von  $0,45 \mu\text{m}$  filtriert. Aus der Abnahme der Proteinkonzentration im Überstand wird die Beladung des Adsorbens berechnet und gegen die Proteinkonzentration graphisch aufgetragen. Den Daten wird eine Kurve nach Langmuir angenähert und daraus die maximale Beladung des Adsorbens  $q_{\text{max}}$  und die Gleichgewichtskonstante aus Adsorption und Desorption  $K_L$  bestimmt.

### 3.4.2 Proteinadsorption in der Kleinsäule

Als Säule geringsten Volumens kommt eine Uno1 Säule von BioRad (BioRad, München) mit einem Innendurchmesser von 0,7 cm und einer Länge von 3,5 cm zum Einsatz. Diese ist mit 1,3 ml Adsorbens befüllt. Die hierfür, wie auch für alle weiteren Chromatographieveruche, eingesetzte FPLC-Einheit ist ein BioLogic DuoFlow System der Firma BioRad mit einer F10-Pumpeneinheit. Eines der insgesamt drei verwendeten Systeme dieses Herstellers verfügt zusätzlich über eine BioLogic Maximizer Buffer Blending Einheit, welche neben dem vollautomatischen Mischen von Pufferlösungen auch eine Verdopplung der maximalen Flussrate auf  $20 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  erlaubt. Zur Prozessüberwachung sind in den ansonsten baugleichen Anlagen ein UV(254/280 nm)-Detector und eine Leitfähigkeitsmesszelle verbaut. Die Prozesssteuerung erfolgt über die BioLogic Software (v. 5.1). Proben werden mittels eines AVR 7-3 Probeninjektionsventils zwischen Pumpe und Säule in das System eingebracht. Das Injektionsvolumen beträgt 1 ml, als Modellproteine werden Lösungen von  $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  ALA,  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  BLG und einem Gemisch der Lösungen eingesetzt. Die Proteine liegen gelöst in 0,1 M Kaliumacetat-Puffer pH 5,7 vor. Die Anlagen verfügen zusätzlich über ein vollautomatisches BioFrac Fraction Collector Probenahmesystem. Der Eluent besteht aus 0,5 M Natriumhydroxid und 1,0 M Natriumchlorid und wird nach dem Elutionsgradienten in Abb. 3.2 bei einer Flussrate von  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  eingesetzt. Aus den erhaltenen Chromatogrammen werden neben den Retentionszeiten der Proteine und den Peakflächen weitere Parameter bestimmt (Schmidt-Traub et al., 2005), welche Aufschluss über die Güte und Trennleistung der Chromatographiesäulen, gepackt mit den untersuchten Materialien, geben. Für die Chromatographie sind zwei Aspekte von entscheidender Wichtigkeit, dies sind Auflösung und Effizienz. Die Auflösung einer Säule  $R$  wird aus den Retentionszeiten der Proteinpeaks und deren Weiten auf 50 % der maximalen Peakhöhe nach

$$R = \frac{1,177 \cdot (t_{\text{ret}_2} - t_{\text{ret}_1})}{w_{0,5_1} + w_{0,5_2}}, \quad (3.12)$$

berechnet (Kromidas and Kuss, 2008) und ist ein direktes Maß für die Trennung unterschiedlicher Substanzen in der Säule. Die theoretische Bodenzahl einer Säule  $N_i$  und daraus

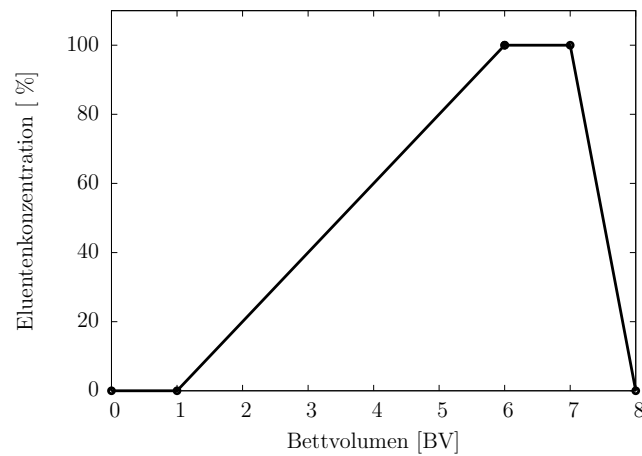


Abbildung 3.2: Schematischer Elutionsgradient zur Proteinelution in einer BioRad Uno1 Säule, in Anlehnung an (BioRad, 1999), Flussrate:  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , Eluent: 0,5 M Natriumhydroxid + 1,0 M Natriumchlorid

abgeleitete Parameter sind ein Maß für die Effizienz einer Säule. Sie geben an, mit welcher Peakschärfe gleiche Substanzen eine Säule verlassen. Die theoretische Bodenzahl wird für asymmetrische Peaks nach

$$N_i = \frac{47,1 \cdot \left(\frac{t_{\text{ret}}}{w_{0,1}}\right)^2}{1,25 + \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}}}, \quad (3.13)$$

aus der Retentionszeit des Proteins  $t_{\text{ret}}$ , der gesamten Peakweite  $w_{0,1}$ , der vorderen Peakweite  $a_{0,1}$  und der hinteren Peakweite  $b_{0,1}$  auf einem Zehntel der maximalen Peakhöhe berechnet (Schmidt-Traub et al., 2005). Die theoretische Trennhöhe HETP ist ein von der theoretischen Bodenzahl abgeleiteter Parameter und wird mittels

$$\text{HETP} = \frac{L_c}{N_i}, \quad (3.14)$$

aus der Länge der Säule  $L_c$  und der theoretischen Trennbodenzahl  $N_i$  bestimmt (Schmidt-Traub et al., 2005). In Chromatographiesäulen können Ungleichverteilungen der Fluidströme auftreten, welche in dem axialen Dispersionskoeffizienten zusammengefasst werden. Ursachen für die Ungleichverteilungen der Fluidströme sind mannigfaltig und werden beispielsweise bedingt durch die Form der Partikel der Säulenpackung und Unregelmäßigkeiten in der Säulenschüttung. Zur Berechnung des axialen Dispersionskoeffizienten  $D_{ax}$  wird Gleichung 3.15

$$D_{ax} = \text{HETP} \cdot \frac{u_{\text{int}}}{2}, \quad (3.15)$$

verwendet (Schmidt-Traub et al., 2005). In diese geht außer der theoretischen Trennhöhe HETP auch die Zwischenraumgeschwindigkeit  $u_{\text{int}}$  ein. Der Tailingfaktor ist die Beschreibung einer Peaksymmetrie in einem Zahlenwert und wird in einfacher Form als  $T_{\text{IUPAC}}$  (nach IUPAC) nach

$$T_{\text{IUPAC}} = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}}, \quad (3.16)$$

bestimmt (Kromidas and Kuss, 2008). In die Gleichung 3.16 gehen dabei die vordere Peakweite links des Peakmaximums  $a_{0,1}$  und die hintere Peakweite rechts des Peakmaximums  $b_{0,1}$  auf einem Zehntel der maximalen Peakhöhe ein. Eine weitere und strengere Methode zur Charakterisierung asymmetrischer Chromatographiepeaks ist die Bestimmung des Tailingfaktors nach USP (U.S. Pharmacopeia). Zur Berechnung des Tailingfaktors nach USP  $T_{\text{USP}}$  wird die vordere Peakweite  $a_{0,05}$  und die hintere Peakweite  $b_{0,05}$  auf 5 % der maximalen Peakhöhe gemäß

$$T_{\text{USP}} = \frac{a_{0,05} + b_{0,05}}{2 \cdot a_{0,05}}, \quad (3.17)$$

verwendet (Schmidt-Traub et al., 2005).

### 3.4.3 Vergleich mit kommerziellem Adsorbens

Als Referenz- und Benchmarksystem dient ein Adsorbens der Firma Pall (Pall GmbH, Dreieich), das nach Angaben des Herstellers bereits erfolgreich zur chromatographischen Aufreinigung von Molkeproteinen eingesetzt wurde. Das kommerzielle Adsorbens PallQ HyperD F besteht aus einer keramischen Matrix, in welche ein Ionenaustauschergel eingebettet ist. Im ersten Versuchsteil wird das kommerzielle Material denselben Untersuchungen in der Kleinsäule mit Modellproteinlösungen unterzogen wie auch die experimentellen Adsorbentien (s. Kap. 3.4.2). Im zweiten Versuchsteil wird die Säule mit Dünnmolke aus Molkekonzentrat beladen. Die Säule wird mit 2 Bettvolumen (BV) Dünnmolke beladen und mit 10 BV demineralisiertem Wasser gewaschen. Die anschließenden Elutionsschritte betragen 10 BV und werden mit 8 %, 20 % und 100 % Elutionspuffer durchgeführt. Bei dem Elutionspuffer handelt es sich um einen 50 mM Kaliumacetatpuffer, welchem 1 M Natriumchlorid beigefügt ist. Der Nachweis der Einzelproteine in den Elutionsproben erfolgt mittels Gelelektrophorese.

### 3.4.4 Aufskalierung der chromatographischen Proteinadsorption

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus der Kleinsäule und Überprüfung der Übertragbarkeit dieser auf ein größeres Adsorptionssystem wird die Säule einem Upscale unterzogen. Kleinsäulen bieten zudem nicht hinreichend die Möglichkeit, die Materialien auf ihre Druckbeständigkeit, maximale Proteinadsorptionskapazität oder Permeabilität in der Säulenpackung hin zu untersuchen. Bei der Untersuchung der bereitgestellten Granulate fällt auf, dass diese für den Einsatz in einer Chromatographiesäule nicht über die ausreichende Druckstabilität verfügen. Bereits während der Equilibrierung kommt es zu Bettverdichtungen und Verblocken der Säulen. Somit werden für die Aufskalierung gepresste Partikel mit hoher Druckbelastbarkeit verwendet. In diesem Fall handelte es sich um sphärische Partikel aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 1,26  $\mu\text{m}$  (EX M 2070) und 0,3  $\mu\text{m}$  (EX M 2181). Die Materialien werden in demineralisiertem Wasser gewaschen und in Flüssigkeit in die TAC25-Säule (Kronlab, Dinslaken) eingebracht. Die Säule besitzt einen Durchmesser von 25 mm und die Betthöhe beträgt 75 mm. Somit besitzt das Chromatographiebett ein Volumen von 37 ml. Die Equilibrierung erfolgt mit 0,1 M Kaliumacetatpuffer bei pH 5,7. Die Versuche finden bei einer Flussrate von 5  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  statt, der Eluent besteht aus 0,5 M NaOH und 1 M NaCl und wird abgewandelt von den Versuchen aus der Kleinsäule nach Abb. 3.3 eingesetzt.

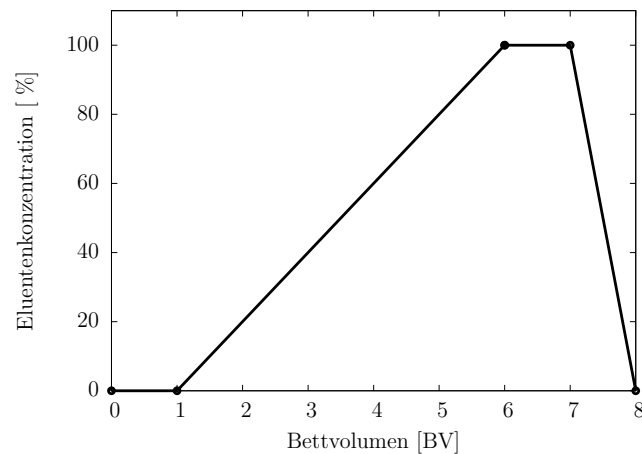


Abbildung 3.3: Schematischer Elutionsgradient zur Proteinelution in einer Kronlab TAC25 Säule, Flussrate:  $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Eluent:  $0,5 \text{ M}$  Natriumhydroxid +  $1,0 \text{ M}$  Natriumchlorid

### 3.4.5 Bestimmung der Beladungskapazitäten der experimentellen Materialien in der Chromatographie

Für die dynamische Bestimmung der maximalen Beladungskapazität werden Säulen mit einem Bettvolumen von  $37 \text{ ml}$  in der Kronlab TAC25-Säule gepackt. Das Adsorbens wird zuvor bis zur vollständigen Klärung des Überstands mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Die Säulen werden mit steigenden Flussraten von  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  bis  $6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  mit einem Flussratenintervall von  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  eingefahren, wobei auch die Korrelation zwischen Flussrate und Säulendruck bestimmt wird. Die Bestimmung der Verweilzeit und des Flüssigkeitsvolumens in der Säule wird mit  $1 \text{ ml}$  einer wässrigen  $6 \%$ igen Acetonlösung bei einer Flussrate von  $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  durchgeführt. Die Bestimmung der maximalen Beladungskapazität erfolgt mit Dünnmolke aus Molkekonzentrat.

### 3.4.6 Untersuchungen zur Stabilität des Chromatographiebettes

Die Säulenpackung wird mit Flussraten von  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  bis  $6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  mit einem Intervall von  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  überströmt. Als Eluenten kommen demineralisiertes Wasser,  $0,1 \text{ M}$  Kaliumacetat-Puffer pH 5,7, Dünnmolke oder Molkekonzentrat zum Einsatz. Wünschenswert ist ein linearer Zusammenhang zwischen angelegter Flussrate und sich in der Säule aufbauendem Rückdruck. Dies lässt auf ein stabiles Chromatographiebett und eine gleich bleibend gleichmäßige Verteilung des Adsorbens schließen. Auch irreversible, die Partikel nachhaltig deformierende oder ihre strukturelle Integrität zerstörende, Effekte können in dem betrachteten Bereich ausgeschlossen werden. Der Zusammenhang zwischen Rückdruck  $\Delta p$  und Flussrate  $\dot{F}$  ist durch eine Umformung des Darcy-Gesetzes (Helmchen and Glatz, 1978)

$$\Delta p = \frac{\eta \cdot u_0 \cdot L_c}{k_0 \cdot d_p^2}, \quad (3.18)$$

über die Leerrohrgeschwindigkeit

$$u_0 = \frac{\dot{F}}{A_c} = \frac{\dot{F}}{\pi \frac{d_c^2}{4}}, \quad (3.19)$$

durch Gleichung 3.20

$$\Delta p = \frac{\eta \cdot \dot{F} \cdot L_c}{k_0 \cdot \pi \cdot \frac{d_c^2}{4} \cdot d_p^2} \quad (3.20)$$

gegeben. Neben der Flussrate  $\dot{F}$  ist der Säulenrückdruck  $\Delta p$  auch abhängig von der Viskosität der mobilen Phase  $\eta$  und der Säulenlänge  $L_c$ . Einen umgekehrt proportionalen Einfluss haben der Säulendurchmesser  $d_c$ , der Partikeldurchmesser  $d_p$ , und die spezifische Permeabilität  $k_0$ . Der Wert für  $k_0$  liegt für gewöhnlich zwischen  $0,5 \cdot 10^{-3}$  und  $2 \cdot 10^{-3}$ . Als Vergleichsparameter zwischen Säulenpackungen kann auch die Säulenpermeabilität  $B$  nach Gleichung 3.21

$$B = k_0 \cdot d_p^2 = \frac{\eta \cdot \dot{F} \cdot L_c}{\Delta p \cdot A_c} \quad (3.21)$$

herangezogen werden (Helmchen and Glatz, 1978).

### 3.4.7 Chromatographische Proteinfractionierung mittels der experimentellen Adsorbentien

Zum Einsatz kommen 30 g des experimentellen Materials EX M 2181 in einer Kronlab-Säule. Die Säule wird mit 2 Bettvolumen (BV) demineralisiertem Wasser gewaschen und anschließend mit 5 ml Dünnmolke beladen. Unspezifisch gebundenes Protein sowie Lactose werden mit 3 BV demineralisiertem Wasser wieder aus der Säule ausgetragen. Die Elutionen erfolgen mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8, welcher in linearen Gradienten variierender Steigungen, isokratischen Stufen variierender Höhen und Kombinationen beider eingesetzt wurde. Abschließend werden die Säulen bei Einsatz von Ultralac 35 mit 2 BV 0,2 M NaOH gereinigt und regeneriert und abschließend mit 2 BV demineralisiertem Wasser gespült.

## 3.5 Proteinadsorption im Rührkessel

### 3.5.1 Adsorptionsisothermen für die Proteinadsorption im Rührkessel

Ausgehend von den Adsorptionsisothermen für den chromatographischen Ansatz (Bestimmung nach 3.4.1) wurden weitere Adsorptionsisothermen für den Ansatz im Rührkessel aufgenommen. Diese werden in 50 ml Falcon Tubes angesetzt, die Proteinkonzentration beträgt in jedem Ansatz  $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gesamtprotein, die Adsorbenskonzentration beträgt zwischen  $4$  und  $304 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Die Proteinlösung wird aus Molkeproteinpulver hergestellt. Die Inkubationszeit beträgt  $30 \text{ min}$  bei  $25 \text{ rpm}$  auf einem neoLab Überkopfschüttler (neoLab, Heidelberg). Es werden die Gesamtproteinkonzentration und die Konzentrationen der Einzelproteine ALA und BLG bestimmt. Die graphische Auftragung der ermittelten Gesamtproteinadsorption  $q$  über die eingesetzte Adsorbensmenge im Gleichgewicht  $c_{eq}$  kann mittels einer Langmuir Adsorptionsisotherme

$$q = q_{\max} \frac{K_L \cdot c_{eq}}{1 + K_L \cdot c_{eq}}, \quad (3.22)$$

beschrieben werden und ermöglicht die Bestimmung der maximalen statischen Proteinbindkapazität  $q_{\max}$  und der Adsorptionskonstanten  $K_L$ . Mittels Umformung der Langmuir Gleichung (3.22) nach

$$q_{\max} = q \frac{1 + K_L \cdot c_{eq}}{K_L \cdot c_{eq}}, \quad (3.23)$$

bzw.

$$q_{\max} = \frac{q}{K_L c_{eq}} + q, \quad (3.24)$$

können benachbarte Werte bestimmt werden nach

$$q_{\max} = \frac{q_1}{K_L c_{eq1}} + q_1, \quad (3.25)$$

und

$$q_{\max} = \frac{q_2}{K_L c_{eq2}} + q_2. \quad (3.26)$$

Ein Gleichsetzen der bestimmten Werte liefert die Lösungsfunktion für  $K_L$

$$K_L = \frac{q_1 \cdot c_{eq1}^{-1} - q_2 \cdot c_{eq2}^{-1}}{q_2 - q_1}. \quad (3.27)$$

Das Lösen der Gleichungen ergibt die Punkte einer Näherungskurve für die Kapazität über der eingesetzten Adsorbenskonzentration.

### 3.5.2 Voruntersuchungen zur Stabilität der Adsorbentien

Die Voruntersuchungen zur Stabilität der Adsorbentien wurden mittels des Abriebtests nach UNILEVER durchgeführt (Thiel, 2009). Dabei werden  $5 \text{ g}$  trockenes Adsorbens in ein mit  $500 \text{ ml}$  demineralisiertem Wasser befülltes  $1 \text{ l}$  Becherglas gegeben. Die Partikelsuspension wird mit einem  $5 \text{ cm}$  langen Rührfisch  $2 \text{ Minuten}$  lang gerührt, dass ein Wirbel



von 4 cm Eindringtiefe entsteht. Die Suspension wird anschließend durch ein Sieb mit einer geringfügig kleineren Maschenweite als der Durchmesser intakter Adsorbenspartikel gegeben und das zurückgehaltene Adsorbens für 24 Stunden bei 70° C getrocknet. Aus der Masse der getrockneten Adsorbenspartikel lässt sich somit deren stabiler Anteil bestimmen. Durch Filtration der restlichen Suspension durch ein Sieb der Maschenweite 0,2 mm und Trocknung der zurückgehaltenen Partikel wird der zerkleinerte Anteil bestimmt.

### 3.5.3 Versuchsaufbau der Proteinadsorption im Rührkessel

Für die Batchversuche zur Proteinadsorption werden zwei Rührkessel verwendet. In den ersten Versuchen kommt ein Minifors-Reaktor (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) als Rührkessel zum Einsatz. An den Reaktor wird ein Probenahmesystem mit externer Peristaltik Pumpe (Pumpdrive 5204, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach) angeschlossen. Dieses System besteht aus zwei 3-Wege-Hähnen, einer Leitfähigkeitselektrode (Qcond 2200, VWR International GmbH, Darmstadt), einer pH-Elektrode (blue line 17, Schott Instruments GmbH, Mainz) und ist mittels Silikon-Schläuchen mit dem Reaktor verbunden. Die eingesetzten Adsorbenspartikel werden mittels eines Netzgitters mit einer Maschenweite von 0,2 mm am Begasungsrohr des Reaktors zurückgehalten. Die partikel-freie Lösung wird anschließend kontinuierlich durch das Probenahmesystem geführt und tritt durch einen Zulauf am Reaktorkopf wieder ein. Der schematische Aufbau des Minifors-Reaktors ist in Abb. 3.4 dargestellt.

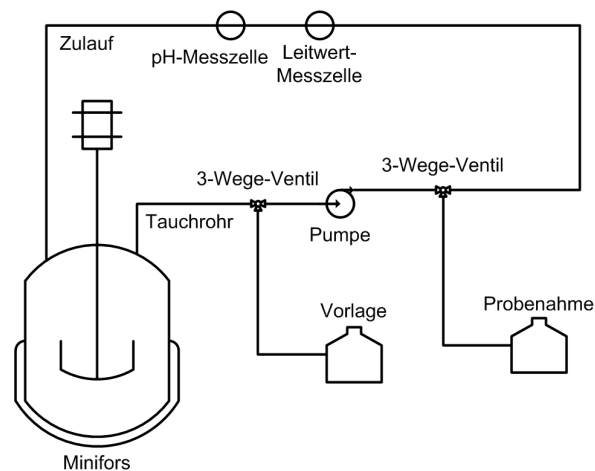


Abbildung 3.4: Schematischer Versuchsaufbau der Batch-Versuche im Minifors-Reaktor

Bei Versuchen mit pulverförmigen Adsorbentien wird ein Bioengineering R'ALF Reaktor verwendet (Bioengineering AG, Wald, Schweiz). Da eine Rückhaltung des feinpartikulären Adsorbens ohne ein Verstopfen des Gitters oder der Löcher im Belüftungsrohr praktisch nicht möglich ist, wird anstatt dessen ein offenes Tauchrohr ohne Rückhalteeinbauten mit Öffnung in Bodennähe des Reaktors eingesetzt. Die reaktoreigene Medienpumpe sorgt für den Transport der Suspension durch das Probenahmesystem. Die Trennung von Adsorbens und der flüssigen Phase erfolgte mittels Zentrifugation. Ein schematischer Aufbau des Bioengineering R'ALF Reaktors ist in Abb. 3.5 abgebildet.

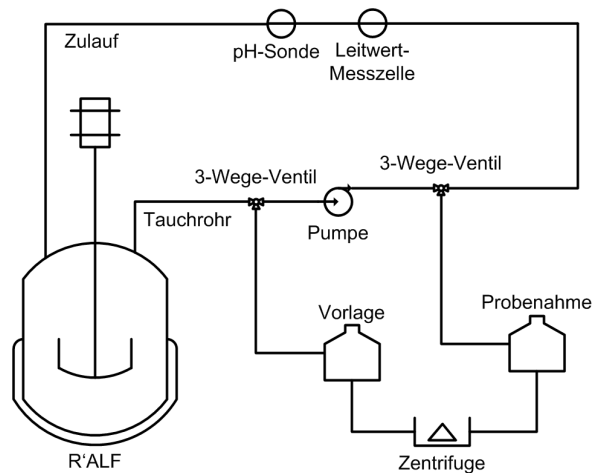


Abbildung 3.5: Schematischer Versuchsaufbau der Batch-Versuche im Bioengineering R'ALF Reaktor

### 3.5.4 Auslegung Rührkessels

In Rührkesseln wird im Allgemeinen eine optimale Verteilung aller an einem Prozess beteiligten Komponenten angestrebt. In dem vorliegenden Fall sind das die Molkeproteine und die eingesetzten Adsorbenspartikel. Allerdings neigen Proteinlösungen zur Schaumbildung, was zur Austragung von Protein aus der Lösung führt (Dissanayake and Vasiljevic, 2009). Auf diese Weise ausgetragenes Protein nimmt nicht mehr am Adsorptionsvorgang teil und stellt zudem eine Quelle für Messfehler dar. Dies macht eine möglichst genaue Abschätzung der zur Suspendierung der Adsorbentien benötigten Rührerdrehzahl notwendig. Die Sinkgeschwindigkeit eines Partikelschwarms  $w_{fs}$  lässt sich nach Richardson-Zaki (Richardson and Zaki, 194) aus der Einzelkorn-Sinkgeschwindigkeit  $w_{f0}$  berechnen.

$$w_{fs} = w_{f0} \cdot (1 - c_V)^{a(Re_{x0})} \quad (3.28)$$

Diese Gleichung für die Schwarm-Sinkgeschwindigkeit  $w_{fs}$  gilt in einem Bereich der Volumenkonzentration des Feststoffs  $c_V$  von 0,01 bis 0,3. Der Exponent ist dabei abhängig von der Partikel-Reynoldszahl und kann Werte zwischen 4,65 und 2,39 annehmen (Stieß, 2007). Die Berechnung der Einzelkorn-Sinkgeschwindigkeit erfolgt nach Gleichung 3.29.

$$w_{f0} = \frac{(\rho_S - \rho_F) \cdot g \cdot d_p^2}{18 \cdot \eta}, \quad (3.29)$$

Neben den Dichten von Feststoff (Adsorbens)  $\rho_S$  und Flüssigkeit (Dünnmolke)  $\rho_L$  gehen in Gleichung 3.29 die Erdbeschleunigung  $g$ , der Partikeldurchmesser  $d_p$  und die dynamische Viskosität  $\eta$  ein. In denselben Rührkesseln werden Adsorbentien sowohl in Pulverform als auch in Form sphärischer Partikel mit Partikeldurchmessern größer 1 mm eingesetzt. Bei den Pulvern steht dabei der Vorgang des „In-Schwebenhaltens“ im Vordergrund, wohingegen bei den großen sphärischen Partikeln, welche schneller zu Boden sinken als die pulverförmigen Adsorbentien, das Aufwirbeln eine übergeordnete Rolle spielt. Voit und Mersmann (Voit and Mersmann, 1985) entwickelten einen Ansatz, welcher beide Fälle

berücksichtigt und eine Unterscheidung dieser mit Hilfe des Kriteriums

$$\left(\frac{d_p}{D}\right)^* = 3 \cdot 10^{-3} \cdot \left(\frac{w_{f0}}{w_{fs}}\right)^2 \cdot \frac{1 - \frac{c_V}{0,6}}{2 + 25 \cdot c_V}, \quad (3.30)$$

zulässt. Dieses Kriterium wird mit dem Verhältnis von Partikelgröße  $d_p$  zu Behälterdurchmesser  $D$  verglichen. Für  $d_p/D > (d_p/D)^*$  müssen große Partikel mit hohen Sinkgeschwindigkeiten aufgewirbelt werden und es gilt die modifizierte Definition der erweiterten Froude-Zahl nach Gleichung 3.31.

$$Fr^{**} = 0,78 \cdot \frac{1 - \frac{c_V}{0,6}}{2 + 25 \cdot c_V} \cdot \frac{D}{d_p}, \quad (3.31)$$

Für  $x/D < (x/D)^*$  müssen kleine Partikel mit niedrigen Sinkgeschwindigkeiten in Schwebelage gehalten werden und es gilt die modifizierte Definition der erweiterten Froude-Zahl nach Gleichung 3.32.

$$Fr^{**} = 260 \cdot (1 + 25 \cdot c_V)^2 \cdot \left(\frac{w_{fs}}{w_{f0}}\right)^2, \quad (3.32)$$

Mit Hilfe der Definitionsgleichung der erweiterten Froudezahl

$$Fr^{**} = \frac{n^2 \cdot d}{g} \cdot \frac{\rho_F}{\Delta\rho} \cdot \frac{d}{d_p}, \quad (3.33)$$

und  $\Delta\rho = \rho_S - \rho_F$  lässt sich dann die benötigte Rührerdrehzahl nach

$$n = \left(\frac{\Delta\rho \cdot g \cdot d_p}{\rho_F \cdot d^2} \cdot Fr^{**}\right)^{1/2}, \quad (3.34)$$

berechnen. Die Größe  $d$  ist hierbei der Rührerdurchmesser. Für die Feststoffdichte  $\rho_S$  wird die Nassdichte des Partikels  $\rho_W$  (s. Kap. 3.3) eingesetzt. Zahlenwerte für die dynamische Viskosität und die Dichte von Molke und anderen Proteinlösungen können der Literatur entnommen werden (Töpel, 2004).



# 4 Chromatographie

## 4.1 Einleitung Chromatographie

Die Chromatographie lässt sich in zwei Prinzipien unterteilen, zum einen in Sorptionsprozesse, zum anderen in Ausschlussverfahren. Die Sorptionsprozesse wie Normalphasen-, Umkehrphasen-, Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie, werden als digitale chromatographische Verfahren bezeichnet (Kromidas and Kuss, 2008), da nur bestimmte Komponenten der mobilen Phase mit der stationären Phase interagieren. Gebundene Komponenten können dann durch verschiedene Einflüsse wie die Änderung von pH-Wert, Ionenstärke oder der Einsatz von Strukturanaloga von der stationären Phase wieder eluiert werden. Unter den Oberbegriff der Ausschlussverfahren fallen die Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography = SEC), Ionenausschlusschromatographie (ion exclusion chromatography = IEC), Gelfiltrationschromatographie (GFC) und die Gelpermeationschromatographie (GPC). Alle Komponenten der mobilen Phase durchwandern die stationäre Phase und werden nicht fest an diese gebunden, sondern erfahren über die Wechselwirkungen mit der stationären Phase eine Retention. Bei der SEC beispielsweise durchwandern Moleküle mit Durchmessern oberhalb des Porendurchmessers der porösen stationären Phase den Zwischenkornraum der stationären Phase sehr schnell. Je kleiner der Partikeldurchmesser der Moleküle ist, desto stärker können sie auch die Porenvolumina der Partikel nutzen und die Partikel immer tiefer durchdringen. Die Diffusion der Moleküle in die Partikelporen ist ein langsamer Prozess und unabhängig von der Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase. Mit sinkendem Moleküldurchmesser sinkt die Geschwindigkeit, mit welcher die Moleküle die stationäre Phase durchwandern. Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle haben Komposition der mobilen Phase, Eigenschaften der stationären Phase, Temperatur und Flussrate der mobilen Phase (Kromidas and Kuss, 2008; Schmidt-Traub et al., 2005; Tanaka and Ishizuka, 1979).

## 4.2 Adsorptionsisothermen für die Chromatographie

Bindungsuntersuchungen mit Modellproteinen der Molke wurden mit den Materialien EX M 1221 (Bentonit/Silica), EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid), EX M 1991 (Siliziumoxid) und EX M 1998 (Siliziumoxid/ $\gamma$ -Aluminiumoxid) durchgeführt. Bei den drei erstgenannten Adsorbentien handelt es sich um Adsorbentien in Pulverform, das Adsorbens EX M 1998 lag in Granulatform vor. Bei dem Adsorbens EX M 1998 handelt es sich um ein Mischmaterial aus 61,9 %  $\gamma$ -Aluminiumoxid und 38,1 % Siliziumoxid. An das Material EX M 1221, ein Bentonit/Silica mit einem Partikeldurchmesser größer  $45 \mu\text{m}$ , können sowohl ALA als auch BLG binden. Die für das Protein ALA ermittelte Maximalbeladung  $q_{\text{max}}$  beträgt  $78 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$ . Für BLG wurde die Maximalbeladung zu  $127 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$  bestimmt. Beide Proteine erreichen ihre Maximalbeladung bereits bei Proteinkonzentrationen um

$2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Die Gleichgewichtskonstante von Adsorption zu Desorption  $K_L$  liegt für ALA mit  $6,59 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$  deutlich höher als für BLG mit  $2,32 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$  (Abb. 4.1).

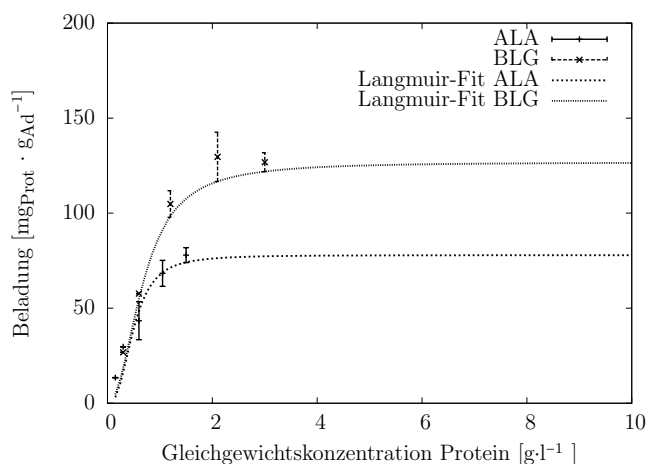


Abbildung 4.1: Adsorptionsisothermen von ALA und BLG an EX M 1221 (Bentonit/Silica), 10 mg Adsorbens, 30 min Inkubation im Überkopfschüttler bei 25 rpm und Raumtemperatur, 1 ml Proteinlösung, 2 ml Eppendorf-Cup

Beide Proteine besitzen somit eine hohe Affinität zu dem Adsorbens aus Bentonit/Silica. Für Materialien aus Bentonit/Silica werden sehr viele mögliche Mechanismen der Wechselwirkung mit Proteinen beschrieben (s. Kap. 2.4.1). Den geringsten Einfluss dürften die elektrostatischen Wechselwirkungen haben. Der Nullladungspunkt von Materialien aus Bentonit/Silica liegt zwischen pH-Werten von 1,8 und 2,5. Die Oberflächen der Adsorbentien aus Bentonit/Silica tragen bei einem pH-Wert von 6 folglich eine negative Gesamtladung. Das Adsorbens aus Bentonit/Silica ist bei diesem pH-Wert somit als Kationentauscher zu betrachten. Die Molkeproteine ALA und BLG liegen bei diesem pH-Wert als Anionen vor (s. Kap. 2.1.2). In Bezug auf elektrostatische Wechselwirkungen werden folglich repulsive elektrostatische Kräfte gegenüber elektrostatischen adsorptiven Kräften überwiegen. Für das "weiche" Protein ALA (Nakanishi et al., 2001) sind Entropie getriebene Konformationsänderungen maßgeblich für die Adsorption verantwortlich. Diese ermöglichen es ALA über sonst im Molekülinneren befindliche hydrophobe Gruppen mit dem Adsorbens wechselzuwirken. BLG besitzt im Gegensatz zu ALA einen starken hydrophoben Charakter (Kontopidis et al., 2004) und kann somit wesentlich stärker an das Adsorbens aus Bentonit/Silica adsorbieren als ALA. Als einziges der in diesem Abschnitt betrachteten Adsorbentien besitzt EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) bei pH-Werten um 6 eine positive Oberflächenladung. Der Nullladungspunkt des Materials liegt zwischen pH-Werten von 8,0 und 9,6 (s. Kap. 2.4.3). Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Adsorbensoberfläche und den anionischen Proteinen sorgen für eine hohe Proteinadsorption. Beide Proteine sind in vergleichbarem Umfang in der Lage, an das Material EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid zu adsorbieren. Dieses Material besitzt die höchsten in dieser Arbeit ermittelten Werte für die Maximalbeladung der Molkeproteine ALA und BLG. Für ALA wurde die Maximalbeladung zu  $363 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$  bestimmt. Die Maximalbeladung für BLG liegt bei  $345 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$ . Die Maximalbeladungen der

## 4.2 Adsorptionsisothermen für die Chromatographie

Proteine werden allerdings erst bei Proteinkonzentrationen über  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der Langmuirkurve erreicht. Die Unterschiede in der Gleichgewichtskonstanten  $K_L$  sind nur sehr gering, für ALA beträgt diese  $0,39 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$ , für BLG  $0,48 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$ . Die Affinität der Proteine zu dem Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid liegt damit deutlich unter jener zum Adsorbens aus Bentonit/Silica (Abb. 4.2).

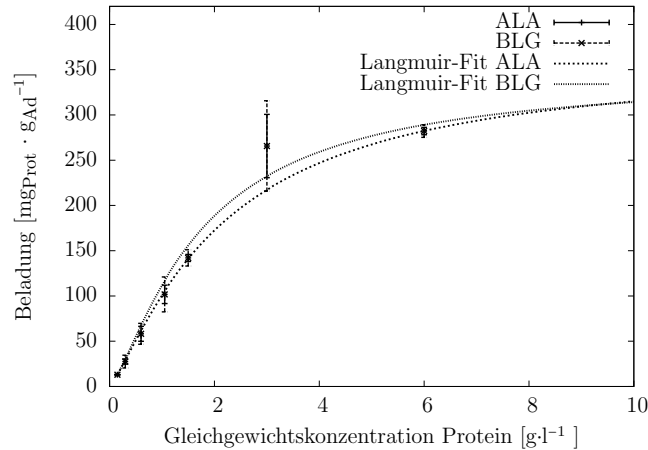


Abbildung 4.2: Adsorptionsisothermen von ALA und BLG an EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid), 10 mg Adsorbens, 30 min Inkubation im Überkopfschüttler bei 25 rpm und Raumtemperatur, 1 ml Proteinlösung, 2 ml Eppendorf-Cup

Im Gegensatz zu den Adsorbentien aus Bentonit/Silica und reinem  $\gamma$ -Aluminiumoxid kann für EX M 1991, einem Adsorbens aus reiner Fällungskieselsäure, keine Adsorption von ALA beobachtet werden (Abb. 4.3).

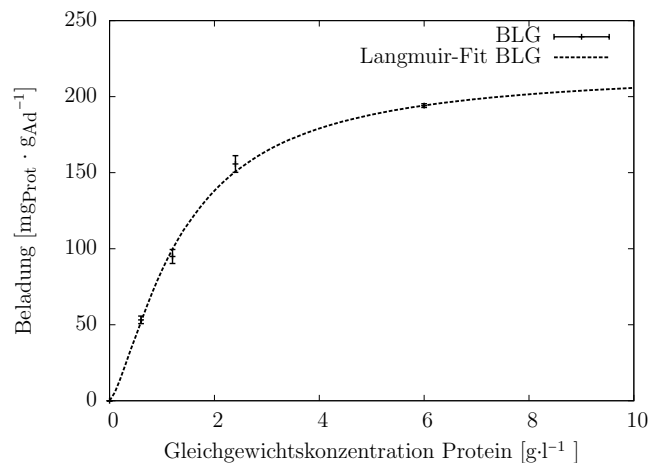


Abbildung 4.3: Adsorptionsisothermen BLG an EX M 1991 (Fällungskieselsäure), 10 mg Adsorbens, 30 min Inkubation im Überkopfschüttler bei 25 rpm und Raumtemperatur, 1 ml Proteinlösung, 2 ml Eppendorf-Cup

Die repulsiven Kräfte der stark negativ geladenen Partikeloberfläche bei pH-Werten um 6 (Kosmulski, 2009) können von ALA nicht durch hydrophobe Wechselwirkungen überwunden werden. Das stark hydrophobe BLG hingegen ist in der Lage die repulsiven elektrostatischen Kräfte auf der Oberfläche des Adsorbens mittels hydrophober Wechselwirkungen zu überwinden und an das Adsorbens zu binden. Für BLG beträgt die Maximalbeladung  $218 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$ . Ihr geringerer Wert im Vergleich zu dem Material aus reinem  $\gamma$ -Aluminiumoxid erklärt sich dadurch, dass die Bindung durch hydrophobe Kräfte vermittelt und gleichzeitig durch elektrostatische Wechselwirkungen behindert wird. Die Gleichgewichtskonstante  $K_L$  für BLG und das Material aus Fällungskieselsäure beträgt 0,65. Die Affinität von BLG zu dem Material aus Fällungskieselsäure liegt somit über jener zum Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid, aber deutlich unter jener zu dem Material aus Bentonit/Silica. Als weiteres Mischphasenadsorbens wurde das Adsorbens EX M 1998 untersucht. Dieses besteht zu 61,9 % aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid und zu 38,1 % aus Siliziumoxid. Es handelt sich im Gegensatz zu den bisher betrachteten Adsorbentien nicht um ein Pulver, sondern um ein Granulat mit einer Partikelgrößenverteilung zwischen 0,59 und 1,01 mm. Mit  $425 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  weisen Schüttungen des Granulats EX M 1998 eine im Vergleich zu den Schüttungen der zuvor untersuchten Adsorbentien sehr große BET-Oberfläche auf. Der Porendurchmesser besitzt hingegen mit 76 Å im Vergleich den geringsten Wert. Das Partikel besteht zu knapp 40 % aus Siliziumoxid, somit befindet sich auf seiner Oberfläche eine Mischung von Aluminium-Silizium-Oxid und Siliziumoxid (s. Abb. 2.6). EX M 1998 zeigt deutlich das Verhalten eines Partikels aus reinem  $\text{SiO}_2$ . Ebenso wie bei reinem Siliziumoxid kann keine Adsorption von ALA beobachtet werden. Der Nullladungspunkt von Materialien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid und Siliziumoxid liegt mit zunehmendem Siliziumoxidanteil immer näher bei dem des reinen Siliziumoxids. So liegt er bei einem Anteil von 30 %  $\text{Al}_2\text{O}_3$  bereits bei pH 4,6. Somit trägt auch dieses Adsorbens bei pH 6 eine negative Oberflächenladung. Trotz der großen BET-Oberfläche von Schüttungen des Mischadsorbens adsorbieren nur 109 mg BLG pro Gramm Adsorbens (Abb. 4.4).

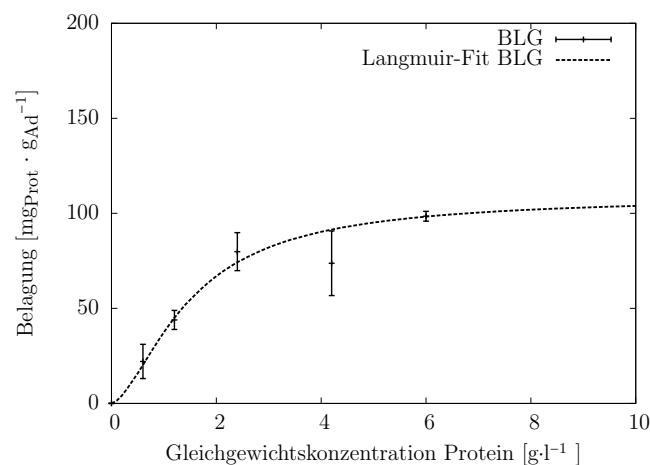


Abbildung 4.4: Adsorptionsisotherme von BLG an EX M 1998 ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  /  $\text{SiO}_2$ ), 10 mg Adsorbens, 30 min Inkubation im Überkopfschüttler bei 25 rpm und Raumtemperatur, 1 ml Proteinlösung, 2 ml Eppendorf-Cup

Auch die Gleichgewichtskonstante ist mit 0,52 jener des Adsorbens aus Fällungskieselsäure



## 4.2 Adsorptionsisothermen für die Chromatographie

mit 0,65 sehr ähnlich. Die Maximalbeladung der Mischphase aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid und Siliziumoxid (EX M 1998) liegt mit  $109 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$  deutlich unter jener des reinen Siliziumoxids (EX M 1991) mit  $218 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$ . Somit bietet das Adsorbens EX M 1998 weder in Selektivität hinsichtlich der Adsorption noch in seiner Maximalbeladung oder der Affinität von BLG ihm gegenüber einen Vorteil gegenüber dem Adsorbens aus reinen Siliziumoxid (EX M 1991). Abschließend sind die Kapazitäten und Charakteristika der untersuchten Adsorbentien in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Übersicht über die statisch untersuchten Adsorbentien und deren Eigenschaften aus Datenblättern der Süd-Chemie AG und Messungen an der TU Kaiserslautern

Adsorbens	Material	BET Oberfl. [ $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ]	BJH-Porendurchmesser [Å]	Maximalbeladung [ $\text{mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$ ]	$K_L$ [ $\text{l} \cdot \text{g}^{-1}$ ]
EX M 1221	Bentonit/ Silica	218	134	ALA 78 BLG 127	ALA 6,59 BLG 2,32
EX M 1986	$\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	160	172	ALA 363 BLG 345	ALA 0,39 BLG 0,48
EX M 1991	Fällungs- kieselsäure	172	325	ALA - BLG 218	ALA - BLG 0,65
EX M 1998	61,9% $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 38,1% $\text{SiO}_2$	425	76	ALA - BLG 109	ALA - BLG 0,52

Es ist zu erkennen, dass EX M 1221 unter den betrachteten Adsorbentien die höchsten Gleichgewichtskonstanten zwischen Adsorption und Desorption  $K_L$  aufweist, die Proteine ALA und BLG also eine hohe Affinität zum Material aus Bentonit Silica besitzen. Die Maximalbeladungen des Materials mit den Proteinen ALA und BLG sind im Vergleich mit den anderen untersuchten Adsorbentien jedoch verhältnismäßig gering. Die Gleichgewichtskonstanten der restlichen betrachteten Adsorbentien befinden sich in einem ähnlichen Bereich um 0,5, die Affinitäten der Proteine ALA und BLG sind für alle diese Materialien also wesentlich geringer als für das Material aus Bentonit/Silica. Trotz kleinster BET-Oberfläche und geringen  $K_L$ -Werten zeigt EX M 1986 die höchste Maximalbeladung für beide Proteine. EX M 1991 und EX M 1998 hingegen binden in diesen Versuchen lediglich BLG in nennenswertem Umfang. Hierbei ist auch zu erkennen, dass das Mischphasenadsorbens EX M 1998 (61,9 %  $\gamma$ -Aluminiumoxid, 38,1 % Siliziumoxid) im Vergleich zum Adsorbens aus reiner Fällungskieselsäure, EX M 1991, trotz deutlich höherer BET-Oberfläche signifikant weniger Protein maximal binden kann.

## 4.3 Proteinadsorption in der Kleinsäule

### 4.3.1 Proteinadsorption mit Modellproteinen

Basierend auf den Ergebnissen der Adsorptionsisothermen (Kapitel 4.2) wurden die Pulver in der Kleinsäule weiter untersucht. Die Pulveradsorbentien EX M 1221 (Bentonit/Silica) und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) wurden in eine BioRad Uno1 Säule gepackt und mit Modellproteinlösungen aus ALA, BLG und einem Gemisch der beiden Proteine beladen sowie anschließend eluiert. Für Pulver aus reiner Fällungskieselsäure, wie das Material EX M 1991, ist dies nicht möglich, da sich aus diesem Material kein stabiles Bett aufbauen lässt. Es kam bei diesem Pulver aus Fällungskieselsäure bereits bei der Equilibrierung der Säule zu starken Bettkompressionen. Dieses Verhalten setzte sich auch nach mehrfachem Auffüllen des Säulenbettes mit weiterem Adsorbens fort. Letztlich kam es unter weiterer Bettkompression zum Verblocken der Säule. Ein wichtiges Kriterium in der Chromatographie ist die Auflösung einer Säule. Sie ist ein Maß für die Selektivität eines Materials hinsichtlich der Trennung zweier Analyte. Für die Auflösung  $R$  (Berechnung nach Gleichung 3.12) wird ein Wert zwischen 1,5 und 2,0 angestrebt. Diesen erreicht eine Säule gepackt mit dem Material EX M 1221 aus Bentonit/Silica mit einem aus den Peaks der Modellproteine ALA und BLG berechneten Wert von  $R = 1,27$  nicht. Das Material besitzt folglich keine gute Selektivität hinsichtlich der Proteine ALA und BLG. Der Peak des Proteins ALA liegt bei einer Retentionszeit von 9,48 min und zeigt ein deutliches Tailing, wie in Abb. 4.5 zu erkennen ist.

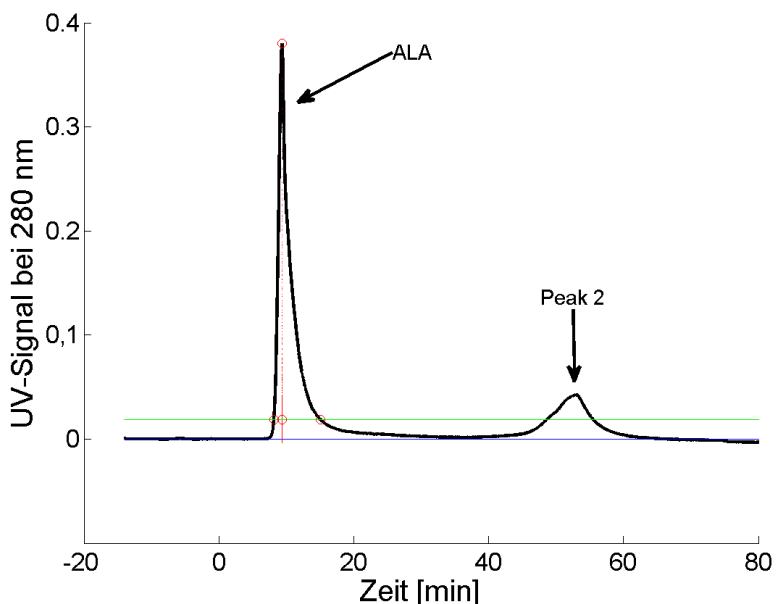


Abbildung 4.5: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 1,5 mg ALA in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1221, Flussrate:  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Zeitpunkt  $t=0$  Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf  $1/20$  Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe

Eine Möglichkeit der Beschreibung und des Vergleichs von Peakasymmetrien wie Tailing oder Fronting ist über den Tailingfaktor gegeben. Auch dieser Wert kann aus dem Chromatogramm ermittelt werden. Ein Tailingfaktor (Berechnung nach Gleichung 3.17) von  $T_{\text{USP}} = 1$  beschreibt einen symmetrischen Peak, wohingegen kleinere bzw. größere Werte auf ein Fronting bzw. Tailing des Peaks hindeuten. Der Peak des Proteins ALA bei dessen Elution von dem Material aus Bentonit/Silica zeigt mit einem ermittelten Tailingfaktor  $T_{\text{USP}} = 2,99$  ein deutliches Tailing. Die Weite des Elutionspeaks von ALA und EX M 1221 (Bentonit/Silica) beträgt 0,68 min und die theoretische Trennstufenanzahl des Materials wurde für ALA zu 27,36 berechnet. Ein Maß für die Trennschärfe eines Materials ist der axiale Dispersionskoeffizient. Er gibt an, wie stark ein Analyt bei seinem Durchgang durch eine Säule Effekten unterworfen ist, welche zu seiner Verteilung über den Verlauf des Durchgangs durch die Säule führen. In einer Säule, gepackt mit dem Adsorbens EX M 1221, wurde die axiale Dispersion für ALA zu einem Wert von  $30,0 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  bestimmt. Ein im Vergleich zu dem eben betrachteten Peak von ALA gegenteiliges Verhalten zeigt der Peak des Proteins BLG in der Säule gepackt mit dem Material EX M 1221 aus Bentonit/Silica. Der Peak von BLG weist ein Fronting auf, welches außer in Abb. 4.6 auch deutlich an dem bestimmten Tailingfaktor mit  $T_{\text{USP}} = 0,848$  zu erkennen ist.

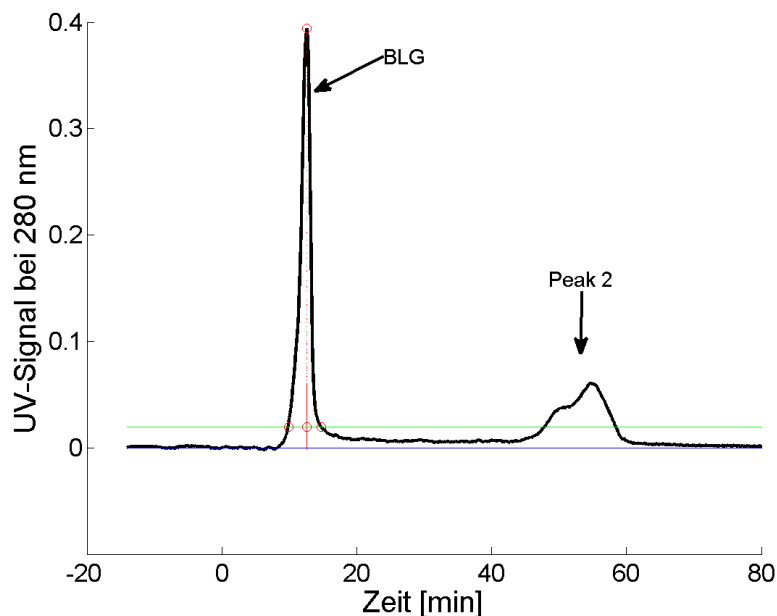


Abbildung 4.6: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1221, Flussrate:  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Zeitpunkt  $t=0$  Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf  $1/20$  Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe

Der Elutionspeak von BLG verlässt die Säule gepackt mit EX M 1221 (Bentonit/Silica) nach 12,75 min, in seiner Breite misst er 1,55 min. Die gemeinsame Injektion der Modellproteine ALA und BLG führt zu einem einzigen Peak, das Proteingemisch aus ALA und BLG verlässt die Säule nach 9,58 min. Dieser Wert liegt zwischen den Werten, welche für die Einzelinjektionen der Proteine gemessen wurden. Mit 1,62 min weist der Peak der

gemeinsamen Injektion von ALA und BLG die bisher höchste Breite auf (Abb. 4.7).

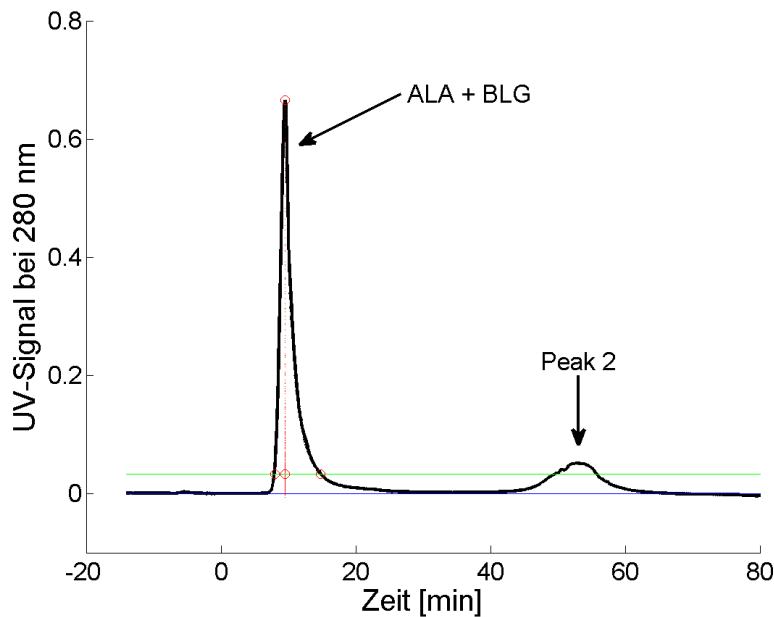


Abbildung 4.7: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung eines Gemischs aus 1,5 mg ALA und 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1221, Flussrate:  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Zeitpunkt  $t=0$  Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf  $1/20$  Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe

Die Anzahl der theoretischen Trennstufen mit einem Wert von 35,26 liegt näher an dem niedrigen Wert von ALA ( $N_j = 27,36$ ) und eine Trennung der Proteine in 2 Peaks ist nicht erkennbar. Die resultierende Peakfläche stellt im Rahmen der Fehlertoleranz die Summe der Flächen der Peaks der einzelnen Proteine dar. Eine Übersicht über die Parameter der Elutionspeaks der Modellproteine ALA und BLG in einer Säule gepackt mit EX M 1221 ist in Tab. 4.2 gegeben.

Tabelle 4.2: Parameter der Peaks von Modellproteinen und EX M 1221 in der Uno1 Säule. Retentionszeit der Proteine  $t_{\text{ret}}$ , Tailingfaktor nach USP  $T_{\text{USP}}$ , Peakweite auf halbem Peakmaximum  $w_h$ , Peakfläche  $A$ , theoretische Trennbodenanzahl  $N_i$  und axialer Dispersionskoeffizient  $D_{\text{ax}}$

	<b>ALA</b>	<b>BLG</b>	<b>ALA + BLG</b>
$t_{\text{ret}}[\text{min}]$	9,48	12,75	9,58
$T_{\text{USP}}$	2,99	0,85	2,24
$w_h [\text{min}]$	1,48	1,55	1,62
$A$	40,87	37,87	73,1
$N_j$	27,36	292,54	35,26
$D_{\text{ax}}[\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$	30,00	2,81	23,33

Von einer vollständigen Elution kann in jedem der gezeigten Fälle ausgegangen werden. Für BLG ist die Anzahl der theoretischen Trennstufen  $N_j$  mit 292,54 deutlich höher als für ALA mit 27,36. Die theoretische Trennbodenzahl ist ein Indikator für die Effizienz des Materials (Kromidas and Kuss, 2008). Die Effizienz des Materials aus Bentonit/Silica (EX M 1221) ist somit höher für das Protein BLG als für ALA. Dies ist auch an dem ermittelten Wert für die axiale Dispersion von BLG in EX M 1221 zu erkennen. Der Wert für die axiale Dispersion ist mit 2,81 für BLG geringer als jener für ALA mit 30,0. Die Werte für die theoretische Trennbodenzahl und die axiale Dispersion deuten darauf hin, dass das Protein BLG über hydrophobe Wechselwirkungen stärker in der Lage ist mit dem Material aus Bentonit/Silica zu interagieren als das Protein ALA, dessen Interaktionen maßgeblich durch Entropie bedingte Konformationsänderungen vermittelt werden. Weder Selektivität noch Effizienz des Materials aus Bentonit/Silica sind jedoch für eine Trennung der Proteine ALA und BLG in der Uno1 Säule ausreichend. Daraus lässt sich abschätzen, dass weder eine Aufskalierung der Säule, noch eine Veränderung des Elutionsgradienten zu nennenswerten Verbesserungen führen werden. Allen Injektionen ist ein Effekt gegen Ende der Elution bei ca. 55 min gemein. Es tritt ein Peak geringer Höhe auf (beschrieben als Peak 2 in den Abb. 4.5, 4.6, 4.7), der durch das Ausbluten des Adsorbens entsteht. In den Peaks können keine nennenswerten Mengen an Protein mittels HPLC und SDS-PAGE nachgewiesen. Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass NaOH ist in der Lage, Bentonite anzugreifen (Jozefaciuk and Bownako, 2002).

Bei Versuchen mit dem experimentellen Material EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid verließ ALA die Säule bei 12,33 min (Abb. 4.8).

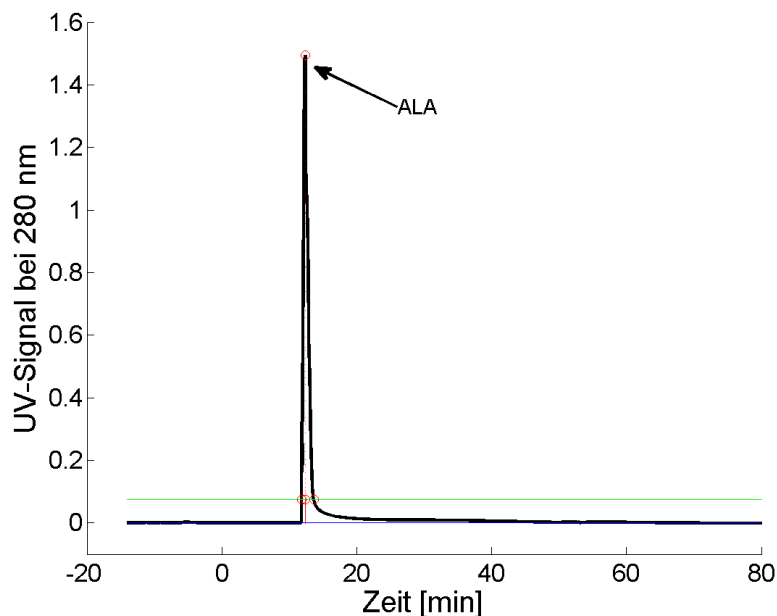


Abbildung 4.8: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 1,5 mg ALA in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1986, Flussrate:  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , Zeitpunkt  $t=0$  Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf  $1/20$  Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe

#### 4 Chromatographie

Der Peak ist im Gegensatz zu den Peaks der Molkeproteine in einer Säule gepackt mit dem Material EX M 1221 aus Bentonit/Silica mit 0,68 min sehr schmal. Darüber hinaus weist der Peak von ALA in der Säule gepackt mit dem Adsorbens EX M 1986 ein starkes Tailing auf. Der Tailingfaktor nach USP beträgt für das Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid und ALA 2,56. Sowohl die hohe Anzahl der theoretischen Trennböden mit einem Wert von 824 als auch der kleine axiale Dispersionskoeffizient mit einem Wert von  $1,09 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  deuten auf eine hohe Effizienz des Materials in seiner Wechselwirkung mit dem Molkeprotein ALA hin. BLG zeigt ein dem ALA sehr ähnliches Verhalten in Versuchen mit dem Material EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid. Es verlässt die Chromatographiesäule nach 12,18 min und somit nur geringfügig früher als ALA (Abb. 4.9).

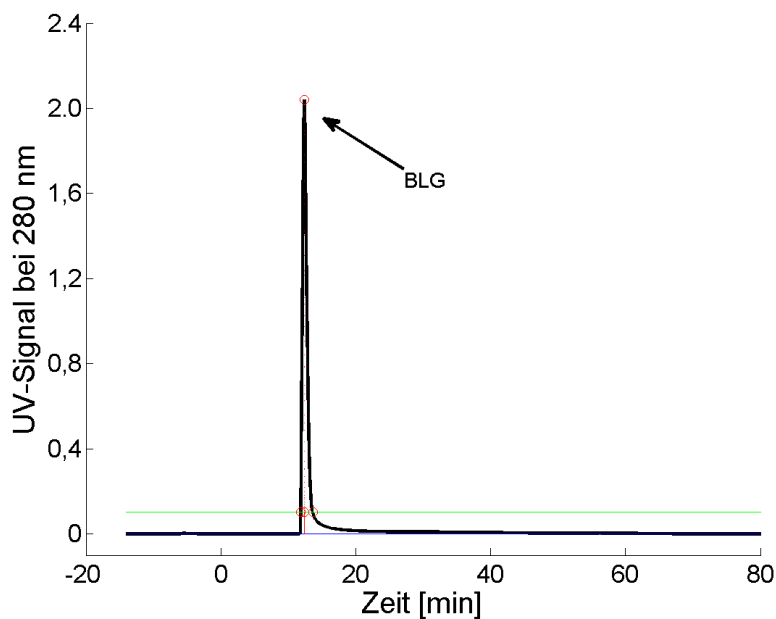


Abbildung 4.9: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1986, Flussrate:  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Zeitpunkt  $t=0$  Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf  $1/20$  Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe

Mit einem Tailingfaktor von 2,35 weist auch der Peak von BLG und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) ein starkes Tailing auf. Ebenso wie bei dem Adsorbens EX M 1221 aus Bentonit/Silica ist auch für das Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) die theoretische Trennbodenanzahl für BLG mit 1407 höher als für das Protein ALA. Die Peakweite ist für das Protein BLG mit 0,67 min im Rahmen der Messfehler identisch mit der Peakweite des Proteins ALA mit 0,68 min. Das Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid erreicht für die Molkeproteine ALA und BLG einen Trennfaktor von  $T = 0,13$ . Es besitzt somit zwar eine geringe Selektivität (erkennbar am Trennfaktor), aber eine hohe Effizienz (erkennbar an der theoretischen Trennbodenanzahl und daraus abgeleiteter Parameter) für die Proteine ALA und BLG. Eine Übersicht über die Parameter der Elutionspeaks der Modellproteine ALA und BLG in einer Säule gepackt mit EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) ist in Tab. 4.3 gegeben.

Tabelle 4.3: Parameter der Peaks von Modellproteinen und EX M 1986 in der Uno1 Säule. Retentionszeit der Proteine  $t_{\text{ret}}$ , Tailingfaktor nach USP  $T_{\text{USP}}$ , Peakweite auf halbem Peakmaximum  $w_h$ , Peakfläche  $A$ , theoretische Trennbodenanzahl  $N_i$  und axialer Dispersionskoeffizient  $D_{\text{ax}}$

	ALA	BLG	ALA + BLG
$t_{\text{ret}}$ [min]	12,33	12,18	12,62
$T_{\text{USP}}$	2,56	2,35	2,12
$w_h$ [min]	0,68	0,67	0,70
$A$	77,23	101,30	83,19
$N_j$	824	1407	810
$D_{\text{ax}}$ [cm <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	1,09	0,68	1,12

Wie für EX M 1221 (Bentonit/Silica) kann auch für das experimentelle Material EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid kein hinreichender Trennfaktor für die Modellproteine ALA und BLG erreicht werden, die Retentionszeiten der Peaks der Einzelproteine (ALA 12,33 min, BLG 12,18 min) und des Gemischs (12,62 min) liegen sehr dicht beieinander. Alle Peaks zeigen ein deutliches Tailing mit Tailingfaktoren nach USP von 2,56 für ALA, 2,35 für BLG und 2,12 für das Gemisch der beiden Proteine (Abb.4.10).

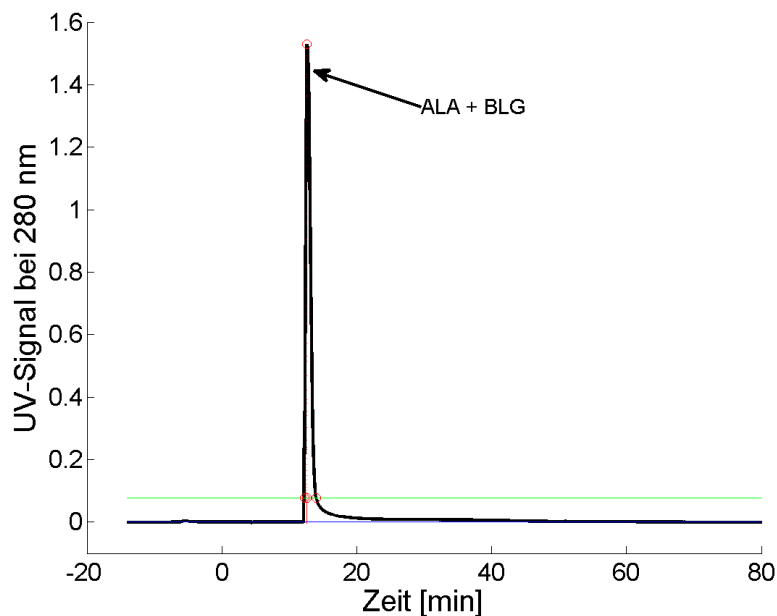


Abbildung 4.10: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung eines Gemischs aus 1,5 mg ALA und 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1986, Flussrate: 1 ml·min<sup>-1</sup>, Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf 1/20 Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe

Die Anzahlen der theoretischen Trennstufen liegen mit 824 für ALA, 1407 für BLG und

810 für das Gemisch der Modellproteine deutlich über denen des Materials EX M 1221. Ebenso wie auch für das Material EX M 1221 kann bei EX M 1986 eine höhere Anzahl an theoretischen Trennböden für BLG berechnet werden, deren Anzahl für das Gemisch liegt wiederum zwischen den Werten von reinem ALA und reinem BLG. Die axiale Dispersion, ein Maß für die Effizienz des Materials, ist mit  $1,12 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  deutlich geringer als für das Material EX M 1221 mit  $23,33 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Dies bedeutet, das Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) besitzt eine höhere Effizienz hinsichtlich der Molkeproteine als das Material aus Bentonit/Silica (EX M 1221). Bei der gemeinsamen Injektion von ALA und BLG wurden auf Grund der kleinen Peakweiten und der damit verbundenen großen Peakhöhen nur die halben Proteinmengen eingesetzt, um den Nachweisbereich des Detektors nicht zu verlassen. Auch für das Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid lässt sich bei der gemeinsamen Injektion von ALA und BLG wie bei EX M 1221 eine Peakverbreiterung im Gegensatz zu den Peaks der Einzelproteine beobachten. Da die berechnete Peakfläche der Hälfte der Summe der Flächen der Peaks der Einzelproteine entspricht kann daraus geschlossen werden, dass keine Auftrennung der Molkeproteine ALA und BLG in der verwendeten Säule mittels des Materials aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid stattfindet und beide Proteine zur selben Zeit eluiert werden. Im Gegensatz zu EX M 1221 (Bentonit/Silica) weist EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) jedoch eine hohe Effizienz auf, was eine Aufskalierung der Säule und Veränderung des Elutionsgradienten als vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der Trennung der Proteine nahe legt.

### 4.3.2 Vergleich mit kommerziellem Adsorbens

Als Referenz- und Benchmarksystem diente ein Adsorbens der Firma Pall (Pall GmbH, Dreieich). Hierbei handelt es sich um ein poröses keramisches Partikel mit einem Durchmesser von 0,05 mm, gefüllt mit einem Anionentauscherhydrogel. Das kommerzielle Referenz- und Benchmarkadsorbens PallQ HyperD F adsorbiert in Versuchen in der BioRad Uno1 Säule von eingesetzten 1,5 mg ALA nur 40 % des aufgetragenen Proteins. Der überwiegende Teil der Injektion (60 %) passiert die Säule im Durchbruch und wird in Abb. 4.11 als Peak 1 bezeichnet. Der Elutionspeak von ALA verlässt die Säule bei einer Retentionszeit von 23,30 min. Also wesentlich später als für die experimentellen Süd-Chemie Adsorbens EX M 1221 aus Bentonit/Silica mit 9,48 min und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) mit 12,33 min. Auch bei PallQ HyperD F tritt ein Tailing im Elutionspeak von ALA auf. Der Tailingfaktor nach USP liegt jedoch mit 1,46 deutlich unter den Werten der Adsorbentien EX M 1221 (Bentonit/Silica) mit 2,99 und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) mit 2,56. Verglichen mit den Peakweiten der experimentellen Adsorbentien der Süd-Chemie AG mit 1,48 min für EX M 1221 (Bentonit/Silica) und 0,68 min für EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) ist die Weite des Elutionspeaks von ALA für das kommerzielle Adsorbens PallQ HyperD F mit 5,70 min erstaunlich hoch. Die Anzahl der für das Material PallQ HyperD F ermittelten theoretischen Trennstufen liegt bei 18,47. Dieser Wert liegt deutlich unter den Werten der experimentellen Adsorbentien EX M 1221 (Bentonit/Silica) mit 27,36 und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) mit 824. Entsprechend hoch ist auch die axiale Dispersion des Adsorbens PallQ HyperD F für ALA mit  $16,81 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ . Bei den experimentellen Süd-Chemie Adsorbentien EX M 1221 (Bentonit/Silica) und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) lag diese für ALA bei  $30,00 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  bzw.  $1,09 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ . Die Adsorption und Elution von ALA an bzw. von dem kommerziellen Adsorbens PallQ HyperD F ist in Abb. 4.11 dargestellt.



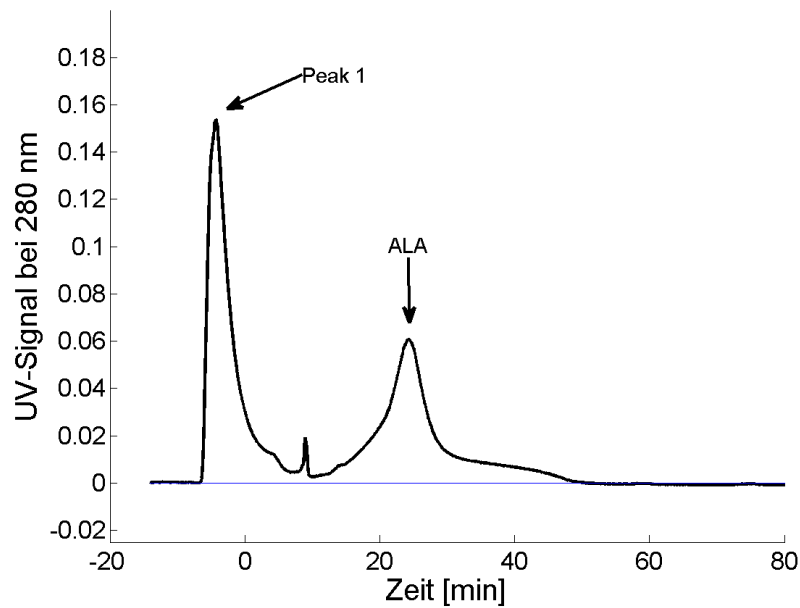


Abbildung 4.11: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 1,5 mg ALA in einer Uno1 Säule, Material: PallQ HyperD F, Flussrate:  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Zeitpunkt  $t=0$  Beginn der Elution

Im Gegensatz zu ALA bindet BLG vollständig an PallQ HyperD F (Abb. 4.12).

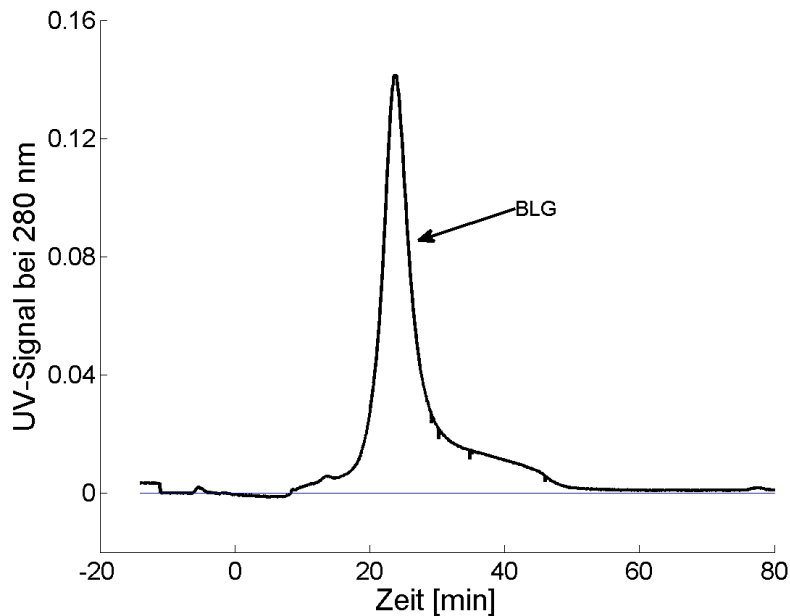


Abbildung 4.12: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: PallQ HyperD F, Flussrate:  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Zeitpunkt  $t=0$  Beginn der Elution

Bei diesem Protein lässt sich kein Proteinsignal im Durchbruch beobachten. BLG eluiert von

dem Adsorbens PallQ HyperD F bei einer Retentionszeit von 23,67 min, also geringfügig später als ALA, das mit einer Retentionszeit von 23,30 min von der Säule eluiert. Der Elutionspeak von BLG weist dabei ein starkes Tailing auf. Der Tailingfaktor liegt mit 2,13 deutlich unter den Werten der Adsorbentien EX M 1221 (Bentonit/Silica) mit 2,99 und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) mit 2,56. Auch BLG eluiert somit weit später von dem kommerziellen Adsorbens PallQ HyperD F als von den Adsorbentien EX M 1221 aus Bentonit/Silica mit 9,48 min und EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid mit 12,33 min. Das Gemisch der Proteine ALA und BLG zeigt in Summe dasselbe Verhalten wie seine Einzelproteine (Abb. 4.13).

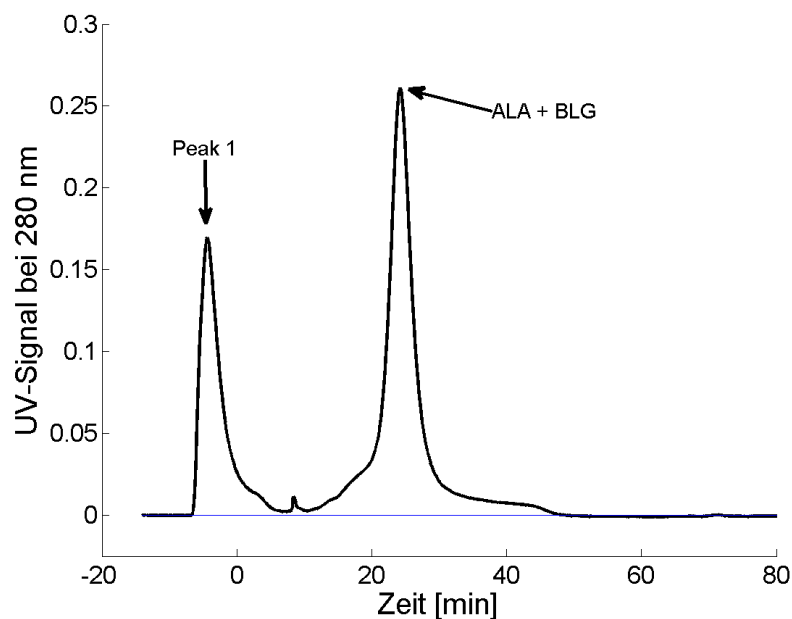


Abbildung 4.13: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung eines Gemischs aus 1,5 mg ALA und 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: PallQ HyperD F, Flussrate:  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Zeitpunkt  $t=0$  Beginn der Elution

Für das Gemisch aus 1,5 mg ALA und 3,0 mg BLG kann wie für reines BLG eine vollständige Bindung des eingesetzten BLG an PallQ HyperD F beobachtet werden. Wie auch für reines ALA verlassen 60 % des eingesetzten ALA hingegen die Säule im Durchbruch ohne an das Säulenmaterial zu adsorbieren. 40 % des eingesetzten ALA eluieren in einem gemeinsamen Peak mit BLG von der Säule gepackt mit dem kommerziellen Adsorbens PallQ HyperD F. Eine Auftrennung der betrachteten Proteine ALA und BLG ist in dieser Säule befüllt mit dem kommerziellen Adsorbens PallQ HyperD F in einem linearen Elutionsgradienten aus 0,5 M NaOH und 1,0 M NaCl somit nicht möglich. Aus den Retentionszeiten und Peakweiten kann nach Gleichung 3.12 die Auflösung der Säule für die majoren Molkeproteine ALA und BLG berechnet werden. Sie liegt für das kommerzielle Adsorbens PallQ HyperD F bei 0,90, also unterhalb des angestrebten Wertes von 1,5 bis 2. Deutlich höher im Vergleich zu den experimentellen Adsorbentien EX M 1221 (Bentonit/Silica) mit  $23,33 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) mit  $0,68 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  ist der Wert für die axiale Dispersion mit 37,51. Dies bedeutet, dass nicht nur die Auflösung der Säule befüllt mit dem kommer-

ziellen Adsorbens PallQ HyperD F unterhalb des angestrebten Zielwertes liegt, sondern auch die Effizienz für eine Trennung der Proteine ALA und BLG nicht ausreicht. Im Vergleich mit dem kommerziellen Adsorbens PallQ HyperD F werden mit dem experimentellen Adsorbens EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) hinsichtlich der Effizienz bessere Ergebnisse erzielt. Eine Übersicht über die Parameter der Peaks der Modellproteine ALA und BLG und PallQ HyperD F ist in Tab. 4.4 gegeben.

Tabelle 4.4: Parameter des Peaks von Modellproteinen und PallQ HyperD F in der Uno1 Säule. Retentionszeit der Proteine  $t_{\text{ret}}$ , Tailingfaktor nach USP  $T_{\text{USP}}$ , Peakweite auf halbem Peakmaximum  $w_h$ , Peakfläche  $A$ , theoretische Trennbodenanzahl  $N_j$  und axialer Dispersionskoeffizient  $D_{\text{ax}}$

	ALA	BLG	ALA + BLG
$t_{\text{ret}}$ [min]	31,30	23,67	24,23
$T_{\text{USP}}$	1,46	2,13	0,67
$w_h$ [min]	5,70	4,33	3,50
$A$	20,63	41,58	61,06
$N_j$	18,47	25,00	19,59
$D_{\text{ax}}$ [cm <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	16,81	43,56	37,51

Eine Möglichkeit die Auflösung einer Säule zu beeinflussen besteht in der Variation des Elutionsgradienten. Ein Übergang zu einem flacheren Elutionsgradienten kann diese verbessern, was jedoch oftmals auch negative Auswirkungen auf die Effizienz hat. Eine Methode, diese zu umgehen, kann im Einsatz eines Stufengradienten bestehen. Hierbei ist die richtige Wahl der Gradientenstufen (Eluentkonzentrationen) entscheidend für den Trennerfolg. Für das kommerzielle Adsorbens PallQ HyperD F wurde ein Dreistufensystem mit einem Eluenten aus 50 mM Natriumacetatpuffer + 1 M NaCl pH 4,5 entworfen. Eine BioRad Uno 1 Säule mit einem Bettvolumen von 1,3 ml wurde bei 10 BV mit 2 BV Dünnmolke aus Ultralac 35 (UL35) beladen und anschließend mit 10 BV demineralisiertem Wasser gespült. Proteine des Durchbruchs waren 8 BV nach dem Ende der Beladung vollständig aus der Säule ausgetragen. Bei den Proteinen des Durchbruchs handelt es sich ausschließlich um Proteine hoher Molekülmassen wie Transferrin, Lactoferrin, Lactoperoxidase und BSA. Proteine niedriger Molekülmassen wie die majoren Molkeproteine ALA und BLG konnten in den Durchbruchproben nicht in signifikanten Mengen nachgewiesen werden. Bei der ersten Elutionsstufe 10 BV nach dem Ende der Beladung (8 % Eluent) konnte ein deutlicher Elutionspeak beobachtet werden. In Proben dieser Elutionsstufe wurde ausschließlich das majore Molkeprotein ALA nachgewiesen. Eine weitere deutliche Elution erfolgte in der zweiten Elutionsstufe 20 BV nach Ende der Beladung (20 % Eluent). Bei den im zweiten Elutionspeak nachgewiesenen Proteinen handelt es sich um die majoren Molkeproteine ALA und BLG. Auch bei der dritten Elutionsstufe 30 BV nach Ende der Beladung (100 % Eluent) konnte ein schmaler Elutionspeak beobachtet werden. Die Proteinkonzentrationen in diesem dritten Elutionspeak waren zu gering für eine Identifikation der enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE. Das Chromatogramm der Auftrennung der Molkeproteine mit PallQ HyperD F in einem Stufengradienten aus 50 mM Natriumacetatpuffer + 1 M NaCl ist in Abb. 4.14 dargestellt.

#### 4 Chromatographie

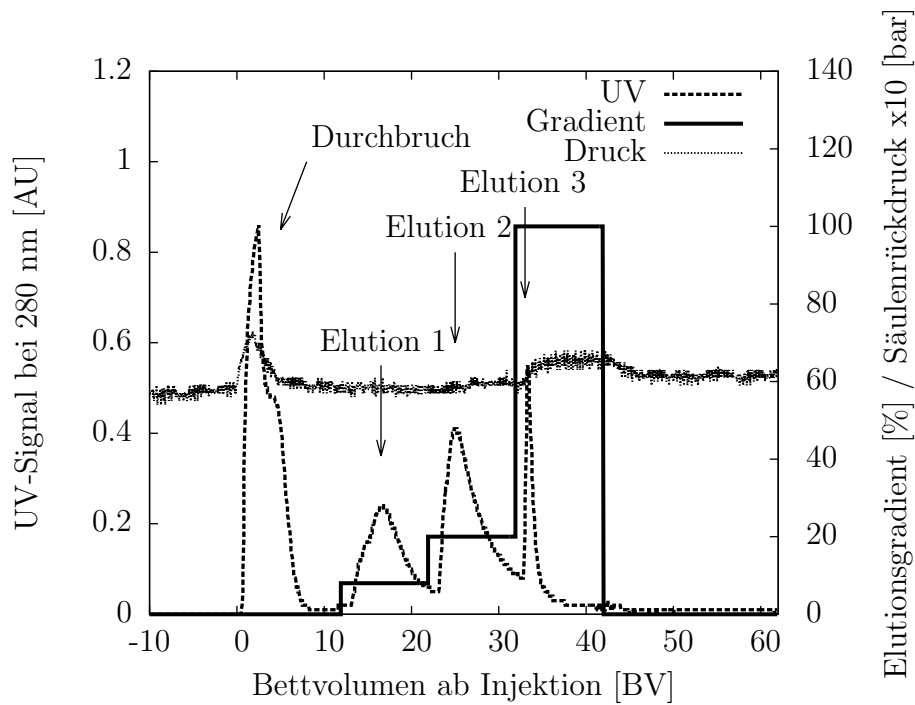


Abbildung 4.14: Chromatogramm zur Auftrennung von Molkeproteinen bei Raumtemperatur. Proteinquelle: Dünnmolke aus UL35, Adsorbens: PallQ HyperD F. Injektion von 2 BV Dünnmolke, Elutionen mit 8 %, 20 % und 100 % 50 mM Natriumacetatpuffer + 1 M NaCl zu je 10 BV

Der Nachweis der Einzelproteine in den Proben des Durchbruch in 3 ml Intervallen nach Injektion (D1 – D3) mittels SDS-PAGE ist in Abb. 4.15 dargestellt.

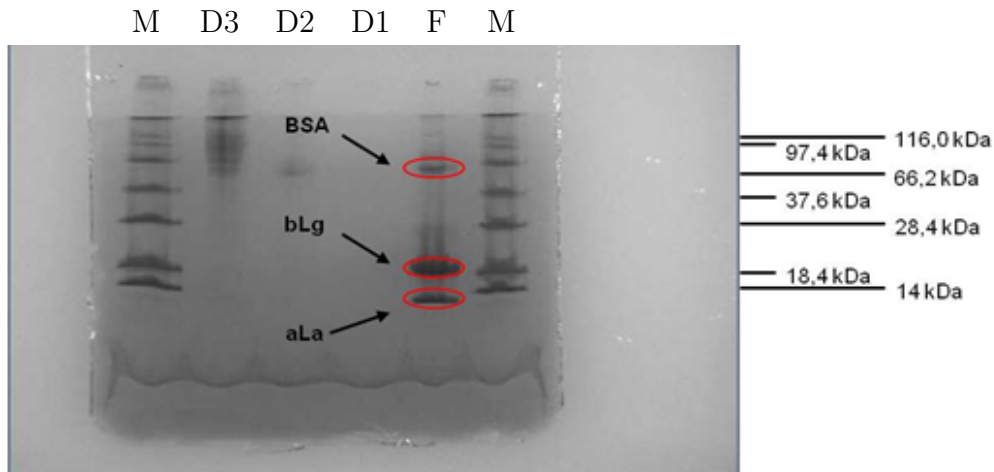


Abbildung 4.15: SDS-PAGE von Feed (F) und Durchbruchproben (D 1-3) der chromatographischen Aufreinigung von Molkeproteinen aus Molke, D 1 erstes Drittel des Durchbruchspeaks, D 2 Mitte des Durchbruchs, D 3 letztes Drittel des Durchbruchs

Von den Proteinen des Feeds (Molke aus UL35) sind zur besseren Orientierung die Banden der Proteine BSA, BLG und ALA rot hervorgehoben. Die Proteinkonzentrationen in der

ersten Durchbruchprobe (D1) waren zu gering für eine Identifikation der enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE. In den Durchbruchproben D2 und D3 sind Banden der Proteine Transferrin, Lactoferrin, Lactoperoxidase und BSA erkennbar, jedoch nicht der majoren Molkeproteine ALA und BLG. Der Nachweis der Einzelproteine in den Proben der Elution in 3 ml Intervallen nach Injektion (E1 – E3) mittels SDS-PAGE ist in Abb. 4.16 dargestellt.

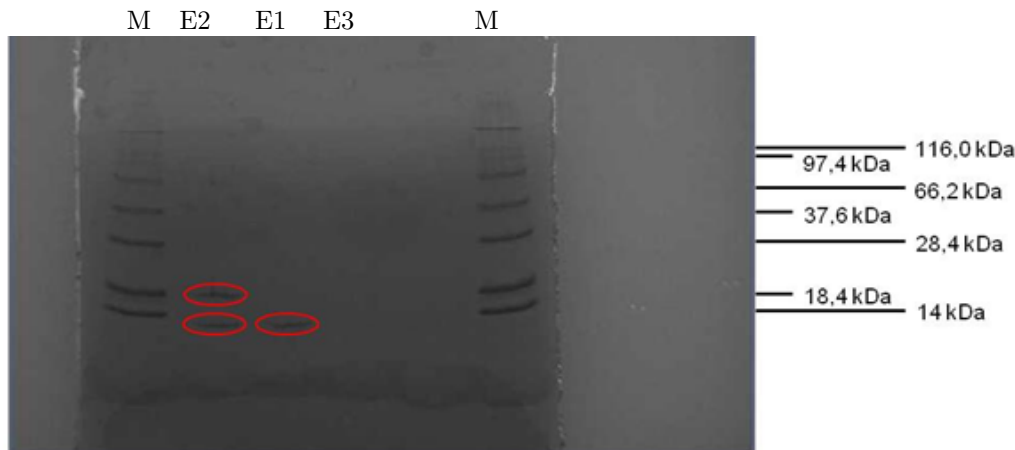


Abbildung 4.16: SDS-PAGE von Elutionsproben (E). E1 Elution bei 8 % Eluent, E2 Elution bei 20 % Eluent und E3 Elution bei 100 % Eluent, Eluent: 50 mM Kaliumacetat + 1 M NaCl

In Proben des ersten Elutionspeaks (E1) sind mittels SDS-PAGE Banden von ALA bei 14 kDa sichtbar. Banden weitere Proteine sind nicht erkennbar. Somit konnte in der ersten Elutionsstufe (8 % Eluent) reines ALA von der Säule befüllt mit dem kommerziellen Adsorbens PallQ HyperD F eluiert werden. Proben des zweiten Elutionspeaks E2 (20 % Eluent) zeigen in der SDS-PAGE Banden von BLG bei 18,4 kDa und von ALA bei 14 kDa. Die Trennung der Molkeproteine ALA und BLG war damit insofern nicht vollständig gegeben, da in dem zweiten Elutionspeak (E2) neben BLG noch geringe Mengen an ALA detektiert wurden. In Peak 3 konnte kein Protein mehr nachgewiesen werden, der Proteingehalt der Probe war für einen Nachweis mittels SDS-PAGE zu gering. Nach der Verwendung von Dünnmolke aus Ultralac 35 wurde das kommerzielle Adsorbens PallQ HyperD F mit Molkekonzentrat beladen. Die hierbei aufgenommenen Chromatogramme sind denen aus den Versuchen mit Dünnmolke aus Ultralac 35 in ihren Verläufen sehr ähnlich. Der größte Unterschied zwischen den Chromatogrammen zur Auftrennung von Dünnmolke aus Ultralac 35 und Molkekonzentrat besteht darin, dass bei der Beladung der Säule mit zwei Bettvolumen Molkekonzentrat im Durchbruch starke Überladungseffekte auftreten, welche im UV-Signal deutlich zu sehen sind. Im Gegensatz zu der Beladung des kommerziellen Materials mit Dünnmolke aus Ultralac 35 kommt es während der Beladung mit Molkekonzentrat zu einem starken Anstieg des Säulenrückdrucks. Der Rückdruck in der BioRad Uno1 Säule überschreitet am Ende der Beladung mit Molkekonzentrat den vom Hersteller für dieses Material empfohlenen Höchstwert von 48 bar (700 psi). Jedoch lässt sich die Säule über den anschließenden Spülschritt weiter bis zur Elution betreiben. Der Rückdruck in der Säule nimmt über den Verlauf des Spülschrittes wieder ab und bleibt über die Elutionen dann konstant. Trotz der starken Überladungseffekte am Durchbruch können Elutionspeaks zu denselben Retentionszeiten wie in den Versuchen mit Dünnmolke aus

Ultralac 35 beobachtet werden. Ein Chromatogramm der Beladung von PallQ HyperD F mit Molkekonzentrat ist in Abb. 4.17 dargestellt.

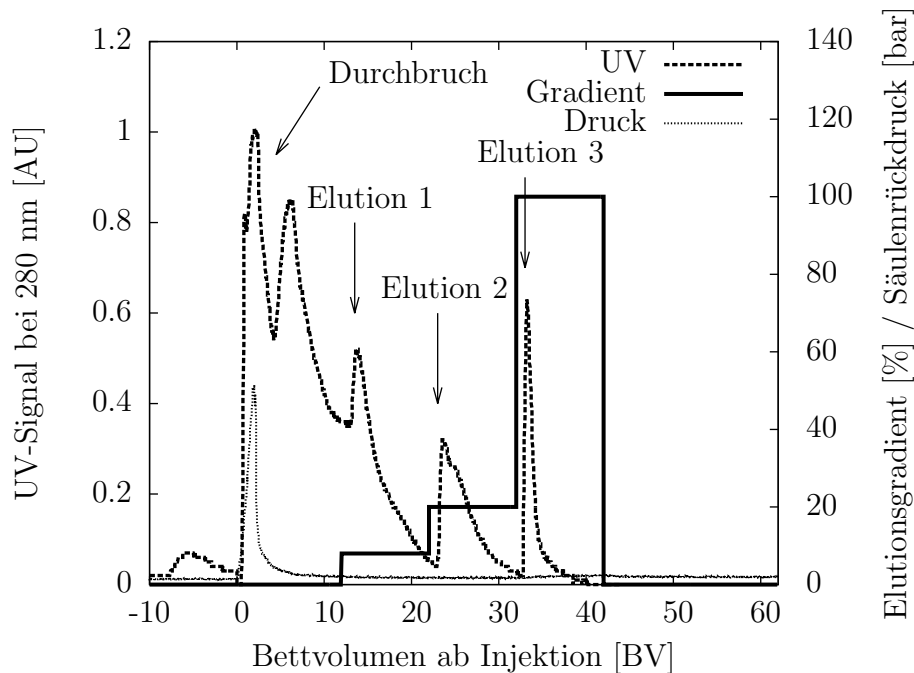


Abbildung 4.17: Chromatogramm zur Auftrennung von Molkeproteinen bei Raumtemperatur. Proteinquelle: Molkekonzentrat, Adsorbens: PallQ HyperD F. Injektion von 2 BV Molkekonzentrat, Spülschritt mit demineralisiertem Wasser (10 BV), Elutionen mit 8 %, 20 % und 100 % 50 mM Natriumacetatpuffer + 1 M NaCl zu je 10 BV

Die Kapazität des HyperD F Materials wird vom Hersteller Pall mit BSA als Referenzprotein und 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 8,6 mit  $85 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  angegeben. Da davon ausgegangen werden kann, dass die Beladungskapazitäten bei Verwendung von Molke oder Molkekonzentrat auf Grund der hohen Salzlast geringer sind und nicht von der vom Hersteller genannten Kapazität ausgegangen werden kann, wurden die Kapazitäten mit diesen Rohstoffen bestimmt. Hierzu wurden 1,3 ml des Materials in eine BioRad Uno1 Säule gepackt und aus Halbwertszeit  $t_{1/2}$ , Verweilzeit  $t_0$ , dem Massenstrom des Adsorptivs  $\dot{m}_F$  und dem Säulenvolumen  $V_S$  die Kapazität über sieben Beladungs- und Elutionsläufe nach Gleichung 4.1

$$X_M = \frac{\dot{m}_F}{V_S} \cdot (t_{1/2} - t_0), \quad (4.1)$$

bestimmt. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  gibt in diesem Fall die Zeit nach Beginn der Beladung an, bei welcher die halbe Proteinkonzentration des Feeds am Säulenausgang gemessen werden kann. Es ist deutlich zu erkennen, dass unter Realbedingungen mit einer 1:10 Verdünnung von Molkekonzentrat nicht die vom Hersteller genannten hohen Kapazitäten wie unter Idealbedingungen mit BSA und Tris-HCl Puffer pH 8,6 erreicht werden können. Die Kapazitäten sinken von anfänglichen  $18,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ab dem vierten Lauf auf durchschnittliche  $4,7 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Dies entspricht 21,3 % bzw. 5,5 % der Kapazität, welche mit BSA und

### 4.3 Proteinadsorption in der Kleinsäule

50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 8,6 vom Hersteller angegeben wurde. Eine Übersicht über die ermittelten Kapazitäten für den Verlauf der Beladungszyklen ist in Tabelle 4.5 gegeben.

Tabelle 4.5: Kapazität von PallQ HyperD F über 7 Beladungszyklen mit 20 BV 1:10 Verdünnung von Molkekonzentrat in einer Uno1 Säule bei 14° C

Lauf	Kapazität [mg·ml <sup>-1</sup> ]
1	18,1
2	12,5
3	11,0
4	4,4
5	4,9
6	4,9
7	4,4

## 4.4 Aufskalierung der chromatographischen Proteinadsorption

### 4.4.1 Kapazitäten der Adsorbentien in der Chromatographiesäule

Die zur Aufskalierung eingesetzte Packung besitzt mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Länge von 75 mm ein Verhältnis von Länge zu Durchmesser von 3. Für Untersuchungen der Bindekapazitäten der Süd-Chemie Materialien für Molkeproteine wurden Adsorbentien in granulierter und extrudierter Form oder als sphärische Partikel in eine Kronlab TAC25 Säule (Kronlab, Dinslaken, Deutschland) gepackt. Die Materialien unterscheiden sich weniger stark in ihren Größen, viel mehr jedoch in ihren chemischen Zusammensetzungen und physikalische Eigenschaften, wie beispielsweise den BET-Oberflächen ihrer Schüttungen. Eine Übersichtstabelle über die untersuchten Adsorbentien der Süd-Chemie AG und deren physikalische Eigenschaften ist in Tab. 4.6 gegeben.

Tabelle 4.6: Physikalische Eigenschaften der untersuchte Adsorbentien aus Datenblättern der Süd-Chemie AG und Messungen an der TU Kaiserslautern

Adsorbens	Anteil Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [%]	Anteil SiO <sub>2</sub> [%]	Partikel- form	Partikel- größe [mm]	BET- Oberfl. [m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ]
EX M 1998	62	38	Granulat	0,60 - 1,00	425
EX M 2070	97	0	Sphären	1,26	95
EX M 2073	59	41	Extrudat	1,16 x 3,50	175
EX M 2115	97	0	Extrudat	1,03	300
EX M 1871	-	100	Granulat	0,61	151
EX M 1907	-	100	Sphären	0,30 - 1,00	157
Pall Q	-	-	Sphären	0,05	unb.

So bestehen EX M 1907 und EX M 1871 aus reinem Siliziumoxid. Obwohl EX M 1907 ein sphärisches Partikel mit einem Durchmesser von 0,61 mm und EX M 1871 ein Granulat mit einer Partikelgrößenverteilung von 0,30 – 1,00 mm ist, sind die BET-Oberflächen ihrer Schüttungen mit 157 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup> und 151 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup> nahezu identisch. EX M 2070 und EX M 2115 bestehen beide zu 97 % aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid. Schüttungen des sphärischen Partikels EX M 2070 mit einem Partikeldurchmesser von 1,26 mm unterscheiden sich von dem 1,03 mm großen Extrudat deutlich hinsichtlich der BET-Oberfläche. Diese beträgt für Schüttungen aus EX M 2070 95 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup> und für Schüttungen aus EX M 2115 300 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>. Hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung aus Siliziumoxid/ $\gamma$ -Aluminiumoxid sind die Adsorbentien EX M 1998 und EX M 2073 miteinander vergleichbar. Beide bestehen näherungsweise zu 60 % aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid und zu 40 % aus Siliziumoxid. In den BET-Oberflächen ihrer Schüttungen unterscheiden sich das Granulat mit einer Partikelgrößenverteilung von 0,60 – 1,00 mm und das zylindrische Extrudat mit den Abmessungen 1,16 · 3,50 mm jedoch mit 425 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup> und 175 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup> und deutlich voneinander. In Folge dessen werden zur besseren Vergleichbarkeit der ermittelten Kapazitäten der mit



#### 4.4 Aufskalierung der chromatographischen Proteinadsorption

den Adsorbentien befüllten Säulen diese in Relation zur eingesetzten Masse, dem Packungsvolumen und der BET-Oberfläche der Materialien angegeben. Bezogen auf die eingesetzte Adsorbensmasse besitzen die Säulen befüllt mit den Adsorbentien EX M 1998 (Siliziumoxid/ $\gamma$ -Aluminiumoxid) mit  $7,01 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) mit  $6,72 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  und EX M 1907 (Siliziumoxid) mit  $5,17 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  die höchsten Kapazitäten. Makroporen, wie bei EX M 2115 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid, bringen keine Verbesserung in der Kapazität für die Proteinbindung. Seine Kapazität liegt bei einem wesentlich geringeren Wert von  $1,59 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Eine ähnliche Tendenz zeigt sich auch in der Kapazität der Adsorbentien bezogen auf das Säulenvolumen. Hier besitzt die Säule befüllt mit dem Adsorbens EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) die höchste Kapazität mit  $3,90 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Im Vergleich dazu liegt die Kapazität des kommerziellen Adsorbens PallQ HyperD F bei  $4,70 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Bezogen auf die Oberfläche der Partikelschüttung (BET) hingegen verfügt die Säule befüllt mit EX M 2070 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid mit  $70,7 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$  über eine deutlich höhere Kapazität als die Säulen befüllt mit allen anderen betrachteten experimentellen Adsorbentien. Es zeigte sich somit, dass die Proteinbindung an die experimentellen Adsorbentien an deren mesoporösen Oberflächen stattfindet und Makroporen (wie bei EX M 2115) zu keinen nennenswerten Verbesserungen der Proteinbindekapazität führen. Die beste Leistung bezogen auf die BET-Oberfläche seiner Schüttung zeigte das Adsorbens EX M 2070 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid. Dabei handelt es sich um ein hoch druckstabiles sphärisches Partikel, das somit für den Einsatz in einer Chromatographiesäule die besten Eigenschaften im Vergleich zu den anderen experimentellen Adsorbentien besitzt. Tab. 4.7 gibt eine Übersicht über die Kapazitäten der Säulen befüllt mit Adsorbentien der Süd-Chemie AG.

Tabelle 4.7: Kapazitäten  $X$  der Adsorbentien bestimmt in einer Kronlab TAC25 Säule bei  $14^\circ \text{C}$ .  $X_M$  Proteinbindekcapazität bezogen auf die Adsorbensmasse,  $X_V$  Proteinbindekcapazität bezogen auf das Säulenvolumen,  $X_O$  Proteinbindekcapazität bezogen auf die Oberfläche der Adsorbenschüttung (BET)

<b>Adsorbens</b>	$X_M$ [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	$X_V$ [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	<b>BET-Oberfl.</b> [ $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ]	$X_O$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ ]	<b>Elutions-effizienz</b> [%]
EX M 1998	7,01	3,15	425	16,5	100
EX M 2070	6,72	3,90	95	70,7	69
EX M 2073	2,94	1,29	175	16,8	70
EX M 2115	1,59	0,87	300	5,3	100
EX M 1871	3,15	1,73	151	20,9	100
EX M 1907	5,17	1,96	157	32,9	100
Pall Q	unb.	4,7	unb.	unb.	100

Das experimentelle Adsorbens EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) besitzt einen Partikeldurchmesser von  $1,26 \text{ mm}$ , es handelt es sich somit um ein verhältnismäßig großes Partikel. Das kommerzielle Adsorbens PallQ HyperD F im Vergleich besitzt beispielsweise einen wesentlich geringeren Durchmesser von  $0,05 \text{ mm}$ . Aus diesen Erkenntnissen wurde ein Ansatz zur Verbesserung des Adsorbens über seine Partikelgröße erarbeitet (Kap. 4.4.3).

#### 4.4.2 Wiederverwendbarkeit der Adsorbentien aus $\gamma$ -Aluminiumoxid in der Chromatographiesäule

Neben der Kapazität einer Adsorbensäule sind auch die Wiederverwendbarkeit und die Stabilität des darin verwendeten Adsorbens für einen geplanten Prozess relevant. In vier direkt aufeinander folgenden Beladungs- und Elutionszyklen wurden die Kapazität und Elutionseffizienz der Säule befüllt mit dem experimentellen Adsorbens EX M 2070 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid ermittelt. Das Adsorbens wurde in 4 Zyklen mit je 2 Bettvolumen (BV) Molkekonzentrat beladen. Als Eluent wurde bei dem eingesetzten experimentellen Adsorbens EX M 2070 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid eine 50 mM Kaliumphosphatlösung mit pH 8 verwendet. In den Zyklen sind keine Regenerationsschritte nach der Elution enthalten, wie es bei vielen kommerziellen Adsorbentien beispielsweise mit NaOH-Lösungen üblich ist. Über die Beladungs- und Elutionszyklen kann eine Abnahme der Kapazität um ca. 75 % vom ersten zu den nachfolgenden Zyklen beobachtet werden. Tab. 4.8 gibt eine Übersicht über die Versuche zur Wiederverwendbarkeit des Adsorbens EX M 2070.

Tabelle 4.8: Wiederverwendbarkeit von EX M 2070 über vier Beladungs- und Elutionszyklen mit 2 Bettvolumina Molkekonzentrat

Lauf	Protein gebunden [mg]	Adsorberkapazität [mg·g <sup>-1</sup> ]	Protein eluiert [mg]	Elutions-effizienz [%]
1	210,51	10,02	202,47	96
2	52,23	2,49	46,79	90
3	52,23	2,49	46,79	90
4	54,21	2,58	44,58	82

Über die darauf folgenden Beladungs- und Elutionszyklen ist die ermittelte Adsorberkapazität konstant. Die für  $\gamma$ -Aluminiumoxid dominierenden Mechanismen bei der Bindung von Proteinen sind elektrostatische Wechselwirkungen. Neben den Proteinen können somit auch die in Molkekonzentrat in hoher Menge enthaltenen Salze mit dem Adsorbens wechselwirken, welches somit als Ionentauscher fungiert. Diese Salze sind mit 50 mM Kaliumphosphatlösung nicht vollständig von dem Adsorbens zu entfernen und belegen die Bindestellen für die Proteinbindung nach der ersten Beladung.

#### 4.4.3 Einfluss der Partikelgröße auf die Proteinbindekapazitäten in der Chromatographie

In Kapitel 4.4.1 wurden Adsorbentien unterschiedlicher chemischer Zusammensetzungen und Partikelformen miteinander verglichen. Die höchsten Kapazitäten wiesen das Granulat EX M 1998 und das sphärische Partikel EX M 2070 auf. Das Granulat EX M 1998 wurde auf Grund seiner geringen Druckstabilität in Chromatographiesäulen nicht weiter betrachtet. Im Vergleich zum Referenzsystem PallQ HyperD F lag die ermittelte Kapazität des sphärischen Partikels EX M 2070 unter jener des Referenzadsorbens. Um den Einfluss des bei diesen Versuchen vorherrschenden starken Unterschieds im Durchmesser der Partikel

#### 4.4 Aufskalierung der chromatographischen Proteinadsorption

EX M 2070 (1,26 mm) und PallQ HyperD F (0,05 mm) auf die ermittelten Kapazitäten zu untersuchen wurde ein Partikel derselben chemischen Zusammensetzung wie EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid), jedoch reduzierter Partikelgröße vorgeschlagen und vom Projektpartner zur Verfügung gestellt. Das neue Partikel EX M 2181 besaß einen Durchmesser von 0,30 mm. Für ein sphärisches Partikel geht der Partikeldurchmesser  $d_p$  quadratisch in die Berechnung der Partikeloberfläche  $O_p$  ein nach

$$O_p = \pi \cdot d_p^2. \quad (4.2)$$

In die Berechnung des Partikelvolumens  $V_p$  hingegen geht der Partikeldurchmesser  $d_p$  in dritter Potenz nach

$$V_p = \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot d_p^3, \quad (4.3)$$

ein. Dies bedeutet, dass bei einer Reduktion des Partikeldurchmessers  $d_p$  die Oberfläche  $O_p$  des Partikels in weitaus geringerem Maß abnimmt als sein Volumen  $V_p$ , also zunehmend mehr Partikel mit in geringerem Umfang abnehmender Oberfläche in eine Säule gepackt werden können. Die durch die Partikelverkleinerung zunehmende Adsorbensmasse ist an einer deutlichen Erhöhung der Rütteldichte von  $580 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  (EX M 2070) auf  $810 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  (EX M 2181) zu erkennen (Tab. 4.9).

Tabelle 4.9: Physikalische Parameter und Kapazitäten von  $\gamma$ -Aluminiumoxid Partikeln unterschiedlicher Partikeldurchmesser im Vergleich zu dem kommerziellen Adsorbens PallQ HyperD F. Daten aus Datenblättern der Süd-Chemie AG und Versuchen an der TU Kaiserslautern

Adsorbens	$d_p$ [mm]	Rüttel- dichte [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ]	BET- Oberfl. [ $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ]	Poren- volumen [ $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	$X_M$ [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	$X_V$ [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
EX M 2070	1,26	580	95	0,76	6,72	3,90
EX M 2181	0,30	810	157	0,42	10,40	8,42
Pall Q	0,05	unb.	unb.	unb.	unb.	4,70

Da es sich sowohl bei EX M 2070 als auch bei EX M 2181 um ein sphärisches Partikel handelt, sind die Unterschiede in der Bettporosität  $\epsilon_L$  nur gering. Für EX M 2070 liegt diese bei 0,37, für EX M 2181 bei 0,40 (s. Kap. 3.3 Tab. 3.5). Das kleinere Partikel EX M 2181 weist mit  $0,42 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$  ein geringeres Porenvolumen (Hg) als das größere Partikel EX M 2070 mit  $0,76 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$  auf. Daraus resultiert eine Reduktion der Kornporosität von 0,70 für EX M 2070 auf 0,57 EX M 2181 (s. Kap. 3.3 Tab. 3.5). Aus BET-Messungen zeigt sich, dass die Verkleinerung der Partikel eine Zunahme der BET-Oberfläche der Partikelschüttung um den Faktor 1,66 bewirkt. Adsorptionsversuche mit Bestimmung der Proteinadsorptionskapazitäten zeigen, dass die auf das Säulenvolumen bezogene Kapazität einer Säule gepackt mit EX M 2070 mit  $3,90 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  auf  $8,42 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  für eine Säule gepackt mit EX M 2181 gesteigert werden konnte. Dies entspricht einer Steigerung der Adsorptionskapazität der Chromatographiesäule um den Faktor 2,16. Damit liegt die Kapazität einer Chromatographiesäule gepackt mit dem neuen, hinsichtlich des Partikeldurchmessers  $d_p$  verbesserten, Adsorbens EX M 2181 mit einem Partikeldurchmesser von 0,3 mm im

System Molke sehr deutlich über der Kapazität einer Chromatographiesäule gepackt mit dem nochmals deutlich kleineren Referenzadsorbens PallQ HyperD F mit einem von Partikeldurchmesser 0,05 mm. Die Reduktion des Partikeldurchmessers  $d_p$  um 77 % führt zu einer Erhöhung der für die Adsorption verfügbaren Oberfläche in der Säule um 65 %. Die Kapazität der Partikelschüttung steigt dabei um 55 % bezogen auf die Adsorbensmasse und um 116 % bezogen auf das Säulenvolumen. Die auf das Säulenvolumen bezogene Kapazität des neuen in seinem Partikeldurchmesser  $d_p$  verkleinerten experimentellen Partikels aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid EX M 2181 liegt um 80 % über der auf das Säulenvolumen bezogenen Kapazität des kommerziellen Referenzadsorbens PallQ HyperD F.

#### 4.4.4 Untersuchungen zur Stabilität des Chromatographiebettes

Von besonderem Interesse bei dem Einsatz von Adsorbematerialien in einem chromatographischen Prozess sind die Druckstabilität des Materials in der Säule und das Verhältnis der angelegten Flussrate zu dem sich in der Säule aufbauenden Rückdruck. Da Säulen bis zu 200 bar  $\cdot$  l ohne Prüfpflicht laut Druckgeräterichtlinie Ad 2000 Art. 3 Abs. 3 (Richtlinie, 1997) konstruierbar sind, ist zumindest eine ausreichende Druckstabilität des Adsorbens in diesem Bereich von Bedeutung. Darüber hinaus sollte ein linearer Zusammenhang zwischen dem Rückdruck in der Säule und der angelegten Flussrate gegeben sein, sodass spätere Aufskalierungen leicht möglich sind. Für das hochstabile experimentelle Adsorbens EX M 2181 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid wurde das Verfahren mit unterschiedlichen Fluiden durchgeführt. So kamen demineralisiertes Wasser, 0,1 M Kaliumacetat-Puffer pH 5,7 und Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver zum Einsatz (Abb. 4.18).

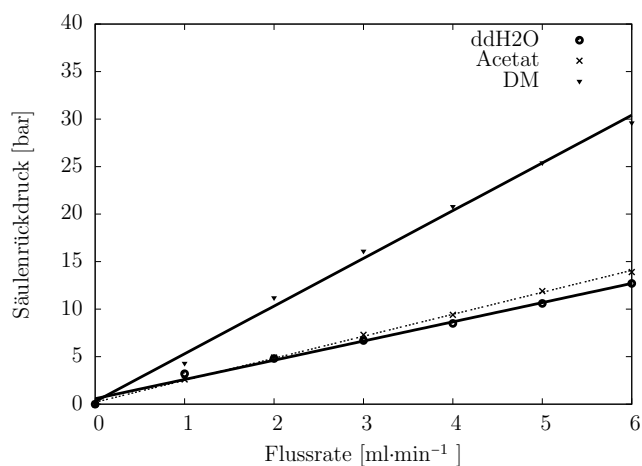


Abbildung 4.18: Druckkennlinien einer Säule mit dem Adsorbens EX M 2181 für demineralisiertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O), 0,1 M Kaliumacetat-Puffer pH 5,7 (Acetat) und Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver (DM). Bestimmt in einer Kronlab TAC25 Säule, 37 ml Bettvolumen

Die ermittelten Druckkennlinien zeigen für alle eingesetzten Fluide einen linearen Verlauf. Im Verhältnis zueinander zeigen die Druckkennlinien für demineralisiertes Wasser und 0,1 M Kaliumacetat-Puffer pH 5,7 einen sehr ähnlichen flachen Verlauf. Die Abweichungen der Druckkennlinien sind für demineralisiertes Wasser und 0,1 M Kaliumacetat-Puffer

#### 4.4 Aufskalierung der chromatographischen Proteinadsorption

pH 5,7 in den Messwerten nur sehr gering. Wesentlich höhere Rückdruckwerte werden bei der Überströmung des Adsorbens EX M 2181 mit Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver beobachtet. Der Zusammenhang von angelegter Flussrate und in der Säule auftretendem Rückdruck ist aber auch für das Adsorbens EX M 2181 und Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver linear. Dabei ist die höhere Dichte von Dünnmolke weit weniger dafür ursächlich als der Anteil an Feststoffpartikeln in dieser. Ein Zahlenwert, der den durch die Säulenpackung verursachten Druckabfall wiedergibt, ist die Permeabilität. Diese wird aus der angelegten Flussrate  $\dot{F}$ , dem in der Säule gemessenen Rückdruck  $\Delta p$ , der Viskosität des Fluids  $\rho_F$  und der Säulenlänge  $L_C$  nach Gleichung 4.4 berechnet.

$$B = k_0 \cdot d_p^2 = \frac{\eta \cdot \dot{F} \cdot L_c}{\Delta p \cdot A_c} \quad (4.4)$$

Wie bei den gemessenen und in Abb. 4.18 dargestellten Rückdruckwerten liegen auch bei der Permeabilität die Werte für demineralisiertes Wasser und 0,1 M Kaliumacetat-Puffer pH 5,7 in einem niedrigen Bereich sehr dicht beieinander. Die für Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver ermittelten Werte der Permeabilität sind signifikant höher. Die für das Adsorbens EX M 2181 und die Fluide demin. Wasser, 0,1 M Kaliumacetat-Puffer und Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver ermittelten Permeabilitäten sind in Tabelle 4.10 aufgelistet.

Tabelle 4.10: Permeabilitäten von EX M 2181 für demin. Wasser, 0,1 M Kaliumacetat-Puffer und Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver

Flussrate [ml·min <sup>-1</sup> ]	Rückdruck H <sub>2</sub> O [psi]	Rückdruck Acetat [psi]	Rückdruck Molke [psi]	Permeabilität H <sub>2</sub> O [10 <sup>10</sup> cm <sup>2</sup> ]	Permeabilität Acetat [10 <sup>10</sup> cm <sup>2</sup> ]	Permeabilität Molke [10 <sup>10</sup> cm <sup>2</sup> ]
1	47	37	62	0,786	0,987	0,834
2	70	71	162	1,056	1,041	6,387
3	97	106	234	1,143	1,056	6,632
4	124	136	302	1,192	1,087	6,852
5	154	172	368	1,200	1,074	7,029
6	184	202	430	1,205	1,100	7,219

Die Druckkennlinien und berechneten Permeabilitäten des Adsorbens EX M 2181 belegen die Eignung der Adsorbens für eine Überströmung mit Molkesuspensionen.

#### 4.4.5 Abschätzung Expanded Bed Chromatographie (EBC)

Bei Prozessen mit hohen Konzentrationen an Nicht-Ziel-Substanzen, wie beispielsweise ungelösten Feststoffpartikeln, oder Fluiden hoher Viskosität bietet die Expanded Bed Chromatographie oftmals die Möglichkeit, eine Proteinaufreinigung in einer Stufe zu erzielen, was mit Gepacktbett-Chromatographie unter diesen Bedingungen nicht mehr möglich ist (Hjorth, 1997). Diese Verfahrensvariante der Chromatographie findet beispielsweise Einsatz bei der Aufreinigung von nicht vorgereinigten Zellsuspensionen oder Protein aus aufgeschlossenen Inclusion Bodies. Ein Beispiel im industriellen Maßstab ist die Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Suspensionen von Säugerzellen (Fetzer and Kaleja, 2003). Doch auch für Milch, welche sehr große Ähnlichkeiten zu ihrem Hauptnebenprodukt aus der Käseherstellung Molke besitzt, wurden Expanded Bed Methoden beschrieben (Noppe et al., 1999). Im Gegensatz zur klassischen Chromatographie besteht bei dem Einsatz der Expanded Bed Chromatographie (EBC) keine Gefahr einer Säulenbettverdichtung bzw. Säulenverblockung, wie sie bei den untersuchten experimentellen Materialien in Pulver- oder Granulatform zu beobachten war. Durch den angelegten Fluidstrom durch die Säule entgegen der Schwerkraft schwimmen die Adsorbenspartikel unterschiedlicher Partikelgrößen bei der Beladung der Säule zu einem homogenen lockeren Chromatographiebett auf. Zur Elution wird das Chromatographiebett mechanisch verdichtet und die Elution kann unter Einsatz geringer Mengen an Eluent erfolgen. Die auf ein Partikel in einem Fluidstrom wirkenden Kräfte sind in Abb. 4.19 dargestellt.

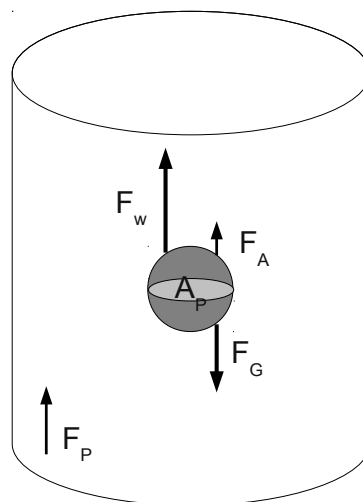


Abbildung 4.19: Kräftegleichgewicht an einem sphärischem Partikel im von unten nach oben gerichteten Flüssigkeitsstrom, Kräfte: Summe aller am Partikel auftretenden Kräfte  $F_p$ , Gewichtskraft  $F_G$ , Auftriebskraft  $F_A$ , Widerstandskraft  $F_w$

Auf ein sich im Flüssigkeitsstrom befindliches und von unten angeströmtes Partikel wirken

#### 4.4 Aufskalierung der chromatographischen Proteinadsorption

drei maßgebliche zu betrachtende Kräfte. Zum einen seine eigene Gewichtskraft  $F_G$  und seine Auftriebskraft in der Flüssigkeit  $F_A$ , zum anderen die von der Anströmung des Partikels verursachte Widerstandskraft  $F_w$ . In selber Art trifft dies auch auf eine Schüttung aus Partikeln zu. Hier wird das Gewicht der Partikelschüttung (abzüglich des Auftriebs der Partikel) vom Durchströmungswiderstand der Schüttung „getragen“.

$$\Delta p \cdot A = (\rho_S - \rho_L) \cdot V_S \cdot g \quad (4.5)$$

Das Feststoffvolumen der Partikel lässt sich durch die Porosität der Schüttung  $\epsilon$  und das Bettvolumen der Schüttung  $V_{Sch}$  ausdrücken.

$$V_S = (1 - \epsilon) \cdot V_{Sch} \quad (4.6)$$

Das Volumen der Schüttung ist gegeben durch den Säulenquerschnitt  $A$  und die Höhe der Schüttung  $H$

$$V_{Sch} = A \cdot H \quad (4.7)$$

Gleichung (4.5) lässt sich mit den Gleichungen (4.6), (4.7) und  $\Delta\rho = \rho_S - \rho_L$  umschreiben und nach Druckverlust und Betthöhe umstellen

$$\frac{\Delta p}{H} = \Delta\rho \cdot (1 - \epsilon) \quad (4.8)$$

Die Gleichung (4.8) lässt sich mit der Gleichung von Ergun

$$\frac{\Delta p}{H} = 150 \cdot \frac{(1 - \epsilon_L)^2}{\epsilon_L^3} \cdot \frac{\eta \cdot \overline{w}_L}{d_P^2} + 1,75 \cdot \frac{(1 - \epsilon_L)}{\epsilon_L^2} \cdot \frac{\rho_L \cdot \overline{w}_L}{d_P} \quad (4.9)$$

gleichsetzen und nach der Minimalfluidisierungsgeschwindigkeit

$$\overline{w}_L = 42,9 \cdot (1 - \epsilon_L) \cdot \frac{\nu}{d_P} \cdot \left( \sqrt{1 + 3,11 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{\epsilon_L^3}{(1 - \epsilon_L)^2} \cdot \frac{\Delta\rho \cdot g \cdot d_P^3}{\rho_F \cdot \nu^2}} - 1 \right) \quad (4.10)$$

umstellen (Stieß, 2007). Zur Abschätzung der notwendigen Lockerungsgeschwindigkeit (Minimalfluidisierungsgeschwindigkeit) für die Ausbildung eines Expanded Beds wurde eine mittlere Lockerungsporosität der Schüttung von  $\epsilon = 0,4$  eingesetzt. Als Modellfluid wurde Dünnmolke mit einer Viskosität von  $\eta = 1,1 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$  und der Dichte  $\rho_F = 1020 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  verwendet. Für alle sphärischen Partikel (EX M 1907, EX M 2070 und EX M 2181) liegen die zur Fluidisierung des Bettes notwendigen Lockerungsgeschwindigkeiten deutlich über den mittels der verwendeten FPLC-Anlagen ohne Maximizer-Modul technisch einstellbaren Flussraten. Die bestehenden FPLC-Anlagen sind in ihren Grundausführungen maximal für Flussraten von  $10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  ausgelegt. Die zur Fluidisierung benötigten Flussraten von  $61,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  für EX M 1907 und  $160,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  für EX M 2070 überschreiten diesen Wert deutlich. Durch eine Erweiterung der Anlagen durch ein Maximizer-Modul, welches Flussraten von bis zu  $20 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  erlaubt, wäre eine Fluidisierung des Bettes aus EX M 2181 möglich. Die Fluidisierungsgeschwindigkeit liegt für das Material EX M 2181 bei  $15,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Eine Fluidisierung der Adsorbentien in ihren Pulverformen (EX M 1221, EX M 1991 und EX M 1986) ist seitens der dazu benötigten Flussraten von  $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  für EX M 1221 und  $0,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  für EX M 1986 prinzipiell möglich. Für EX M 1221 liegt die

Minimalfluidisierungsgeschwindigkeit mit  $4,5 \cdot 10^{-2} \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  deutlich unterhalb des Steuerbereichs der Anlagen. Das Adsorbens aus Bentonit/Silica (EX M 1221) wurde jedoch bereits in Kap. 4.3.1 auf Grund seines Blutungsverhaltens von weiteren Betrachtungen ausgeschlossen. Zudem ist das Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) in seiner Pulverform auf Grund seiner Kompressibilität prinzipiell nicht für den chromatographischen Einsatz geeignet (s. Kap. 4.3.1). Eine Übersicht über die untersuchten Adsorbentien, deren physikalische Eigenschaften und der für einen Expanded Bed Einsatz relevante verfahrenstechnische Kenngrößen ist in Tab. 4.11 gegeben.

Tabelle 4.11: Übersicht über die Adsorbentien, deren physikalische Eigenschaften und verfahrenstechnische Kenngrößen für die Abschätzung zu deren Expanded Bed Einsatz

Partikel	Durchmesser $d_P$ [mm]	Nassdichte $\rho_W$ [kg·m <sup>-3</sup> ]	Minimalfluidisierung $w_L$ [cm·min <sup>-1</sup> ]	Flussrate $\dot{V}$ [ml·min <sup>-1</sup> ]	$\rho_W \cdot \rho_F^{-1}$ [ ]	Fr [ ]
EX M 1221	0,05	1468	$3,5 \cdot 10^{-2}$	0,2	1,44	$7,5 \cdot 10^{-8}$
EX M 1991	0,02	1618	$9,1 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-2}$	1,59	$1,2 \cdot 10^{-8}$
EX M 1986	0,03	1618	$2,0 \cdot 10^{-2}$	0,1	1,59	$4,0 \cdot 10^{-8}$
EX M 1907	1,00	1362	12,5	61,6	1,34	$4,5 \cdot 10^{-4}$
EX M 2070	1,26	1627	32,6	160,3	1,60	$2,4 \cdot 10^{-3}$
EX M 2181	0,30	1915	3,1	15,0	1,90	$8,8 \cdot 10^{-5}$

Nach Molerus (Molerus, 1982) sind für die Ausbildung einer homogenen Fluidisierung zusätzlich noch das Dichteverhältnis von Partikel  $\rho_W$  zu Fluid  $\rho_L$  und die Froude-Zahl zu beachten. Das Dichteverhältnis sollte nicht größer als ca. 3 sein und die Froude-Zahl sollte keine höheren Werte als 0,13 annehmen. Beide Bedingungen werden von allen Adsorbentien erfüllt, so auch von den Adsorbentien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid EX M 1986 und EX M 2181. Somit ist die Ausbildung eines homogenen Expanded Beds mit dem Adsorbenspulver EX M 1986 ohne Einsatz eines Maximizer-Moduls und mit dem Adsorbens EX M 2181 unter Einsatz eines Maximizer-Moduls möglich. Die Partikelgrößenverteilung kommerzieller Expanded Bed Partikel beträgt ca. 80 – 165  $\mu\text{m}$  im Durchmesser (Amersham Biosciences, 2004), befindet sich somit zwischen den Größen der untersuchten Pulver und der betrachteten sphärischen Partikel. Zudem werden EBC-Prozesse für gewöhnlich bei Flussraten zwischen 100 und 300  $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$  (entspricht 1,67 bis 5  $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ) ausgeführt (Hjorth, 1997). Die Minimalfluidisierung des im Vergleich zu EX M 2070 in seinem Durchmesser verkleinerten Partikels EX M 2181 befindet sich in diesem Bereich.



#### 4.4.6 Proteinadsorption mit Modellproteinen

Analog zu Adsorptionsversuchen in der BioRad Uno1 Säule (Kap. 4.3.1) wurde auch die aufskalierte Kronlab TAC25 Säule mit den Modellproteinen ALA und BLG beladen und eluiert. In dem in Kap. 3.4.4 beschriebenen Elutionsgradienten erfolgt die Elution von sowohl ALA (Abb. 4.20) als auch BLG (Abb. 4.20) zur selben Zeit von 33,27 min relativ zum Zeitpunkt des Elutionsbeginns. Der zeitliche Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 1,5 mg ALA in einer Kronlab TAC25 Säule ist in Abb. 4.20 dargestellt.

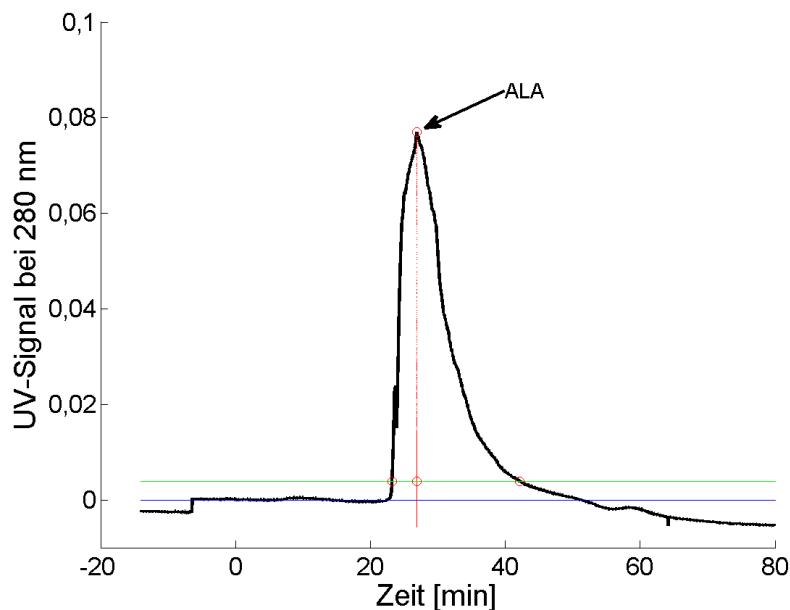


Abbildung 4.20: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 1,5 mg ALA in einer Kronlab TAC25 Säule, Material: EX M 2181, Flussrate:  $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Zeitpunkt  $t=0$  Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf  $1/20$  Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe

Der Peak des majoren Molkeproteins ALA besitzt mit einem Tailingfaktor von 2,63 und beschreibt ein deutliches Tailing. Ähnliche Tailingfaktoren wurden zuvor auch für das Pulver EX M 1986 in der BioRad Uno 1 Säule mit 2,56 für ALA und 2,35 für BLG berechnet. Die Weite des Peaks von 1,5 mg ALA in der Kronlab TAC25 Säule beträgt 6,70 min. Die Anzahl der theoretischen Trennstufen liegt bei 41 und der axiale Dispersionskoeffizient beträgt  $23,43 \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ . Die ermittelte Trennbodenanzahl (Berechnung siehe 3.4.2) sinkt dabei für ALA von 824 bei EX M 1986 auf 35 bei EX M 2181. Eine Übersicht über die Parameter der Peaks der Modellproteine ALA und BLG in einer Kronlab TAC25 Chromatographiesäule gepackt mit dem Adsorbens EX M 2181 ist in Tab. 4.12 gegeben.

## 4 Chromatographie

Tabelle 4.12: Parameter der Peaks von Modellproteinen und EX M 2181 in der Kronlab TAC25 Säule. Retentionszeit der Proteine  $t_{ret}$ , Tailingfaktor nach USP  $T_{USP}$ , Peakweite auf halbem Peakmaximum  $w_h$ , Peakfläche  $A$ , theoretische Trennbodenanzahl  $N_i$  und axialer Dispersionskoeffizient  $D_{ax}$

	<b>ALA</b>	<b>BLG</b>	<b>ALA + BLG</b>
$t_{ret}$ [min]	33,27	33,27	33,27
$T_{USP}$	2,63	2,06	2,63
$w_h$ [min]	6,70	7,43	6,70
$A$	35,60	28,71	35,60
$N_j$	41,00	59,5	41,0
$D_{ax}$ [cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ]	23,43	16,17	23,43

Der zeitliche Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 1,5 mg ALA in einer Kronlab TAC25 Säule ist in Abb. 4.20 dargestellt.

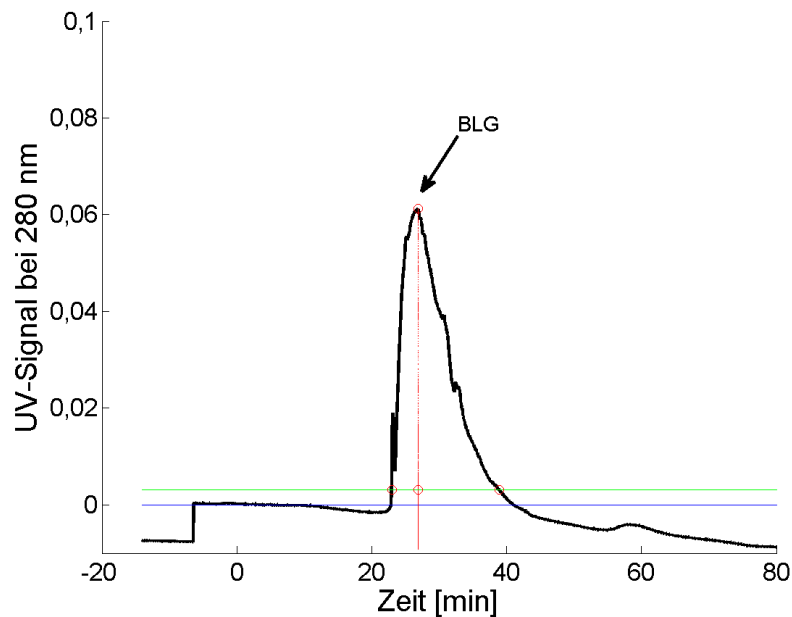


Abbildung 4.21: Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 3,0 mg BLG in einer Kronlab TAC25 Säule, Material: EX M 2181, Flussrate: 5 ml·min<sup>-1</sup>, Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf 1/20 Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe

Die Peakweite beträgt 7,43 min und der Peak weist mit einem Wert von 2,06 nach USP ein Tailing auf. Die ermittelte Trennbodenanzahl beträgt 59,5 und der axiale Dispersionskoeffizient 16,17 cm<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>. Da die Peaks der Proteine zur selben Zeit ihr Maximum erreichen, lässt sich kein Wert für die Selektivität der Säule ermitteln. Die Unterschiede in den Eigenschaften der Proteine sind folglich nicht ausreichend, um eine Trennung derer über die Wechselwirkungen mit dem Material EX M 2181 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid zu

erzielen. Es treten mit 6,70 min (ALA) und 7,43 (BLG) deutlich höhere Werte für die Peakweiten auf als für dasselbe Material EX M 1986 in Pulverform mit 0,68 min für ALA und 0,67 min für BLG. Die partikuläre Form des Adsorbens führt somit zu einer deutlichen Peakverbreiterung. Das partikuläre Material EX M 2181 besitzt im Vergleich zu dem Pulver EX M 1986 eine schlechtere Effizienz, welche sich jedoch leicht z.B. durch eine Erhöhung der Säulenlänge verbessern ließe. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.4.4 lassen die Prognose zu, das aus einer gesteigerten Säulenlänge keine massiven Säulenrückdruckprobleme entstehen werden.

#### 4.4.7 Selektive chromatographische Proteinadsorption

Neben der Gewinnung der Molkeproteine aus Molke wird eine partielle Trennung der einzelnen Molkeproteine angestrebt. Die in Kap. 4.4.6 beschriebenen Unterschiede in der Interaktion von ALA und BLG mit dem Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid legen die Schluss nahe, dass eine Trennung der Proteine während der Adsorption bzw. im Durchbruch bei der Beladung nicht möglich ist, wie es beispielsweise bei El-Sayed (El-Sayed, 2011) für ein anderes Material beschrieben wird. Für die Betrachtung der Möglichkeit einer Proteinfractionierung mittels selektiver Adsorption wurde die auf 37 ml Bettvolumen aufskalierte Säule mit 1 Bettvolumen Dünnmolke aus Molkekonzentrat beladen und der Durchbruch in 2 ml Fraktionen aufgesammelt. Die erhaltenen Durchbruchfraktionen wurden mittels RP-HPLC auf ihren Gehalt an ALA und BLG untersucht. Beide Proteine brechen zeitgleich durch und die zeitlichen Verläufe ihrer Konzentrationen über den Durchbruch unterscheiden sich lediglich in ihren Absolutwerten (Abb. 4.22).

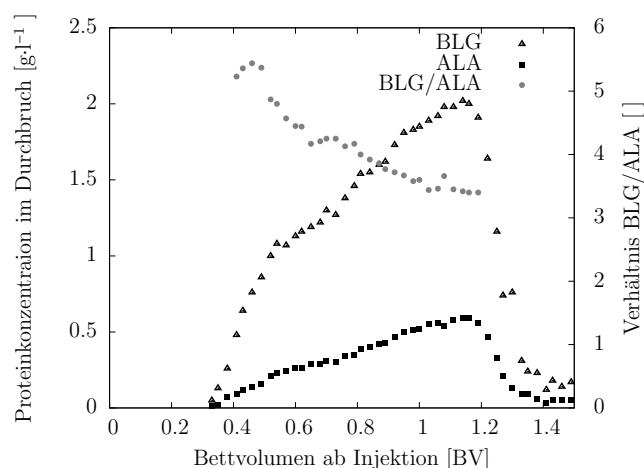


Abbildung 4.22: Proteinverteilung im Durchbruch einer 37 ml Bettvolumen Säule aus EX M 2181. Proteinquelle: Dünnmolke aus Molkekonzentrat, Flussrate:  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , Raumtemperatur, Probenvolumen: 2 ml

Zu Beginn des Durchbruchs kann ein höheres Verhältnis von BLG zu ALA (5,4:1) gemessen werden als im angelegten Feedstrom (3,6:1). Dieses Verhältnis nimmt über den Verlauf des Durchbruchs auf einen Wert nahe jenem im Feedstrom ab (3,4:1). Der Durchbruch enthält weder zu Beginn noch an seinem Ende eine Fraktion, welche nur eines der Proteine

in Reinform enthält. Das Prinzip der selektiven Adsorption oder Retention lässt sich im chromatographischen Ansatz für die Materialien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid somit nicht für eine hinreichende Trennung der Proteine ALA und BLG einsetzen.

#### 4.4.8 Selektive chromatographische Proteindesorption

Die Fraktionierung von Molkeproteinen war in vorangegangenen Experimenten mit Materialien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid wie EX M 1998, EX M 2070 und EX M 2181 nicht möglich. Das Material verfügt bei Verwendung der bisherigen Elutionsgradienten nicht über eine ausreichende Auflösung für die Molkeproteine. Die Unterschiede in den pI-Werten der Proteine sind mit 4,2 – 4,8 für ALA und 5,3 – 5,4 für BLG sehr gering. Die Neutralisierung der Oberflächenladung des Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (Nullladungspunkt 8,0 – 9,6) durch 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8 als Eluent bewirkt die Elution beider Proteine zu sehr ähnlichen bzw. identischen Zeiten. Auch der Unterschied im hydrophoben Charakter der Proteine ist nicht ausreichen, um Verbesserungen in der Auflösung mit den bisher eingesetzten Gradienten zu erzielen. Eine Möglichkeit die Auflösung zu beeinflussen besteht in der Veränderung des Elutionsgradienten in seiner Steigung oder der Einsatz eines Stufengradienten. Eine Fraktionierung von 5 ml Molkekonzentrat aus Ultralac 35 Proteinpulver (Proteingehalt:  $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) gelang nun unter Einsatz des Adsorbens EX M 2181 (Abb. 4.23) in einem flachen linearen Elutionsgradienten aus 0,5 M Kaliumphosphat pH 8.

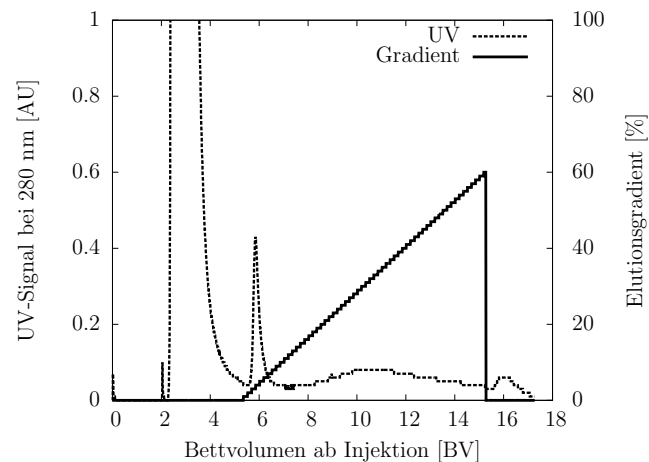


Abbildung 4.23: Proteinfractionierung von 5 ml Molkekonzentrat aus Ultralac 35 Pulver mittels EX M 2181 im linearen Gradienten von 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8, Flussrate  $4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Raumtemperatur

Schon zu Beginn des Elutionsgradienten, bei einer Konzentration von 0,5 mM Kaliumphosphat, kann der erste Elutionspeak bei 6 BV beobachtet werden. Der zweite Elutionspeak tritt bei 20 % Eluentenkonzentration auf, dies entspricht einer Konzentration von 10 mM Kaliumphosphatpuffer. Das Peakmaximum des zweiten Peaks wird in diesem Gradienten bei 10 BV erreicht. Die Peakidentifikation erfolgt durch Injektion der reinen Modellproteine ALA und BLG. Von ALA werden 2 mg und von BLG 1 mg auf die Säule aufgetragen und mit denselben Protokollen, die auch zur Fraktionierung der Molkeproteinsuspensionen

#### 4.4 Aufskalierung der chromatographischen Proteinadsorption

verwendet werden, eluiert. Hierbei zeigte ALA ein Retentionsvolumen von 6 BV und BLG von 10 BV. Der Einsatz eines Stufengradienten aus 0,5 mM und 35 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8 erzielte deutliche Verbesserungen in den Auflösungen der Elutionspeaks. ALA eluiert erneut in einem scharfen Peak um 6 BV. Die Elution von BLG erfolgt um 1 BV früher bei 9 BV in einem deutlich schärferen Peak als unter Verwendung des linearen Elutionsgradienten aus 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8. Dem Stufenansatz war ein zusätzlicher NaOH-Regenerationsschritt am Ende eines Trennlaufs bei 12 BV hinzugefügt, welcher an das Material gebundenes Protein entfernt, welches zuvor mittels des Kaliumphosphatpuffers nicht wieder von diesem entfernt werden konnte (Abb. 4.24).

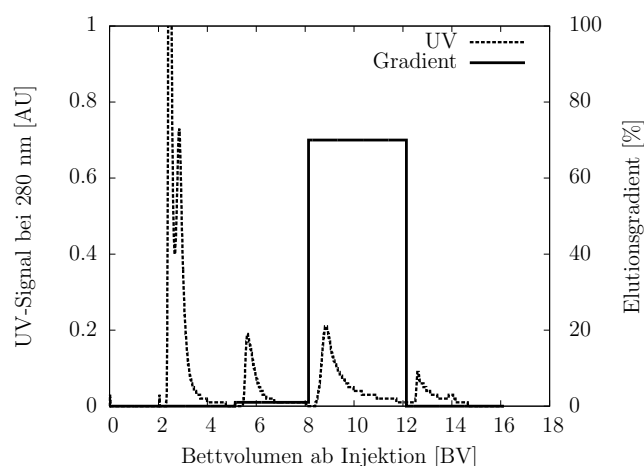


Abbildung 4.24: Proteinfractionierung von 5 ml Molkekonzentrat aus Ultralac 35 Proteinpulver mittels EX M 2181 durch Stufengradienten von 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8 und Regeneration des Adsorbens mittels 0,2 M NaOH-Lösung, Flussrate  $4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , Raumtemperatur

Proteinpeaks geringer Intensität können während der NaOH-Regeneration zwischen 12 BV und 13 BV und des abschließenden Spülschrittes mit demineralisiertem Wasser bei 14 BV beobachtet werden. Der größte Anteil der Proteine wird jedoch im Durchbruch aus der Säule ausgetragen. Ausgehend von einer vollständigen Bindung der eingesetzten Proteine ALA und BLG (76 % des Gesamtproteins), einer Adsorbensmenge von 30 g, einer Prozessdauer von 133 min und einer Re-equilibrierungszeit unter Verwendung von 25 ml 0,4 % HCl-Lösung von 12 min wird die Produktivität des Prozesses zu sehr geringen  $2,4 \mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  berechnet. Dieser Prozess könnte nur bei sehr hochpreisigen Produkten rentabel sein.

## 4.5 Zusammenfassung Chromatographie

Adsorptionsisothermen zeigen, dass die Bindung von Molkeproteinen an Materialien aus Bentonit/Silica, Siliziumdioxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid mittels Langmuir-Isothermen beschrieben werden kann. Die Maximalbeladung des Adsorbens aus Bentonit/Silica wurde für ALA zu  $78 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$  und für BLG zu  $127 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$  bestimmt. Diese Werte werden bei diesem Material bereits bei Proteinkonzentrationen von unter  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  erreicht. Die ermittelten  $K_L$ -Werte von  $6,59 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$  für ALA und  $2,32 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$  für BLG belegen eine hohe Affinität der Proteine zu dem Material aus Bentonit/Silica. Für Materialien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid und Schichtsilicat wurden wesentlich geringere Werte für die Gleichgewichtskonstante  $K_L$  von durchschnittlich  $0,65 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$  ermittelt. Die Affinität der Proteine ALA und BLG zu diesen Materialien ist also wesentlich geringer als zu dem Material aus Bentonit/Silica. Der Sättigungsbereich der Adsorption wird bei diesen Materialien erst bei Proteinkonzentrationen über  $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  erreicht. Für  $\gamma$ -Aluminiumoxid konnten die höchsten Werte für die Maximalbeladung bestimmt werden. Diese liegen für ALA bei  $363 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$  und für BLG bei  $345 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$ . Weder das Adsorbens aus Fällungskieselsäure noch das Material aus  $61,9 \%$   $\gamma$ -Aluminiumoxid und  $38,1 \%$  Siliziumoxid binden ALA in nennenswertem Umfang. Die Oberflächen dieser Materialien sind bei pH 6 stark negativ geladen und auch ALA und BLG liegen bei diesem pH-Wert als Anionen vor, somit behindern repulsive elektrostatische Kräfte die Adsorption der Proteine. Das stark hydrophobe BLG kann diese repulsiven Kräfte über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Adsorbens überwinden und dadurch an diesen binden. Die bei ALA über Entropie getriebenen Konformationsänderungen an der Materialoberfläche hervortretenden hydrophoben Wechselwirkungen sind hierfür nicht ausreichend. Trotz seiner im Gegensatz zum Material aus Fällungskieselsäure wesentlich größeren BET-Oberfläche liegt die Maximalbeladung des Adsorbens aus  $61,9 \%$   $\gamma$ -Aluminiumoxid und  $38,1 \%$  Siliziumoxid mit  $109 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$  deutlich unter jener des Adsorbens aus reinem Siliziumdioxid ( $218 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$ ). Für Versuche in Chromatographiesäulen (BioRad Uno1) ist das Material aus Fällungskieselsäure auf Grund seiner hohen Kompressibilität nicht geeignet. Adsorption und Desorption der Modellproteine ALA und BLG an die Materialien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid und Bentonit/Silica verliefen in einem Bereich von  $1,2 - 2,3 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{ml}_{\text{Ad}}^{-1}$  vollständig. Eine Trennung der Modellproteine in den Säulen gepackt mit Bentonit/Silica und  $\gamma$ -Aluminiumoxid ist mit dem für diese Säule vom Hersteller angegebenen Standardgradienten nicht möglich. Zudem weisen Materialien aus Bentonit/Silica sowohl als Pulver als auch in Granulatform starke Blutungseffekte auf. Die Säule gepackt mit dem Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid zeigt im Vergleich zu einer Säule gepackt mit Bentonit/Silica eine höhere Peakschärfe, doch auch in dieser ist die Trennung der Modellproteine unter den gewählten Bedingungen nicht möglich. Versuche mit dem kommerziellen Referenzmaterial Pall Q HyperD F zeigen in der BioRad Uno1 Säule, dass die Aufarbeitung von Molke bzw. Molkekonzentrat mittels der eingesetzten Chromatographieanlagen prinzipiell möglich ist. Es wird aber auch deutlich, dass eine einstufige Trennung im linearen Gradienten aus Natronlauge und Kochsalz voraussichtlich schwierig sein wird. Die Proteinbindekapazität im realen System Molke/Molkekonzentrat liegen deutlich unter den Herstellerangaben, bezogen auf ein ideales System bestehend aus einer Pufferlösung und einem einzigen Modellprotein. Zudem bringt die Beladung mit Molkekonzentrat das System aus kommerziellem Adsorbens und Chromatographiesäule an die Grenzen

der maximalen vom Säulenhersteller angegebenen Druckbelastbarkeit. Adsorbentien unterschiedlicher chemischer Zusammensetzungen und Herstellungsverfahren der Partikulierung wurden in einer auf 37 ml hochskalierten Chromatographiesäule (Kronlab TAC25) hinsichtlich ihrer Proteinbindekapazität und Druckbelastbarkeit untersucht. Die Untersuchungen der Proteinbindekapazitäten zeigten, dass Partikelschüttungen aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) bezogen auf ihre BET-Oberfläche die größte Proteinbindekapazität aller untersuchten Schüttungen aus Adsorbentien in partikulärer Form besitzen. Zur Steigerung der Kapazität von Schüttungen aus dem vergleichsweise großen (1,26 mm Durchmesser) sphärischen Adsorbens EX M 2070 hinsichtlich Adsorbensmasse und Säulenvolumen wurde ein Partikel mit geringerem Partikeldurchmesser (EX M 2181, 0,30 mm Partikeldurchmesser) bei den Projektpartnern in Auftrag gegeben. Die Reduktion des Partikeldurchmessers um 77 % sorgte für eine Erhöhung der Kapazität seiner Schüttung um 55 % bezogen auf die Adsorbensmasse und 116 % bezogen auf das Säulenvolumen. Schüttungen aus dem hinsichtlich seiner Größe verbesserte Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2181) weisen eine um 79 % höhere Kapazität bezogen auf das Säulenvolumen auf als der kommerzielle Referenzadsorbens PallQ HyperD F. Eine Trennung über selektive Adsorption, wie von El-Sayed (El-Sayed, 2011) für Sepharose beschrieben, kann nicht erreicht werden, die bei der Beladung der Säule auftretenden Veränderungen der Proteinzusammensetzung sind hierfür zu gering. Auch eine selektive Elution mittels unterschiedlicher Elutionspuffer, wie von Doultani et al. (Doultani et al., 2004) beschrieben, ist mit den untersuchten Materialien nicht möglich. Die Trennung der majoren Molkeproteine ALA und BLG wurde in einem linearen 50 mM Kaliumphosphatgradienten pH 8 erzielt. Der Einsatz eines Stufengradienten desselben Eluenten brachte deutliche Verbesserungen dieses Ergebnisses. Die aus diesen Versuchen abgeschätzte Produktivität beträgt  $2,4 \mu\text{g}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Die selektive Bindung von ALA an die Materialien aus Siliziumoxid eröffnet die Möglichkeit eines zweistufigen Prozesses, in welchem ALA in der ersten Stufe aus der Molke entfernt wird. In der zweiten Stufe kann BLG aus der an ALA angereicherten Molke an Adsorbentien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid gebunden werden. Aus der zweiten Stufe tritt somit eine an Protein angereicherte Lactoselösung aus. Die Elution der beiden Adsorptionsstufen liefert ALA und BLG in hoher Reinheit. Auf Grund der geringen Produktivitäten der experimentellen Adsorbentien in der Chromatographie und der ungünstigen Gleichgewichtslagen der Adsorption wurde dieser Ansatz für die Chromatographie nicht weiter verfolgt und für einen Batch-Ansatz (Kapitel 5) wieder aufgegriffen.





# 5 Proteinadsorption im Rührkessel

## 5.1 Einleitung Proteinadsorption im Rührkessel

Rührkessel finden breite Anwendung in der Milchverarbeitung, Fermentation und chemischen Reaktionstechnik. Für die Aufarbeitung von Molke sind sie weniger verbreitet, der Großteil der anfallenden Molke wird hauptsächlich mittels Membranverfahren und in geringerem Umfang mittels chromatographischer Prozesse aufgearbeitet. Besonders der absatzweise Betrieb von Rührkesseln hat bedingt durch seine betrieblichen Leerzeiten, welche vorwiegend durch das Befüllen, Entleeren und Reinigen der Rührkessel bedingt sind, eine geringe spezifische Produktleistung (auch als Raum-Zeit-Ausbeute bezeichnet) (Müller-Erlwein, 1998). Rührkessel stellen nicht die Hauptkomponenten zur Aufarbeitung von Molke dar, sondern ihr Einsatz beschränkt sich auf einzelne Prozesselemente wie das Lagern, Erhitzen oder Beaufschlagen von Molke mit z. B. Fällungssalzen, Säuren oder Laugen (Maté and Krochta, 1994). Die Vorteile der absatzweisen Betriebsweise von Rührkesseln liegen vor allem in den niedrigen Betriebskosten und einer geringeren Sterilitätsproblematik im Vergleich zu halbkontinuierlichen oder kontinuierlichen Prozessen (Schmid, 2002). Darüber hinaus ist der Rührkessel im Gegensatz zur Chromatographie unempfindlich gegenüber dem hohen Feststoffanteil der Molke, welcher in Kapitel 4.3.2 zu Rückdruckproblemen in der Chromatographiesäule führte. Deshalb wurde ein Rührkesselprozess im absatzweisen Betrieb als zweiter Verfahrensansatz für die Aufarbeitung von Molkeproteinen gewählt.

## 5.2 Proteinadsorption im Labormaßstab

### 5.2.1 Adsorptionsisothermen

Zur Erstellung der Adsorptionsisothermen für die Proteinadsorption im Rührkessel wurden wie in Kapitel 4 Materialien aus Bentonit/Silica (EX M 1221), Fällungskieselsäure (EX M 1991) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) verwendet. Die Adsorbentien kamen hierfür als Pulver zum Einsatz. Wie für die Modellproteine ALA und BLG in Kap. 4.2 kann das Bindeverhalten des Gesamtproteins an alle drei Adsorbentien in dem untersuchten Bereich nach Langmuir beschrieben werden. Zusätzlich wurde eine Darstellung der Ergebnisse in Form von Kapazitätskurven erstellt, bei welchen die Kapazität des Adsorbens über der Adsorbenskonzentration aufgetragen ist. Andere Adsorbentien außer diesen oder direkte Derivate derer wurden basierend auf den Ergebnissen aus Kap. 4.2 nicht weiter betrachtet und untersucht. Für das Material EX M 1221 (Bentonit/Silica) strebt die Näherungskurve nach Langmuir nach einem anfänglich steilen Verlauf einen Wert von 90 % Gesamtproteinadsorption an. Abb. 5.1 zeigt die Adsorptionsisotherme für Gesamtprotein und das experimentelle Adsorbens EX M 1221 aus Bentonit/Silica.

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

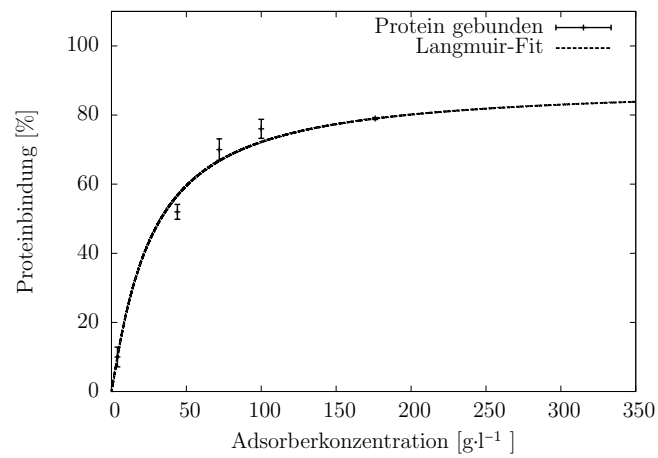


Abbildung 5.1: Adsorptionsisotherme für EX M 1221 (Bentonit/Silica) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbierkonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm

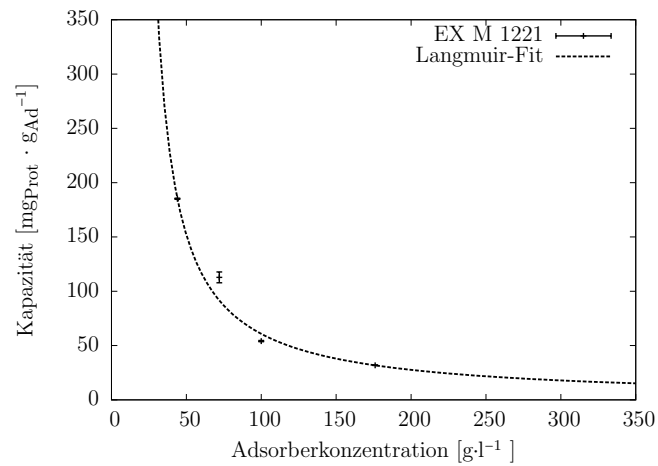


Abbildung 5.2: Kapazitätskurve für EX M 1221 (Bentonit/Silica) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbierkonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm

Wie bereits in Kapitel 4.2 gezeigt wurde binden die Proteine ALA und BLG rasch an das Material aus Bentonit/Silica. Hierbei fällt auf, dass für EX M 1221 (Bentonit/Silica) keine vollständige Bindung des Gesamtprotein vorausgesagt werden kann. Der Versuchsraum endete auf Grund der für ein Pulver geringen Schüttdichte des Materials von  $392 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  noch unter einer Adsorbenskonzentration von  $200 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Die dazugehörige Kapazitätsisotherme zeigt über die steigende Adsorbenskonzentration eine langsame und kontinuierliche Abnahme der Adsorbenskapazität (Abb. 5.2). Für das experimentelle Adsorbens EX M 1991 zeigt die Langmuirisotherme einen sehr steilen Verlauf, welcher gegen einen Wert von 70 % Gesamtproteinbindung strebt (Abb. 5.3).

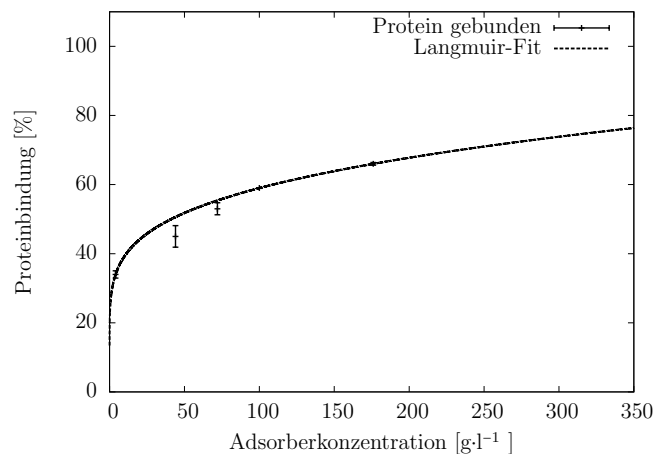


Abbildung 5.3: Adsorptionsisotherme für EX M 1991 (Siliziumoxid) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm

Das Material EX M 1991 aus Siliziumoxid bindet BLG bereits bei niedrigen Adsorbenskonzentrationen sehr rasch. Dies wurde bereits in Kapitel 4.2 anhand von Adsorptionsisothermen mit reinem Modellprotein beobachtet. Eine weitere Beobachtung aus Kapitel 4.2 bestand darin, dass reines ALA nicht in der Lage ist, an das Material aus Siliziumoxid zu binden. Eine Bindung von 54 % des Gesamtproteins an EX M 1991, ein Wert der dem Anteil von BLG in Lösung entspricht, wird bei einer Adsorbenskonzentration von  $72 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  erreicht. Die weitere Bindung von Protein bei steigender Adsorbenskonzentration ist vermutlich auf Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen dem bereits gebundenen Molkeprotein BLG und dem im Vergleich zu BLG noch in großer Menge in Lösung befindlichen ALA zurückzuführen. Eine nähere Betrachtung dessen findet in Kapitel 5.2.3 statt. Auch für das Adsorbens EX M 1991 aus Siliziumoxid endet der experimentelle Versuchsraum auf Grund der geringen Schüttdichte des Materials von  $220 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  unter einer Adsorbenskonzentration von  $200 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Die Abnahme der Kapazität über die Adsorbenskonzentration auf der Kapazitätsisotherme zeigt einen wesentlich steileren Verlauf als für das Adsorbens aus Bentonit/Silica (Abb. 5.4). Dies ist zum einen durch die Lage der Gleichgewichtskonstanten  $K_L$  mit  $0,65 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  für das Molkeprotein BLG bedingt, zum anderen kann das Molkeprotein ALA nicht direkt mit dem Adsorbens aus Siliziumoxid interagieren (s. Kap. 4.2). Die Bindung des Proteins ALA über Protein-Protein

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

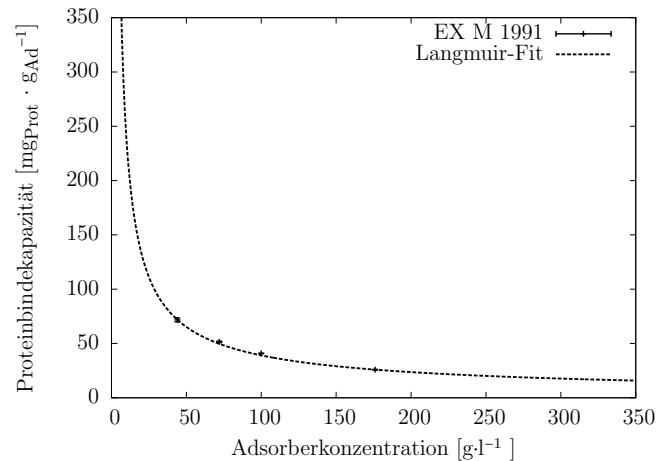


Abbildung 5.4: Kapazitätskurve für EX M 1991 (Fällungskieselsäure) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm

Wechselwirkungen mit dem bereits an das Adsorbens gebundenen Protein BLG scheint schwächer zu sein als die Bindung von BLG an das Adsorbens aus Siliziumoxid. Nach der schnellen Bindung des Proteins BLG aus der Lösung hat eine weitere Erhöhung der Adsorbenskonzentration keinen direkten Einfluss auf die Bindung von ALA, da dieses durch Protein-Protein-Wechselwirkungen und nicht direkt durch Wechselwirkung mit dem Adsorbens gebunden wird. Die Adsorptionisotherme des experimentellen Adsorbens EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid zeigt einen Verlauf ähnlich dem des Adsorbens aus Bentonit/Silica (E XM 1221). Nach einem anfänglich steilen Verlauf der Proteinadsorption strebt die Adsorptionisotherme ab einer Adsorbenskonzentration von 304 g·l<sup>-1</sup> eine Gesamtproteinbindung von über 90 % an (Abb. 5.5). Dieser Wert befindet sich auf Grund der hohen Schüttdichte des Materials von 420 kg·m<sup>3</sup> im experimentellen Messbereich. Bedingt durch die im Vergleich zu EX M 1221 kleinere Gleichgewichtskonstante  $K_L$  von 0,39 l·g<sup>-1</sup> für ALA bzw. 0,48 l·g<sup>-1</sup> für BLG nimmt die Proteinadsorption mit steigender Adsorbenskonzentration in geringerem Maß zu als für das experimentelle Adsorbens EX M 1221 aus Bentonit/Silica. Das experimentelle Adsorbens EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid bindet ebenso wie EX M 1221 (Bentonit/Silica) sowohl ALA als auch BLG (s. Kap. 5.2.3). Die Abnahme der Kapazität des Adsorbens EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) ist weniger steil als für das Adsorbens aus Fällungskieselsäure (EX M 1991). Die Ursache hierfür besteht darin, dass an das Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid beide Proteine direkt binden können, während bei dem Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) die Bindung von ALA über an das Material gebundenes BLG vermittelt wird.

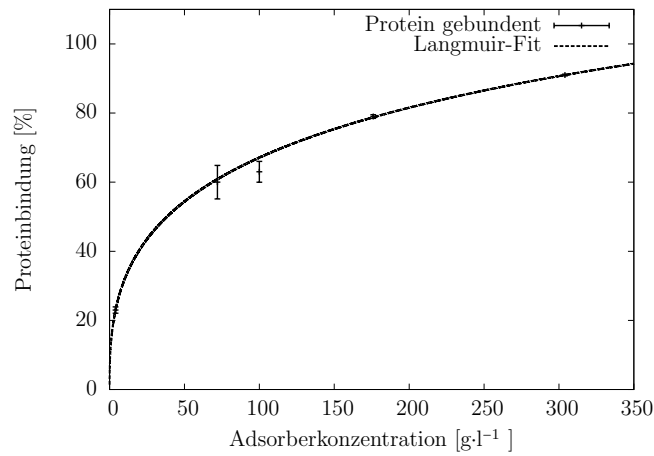


Abbildung 5.5: Adsorptionsisotherme für EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmilke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm

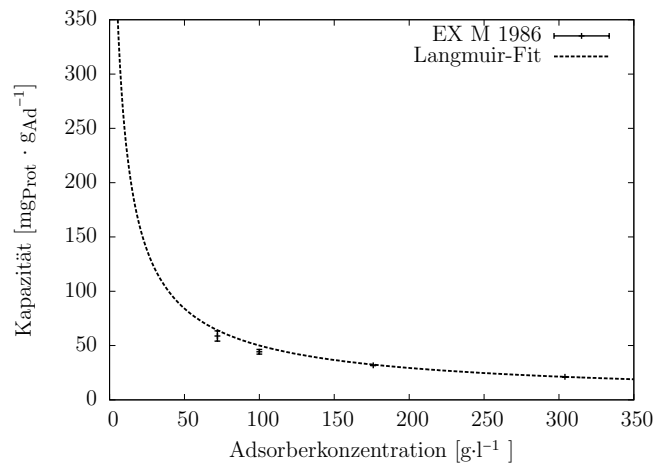


Abbildung 5.6: Kapazitätskurve für EX M 1986  $\gamma$ -Aluminiumoxid bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmilke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm

### 5.2.2 Verteilung des Gesamtproteins über die Prozessschritte

Nach der Betrachtung der Adsorption und deren Beschreibung mittels Langmuir-Isothermen für die Adsorbentien EX M 1221 (Bentonit/Silica), EX M 1991 (Siliziumoxid) und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) rückte die Betrachtung der Proteinverluste bei den Waschschrritten in den Fokus der Untersuchungen. Proteinverluste können aus mehreren Gründen auftreten. Zum einen kann Protein, welches sich in der Flüssigkeit des Zwischenkornraums oder im Flüssigkeitsfilm um das Adsorbens befindet und nicht an das Adsorbens gebunden hat, bei der Abtrennung des Adsorbens von der Adsorbenslösung das Adsorptionssystem verlassen. Zum anderen kann Protein unspezifisch oder an schwächere Bindestellen auf der Adsorbensoberfläche gebunden vorliegen und bei Waschschrritten aus dem Adsorptionssystem ausgetragen werden. Darüber hinaus ist es möglich, dass sich während der Adsorption und mechanischen Durchmischung von Adsorbens und Adsorbenslösung feiner Adsorbensabrieb bildet, welcher zu fein ist, als dass er bei den Fest-Flüssig-Trennungen im System zurückgehalten werden kann. Eine Austragung dieses Adsorbensabriebs und des daran gebundenen Proteins kann eine zusätzliche Quelle für Proteinverluste darstellen. Neben der Adsorption wurde auch die Elution bei steigenden Adsorbenskonzentrationen untersucht. Eine Betrachtung der Gesamtproteinverteilung für EX M 1221 (Bentonit/Silica) über die einzelnen Prozessschritte zeigt neben der Zunahme der Gesamtproteinbindung über steigende Adsorbenskonzentrationen, dass die Menge ausgewaschenen Proteins mit zunehmender Adsorbenskonzentration in den Waschschrritten nur geringfügig ansteigt. Die Verteilung des Gesamtproteins über die Prozessschritte ist für das Adsorbens EX M 1221 (Bentonit/Silica) in Abb. 5.7 dargestellt.

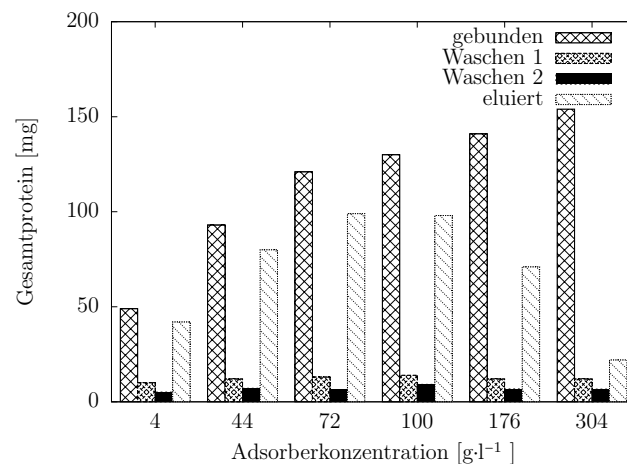


Abbildung 5.7: Verteilung des Gesamtproteins über die Prozessschritte für EX M 1221 (Bentonit/Silica) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm

Hierbei ist der Proteinverlust bei dem zweiten Waschschrritt in der Regel geringer als bei dem ersten. Analog zur Zunahme des gebundenen Gesamtproteins steigt bis zu einer Adsorbierkonzentration von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  auch die Menge des eluierten Proteins kontinuierlich an. Ab der Adsorbierkonzentration von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  jedoch sinkt diese bei zunehmender

Adsorbenskonzentration stark ab. Das Material EX M 1221 aus Bentonit/Silica zeigt einerseits eine starke Adsorption beider Proteine ALA und BLG mit hohen Werten für die Gleichgewichtskonstante  $K_L$ , andererseits steigt die Menge eluierten Proteins ab einer Adsorbenskonzentration von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  trotz der Zunahme gebundenen Gesamtproteins nicht weiter an.

Auch bei dem Adsorbens EX M 1991 aus Siliziumoxid steigt die Menge des gebundenen Gesamtproteins über eine Zunahme der eingesetzten Adsorbenskonzentration. Im Vergleich mit dem Adsorbens EX M 1221 aus Bentonit/Silica verlässt wesentlich mehr Protein das Adsorbens EX M 1991 über die Waschschritte. Die Betrachtung der Verteilung des Gesamtproteins über die Prozessschritte für das Adsorbens EX M 1991 (Siliziumoxid) zeigt des Weiteren, dass es außer bei dem ersten Waschschritt auch noch im zweiten Waschschritt zur Austragung von Protein im Umfang von mehr als 50 % relativ zum ersten Waschschritt kommt (Abb. 5.8).

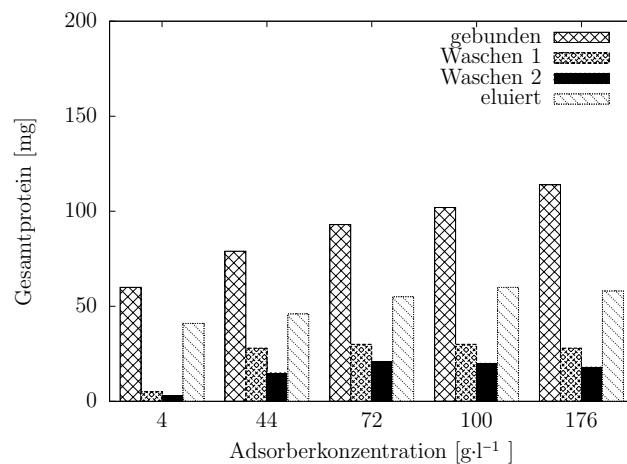


Abbildung 5.8: Verteilung des Gesamtproteins über die Prozessschritte für EX M 1991 (Siliziumoxid) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm

Die Austragung von Protein über die Waschschritte kann wie beispielsweise bei der Adsorbenskonzentration von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  bis zu 55 % des aus dem Überstand gebundenen Gesamtproteins betragen. Hierbei handelt es sich in Anbetracht der Ergebnisse aus Kapitel 4.2 vermutlich vorwiegend um ALA. Eine nähere Betrachtung dessen findet in Kapitel 5.2.3 statt. Bei der Elution kann ab einer Adsorbenskonzentration von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  trotz höherer Proteinbindung keine weitere Steigerung in der Menge des eluierten Proteins mehr erzielt werden. Ab einer Adsorbenskonzentration von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  wird eine vollständige Bindung des Molkeproteins BLG erreicht. Zusätzlich gebundenes Protein (ALA) verlässt das Adsorbens wieder über die Waschschritte. Die Elution des Adsorbens EX M 1991 aus Siliziumoxid liefert reines BLG.

Wie bei den anderen in diesem Kapitel betrachteten Adsorbentien (EX M 1221 und EX M 1991) nimmt auch bei dem Adsorbens EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid die Gesamtproteinbindung über die Adsorbenskonzentration zu. Bei dem Adsorbens EX M 1986

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

( $\gamma$ -Aluminiumoxid) sind, wie bei dem Adsorbens EX M 1221 (Bentonit/Silica), die Verluste durch die Waschschriffe im Verhältnis zu Adsorption und Elution sehr gering (Abb. 5.9).

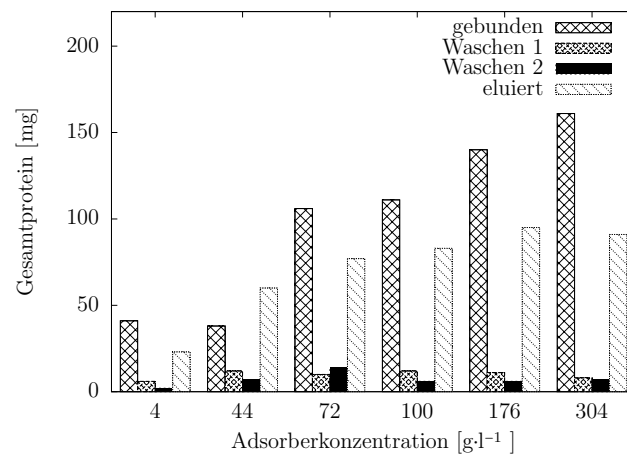


Abbildung 5.9: Verteilung des Gesamtproteins über die Prozessschritte für EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm

Bei den weniger durch Messfehler behafteten höheren Adsorbenskonzentrationen liegen sie für die Summe der Waschschriffe zwischen 10 % und 20 % bezogen auf das eingesetzte Protein. Ab einer Adsorbenskonzentration von 176  $\text{g}_{Ad}\cdot\text{l}^{-1}$  kann trotz höherer Proteinbindung keine weitere Steigerung in der Elution mehr erzielt werden. Dies kann bei dem Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid mehrere Ursachen haben. Mit steigender Adsorbensmenge entstehen immer mehr Zwischenkornvolumina, in welchen Waschwasser nach Zentrifugation und Abdekantieren des Überstandes verbleiben kann. Dieser Effekt fällt bei EX M 1986 vermutlich wesentlich höher ins Gewicht als bei den beiden anderen Adsorbentien (EX M 1221 und EX M 1991), da die Elution dieses Adsorbens mittels eines Eluenten wesentlich niedrigerer Molarität erfolgt (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8). Hierdurch kann es zu einer Verdünnung des Eluenten kommen, welcher dadurch an Elutionskraft verliert. Zum anderen ist es möglich, dass bei den hohen einsetzbaren Mengen des Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) die Menge des Eluenten aus 50 mM Kaliumphosphatpuffer auch ohne die zuvor beschriebenen Verdünnungseffekte des Eluenten für eine vollständige Elution des gebundenen Proteins nicht mehr ausreicht.

### 5.2.3 Verteilung der Einzelproteine bei der Batchbeladung im Labormaßstab

In Kapitel 4.2 wurden Materialien aus Bentonit/Silica (EX M 1221), Siliziumoxid (EX M 1991) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) mittels Adsorptionsisothermen auf ihre Selektivität hinsichtlich der majoren Molkeproteine ALA und BLG untersucht. Des Weiteren wurden die Maximalbeladungen ( $q_{\max}$ ) und die Gleichgewichtskonstanten für die



Adsorption der Proteine ALA und BLG nach Langmuir ( $K_L$ ) bestimmt. Dabei wurde eine konstante Adsorbensmenge mit steigenden Proteinkonzentrationen beladen. In ähnlicher Weise wurde in Kapitel 5.2.1 einer konstanten Proteinmenge eine steigende Menge an Adsorbens zugegeben, um das Optimum aus Adsorbensmenge und Proteinadsorption zu ermitteln. Auftretende Waschverluste, sowie die Elutionseffizienz, wurden in Kapitel 5.2.2 für diese Adsorbentien betrachtet. In diesem Kapitel wird die Verteilung der majoren Molkeproteine ALA und BLG bei der Beladung der Materialien aus Bentonit/Silica, Siliziumoxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid mit Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 Proteinpulver untersucht. Der Begriff Gesamtprotein bezieht sich in diesem Kapitel auf die Summe der betrachteten Proteine, nämlich ALA und BLG. Ebenso beziehen sich relative Angaben, wenn sie auf das Gesamtprotein bezogen sind, auf die Summe der betrachteten Proteine ALA und BLG. Das Adsorbens aus Bentonit/Silica (EX M 1221) ist in der Lage, sowohl ALA als auch BLG bereits bei niedrigen Adsorbenskonzentrationen von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  fast vollständig zu binden. Der prozentuale Gehalt der Überstände an den Molkeproteinen ALA und BLG während der Adsorption ist für das Adsorbens EX M 1221 in Abb. 5.10 dargestellt.

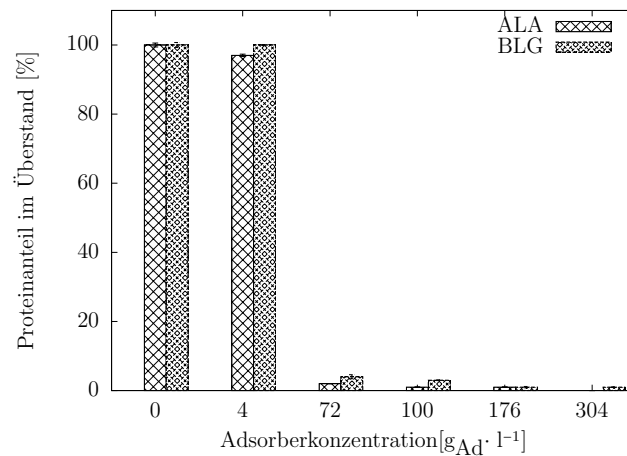


Abbildung 5.10: EX M 1221, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbierkonzentration, 25 ml Testansatz,  $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Gesamtprotein,  $4 - 304 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm

Die rasche und bereits bei niedrigen Adsorbierkonzentrationen fast vollständige Bindung beider Proteine stimmt gut mit den bisherigen Ergebnissen aus den vorangegangenen Kapiteln überein. In Kapitel 4.2 wurde die Gleichgewichtskonstante nach Langmuir, ein Maß für die Affinität der Proteine zu dem Material, für das Adsorbens aus Bentonit/Silica zu  $K_L = 6,59 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$  für ALA und zu  $K_L = 2,32 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$  für BLG bestimmt. Die ab der Adsorbierkonzentration von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  im Überstand verbliebenen Mengen der Proteine ALA und BLG liegen unter 5 % der eingesetzten Mengen und nehmen bei steigender Adsorbiermenge noch geringfügig weiter ab. Die Anteile der Proteine ALA und BLG in den Überständen verändern sich über die Zunahme der Adsorbierkonzentrationen von einer zur nächst höheren Adsorbierkonzentration in nur geringem Umfang. Hierbei wird ALA mit steigender Adsorbierkonzentration über den gesamten betrachteten Bereich von 4 bis

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

$304 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  zunehmend stärker gebunden als BLG. Abb. 5.11 zeigt das relative Verhältnis der Molkeproteine ALA und BLG in den Überständen während der Adsorption bei steigender Konzentration des Adsorbens EX M 1221 aus Bentonit/Silica.

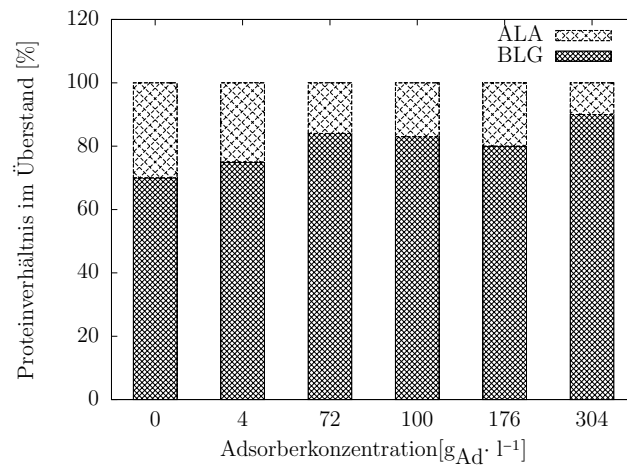


Abbildung 5.11: EX M 1221, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz,  $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Gesamtprotein, 4 -  $304 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm

Mit steigender eingesetzter Adsorbensmenge geht eine kontinuierliche Verschiebung des relativen Verhältnisses der Proteine ALA und BLG zueinander zu reinem BLG einher. Das gebundene ALA kann in der anschließenden Elution mit einem Eluenten aus  $0,5 \text{ M NaOH} + 1 \text{ M NaCl}$  unabhängig von der Adsorbenskonzentration nicht wieder vom Adsorbens EX M 1221 aus Bentonit/Silica entfernt werden. Der prozentuale Gehalt der Überstände an den Molkeproteinen ALA und BLG bei der Elution von EX M 1221 (Bentonit/Silica) ist in Abb. 5.12 dargestellt. BLG hingegen kann bei einer Adsorbenskonzentrationen von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  und  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  zu 40 % der bei der Adsorption eingesetzten Menge wieder von dem Adsorbens aus Bentonit/Silica eluiert werden. Bei höheren Adsorbenskonzentrationen nimmt die Menge an eluiertem Protein trotz der Zunahme der Menge an aus dem Überstand gebundenen Protein wieder ab. Auch die Darstellung der Verhältnisse der Molkeproteine ALA und BLG in den Elutionsproben zueinander zeigt, dass von dem Adsorbens EX M 1221 (Bentonit/Silica) eluiertes Protein bei allen Adsorbenskonzentrationen nahezu vollständig aus BLG besteht. Abb. 5.13 zeigt das relative Verhältnis der Molkeproteine in den Überständen während der Desorption bei steigender Adsorbenskonzentration von EX M 1221. Das Adsorbens EX M 1221 aus Bentonit/Silica ist somit in der Lage, die beiden Molkeproteine ALA und BLG bereits bei niedrigen Adsorbenskonzentrationen nahezu vollständig zu binden. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche. Bei der Bindung der Proteine wird ALA, das Protein mit der höheren Gleichgewichtskonstanten nach Langmuir ( $K_L$ ), über steigende Adsorbenskonzentrationen geringfügig stärker gebunden als das Protein BLG. In den Elutionsproben des Adsorbens aus Bentonit/Silica (EX M 1221) kann jedoch kein ALA wiedergefunden werden. Die für dieses Adsorbens typischen sehr geringen Waschverluste können für die vollständige Austragung des Proteins ALA über die Waschstapen (s. Kap. 5.2.2) nicht verantwortlich sein. ALA verbleibt somit

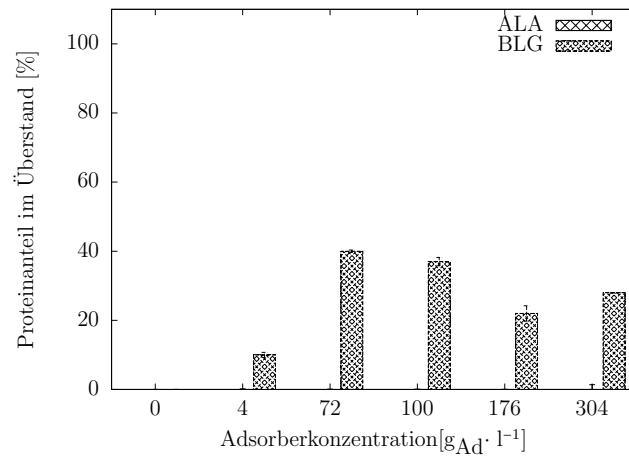


Abbildung 5.12: EX M 1221, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Elutionen aus Ansätzen steigender Adsorbenskonzentration, Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver, 25 ml Testansatz, Eluent: 0,5 M NaOH + 1 M NaCl, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm

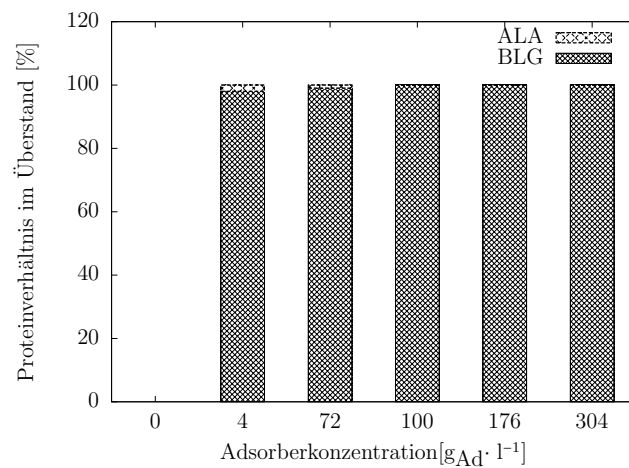


Abbildung 5.13: EX M 1221, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Elutionen aus Ansätzen steigender Adsorbenskonzentration, Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver, 25 ml Testansatz, Eluent: 0,5 M NaOH + 1 M NaCl, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

auf dem Adsorbens EX M 1221 und würde in einem Aufarbeitungsprozess verloren gehen, sowie die Adsorbensoberfläche dauerhaft und zunehmend belegen. Damit ist das Adsorbens für den Zweck einer Aufarbeitung der Hauptkomponenten der Molke nicht geeignet und wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nicht weiter betrachtet.

Versuche mit dem Adsorbens EX M 1991 aus Siliziumoxid zeigen, dass dieses in der Lage ist, das majore Molkeprotein BLG rasch und bis zu einer Adsorbenskonzentration von  $176 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  nahezu vollständig aus dem Überstand zu binden. Die Abnahme der Menge des Proteins BLG im Überstand ist am stärksten bei einer Erhöhung der Adsorbenskonzentration von  $4 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  auf  $44 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$ . Ab Adsorbenskonzentrationen über  $44 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  nimmt die Menge an BLG im Überstand in weit geringerem Umfang weiter ab. ALA wird von dem Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) bis zu einer Adsorbenskonzentration von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  weit weniger stark gebunden als BLG. Bereits ab einer Adsorbenskonzentration von  $4 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  bleibt die Abnahme der Menge des majoren Molkeproteins ALA im Überstand deutlich hinter der Abnahme der Menge von BLG im Überstand zurück. Eine deutliche Steigerung der Abnahme der Menge des majoren Molkeproteins ALA kann ab einer Adsorbenskonzentration von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  beobachtet werden. Bei dieser Adsorbenskonzentration sind bereits 85 % des BLG an das Adsorbens gebunden, wohingegen sich noch 82 % des eingesetzten ALA im Überstand befinden. Abb. 5.14 zeigt das relative Verhältnis der Molkeproteine ALA und BLG in den Überständen während der Adsorption bei steigender Konzentration des Adsorbens EX M 1991 aus Siliziumoxid.

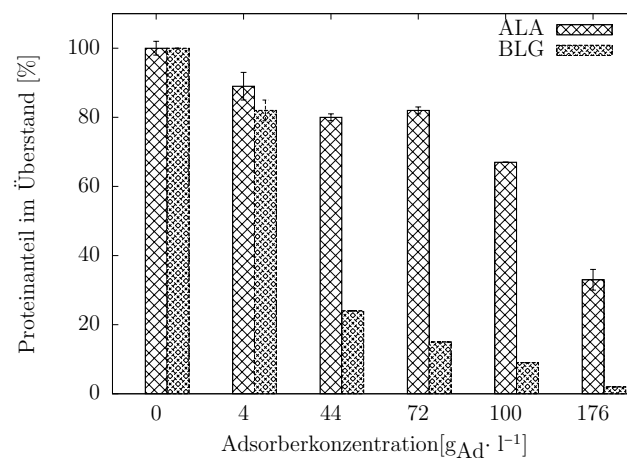


Abbildung 5.14: EX M 1991, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbierkonzentration, 25 ml Testansatz,  $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Gesamtprotein, 4 - 304  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm

Ab der Adsorbierkonzentration von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  setzt die bereits zuvor erwähnte Co-Adsorption von ALA ein und seine Menge im Überstand nimmt bis auf 33 % der eingesetzten Menge ab. Eine Einzelbetrachtung der Verhältnisse der Molkeproteine ALA und BLG in den Überständen zueinander über eine steigende Adsorbierkonzentration in Abb. 5.15 zeigt eine kontinuierliche Zunahme von ALA.

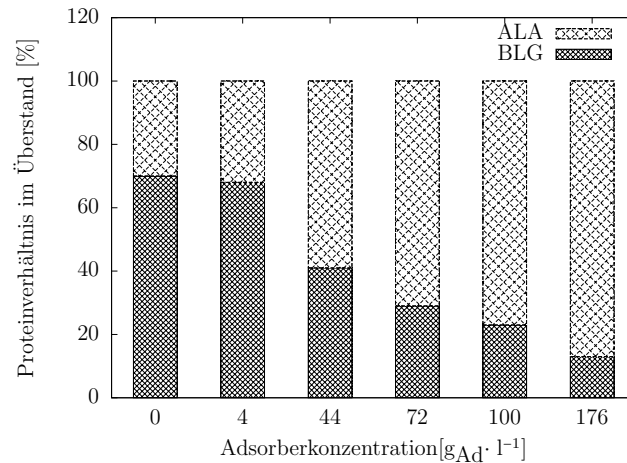


Abbildung 5.15: EX M 1991, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbierkonzentration, 25 ml Testansatz,  $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Gesamtprotein, 4 -  $304 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm

Nach einem sprunghaften Anstieg des Anteils von ALA von 32 % auf 59 % im Überstand bei einer Erhöhung der Adsorbierkonzentration von  $4 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  auf  $44 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  nimmt sein Anteil bis zu einer Adsorbierkonzentration von  $176 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  bis auf 87 % zu. In Elutionsproben des Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) konnte mittels RP-HPLC-Analytik bis zu einer Adsorbierkonzentration von einschließlich  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  kein ALA in signifikanter Menge nachgewiesen werden (Abb. 5.16). An das Adsorbens EX M 1991 aus Siliziumoxid co-adsorbiertes ALA verlässt das Adsorbens über die Waschschriffe wieder und kann bei der Elution daher nicht wiedergefunden werden. Die Mengen an über die Waschschriffe ausgetragenen Proteins sind aus den Ergebnissen aus Kapitel 5.2.2 dafür ausreichend. Die einzige Ausnahme stellt die Elution von  $176 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  dar. Bei dieser Adsorbierkonzentration wurde das co-adsorbierte ALA nicht vollständig über die Waschschriffe aus dem Testansatz ausgetragenen und kann zu 20 % der eingesetzten Menge in der Elution wiedergefunden werden. Die Einzelbetrachtung der Verhältnisse der Molkeproteine ALA und BLG zueinander in den Elutionen zeigt, dass alle Elutionsproben von  $4 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  bis  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  im Rahmen der Messfehler ausschließlich aus BLG bestehen (Abb. 5.17). Allein die Elutionsprobe bei einer Konzentration des Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) besteht nur zu 69 % aus BLG und zu 31 % aus ALA. Die bei der Adsorption ab einer Adsorbierkonzentration von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  beobachtet Co-Adsorption der Proteine ALA und BLG hat also erst bei einer Adsorbierkonzentration von  $176 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  Auswirkungen auf die Proteinzusammensetzung der Elutionsproben. Bei einer Adsorbierkonzentration von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  in geringen Mengen gebundenes ALA verlässt das Adsorbens wieder bei den Waschschriffen. Die Versuche mit dem Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) zeigen, dass das Material das Molkeprotein BLG deutlich stärker bindet als ALA. Ab Adsorbierkonzentrationen von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  liegen über 80 % des eingesetzten BLG gebunden am Adsorbens vor, wohingegen sich bei dieser Adsorbierkonzentration noch über 80 % des eingesetzten ALA im Überstand befinden. Mit steigender Adsorbierkonzentration verbleibt ALA in zunehmender Reinheit im Überstand. Die Elution des Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991)

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

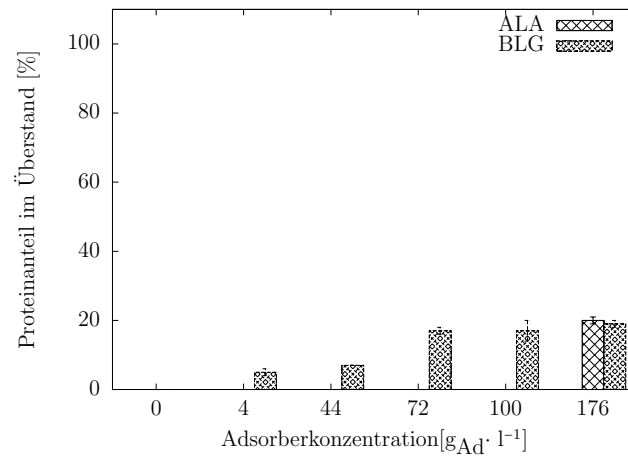


Abbildung 5.16: EX M 1991, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Elutionen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, Eluent: 0,5 M NaOH + 1 M NaCl, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm

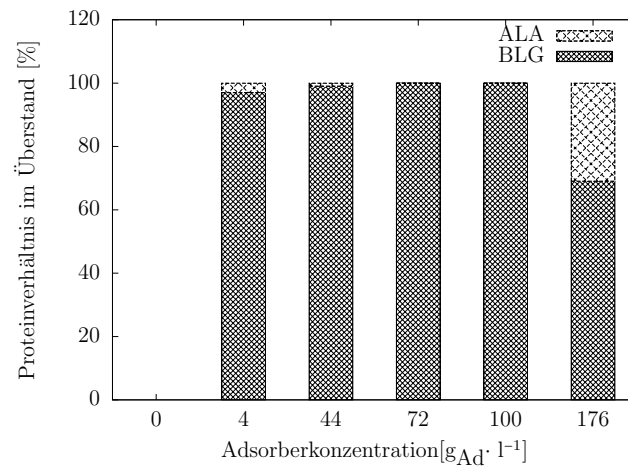


Abbildung 5.17: EX M 1991, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Elutionen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, Eluent: 0,5 M NaOH + 1 M NaCl, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm

liefert bis zu Adsorbierkonzentrationen von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  nahezu reines BLG. Das Material aus Siliziumoxid (EX M 1991) besitzt folglich ein Optimum für die Trennung von ALA und BLG bei einer Adsorbierkonzentration von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$ . BLG kann mit dem Eluenten aus  $0,5 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M NaCl}$  zu  $20 \%$  der eingesetzten Menge wieder von dem Adsorbens entfernt werden.

Versuche mit dem Adsorbens EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid zeigen eine Abnahme der Mengen der majoren Molkeproteine ALA und BLG im Überstand auf  $40 \%$  des Feedwertes bereits bei Adsorbierkonzentrationen von  $4 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  (Abb. 5.18).

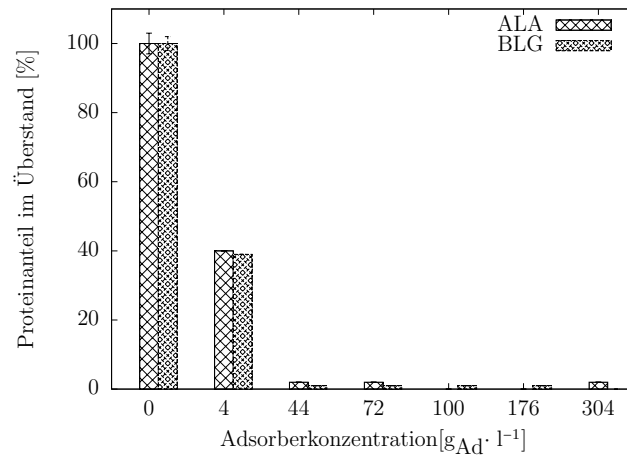


Abbildung 5.18: EX M 1986, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbierkonzentration,  $25 \text{ ml}$  Testansatz,  $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Gesamtprotein,  $4 - 304 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für  $30 \text{ min}$  bei  $25 \text{ rpm}$

Beide Proteine, sowohl ALA als auch BLG, werden in selbem Umfang vom Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid gebunden. Unterschiede in den Abnahmen ihrer Mengen im Überstand sind nur gering und liegen im Bereich der Standardabweichung. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Adsorptionsisothermen aus Kapitel 4.2. Vergleichbare Maximalbeladungen der Proteine ( $363 \text{ mg}_{Prot} \cdot \text{g}_{Ad}^{-1}$  für ALA und  $345 \text{ mg}_{Prot} \cdot \text{g}_{Ad}^{-1}$  für BLG) und ähnliche  $K_L$ -Werte ( $0,39 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$  für ALA und  $0,48 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$  für BLG) legten bereits in diesem Kapitel den Schluss eines ähnlichen Adsorptionsverhalten beider Proteine nahe. Eine Erhöhung der Adsorbierkonzentration auf  $44 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  bewirkt eine nahezu vollständige Bindung beider Proteine. Mit zunehmender Adsorbierkonzentration steigt der Anteil von ALA am Gesamtprotein bei der Adsorption im Überstand bis zu einer Adsorbierkonzentration von  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$ . Ab  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  geht der Anteil des in geringen Mengen im Überstand verbleibenden ALA bei weiterer Zunahme der Adsorbierkonzentration bis auf nahezu Null zurück. Das bei der höchsten Adsorbierkonzentration von  $304 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  in geringen Mengen im Überstand verbleibende Protein besteht aus reinem BLG. Abb. 5.19 zeigt das relative Verhältnis der Molkeproteine ALA und BLG in den Überständen während der Adsorption bei steigender Konzentration des Adsorbens EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid.

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

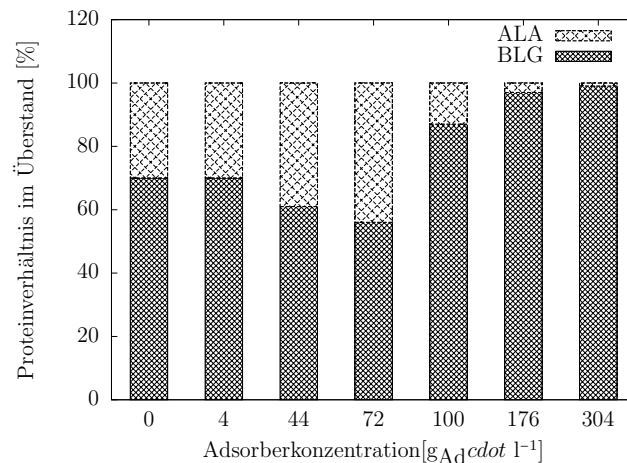


Abbildung 5.19: EX M 1986, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbierkonzentration, 25 ml Testansatz,  $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Gesamtprotein, 4 -  $304 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Adsorbier, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm

Mit einem Eluenten aus 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8 (KPP) können bis zu 60 % des eingesetzten ALA bei einer Adsorbierkonzentration von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  wiedergewonnen werden (Abb. 5.20). Der Anteil des ALA am Gesamtprotein beträgt bei dieser Adsorbierkonzentration über 80 %. Mit weiter steigender Adsorbierkonzentration nimmt die eluierte Menge an ALA wieder ab. Im Gegensatz dazu übersteigt die Elution des Adsorbier aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) mit 50 mM KPP für BLG in keinem der Ansätze höherer Werte als 20 % (Abb. 5.21). Der Anteil des BLG am eluierten Gesamtprotein ist mit Ausnahme der Adsorbierkonzentration von  $4 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  stets wesentlich geringer als im Feed. An das Adsorbier aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid bindet im Gegensatz zu dem Adsorbier aus Siliziumoxid (EX M 1991) beide Proteine bereits ab einer Adsorbierkonzentration von  $44 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  nahezu vollständig. Hierbei erfolgt die Bindung von ALA stärker als die von BLG, die Überstände bestehen bei höheren Adsorbierkonzentrationen zunehmend aus reinem BLG. Auch dieses Verhalten steht in direktem Gegensatz zu dem des Adsorbier EX M 1991 aus Siliziumoxid. Bei der Elution werden bei einer Adsorbierkonzentration von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  60 % des eingesetzten ALA wiedergewonnen. Diese Konzentration des Adsorbier aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid liefert somit die besten Ergebnisse für die Aufreinigung von ALA aus Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver. Die von der Adsorbierkonzentration abhängigen Selektivitäten der Adsorbentien aus Siliziumoxid (EX M 1991) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) hinsichtlich der Proteine ALA und BLG bei Adsorption und Elution legen die Möglichkeit nahe über deren Kombination eine Trennung dieser Proteine zu erreichen. Nach der Adsorption von über 80 % des in Molke enthaltenen BLG an das Adsorbier aus Siliziumoxid (EX M 1991) bei einer Adsorbierkonzentration von 72 –  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  verbleibt eine Lösung aus Lactose und 80 % des eingesetzten ALA. Das verbliebene ALA kann daraufhin an das Adsorbier aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) gebunden werden und es verbleibt eine an Protein und Mineralien abgereicherte Lactoselösung. Beide Proteine lassen sich mit einer Reinheit zwischen 80 und 100 % wieder von den Adsorbentien eluieren.



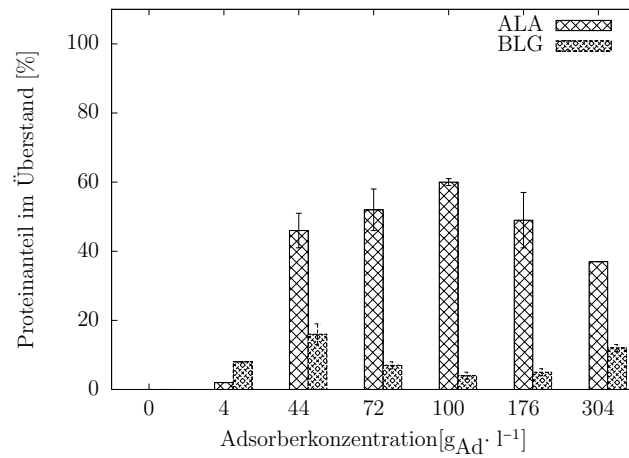


Abbildung 5.20: EX M 1986, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Elutionen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, Eluent: 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm

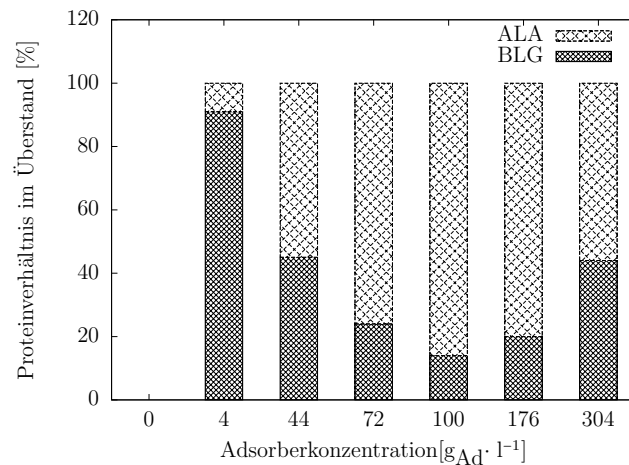


Abbildung 5.21: EX M 1986, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Elutionen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, Eluent: 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm

## 5.3 Proteinadsorption an Adsorbentien in Pulverform

### 5.3.1 Proteinadsorption im Rührkessel mit Adsorbentien in Pulverform

In dem vorangegangenen Kapitel 5.2.3 wurde im Labormaßstab gezeigt, dass mit den Adsorbentien aus Siliziumoxid (EX M 1991) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) eine Trennung der Proteine ALA und BLG theoretisch möglich ist. Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Kapitel wurden Adsorbentien aus Siliziumoxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid in Reaktoren mit einem Arbeitsvolumen von bis zu zwei Litern eingesetzt. Der Reaktor, befüllt mit 0,5 Litern Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver (UL35), wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 min Adsorptionszeit konnten von 33 g EX M 1991 (Siliziumoxid) 39 % des eingesetzten Gesamtproteins gebunden werden (Abb. 5.22).

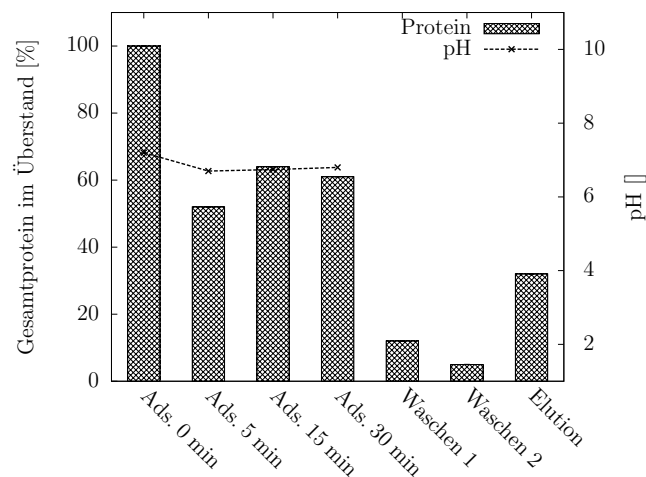


Abbildung 5.22: Gesamtprotein über den Batchprozess für 33 g EX M 1991 (Siliziumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver ( $6,63 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gesamtprotein), Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert)

Die Waschverluste belaufen sich auf 17 % des eingesetzten Proteins, wobei es sich um ALA handelt. In Kap. 5.2.3 wurde gezeigt, dass bei dieser Adsorbenskonzentration 80 % des BLG und 20 % des ALA an das Adsorbens gebunden vorliegen. Da ALA über die schwachen Protein-Protein-Wechselwirkungen gebunden wird und alleine nicht an das Adsorbens binden kann (s. Kap. 4.2), verlässt es das Adsorbens bei den Waschschrte wieder. Bei der Elution werden 82 % des gebundenen Proteins, ein Wert der dem Anteil des gebundenen BLG entspricht, vom Adsorbens eluiert. Bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge werden 32 % des Proteins wiedergewonnen. Die Kapazität hinsichtlich der Gesamtproteinbindung beträgt 39 mg Protein pro Gramm Adsorbens. Eine Erhöhung der eingesetzten Menge des Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) auf 83 g (um 152 %) führte zu einer Bindung von 61 % des Gesamtproteins. Dieser Bindungswert korreliert sehr gut mit dem Wert der Adsorptionsisotherme aus Kap. 5.2.1 von 63 %. Die Waschverluste betragen nun 33 %, was einer Verdopplung im Vergleich zum Ansatz mit 33 g entspricht. Abb. 5.23 zeigt den Verlauf der Proteinadsorption über den Batchprozess mit 83 g EX M 1991 aus Siliziumoxid.

### 5.3 Proteinadsorption an Adsorbentien in Pulverform

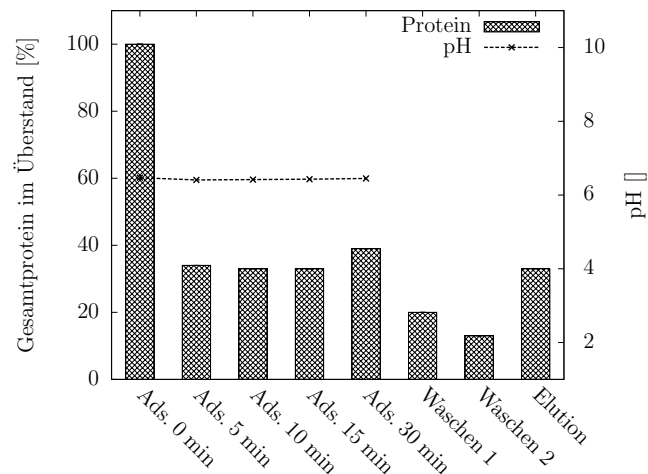


Abbildung 5.23: Gesamtprotein über den Batchprozess für 83 g EX M 1991 (Siliziumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver ( $6,63 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gesamtprotein), Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert)

Auch in diesem Fall besteht das bei den Waschsritten verlorene Protein aus ALA. Bei einer eingesetzten Adsorbensmenge von 83 g (entspricht  $164 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) liegt BLG zu 100 % und ALA zu 35 % am Adsorbens gebunden vor, wie Kap. 5.2.3 zeigte. Nach Elution werden 45 % der gebundenen Menge an Gesamtprotein wiedergefunden, bei welchem es sich um reines BLG handelt. Diese bei einer eingesetzten Adsorbensmasse von 83 g eluierte Proteinmenge entspricht 27 % des eingesetzten Proteins. Der pH-Wert bleibt für das Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) über den Prozessverlauf nahezu konstant zwischen 6,5 und 7,0.

Das Adsorbens EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) kann in Ansätzen mit 33 g Adsorbensmasse nach 30 min Adsorptionszeit 42 % des eingesetzten Proteins aus der Lösung binden (Abb. 5.24). Die zwei Waschsritte führen zu einem Gesamtverlust an Protein von 9 % und die Elution liefert 86 % des gebundenen (entspricht 36 % des eingesetzten) Proteins. Pro Gramm Adsorbens werden somit 42 mg Protein gebunden. Durch eine Erhöhung der eingesetzten Adsorbensmasse auf 83 g können nach 30 Minuten Adsorptionszeit 77 % des eingesetzten Proteins aus der Lösung gebunden werden (Abb. 5.25). Dies entspricht exakt dem Bindungswert der Isotherme aus Kap. 5.2.1. Auch für dieses Adsorbens geht die Erhöhung der eingesetzten Adsorbensmenge mit einer Zunahme der Verluste an Protein bei den Waschsritten einher. Es gehen durch die Waschsritte nun insgesamt 32 % des eingesetzten Proteins verloren. Mittels eines 50 mM Kaliumphosphatpuffers pH 8 können 42 % des gebundenen Proteins wieder eluiert werden, dies entspricht 33 % des eingesetzten Proteins. Tab. 5.1 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse des Kapitels. Mit steigender Adsorbensmenge kann immer mehr Protein aus der Lösung gebunden werden, aber auch Waschverluste nehmen für EX M 1991 (Siliziumoxid) stark, für EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) weit weniger stark, zu. Bezogen auf die gebundene Proteinmenge nimmt die Menge des eluierten Proteins für beide Adsorbentien stark ab. Für das Adsorbens aus Siliziumoxid ist dies dadurch begründet, dass ALA nicht direkt mit dem Adsorbens interagiert, sondern vermutlich über Protein-Protein Wechselwirkungen mit dem bereits gebundenen BLG adsorbiert. Im Fall des Adsorbens EX M 1986 aus ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) ist die Ursache hierfür

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

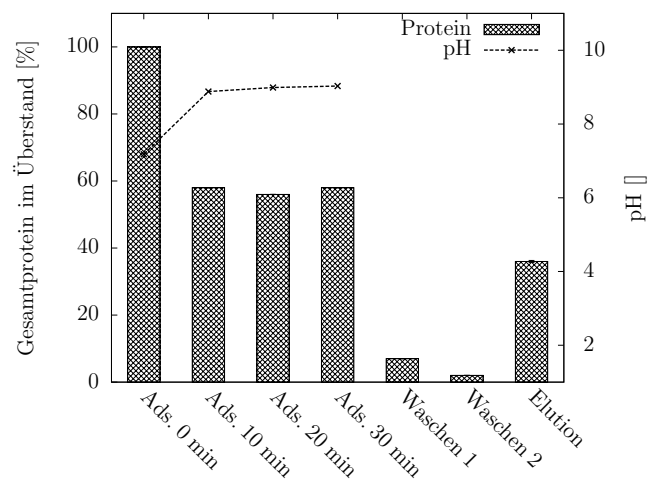


Abbildung 5.24: Gesamtprotein über den Batchprozess für 33 g EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver ( $6,63 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gesamtprotein), Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert)

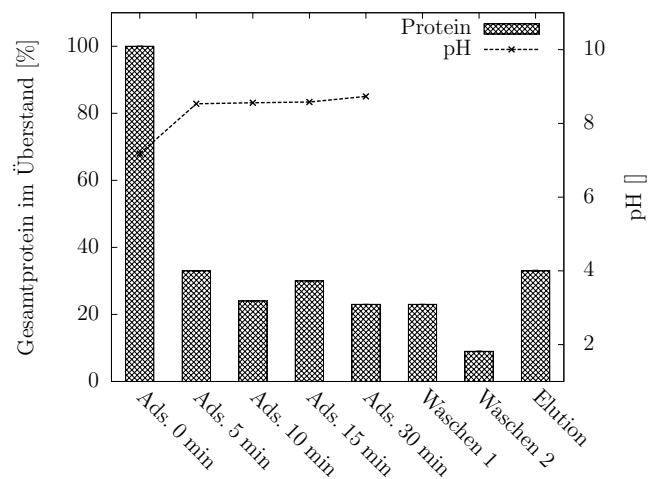


Abbildung 5.25: Gesamtprotein über den Batchprozess für 83 g EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver ( $6,63 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gesamtprotein), Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert)

### 5.3 Proteinadsorption an Adsorbentien in Pulverform

Tabelle 5.1: Übersicht über die Rührkesselversuche hinsichtlich Gesamtproteinbindung. (g) Wert bezogen auf an das Adsorbens gebundenes Protein, (e) Wert bezogen auf eingesetzte Proteinmasse, Proteinquelle angegeben als Mehrfaches des in Dünnmolke vorliegenden Wertes hergestellt aus MK (Molkekonzentrat) oder UL35 (Ultralac 35 Proteinpulver)

Adsorbens	Proteinquelle	Adsorbensmasse [g]	Adsorbensvolumen [ml]	Proteinbindung [%]	Proteinelution [%]	Eluent	Kapazität [ $\frac{\text{mg}_{\text{Prot}}}{\text{g}_{\text{Ad}}}$ ]
EX M 1991	UL 35 1x	33	151	39	82 (g) 32 (e)	0,5 M NaOH + 1 M NaCl	39
	UL 35 1x	83	378	61	45 (g) 27 (e)	0,5 M NaOH + 1 M NaCl	23
EX M 1986	UL 35 1x	33	79	42	86 (g) 36 (e)	50 mM KPP	42
	UL 35 1x	83	198	77	42 (g) 33 (e)	50 mM KPP	31

vermutlich die mit steigender Adsorbenskonzentration zunehmend ineffizienter werdende Elution, wie bereits in Kapitel 5.2.2 beschrieben. Bezogen auf das eingesetzte Protein bleibt die Menge des eluierten Proteins nahezu konstant. Im Gegensatz zu dem Adsorbens basierend auf Siliziumoxid (EX M 1991) steigt der pH-Wert bei dem Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) stetig auf Werte bis pH 9 an.

#### 5.3.2 Einfluss des pH-Werts auf die Adsorptionskapazität

Über den Verlauf der Adsorption kam es bei dem Einsatz von Adsorbentien aus Siliziumoxid (EX M 1907 und EX M 1991) nur zu geringfügigen Änderungen des pH-Wertes der Proteinlösungen. Im Gegensatz hierzu veränderte sich der pH-Wert der Proteinlösungen bei dem Einsatz von Adsorbentien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986 und EX M 2070) um fast zwei pH-Einheiten in Richtung basischer Werte (Kap. 5.3.1). Die Darstellung von  $\gamma$ -Aluminiumoxid erfolgt durch thermische Dehydroxylierung von Rohstoffen wie Bohemit (s. Kap. 2.4.3). In wässriger Lösung läuft auch bei Raumtemperatur die Gegenreaktion, die Bildung hydroxylierten Aluminiumoxids, ab (Garcia et al., 2007). Durch Hydroxylierung der Aluminolgruppen an der Adsorbensoberfläche entstehen bei pH 6 Al-OH<sub>2</sub><sup>+</sup> Gruppen, welche als Anionentauscher fungieren können. Bei dieser Hydroxylierungsreaktion werden der wässrigen Lösung Protonen entzogen, was in einer Zunahme des pH-Wertes der Lösung resultiert. Der pH-Wert der wässrigen Lösung verschiebt sich dabei in die Nähe des Nullladungspunktes des Adsorbens, welcher zwischen pH-Werten von 8,0 und 9,6 liegt (Wang et al., 2002; Kosmulski, 2004). In diesem Kapitel soll überprüft werden, ob diese Verschiebung des pH-Wertes der Proteinlösung zu einer Verminderung der Proteinbindung führt und ob ein Konstanthalten des pH-Wertes (pH-stat) bei der Adsorption die Bindung der Molkeproteine verbessert. PH-stat-Versuche, bei denen der pH-Wert durch den Einsatz von Säure (HCl) über die Adsorptionszeit konstant gehalten wurde, zeigen, dass dadurch

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

die adsorbierte Proteinmenge um 5 % gesteigert werden kann (Abb. 5.26).

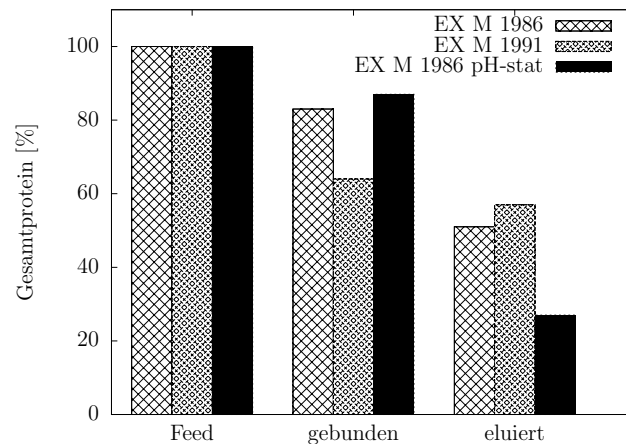


Abbildung 5.26: Proteinbindung an EX M 1991 (Siliziumdioxid), EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) ohne pH-Kontrolle und unter pH-stat Bedingungen, 5 g Adsorbens, 25 ml Arbeitsvolumen, 30 min Beladen, 2 x 10 min Waschen mit ddH<sub>2</sub>O, 30 min Elution, Konstanthalten des pH-Wertes durch Zugabe von HCl

Die Menge des eluierten Proteins halbiert sich jedoch in demselben pH-stat Ansatz im Vergleich zu den Versuchsansätzen ohne pH-Kontrolle bei der Adsorption. Die zum Konstanthalten des pH-Wertes eingebrachten Protonen scheinen mit den Anionen des Eluenten (50 mM KPP pH 8) zu interagieren, welcher dadurch an Elutionskraft verliert. Der pH-stat Ansatz bringt somit keinen Vorteil gegenüber dem bisherigen Adsorptionsansatz ohne pH-Kontrolle. Die geringfügige Verbesserung der Proteinadsorption bei dem Adsorbens EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid steht in keinerlei sinnvollem Verhältnis zur Verschlechterung der Ergebnisse bei der Desorption der Molkeproteine.

## 5.4 Proteinadsorption an Adsorbenspartikel

### 5.4.1 Voruntersuchungen zur Stabilität der Adsorbentien

Die Anwendung in Rührkesseln setzt hohe Anforderungen an die mechanische Stabilität der eingesetzten Adsorbentien. Die mechanische Stabilität der Materialien wurde mittels des Stabilitätstests nach UNILEVER untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 dargestellt.

Tabelle 5.2: Abriebtest nach UNILEVER für die Materialien EX M 1907 und EX M 2070. Abrieb von 5 g Adsorbens über 2 min in 500 ml demineralisiertem Wasser mit einem 5 cm langen Rührfisch (Wiesen, 2010)

Adsorbens	EX M 1907	EX M 2070
Stabiler Anteil [%]	94,10	99,43
Zerkleinerter Anteil [%]	4,52	0,23
Zerstörter Anteil [%]	1,38	0,34

Die Ergebnisse der Untersuchungen nach UNILEVER zeigen, dass bei dem Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) nur ein sehr geringer Abrieb auftritt. Es bleiben 99,43 % des eingesetzten Adsorbens intakt. Der zerkleinerte Anteil liegt bei 0,23 % und 0,34 % des Adsorbens werden in dem Testverfahren zerstört. Bei dem Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1907) liegen sowohl der zerkleinerte, als auch der zerstörte Anteil höher als bei dem Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid. Die Stabilitätsuntersuchungen nach UNILEVER zeigen, dass 94,10 % der Partikel EX M 1907 aus Siliziumoxid über den Testverlauf intakt bleiben. 4,52 % der Partikel werden zerkleinert und 1,38 % werden zerstört. Auf Grundlage der Untersuchungen nach UNILEVER wurden die Adsorbenspartikel grundsätzlich für den Einsatz im Rührkessel als geeignet erachtet.

### 5.4.2 Proteinadsorption im Rührkessel an Adsorbenspartikel

Zur vereinfachten Abtrennung der Adsorbentien wurden partikuläre Formen der Adsorbentien aus Siliziumoxid (EX M 1907) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) getestet. Der Vorteil des Einsatzes von Adsorbentien in partikulärer Form bestünde in einer starken Verfahrensvereinfachung durch den Wegfall der Notwendigkeit einer Abtrennung des Adsorbenspulvers am Ende des Satzprozesses mittels Filtrations- oder Zentrifugationsverfahren. Die Adsorbenspartikel könnten bei der Entleerung der Flüssigphase mittels Sieben am Ausgang der als Rührkessel betriebenen Reaktoren im Reaktor zurückgehalten werden. Sowohl Adsorption als auch Waschstufen und Elution könnten in einem einzigen Rührkessel stattfinden, was den apparativen Aufwand des Verfahrens deutlich reduziert. In einem Ansatz mit 55 g des partikulären Adsorbens EX M 1907 aus Siliziumoxid und Dünnmolke aus Ultralac 35 (6,63 g·l<sup>-1</sup> Gesamtprotein) können nach 30 Minuten gemittelt 30 % des eingesetzten Proteins gebunden werden. Die Bindung liegt damit noch unter dem Anteil von BLG in Dünnmolke. Der Verlauf der Proteinadsorption im Rührkessel mit 55 g EX M 1907 (Siliziumoxid) ist in Abb. 5.27 dargestellt.

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

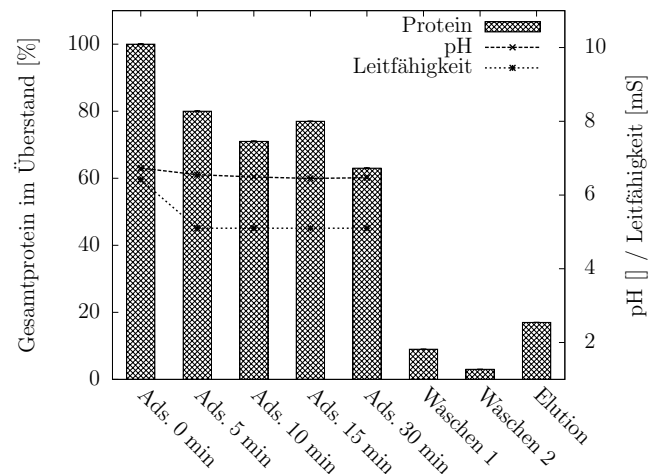


Abbildung 5.27: Verlauf der prozessrelevanten Parameter über den Batchprozess für 55 g EX M 1907 (Siliziumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver ( $6,63 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gesamtprotein). Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert), LW (Leitwert [ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ])

Die bei dem Waschen der Partikel zwischen Adsorption und Elution auftretenden Verluste betragen insgesamt 12 %. Bei der Elution des Adsorbens E XM 1907 können 46 % des gebundenen Proteins wiedergewonnen werden, dies entspricht 17 % des eingesetzten Proteins. Es wird somit etwa ein Drittel des Proteins BLG in dem Versuchsansatz aufgearbeitet. Pro Gramm Adsorbens werden 25 mg Protein gebunden. Die Leitfähigkeit zeigt nach einer geringen Abnahme um 18 % nach 5 Minuten keine signifikanten Veränderungen und bleibt bis zum Ende des Adsorptionsschrittes konstant. In Versuchen mit Dünnmolke aus Molkekonzentrat konnten dieselben Beobachtungen für pH-Wert und Leitfähigkeit gemacht werden.

Die Erhöhung der Menge des Adsorbens EX M 1907 um 53 % auf 84 g bewirkt eine Bindung von 44 % des Gesamtproteins. Dies entspricht einer Zunahme der Bindung um 7 %. Im Vergleich dazu liegt die Gesamtproteinbindung bei dem Adsorbens des gleichen Materials in Pulverform (EX M 1991) bei einer vergleichbaren Adsorbensmenge von 83 g mit 61 % deutlich höher. Schüttungen der Pulverform EX M 1991 besitzen mit  $160 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  nahezu dieselbe BET-Oberfläche wie Schüttungen der Partikelform EX M 1907 mit  $157 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ . Dies bedeutet, dass die Oberfläche in den Poren, welche in der BET-Messung mit erfasst wurde, bei dem Porenradius von  $143 \text{ \AA}$  nicht oder nur in sehr geringem Umfang für die Adsorption von BLG nutzbar ist. Die Proteinadsorption an Partikel aus Siliziumoxid (EX M 1907) findet somit vorwiegend bis ausschließlich an der (porösen) Partikeloberfläche statt. Der Beitrag der Oberfläche der Poren im Inneren der Partikel ist im Gegensatz zur Adsorption an der Partikeloberfläche für Protein somit nur sehr gering. Bei der Elution befinden sich in dem Eluat des Adsorbens EX M 1907 61 % des gebundenen Proteins. Diese eluierte Menge entspricht 26 % des eingesetzten Proteins und ist wiederum vergleichbar mit dem Ergebnis des Adsorbenspulvers EX M 1991 aus Kap. 5.3.1 mit einem Zahlenwert von 27 %. Pro Gramm eingesetztem Adsorbens können somit 17 mg Protein aus dem Überstand gebunden werden. Der Verlauf der Proteinadsorption im Rührkessel mit 84 g EX M 1907 ist in Abb. 5.28 dargestellt.



## 5.4 Proteinadsorption an Adsorbenspartikel

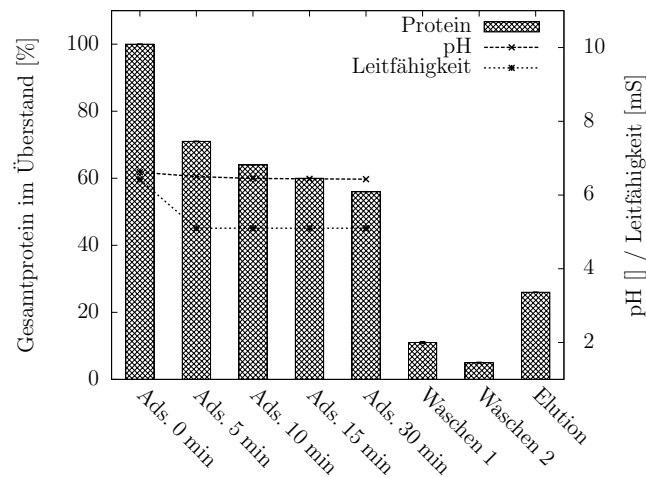


Abbildung 5.28: Verlauf der prozessrelevanten Parameter über den Batchprozess für 84 g EX M 1907 (Siliziumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Molkekonzentrat ( $6,63 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gesamtprotein). Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert), LW (Leitwert [ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ])

In Versuchen mit 66 g EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) und Dünnmolke aus Molkekonzentrat werden nach 30 Minuten 12 % des eingesetzten Proteins von dem Adsorbens gebunden (Abb. 5.29).

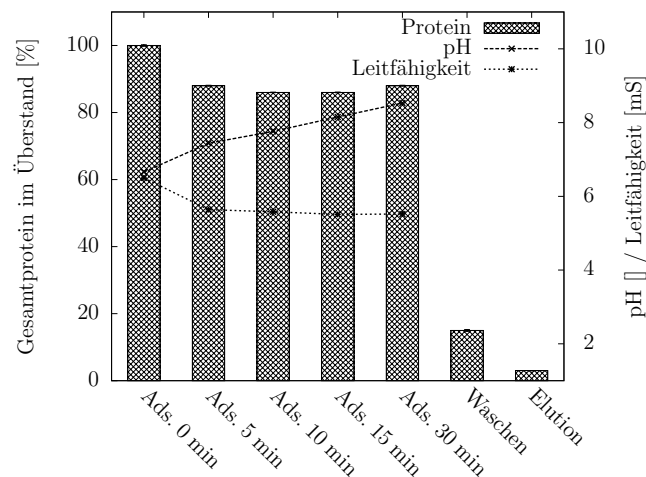


Abbildung 5.29: Verlauf der prozessrelevanten Parameter über den Batchprozess für 66 g EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver ( $6,63 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gesamtprotein). Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert), LW (Leitwert [ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ])

In der Elution des Materials aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid mittels 50 mM Kaliumphosphat-Puffer können davon 28 % wieder vom Adsorbens eluiert werden. Dies entspricht 3 % des eingesetzten Proteins. Die Kapazität des Adsorbens EX M 2070 wurde für diese Adsorbenskonzentration zu  $7 \text{ mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{g}_{\text{Ad}}^{-1}$  bestimmt. Durch massive Erhöhung der eingesetzten

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

Adsorbensmenge konnten in Versuchen mit 208 g des Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) bis zu 65 % des eingesetzten Proteins gebunden werden (Abb. 5.30).

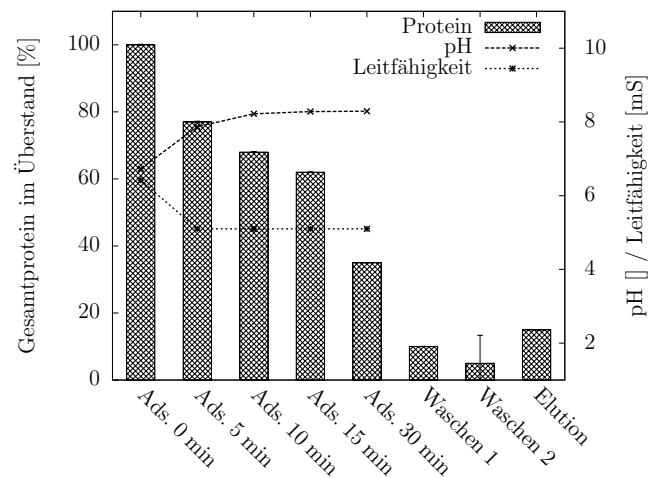


Abbildung 5.30: Verlauf der prozessrelevanten Parameter über den Batchprozess für 208 g EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver ( $6,63 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gesamtprotein). Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert), LW (Leitwert [ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ])

Pro Gramm eingesetztem Adsorbens werden somit 8 mg Protein gebunden. Die Elution von EX M 2070 liefert 29 % des an das Adsorbens gebundenen Gesamtproteins. Dies entspricht 15 % des eingesetzten Proteins. Selbst durch die massiven Erhöhung der eingesetzten Menge an dem Adsorbens EX M 2070 liegen sämtliche Werte immer noch deutlich unter jenen desselben Materials in Pulverform (EX M 1986). Die Leitfähigkeit zeigt einen ähnlichen Verlauf wie für Siliziumoxid. Das Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1907) zeigt eine geringfügig bessere Leistung gegenüber dem Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) hinsichtlich Proteinbindung und -elution. Dies kann mehreren Faktoren zugeschrieben werden. Zum einen ist das Adsorbens EX M 1907 (Siliziumoxid) mit 0,3-1,0 mm Partikeldurchmesser kleiner als EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) mit einem Partikeldurchmesser von 1,26 mm. So verfügen Schüttungen von EX M 1907 (Siliziumoxid) über eine BET-Oberfläche von  $157 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ . Die BET-Oberfläche von Schüttungen aus dem Material EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) hingegen beträgt lediglich  $95 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ . Zum anderen erfolgte die Elution des Adsorbens EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) mittels eines Eluenten aus 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8, zur Elution von EX M 1907 (Siliziumoxid) hingegen kam ein wesentlich höher konzentrierter Eluent aus 0,5 M NaOH und 1,0 M NaCl zum Einsatz. Die im Batch-Ansatz für die Partikel ermittelten Kapazitäten stimmen sehr gut mit jenen aus Versuchen mit der Chromatographiesäule aus Kapitel 4.4.1 überein. Im Gegensatz zu den pulverförmigen Adsorbentien aus Siliziumoxid (EX M 1991) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) zeigen die Adsorbenspartikel (EX M 1907 und EX M 2070) eine deutlich schlechtere Leistung hinsichtlich Proteinbindung und -elution. Dies ist hauptsächlich auf die geringeren BET-Oberflächen ihrer Schüttungen und die bedingte Nutzbarkeit der Poren im Inneren der Partikel für die Proteinadsorption zurückzuführen. Eine Übersicht über die Rührkesselversuche hinsichtlich Gesamtproteinbindung ist in Tabelle 5.3 gegeben.

Tabelle 5.3: Übersicht über die Rührkesselversuche hinsichtlich Gesamtproteinbindung. (g) Wert bezogen auf an Adsorbens gebundenes Protein, (e) Wert bezogen auf eingesetzte Proteinmasse, Proteinquelle angegeben als Mehrfaches des in Dünnmolke vorliegenden Wertes hergestellt aus MK (Molkekonzentrat) oder UL 35 (Ultralac 35 Proteinpulver)

Adsorbens	Proteinquelle	Adsorbensmasse [g]	Adsorbensvolumen [ml]	Proteinbindung [%]	Proteinelution [%]	Eluent	Kapazität [ $\frac{\text{mg}_{\text{Prot}}}{\text{g}_{\text{Ad}}}$ ]
EX M 1907	UL 35 3x	109	319	45	-	0,5 M NaOH + 1 M NaCl	26
	UL 35 1x	55	159	37	46 (g) 17 (e)	0,5 M NaOH + 1 M NaCl	25
	MK 1x	84	244	44	61 (g) 26 (e)	0,5 M NaOH + 1 M NaCl	17
EX M 2070	MK 1x	66	144	12	28 (g) 3 (e)	50 mM KPP	7
	UL35 1x	208	358	65	29 (g) 15 (e)	50 mM KPP	8

Des Weiteren trat besonders bei dem Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid ((EX M 2070) ein wesentlich stärkerer Abrieb auf als durch den Test nach UNILEVER (Kap. 5.4.1) vorausgesagt wurde. Dies war an einer deutlichen Trübung der Wasch- und Elutionslösungen zu erkennen. Über das an den Adsorbensabrieb gebundene Protein geht zusätzlich Protein bei den Waschschrritten verloren, welches ansonsten erst bei der Elution freigesetzt würde. Somit bestünde bei dem Einsatz der Adsorbentien in partikulärer Form die Notwendigkeit einer Abtrennung des Adsorbensabriebs aus dem Eluat, also eine Abtrennung von Pulver aus einer Flüssigkeit, wie sie auch für den Einsatz der Adsorbentien in Pulverform notwendig ist. In Folge dessen bietet der Einsatz der Adsorbentien zur Proteinadsorption in partikulären Formen keine deutlichen Vorteile gegenüber dem Einsatz der Adsorbenspulver.

### 5.4.3 Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorptionskapazität

Da verschiedene Molkeproteinquellen zur Verfügung stehen, die sich hinsichtlich der Verhältnisse von Protein zu Lactose und Mineralien unterscheiden, zeigen sich für die unterschiedlichen Systeme auch abweichende Adsorptionseigenschaften. Vergleicht man Molkekonzentrat (Proteingehalt  $33,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) mit einer UL35-Lösung mit  $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Proteingehalt, so zeigt sich, dass Molkekonzentrat höhere Konzentrationen von Lactose, als auch von Mineralien enthält. Vor allem Mineralien sollten sich aufgrund ihrer Konkurrenz um die Bindungsstellen mit den Molkeproteinen ungünstig auf die Proteinbindungskapazität der getesteten Adsorbentien auswirken. Diese Verminderung der Kapazität bei der Verwendung von Molkekonzentrat im Vergleich mit einer Ultralac-Lösung derselben Proteinkonzentration konnte auch im Experiment bestätigt werden. Ein Vergleich von Molkekonzentrat mit einer Ultralac 35 Lösung hinsichtlich ihrer Hauptbestandteile ist in Tab. 5.4 gegeben.

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

Tabelle 5.4: Vergleich von Molkekonzentrat mit einer Ultralac 35 Lösung hinsichtlich ihrer Hauptbestandteile (Biolac GmbH & Co. KG, 2011)

	Molkekonzentrat [g·l <sup>-1</sup> ]	UL35 mit 50 g <sub>Prot</sub> · l <sup>-1</sup> [g·l <sup>-1</sup> ]
<b>Protein</b>	33,2	50,0
<b>Lactose</b>	282,2	65,6
<b>Mineralien</b>	23,8	max. 11,4

Durch Anpassen der Salzkonzentration der UL35-Lösung auf Werte von Molkekonzentrat mittels einer Modellsalz-Lösung (basierend auf der Mineralzusammensetzung von Molkekonzentrat) kann der Kapazitätsunterschied deutlich in Zusammenhang mit der Mineralkonzentration gebracht werden. Experimentell wurden hierzu die Beladungskapazitäten der Adsorbentien EX M 1907 und EX M 2070 im statischen System unter Verwendung von Molkekonzentrat (MK), einer Ultralac 35-Lösung (UL, Proteingehalt 33,2 g·l<sup>-1</sup>) und der entsprechenden Ultralac 35-Lösung mit einem Mineraliengehalt von Molkekonzentrat (ULS) verglichen (Abb. 5.31).

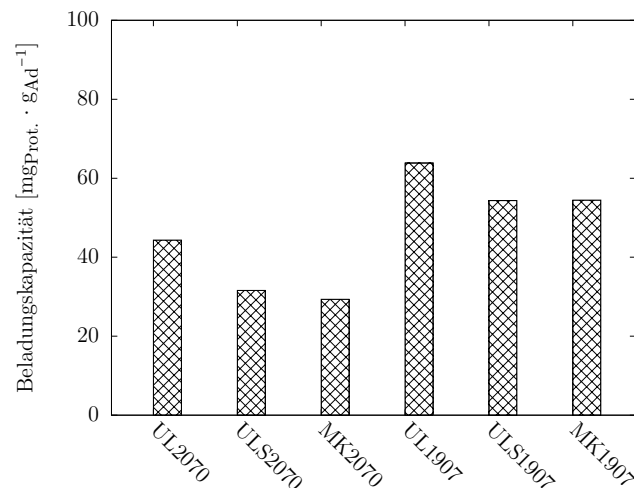


Abbildung 5.31: Beladungskapazitäten der Adsorbentien EX M 2070 und EX M 1907 für Proteinlösungen mit unterschiedlichem Salzgehalt. UL = Ultralac 35, ULS = Ultralac 35 mit erhöhtem Salzgehalt und MK = Molkekonzentrat (Wiesen, 2010)

Die Beladungskapazität beider Adsorbentien, sowohl des Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1907) als auch des Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) ist für den Ansatz mit Ultralac 35-Proteinlösung am höchsten. Diese Proteinlösung enthält mit 7,6 g·l<sup>-1</sup> die geringste Konzentration an Salzen. Eine deutliche Abnahme der Beladungskapazität tritt sowohl bei der im Salzgehalt dem Molkekonzentrat angepassten Ultralac 35-Lösung (ULS) als auch bei Molkekonzentrat auf. Beide Lösungen beinhalten Salzkonzentrationen von 23,8 g·l<sup>-1</sup>. Die Unterschiede in den Beladungskapazitäten bei dem Einsatz von der in ihrem Salzgehalt dem Molkekonzentrat angepassten Ultralac 35 Lösung (ULS) und Molke-

konzentrat sind im Vergleich dazu sehr gering. Dies spricht dafür, dass die Salzkonzentration einen deutlichen Einfluss auf die Proteinbindekapazität der untersuchten Adsorbentien aus Siliziumoxid (EX M 1907) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) hat. Dieser Effekt ist für den Anionentauscher EX M 2070 noch deutlicher als für das Material aus Siliziumoxid (EX M 1907), dessen Proteinbindung hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Protein BLG beruht. Bei dem Ionentauscher aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) belegen Salzanionen die Adsorbensoberfläche und verdrängen gebundenes Protein. Wohingegen bei dem Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1907) die Salzanionen vorwiegend mit dem Protein wechselwirken und seine negativen Oberflächenladungen verstärken. Dies führt zu einer verstärkten elektrostatischen Repulsion zwischen Adsorbensoberfläche und Protein, welche dann gegenüber den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Adsorbensoberfläche und BLG überwiegt. Daraus folgt dann die Elution gebundenen Proteins bzw. die Verhinderung der Bindung von BLG an die negativ geladene Adsorbensoberfläche.

#### 5.4.4 Einfluss der Lactose auf die Adsorptionskapazität

In verschiedenen Rührkesselversuchen konnte während der Abnahme der Molkeproteinkonzentration eine Abnahme in der Lactosekonzentration beobachtet werden. Um auszuschließen, dass die verwendeten Adsorbentien Lactose binden, wurde das Bindungsverhalten von Lactose im statischen System untersucht. Für den Elutionsschritt wurden die Partikel zusätzlich gemörsert. Die Versuche wurden mit den Adsorbentien EX M 1907 (Siliziumoxid) und EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) durchgeführt. Die Auswertung der Versuche zeigt, dass es bei EX M 1907 nach 5 bzw. 30 min zu einer scheinbaren Lactosebindung kommt. Die Lactose wird aber in den nachfolgenden Waschschritten vollständig ausgewaschen (Abb. 5.32).

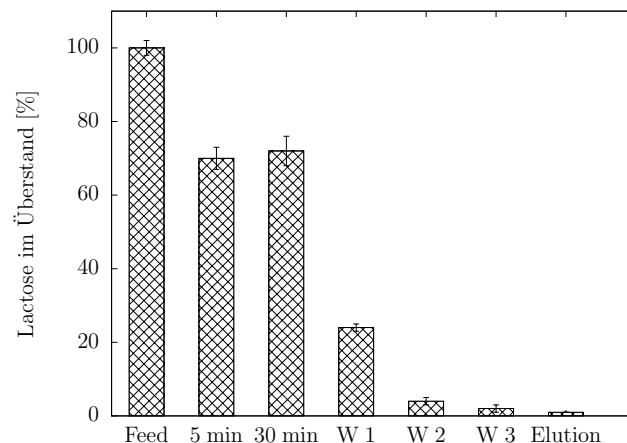


Abbildung 5.32: Lactosebindung an EX M 1907, 5 g Adsorbens, 25 ml Arbeitsvolumen, 3 x 10 min Waschen mit ddH<sub>2</sub>O, 30 min Beladung, 3 x 10 min Waschen mit ddH<sub>2</sub>O, Elution 30 min mit ddH<sub>2</sub>O nach Trocknen und Mörsern, Messung der Lactose im Überstand (Wiesen, 2010)

Ähnliche Beobachtungen wie bei EX M 1907 (Siliziumoxid) konnten auch bei EX M 2070 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) gemacht werden. Der beobachtete Abfall der Lactosekonzentration

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

nach 5 bzw. 30 min, der in beiden Fällen zu beobachten ist, deutet auf den ersten Blick auf ein Bindevverhalten hin (Abb. 5.33).

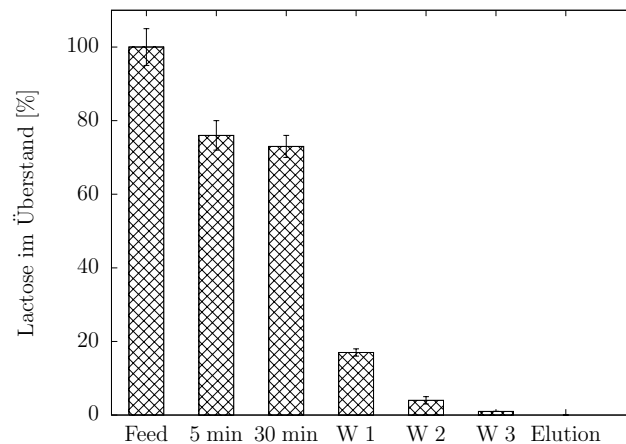


Abbildung 5.33: Lactosebindung an EX M 2070, 5 g Adsorbens, 25 ml Arbeitsvolumen, 3 x 10 min Waschen mit ddH<sub>2</sub>O, 30 min Beladung, 3 x 10 min Waschen mit ddH<sub>2</sub>O, Elution 30 min mit ddH<sub>2</sub>O nach Trocknen und Mörsern, Messung der Lactose im Überstand (Wiesen, 2010)

Da die vermeintlich gebundene Lactose jedoch vollständig in den Waschfraktionen wiedergefunden wird, kann man bei dem Beobachteten von einem Verdünnungseffekt ausgehen. Lactose kann auf Grund ihrer sehr geringen Größe auch das Porenvolumen der Adsorbentien schnell durchdringen. Folglich verteilt sich Lactose in der Proteinlösung und dem Porenvolumen der Adsorbentien, wodurch Messungen des Überstandes eine im Gegensatz zum Feed geringere Lactosekonzentration liefern. Die Partikel sind zudem bereits vor der Beladung durch die vorbereitenden Waschschrte feucht, was bei EX M 1907 stärker als bei EX M 2070 zu einer Verdünnung der Lactose führt. Der zweit genannte Effekt besitzt vermutlich aber weit geringere Auswirkungen auf die gemessene Lactosekonzentration als der erstgenannte. Die Lactosebilanz ist nach dem Waschen geschlossen und in Elutionsproben lässt sich Lactose in keinen nennenswerten Mengen nachweisen. Somit ist von keinerlei Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Materialien aus Siliziumoxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid und Lactose auszugehen.

## 5.5 Prozesssimulation und Auslegung

Zur Abschätzung der ökonomischen Machbarkeit, benötigten Anlagenbauteile und der Rentabilität eines Batch-Prozesses wurde ein Modell des Prozesses erstellt. Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Kapitel wurden hierfür das Adsorbens aus Schichtsilicat EX M 1991 und das Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid EX M 1986 in Pulverform ausgewählt. Zur Auslegung und Simulation dieses Prozesses wurde die Software SuperPro Designer der Firma Intelligen, Inc. verwendet. Neben der Auslegung von Prozessen ist die Software in der Lage, die Optimierung und ökonomische Bewertung von Verfahren zu unterstützen. Der entwickelte Prozess besteht aus 6 Rührkesseln, 6 Filtrationsmodulen und 2 Sprühtrocknungseinheiten. Dieser Prozessaufbau gewährleistet den kontinuierlichen Betrieb der Anlage durch die parallele Ausführung der Prozessschritte Proteinadsorption, Waschen der Adsorbentien und Elution adsorbierter Proteins für beide Adsorbentien. Ein Schema des Prozessflussdiagramms in Abbildung 5.34 zeigt, dass die Rührkessel zur Beladung von Adsorbens mit Protein (V-101 und V-102) stetig beladen oder entladen werden oder sich im Rührbetrieb zur Adsorption von Protein befinden.

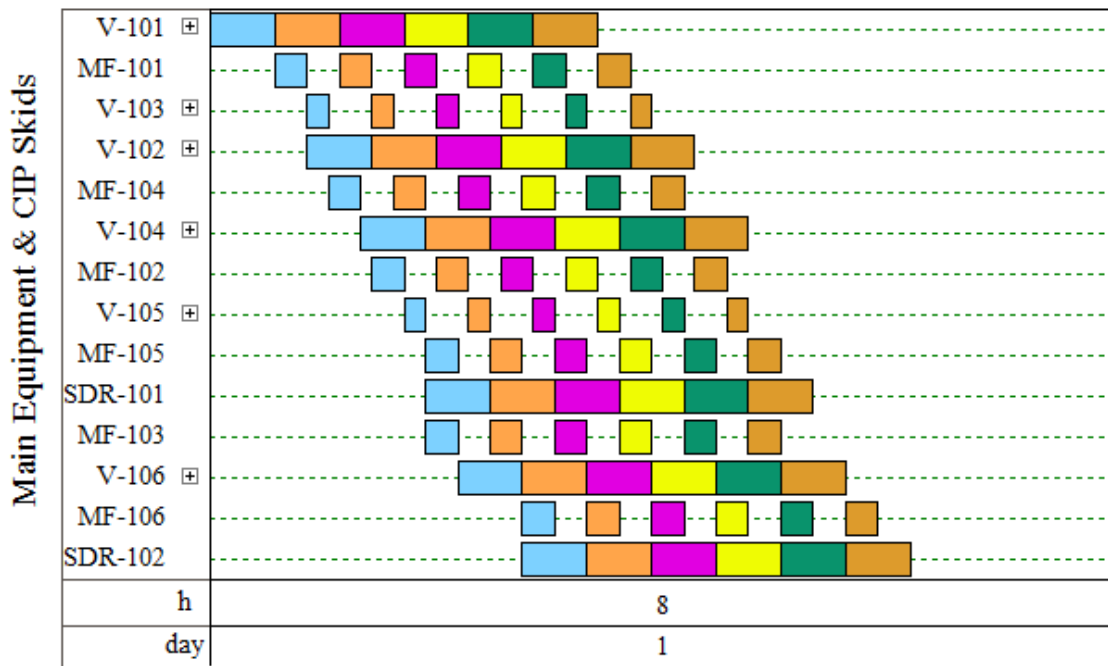


Abbildung 5.34: Schema des Prozessflussdiagramms für die Aufarbeitung von Molke in einem System von Rührkesseln über 6 Batchverläufe, erstellt in SuperPro Designer der Firma Intelligen, jede Farbe zeigt den Ablauf einer 1000 l Kampagne

Selbiges trifft für die Rührkessel zur Elution gebundenen Proteins (V-104 und V-106) zu. Auch die Sprühtrocknungseinheiten SDR-101 und SDR-102 werden permanent mit Edukt befahren, was deren kontinuierlichen Betrieb gewährleistet und somit Energiekosten durch das Fehlen von Aufheizphasen reduziert. Allein die Rührkessel zum Waschen beladenen Adsorbens (V-103 und V-105) und die Filtrationseinheiten weisen Leerlaufzeiten auf. Ein Verfahrensfliessbild des möglichen Prozesses ist in Abb. 5.35 dargestellt. Über den Zulauf

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

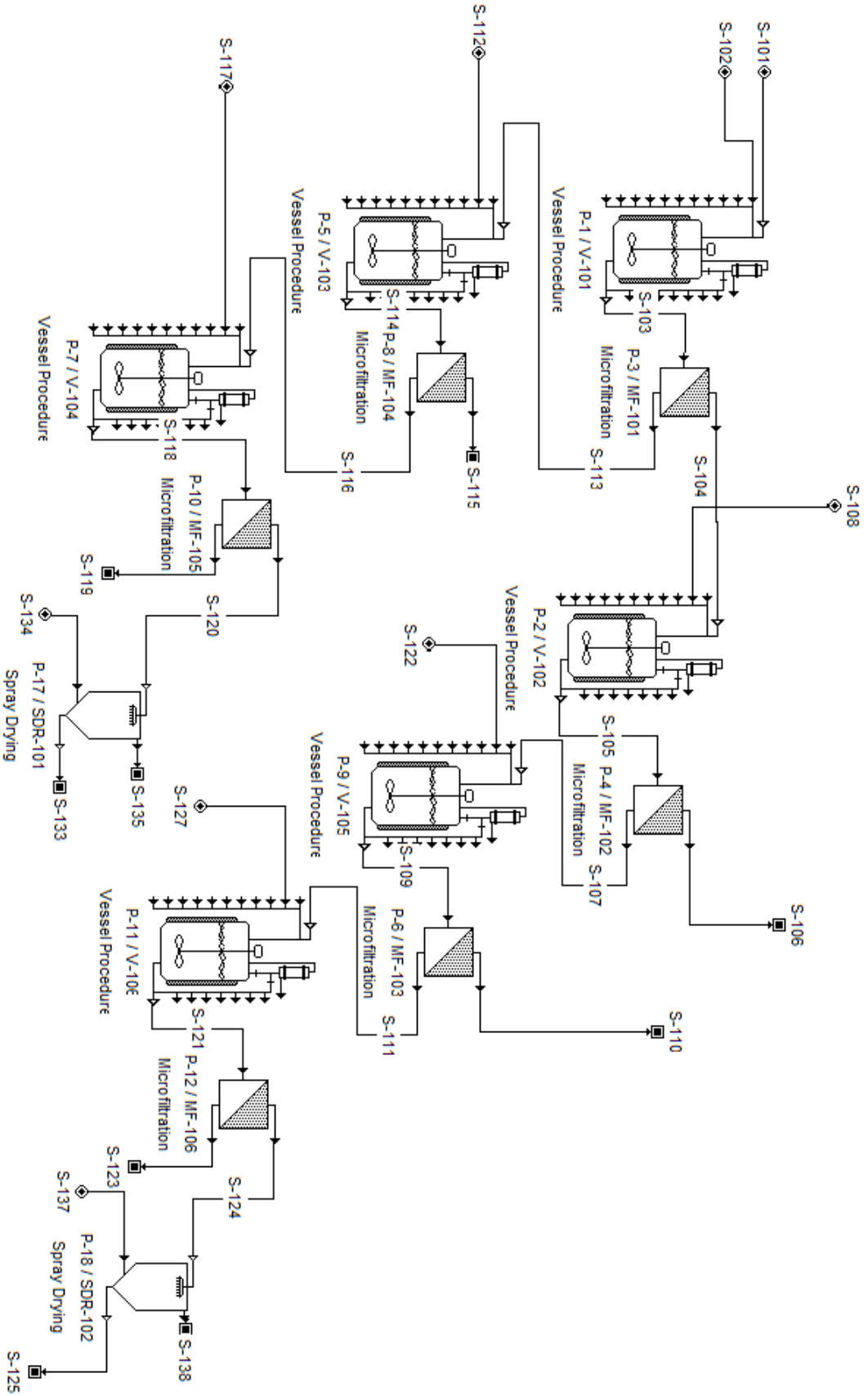


Abbildung 5.35: Prozessschaubild für die Aufarbeitung von Molke in einem System von Rührkesseln. Erstellt in SuperPro Designer der Firma Intelligen



S-101 gelangen pro Batchansatz 1000 l Dünnmolke in die Anlage und werden mit Adsorbens aus Siliziumoxid EX M 1991 in dem Rührkessel V-101 unter Vermischung inkubiert. EX M 1991 gelangt in den Prozess über den Zulauf S-102. In diesem ersten Prozessschritt bindet das majore Molkeprotein BLG an das Adsorbens EX M 1991. Adsorbens und BLG können im Filtrationsmodul MF-101 von der verbliebenen Lösung, bestehend aus ALA und Lactose, abgetrennt werden (vgl. Kap. 5.2.3 und Kap. 5.4.4). Der Prozessteil für das Adsorbens EX M 1991 aus Schichtsilicat zur Aufreinigung von BLG ist in Tab. 5.5 dargestellt.

Tabelle 5.5: Übersicht über die Anlagenkomponenten und deren Funktionen für eine Anlage zur Aufarbeitung von 1000 l Dünnmolke für das Adsorbens aus Schichtsilikat

Prozesselement	Operation	Funktion
P-1/V-101	Rührkessel	Adsorption von BLG an Siliziumoxid
P-3/MF-101	Mikrofiltration	Trennung von beladenem Siliziumoxid, ALA und Lactose
P-5/V-103	Rührkessel	Waschen von beladenem Siliziumoxid
P-8/MF-104	Mikrofiltration	Trennung von beladenem Siliziumoxid und Waschwasser
P-7/V-104	Rührkessel	Elution von BLG von Siliziumoxid
P-10/MF-105	Mikrofiltration	Trennung von BLG und Siliziumoxid
P-17/SDR-101	Sprühtrocknung	Trocknen von BLG

Das mit BLG beladene Adsorbens EX M 1991 aus Siliziumoxid gelangt anschließend in den Rührkessel V-103 und wird mit Wasser gewaschen, um die verbliebene Lactose und ALA von diesem zu entfernen. Nach der Abtrennung des Waschwassers im Filtrationsmodul MF-104 wird das mit BLG beladene Material im Rührkessel V-104 mit 0,5 M Natronlauge eluiert. Das eluierte BLG wird im Filtrationsmodul MF-105 von dem entladene Adsorbens EX M 1991 getrennt und nach Neutralisierung (nicht dargestellt) in der Sprühtrocknungseinheit SDR-101 getrocknet.

Die Lösung aus ALA und Lactose wird nach dem Verlassen des Filtrationsmoduls MF-101 in den Rührkessel V-102 überführt und dort mit Adsorbens EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid vermischt. ALA bindet an das Adsorbens und wird zusammen mit diesem im Filtrationsmodul MF-102 von der verbliebenen Lactoselösung getrennt. Die an Protein angereicherte Lactoselösung verlässt das System über den Ablauf S-106 (vgl. Kap. 5.4.4). Das mit ALA beladene Adsorbens EX M 1986 wird in dem Rührkessel V-105 zur Entfernung von Lactoseresten mit Wasser gewaschen. Nach der Abtrennung des Waschwassers im Filtrationsmodul MF-103 wird das mit ALA beladene Adsorbens EX M 1986 im Rührkessel V-106 mit Kaliumphosphatpuffer eluiert (vgl. Kap. 5.2.3). Die Trennung von entladene Adsorbens und eluiertem ALA erfolgt im Filtrationsmodul MF-106. Das in diesem Prozessweig aufgearbeitete ALA wird abschließend in der Sprühtrocknungseinheit SDR-102 getrocknet. Der Prozessteil für das Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid zur Aufreinigung von ALA ist in Tab. 5.6 dargestellt.

## 5 Proteinadsorption im Rührkessel

Tabelle 5.6: Übersicht über die Anlagenkomponenten und deren Funktionen für eine Anlage zur Aufarbeitung von 1000 l Dünnmolke für das Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid

Prozesselement	Operation	Funktion
P-2/V-102	Rührkessel	Adsorption von ALA an $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
P-4/MF-102	Mikrofiltration	Trennung von beladenem $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> und Lactose
P-9/V-105	Rührkessel	Waschen von beladenem $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
P-6/MF-103	Mikrofiltration	Trennung von beladenem $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> und Waschwasser
P-11/V-106	Rührkessel	Elution von ALA von $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
P-12/MF-106	Mikrofiltration	Trennung von ALA und $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
P-18/SDR-102	Sprühtrocknung	Trocknen von ALA

Die Investitionskosten der Anlage und ihrer Komponenten (Tab. 5.7) wurden nach der Auslegung des Prozesses aus der Datenbank von SuperPro Designer und externen Quellen (Kiefer, 2011) berechnet.

Tabelle 5.7: Dimensionierung einer Anlage zur Aufarbeitung von 1000 l Dünnmolke pro Batch Ansatz und Abschätzung der Anschaffungskosten aus der Datenbank von Intelligens SuperPro Designer und externen Quellen (Kiefer, 2011)

Operation	Dimension	Geschätzte Anschaffungskosten [ $\cdot 10^3$ €]
Rührkessel	1,2 m <sup>3</sup>	9
Rührkessel	3 · 1 m <sup>3</sup>	23
Rührkessel	2 · 0,5 m <sup>3</sup>	8
Mikrofiltration	170 m <sup>2</sup>	157
Mikrofiltration	140 m <sup>2</sup>	140
Mikrofiltration	4 · 55 m <sup>2</sup>	319
Sprühtrocknung	2 · 5 m <sup>3</sup>	241

In die Berechnungen gingen neben den Geräten an sich auch Rohrleitungen mit ein. Das geschätzte Gesamtinvestitionsvolumen für die Anlage beträgt  $897 \cdot 10^3$  €. Ausgehend von einer jährlichen Betriebszeit von 7.920 Stunden können bei einer Batchzeit von 2,92 Stunden in 15.835 Satzprozessen knapp  $16 \cdot 10^3$  m<sup>3</sup> Dünnmolke verarbeitet werden. Die Hauptprodukte, die majoren Molkeproteine ALA und BLG, fallen bei der in dieser Arbeit vorgestellten Auslegung des Prozesses in einen Umfang von  $22,7 \cdot 10^3$  kg·Jahr<sup>-1</sup> bzw.  $53 \cdot 10^3$  kg·Jahr<sup>-1</sup> an. Die wichtigsten Stoffströme einer Anlage zur Aufarbeitung von 1000 l Dünnmolke pro Batch betrachtet über ein Jahr sind in Tab. 5.8 zusammengefasst.

Tabelle 5.8: Stoffströme einer Anlage zur Aufarbeitung von 1000 l Dünnmolke pro Batch

Stoff	Art des Stoffstroms	Menge [10 <sup>3</sup> kg·Jahr <sup>-1</sup> ]
ALA	Produkt	22,7
BLG	Produkt	53,0
Lactose (gelöst)	Zwischenprodukt	887
Adsorbens	Zulauf	2 x 1.584
0,5 M NaOH	Eluent	3.959
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Eluent	32,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Eluent	1,7
Luft	Zulauf	39.272

Der nach der Abreicherung beider Protein-Hauptkomponenten der Molke verbleibende Lactosestrom verlässt die Anlage über den Ablauf S-110 und könnte beispielsweise klassisch in einer Ultrafiltrationsanlage weiter aufgearbeitet werden. In dieser Arbeit wurde er weder als Produktstrom noch als Abfallstrom in die wirtschaftliche Betrachtung der Anlage und des Prozesses miteinbezogen. Die Anlage wäre durch ihre im Gegensatz zur Ultrafiltration kompakte Bauart in einen klassischen Ultrafiltrationsprozess integrierbar oder direkt bei Prozessen, bei welchen Molke als Nebenprodukt anfällt, einsetzbar. Die Produktivität war bei dem Batch-Ansatz mit  $10,3 \text{ g}_{Prot} \cdot \text{kg}_{Ad}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  wesentlich höher als im chromatographischen Ansatz. Die Rentabilität des vorgestellten Verfahrens lässt sich unter verschiedenen Aspekten beleuchten. Die maßgebliche Einflussgröße ist hierbei der Verkaufspreis der erzeugten Molkeproteine. An einzelnen Proteinen angereicherte Proteinfractionen, erzeugt mittels Ultrafiltrationsverfahren, erzielen in der Nahrungsmittelindustrie, z.B. für Baby- oder Sportlernahrung, Verkaufspreise um die  $100 \text{ \$} \cdot \text{kg}^{-1}$  (entspricht 75,52 €) (Buchholz, 2010). Bei diesen Verkaufspreisen wird es sehr schwierig sein, gegen das günstige Massenverfahren der Ultrafiltration innerhalb von 5 Jahren wirtschaftlich zu arbeiten. Bei hinreichender Einzelkomponentenreinheit und einem Einsatz dieser Fraktionen z.B. als Zutaten für Functional Foods, Nutraceuticals oder medizinisch wirksame Zusatzstoffe sollen die Molkeproteine einen Marktwert von bis zu 600 \$ (umgerechnet 453 €) erzielen können (El-Sayed, 2011; Smithers, 2008). Wirtschaftlichkeitsberechnungen mit SuperPro Designer ergaben eine voraussichtliche Rentabilität der Anlage in unter 5 Jahren für diesen Marktwertbereich der Produkte. Andere Autoren wie El-Sayed (El-Sayed, 2010) hingegen gehen von einem Einkaufspreis von  $15 \text{ £} \cdot \text{kg}^{-1}$  (umgerechnet  $18 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) für Molkekonzentrat und einem Marktwert von  $350 \cdot 10^3 \text{ £} \cdot \text{kg}^{-1}$  (umgerechnet  $419 \cdot 10^3 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) für ALA und  $30 \cdot 10^3 \text{ £} \cdot \text{kg}^{-1}$  (umgerechnet  $36 \cdot 10^3 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) für BLG aus. Hierbei wurden vermutlich die Marktpreise der Proteine in hochreiner Form und nicht die Marktpreise von Proteinfractionen, angereichert mit diesen Proteinen, als Zahlenwerte für die wirtschaftliche Betrachtung des Prozesses herangezogen.

## 5.6 Zusammenfassung Proteinadsorption im Rührkessel

Das Adsorptionsverhalten der Adsorbentien EX M 1221 (Bentonit/Silica), EX M 1991 (Siliziumoxid) und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) kann wie in den Versuchen mit reinen Modellproteinen (Kap. 4.2) auch für Versuche mit Dünnmolke nach Langmuir beschrieben werden (Kap. 5.2.1). Das Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) zeigt bei steigender Adsorbenskonzentration in Dünnmolke bis zu einer Adsorbenskonzentration von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  nur eine geringfügige Bindung von ALA, 67 % des Proteins verbleiben im Überstand (Kap. 5.2.3). BLG hingegen wird bei dieser Adsorbenskonzentration zu 91 % an das Adsorbens gebunden, im Überstand verbleibendes Protein besteht zu 77 % aus ALA. In den Elutionen des Adsorbens aus Siliziumoxid wird bis zu einer Adsorbenskonzentration von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  kein BLG in nennenswertem Umfang nachgewiesen. Das Adsorbens EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) hingegen zeichnet sich durch schnelle und starke Adsorption beider Proteine aus (Kap. 5.2.1). In einem Bereich zwischen  $44 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  und  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  Adsorbenskonzentration wird ALA geringfügig stärker gebunden, bei höheren Adsorbenskonzentrationen überwiegt die Bindung von BLG (Kap. 5.2.3). Auch in der Elution können beide Proteine wiedergefunden werden. Ebenso wie für den Bereich zwischen  $44 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  und  $72 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  Adsorbenskonzentration der Umfang der Adsorption von ALA stärker ist, trifft dies auch für den Umfang der Elution von ALA in diesem Bereich der Adsorbenskonzentration zu. Eine sequenzielle Kombination der Adsorbentien EX M 1991 (Siliziumoxid) und EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) legt eine effiziente und elegante Möglichkeit der Trennung der Proteine ALA und BLG nahe. Das Adsorbens EX M 1221 (Bentonit/Silica) kann zwar beide Proteine schnell und effizient binden (Kap. 5.2.1), zeigt jedoch keine Elution von ALA (Kap. 5.2.3). Dies schließt das Adsorbens aus Bentonit/Silica auf Grund von mangelnder Kombinierbarkeit mit andern Adsorbentien für einen Aufreinigungsprozess für Molkeproteine aus. Die Betrachtung der Waschverluste bei der Aufarbeitung von Molkeproteinen im Labormaßstab (Kap. 5.2.2) zeigt, dass diese für die Adsorbentien aus Bentonit/Silica (EX M 1221) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) am geringsten sind. Die höchsten Verluste bei den Waschschritten treten bei dem Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) auf. BLG kann von Siliziumoxid (EX M 1991) mit steigender Adsorbenskonzentration in steigender Menge aus dem Überstand der Proteinlösungen entfernt werden, ALA hingegen verbleibt größtenteils im Überstand und wird bei den Waschschrritten aus dem Material entfernt (Kap. 5.2.3 und Kap. 5.2.2). Im Labormaßstab ist das Material aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) in der Lage, beide Proteine bei einer Adsorbenskonzentration von  $304 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  nahezu vollständig zu binden. Bei Elution mittels 50 mM Kaliumphosphat pH 8 können bei einer Adsorbenskonzentration von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  bis zu 80 % ALA und 20 % BLG gefunden werden. Bei der Adsorption von Molkeproteinen an Adsorbentien in Pulverform im Technikumsmaßstab zeigt das Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) deutliche Zunahmen in der Gesamtproteinbindung bei steigender Adsorbensmenge. Durch die Erhöhung der Adsorbenskonzentration von  $66 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  auf  $166 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  erhöht sich die Gesamtproteinbindung von 39 % auf 61 % des eingesetzten Proteins. Mit zunehmender Adsorbensmenge findet nach der Bindung von BLG auch eine verstärkte Bindung von ALA statt. Wie auch in Kapitel 5.2.3 beschrieben liegt das Optimum für die Entfernung von BLG bei einer Adsorbenskonzentration von  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  EX M 1991 (Siliziumoxid). Bei der

niedrigeren Adsorbenskonzentration von  $66 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  wird BLG, dessen Anteil am Gesamtprotein 54 % beträgt, nur unvollständig gebunden. Die Bindung von BLG ist bei  $166 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  vollständig, jedoch findet bei dieser Adsorbenskonzentration auch eine zusätzliche Bindung von ALA statt. Das über Protein-Protein-Wechselwirkungen gebundenes ALA wird bei den Waschschritten wieder vom Adsorbens entfernt und das eluierte Protein besteht hauptsächlich aus BLG. Die Menge des eluierten Proteins bleibt mit 30 % bezogen auf das eingesetzte Gesamtprotein trotz Erhöhung der Adsorbensmenge gleich. Das Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) kann sowohl ALA als auch BLG direkt und ohne Wechselwirkungen zwischen den Proteinen binden (Kap. 4.2). Eine Erhöhung der Adsorbenskonzentration bei der Adsorption von Molkeproteinen an Adsorbenspulver im Technikumsmaßstab geht mit einer Erhöhung der Gesamtproteinbindung von 42 % auf 77 % einher. Auch bei diesem Adsorbens bewirkt die Erhöhung der Adsorbenskonzentration über  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  keine Erhöhung der eluierten Proteinmenge bezogen auf das gebundene Protein. Zusätzlich gebundenes Protein geht dabei nur zu sehr geringen Mengen über die Waschschriffe verloren (Kap. 5.2.2), die Elution wird anstatt dessen mit steigender Adsorbenskonzentration zunehmend unvollständig. Das Optimum für die Proteinaufarbeitung liegt somit auch bei dem Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid bei  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$ . Die Kapazitäten der Pulver liegen erwartungsgemäß deutlich über den im chromatographischen Ansatz (4.4.1) ermittelten Werten der granularen und sphärischen Darreichungsformen der Materialien. Das Konstanthalten des pH-Wertes bei der Proteinadsorption (pH-stat) bei dem Einsatz von Adsorbentien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) führt zwar zu einer 5 %igen Verbesserung der Proteinadsorption, jedoch auch zu einer Halbierung der eluierten Proteinmenge (Kap. 5.3.2). Die Hydroxylierung des Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid in wässriger Lösung führt zu einer Erhöhung des pH-Wertes im System. Die zum Konstanthalten des pH-Wertes eingebrachten Protonen verhindern diesen Effekt. Ebenso wird dadurch eine Verringerung der positiven Oberflächenladung des Adsorbens und eine damit verbundene Verschlechterung der Adsorption der anionischen Molkeproteine verhindert. Bei der darauf folgenden Elution behindern dieselben Protonen jedoch die Interaktion der Phosphatanionen mit der Adsorbensoberfläche und somit die Verdrängung des gebundenen Proteins von dieser. Für den Gesamtprozess ist durch diesen pH-stat Ansatz also keine nachhaltige Verbesserung zu erreichen. Für Adsorptionsversuche im Technikumsmaßstab wurden zur einfacheren Abtrennung der Festphase (Adsorbens) von der Flüssigphase (Molke, Waschwasser, Eluent) Adsorbentien aus Siliziumoxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid in partikulärer Form (EX M 1907 und EX M 2070) eingesetzt (Kap. 5.4). Diese zeigten in dem Abriebtest nach UNILEVER ein geringes Abriebverhalten (Kap. 5.4.1). Bei der Anwendung der Partikel im Rührkessel fiel jedoch schnell auf, dass der Abriebtest nach UNILEVER für das gewählte Rührkesselsystem nicht hinreichend repräsentativ ist (Kap. 5.4.2). Durch Rührwerk, Stromstörer und die zur Durchmischung eingebrachte Leistung wirken wesentlich höhere Kräfte auf die Partikel als zuvor in dem Abriebtest nach UNILEVER. Es kommt zu massivem Abrieb der untersuchten Adsorbentien aus Siliziumoxid (EX M 1907) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070), wobei dieser für die Partikel aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid höher ist als für die Silicapartikel. Dieser Abrieb führt zur Austragung von Protein über die Waschschriffe und der Notwendigkeit einer zusätzlichen Abtrennung des Adsorbensabriebs aus dem Eluat. Sowohl die Werte für Proteinbindung und Proteinelution, als auch die Proteinbindekapazitäten liegen deutlich unter denen ermittelt für die Adsorbenspulver (Kap. 5.3.1). Somit ist der Vorteil einer vereinfachten Fest-Flüssig-Phasen-Trennung zu Kosten einer im Vergleich zu pulverförmigen

Adsorbentien geringeren Adsorptionskapazität nicht gegeben. Einen starken Einfluss auf die Proteinadsorption haben die Salze der Molke, welche zuvor schon in der Chromatographie für die Abweichungen der Ergebnisse von den Ergebnissen aus idealisierten Adsorptionsversuchen unter Einsatz niedermolaren Puffers und Modellproteinen verantwortlich waren (Kap. 4). Ab Beginn der Adsorption war auch im Rührkessel stets ein deutlicher Abfall des Leitwertes, ein Indikator für den Ionengehalt von Lösungen, zu beobachten (Kap. 5.3.1 und Kap. 5.4.2). Der negative Einfluss der Salze auf die Proteinadsorption wurde darüber hinaus durch Adsorptionsversuche mit zusätzlicher Salzsupplementierung bestätigt (Kap. 5.4.3). Mit steigender zusätzlicher Salzkonzentration konnte eine stetige Abnahme der adsorbierten Proteinmenge beobachtet werden. Dieser Einfluss der Salze auf die Proteinadsorption ist für Adsorbentien aus Siliziumoxid, bei denen die Wechselwirkungen zwischen Materialoberfläche und Protein hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, deutlich geringer als für Adsorbentien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid, deren Wechselwirkungen zwischen Materialoberfläche und Protein vorwiegend ionischer Natur sind. Bei der Proteinadsorption im Rührkessel zeigt Lactose keine Wechselwirkungen mit den eingesetzten Adsorbentien und verlässt das System über die Waschschrte. Bestätigt wurde diese Beobachtung durch die Ergebnisse aus Batchversuchen mit den Adsorbentien aus Siliziumoxid (EX M 1907) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070), in welchen die Bilanz der eingesetzten Lactose über die Waschschrte geschlossen wurde (Kap. 5.4.4). Des Weiteren konnten keine nennenswerten Mengen an Lactose in Elutionsproben wiedergefunden werden. Somit ist eine Wechselwirkung zwischen Lactose und den Materialien aus Siliziumoxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid ausgeschlossen. Zuletzt wurde ein Prozess in einer Größenordnung von  $1 \text{ m}^3$  Dünnmolke pro Batchansatz in der Software SuperPro Designer von Intelligent, Inc. ausgelegt. Als Adsorbentien wurden hierfür die Pulver EX M 1991 aus Siliziumoxid und EX M 1986 aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid ausgewählt. Der Investitionsaufwand für diese Anlage beträgt geschätzte  $897 \cdot 10^3 \text{ €}$  und ermöglicht bei einer Jahresbetriebszeit von 7.920 Stunden die Verarbeitung von knapp  $16 \cdot 10^3 \text{ t}$  Dünnmolke pro Jahr in 15.835 Satzprozessen. Die Batchzeit beträgt 2,92 Stunden und die Produktivität liegt bei  $10,3 \text{ g}_{Prot} \cdot \text{kg}_{Ad}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

## 6 Abschließende Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Materialien bestehend aus Bentonit/Silica, Siliziumoxid,  $\gamma$ -Aluminiumoxid und Gemischen aus Siliziumoxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid auf ihre Eignung zur Proteinaufarbeitung untersucht. Die Proteine der Molke dienten hierbei als Modellsystem. In Adsorptionsversuchen konnten Isothermen nach Langmuir erstellt werden, welche zeigen, dass die Materialien in der Lage sind, mit Molkeproteinen wechselzuwirken und diese zu binden. Adsorbentien aus Bentonit/Silica und  $\gamma$ -Aluminiumoxid können sowohl ALA als auch BLG binden. An der Adsorption von Proteinen an Bentonit/Silica sind dabei verschiedene Arten von Wechselwirkungen beteiligt, wie elektrostatische (Martin et al., 1991; Johnston et al., 2012) und hydrophobe Wechselwirkungen (Quiquampoix, 2008), Van-der-Waals-Kräfte (Greenland, 1965) und Wechselwirkungen über verbrückende divalente Ionen (Weiss, 1959). Diese hohe Anzahl an Wechselwirkungen drückt sich deutlich in der Adsorptionskonstanten nach Langmuir ( $K_L$ ) aus.  $K_L$  nimmt für das „weiche“ Protein ALA (Nakanishi et al., 2001) mit 6,59 wie erwartet einen höheren Wert an als für das „harte“ Protein BLG mit 3,23. Das Molkeprotein ALA besitzt somit eine höhere Affinität zu Materialien aus Bentonit/Silica als BLG. Materialien aus Siliziumoxid zeigen lediglich gegenüber BLG ein starkes Adsorptionsverhalten. ALA wird von Siliziumoxid in den Adsorptionsansätzen, welche ALA als alleiniges Protein enthalten, nicht gebunden. Bei dem in den Versuchen herrschenden pH-Wert von 6 ist die Oberflächenladung der Materialien aus Siliziumoxid stark negativ geladen, der Nullladungspunkt des Siliziumoxids liegt zwischen pH 1,8 und 2,5 (Kosmulski, 2004)). Auch die Proteine ALA (pI zwischen 4,2 und 4,8 (Montagne et al., 1999; Plate, 2008)) und BLG (pI zwischen 5,3 und 5,4 (Chatterton et al., 2006; Etzel, 2004)) liegen bei diesem pH-Wert als Anionen vor. Somit ist eine Adsorption der Proteine an die Materialoberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen nicht möglich, viel mehr verhindern die elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Adsorbensoberfläche und Protein eine Adsorption der Proteine durch elektrostatische Repulsion (Nakanishi et al., 2001). Der Zuwachs an konformationsabhängiger Entropie durch eine Bindung an das Adsorbens ist für das „weiche“ Protein ALA nicht ausreichend, um die repulsiven elektrostatischen Kräfte zwischen Adsorbensoberfläche und Protein zu überwinden. Dem Protein BLG hingegen gelingt es durch seinen stark hydrophoben Charakter (Kontopidis et al., 2004), die repulsiven elektrostatischen Kräfte zu überwinden und an die Oberflächen von Materialien aus Siliziumoxid zu adsorbieren. Die Affinität des Molkeproteins BLG zu dem Material aus Siliziumoxid ( $K_L=0,65$ ) ist wesentlich geringer als zu dem Material aus Bentonit/Silica, wodurch die Bindekapazität des Materials bei steigender Adsorbenskonzentration und konstanter Proteinkonzentration schnell abnimmt (s. Abb. 5.4). Mischmaterialien aus Siliziumoxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid zeigen bei dem vorliegenden Siliziumoxidanteil von 38,1 % dasselbe Verhalten wie Materialien aus reinem Siliziumoxid. Bei diesem Verhältnis von Siliziumoxid zu  $\gamma$ -Aluminiumoxid im Adsorbens dominieren die Eigenschaften des Sili-

ziumoxids, da die Oberfläche des Adsorbens bei diesem Substitutionsgrad von Siliziumoxid aus Al-Si-Oxid und Siliziumoxid besteht (Daniell et al., 2000). Bedingt durch den verringerten Anteil an reinem Siliziumoxid an der Oberfläche weisen sie zudem eine geringere Kapazität im Vergleich zu den Adsorbentien aus reinem Siliziumoxid auf. Somit bieten diese Materialien für die Adsorption der Molkeproteine ALA und BLG aufgrund der vorliegenden Ergebnisse keine Vorteile gegenüber Materialien aus reinem Siliziumoxid. Mit den untersuchten Materialien aus Siliziumoxid oder Siliziumoxid/ $\gamma$ -Aluminiumoxid konnten zudem kein stabiles Chromatographiebetten aufgebaut werden. Es kam im Fall von Pulvern (EX M 1991) sofort zu starken Bettkompressionen, welche bereits ab der Equilibrierung der Säule zu deren Verblocken führten. Der Einsatz dieser Materialien in Granulatform erlaubte den Aufbau eines Chromatographiebettes, jedoch kam es im Verlauf weniger Läufe (1 bis 3) wiederum zu optisch deutlich erkennbaren Bettkompressionen, welche letzten Endes dann in einer massiven Bettkompression und dem Verblocken der Säule mündeten. Im Vergleich dazu weisen Materialien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid bereits in Pulverform deutlich bessere Eigenschaften hinsichtlich der Bettstabilität auf. Sie besitzen bis zu einem pH-Wert von 8 eine positive Oberflächenladung (Wang et al., 2002; Kosmulski, 2004) und ermöglichen somit den bei pH 6 in anionischer Form vorliegenden Molkeproteinen ALA und BLG die Adsorption über elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken (Garcia et al., 2007; Urano and Fukuzaki, 1997). Eine Elution der adsorbierten Proteine ist durch Citrat und Phosphat möglich und wurde auch in dieser Arbeit bestätigt. Die Adsorption von Phosphat- oder Citrationen an die Oberfläche der Materialien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid führt dabei zu einer Verdrängung gebundenen Proteins von deren Oberflächen (Garcia et al., 2007). Dies wird zudem verstärkt durch repulsive elektrostatische Kräfte durch die dabei induzierte Ladungsumkehr auf der Adsorbensoberfläche. Zudem wird die Elution der Proteine durch das Binden von Salzen an die Carboxylgruppen der adsorbierten Proteine verstärkt. Bereits in Pulverform (EX M 1986) können dauerhaft stabile Chromatographiebetten aufgebaut werden. Die Granulate aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid hingegen besitzen kaum eine bessere Langzeitstabilität als die Materialien aus Siliziumoxid oder Siliziumoxid/ $\gamma$ -Aluminiumoxid. Allein die mechanisch hochstabilen Partikel (EX M 2070) aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid erfüllen die notwendigen Stabilitätskriterien. Mit diesem Partikeltyp ist es möglich, stabile Chromatographiebetten aufzubauen, welche auch nach weit mehr als 10 Läufen keine offensichtlichen Anzeichen mechanischer Zerstörung zeigen. Die Säulen lassen sich selbst mit Proteinsuspensionen vergleichbar zu Molkekonzentrat überströmen und ihre Kapazität bleibt stabil. Auf Grund der geringen massenspezifische Proteinbindkapazität der Partikelschüttungen aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) wurde ein Typ geringeren Durchmessers entwickelt (EX M 2181), der wie erwartet eine signifikant verbesserte Bindekapazität aufweist und letztlich das kommerzielle Referenzmaterial Pall Q HyperD F in dieser Eigenschaft übertrifft. Bei der Beladung der Säulen aus EX M 2181 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) konnten geringfügige Verschiebungen der Anteile der Proteine ALA und BLG beobachtet werden, diese sind jedoch nicht ausreichend, um eine selektive Adsorption zu deren vollständigen Trennung zu nutzen. Für geringe Injektionsvolumina von bis zu 10 Millilitern können die Proteine ALA und BLG bei der selektiven Elution im Stufengradienten aus 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8 getrennt werden. Jedoch verfügt die dabei eingesetzte Säule mit einem Bettvolumen von 37 ml unter diesen Betriebsparametern über eine sehr geringe Produktivität von  $2,4 \text{ mg}_{Prot} \cdot \text{kg}_{Ad}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , weshalb der chromatographische Ansatz zur Aufreinigung von Molkeproteinen voraussichtlich als unrentabel



einzustufen ist. Zusätzlich wurden die Materialien auf einen möglichen Einsatz im Expanded Bed Betrieb getestet. Experimentell konnte kein Expanded Bed aus den sphärischen Formen der Materialien erzeugt werden und auch theoretische Betrachtungen belegen, dass sowohl die Partikelgröße als auch die Dichte der untersuchten Materialien für einen solchen Einsatz zu hoch sind. Beide Materialparameter sind bei kommerziellen Expanded Bed Materialien deutlich geringer als bei den betrachteten Adsorbentien der Süd-Chemie AG. Bei der Adsorption von Molkeproteinen an Adsorbentien in Pulverform im Technikumsmaßstab zeigt das Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) deutliche Zunahmen in der Gesamtproteinbindung bei steigender Adsorbensmasse. Mit zunehmender Adsorbensmenge findet nach der Bindung von BLG auch eine verstärkte Bindung von ALA statt. Bei der niedrigeren Adsorbenskonzentration von  $66 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  wird BLG, dessen Anteil am Gesamtprotein 54 % beträgt, nur unvollständig gebunden. Die Bindung von BLG ist bei  $166 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  vollständig, jedoch findet bei dieser Adsorbenskonzentration auch eine zusätzliche Bindung von ALA statt. Das über Protein-Protein-Wechselwirkungen gebundene ALA wird bei den Waschschrinen wieder vom Adsorbens entfernt und das eluierte Protein besteht hauptsächlich aus BLG. Das Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) kann sowohl ALA als auch BLG direkt und ohne Wechselwirkungen zwischen den Proteinen binden. Eine Erhöhung der Adsorbenskonzentration bei der Adsorption von Molkeproteinen an das Adsorbens in Pulverform EX M 1986 im Technikumsmaßstab geht mit einer Erhöhung der Gesamtproteinbindung von 42 % auf 77 % einher. Auch bei diesem Adsorbens bewirkt die Erhöhung der Adsorbenskonzentration über  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$  keine Erhöhung der eluierten Proteinmenge bezogen auf das gebundene Protein. Zusätzlich gebundenes Protein geht dabei nur zu sehr geringen Mengen über die Waschschrine verloren, die Elution wird anstatt dessen mit steigender Adsorbenskonzentration zunehmend unvollständig. Das Optimum für die Proteinaufarbeitung liegt somit bei beiden Adsorbentien bei  $100 \text{ g}_{Ad} \cdot \text{l}^{-1}$ . Dies wird durch die Ergebnisse aus der Betrachtung der Einzelproteine über zunehmende Adsorbenskonzentrationen bei der Proteinadsorption im Labormaßstab und Adsorptionsisothermen aus dem chromatographischen Ansatz bestätigt. Die Kapazitäten der Pulver liegen erwartungsgemäß deutlich über den im chromatographischen Ansatz ermittelten Werten der granularen und sphärischen Darreichungsformen der Materialien. Der Einsatz von Partikeln sollte die Abtrennung der festen Phase von der Flüssigphase erleichtern. Hierfür wurden Partikel aus Siliziumoxid (EX M 1907) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) auf ihre Stabilität in einem Testverfahren nach UNILEVER untersucht. Dabei konnte keine nennenswerte Zerstörung der Partikel beobachtet werden. Versuche im Rührkessel zeigten jedoch, dass die Abriebsversuche nach UNILEVER für dieses System mit in das Material eingetauchten Rührerblättern und Stromstörern nicht hinreichend waren. Es wurde besonders für das partikuläre Adsorbens aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070) ein starker Abrieb festgestellt, welcher sich durch eine deutliche Trübung der Lösungen bemerkbar machte. Da dies in jedem Fall in einer zusätzlichen Abtrennoperation des Abriebs resultiert, entfiel der Vorteil der erleichterten Phasentrennung durch den Einsatz von Adsorbenspartikeln trotz vielversprechender Adsorptionsergebnisse. Zudem liegen die Werte für Proteinbindung und -elution deutlich unter denen ermittelt für die Adsorbentien in Pulverform. Einen starken Einfluss auf die Proteinadsorption haben die Salze der Molke, welche zuvor schon in der Chromatographie für die Abweichungen der Ergebnisse von den Ergebnissen aus idealisierten Adsorptionsversuchen unter Einsatz niedermolekularer Puffers und Modellproteinen verantwortlich waren. Ab Beginn der Adsorption war auch

im Rührkessel stets ein deutlicher Abfall des Leitwertes, ein Indikator für den Ionengehalt von Lösungen, zu beobachten. Der negative Einfluss der Salze auf die Proteinadsorption wurde darüber hinaus durch Adsorptionsversuche mit zusätzlicher Salzsupplementierung bestätigt (Kap. 5.4.3). Mit steigender zusätzlicher Salzkonzentration konnte eine stetige Abnahme der adsorbierten Proteinmenge beobachtet werden. Dieser Einfluss der Salze auf die Proteinadsorption ist für Adsorbentien aus Siliziumoxid, bei denen die Wechselwirkungen zwischen Materialoberfläche und Protein hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, deutlich geringer als für Adsorbentien aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid, deren Wechselwirkungen zwischen Materialoberfläche und Protein vorwiegend ionischer Natur sind. Bei der Proteinadsorption im Rührkessel zeigt Lactose keine Wechselwirkungen mit den eingesetzten Adsorbentien und verlässt das System über die Waschschriffe. Bestätigt wurde diese Beobachtung durch die Ergebnisse aus Batchversuchen mit den Adsorbentien aus Siliziumoxid (EX M 1907) und  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 2070), in welchen die Bilanz der eingesetzten Lactose über die Waschschriffe geschlossen werden konnte (Kap. 5.4.4). Des Weiteren konnten keine nennenswerten Mengen an Lactose in Elutionsproben wiedergefunden werden. Somit ist eine Wechselwirkung zwischen Lactose und den Materialien aus Siliziumoxid und  $\gamma$ -Aluminiumoxid ausgeschlossen. Basierend auf den Ergebnissen aus Adsorptionsisothermen, Adsorptionsversuchen im Labormaßstab und Rührkesselversuchen im Technikumsmaßstab wurde ein Rührkesselprozess in SuperPro Designer ausgelegt. Der Prozess besteht aus zwei parallel arbeitenden Rührkesselkaskaden, von denen jede aus je drei Rührkesseln besteht. Die Phasentrennung erfolgt mittels Mikrofiltration und die Hauptproduktströme werden vor ihrer Sprühtrocknung zu den Hauptprodukten ALA und BLG mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. In der ersten Rührkesselkaskade wird BLG aus dem Edukt Dünnmolke an ein pulverförmiges Adsorbens aus Siliziumoxid (EX M 1991) gebunden. Das Adsorbens wird anschließend mit Wasser gewaschen und mit 0,5 M NaOH eluiert. In der zweiten Rührkesselkaskade wird ALA mittels eines Adsorbens in Pulverform aus  $\gamma$ -Aluminiumoxid (EX M 1986) aus der an BLG angereicherten Dünnmolke entfernt. Der nach der Abreicherung beider Protein-Hauptkomponenten der Molke verbleibende Lactosestrom verlässt die Anlage und könnte beispielsweise klassisch in einer Ultrafiltrationsanlage weiter aufgearbeitet werden. Die Produktivität war bei dem Batch-Ansatz mit  $10,3 \text{ g}_{Prot} \cdot \text{kg}_{Ad}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  wesentlich höher als im chromatographischen Ansatz. Die Rentabilität des vorgestellten Verfahrens lässt sich unter verschiedenen Aspekten beleuchten. Die maßgebliche Einflussgröße ist hierbei der Verkaufspreis der erzeugten Molkeproteine. An einzelnen Proteinen angereicherte Proteinfractionen, erzeugt mittels Ultrafiltrationsverfahren, erzielen in der Nahrungsmittelindustrie, z.B. für Baby- oder Sportlernahrung, Verkaufspreise um die  $100 \text{ \$} \cdot \text{kg}^{-1}$  (entspricht  $75,52 \text{ €}$ ) (Buchholz, 2010). Bei diesen Verkaufspreisen wird es sehr schwierig sein, gegen das günstige Massenverfahren der Ultrafiltration innerhalb von 5 Jahren wirtschaftlich zu arbeiten. Bei hinreichender Einzelkomponentenreinheit und einem Einsatz dieser Fractionen, z.B. als Zutaten für Functional Foods, Nutraceuticals oder medizinisch wirksame Zusatzstoffe, sollen die Molkeproteine einen Marktwert von bis zu  $600 \text{ \$}$  (umgerechnet  $453 \text{ €}$ ) erzielen können (El-Sayed, 2011; Smithers, 2008). Wirtschaftlichkeitsberechnungen mit SuperPro Designer ergaben eine voraussichtliche Rentabilität der Anlage in unter 5 Jahren für diesen Marktwertbereich der Produkte. Andere Autoren wie El-Sayed (El-Sayed, 2010) hingegen gehen von einem Einkaufspreis von  $15 \text{ £} \cdot \text{kg}^{-1}$  (umgerechnet  $18 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) für Molkekonzentrat und einem Marktwert von  $350 \cdot 10^3 \text{ £} \cdot \text{kg}^{-1}$  (umgerechnet  $419 \cdot 10^3 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) für ALA und  $30 \cdot 10^3 \text{ £} \cdot \text{kg}^{-1}$  (umgerechnet  $36 \cdot 10^3 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$ )

für BLG aus. Hierbei wurden vermutlich die Marktpreise der Proteine in hochreiner Form und nicht die Marktpreise von Proteinfractionen, angereichert mit diesen Proteinen, als Zahlenwerte für die wirtschaftliche Betrachtung des Prozesses herangezogen. Der exakte Marktwert aufgereinigter Proteine richtet sich nämlich maßgeblich nach deren Reinheit. Ein wichtiger weiterführender Schritt des in dieser Arbeit vorgestellten Aufarbeitungsprozesses wären somit dessen Umsetzung in einer Pilotanlage und die Feststellung der Ausbeuten und Reinheiten der Proteine unter Produktionsbedingungen.



# Literaturverzeichnis

- 03/055322, W. (2003). Infant formula compositions comprising increased amounts of alpha-lactalbumin.
- Adlerova, L., Bartoskova, A., & Faldyna, M. (2008). Lactoferrin: A review. *Vet. Med*, 53:457–468.
- Aisen, P. & Liebman, A. (1972). Lactoferrin and transferrin: A comparative study. *Biochim. Biophys. Acta*, 257:314–323.
- Al-Mashikh, S. A. & Nakai, S. (1987). Reduction of beta-lactoglobulin content of cheese whey by polyphosphate precipitation. *J. Food Sci.*, 52:1237–1244.
- Al-Mashikhi, S. A., Li-Chan, E., & Nakai, S. (1988). Preparation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography. *J. Dairy Sci.*, 71:1747–1755.
- Amersham Biosciences (2004). Data file, Streamline Direct CDT I.
- Anfinsen, C. B., Richards, F. M., & Edsall, J. T. (1994). *Advances in Protein Chemistry 45: Lipoproteins, Apolipoproteins, and Lipases*. Academic Press Inc.
- Aschaffenburg, R. & Drewry, J. (1957). Improved method for the preparation of crystalline  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin from cow's milk. *BCJ*, 65:273–277.
- Balagtas, J. V., Hutchinson, F. M., Krochta, J. M., & Summers, D. A. (2003). Anticipating market effects of new uses for whey and evaluating returns to research and development. *J. Dairy Sci.*, 86:1662–1672.
- Ball, G. F. M. (2006). *Vitamins in Foods, Analysis, Bioavailability, and Stability*. Taylor and Francis Group.
- Baron, M. H., Revault, M., Servagent-Noinville, S., Abadie, J., & Quiquampoix, H. (1999). Chymotrypsin adsorption on montmorillonite: Enzymatic activity and kinetic ftir structural analysis. *J. Colloid Interface Sci.*, 214:319–332.
- Barth, C. A. & Behnke, U. (1997). Ernährungsphysiologische Bedeutung von Molke und Molkenbestandteilen. *Nahrung*, 41:2–12.
- Bathen, D. & Breitbach, M. (2001). *Adsorptionstechnik*. Springer-Verlag.
- Belik, E. V., Brykalov, A. V., Bostanova, F. A., & Golovkina, E. M. (2009). Study of acidity of the modified aluminosilicate sorbents prepared by the method of destructive epitaxial precipitation. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 82:166–168.

- Bergaya, F., Theng, B. K. G., & Lagaly, G. (2006). *Handbook of Clay Science*. Elsevier Science & Technology.
- Bhattacharjee, S., Bhattacharjee, C., & Datta, S. (2006). Studies on the fractionation of  $\beta$ -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chrom. *J. Membr. Sci.*, 275:141–150.
- Bhut, B. V., Weaver, J., Carter, A. R., Wickramasinghe, S. R., & Husson, S. M. (2011). The role of polymer nanolayer architecture on the separation performance of anion-exchange membrane adsorbers: I. Protein separations. *Biotechnol. Bioeng.*, 108:2645–2653.
- Biolac GmbH & Co. KG (2011).  
<http://www.biolac.com/c125718e002c675e/o/5859e3c5e7f64fcec12571990023fb14>.
- BioRad (1999). Uno<sup>tm</sup> Q&S continuous bed ion exchange column. Instruction Manual.
- Boumaza, A., Favaro, L., Le'dion, J., Sattonnay, G., Brubach, J. B., Berthet, P., Huntz, A. M., Royc, P., & Té, R. (2009). Transition alumina phases induced by heat treatment of boehmite: An x-ray diffraction and infrared spectroscopy study. *J. Solid State Chem.*, 182:1171–1176.
- Bregna, H. E. (1994). *The colloid chemistry of silica (Advances in Chemistry Series)*. American Chemical Society.
- Buchholz, H. (2010). Biolac GmbH & Co. KG, Persönliche Mitteilung.
- Bujdák, J. & Rode, B. M. (1996). The effect of smectite composition on the catalysis of peptide bond formation. *J. Mol. Evol.*, 43:326–333.
- Caessens, P. W. J. R. & Gruppen, S. V. H. (1997). Method for the isolation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physiological characterization of the purified product. *Int. Dairy J.*, 7:229–235.
- Cals, M.-M., Maillart, P., Brignon, G., Anglade, P., & Dumas, B. R. (1991). Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family. *Eur. J. Biochem.*, 198:733–739.
- Chatterton, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P., & Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin-technological implications for processing. *Int. Dairy J.*, 16:1229–1240.
- Cheang, B. & Zydney, A. L. (2004). A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *J. Membr. Sci.*, 231:159–167.
- Chen, W. L., Hwang, M. T., Liau, C. Y., Ho, J. C., Hong, K. C., & Mao, S. J. T. (2005).  $\beta$ -lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra. *J. Dairy Sci.*, 88:1618–1630.
- Chizallet, C. & Raybaud, P. (2009). Pseudo-bridging silanols as versatile bronsted acid sites of amorphous aluminosilicate surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48:2891–2893.

- Chrysin, E. D., Brew, K., & Acharya, K. R. (2000). Crystal structures of apo- and holo-bovine  $\alpha$ -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *J. Biol. Chem.*, 275:37021–37029.
- Conrado, L. S., Veredas, V., Nóbrega, E. S., & Santana, C. C. (2005). Concentration of  $\alpha$ -lactalbumin from cow milk whey through expanded bed adsorption using a hydrophobic resin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22:501–509.
- Daniell, W., Schubert, U., Glöckler, R., Meyer, A., Noweck, K., & Knözinger, H. (2000). Enhanced surface acidity in mixed alumina–silicas: a low-temperature FTIR study. *Appl. Catal., A*, 196:247–260.
- Davisco Foods Inc. (2012). <http://www.daviscofoods.com/docs/ixvsmf.pdf>.
- de Wit, J. N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.*, 81:597–608.
- Dissanayake, M. & Vasiljevic, T. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *J. Dairy Sci.*, 92:1387–1397.
- Doultani, S., Turhan, K. N., & Etzel, M. R. (2004). Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. *Process Biochem.*, 39:1737–1743.
- D'Souza, N. M. & Mawson, A. J. (2005). Membrane cleaning in the dairy industry: A review. *Crit. Rev. Food Sci.*, 45:125–134.
- El-Sayed, M. E. H. (2010). *Selective Cation-exchange Adsorption of the Two Major Whey Proteins*. PhD thesis, University of Cambridge.
- El-Sayed, M. E. H. (2011). Trends in whey protein fractionation. *Biotechnol. Lett.*, 33:1501–1511.
- El-Sayed, M. E. H. & Chase, A. C. (2010). Purification of the two major proteins from whey concentrate using a cation-exchange selective adsorption process. *Biotechnol. Prog.*, 26:192–199.
- Elgar, D. F., Norris, C. S., Ayers, J. S., Pritchard, M., Otter, D. E., & Palmano, K. P. (2000). Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene–divinylbenzene. *JCA*, 878:183–196.
- Elofsson, C., Dejmek, P., Paulsson, M., & Burling, H. (1997). Characterization of a cold-gelling whey protein concentrate. *Int. Dairy J.*, 7:601–608.
- Etzel, M. R. (2004). Manufacture and use of dairy protein fractions. *J. Nutr.*, 134:996–1002.
- Farrell, H. M. J., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F., & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 87:1641–1674.

- Fetzer, S. & Kaleja, M. (2003). Industrielle Aufreinigung biotechnologischer Therapeutika. *Laborwelt*, 4:14–18.
- Fischer, W., Gustafsson, L., Mossberg, A.-K., Gronli, J., Mork, S., Bjerkvig, R., & Svanborg, C. (2004). Human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells (hamlet) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival. *Cancer Res.*, 64:2105–2112.
- Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (2010). Optimierung der Ultrafiltrationsleistung sowie Verbesserung der mikrobiologischen Qualität bei der Herstellung von Molkekonzentraten durch vorgeschaltete Mikrofiltration (MF). IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), AIF 16300 N.
- Fox, K. K., Holsinger, V. H., Posati, L. P., & Pallansch, M. J. (1967). Separation of  $\beta$ -lactoglobulin from other milk serum proteins by trichloroacetic acid. *J. Dairy Sci.*, 50:1363–1367.
- Gan, L. M., Zhang, K., & Chew, C. H. (1996). Preparation of silica nanoparticles from sodium orthosilicate in inverse microemulsions. *Colloids Surf., A*, 110:199–206.
- Garcia, A. R., de Barros, R. B., Fidalgo, A., & Ilharco, L. M. (2007). Interaction of l-alanine with alumina as studied by vibrational spectroscopy. *Langmuir*, 23:10164–10175.
- Geberding, J. S. & Byers, C. H. (1998). Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *J. Chromat. A*, 808:141–151.
- Goodall, S., Grandison, A. S., Jauregi, P. J., & Price, J. (2008). Selective separation of the major whey proteins using ion exchange membranes. *J. Dairy Sci.*, 91:1–10.
- Gougeon, R. D., Soulard, M., Reinholdt, M., Miehé-Brendlé, J., Chézeau, J.-M., Le Dred, R., Marchal, R., & Jeandet, P. (2003). Polypeptide adsorption on a synthetic montmorillonite: A combined solid-state NMR spectroscopy, X-ray diffraction, thermal analysis and N<sub>2</sub> adsorption study. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2003:1366–1372.
- Greene, L. H., Hamada, D., Eyles, S. J., & Brew, K. (2003). Conserved signature proposed for folding in the lipocalin superfamily. *FEBS Letters*, 553:39–44.
- Greenland, D. J. (1965). Interaction between clays and organic compounds in soils. I. Mechanisms of interaction between clays and defined organic compounds. *Soils Fertil*, 28:415–425.
- Gurgel, P. V., Carbonell, R. G., & Swaisgood, H. E. (2001). Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin. *Bioseparation*, 9:385–392.
- Harkensee, D., Kökpinar, M., Walter, J., Kasper, C., Beutel, S., Reif, O. W., Scheper, T., & Ulber, R. (2006). Innovative modular membrane adsorber system for high-throughput downstream screening for protein purification. *Biotechnol. Prog.*, 22:1215–1219.
- Heddleson, R. A., Allen, J. C., Wang, Q., & Swaisgood, H. E. (1997). Purity and yield of  $\beta$ -lactoglobulin isolated by an n-retinyl-celite bioaffinity column. *J. Agric. Food Chem.*, 45:2369–2373.



- Helmchen, G. & Glatz, B. (1978). Ein apparativ einfaches System und Säulen höchster Trennleistung zur präparativen Mitteldruck-Flüssigchromatographie. Universität Stuttgart.
- Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., & Fukuhara, K. (1990). Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173:639–646.
- Hjorth, R. (1997). Expanded-bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments. *Trends Biotechnol.*, 15:230–235.
- Janusz, W., Skwarek, E., Zarko, V. I., & Gun'ko, V. M. (2007). Structure of electrical double layer at the  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ /electrolyte solution interface. *Physicochem. Porbl. Mi.*, 41:215–225.
- Johnston, C. T., Premachandra, G. S., Szabo, T., Lok, J., & Schoonheydt, R. A. (2012). Interaction of biological molecules with clay minerals: A combined spectroscopic and sorption study of lysozyme on saponite. *Langmuir*, 28:611–619.
- Jozefaciuk, G. & Bownako, G. (2002). Effect of acid and alkali treatment on surface areas and adsorption energies of selected minerals. *Clays Clay Miner.*, 50:771–783.
- Järvinen, K.-M., Chatchatee, P., Bardina, L., Beyer, K., & Sampson, H. A. (2001). IgE and IgG binding epitopes on  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 126:111–118.
- Jung, J.-M., Gunes, D. Z., & Mezzenga, R. (2010). Interfacial activity and interfacial shear rheology of native  $\beta$ -lactoglobulin monomers and their heat-induced fibers. *Langmuir*, 26:15366–15375.
- Kiefer, T. (2011). TU Kaiserslautern, Persönliche Mitteilung.
- Kinekawa, Y.-I. & Kitabatake, N. (1996). Purification of p-lactoglobulin from whey protein concentrate by pepsin treatment. *J. Dairy Sci.*, 79:350–356.
- Kökpınar, M., Harkensee, D., Kasper, C., Scheper, T., Zeidler, R., Reif, O. W., & Ulber, R. (2006). Innovative modular membrane adsorber system for high-throughput downstream screening for protein purification. *Biotechnol. Prog.*, 22:1215–1219.
- Kleinberg, D. L., Todd, J., & Babitsky, G. (1983). Inhibition by estradiol of the lactogenic effect of prolactin in primate mammary tissue: Reversal by antiestrogens LY 156758 and tamoxifen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4144–4148.
- Kondo, A., Urabe, T., & Yoshinaga, K. (1996). Adsorption activity and conformation of  $\alpha$ -amylase on various ultrafine silica particles modified with polymer silane coupling agents. *Colloids Surf., A*, 109:129–136.
- Konrad, G. & Kleinschmidt, T. (2008). A new method for isolation of native  $\alpha$ -lactalbumin from sweet whey. *Int. Dairy J.*, 18:47–54.

- Konrad, G., Lieske, B., & Faber, W. (2000). A large-scale isolation of native  $\beta$ -lactoglobulin: Characterization of physicochemical properties and comparison with other methods. *Int. Dairy J.*, 10:713–721.
- Konrad, G., Lieske, B., & Kleinschmidt, T. (2001). Einsatz der membranfiltration bei der isolierung von  $\beta$ -lactoglobulin aus labmolke. *Chem. Ing. Tech.*, 73:1483–1487.
- Kontopidis, G., Holt, C., & Sawyer, L. (2004). Invited review:  $\beta$ -lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *J. Dairy Sci.*, 87:785–796.
- Korhonen, H., Marnila, P., & Gill, H. S. (2000). Milk immunoglobulins and complement factors. *Brit. J. Nutr.*, 84:75–280.
- Kosmulski, M. (2004). pH-dependent surface charging and points of zero charge II. Update. *J. Colloid Interface Sci.*, 275:214–224.
- Kosmulski, M. (2009). pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach. *J. Colloid Interface Sci.*, 337:439–448.
- Kromidas, S. & Kuss, H.-J. (2008). *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kussendrager, K. D. & van Hooijdonk, A. C. M. (2000). Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Brit. J. Nutr.*, 84:19–25.
- Kuwata, T., Pham, A. M., Ma, C. Y., & Nakai, S. (1985). Elimination of p-lactoglobulin from whey to simulate human milk protein. *J. Food Sci.*, 50:606–609.
- Lagaly, G. & Fahn, R. (1983). *Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie. Bd.23*. Wiley-VCH.
- Lønnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77:1537–1543.
- Mailliard, P. & Ribadeau-Dumas, B. (1988). Preparation of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -lactoglobulin-free proteins from whey retentate by NaCl salting out at low pH. *J. Food Sci.*, 53:743–745.
- Martin, R., Bailey, S., Eberl, D., Fanning, D., Guggenheim, S., Kodama, H., Pevear, D., Srodon, J., & Wicks, F. (1991). Report of the clay mineral society nomenclature committee: Revised classification of the clay minerals. *Clays Clay Miner.*, 39:333–335.
- Maté, J. & Krochta, J. M. (1994).  $\beta$ -lactoglobulin separation from whey protein isolate on a large scale. *J. Food Sci.*, 59:1111–1114.
- Müller-Erlwein, E. (1998). *Chemische Reaktionstechnik*. B.G. Teubner.
- Molerus, O. (1982). *Fluid-Feststoff-Strömungen - Strömungsverhalten feststoffbeladener Fluide und kohäsiver Schüttgüter*. Springer.

- Montagne, P., Cuilliere, M. L., Mole, C., Bene, M. C., & Faure, G. (1999). Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mother's parity during the first 2 weeks of lactation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 29:75–280.
- Mulsow, B. B. (2008). *Struktur-Eigenschaftsbeziehungen nichtenzymatisch glykosylierter Molkenproteine*. PhD thesis, Technische Universität Dresden.
- Nakanishi, K., Sakiyama, T., & Imamura, K. (2001). On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J. Biotechnol. Bioeng.*, 91:233–240.
- Nitta, K. & Sugai, S. (1989). The evolution of lysozyme and alpha-lactalbumin. *Eur. J. Biochem.*, 182:111–118.
- Noppe, W., Haezebrouck, P., Hanssens, I., & De Cuyper, M. (1999). A simplified purification procedure of alpha-lactalbumin from milk using Ca(2+)-dependent adsorption in hydrophobic expanded bed chromatography. *Bioseparation*, 8:153–158.
- Norisuye, T., Inoue, M., & Shibayama, M. (2000). Time-resolved dynamic light scattering study on the dynamics of silica gels during gelation process. *Macromolecules*, 33:900–905.
- Outinen, M., Tossavainen, O., Tupasela, T., Koskela, P., Koskinen, H., Rantamäki, P., Syväoja, E.-L., Antila, P., & Kankare, V. (1996). Fractionation of proteins from whey with different pilot scale processes. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 29:411–417.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., Skurnik, M., & Conway, P. L. (1997). Inhibition of pathogen adhesion by  $\beta$ -lactoglobulin. *Int. Dairy J.*, 7:685–692.
- Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E., & Kraulis, P. J. (1986). The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324:383–385.
- Peri, J. B. (1965a). Infrared and gravimetric study of the surface hydration of  $\gamma$ -alumina. *J. Phys. Chem.*, 69:211–219.
- Peri, J. B. (1965b). Infrared study of adsorption of ammonia on dry  $\gamma$ -alumina. *J. Phys. Chem.*, 69:231–239.
- Peri, J. B. (1965c). A model for the surface of  $\gamma$ -alumina. *J. Phys. Chem.*, 69:220–230.
- Permyakov, E. A. & Berliner, L. J. (2000a).  $\alpha$ -lactalbumin: Structure and function. *Int. Dairy J.*, 18:695–704.
- Permyakov, E. A. & Berliner, L. J. (2000b).  $\alpha$ -lactalbumin: Structure and function. *FEBS Letters*, 473:269–274.
- Pike, A. C. W., Brew, K., & Acharya, K. R. (1996). Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine  $\alpha$ -lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure*, 4(6):691–703.

- Plate, K. (2008). *Großtechnische Gewinnung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke unter Verwendung von Membrantechnologie*. PhD thesis, Universität Hannover.
- Plate, K., Beutel, S., Buchholz, H., Demmer, W., Fischer-Frühholz, S., Reif, O., Ulber, R., & Scheper, T. (2006). Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography. *J. Chromat. A*, 1117:–.
- Pouliot, Y. (2008). Membrane processes in dairy technology—from a simple idea to world-wide panacea. *Int. Dairy J.*, 18:735– 740.
- Qi, P. X. & Onwulata, C. I. (2011). Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: effect of extrusion moisture content. *J. Dairy Sci.*, 94:2231–2244.
- Quiquampoix, H. (2008). Interaction with soil constituents determines the environmental impact of proteins. 5th International Symposium ISMOM 2008 - November 24th - 28th, Pucón, Chile.
- Richardson, J. F. & Zaki, W. N. (194). Sedimentation and fluidisation. *Trans. Inst. Chem. Eng.*, 32:35–53.
- Richtlinie (1997). 97/23/EG des Europäischen Parlaments und des Rates.
- Riechers, D. (2005). *Untersuchungen zum Bindungsverhalten biologisch aktiver Substanzen an Bentonite*. PhD thesis, Universität Hannover.
- Righetti, P. G. & Caravaggio, T. (1976). Isoelectric points and molecular weights of proteins: A table. *J. Chromat. A*, 127:1–28.
- Rodríguez Furlán, L. T., Pérez Padilla, A., & Campderrós, M. E. (2010). Functional and physical properties of bovine plasma proteins as a function of processing and pH, application in a food formulation. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2:256–267.
- Saufi, S. M. (2010). *Mixed Matrix Membrane Chromatography for Bovine Whey Protein Fractionation*. PhD thesis, University of Canterbury.
- Saufi, S. M. & Fee, C. J. (2009). Fractionation of  $\beta$ -lactoglobulin from whey by mixed matrix membrane ion exchange chromatography. *Biotechnol. Bioeng.*, 103:138–147.
- Schlimme, E. & Buchheim, W. (1995). *Milch und ihre Inhaltsstoffe. Chemische und physikalische Grundlagen*. Th. Mann.
- Schlomach, J. (2006). *Feststoffbildung bei technischen Fällprozessen, Untersuchung zur industriellen Fällung von Siliziumoxid und Calciumcarbonat*. PhD thesis, Universität Karlsruhe.
- Schmid, R. D. (2002). *Taschenatlas der Biotechnologie und Genetik*. Wiley-VCH.

- Schmidt, R. H., Packard, V. S., & Morris, H. A. (1984). Effect of processing on whey protein functionality. *J. Dairy Sci.*, 67:2723–2733.
- Schmidt-Traub, H., Schulte, M., & Seidel-Morgenstern, A. (2005). *Preparative Chromatography*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins -from "gutter-to-gold". *Int. Dairy J.*, 18:695–704.
- Sposito, G., Skipper, N. T., Sutton, R., Park, S.-H., Soper, A. K., & Greathouse, J. A. (1999). Surface geochemistry of the clay minerals. *Proc. Natl. Acad.*, 96:3358–3364.
- Stanciuc, N. & Rapeanu, G. (2010). An overview of bovine  $\alpha$ -lactalbumin structure and functionality. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*, 34:82–93.
- Stefani, A. & Sequi, P. (1978). Interaction between kaolinite and amino acid components of soil organic matter. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.*, 141:3–10.
- Stieß, M. (2007). *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie 1: Beschreibung und Erzeugung von dispersen Stoffen*. Springer-Verlag.
- Suh, C. W., Kim, M. Y., Choo, J. B., Kim, J. K., Kim, H. K., & Lee, E. K. (2004). Analysis of protein adsorption characteristics to nano-pore silica particles by using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Biotechnology*, 112:367–277.
- Tanaka, K. & Ishizuka, T. (1979). Elution behaviour of acids in ion-exclusionchromatography using a cation-exchange resin. *JCA*, 174:153–157.
- Thiel, A. (2009). Adsorption und Chromatographie von Proteinen und Polyphenolen mit neuen Silikatgranulaten. Master's thesis, TU Kaiserslautern.
- Tolkach, A., Steinle, S., & Kulozik, U. (2005). Optimization of thermal pretreatment conditions for the separation of native  $\alpha$ -lactalbumin from whey protein concentrates by means of selective denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Food Sci.*, 70:557–566.
- Töpel, A. (2004). *Chemie und Physik der Milch: Naturstoff - Rohstoff - Lebensmittel*. Behr.
- Trombetta, M., Busca, G., Rossini, S., Piccoli, V., Cornaro, U., Guercio, A., Catani, R., & Willey, R. J. (1998). FT-IR studies on light olefin skeletal isomerization catalysis III. Surface acidity and activity of amorphous and crystalline catalysts belonging to the  $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$  system. *Journal of Catalysis*, 179:581–596.
- Ulber, R., Plate, K., Weiss, T., Demmer, W., Buchholz, H., & Scheper, T. (2001). Downstream processing of bovine lactoferrin from sweet whey. *Acta Biotechnol.*, 21:27–34.
- Urano, H. & Fukuzaki, S. (1997). Influence of anionic compounds on adsorption behavior of bovine serum albumin at oxide-water interfaces. *J. Ferment. Bioeng.*, 83:261–266.

- van Oss, C. J., Wu, W., Giese, R. F., & Naim, J. O. (1995). Interaction between proteins and inorganic oxides – adsorption of albumin and its desorption with a complexing agent. *Colloids Surf., A*, 4:185–189.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2002). *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH.
- Voit, H. & Mersmann, A. (1985). Allgemeingültige aussage zur mindest-rührerdrehzahl beim suspendieren. *Chem.-Ing.-Tech.*, 57:692–693.
- Vyas, H. K., Izco, J. M., & Jiménez-Flores, R. (2002). Scale-up of native  $\beta$ -lactoglobulin affinity separation process. *J. Dairy Sci.*, 85:1639–1645.
- Wang, Y., Bryan, C., Xu, H., Pohl, P., Yang, Y., & Brinker, C. J. (2002). Interface chemistry of nanostructured materials: Ion adsorption on mesoporous alumina. *JCI*, 254:23–30.
- Weiss, A. (1959). Über das Kationenaustauschvermögen der tonminerale III. Der Kationenaustausch bei Kaolinit. *ZAAC*, 299:92–120.
- Weiß, T. (1999). *Neue Membrantechnologien zur Isolierung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke –Methodenentwicklung für den industriellen Einsatz*. PhD thesis, Universität Hannover.
- Wiesen, S. (2010). TU Kaiserslautern, persönliche Mitteilung.
- WO2004/091306 (2004). Method for producing a whey protein concentrate enriched in betalactoglobulin and texture enhancer based thereupon for use in dairy products.
- Wolfson, L. M. & Summer, S. S. (1993). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system. *J. Food Prot.*, 56:867–892.
- Wong, D. W. S., Camirand, W. M., Pavlath, A. E., Parris, N., & Friedman, M. (1996). Structures and functionalities of milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci.*, 36:807–844.
- Wong, N. P. (1999). *Fundamentals of Dairy Chemistry*. CBS Publishers & Distributors.
- Yoshida, S. & Ye-Xiuyun (1991). Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography. *J. Dairy Sci.*, 74:1439–1444.
- ZMB Zentrale Milchmarkt Berichterstattung GmbH (2012). ZMB 04/2012.

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Struktur von ALA (El-Sayed, 2011) . . . . .	5
2.2	Struktur von BLG (Papiz et al., 1986) . . . . .	6
2.3	Schichtstruktur Montmorillonit (Lagaly and Fahn, 1983) . . . . .	12
2.4	Darstellung synthetischer Silicate (Bregna, 1994; Schlomach, 2006) . . . . .	13
2.5	Schematische Darstellung eines Silicapartikels, Partikelgröße: 5 bis ca. 1500 nm (Bregna, 1994) . . . . .	14
2.6	Modell der Oberflächenveränderung von $Al_2O_3$ durch Substitution von Al durch Si. Reines $Al_2O_3$ (A), 1.5 – 5 % $SiO_2$ (B), 10 – 20 % $SiO_2$ (C), 30 – 40 % $SiO_2$ (D), 60 – 80 % $SiO_2$ (E) und 90 – 100 % $SiO_2$ (F). (Daniell et al., 2000) . . . . .	15
3.1	Chromatogramm eines Standardgemischs aus 30 $\mu g$ ALA, 120 $\mu g$ BLG, und 300 $\mu g$ BSA, Injektionsvolumen: 100 $\mu l$ , Flussrate: 1 $ml \cdot min^{-1}$ , Eluent: Wasser, Trifluoressigsäure, Acetonitril, Säule: PLRS-100 Polymer Laboratories . . . . .	19
3.2	Schematischer Elutionsgradient zur Proteinelution in einer BioRad Uno1 Säule, in Anlehnung an (BioRad, 1999), Flussrate: 1 $ml \cdot min^{-1}$ , Eluent: 0,5 M Natriumhydroxid + 1,0 M Natriumchlorid . . . . .	28
3.3	Schematischer Elutionsgradient zur Proteinelution in einer Kronlab TAC25 Säule, Flussrate: 5 $ml \cdot min^{-1}$ , Eluent: 0,5 M Natriumhydroxid + 1,0 M Natriumchlorid . . . . .	30
3.4	Schematischer Versuchsaufbau der Batch-Versuche im Minifors-Reaktor . . . . .	33
3.5	Schematischer Versuchsaufbau der Batch-Versuche im Bioengineering R'ALF Reaktor . . . . .	34
4.1	Adsorptionsisothermen von ALA und BLG an EX M 1221 (Betonit/Silica), 10 mg Adsorbens, 30 min Inkubation im Überkopfschüttler bei 25 rpm und Raumtemperatur, 1 ml Proteinlösung, 2 ml Eppendorf-Cup . . . . .	38
4.2	Adsorptionsisothermen von ALA und BLG an EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid), 10 mg Adsorbens, 30 min Inkubation im Überkopfschüttler bei 25 rpm und Raumtemperatur, 1 ml Proteinlösung, 2 ml Eppendorf-Cup . . . . .	39
4.3	Adsorptionsisothermen BLG an EX M 1991 (Fällungskieselsäure), 10 mg Adsorbens, 30 min Inkubation im Überkopfschüttler bei 25 rpm und Raumtemperatur, 1 ml Proteinlösung, 2 ml Eppendorf-Cup . . . . .	39
4.4	Adsorptionsisotherme von BLG an EX M 1998 ( $Al_2O_3 / SiO_2$ ), 10 mg Adsorbens, 30 min Inkubation im Überkopfschüttler bei 25 rpm und Raumtemperatur, 1 ml Proteinlösung, 2 ml Eppendorf-Cup . . . . .	40

4.5	Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 1,5 mg ALA in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1221, Flussrate: 1 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf 1/20 Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe . . . . .	42
4.6	Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1221, Flussrate: 1 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf 1/20 Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe . . . . .	43
4.7	Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung eines Gemischs aus 1,5 mg ALA und 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1221, Flussrate: 1 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf 1/20 Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe . . . . .	44
4.8	Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 1,5 mg ALA in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1986, Flussrate: 1 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf 1/20 Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe . . . . .	45
4.9	Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1986, Flussrate: 1 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf 1/20 Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe . . . . .	46
4.10	Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung eines Gemischs aus 1,5 mg ALA und 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: EX M 1986, Flussrate: 1 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf 1/20 Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe . . . . .	47
4.11	Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 1,5 mg ALA in einer Uno1 Säule, Material: PallQ HyperD F, Flussrate: 1 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution . . . . .	49
4.12	Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: PallQ HyperD F, Flussrate: 1 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution . . . . .	49
4.13	Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung eines Gemischs aus 1,5 mg ALA und 3,0 mg BLG in einer Uno1 Säule, Material: PallQ HyperD F, Flussrate: 1 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution . . . . .	50
4.14	Chromatogramm zur Auftrennung von Molkeproteinen bei Raumtemperatur. Proteinquelle: Dünnmolke aus UL35, Adsorbens: PallQ HyperD F. Injektion von 2 BV Dünnmolke, Elutionen mit 8 %, 20 % und 100 % 50 mM Natriumacetatpuffer + 1 M NaCl zu je 10 BV . . . . .	52



4.15 SDS-PAGE von Feed (F) und Durchbruchproben (D 1-3) der chromatographischen Aufreinigung von Molkeproteinen aus Molke, D 1 erstes Drittel des Durchbruchspeaks, D 2 Mitte des Durchbruchs, D 3 letztes Drittel des Durchbruchs . . . . .	52
4.16 SDS-PAGE von Elutionsproben (E). E1 Elution bei 8 % Eluent, E2 Elution bei 20 % Eluent und E3 Elution bei 100 % Eluent, Eluent: 50 mM Kaliumacetat + 1 M NaCl . . . . .	53
4.17 Chromatogramm zur Auftrennung von Molkeproteinen bei Raumtemperatur. Proteinquelle: Molkekonzentrat, Adsorbens: PallQ HyperD F. Injektion von 2 BV Molkekonzentrat, Spülschritt mit demineralisiertem Wasser (10 BV), Elutionen mit 8 %, 20 % und 100 % 50 mM Natriumacetatpuffer + 1 M NaCl zu je 10 BV . . . . .	54
4.18 Druckkennlinien einer Säule mit dem Adsorbens EX M 2181 für demineralisiertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O), 0,1 M Kaliumacetat-Puffer pH 5,7 (Acetat) und Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver (DM). Bestimmt in einer Kronlab TAC25 Säule, 37 ml Bettvolumen . . . . .	60
4.19 Kräftegleichgewicht an einem sphärischem Partikel im von unten nach oben gerichteten Flüssigkeitsstrom, Kräfte: Summe aller am Partikel auftretenden Kräfte $F_p$ , Gewichtskraft $F_G$ , Auftriebskraft $F_A$ , Widerstandskraft $F_w$ . . . . .	62
4.20 Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 1,5 mg ALA in einer Kronlab TAC25 Säule, Material: EX M 2181, Flussrate: 5 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf 1/20 Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe . . . . .	65
4.21 Zeitlicher Verlauf der UV-Absorption während der chromatographischen Aufreinigung von 3,0 mg BLG in einer Kronlab TAC25 Säule, Material: EX M 2181, Flussrate: 5 ml·min <sup>-1</sup> , Zeitpunkt t=0 Beginn der Elution, blaue Linie Baseline, grüne Linie Schnittgerade mit der Messkurve auf 1/20 Peakhöhe, rote Linie Peakhöhe . . . . .	66
4.22 Proteinverteilung im Durchbruch einer 37 ml Bettvolumen Säule aus EX M 2181. Proteinquelle: Dünnmolke aus Molkekonzentrat, Flussrate: 1 ml·min <sup>-1</sup> , Raumtemperatur, Probenvolumen: 2 ml . . . . .	67
4.23 Proteinfractionierung von 5 ml Molkekonzentrat aus Ultralac 35 Pulver mittels EX M 2181 im linearen Gradienten von 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8, Flussrate 4 ml·min <sup>-1</sup> , Raumtemperatur . . . . .	68
4.24 Proteinfractionierung von 5 ml Molkekonzentrat aus Ultralac 35 Proteinpulver mittels EX M 2181 durch Stufengradienten von 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8 und Regeneration des Adsorbens mittels 0,2 M NaOH-Lösung, Flussrate 4 ml·min <sup>-1</sup> , Raumtemperatur . . . . .	69
5.1 Adsorptionsisotherme für EX M 1221 (Bentonit/Silica) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm . . . . .	74

5.2	Kapazitätskurve für EX M 1221 (Bentonit/Silica) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm . . . . .	74
5.3	Adsorptionsisotherme für EX M 1991 (Siliziumoxid) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm . . . . .	75
5.4	Kapazitätskurve für EX M 1991 (Fällungskieselsäure) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm . . . . .	76
5.5	Adsorptionsisotherme für EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm . . . . .	77
5.6	Kapazitätskurve für EX M 1986 $\gamma$ -Aluminiumoxid bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm . . . . .	77
5.7	Verteilung des Gesamtproteins über die Prozessschritte für EX M 1221 (Bentonit/Silica) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm . . . . .	78
5.8	Verteilung des Gesamtproteins über die Prozessschritte für EX M 1991 (Siliziumoxid) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm . . . . .	79
5.9	Verteilung des Gesamtproteins über die Prozessschritte für EX M 1986 ( $\gamma$ -Aluminiumoxid) bei konstanter Gesamtproteinmenge und steigender Adsorbenskonzentration. Proteinquelle: 25 ml Dünnmolke aus Ultralac 35. Adsorption bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min und bei 25 rpm . . . . .	80
5.10	EX M 1221, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, 7 g·l <sup>-1</sup> Gesamtprotein, 4 - 304 g·l <sup>-1</sup> Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm . . . . .	81
5.11	EX M 1221, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, 7 g·l <sup>-1</sup> Gesamtprotein, 4 - 304 g·l <sup>-1</sup> Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm . . . . .	82

- 5.12 EX M 1221, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Elutionen aus Ansätzen steigender Adsorbenskonzentration, Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver, 25 ml Testansatz, Eluent: 0,5 M NaOH + 1 M NaCl, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm . . . . . 83
- 5.13 EX M 1221, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Elutionen aus Ansätzen steigender Adsorbenskonzentration, Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver, 25 ml Testansatz, Eluent: 0,5 M NaOH + 1 M NaCl, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm . . . . . 83
- 5.14 EX M 1991, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, 7 g·l<sup>-1</sup> Gesamtprotein, 4 - 304 g·l<sup>-1</sup> Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm . . . . . 84
- 5.15 EX M 1991, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, 7 g·l<sup>-1</sup> Gesamtprotein, 4 - 304 g·l<sup>-1</sup> Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm 85
- 5.16 EX M 1991, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Elutionen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, Eluent: 0,5 M NaOH + 1 M NaCl, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm . . . . . 86
- 5.17 EX M 1991, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Elutionen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, Eluent: 0,5 M NaOH + 1 M NaCl, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm . . . . . 86
- 5.18 EX M 1986, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, 7 g·l<sup>-1</sup> Gesamtprotein, 4 - 304 g·l<sup>-1</sup> Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm . . . . . 87
- 5.19 EX M 1986, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Überständen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, 7 g·l<sup>-1</sup> Gesamtprotein, 4 - 304 g·l<sup>-1</sup> Adsorbens, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 30 min bei 25 rpm 88
- 5.20 EX M 1986, prozentualer Gehalt der Proteine ALA und BLG in den Elutionen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, Eluent: 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm 89
- 5.21 EX M 1986, Verhältnis der Proteine ALA und BLG in den Elutionen von Dünnmolkelösungen aus Ultralac 35 bei steigender Adsorbenskonzentration, 25 ml Testansatz, Eluent: 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8, Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 10 min bei 25 rpm . 89

5.22	Gesamtprotein über den Batchprozess für 33 g EX M 1991 (Siliziumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver (6,63 g·l <sup>-1</sup> Gesamtprotein), Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert) . . . . .	90
5.23	Gesamtprotein über den Batchprozess für 83 g EX M 1991 (Siliziumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver (6,63 g·l <sup>-1</sup> Gesamtprotein), Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert) . . . . .	91
5.24	Gesamtprotein über den Batchprozess für 33 g EX M 1986 (γ-Aluminiumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver (6,63 g·l <sup>-1</sup> Gesamtprotein), Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert) . . . . .	92
5.25	Gesamtprotein über den Batchprozess für 83 g EX M 1986 (γ-Aluminiumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver (6,63 g·l <sup>-1</sup> Gesamtprotein), Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert) . . . . .	92
5.26	Proteinbindung an EX M 1991 (Siliziumdioxid), EX M 1986 (γ-Aluminiumoxid) ohne pH-Kontrolle und unter pH-stat Bedingungen, 5 g Adsorbens, 25 ml Arbeitsvolumen, 30 min Beladen, 2 x 10 min Waschen mit ddH <sub>2</sub> O, 30 min Elution, Konstanthalten des pH-Wertes durch Zugabe von HCl . . . . .	94
5.27	Verlauf der prozessrelevanten Parameter über den Batchprozess für 55 g EX M 1907 (Siliziumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver (6,63 g·l <sup>-1</sup> Gesamtprotein). Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert), LW (Leitwert [μS·cm <sup>-1</sup> ]) . . . . .	96
5.28	Verlauf der prozessrelevanten Parameter über den Batchprozess für 84 g EX M 1907 (Siliziumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Molkekonzentrat (6,63 g·l <sup>-1</sup> Gesamtprotein). Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert), LW (Leitwert [μS·cm <sup>-1</sup> ]) . . . . .	97
5.29	Verlauf der prozessrelevanten Parameter über den Batchprozess für 66 g EX M 2070 (γ-Aluminiumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver (6,63 g·l <sup>-1</sup> Gesamtprotein). Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert), LW (Leitwert [mS·cm <sup>-1</sup> ]) . . . . .	97
5.30	Verlauf der prozessrelevanten Parameter über den Batchprozess für 208 g EX M 2070 (γ-Aluminiumoxid). Proteinquelle: Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver (6,63 g·l <sup>-1</sup> Gesamtprotein). Protein (Gesamtproteinmenge [%]), pH (pH-Wert), LW (Leitwert [mS·cm <sup>-1</sup> ]) . . . . .	98
5.31	Beladungskapazitäten der Adsorbentien EX M 2070 und EX M 1907 für Proteinlösungen mit unterschiedlichem Salzgehalt. UL = Ultralac 35, ULS = Ultralac 35 mit erhöhtem Salzgehalt und MK = Molkekonzentrat (Wiesen, 2010) . . . . .	100
5.32	Lactosebindung an EX M 1907, 5 g Adsorbens, 25 ml Arbeitsvolumen, 3 x 10 min Waschen mit ddH <sub>2</sub> O, 30 min Beladung, 3 x 10 min Waschen mit ddH <sub>2</sub> O, Elution 30 min mit ddH <sub>2</sub> O nach Trocknen und Mörsern, Messung der Lactose im Überstand (Wiesen, 2010) . . . . .	101

5.33	Lactosebindung an EX M 2070, 5 g Adsorbens, 25 ml Arbeitsvolumen, 3 x 10 min Waschen mit ddH <sub>2</sub> O, 30 min Beladung, 3 x 10 min Waschen mit ddH <sub>2</sub> O, Elution 30 min mit ddH <sub>2</sub> O nach Trocknen und Mörsern, Messung der Lactose im Überstand (Wiesen, 2010) . . . . .	102
5.34	Schema des Prozessflussdiagramms für die Aufarbeitung von Molke in einem System von Rührkesseln über 6 Batchverläufe, erstellt in SuperPro Designer der Firma Intelligen, jede Farbe zeigt den Ablauf einer 1000 l Kampagne . . . . .	103
5.35	Prozessschaubild für die Aufarbeitung von Molke in einem System von Rührkesseln. Erstellt in SuperPro Designer der Firma Intelligen . . . . .	104



# Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht über die Inhaltsstoffe von Milch und Molke (Smithers, 2008) . . .	3
2.2	Anteil der einzelnen Proteine an der Proteinfraction von Molke (Montagne et al., 1999; Plate, 2008; Kontopidis et al., 2004; Mulsow, 2008; Farrell et al., 2004; Hirayama et al., 1990; Al-Mashikh and Nakai, 1987) . . . . .	4
2.3	Konzentration von Mineralien, Spurenelementen und Vitaminen in Molke (Plate, 2008) . . . . .	4
2.4	Übersicht über die majoren Molkeproteine und deren Eigenschaften (Montagne et al., 1999; Plate, 2008; Kontopidis et al., 2004; Mulsow, 2008; Farrell et al., 2004; Hirayama et al., 1990; Al-Mashikh and Nakai, 1987) . .	7
2.5	Übersicht über einzelne minore Molkeproteine und deren Eigenschaften (Aisen and Liebman, 1972; Schlimme and Buchheim, 1995; Pike et al., 1996; Yoshida and Ye-Xiuyun, 1991; Plate, 2008; Righetti and Caravaggio, 1976; Weiß, 1999; Al-Mashikh and Nakai, 1987) . . . . .	8
3.1	Übersicht über die Methoden zur Proteinbestimmung in Molkeproteinlösungen und Versuchsproben . . . . .	20
3.2	Aufstellung der verwendeten Modellproteine . . . . .	21
3.3	Inhaltsstoffe von Ultralac 35 Proteinpulver und deren Massenanteil . . . . .	22
3.4	Übersicht über die untersuchten Adsorbentien, deren chemische Zusammensetzung, Partikelform, BET-Oberfläche und Testumgebungen . . . . .	23
3.5	Dichten und Porositäten einer Auswahl der verwendeten Adsorbentien . . .	26
4.1	Übersicht über die statisch untersuchten Adsorbentien und deren Eigenschaften aus Datenblättern der Süd-Chemie AG und Messungen an der TU Kaiserslautern . . . . .	41
4.2	Parameter der Peaks von Modellproteinen und EX M 1221 in der Uno1 Säule. Retentionszeit der Proteine $t_{ret}$ , Tailingfaktor nach USP $T_{USP}$ , Peakweite auf halbem Peakmaximum $w_h$ , Peakfläche $A$ , theoretische Trennbodenanzahl $N_i$ und axialer Dispersionskoeffizient $D_{ax}$ . . . . .	44
4.3	Parameter der Peaks von Modellproteinen und EX M 1986 in der Uno1 Säule. Retentionszeit der Proteine $t_{ret}$ , Tailingfaktor nach USP $T_{USP}$ , Peakweite auf halbem Peakmaximum $w_h$ , Peakfläche $A$ , theoretische Trennbodenanzahl $N_i$ und axialer Dispersionskoeffizient $D_{ax}$ . . . . .	47
4.4	Parameter des Peaks von Modellproteinen und PallQ HyperD F in der Uno1 Säule. Retentionszeit der Proteine $t_{ret}$ , Tailingfaktor nach USP $T_{USP}$ , Peakweite auf halbem Peakmaximum $w_h$ , Peakfläche $A$ , theoretische Trennbodenanzahl $N_j$ und axialer Dispersionskoeffizient $D_{ax}$ . . . . .	51
4.5	Kapazität von PallQ HyperD F über 7 Beladungszyklen mit 20 BV 1:10 Verdünnung von Molkekonzentrat in einer Uno1 Säule bei 14° C . . . . .	55

4.6	Physikalische Eigenschaften der untersuchte Adsorbentien aus Datenblättern der Süd-Chemie AG und Messungen an der TU Kaiserslautern . . .	56
4.7	Kapazitäten $X$ der Adsorbentien bestimmt in einer Kronlab TAC25 Säule bei 14° C . $X_M$ Proteinbindekapazität bezogen auf die Adsorbensmasse, $X_V$ Proteinbindekapazität bezogen auf das Säulenvolumen, $X_O$ Proteinbindekapazität bezogen auf die Oberfläche der Adsorbensschüttung (BET)	57
4.8	Wiederverwendbarkeit von EX M 2070 über vier Beladungs- und Elutionszyklen mit 2 Bettvolumina Molkekonzentrat . . . . .	58
4.9	Physikalische Parameter und Kapazitäten von $\gamma$ -Aluminiumoxid Partikeln unterschiedlicher Partikeldurchmesser im Vergleich zu dem kommerziellen Adsorbens PallQ HyperD F. Daten aus Datenblättern der Süd-Chemie AG und Versuchen an der TU Kaiserslautern . . . . .	59
4.10	Permeabilitäten von EX M 2181 für demin. Wasser, 0,1 M Kaliumacetat-Puffer und Dünnmolke aus Ultralac 35 Proteinpulver . . . . .	61
4.11	Übersicht über die Adsorbentien, deren physikalische Eigenschaften und verfahrenstechnische Kenngrößen für die Abschätzung zu deren Expanded Bed Einsatz . . . . .	64
4.12	Parameter der Peaks von Modellproteinen und EX M 2181 in der Kronlab TAC25 Säule. Retentionszeit der Proteine $t_{ret}$ , Tailingfaktor nach USP $T_{USP}$ , Peakweite auf halbem Peakmaximum $w_h$ , Peakfläche $A$ , theoretische Trennbodenanzahl $N_i$ und axialer Dispersionskoeffizient $D_{ax}$ . . . . .	66
5.1	Übersicht über die Rührkesselversuche hinsichtlich Gesamtproteinbindung. (g) Wert bezogen auf an das Adsorbens gebundenes Protein, (e) Wert bezogen auf eingesetzte Proteinmasse, Proteinquelle angegeben als Mehrfaches des in Dünnmolke vorliegenden Wertes hergestellt aus MK (Molkekonzentrat) oder UL35 (Ultralac 35 Proteinpulver) . . . . .	93
5.2	Abriebtest nach UNILEVER für die Materialien EX M 1907 und EX M 2070. Abrieb von 5 g Adsorbens über 2 min in 500 ml demineralisiertem Wasser mit einem 5 cm langen Rührfisch (Wiesen, 2010) . . . . .	95
5.3	Übersicht über die Rührkesselversuche hinsichtlich Gesamtproteinbindung. (g) Wert bezogen auf an Adsorbens gebundenes Protein, (e) Wert bezogen auf eingesetzte Proteinmasse, Proteinquelle angegeben als Mehrfaches des in Dünnmolke vorliegenden Wertes hergestellt aus MK (Molkekonzentrat) oder UL 35 (Ultralac 35 Proteinpulver) . . . . .	99
5.4	Vergleich von Molkekonzentrat mit einer Ultralac 35 Lösung hinsichtlich ihrer Hauptbestandteile (Biolac GmbH & Co. KG, 2011) . . . . .	100
5.5	Übersicht über die Anlagenkomponenten und deren Funktionen für eine Anlage zur Aufarbeitung von 1000 l Dünnmolke für das Adsorbens aus Schichtsilikat . . . . .	105
5.6	Übersicht über die Anlagenkomponenten und deren Funktionen für eine Anlage zur Aufarbeitung von 1000 l Dünnmolke für das Adsorbens aus $\gamma$ -Aluminiumoxid . . . . .	106
5.7	Dimensionierung einer Anlage zur Aufarbeitung von 1000 l Dünnmolke pro Batch Ansatz und Abschätzung der Anschaffungskosten aus der Datenbank von Intelligens SuperPro Designer und externen Quellen (Kiefer, 2011) . .	106



5.8 Stoffströme einer Anlage zur Aufarbeitung von 1000 l Dünnmolke pro Batch107



# Curriculum Vitae

Name: Christian Staub  
Geburtsdatum: 18.10.1978  
Geburtsort: Stuttgart  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

---

08/1985 – 07/1989 Wilhelm-Mayer-Schule, Obereisesheim  
08/1989 – 01/1990 Hermann Greiner Realschule, Neckarsulm  
02/1990 – 07/1998 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Neckarsulm  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
11/1998 – 11/1999 Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund, Kreisverband Heilbronn  
mit freiwilliger Ausbildung zum Rettungssanitäter  
10/1999 – 04/2007 Studium der Technischen Biologie,  
Universität Stuttgart  
Abschluss: Diplom Biologe (technisch orientiert)  
04/2007 – 12/2008 Musiker  
01/2009 – 12/2009 Stipendiat der TU Kaiserslautern,  
Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik  
01/2010 – 12/2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter,  
Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik  
Technische Universität Kaiserslautern