



# Weiterentwicklung und Optimierung der Proteinaufreinigung mittels Mikropartikel-Technologie

## Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

***Diplomingenieur***

*an der Universität für Bodenkultur, Wien*

*Studiengang Biotechnologie H 066 418*

*Durchgeführt bei*

**Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG.**

*in der Abteilung*

**Process Science Downstream**

*Vorgelegt von:*

Ing. Andreas Egert, BSc.

*Betreuer:*

Assoc. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Rainer Hahn

*März 2016*

---

## Kurzfassung

Um intrazellulär akkumulierte Proteine aus genetisch modifizierten Produktionszellen freizusetzen, ist der mechanische Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator die übliche Methode für Prozesse im industriellen Maßstab. Neben dem gewünschten Protein werden durch einen Zellaufschluss aber auch viele andere Biomoleküle (Proteine der Produktionszellen, Lipide, Endotoxine, Nukleinsäuren) freigesetzt. Außerdem werden die Zellmembranen unter den mechanischen Einwirkungen in kleinere Bruchstücke zerteilt. Die Folgen derartiger Methoden sind Produktlösungen mit hoher Viskosität und hohen Konzentrationen an Verunreinigungen (unerwünschte Biomoleküle).

Eine Alternative zum Zellaufschluss stellen chemische Methoden dar, welche die Permeabilität von Biomembranen erhöhen. Mit einer dieser Methoden, der sogenannten Mikropartikel Technologie, wurden in den letzten Jahren vielversprechende Ergebnisse für die Extraktion von zytoplasmatischen Proteinen erzielt. Vor allem die Universität für Bodenkultur (Department für Biotechnologie, Wien) hat sich eingehend mit dieser Technologie befasst. Verglichen zu den Ergebnissen eines Zellaufschlusses (Hochdruckhomogenisator) konnte der Grad an Verunreinigungen (Proteine der Produktionszellen, Endotoxine, Nukleinsäuren), bei gleichbleibenden Produktausbeuten, deutlich vermindert werden. Die extrahierten rekombinanten Proteine wurden an den Mikropartikel adsorbiert und mussten somit nachfolgend wieder desorbiert werden.

Die Mikropartikel-Technologie wurde aber auch dazu eingesetzt, um Proteine aus Zell-Homogenaten zu isolieren. Auch hier wurden die Proteine zuerst adsorbiert, um anschließend in einem Elutionspuffer wieder desorbiert zu werden. Nach den durchgeführten Elutionen konnten die entstandenen Flocken jedoch nicht mittels Filtration abgetrennt werden, da die Filter innerhalb weniger Sekunden verstopft waren.

In der vorliegenden Arbeit konnten diese Separationsschwierigkeiten für die Extraktionsanwendung überwunden werden. Es wurde eine Methode weiterentwickelt und optimiert, welche es ermöglicht GFP (mittels kationischer Mikropartikeln) aus E.coli Zellen zu extrahieren, dabei aber nur einen minimalen Anteil des GFPs an den Mikropartikeln zu adsorbieren. Filtrationen derartiger Extrakte konnten im Labormaßstab ohne Probe durchgeführt werden (0,2 bis 40,0µm). Verglichen mit den Ergebnissen eines Zellaufschlusses mittels Hochdruckhomogenisator wurde eine Produktausbeute von über 85% erreicht, wobei die Verunreinigungen stark reduziert waren. So wurde im Extrakt eine GFP Reinheit - bezüglich Fremdproteine - von über 65% quantifiziert. Die entsprechenden Extraktionen konnten innerhalb von ca. 6,5h abgeschlossen werden.

---

## Abstract

Industrial scale processes usually employ mechanical cell disruption methods like high pressure homogenization, in order to release intracellular Proteins from genetically modified cell factories. Beside the protein of interest a lot of impurities (host cell proteins, lipids, endotoxins, nucleic acids) are liberated during such cell disruption. Furthermore, due to mechanical forces, the cell membranes will break up in smaller units of cell debris. Therefore the result of suchlike methods are product including biological suspensions with high levels of viscosity and high concentrations of impurities (unwanted biomolecules).

There are chemical methods to reduce the permeability of biomembranes, which represents alternatives to cell disruption methods. The microparticle technology is one of these methods. With the University of Natural Resources and Applied Life Science (department of biotechnology, Vienna) leading the way promising Results have been made for the microparticle-induced extraction of cytoplasmic proteins. Compared to results gained by high pressure homogenization the level of impurities (host cell proteins, endotoxins, nucleic acids) could be reduced at steady product yields. Extracted Proteins were adsorbed to the microparticles and therefore have to be desorbed later on.

The microparticle technology was used for an additional application, in particular for the isolation of proteins out of a cell homogenate. Again the Proteins were adsorbed to the microparticles and have to be desorbed afterwards, using suitable elution-buffer. Subsequent to such elution steps the built flocs could not be separated from liquid by filtration because the filter clogged immediately under such Buffer conditions.

In this study the Problems of separation could be overcome for application of protein extraction. Further development and optimization of a method for GFP extraction out of E.coli cells was performed. During an extraction using this method, GFP is extracted due to microparticle addition but only a small amount of the protein get adsorbed to the particles. Filtration of gained extracts (0.2 – 40.0µm) were conducted without problems in lab scale, during this study. Compared to results gained by high pressure homogenization, product yields over 85% were achieved and the levels of impurities were obvious lowered. For the produced extracts GFP purities over 65% were determined with respect to protein impurities. Such extraction processes could be completed within 6.5h.

---

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe und alle Ausführungen, die anderen Schriften (Quellen) wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüferin/ keinem anderen Prüfer als Prüfungsleistung eingereicht.

Mir ist bekannt, dass Zuwiderhandeln mit der Note „nicht genügend“ (ohne Möglichkeit einer Nachbesserung oder Wiederholung) geahndet wird und weitere rechtliche Schritte nach sich ziehen kann.

Wien, 31.03.2016  
(Ort, Datum)

Andreas Egert  
(Unterschrift)

---

## Statutory Declaration

I hereby declare that I have developed and written the master's thesis entirely by myself and have not used any sources or means without unambiguous declaration in this work.

This thesis was not submitted in the same or in a similar version, not even partially, to any other authority to achieve an academic grading.

I am aware, that counteracting will have legal consequences.

Wien, 31.03.2016  
(Location, Date)

Andreas Egert  
(Signature)

---

## **Sperrvermerk**

Die vorliegende Masterarbeit beinhaltet interne vertrauliche Informationen der Firma Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG. Die Weitergabe des Inhaltes der Arbeit und eventuell beiliegender Zeichnungen und Daten im Gesamten oder in Teilen ist zumindest fünf Jahre strikt untersagt. Es dürfen keinerlei Kopien oder Abschriften – auch nicht in digitaler Form – gefertigt werden. Ausnahmen bedürfen der vorherigen, schriftlichen Zustimmung (Einwilligung) der Firma Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG.

Die Masterarbeit darf nur den jeweiligen Korrektoren – soweit diese durch eine entsprechende Verschwiegenheitsverpflichtung gebunden sind – zugänglich gemacht werden.

---

## **Note of restriction of access**

This thesis contains internal confidential information of Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG. Disclosure of any content of this thesis and attached drawings and data, or parts thereof, is strictly prohibited for at least five years. It is also not allowed to make copies or transcriptions – including in digital form. Exceptions require prior written approval by Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG.

The thesis may only be made accessible to university examiners, to the extent that they are bound by respective confidentiality obligations.

---

## Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung.....	1
Abstract .....	2
Eidesstattliche Erklärung.....	3
Statutory Declaration .....	3
Sperrvermerk .....	4
Note of restriction of access.....	4
Inhaltsverzeichnis .....	5
1. Einleitung.....	7
1.1. Biopharmazeutika bzw. therapeutische Proteine.....	7
1.2. Bioprozess - Herstellung von Biopharmazeutika.....	8
1.2.1. Downstream Prozessierung.....	9
1.2.1.1. Entwicklungen und limitierende Faktoren.....	11
1.2.1.2. Mikropartikel Technologie.....	13
1.2.1.2.1. Protein Extraktion mittels kationischer Mikropartikel .....	14
1.2.1.2.2. Flockulationssysteme (ORS vs. TRS).....	15
2. Zielsetzung .....	16
3. Materialien und Methoden.....	17
3.1. Equipment .....	17
3.2. Material.....	18
3.2.1. Chemikalien.....	18
3.2.2. Puffer und Lösungen .....	18
3.2.3. Expressionssystem und Modelprotein.....	19
3.2.4. Mikropartikel .....	20
3.3. Methoden.....	21
3.3.1. Herstellung der Zellsuspensionen.....	21
3.3.2. Bestimmung des Biomassefeuchtanteils.....	21
3.3.3. Zellaufschluss.....	22
3.3.3.1. Hochdruckhomogenisation.....	22
3.3.3.2. Enzymatische Lyse.....	22
3.3.4. Mikropartikel Batch Charakterisierung .....	23
3.3.4.1. Messung der Partikelgrößenverteilungen.....	23
3.3.4.2. Adsorptionsisothermen / Bindungskapazität .....	23
3.3.4.3. Trockenmasse Bestimmung .....	24
3.3.4.4. Volumenanteil und Feuchtmasse Bestimmung .....	24

---

3.3.5.	Flockengrößenuntersuchungen und Sedimentation .....	26
3.3.6.	Experimente zur GFP Aufreinigung.....	26
3.3.6.1.	Versuche mit Zell-Homogenat.....	26
3.3.6.2.	Mikropartikel Zellextraktion .....	27
3.3.7.	Proteinquantifizierung und Reinheitsbestimmung .....	27
3.3.7.1.	Fluoreszenz Messungen.....	28
3.3.7.2.	UV / VIS Spektroskopie .....	30
3.3.7.3.	SDS PAGE .....	31
3.3.8.	Filtration.....	33
4.	Ergebnisse und Diskussion.....	34
4.1.	Mikropartikel Charakterisierung und Batch Vergleich.....	34
4.1.1.	Partikelgrößenverteilung .....	34
4.1.2.	Adsorptionsisothermen (BSA).....	37
4.1.3.	Weitere physikalischen Eigenschaften .....	38
4.2.	Flockulation .....	40
4.2.1.	Flockulation im Homogenat.....	40
4.2.2.	Flockulation der Mikropartikel Zell Extraktion (MPZE) .....	41
4.3.	Proteinaufreinigung.....	44
4.3.1.	Reinigung aus Zell-Homogenat.....	44
4.3.1.1.	One Resin System (ORS).....	44
4.3.1.2.	Two Resin System (TRS) .....	47
4.3.2.	Mikropartikel Zell Extraktion (MPZE) .....	51
4.3.2.1.	Optimierung Extraktionsprozess .....	51
4.3.2.2.	Filtration.....	64
4.4.	Zusammenfassung .....	66
	Literaturverzeichnis.....	70
	Abkürzungsverzeichnis .....	73
	Abbildungsverzeichnis .....	75
	Tabellenverzeichnis .....	77

---

## 1. Einleitung

Im vorliegenden Kapitel werden Aspekte relevanter Themenfelder dargelegt. Im Mittelpunkt stehen dabei Biopharmazeutika und deren Herstellung. Vor allem der Teilbereich eines Bioprozesses, in dem das Produkt aus dem Produktionsstamm isoliert und anschließend aufgereinigt wird (*Downstream* Prozess), steht dabei im Fokus. Dabei wird zunächst auf gängige Verfahrenstechniken innerhalb der *Downstream* Prozessierung eingegangen, um anschließend die Limitierungen in der biopharmazeutischen Produktion zu beleuchten. Am Ende des Kapitels werden Alternativen zu den industriell etablierten Methoden der Produktisolierung intrazellulärer Moleküle dargelegt.

### 1.1. Biopharmazeutika bzw. therapeutische Proteine

Proteine sind für die Funktionalität jeder Zelle unabdinglich. Im menschlichen Körper agieren sie in einem sehr komplexen physiologischen Netzwerk. Auf zellulärer Ebene werden durch sie zahlreiche Aufgaben (z.B. in der Signaltransduktion, als strukturelle Einheiten oder als Katalysator für Reaktionen) übernommen. Durch eine Fehlfunktion oder die Abwesenheit eines Proteins kann es beim Menschen zu schwerwiegenden Krankheitsbildern kommen (z.B. Diabetes oder zystische Fibrose) [1]. Um betroffenen Patienten eine Behandlung zu ermöglichen, wurden in den letzten Jahrzehnten viele therapeutische Proteine entwickelt und in großen Mengen produziert, sodass im Jahr 2005 die Biopharmazeutika 44% aller weltweit zugelassenen Pharmazeutika ausmachten [2]. Auch das Gebiet der Onkologie profitierte stark durch die Entwicklung neuer Biopharmazeutika und der daraus entstandenen anti-tumoralen Therapien [3].

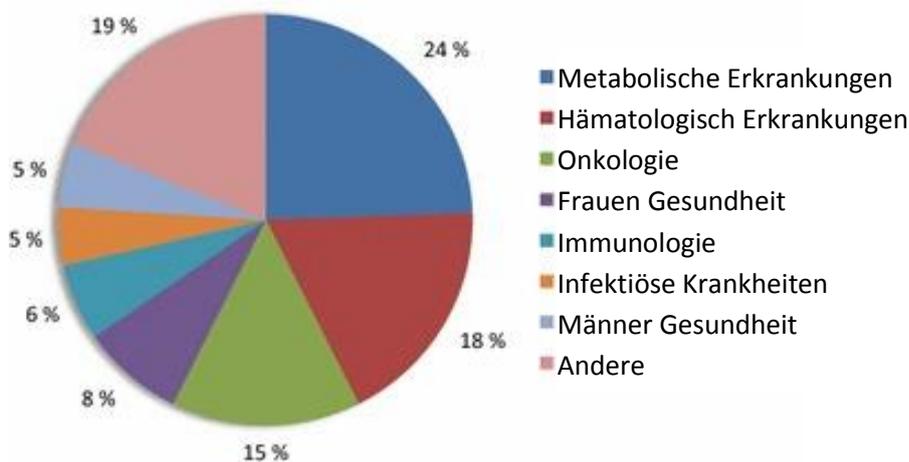
Das erste weltweit zugelassene Biopharmazeutika wurde im Jahre 1982 von der FDA (Food and Drug Administration; USA) zugelassen. Es handelte sich um das rekombinante humane Insulin (Humulin®), welches mit Hilfe eines *E.coli* Produktionsstammes in industriellen Maßstab hergestellt wurde. Bald darauf folgten weitere rekombinante Protein-Produkte wie Hormone, Zytokine oder auch Antikörper [4].

Als erste Grundvoraussetzung müssen therapeutische Proteine, neben der vollständigen Funktionalität, auch hohen Anforderungen an die Reinheit erfüllen und eine wirtschaftliche sowie rentable Produktion im industriellen Maßstab ermöglichen. Im Jahr 2015 waren weltweit ungefähr 400 - auf rekombinanten Proteinen bzw. Peptiden basierende - Biopharmazeutika zugelassen und weitere 1300 waren in Entwicklung (präklinische bzw. klinische Studien). Die Einsatzgebiete für therapeutische Proteine sind umfangreich [5]. Abbildung 1 zeigt verschiedene therapeutische Anwendungsgebiete vermarkteter rekombinanter Proteine. Außerdem zeigt die Abbildung die jeweiligen prozentuellen Anteile an der Gesamtheit der vermarkteten rekombinanten Proteine. Zählt man jene rekombinanten Proteine zusammen welche zur Behandlung metabolischer,

---

hämatologischer und onkologischer Krankheitsbilder zum Einsatz kommen, so ergibt sich ein Anteil an den vermarkteten rekombinanten Proteine der deutlich über 50% liegt. Weitere Einsatzgebiete therapeutischer Proteine stellen die Immunologie und die Behandlung infektiöser Krankheiten dar. Auch zur Therapie von Frauen- bzw. Männerspezifischen Krankheitsbildern kommen rekombinante Proteine zum Einsatz [3].

Durch gentechnische Methoden können, bei der Entwicklung von neuen Biopharmazeutika,



**Abbildung 1:** Medizinische Anwendungsgebiete für rekombinante Proteine [3].  
Der prozentuelle Anteil dieser verschiedenen Anwendungsgebiete an der Gesamtheit der vermarkteten therapeutischen Proteine ist ebenfalls ausgewiesen.  
Abbildung bearbeitet: Quelle [3]

Proteindomänen unterschiedlichster Herkunft miteinander kombiniert werden. Auf diese Weise werden die entsprechenden Proteinaktivitäten miteinander verknüpft oder neuartige Aktivitäten bzw. Funktionalitäten entstehen. Somit können auch Proteine erzeugt werden, die in dieser Form in der Natur nicht vorkommen. Die Entwicklungen der jüngsten Zeit zeigen, dass großes Potential für weitere Anwendungen von therapeutischen Proteinen besteht und der Markt für Biopharmazeutische Produkte stetig wächst [3].

## 1.2. Bioprozess - Herstellung von Biopharmazeutika

Der zur Produktion von Biopharmazeutika nötige Prozess kann in zwei Teilbereich geteilt werden: *Upstream* bzw. *Downstream*. Der *Upstream* Prozess umfasst die Tätigkeiten beginnend bei der genetischen Modifikation von Produktionszelle, bis hin zum Ende des Fermentationsvorganges (Zell-Ernte). Nach der Zellernte liegt das Produkt entweder extrazellulär oder intrazellulär vor. Ein nachfolgender *Downstream* Prozess ist notwendig um das Produkt vom Rest der Fermentationsbrühe zu isolieren. Um alle unerwünschten Verunreinigungen des Produkts zu entfernen, müssen mehrere aufeinander abgestimmte Verfahrensschritte durchgeführt werden (siehe Kapitel 1.2.1) [6].

---

Auf Grund der Entwicklung von Methoden wie *Genetic Engineering* oder *High Throughput Screening*, konnten die - während den Fermentationen (*Upstream* Prozess) - erreichten Produkttiter erheblich gesteigert werden [7] [8]. Dieser Anstieg (der Produkttiter im Bioreaktor) hat dazu geführt, dass der *Downstream* Prozess zum limitierenden Flaschenhals für die Herstellung von Biopharmazeutika geworden ist [6].

### 1.2.1. Downstream Prozessierung

Die Verfahrensschritte diverser *Downstream* Prozesse sind sehr vielfältig und in ihren Ausführungen an die Anforderungen des gewünschten Produkts angepasst. Sie umfassen die Zellabtrennung, den Zellaufschluss, Produktgewinnung und Produktkonzentrierung, die Produktaufreinigung sowie die Konfektionierung.

In den meisten Fällen eines Bioprozesses entfallen mehr als die Hälfte (50 – 80%) der Produktionskosten auf den Bereich der *Downstream* Prozesse [9]. Bei der Herstellung von pharmazeutischen Proteinen entfallen sogar bis zu 90% der Produktionskosten auf diesen Prozessabschnitt [10].

Für die Auswahl der einzelnen Produkt-Aufreinigungsschritte eines *Downstream* Prozesses sind vor allem die Produkt-Lokalisation (Cytoplasma; Periplasma; extrazellulär;) und die biologisch-chemischen Eigenschaften des Moleküls (z.B. Löslichkeit; Ladung; uvm.) entscheidend. Liegt das Protein intrazellulär vor, müssen die Zellen zunächst vom Überstand abgetrennt und nachfolgend aufgeschlossen werden. Die beim Aufschluss entstandenen Zellbruchstücke (Debris) müssen anschließend abgetrennt werden. Diese Prozessschritte gehören zum ersten von zwei Teilbereichen innerhalb der *Downstream* Prozesse (primären Produktisolierung). Neben unterschiedlichen Methoden des Zellaufschlusses (mechanische, physikalische oder chemische/enzymatische), kommen hierfür im Regelfall Separationstechniken wie Zentrifugation, Sedimentation oder Filtration zum Einsatz [10]. Ziel dieses ersten *Downstream* Teilbereiches ist die Produktfreisetzung (aus der Zelle), die Abtrennung der dabei entstandenen Zellbruchstücke und eine erste Aufreinigung des Produkts. Nach der primären Produktisolierung liegt das Molekül (im Regelfall) in wässriger Lösung vor [11].

Im zweiten Teilbereich der *Downstream* Prozesse wird das Endprodukt der primären Produktisolierung weiter aufgereinigt und aufkonzentriert. Zur Abtrennung des Produktes von den unerwünschten Begleitstoffen, werden unterschiedliche Separationsmethoden bzw. Kombinationen dieser Methoden eingesetzt. Einige der gängigen Verfahrenstechniken sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Auf Grund der hohen Selektivität hat sich die Säulenchromatographie in der Aufreinigung von Biomolekülen als essentielles Werkzeug etabliert, um biologische oder chemische Verunreinigungen aus den Produktlösungen zu entfernen [12].

**Tabelle 1:** Separationsmethoden zur Isolierung bzw. Aufreinigung von Biopharmazeutischen Molekülen [43]

Verfahrenstechnik	Trennungsvorgang
<b>Filtration</b>	Größenunterschiede;
<b>Zentrifugation</b>	Größen- bzw. Dichteunterschiede;
<b>Präzipitation bzw. Kristallisation</b>	Löslichkeit (Polarität) bzw. elektr. Ladung;
<b>wässrige zwei Phasen Extraktion</b>	Löslichkeit (Polarität);
<b>Flüssigchromatographie</b>	hydrophobe Wechselwirkungen; elektr. Ladungen und Ladungsverteilungen; Größenunterschiede; Bioaffinität;

An den Oberflächen von Proteinen sind Ladungen zu finden, welche vom isoelektrischen Punkt des Proteins und dem pH Wert der Umgebung abhängen. Liegt der pH Wert über dem isoelektrischen Punkt des Proteins, so findet man an der Proteinoberfläche negative Ladungen. Wenn die Umgebung einen pH-Wert unter dem isoelektrischen Punkt des Proteins hat, dann sind die Oberflächen positiv geladen. Diese Ladungen ermöglicht es den Proteinen mit Liganden entgegengesetzter Ladung zu interagieren.

Auf Grund dieser Interaktionen ist die Ionenaustausch-Chromatographie eine geeignete Methode zur Aufreinigung von Proteinen und Plasmiden. Hierfür werden Liganden an einer stationären Phase immobilisiert und eine mobile Phase darüber hinwegbewegt, in welcher das Produkt gelöst vorliegt. Die stationären Phasen der Anionentauscher tragen positive geladene Liganden, an Kationentauscher sind negativ geladene Liganden immobilisiert. Da unterschiedliche Proteine auch verschiedene isoelektrische Punkte aufweisen, variieren ihre Ladungen unter Einfluss eines konstanten pH-Wertes. Aus diesem Grund sind auch die Interaktionen mit den Liganden von unterschiedlicher Stärke, wodurch eine Trennung der Proteine ermöglicht wird [13].

---

### 1.2.1.1. Entwicklungen und limitierende Faktoren

Mit dem Ziel ihre Produktionskapazitäten zu steigern, setzten die Produzenten von Biopharmazeutika in den letzten Jahrzehnten verstärkt auf die Optimierung ihrer *Upstream* Prozesse. Auf Grund der daraus entstandenen Fortschritte im Bereich des *Upstreams*, sowie dem daraus resultierenden Anstieg der erreichten Zelldichten und Produkt-Ausbeuten, wurde der *Downstream* zum limitierenden Flaschenhals der biopharmazeutischen Produktionskapazitäten [6]. Dies liegt an der Dimensions-Limitierung von Reaktoren (Chromatographie Säule; Kristallisatoren usw.), Kesseln (Herstellung und Lagerung von Puffern) oder sonstiger Infrastruktur. Zusätzlich sind die Anforderungen an *Downstream* Prozesse in den letzten Jahrzehnten gewachsen, da mit Steigerung der Zelldichten und Produkttiter auch die Mengen an Kontaminationen (z.B. Zellbruchstücke) zunehmen [14].

Am oben angeführten Beispiel wird sichtbar, dass bei der Planung bzw. der Optimierung eines Bioprozesses (*Upstream* und *Downstream* Prozesse) eine ganzheitliche Betrachtung nötig ist. Durch einseitige Problemlösungen besteht die Gefahr, dass die Probleme lediglich auf andere Prozessschritte übertragen werden [6]. Agerkvist und Enfors [15] berichteten über Zellaufschlussversuche unter Verwendung eines Hochdruckhomogenisators. Diese Methode ist derzeit die industriell am meisten angewandte Methode des Zellaufschlusses. Durch Erhöhung der durchlaufenen Homogenisator-Passagen (von einer auf drei) konnte die Produktausbeute von ca. 60% auf ca. 80% gesteigert werden. Durch die Erhöhung der Passagenanzahl wurden gleichzeitig die Partikelgrößen (Mittelwerte), der entstandenen Zellbruchstücke (Debris), von 0,5µm auf 0,2µm reduziert. Dies führte zu einer Abnahme der Feststoffmassen, welche (im Anschluss an die Zellaufschlüsse) durch Zentrifugation abgetrennt werden konnten. Die Studie hat auch gezeigt, dass die Viskosität bzw. die DNA Konzentration im entstandenen Homogenat stark von den vollzogenen Homogenisator-Passagen abhängig sind. Sowohl das Vorhandensein von kleineren Partikeln, als auch die Erhöhung der Viskosität, können die Separationsfähigkeit nachfolgender Verfahrensschritte erheblich beeinträchtigen [15].

Innerhalb der Proteinaufreinigung hat sich in den letzten Jahrzehnten, die Säulen-Chromatographie als Herzstück der Verfahrenstechnik etabliert. Dies gilt insbesondere für die Aufreinigung von Antikörpern, wobei in den meisten Fällen zwei bis drei chromatographische Reinigungsschritte notwendig sind. Es ist zu bedenken, dass für chromatographische Separationen mehrere Arbeitsschritte (Equilibration, Waschen, Eluieren, Regenerierung) abgearbeitet werden müssen und dabei ein Bedarf an großen Mengen verschiedener Pufferlösungen bzw. stationärer Phasen (z.B. Protein A) anfällt. Die benötigten Pufferlösungen müssen in geeigneten Kesseln hergestellt und gelagert werden. Realisierbare Dimensionen derartiger Anlagen sind, ebenso wie jene der Chromatographie-Säulen, limitiert [16]. Weitere Limitierungen der Säulen Chromatographie sind niedrige Durchsatzmengen, hohe

---

Betriebskosten und Schwierigkeiten bei der Prozessübertragung vom Labor in den industriellen Maßstab (*Scale Up*) [17].

Im Bereich der Prozessentwicklung für Aufreinigungsverfahren steht die Säulen-Chromatographie dennoch weiterhin sehr stark im Fokus der biopharmazeutischen Industrie [18]. Aber auch Ansätze zur Reduzierung bzw. Vermeidung solcher Säulen-Prozesse werden verfolgt. Einige dieser Ansätze zielen darauf ab, die während der Produktfreisetzung entstehenden Verunreinigungen zu minimieren. Ein Beispiel hierfür ist die zielgerichtete Produktfreisetzung (SRP, engl. selective product release). Je nach Lokalisation des Zielproteins kommen hierfür unterschiedliche Methoden zum Einsatz, wodurch die begleitende Freisetzung unerwünschter Biomoleküle (Endotoxine; DNA/RNA; usw.) reduziert wird [14]. So ist es beispielsweise möglich zellwandassoziierte Proteine oder periplasmatische Proteine zielgerichtet freizusetzen [19] [20].

Unterschiedliche Methoden der Protein-Extraktion (aus Produktionszellen) verfolgen ebenfalls das Ziel, die Verunreinigungen durch Nukleinsäuren (RNA/DNA), Proteine des Produktionsstammes oder Zelldebris zu reduzieren. Da bei der Extraktion kein Zellaufschluss notwendig ist, stellt diese Methode eine deutliche Vereinfachung konventioneller Produktisolierungen für intrazellulärer Biomoleküle dar [21]. Je nachdem, ob das Produkt im Periplasma oder im Zytoplasma eines Bakteriums lokalisiert ist, muss es entweder nur die äußere oder zusätzlich auch die zytoplasmatische Membran passieren. Um die Membranen zu permeabilisieren (ganz oder teilweise) wurden unterschiedliche Substanzen (z.B. Detergenzien, Komplexbildner, chaotrophe Chemikalien, Lösungsmittel oder Enzyme) eingesetzt [22]. Für die Auswahl einer geeigneten Methode sind vor allem die Eigenschaften des Produktionsorganismus bzw. seiner äußeren und seiner zytoplasmatischen Membran ausschlaggebend. Vor allem für die Freisetzung periplasmatischer Proteine finden sich einige Methoden in der Literatur [23]. Die meisten dieser Methoden sind jedoch für den industriellen Maßstab ungeeignet, da zu viele Extraktionsschritte notwendig wären [24].

In Tabelle 2 sind einige Reagenzien angeführt, mit welchen Proteinextraktionen aus gramnegativen Bakterien erfolgreich durchgeführt wurden. Die dabei freigesetzten Produkte und die verwendeten Bakterien sind ebenfalls in der Tabelle aufgelistet. Aus dem Literaturverzeichnis können die Quellen der Methoden entnommen werden.

Im nächsten Kapitel wird auf die Proteinisolierung mittels Mikropartikel Technologie eingegangen. Diese Technologie stellt eine weitere neuartige Methode der Proteinextraktion aus gramnegativen Bakterien dar [25].

**Tabelle 2:** Reagenzien zur Permeabilisierung von Biomembranen gramnegativer Bakterien und die dabei freigesetzten Proteine [26] bis [27]

verwendetes Reagenz	freigesetzte Produkte	Bakterium (gramnegativ)	Literatur
Glykolether	periplasmatische Proteine	P. fluorescens	[26]
Inverse Mizellen Lösung	Penicillin-Acylase (periplasmatisch)	E. coli	[28]
Glycin	$\alpha$ -Amylase (periplasmatisch)	E. coli	[29]
EDTA / Urea	zytoplasmatische Proteine	E. coli	[30]
EDTA / Urea / DTT	zytoplasmatische Proteine	E. coli	[31]
TritonX- 100	$\beta$ -Laktamase (periplasmatisch); L-Asparaginase (periplasmatisch);	E. coli	[32] [33]
Lysozym / EDTA	alkalische Phosphatase (periplasmatisch); Ribonuklease (periplasmatisch); $\alpha$ -Amylase (periplasmatisch);	E. coli	[34] [24] [27]

### 1.2.1.2. Mikropartikel Technologie

Mikropartikel (Partikel < 1 $\mu$ m) entstehen während der Feinvermahlung unterschiedlicher Ausgangsmaterialien (z.B. Ionenaustauschharze). Die Größe der entstehenden Partikel hat Einfluss auf manche Eigenschaften der Partikeln (z.B. Bindungskapazitäten). Durch die Zugabe kationischer Mikropartikeln (z.B. Anionenaustauschharz Marathon A2) zu Zellsuspensionen gramnegativer Bakterien können intakte Zellen, Zelldebris, Proteine und andere Biomoleküle (Zelldebris/Nukleinsäuren) an den Partikel adsorbiert werden. Die dabei entstehenden Flocken lassen sich im Labormaßstab mittels Zentrifugation vom Überstand abtrennen. Eine Filtration konnte nur unter bestimmten Bedingungen (pH; Ionenstärke) durchgeführt werden. Sobald versucht wurde die adsorbierten Biomoleküle wieder von den Mikropartikeln (MP) zu desorbieren (400mM NaCl im Puffer) ergaben sich Schwierigkeiten bezüglich der Filtrierbarkeit. Bei Filtrationsversuchen derartiger Eluate, wurde der Filter innerhalb weniger Sekunden verstopft und die entsprechenden Filtrationen musste abgebrochen werden [35].

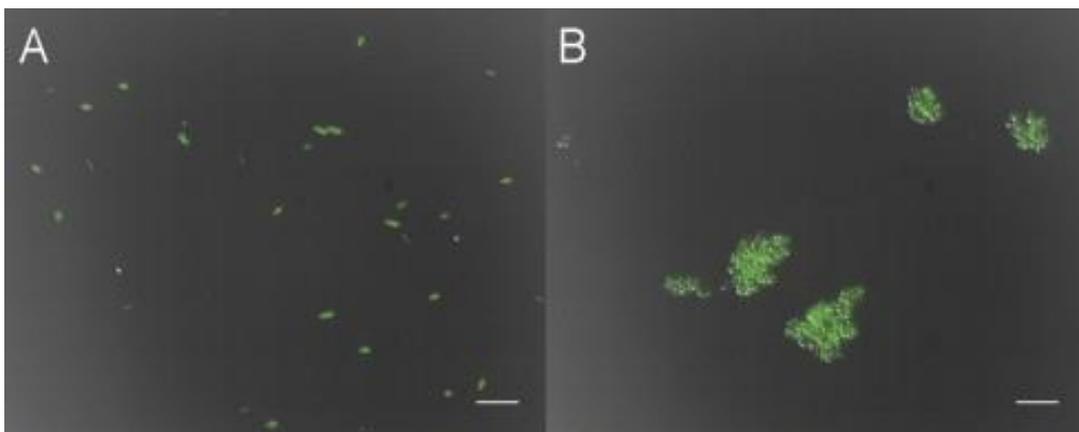
---

### 1.2.1.2.1. Protein Extraktion mittels kationischer Mikropartikel

Versuche zur Proteinextraktion mit kationischen Mikropartikel (MP) haben gezeigt, dass lösliche rekombinante Proteine aus dem Zytoplasma gramnegativer Bakterien extrahiert werden können. Die Zellform der meisten Bakterien blieb während der Extraktion unverändert und größere Moleküle (z.B. Nukleinsäuren) verblieben in der Zelle.

Dennoch konnten für rekombinante Proteine dieselben Produktausbeuten wie mittels Hochdruck-Zellaufschluss erreicht werden. Es wurden die Zellen in einem Extraktionspuffer resuspendiert und mit den kationischen Mikropartikeln versetzt. Nach erfolgter Mischung der Extraktionsansätze folgte eine statische Inkubationsphase von wenigen Stunden. Anschließend wurden die mittels Mikropartikel (MP) flockulierten Zellen abgetrennt und in einem Elutionspuffer (erhöhter Salzgehalt) resuspendiert, um das an den MP adsorbierte Zielprotein zu desorbieren. Der Extraktionsvorgang wurde durch eine Verdrängung von membranstabilisierenden Kationen (durch die kationischen MP) und einer damit einhergehenden Permeabilisierung der Bakterienmembran erklärt. Ein elektrochemischer Gradient wurde als treibende Kraft postuliert [25].

Abbildung 2 zeigt zwei fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen. Foto A zeigt GFP produzierende E.coli Bakterien vor der Zugabe von kationischen Mikropartikel. In Foto B sind E.coli Zellen nach der Mikropartikel Zugabe zu sehen. Rund um die Bakterienzellen hatten sich kationische Mikropartikel angelagert welche auch GFP adsorbierten. Die gebildeten Aggregate (Flocken) im Foto B sind größer als der weiße Balken in der rechten unteren Ecke des Fotos, welcher eine Länge von 10µm darstellt [36].



**Abbildung 2:** Bilder einer Fluoreszenz Mikroskopie von GFP produzierenden E.coli Bakterien [36]. Das linke Bild (A) zeigt eine Bakteriensuspension vor einer Mikropartikel (MP) Zugabe. Im rechten Bild ist eine Zellsuspension nach erfolgter Flockulation mittels kationischer MP zu sehen. Der Maßstab ist durch die weißen Balken (10µm) in den Bildern vorgegeben.  
*Quelle* [36]

---

In der Diplomarbeit von Tobias Schneider (2015) wird darauf hingewiesen, dass durch Absenken der Mikropartikel Konzentrationen weniger Zielprotein an den Partikeln adsorbiert, wobei die Extraktion des Zielproteins aber weiter aufrecht erhalten werden kann [35]. Diese potentielle Methode der Proteinextraktion mittels Mikropartikel wurde jedoch nicht weiter verfolgt. Durch einen derartigen Extraktionsprozess wäre ein Elutionsschritt überflüssig.

#### **1.2.1.2.2. Flockulationssysteme (ORS vs. TRS)**

Aufgrund der bereits angesprochenen Schwierigkeiten während den Filtrationen unter Elutionsbedingung wurden Versuche unternommen, die Größe der mittel Mikropartikel gebildeten Flocken und deren Stabilität zu erhöhen. Hierzu wurde neben dem One Resin System (ORS), in welchem nur einen Mikropartikel-Typ eingesetzt wird, auch ein sogenanntes Two Resin System (TRS) eingesetzt. Bei einem TRS werden mit einem Mikropartikel-Typ (z.B. kationische MP) Biomoleküle gebunden und mit einem zweiten Mikropartikeltyp (entgegengesetzter Bindungseigenschaften, z.B. anionische MP) soll die Flockulation unterstützt werden. Im Vergleich zum ORS konnten die Flockengrößen, durch Etablierung eines TRS, gesteigert werden und nach erhöhtem Scherstress zeigte die Flockenbildung eine Reversibilität von annähernd 100% [37].

---

## 2. Zielsetzung

Die Firma Boehringer Ingelheim (BI) konnte, durch vorangegangenen Arbeiten zur Mikropartikel-Technologie und Kooperationen mit der Universität für Bodenkultur (Arbeitsgruppe R. Hahn bzw. A. Jungbauer), bereits einen Technologietransfer in Gang setzen und erste Schlüsselexperimente erfolgreich reproduzieren. Schwierigkeiten im Labormaßstab ergaben sich bei dem Versuch, die im Elutionspuffer gebildeten Flocken zu filtrieren. Untersuchungen haben ergeben, dass durch die nötige NaCl Zugabe in den Elutionspuffer die Flockengrößen abnimmt.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der zur Verfügung stehenden Mikropartikel Batches (Marathon A2 bzw. Marathon MSC) und die Optimierung bzw. Weiterentwicklung einer Anwendungsmethode zur Isolierung von GFP aus E.coli Bakterien bzw. Zellaufschlüssen. Zur Beurteilung der Ergebnisse sollten die erreichten GFP Ausbeuten und vorgefundenen Verunreinigungen herangezogen werden. Des Weiteren sollte beurteilt werden, ob durch die Etablierung eines TRS (siehe oben, Unterpunkt 1.2.1.2.2) die Flockengrößen (vor allem unter Elutionsbedingung) gesteigert werden können, um eine anschließende Separation zu erleichtern. Als Separationstechnik wurde eine Filtration angestrebt.

In der Diplomarbeit von T. Schneider (BI) wurde auch erwähnt, dass es möglich wäre Proteine zu extrahieren und sie dabei nur zu einen geringen Anteil zu binden. In der Arbeit wird des Weiteren darauf hingewiesen, dass für eine solche Anwendung die Konzentration der eingesetzten MP entsprechend reduziert werden muss (siehe oben, Unterpunkt 1.2.1.2.1). Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte das Potential dieser Methode („minimal amount method“) beurteilt werden.

### 3. Materialien und Methoden

Im Folgenden werden das Equipment, die Materialien und die angewandten Methoden dargelegt.

#### 3.1. Equipment

Die während der praktischen Arbeiten verwendeten Geräte und deren Software sind in Tabelle 3 angeführt. Neben der handelsüblichen Bezeichnungen des Equipment, können der Tabelle auch die jeweiligen Anwendungsgebiete und der Hersteller entnommen werden.

**Tabelle 3:** Liste des verwendeten Equipments

<b>Equipment Namen</b>	<b>Anwendung des Equipment</b>	<b>Hersteller</b>
APV Labor Homogenisator	Labor Hochdruckhomogenisator (max 1000 bar)	SPX Flow Techn.
Ep S301 bzw. EP S601	Stromversorgung der Elektrophorese Zelle	GE Healthcare
Xcell Elektrophorese Zelle	SDS-PAGE Zelle für zwei Gele	Invitrogen
Image Lab 5.0	Software zur Auswertung gescannter Elektrophorese Gele	Bio Rad
GS 900 calibrated densitometer	Scanner für Elektrophorese Gele	Bio Rad
FBRM - Sonde	Flockengrößenmessungen	Mettler Toledo
IC FBRM	Software: Flockengrößenmessungen	Mettler Toledo
LS 13 320 Laser Diffraction Analyzer	Messung von Partikelgrößenverteilungen in Flüssigkeiten	Beckman Coulter
LS 13 320 Control Software	Software: Partikelgrößenverteilung	Eppendorf
Minispin Zentrifuge	Tischzentrifuge (bis 2ml Eppis)	Eppendorf
Centrifuge 5415 C	Tischzentrifuge (bis 2ml Eppis)	Eppendorf
Centrifuge 5810 R	Zentrifuge (bis 50ml Röhrchen)	Eppendorf
Avanti J-26XP	Zentrifuge (bis 1l Becher)	Beckman Coulter
Whatman Filterspritzen 0,21µm	Spritzenvorsatzfilter (PVDF) zur Sterilfiltration div. Proben	Sartorius Stedim
Zelluloseacetat Filter 0,2µm	Filtermaterial zur Dead-End-Filtration in der Nutsche	Sartorius Stedim
DOA-P730-BN	Vakuum Pumpe	Pall Corporation
Seven Excellence	pH Meter	Mettler Toledo
Seven Multi	pH Meter	Mettler Toledo
CPA 10003S-OCE	Analytische Waage	Sartorius Stedim
CPA 62025-OCE	Waage	Sartorius Stedim
XP204	Analytische Waage	Mettler Toledo
XS 4001S	Waage (kombinierbar mit Software "Balance Link")	Mettler Toledo
Balance Link	Software zur Aufzeichnung von Wäageergebnissen	Mettler Toledo
HG63	Trockenwaage zur Bestimmung div. Trockenmasseanteile.	Mettler Toledo
RT 5	Motor für Magnetrührer	IKA
RTC basic	Motor für Magnetrührer	IKA
Labvortex	Mischung diverser Versuchsansätze bzw. Proben.	VWR Intern.
Thermomixer Kompakt	Erhitzung des SDS Proben	Eppendorf
Nanodrop 2000c	UV/VIS-Spektroskopie	Thermo Scientific
TECAN™ Safire™2	Mikroplatten Multireader	Thermo Scientific
RM 5	Rollen-/Kippmischer zur Mischung div. Versuchsansätze	CAT
DMA 4500	Messmodul zur Dichtebestimmung von MP-Suspensionen	Anton Paar

## 3.2. Material

Bei den Verbrauchsmaterialien wird zwischen Chemikalien, Puffer bzw. Lösungen, Expressionssystem, Modelprotein und Mikropartikel unterschieden.

### 3.2.1. Chemikalien

In der untenstehenden Tabelle 4 sind die eingesetzten Chemikalien und Proteine (inkl. Hersteller) aufgelistet.

Tabelle 4: Chemikalienliste

Chemikalien / Protein	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich
Chlorwasserstoff (HCl)	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma Aldrich
4-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Sigma Aldrich
Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	Sigma Aldrich
Rinder Albumin (BSA)	Sigma Aldrich
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris SDS Midi-Gel 1mm x 12 wells	Novex
Mark12™ Unstained SDS Standard	Novex
Simply Blue™ Safe Stain	Novex
NuPAGE™ LDS Proben Puffer 4x	Novex
NuPAGE™ SDS Laufpuffer	Novex
Lysonase™ Bioprocessing Reagent	Merck
Bug Buster™ Extraction Reagent	Merck

### 3.2.2. Puffer und Lösungen

In Tabelle 5 sind die verwendeten Puffer und Lösungen, sowie deren Konzentrationen angeführt. Auch die entsprechenden pH Werte und die zur pH Wert Adjustierung verwendete Lösung kann der Tabelle entnommen werden.

Tabelle 5: Liste der Puffer und Lösungen

Puffer	Konzentrationen	pH	pH Adjustierung
<b>Adsorptions / Extraktion / Waschen</b>	Tris: 25mM / 50mM / 100mM NaCl: 0mM / 50mM / 100mM	8,0 / 8,5 / 9,0	HCl (15%)
<b>Elution 1/2</b>	Tris: 25mM / 50mM / 100mM NaCl: 400mM	8,0 / 8,5 / 9,0	HCl (15%)
<b>Elution 3</b>	Tris: 25mM / 50mM / 100mM NaCl: 1M	8,0 / 8,5 / 9,0	HCl (15%)
<b>Fixierungslösung für SDS Gele</b>	Ethanol: 50% (v/v) Essigsäure: 7% (v/v) RO-H <sub>2</sub> O: 43% (v/v)	-	-

### 3.2.3. Expressionssystem und Modelprotein

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde die nötige Biomasse durch die Fermentationsabteilung der Firma Boehringer Ingelheim RCV bereitgestellt. Es kam der *Escherichia coli* Produktionsstamm BL21 (pBI1KT7ix.1\_GFP.1) zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um einen GVO der Sicherheitsklasse S1. Die Experimente im Homogenat wurden mit zuvor bei -40°C eingefrorener Biomasse durchgeführt, jene mit intakten Zellen wurden am Tag des Fermentationsendes vollzogen.

Der entsprechende Fermentationsprozess konnte gestartet werden, sobald die Vorkultur (300ml in Schüttelkolben) eine OD<sub>550</sub> von 1,75 aufwies. Sowohl die Vorkultur als auch die Hauptkultur hatten das Antibiotikum Kanamycin zugesetzt. Zunächst wurde die Hauptkultur in einem Batch Prozess (3l) vermehrt, bis das limitierende Substrat (Glukose) eine Konzentration von <1g/l hatte. Anschließend wurde ein exponentieller Glukosefeed gestartet ( $\mu=0,25h^{-1}$ ). Diese erste Feedphase wurde nach 8,5h durch eine lineare Feedphase abgelöst, welche weitere 13,5h dauerte. Jedoch wurde, bereits 16h nach Fermentationsstart, der Induktorpuls (IPTG) zugegeben. Die Fermentation wurde 6 Stunden nach dem Induktorpuls beendet und die Biomasse geerntet.

Im Zuge der praktischen Arbeit kam das „Grün Fluoreszierende Protein“ (GFP) als Modelprotein zum Einsatz. Der Genabschnitt des Biomoleküls wurde aus der Medusa (Qualle) *Aequorea victoria* isoliert [38] und hat sich als wichtiges Reporter gen zur Untersuchung von Proteinlokalisierungen oder auch Gen-Expressionsmuster etabliert [39]. Mit der Absicht die fluoreszierende Eigenschaft des GFPs zu verändern wurden verschiedene Mutanten des Protein-Wildtypes konstruiert. Auf diese Weise konnten GFP-Varianten erzeugt werden, welche sich in ihrer Anregungs- und Emissionswellenlänge von dem Wildtyp GFP unterscheiden oder deren Emissionsintensitäten (im Vergleich zum Wildtyp) gesteigert werden konnte [40] [41]. Die während der Arbeiten verwendete GFP-Mutante setzt sich aus 248 Aminosäuren zusammen, hat eine Größe von 28 kDa und zeigt ein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 503nm [35]. Nachstehend ist die Aminosäuresequenz der verwendeten GFP Mutante angeführt:

10	20	30	40	50	60
MRKGEELFTG	VVPILVELDG	DVNGHKFSVS	GEGEDATYG	KLTLKFICTT	GKLPVPWPTL
70	80	90	100	110	120
VTTFGYGVQC	FARYPDHMET	KQHDFFKSAM	ETPEGYVQER	TIFFKDDGNY	KTRAEVKFEG
130	140	150	160	170	180
DTLVNRIELK	GIDFKEDGNI	LGHKLEYNYN	SHNVYIMETA	DKQKNGIKVN	FKIRHNIEDG
190	200	210	220	230	240
SVQLADHYQQ	NTPIGDGPVL	LPDNHYLSTQ	SALSKDPNEK	RDHMETVLLV	FVTAAGITHG

Abbildung 3: Aminosäuresequenz der, während den Arbeiten, verwendeten GFP Variante.

---

### 3.2.4. Mikropartikel

Als Grundmaterialien, die während den praktischen Arbeiten eingesetzten Mikropartikel, dienten das Anionenaustauscherharz Marathon A2™ (DOWEX™) und das Kationenaustauscherharz Marathon MSC™ (DOWEX™). Die Firma Boehringer Ingelheim RCV beauftragte einen zweistufigen Feuchtvermahlungsprozess der Grundmaterialien, durch die beiden Firmen Netzsch Vakumix GmbH bzw. Netzsch Lohnmahltechnik GmbH in Selb (Deutschland). Ein Marathon MSC Batch und zwei Marathon A2 Batches (unabhängiger Herstellung) wurden während der Arbeiten verwendet. Die Bezeichnungen der Batches geben das Monat (M) und das Jahr (J) der Lohnmahlung wieder (MM\_JJ).

Verwendete Mikropartikel Batches:

- Marathon **A2** Batch 03\_14
- Marathon **A2** Batch 07\_15
- Marathon **MSC** Batch 03\_15

---

### 3.3. Methoden

In diesem Kapitel werden die Methoden der durchgeführten Arbeitsschritte dargelegt. Auch die Formeln relevanter Berechnungen werden in diesem Abschnitt angeführt.

#### 3.3.1. Herstellung der Zellsuspensionen

Die Durchführungen unterschiedlicher Extraktionsversuche mit E.coli Suspensionen (intakte Zellen) wurden am Tag der Zellernte, einer entsprechenden 5 Liter Fermentation, durchgeführt. Aus der geernteten Fermentationsbrühe musste, mit Hilfe der Eppendorf Zentrifuge Avanti J-26XP (12000g für 25 min), die Biomasse vom Überstand getrennt werden (5 Zentrifugenbecher, je 1Liter). Unter Einsatz eines Spatels konnten die erhaltenen Pellets - nach ihrer Vereinigung - homogen gerührt werden. Für die Herstellung unterschiedlicher Extraktionsansätze wurden Aliquote der Biomasse in diversen Extraktionspuffern resuspendiert. Mittels gravimetrischen Vorgehens wurden Ansätze unterschiedlicher Biomassefeuchtanteilen hergestellt (siehe auch 3.3.2 „Bestimmung des Biomassefeuchtanteils“).

Bei der Herstellung der Suspensionen für Proteinreinigungsversuche aus dem Homogenat wurde ähnlich vorgegangen. Da für diesen Zweck Biomasse zum Einsatz kam, welche aus früheren Fermentationen stammte und bei -40°C eingefroren war, musste diese zuerst aufgetaut werden. Danach wurde gleich wie mit den Pellets der frischen Fermentationen verfahren (siehe oben). Um die Zellsuspension aufzuschließen wurde ein mechanisches Aufschlussverfahren angewandt (siehe 3.3.3.1).

#### 3.3.2. Bestimmung des Biomassefeuchtanteils

Für die Bestimmung des Biomassefeuchtanteils (BFA) wurden, vor dem - unter Punkt 3.3.1 „Herstellung der Zellsuspensionen“ beschriebenen - Zentrifugationsschritt, die leeren Becher ( $m_{\text{Becher}}$ ) und die mit Fermentationsbrühe befüllten Zentrifugenbecher ( $m_{\text{Brühe}}$ ) gewogen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Becher mit den darin enthaltenen Biomasse Pellets ebenfalls gewogen ( $m_{\text{Pellet}}$ ). Der Biomassefeuchtanteil wurde anschließend mit unten stehender Formel berechnet und ist notwendig um den Titer der erhaltenen Fermentationssuspension zu bestimmen (siehe unter Punkt 3.3.7.1 „Fluoreszenz Messungen“).

Den Biomassefeuchtanteil der Fermentationsbrühe erhält man durch folgende Gleichung:

$$BFA [\%] = \frac{m_{\text{Pellet}} - m_{\text{Becher}}}{m_{\text{Brühe}} - m_{\text{Becher}}} \quad (\text{Formel 1})$$

$m_{\text{Becher}}$ ...Masse der Zentrifugenbechers [g];  $m_{\text{Pellet}}$ ...Masse des Biomassepellets inkl. Zentrifugenbecher [g];

$m_{\text{Brühe}}$ ...Masse der Fermentationsbrühe inkl. Zentrifugenbecher [g];

---

### 3.3.3. Zellaufschluss

Um den jeweils angedachten Zweck zu adressieren, wurde sowohl eine mechanische als auch eine chemisch/enzymatische Zellaufschluss-Methode angewandt. Die Vorgehensweisen werden nachfolgend dargelegt.

#### 3.3.3.1. Hochdruckhomogenisation

Um den Vergleich zu einem konventionellen Aufreinigungsprozess aufrecht zu erhalten, wurde die Fermentationsbrühe mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen, damit anschließend die GFP-Fermentationstiter Bestimmung durchgeführt werden konnte (Details zur GFP Quantifizierung unter Punkt 3.3.7.1 „Fluoreszenz Messungen“). Außerdem wurde das Grundmaterial, für die Proteinreinigungsversuche im Homogenat, durch Hochdruckhomogenisation entsprechender E.coli Zellsuspensionen erzeugt. Der Vorgang dieser beiden angeführten Zwecke war derselbe, lediglich die verwendeten Volumina und das Alter der Biomasse unterschieden sich voneinander. Zur Bestimmung des Fermentationstiters wurde frische Fermentationsbrühe eingesetzt, wohingegen die Biomasse für Reinigungsversuche im Homogenat vorher bei -40°C gelagert war und somit aufgetaut, sowie in Puffer resuspendiert werden musste (siehe auch 3.3.1). Zwecks Zellaufschluss wurde der Homogenisator, APV Labor Homogenisator (SPX®), unter 900bar mit Kühlung betrieben. Um einen möglichst vollständigen Aufschlussgrad der suspendierten E.coli Zellen zu erreichen, wurden nacheinander 3 Passagen durchlaufen.

#### 3.3.3.2. Enzymatische Lyse

Damit nach einem Extraktionsversuch festgestellt werden konnte wieviel GFP in den Zellen verblieb, war es nötig die entsprechenden Zellen zu lysieren. Zu diesem Zweck wurde das Protein Extraktionsreagent BugBuster™ (Merck) in Kombination mit dem Lysozym-hältigen Reagent Lysonase™ (Merck) eingesetzt. Die nötigen Volumina der Reagenzien (pro mg Feuchtbio-masse) wurden der Herstellervorschrift entnommen. Zu lysierende Proben mussten zunächst bei 13000rpm, für 5min abzentrifugiert und die entstandenen Pellets in den entsprechenden Mengen BugBuster™ resuspendiert (Ultra Turax®) werden. Anschließend wurden für jeden eingesetzten Milliliter BugBuster™ jeweils 2µl Lysonase™ zugesetzt und die Ansätze für 20min, bei 21°C inkubiert. Nach der durchgeführten Lyse wurden die Proben weiter prozessiert (siehe 3.3.7.1 „Fluoreszenz Messungen“).

---

### 3.3.4. Mikropartikel Batch Charakterisierung

Teil der praktischen Arbeiten war es unterschiedliche Mikropartikel Batches zu charakterisieren. Zum Teil waren die untenstehend angeführten Messungen für spätere Reinigungsexperimente von Nutzen, zum anderen dienten sie ausschließlich dem Vergleich zwischen den MP-Batches.

#### 3.3.4.1. Messung der Partikelgrößenverteilungen

Partikelgrößenverteilungen der unterschiedlichen Mikropartikel Batches wurden mittels Laser basierender Partikelgrößen Messung (Laser Diffraction Analyser LS 13 320 – Beckman Coulter) aufgenommen. Die Auswertung erfolgt nach dem Prinzip der Fraunhofer bzw. der Mie Theorie. Zum Einsatz kam die Software des Herstellers, wobei folgende Schritte mehrfach und in der angeführten Reihenfolge durchlaufen wurden:

- Spülen des Messgerätes
- Entgasen
- Laser Adjustierung
- Messung des Hintergrundrauschens
- Proben Beladung
- Dreifachmessung der Probe

Die Pumpe des Messgerätes wurde auf 45% ihrer maximalen Leistung eingestellt. Durch die Software des Gerätes wird die bereits aufgetragene Probenmenge online ausgegeben und jener Bereich dargestellt, welcher eine reproduzierbare und präzise Messung gewährt. Daher wurden bei der Beladung solange Probenaliquote des zu messenden Mikropartikel Batches aufgetragen, bis der gewünschte Bereich erreicht wurde. Im Anschluss wurden die Dreifachmessungen per Software gestartet.

#### 3.3.4.2. Adsorptionsisothermen / Bindungskapazität

Für die Bestimmung der maximalen Bindungskapazität wurden Adsorptionsisothermen mit dem Protein BSA (Rinderalbumin) aufgenommen. Die BSA Stocklösung und die daraus angefertigte Verdünnungsreihe wurde ausschließlich in 100mM Tris Puffer (pH8) hergestellt. Es musste eine Verdünnungsreihe der BSA-Stocklösung (5 mg/ml) hergestellt werden. Anschließend wurden Ansätze mit je 500µl entsprechender BSA Stock-Verdünnung, 10µl Mikropartikelsuspension und 490µl Wasser vereinigt und mittels Vortex für wenige Sekunden gemischt. Darauf folgte eine Inkubation der Ansätze für 30 min bei Raumtemperatur (Roll-/Kippmischer) und eine Zentrifugation bei 7000\*g für 10min. Um die Adsorptionsisothermen darstellen zu können wurde die BSA-Konzentration der entstandenen Überstände quantifiziert (Extinktion 280nm –

---

Nanodrop2000). Details zur BSA Quantifizierung siehe unter Punkt 3.3.7.2 „UV / VIS Spektroskopie“. Es wurde das Modell der Langmuir Isotherme verwendet.

$$q = \frac{k * q_{max} * c_{eq}}{1 + k * c_{eq}} \quad (\text{Formel 2})$$

$q$ ... Bindungskapazität [mg/ml];  $q_{max}$ ... maximale Bindungskapazität [mg/ml];  $k$ ... Langmuir Konstante [ml/mg];  
 $c_{eq}$ ... Konzentration des Sorbats in Lösung [mg/ml];

Folgende BSA Konzentrationen wurden aus der Stock Lösung hergestellt:

0,5 [mg/ml]; 0,75 [mg/ml]; 1,0 [mg/ml]; 1,25 [mg/ml]; 1,5 [mg/ml]; 2 [mg/ml]; 2,5 [mg/ml]; 3,0 [mg/ml];  
3,5 [mg/ml]; 4,0 [mg/ml]; 4,5 [mg/ml]; 5,0 [mg/ml];

### 3.3.4.3. Trockenmasse Bestimmung

Mikropartikelkonzentrationen im Abschnitt 4.3 „Proteinaufreinigung“ geben die MP Trockenmasse pro Feuchtbiomasse wieder. Zwecks Bestimmung der verschiedenen Mikropartikel Trockenmasse-Anteile wurde die Trockenwaage HG63 (Mettler Toledo) verwendet. Für die Messungen wurden jeweils ca. 5ml der entsprechenden Mikropartikelsuspension auf die Messschale der Trockenwaage aufgetragen. Die Trocknung wurde bei 85°C, über einen Zeitraum von 6h vollzogen und die verbliebene Masse anschließend erfasst. Die Berechnung des Trockenmasse-Anteils erfolgte mit unten stehender Formel:

$$\text{Trockenmasse [\%]} = \frac{m_{trocken}}{m_{Suspension}} \quad (\text{Formel 3})$$

$m_{trocken}$ ... Masse nach 6h Trocknung [mg];  $m_{Suspension}$ ... Masse der eingesetzten Mikropartikelsuspension [mg];

### 3.3.4.4. Volumenanteil und Feuchtmasse Bestimmung

Da die verwendeten Batches (der Mikropartikel Suspensionen) mittels Nassvermahlung hergestellt wurden, sollte beurteilt werden, wie hoch die Volumen- bzw. die Feuchtmasseanteile der Mikropartikel (MP) in den unterschiedlichen Suspensionen der Batches sind.

#### Feuchtsubstanz-Volumenanteil

Vor der Bestimmung des feuchten Volumenanteils der Feststoffe wurde die Dichte der eingesetzten MP Suspension festgestellt. Hierfür kam das Dichtemessmodul DMA 4500 (Anton Paar) zum Einsatz.

Zwecks Dreifachbestimmung mussten drei leere Zentrifugenröhrchen (50ml) gewogen ( $m_{\text{Röhrchen}}$ ) und beschriftet werden. Jedes Röhrchen wurde mit ca. 5ml der MP-Suspension gefüllt, wobei die Zugaben gravimetrisch erfolgte und die Ergebnisse notiert ( $m_{\text{Einwaage}}$ ) wurden. Über diese tatsächlichen Einwaagen und die Dichte der MP Suspension, kann somit das tatsächliche Volumen der eingesetzten MP-Suspension ( $V_{\text{MP\_SUSP}}$ ) berechnet werden.

$$V_{\text{MP\_SUSP}} = \frac{m_{\text{Einwaage}}}{\rho_{\text{MP}}} \quad \text{(Formel 4)}$$

$V_{\text{MP\_susp}}$ ...Volumen der eingesetzten Suspension [ml];  $m_{\text{Einwaage}}$ ...tatsächliche Einwaage an MP Suspension [mg];  
 $\rho_{\text{MP}}$ ...Dichte der eingesetzten MP Suspension [mg/ml];

Um dem Effekt des „hindered settlings“ entgegen zu wirken, wurde den Röhrchen zusätzliche 20ml RO-H<sub>2</sub>O zugesetzt und mittels Vortex gut gemischt. Anschließend wurden die Röhrchen bei 12g und 15°C für 5h abzentrifugiert, die entstandenen Überstände in ein Bechergläser - welche auf der Analysenwaage standen - überführt und die Volumen der Überstände ( $V_{\text{Ü}}$ ) ermittelt (1mg ~ 1ml). Für die Volumenanteils Berechnungen müssen die 20ml RO-H<sub>2</sub>O, welche den Röhrchen zusätzlich zugegeben wurden, vom Überstand wieder abgezogen werden. Dadurch wird der korrigierte Überstand ( $V_{\text{Ü\_korr}}$ ) ermittelt, welcher ausschließlich von der MP Suspension stammt. Außerdem wurden die Röhrchen inkl. dem verbliebenem Pellet ( $m_{\text{Pellet+ Röhrchen}}$ ) ebenfalls gewogen.

$$V_{\text{Ü\_korr}} = V_{\text{Ü}} - 20 \text{ [ml]} \quad \text{(Formel 5)}$$

$$V_{\text{MP}} = V_{\text{MP\_SUSP}} - V_{\text{Ü\_korr}} \quad \text{(Formel 6)}$$

$$\text{Volumenanteil Feuchtsubstanz [\%]} = \frac{V_{\text{MP}}}{V_{\text{MP\_SUSP}}} * 100\% \quad \text{(Formel 7)}$$

$V_{\text{Ü\_korr}}$ ...Volumen des Überstandes, korrigiert um die H<sub>2</sub>O Zugabe [ml];  $V_{\text{Ü}}$ ... Volumen des Überstandes [ml];  
 $V_{\text{MP}}$ ... Volumen der eingesetzten MP [ml];  $V_{\text{MP\_SUSP}}$ ...Volumen der eingesetzten MP Suspension [ml];

### Feuchtsubstanz-Masseanteil

Der MP Feuchtsubstanz-Masseanteil kann, auf Grund der notierten Ergebnisse aus der Volumenanteilsbestimmung, berechnet werden:

$$m_{\text{Pellet}} = m_{\text{Pellet+Röhrchen}} - m_{\text{Röhrchen}} \quad \text{(Formel 8)}$$

$$\text{Feuchtsubstanz Masseanteil [\%]} = \frac{m_{\text{Pellet}}}{m_{\text{Einwaage}}} * 100\% \quad \text{(Formel 9)}$$

$m_{\text{Pellet}}$ ...Masse des Pellets [mg];  $m_{\text{Röhrchen}}$ ...Masse des leeren Röhrchens [mg];  
 $m_{\text{Pellet+Röhrchen}}$ ...Masse des Röhrchens inkl. Pellets;  $m_{\text{Einwaage}}$ ...Masse der tatsächlichen MP Einwaage [mg];

---

### 3.3.5. Flockengrößenuntersuchungen und Sedimentation

Durch die Adsorption diverser negativ geladener Biomoleküle (z.B. saure Proteine oder Nukleinsäuren) an den Mikropartikeln entstehen Flocken, deren Größen mittels FBRM Sonde (G400, Mettler Toledo) gemessen wurden. Für die Versuche kamen ein 600ml Becherglas (ohne Schikanen), ein Überkopf-Rührer und jeweils 400ml der zu untersuchender Suspension (Homogenat oder intakte Bakterienzellen) zum Einsatz. Für die Messung konnte die, vom Hersteller zur Verfügung gestellte, Gerätesoftware verwendet werden. Untersuchungen wurden sowohl zum Einsatz des ORS (nur Marathon A2 MP), als auch unter Verwendung des TRS (zusätzlich Marathon MSC als Flockulationsmittel) durchgeführt. Für die Versuche wurden die gleichen Zellsuspensionen wie für die Experimente der Proteinaufreinigung genutzt (Herstellung der Suspensionen siehe Kapitel 3.3.1), jedoch waren die Suspensionen in 50mM Tris Puffer (pH 8) auf einen BFA von ca. 1% verdünnt. Bei den Ansätzen eines TRS wurden zuerst die A2 MP zupipettiert und wenige Sekunden danach die MSC MP zugegeben. Die Rührerdrehzahl war in beiden Fällen ca. 250rpm. Nachdem die entsprechenden Mikropartikel zugesetzt waren, wurden die Pufferbedingungen (NaCl Gehalt) bzw. die Rührerdrehzahl variiert und die Auswirkungen auf die Flockengröße mittels FBRM Sonde online gemessen.

### 3.3.6. Experimente zur GFP Aufreinigung

Die Herstellung der nötigen Suspensionen (Homogenat/intakte Zellen) ist in Abschnitt 3.3.1 ausführlich beschrieben. Für die Herstellung unterschiedlicher GFP-Aufreinigungsansätze wurden Aliquote der Zellsuspensionen in adäquate Reaktionsbehälter überführt und der gewünschte pH Wert eingestellt (15% HCl). Versuchsansätze mit einem Volumen unter 2ml konnten in Eppis durchgeführt werden. Für Ansätze mit größerem Volumen wurden entweder Zentrifugenröhrchen (bis 40ml) oder Bechergläser (bis 400ml) verwendet. Versuche im Becherglas wurden mittels Magnetrührer durchgeführt, für die restlichen Ansätze (bis 40ml) kam der Rollenkippmischer (RM5, CAT) zum Einsatz. Für die GFP Aufreinigungsversuche wurden ausschließlich der Marathon A2 Mikropartikel Batch 03\_14 und der Marathon MSC Mikropartikel Batch 03\_15 verwendet.

#### 3.3.6.1. Versuche mit Zell-Homogenat

Bei den Aufreinigungsversuchen aus Zell-Homogenaten sollte GFP an den Marathon A2 Mikropartikel adsorbieren, um in weiteren Prozessschritten in frischem Puffer wieder eluiert (desorbieren) zu werden. Das an Marathon A2 adsorbierte GFP kann, mit Hilfe von Elutionspuffern unterschiedlicher NaCl Konzentrationen (400mM bzw. 1M), wieder desorbiert werden. Neben dem „One Resin System“ (ORS) wurden auch Versuche mit dem „Two Resin

---

System“ (TRS) durchgeführt. Bei solchen Versuchen kamen, zusätzlich zu den adsorbierenden Marathon A2 Mikropartikel, die entgegengesetzt geladenen Marathon MSC Mikropartikel (als Flockulationsmittel) zum Einsatz.

### One Resin System - ORS

Den Zell-Homogenaten wurden entsprechende Mengen Marathon A2 Mikropartikel zupipettiert und der entstandene Versuchsansatz gut gemischt (Vortex oder Magnetrührer). Nach wenigen Minuten Inkubationsphase kam entweder der gesamte Ansatz oder eine daraus entnommene Probe für 4 min, bei 12000 rcf in die Zentrifuge. Der gewonnene Überstand musste mittels Spritzenfilter (0,21µm), für spätere Analysen (siehe 3.3.7 „Proteinquantifizierung und Reinheitsbestimmung“), sterilfiltriert und bei 4°C gelagert werden. Das entstandene Pellet wurde anschließend mehrfach in unterschiedlichen Elutionspuffer resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Jeder der dabei entstandenen Überstände diente als weitere Probe (Eluat) und wurde ebenfalls sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

### Two Resin System – TRS

Die Durchführung der Experimente unter Verwendung des TRS unterschied sich nur in einem Punkt von jener des ORS, nämlich darin dass wenige Sekunden nach der Marathon A2 Zugabe, die (entgegengesetzt geladenen) Marathon MSC Mikropartikel hinzukamen. Anschließend wurde der Ansatz nochmals gemischt und wenige Minuten inkubiert. Die weitere Vorgehensweise war die gleiche wie jene bei Verwendung eines ORS (siehe oben).

### 3.3.6.2. Mikropartikel Zellextraktion

Auch hier war (wie bereits bei den Flockenuntersuchungen im Zell-Homogenat in Kapitel 3.3.6.1) die Zugabe der Marathon A2 MP zur Zellsuspension (intakte E.coli Zellen), mit anschließender Mischung des Ansatzes, der erste Schritt. Für die GFP Extraktion aus den Bakterienzellen erfolgte eine Inkubationsphase von bis zu 20h, welche von mehreren Probenahmen begleitet wurde. Jede gezogene Probe musste zuerst für 4 min bei 12000 rcf abzentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (0,21µm) werden. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C. Analyse der Proben wurden wie in 3.3.7 beschrieben durchgeführt.

### 3.3.7. Proteinquantifizierung und Reinheitsbestimmung

Damit die unterschiedlichsten Versuche GFP aus den Bakterienzellen freizusetzen beurteilt werden konnten, wurden GFP-Konzentrationen mittels Fluoreszenz bzw. VIS-Spektroskopie quantifiziert. Verunreinigungen des GFPs konnten mit Hilfe von UV-Spektroskopie, sowie durch SDS PAGE untersucht werden.

---

### 3.3.7.1. Fluoreszenz Messungen

Die GFP Quantifizierung mittels Fluoreszenz wurde für die Bestimmung des Fermentationstiter und der Konzentrationen verschiedener Extraktionsversuche verwendet. Für diese beiden Einsatzgebiete der Fluoreszenz Messung kamen unterschiedliche Methoden zur Anwendung (Standard Addition bzw. externe Kalibration). Aus diesem Grund sind beide Methoden nachfolgend gesondert dargelegt. In jedem Fall kamen der Mikroplatten Multireader Tecan™ Safire™2 und Mikroplatten (96 Wells) zum Einsatz (beides von Thermo Fisher Scientific). Zwecks Anregung des GFPs wurde Licht mit einer Wellenlänge von 485nm am Gerät eingestellt und die darauf stattfindende Fluoreszenz bei 535nm gemessen (Bereiche +/- 10nm).

#### a) Fermentationstiter

Nachdem die frische Fermentationsbrühe aufgeschlossen war (siehe 3.3.3.1 „Hochdruckhomogenisation“), konnten die dabei entstandenen Zellbruchstücke für 4h, bei 12000 rcf abzentrifugiert werden. Mit Hilfe einer Schlauchquetschpumpe musste der Überstand zuerst über einen Filter der Porengröße 0,6µm und anschließend über einen Filter mit einer Porengröße von 0,21µm filtriert werden (Kleenpak™ Filter - PALL). Um einer Verfälschung der Messergebnisse durch Matrixeffekte entgegen zu wirken, kam das Standard Additionsverfahren bei der GFP Quantifizierung zum Einsatz. Jede zu messende Probe musste zunächst 1:10 verdünnt und anschließend je 50µl davon in vier Taschen der 96-Well-Platte pipettiert werden. (Reihe A, Spalte 1-12). In die gleichen Taschen wurden des Weiteren 100µl Tris Puffer (50mM / pH8) und 50µl aus vier unterschiedlichen GFP Standardverdünnungen überführt. Die GFP Konzentrationen der eingesetzten Standardverdünnungen betragen 0,66mg/ml, 0,33mg/ml, 0,66mg/ml, 0mg/ml (Tris Puffer ohne GFP). In der Reihe A, der 96-Well-Platte, waren somit die Proben mit einem Verdünnungsfaktor von 40 aufgetragen und die Proben enthielten bereits den GFP-Standard (unterschiedlicher Konzentration). Unter Verwendung einer 12-fach Pipette konnte eine Verdünnungsreihe, der in Reihe A aufgetragenen Proben hergestellt werden. Insgesamt waren es 7 weitere Verdünnungsstufen, wobei in jeder jeweils 100µl der vorherigen Reihe mit 100µl Tris Puffer versetzt (1:2 Verd.) wurden. Aus der Reihe H mussten 100µl verworfen werden, sodass jede Tasche der Platte ein Volumen von 100µl für die Messung beinhaltete. So kann sichergestellt werden, dass Messwerte im Bereich der Kalibrationsgerade (Arbeitsbereich) generiert werden. Die beladene Platte wurde anschließend in den Tecan™ Reader eingesetzt und die Messung gestartet. Trägt man die gemessene Fluoreszenz über die zugesetzten GFP Konzentrationen in einem Diagramm ein, so kann durch lineare Regression die GFP Konzentration der Probe berechnet werden:

$$\text{Fluoreszenz [FU]} = b_0 + b_1 * \text{GFP}_{STD} \quad (\text{Formel 10})$$

$$\text{GFP}_{Probe} = \text{GFP Fermentationstiter} = \frac{b_0}{b_1} * \text{Verdünnungsfaktor} \quad (\text{Formel 11})$$

*Fluoreszenz*...in der Platte gemessene Fluoreszenz [FU];  $b_0$ ...Ordinatenanschnitt der Regression [FU];  $b_1$ ...Steigung der Regression [FU/(mg/ml)];  $\text{GFP}_{STD}$ ...Konzentration des zugesetzten GFP Standards in der Plattentasche [mg/ml];  $\text{GFP}_{Probe}$ ...GFP Konzentration der ursprünglichen (unverd.) Probe [mg/ml];

Die berechnete GFP Konzentration ( $\text{GFP}_{Probe}$ ) entspricht dem Fermentationstiter der verwendeten Zellsuspension.

## b) Bestimmung aus dem Extrakt

Bei der Bestimmung der GFP Konzentration unterschiedlicher Extrakte wurde mit einer externen GFP-Kalibrationsgerade, im Bereich von 0,01 bis 0,33mg/ml gearbeitet (Mikroplatten Spalten 10-12). Jede der zu messenden Proben musste 1:10 verdünnt werden und je 50µl davon wurden in eine Taschen der 96-Well-Platte pipettiert (Reihe A, Spalte 1-4 bzw. 5-8). In die gleichen Taschen wurden zusätzlich 150µl Tris Puffer (50mM / pH8) überführt. In der Reihe A, der 96-Well-Platte, waren somit die Proben mit einem Verdünnungsfaktor von 40 aufgetragen. Unter Verwendung einer 12-fach Pipette konnte anschließend eine Verdünnungsreihe der (in Reihe A aufgetragenen) Proben- bzw. Standardverdünnungen hergestellt werden. Insgesamt waren es 7 weitere Verdünnungsstufen, wobei in jeder jeweils 100µl der vorherigen Reihe mit 100µl Tris Puffer (1:2 Verd.) versetzt wurden. Aus der Reihe H mussten 100µl verworfen werden, sodass jede Tasche der Platte ein Volumen von 100µl für die Messung beinhaltete. Die beladene Platte wurde anschließend in den Tecan™ Reader eingesetzt und die Messung gestartet. Mit den Messwerten der Standardverdünnungen konnte eine Kalibrationsgerade erstellt werden, wodurch in weiterer Folge die GFP Quantifizierung der Proben ermöglicht wurde. Außerdem musste in den Ergebnissen noch der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden:

$$\text{Fluoreszenz [FU]} = b_0 + b_1 * \text{GFP}_{STD} \quad (\text{Formel 12})$$

$$\text{GFP}_{Extrakt} = \left( \frac{\text{Fluoreszenz} - b_0}{b_1} \right) * \text{Verdünnungsfaktor} \quad (\text{Formel 13})$$

*Fluoreszenz*...in der Platte gemessene Fluoreszenz [FU];  $b_0$ ...Ordinatenanschnitt der Kalibrationsgerade [FU];  $b_1$ ...Steigung der Kalibrationsgerade [FU/(mg/ml)];  $\text{GFP}_{STD}$ ...Konzentration der gemessenen GFP Standards [mg/ml];  $\text{GFP}_{Extrakt}$ ...berechnete GFP Konzentration des Extraktes [mg/ml];

---

Die schließlich berechnete GFP-Ausbeute der Extrakte wurde auf den Fermentationstiter bezogen:

$$Ausbeute_{GFP} [\%] = \frac{GFP_{Extrakt}}{GFP_{Fermentationstiter}} * 100 [\%] \quad (\text{Formel 14})$$

GFP<sub>Extrakt</sub>...berechnete GFP Konzentration des Extraktes [mg/ml];

GFP Fermentationstiter...Titer der verwendeten Zellsuspension [mg/ml];

### 3.3.7.2. UV / VIS Spektroskopie

Mit Hilfe der UV bzw. der VIS Spektroskopie konnten sowohl die GFP Konzentrationen im Überstand der MP Adsorptionsversuche (Versuche mit Homogenat) bestimmt, als auch die anwesenden Verunreinigungen (E.coli Proteine oder Nukleinsäuren) abgeschätzt werden. Bei allen Messungen kam das Spektrophotometer „Nanodrop 2000c“ zum Einsatz. Zwischen jeder Messung musste die Messlinse mit einem feuchten (RO-H<sub>2</sub>O) und anschließend mit einem trockenen Tuch gereinigt werden.

#### a) Extinktion bei 503nm

Im Zuge der GFP Aufreinigungsversuche aus E.coli Homogenat, wurden die Konzentrationen auf Basis der Extinktion bei Wellenlänge von 503nm bestimmt. Zur Auswertung der Messwerte diente eine externe Kalibrationsgerade. Für die Kalibration wurden vier GFP Standard Konzentrationen gemessen, wodurch ein Arbeitsbereich von 0,15 mg/ml bis 13,40 mg/ml abgedeckt wurde. Zwecks Bestimmung der GFP Konzentration in den Überständen unterschiedlicher Adsorptionsversuche, wurden ca. 4µl der entsprechenden Probe auf die Messzelle des Nanodrop 2000c aufgetragen und der Messarm der Apparatur in eine waagrechte Position gebracht. Mit der - zum Gerät gehörenden - Software konnte anschließend die Messung gestartet und über die dabei ermittelte Extinktion (503nm) konnte die entsprechende GFP Konzentration berechnet werden. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Kalibrationsgerade:

$$Extintion [EU] = b_0 + b_1 * GFP_{STD} \quad (\text{Formel 15})$$

$$GFP_{Probe} = \left( \frac{b_0 * Extintion}{b_1} \right) \quad (\text{Formel 16})$$

Extintion...mit Nanodrop gemessene Extinktion bei 503nm [EU];  $b_0$ ...Ordinatenanschnitt der Kalibrationsgerade [EU];  $b_1$ ...Steigung der Kalibrationsgerade [EU/(mg/ml)];  $GFP_{STD}$ ...Konzentration der gemessenen GFP Standards [mg/ml];  $GFP_{Probet}$ ...berechnete GFP Konzentration der Probe [mg/ml];

---

### **b) Extinktion bei 260nm**

Die Durchführung einzelner Messungen wich von der unter (a) „Extinktion bei 503nm“ dargelegten Vorgehensweise nicht ab. Jedoch wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen, um den Grad der Nukleinsäure-Verunreinigungen (RNA/DNA) abschätzen zu können bzw. ihre zeitliche Zu- bzw. Abnahme während unterschiedlichen Extraktionsexperimenten zu untersuchen.

### **c) Extinktion bei 280nm**

Neben den Nukleinsäure-Verunreinigungen wurden auch die Verunreinigungen durch E.coli Proteine (ECP) analysiert. Hierfür diente die Messung der Extinktion - diverser Proben (Extrakte / Adsorptionsüberstände) - bei einer Wellenlänge von 280nm.

Außerdem wurden bei dieser Wellenlänge auch die BSA Konzentrationen im Überstand der Mikropartikel Adsorptionsansätze (siehe 3.3.4.2) bestimmt. Hierfür wurde die bereits vorinstallierte Einstellung „BSA Quantifizierung“ der Software genutzt. Diese errechnet die entsprechende BSA Konzentration (mg/ml) der gemessenen Probe.

### **3.3.7.3. SDS PAGE**

Mit Hilfe der elektrophoretischen Trennung konnten diverse Proteingemische, abhängig von den unterschiedlichen Molekülmassen, aufgetrennt werden. Anschließend wurden die Proteine am Elektrophorese Gel immobilisiert und zwecks Visualisierung gefärbt. Die zur Durchführung nötigen Arbeitsschritte (Probenvorbereitung / Aufbau der Elektrophorese Zelle / Beladung der Gele und Elektrophorese / Fixierung und Färbung / Auswertung des Gels) werden im Folgenden einzeln erklärt.

#### **a) Probenvorbereitung und Beladung der Gele**

Damit eine Überladung des Gels - welche eine anschließende Analyse erheblich erschweren würde - vermieden werden konnte, mussten die Proben zunächst adäquat verdünnt werden. Auf jedem Elektrophorese Gel wurden drei GFP Standards, im Bereich von 0,5 – 2ng GFP pro Gelbahn aufgetragen. Daher war das Ziel der Probenverdünnungen - auch in den zu messenden Proben - GFP Konzentrationen im Arbeitsbereich der Kalibrationsgerade zu erhalten. Die entsprechenden Probenverdünnungen (1:5 bis 1:150) wurden mit dem NuPAGE™ LDS Probenpuffer (unterschiedlicher Konzentrationen) hergestellt, mittels Vortex gemischt und anschließend bei 95°C, für 5min gekocht (Thermomixer Compact - Eppendorf). Nach dem Kochen wurde durch Zentrifugation für wenige Sekunden (Minispin Zentrifuge - Eppendorf) das entstandene Kondensat wieder mit dem Rest der Probe vereinigt. Nach

---

kurzem Mischen am Vortex konnten auf jeder Bahn des Gels 15µl der jeweiligen Probe (per Pipette) aufgetragen werden. Zum Einsatz kamen Elektrophorese Gele von NuPAGE™ (4-12% Bis-Tris Gel; 12 bzw. 20 Geltaschen).

**b) Aufbau der Elektrophorese Zelle**

Je nach Umfang der Proben wurde entweder die Xcell Elektrophorese Zelle (Novex) für Gele mit 12 oder jene für Gele mit 20 Geltaschen verwendet. Das beladene Gel wurde in die entsprechende Elektrophorese Zelle eingesetzt und ordnungsgemäß fixiert. Die in der Zelle entstandenen Kammern konnten anschließend mit dem NuPAGE™ SDS-Laufpuffer befüllt und die Elektrophorese Zelle geschlossen werden.

**c) Elektrophorese**

Nach dem Anschluss der Zelle an die Stromversorgung wurde die elektrophoretische Trennung der Proteine am Gel gestartet. Die Einstellungen der Stromversorgung waren: 200V, 400mA, Timer: 35min;

**d) Fixierung und Färbung**

Sobald der Timer abgelaufen war, wurde das Gel aus der Kammer genommen, für 15min in der Fixierlösung geschwenkt und anschließend vorsichtig aber gründlich mit RO-H<sub>2</sub>O gespült. Die anschließende Färbung des Gels mit „Simply Blue™ Safe Stain“, dauerte 1h, die nachfolgende Entfärbung in RO-H<sub>2</sub>O wurde über Nacht vollzogen (ebenfalls unter Schwenken).

**e) Auswertung des Gels**

Am Tag nach der Proteinfärbung wurde das Gel nochmals mit frischem RO-H<sub>2</sub>O gespült und mit dem Gelscanner GS-900 (BioRad) digitalisiert. Der Scanner und die anschließenden Auswertungen konnten mit der gleichen Software durchgeführt werden - „Image Lab 5“ (BioRad). Unterschiedliche Software Werkzeuge ermöglichten die Durchführung folgende Analysen:

- Bestimmung des GFP Anteils an den Proteinen in der Probe;
- GFP-Konzentrationsbestimmung mittels Kalibrationsgerade;
- Proteingrößenbestimmung mittels Größenmarker;

---

### 3.3.8. Filtration

Filtrationen wurden mittels unterschiedlicher Filtrationsgeräte und Porengrößen durchgeführt. Nachstehend werden die durchgeführten Filtrationsversuche beschrieben.

#### a) Nalgene™ Einweg Unterdruckfilter 0,1 µm (Thermo Scientific)

Das Nalgene™ Set, bestehend aus Filtereinheit mit PES-Membran (0,1µm) und Filtratgefäß musste lediglich miteinander verschraubt und an die Vakuumpumpe angeschlossen werden. Der zu filtrierende Extraktionsansatz wurde in den Filteraufsatz überführt und die Filtration gestartet.

#### b) VitraPOR® Unterdruck-Sinternutsche (Boroglas) 1 µm bis 40 µm

Filtrationen mittels VitraPOR® Sinternutschen wurden mit unterschiedlichen Porengrößen durchgeführt (1– 1,6 µm; 1-16 µm; 16-40 µm). Die Nutsche wurde in die zugehörige Saugflasche eingeführt und die Saugflasche mit der Vakuumpumpe verbunden. Anschließend musste nur noch der zu filtrierende Extraktionsansatz in die Nutsche überführt und die Vakuumpumpe gestartet werden.

---

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Nachfolgend werden Resultate der durchgeführten Experimente besprochen. Die Ergebnisse der Mikropartikel (Batch) Charakterisierung, der Flockulationsexperimente sowie jene der Protein Aufreinigung sind gesondert dargestellt. Am Ende des Kapitels werden die wichtigsten Ergebnisse der Unterpunkte nochmals zusammengefasst dargestellt.

### 4.1. Mikropartikel Charakterisierung und Batch Vergleich

Die Charakterisierung der unterschiedlichen Mikropartikel Batches wurde, wie bereits unter den Methoden (3.3.4 „Mikropartikel Batch Charakterisierung“) beschrieben, durchgeführt. Zum Teil waren die Untersuchungen für spätere Reinigungsexperimente vonnöten, zum anderen dienten sie ausschließlich dem Vergleich der verschiedenen MP-Batches.

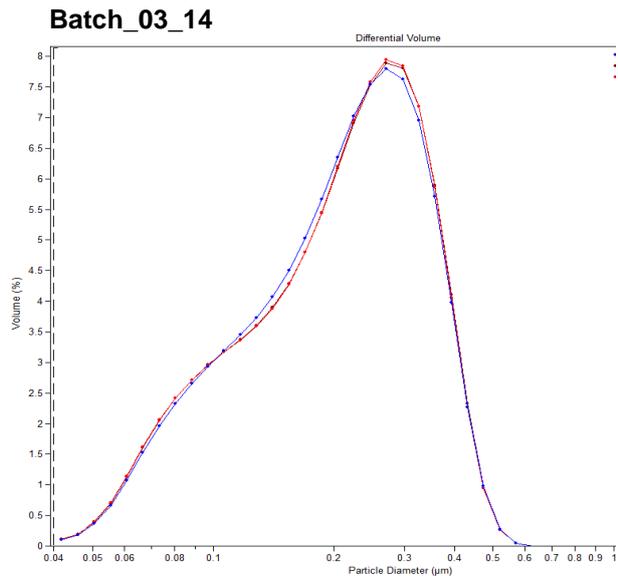
Die Untersuchungen umfassten unter anderem die Bestimmung der Partikelgrößenverteilungen, der Bindungskapazitäten (BSA) und des Massenanteils der Mikropartikel-Trockensubstanz.

#### 4.1.1. Partikelgrößenverteilung

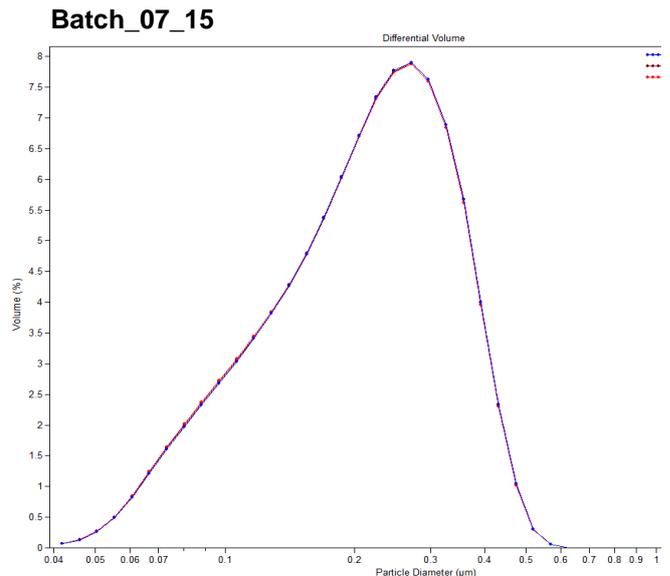
Wie bereits erwähnt (siehe 3.2.4 „Mikropartikel“), wurden während der durchgeführten Arbeiten, drei unterschiedliche Mikropartikel Batches eingesetzt. Es handelte sich dabei um zwei (unabhängig voneinander hergestellte) Batches des Anionenaustauscherharzes Marathon A2 und einen Batch des Kationenaustauscherharzes Marathon MSC. Da die Partikelgrößen - welche durch die vorangegangenen Mahlprozesse entstanden sind (siehe 3.2.4 „Mikropartikel“) - das Verhältnis zwischen Volumen und Oberfläche der entsprechenden Partikel vorgibt, ist diese auch für die adsorptiven Eigenschaften der MP maßgebend mitverantwortlich. Damit Adsorptions- und Extraktionsexperimente reproduzierbar durchgeführt werden können, muss auch eine annähernd gleiche Partikelgrößenverteilung in verschiedenen MP-Batches des gleichen Ionenaustauschers vorliegen.

#### Marathon A2

Um zu prüfen, wie groß die Unterschiede der Partikelgrößen zwischen den beiden Marathon A2 Batches sind, wurden die Partikelgrößenverteilungen der Batches gemessen. Die beiden unten stehenden Grafiken (Abbildung 4 und Abbildung 5) zeigen die gemessenen Verteilungen der Marathon A2 Batches. Jede Abbildung zeigt die Ergebnisse einer durchgeführten Dreifachmessung.



**Abbildung 4: Marathon A2 Partikelgrößenverteilung I**  
Dargestellt ist Verteilung des Batches\_03\_14. Es wurde eine Dreifachmessung ausgeführt.



**Abbildung 5: Marathon A2 Partikelgrößenverteilung II**  
Dargestellt ist die Verteilung des Batches\_07\_15. Es wurde eine Dreifachmessung ausgeführt.

In den beiden Abbildungen ist gut zu erkennen, dass der maximale Partikeldurchmesser beider Batches bei ca. 0,6 µm liegt und der Batch 03\_14 (Abbildung 4) neben dem Hauptpeak noch einen zusätzlichen überlagerten Nebenpeak aufweist. Dieser stellt sich in der Abbildung als Schulter dar (im Bereich um 0,1 µm) und lässt darauf schließen, dass beim Batch 03\_14 ein größerer Partikelanteil im Bereich zwischen 0,05 bis 0,15 µm vorliegt als bei dem Batch 07\_15 (Abbildung 5). Den nachstehend angeführten Tabellen (Tabelle 6 und Tabelle 7) können die wichtigsten Daten der Partikelgrößenverteilungen entnommen werden. Die Ergebnisse der beiden gemessenen Marathon A2 Batches zeigen nur minimale Abweichungen voneinander.

**Tabelle 6: Partikelgrößenverteilung I**  
Messergebnisse der Partikelgrößenmessung.  
Marathon A2 Batch\_03\_14.

Partikeldurchmesser [µm]				
d10	d25	d50	d75	d90
0,090	0,137	0,215	0,294	0,361
Mittelwert:	0,221 µm			
Median:	0,215 µm			
STD Abw.:	0,101 µm			
Varianz:	0,010 µm <sup>2</sup>			

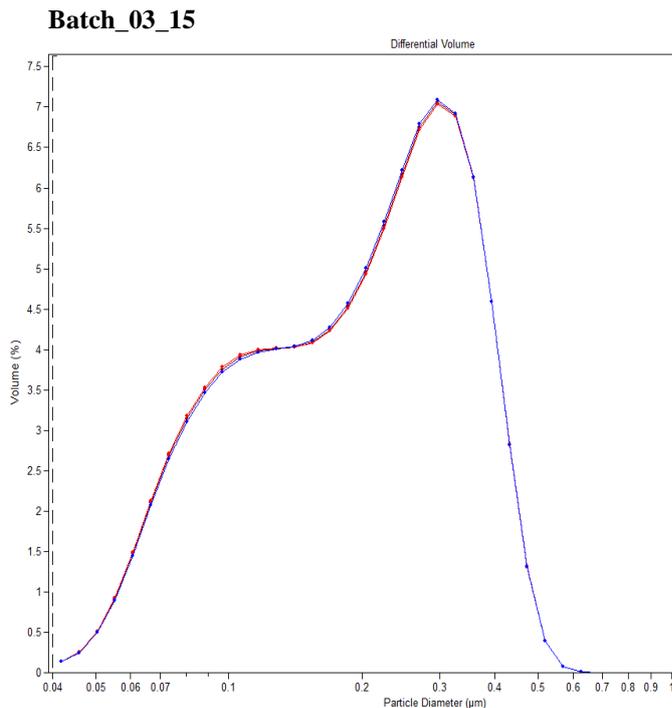
**Tabelle 7: Partikelgrößenverteilung II**  
Messergebnisse der Partikelgrößenmessung.  
Marathon A2 Batch\_07\_14.

Partikeldurchmesser [µm]				
d10	d25	d50	d75	d90
0,096	0,144	0,217	0,294	0,362
Mittelwert:	0,224 µm			
Median:	0,217 µm			
STD Abw.:	0,099 µm			
Varianz:	0,010 µm <sup>2</sup>			

Da die Unterschiede der Partikelgrößenverteilungen relativ gering sind, können die vorangegangenen Mahlprozesse (bezüglich der Partikelgrößen) als reproduzierbar angesehen werden.

## Marathon MSC

Die gemessenen Partikelgrößenverteilungen (Dreifachmessungen) des MSC Batches 03\_15 sind in Abbildung 6 dargestellt und weisen ebenfalls einen maximalen Partikeldurchmesser von ca. 0,6  $\mu\text{m}$  auf. Ähnlich wie bei dem Marathon A2 Batch 03\_14 ist auch hier neben dem Hauptpeak noch ein zusätzlicher Peak im Bereich um 0,1  $\mu\text{m}$  zu erkennen. Der zusätzliche Peak ist jedoch deutlich stärker ausgeprägt als bei dem Marathon A2 Batch.



**Tabelle 8:** Partikelgrößenverteilung III  
Messergebnisse der Partikelgrößenmessung.  
Marathon MSC Batch\_07\_15.

Partikeldurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]				
d10	d25	d50	d75	d90
0,082	0,120	0,206	0,301	0,371
Mittelwert:	0,217 $\mu\text{m}$			
Median:	0,206 $\mu\text{m}$			
STD Abw.:	0,110 $\mu\text{m}$			
Varianz:	0,012 $\mu\text{m}^2$			

**Abbildung 6:** Marathon MSC Partikelgrößenverteilung.  
Dargestellt ist die Verteilung des Batches\_03\_15. Es wurde eine Dreifachmessung ausgeführt.

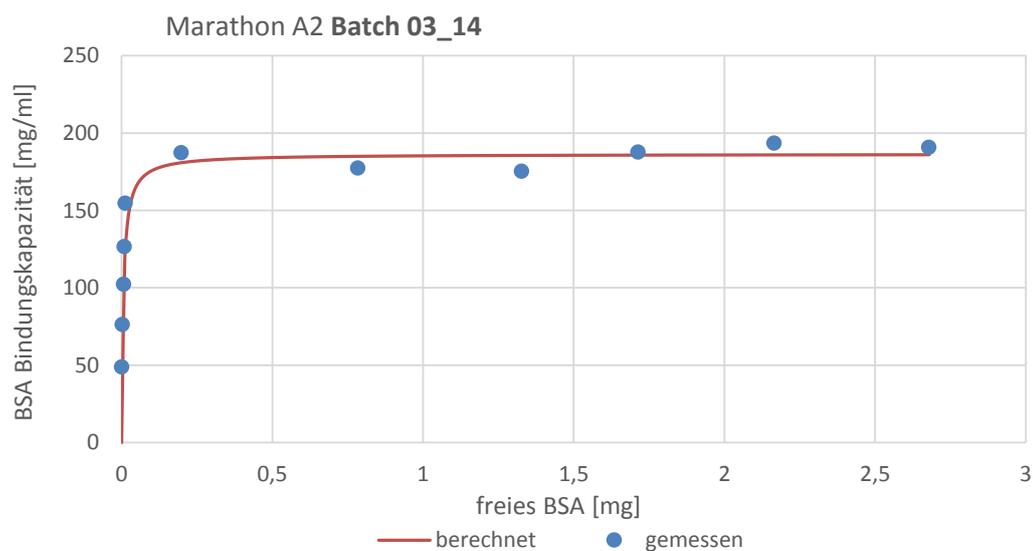
Tabelle 8 gibt einen Überblick über die wichtigsten Messergebnisse der Partikelgrößenbestimmung. Bei einem Vergleich der Tabelle mit jenen der beiden A2 Batches (Tabelle 6 und Tabelle 7) fällt auf, dass einerseits die Werte d10, d25, d50 für den MSC Batch größer und andererseits die Werte d75 sowie d90 kleiner als jene der A2 Batches sind.

Eine Aussage über die Ab- oder Anwesenheit von Nanopartikeln (kleiner 0,001  $\mu\text{m}$ ) in den einzelnen Mikropartikel Batches, kann aufgrund der Partikelgrößenverteilung nicht getroffen werden.

#### 4.1.2. Adsorptionsisothermen (BSA)

Die Bindungskapazitäten der Mikropartikel sind für die Durchführung von Protein-Aufreinigungsprozessen entscheidend. Wird mit den eingesetzten MPs eine zu hohe Bindungskapazität erreicht, binden neben dem Zielprotein auch unerwünschte Verunreinigungen wie Nukleinsäuren oder E.coli Proteine (ECP) an den MP. Auf der anderen Seite kann, unter Verwendung eines MP Batches zu geringer Bindungskapazität, nur ein Teil des vorhandenen Zielproteins an die Partikel gebunden werden.

Die mit BSA generierten Marathon A2 Langmuir-Adsorptionsisothermen sind in Abbildung 7 (Batch 03\_14) und Abbildung 8 (Batch 07\_15) dargestellt. Die Isotherme des Batches 03\_14 ergab eine maximale Bindungskapazität von ca. 186mg BSA/ml A2 Suspension und eine Langmuir Konstante K von ca. 160ml/mg BSA. Die Langmuir Konstante kann als Maß für die Affinität angesehen werden. Je höher der Wert der Konstante, desto höher ist die Affinität zum Substrat.

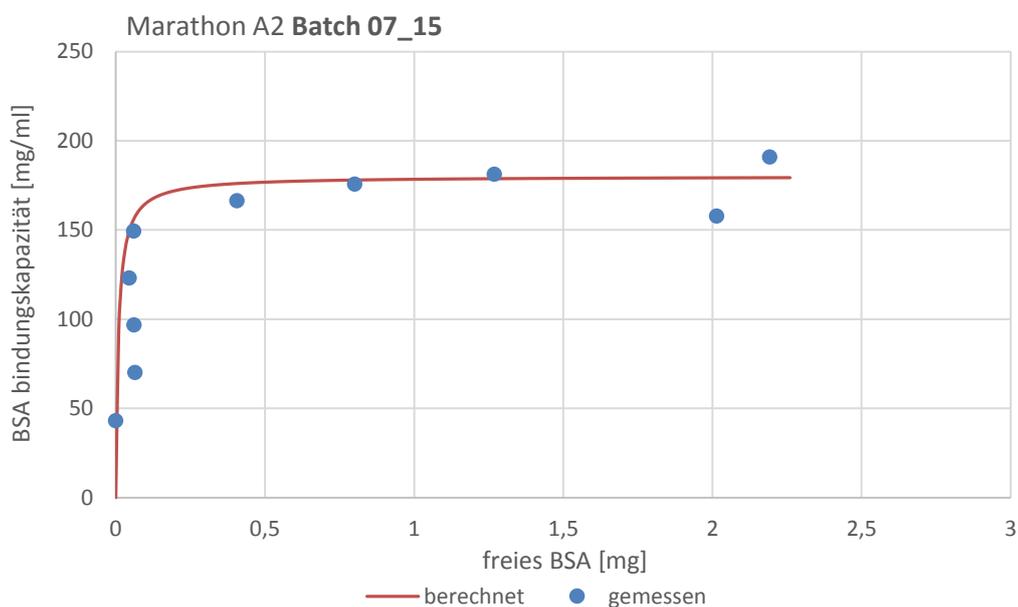


**Abbildung 7:** BSA-Adsorptionsisotherme des Marathon A2 Batches 03\_14.

Die dargestellte BSA-Adsorptionsisotherme des Marathon A2 Batches 03\_14 (rote Linie) wurde aus den gemessenen Punkten (blau) derart berechnet, dass die Fehlerquadratsumme aller Punkte einen minimalen Wert annimmt. Aus der berechneten Langmuir Isotherme ergibt sich für den A2 Batch eine maximale Bindungskapazität ( $q_{\max}$ ) von 186,4mg BSA/ml Marathon A2 Suspension und eine Langmuir Konstante von  $K=160$  ml/mg BSA.

Die in Abbildung 8 wiedergegebene Messung des A2 Batches 07\_15 zeigt einen ähnlichen Verlauf der Adsorptionsisotherme wie jene des Batches 03\_14. Bei dem untersuchten Batch wurde eine maximale Bindungskapazität von ca. 180mg BSA/ml A2 Suspension und eine Langmuir Konstante K von 110ml/mg BSA bestimmt. Somit konnten zwischen den Adsorptionsisothermen der beiden A2 Batches (03\_14 bzw. 07\_15) nur minimale Unterschiede

bei den maximalen Bindungskapazitäten festgestellt werden. Die Werte der bestimmten Langmuir Konstanten weichen hingegen deutlicher voneinander ab, sind jedoch in beiden Fällen relativ hoch, wodurch die steilen Anstiege in den beiden besprochenen Abbildungen resultieren. Ebenso wie bereits die Ergebnisse der Partikelgrößenverteilung (siehe 4.1.1), legen auch die oben präsentierten Bindungsisothermen dar, dass die beiden verglichenen A2 Mikropartikel-Batches annähernd gleiche Eigenschaften aufweisen und der vorangegangene Mahlprozess somit reproduzierbar war. Auf Grund dieser Resultate wurde durch die Firma Boehringer Ingelheim RCV eine weitere Lohnmahlung, zur Herstellung von 100 Liter Marathon A2 Mikropartikel, in Auftrag gegeben.



**Abbildung 8:** BSA-Adsorptionisotherme des Marathon A2 Batches 07\_25

Die dargestellte BSA-Adsorptionisotherme des Marathon A2 Batches 07\_15 (rote Linie) wurde aus den gemessenen Punkten (blau) derart berechnet, dass die Fehlerquadratsumme aller Punkte einen minimalen Wert annimmt. Aus der berechneten Langmuir Isotherme ergibt sich für den A2 Batch eine maximale Bindungskapazität ( $q_{max}$ ) von 180,3mg BSA/ml Marathon A2 Suspension und eine Langmuir Konstante von  $K=110\text{ml/mg BSA}$ .

### 4.1.3. Weitere physikalischen Eigenschaften

Im folgendem werden weitere Eigenschaften, der zu charakterisierenden Mikropartikel Batches, angeführt. Kenntnisse über diese Eigenschaften sind für praktische Arbeiten, mit den MPs Suspensionen, sehr hilfreich z.B. um das Volumen einer entsprechenden MP-Trockenmasse, eines bestimmten Batches zu berechnen. In Tabelle 9 sind Messergebnisse sowohl aus der Charakterisierung der beiden A2 Batches, als auch jene des MSC Batches zusammengefasst. In allen Fällen wurde eine Dreifachbestimmungen durchgeführt, die Standardabweichungen der einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 9 ebenfalls angeführt („std dev“).

**Tabelle 9:** Ergebnisse diverser physikalischer Eigenschaften unterschiedlicher Mikropartikel Batches.

Mikropartikel	Dichte [g/ml]		Volumenanteil der Feststoff-Feuchtsubstanz [%]		Massenanteil der Feststoff-Feuchtsubstanz [%]		Massenanteil der Feststoff-Trockensubstanz [%]	
	mean	std dev	mean	std dev	mean	std dev	mean	std dev
<b>Marathon A2</b> batch 07_15	1,019	0,001	78,707	1,059	79,093	1,171	11,860	0,035
<b>Marathon A2</b> batch 03_14	1,022	0,001	89,530	2,248	86,955	0,631	13,279	0,296
<b>Marathon MSC</b> batch 03_15	1,105	0,006	79,971	1,068	80,050	0,312	24,939	0,069

Die beiden A2 Batches zeigen eine Dichte von ca. 1,02 g/ml Mikropartikel-Suspension. Die Dichte des MSC Batches ist mit ca. 1,11 g/ml etwas höher. Auch der Massenanteil der Feststoff-Trockensubstanz ist bei dem Marathon MSC Batch höher (~ 25%) als bei den A2 Batches (11,9 – 13,3%). Bei einem Vergleich zwischen den Ergebnissen der beiden A2 Batches findet man die größten Unterschiede zwischen den Werten der MP Volumenanteile. Die Differenz beträgt ca. 10%, bei einer Gesamtstandardabweichung der beiden Bestimmungen von ungefähr 3,3%.

Abbildung 9 zeigt die, während der Bestimmung des Feuchtsubstanz-Volumenanteils, entstandenen Pellets. Auffällig ist die bräunliche Farbe des Marathon MSC Pellets (links im Bild) im Gegensatz zum farblosen Marathon A2 Pellet (rechts im Bild – Batch 03\_14). Die korrespondierenden Überstände, welche während der Zentrifugation entstanden, sind in Abbildung 10 dargestellt (links Marathon MSC; rechts Marathon A2). Die gesammelten Überstände zeigen beide eine leichte Trübung, welche darauf hinweist, dass nicht alle Partikel während der Zentrifugation abgetrennt werden konnten. Die Überstände stellen sich in denselben Farben wie die Pellets dar.



**Abbildung 9:** Mikropartikel Pellets. Entstanden sind die Pellets durch Zentrifugation während der Bestimmung des Feuchtsubstanz-Volumenanteils (links Marathon MSC und rechts Marathon A2).



**Abbildung 10:** Überstände der Mikropartikelsuspensionen. Das Bild wurde nach Abtrennung des Großteils der Partikelfeststoffe aufgenommen. In der linken Hälfte des Bildes ist Marathon MSC und in der rechten Hälfte Marathon A2 abgebildet.

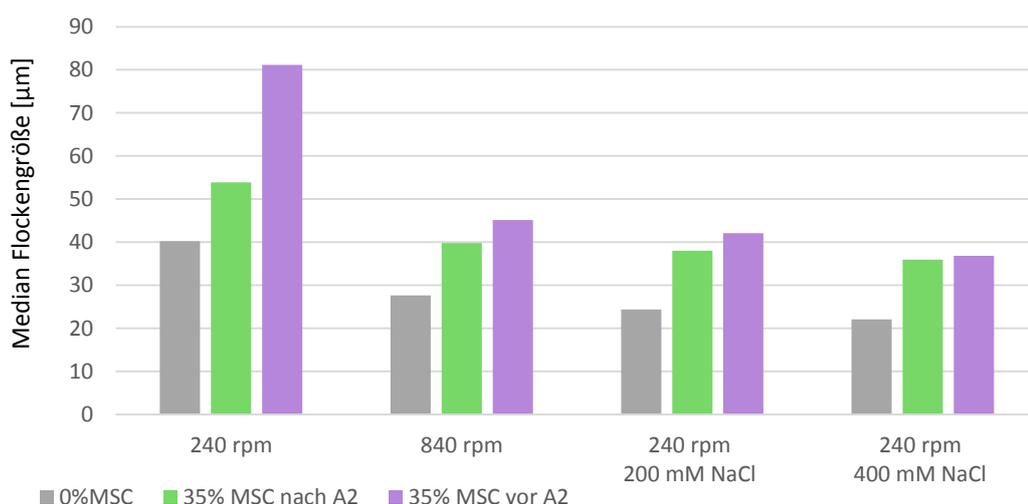
Zusammenfassend kann zu den Ergebnissen des Kapitels 4.1 „Mikropartikel Charakterisierung und Batch Vergleich“ gesagt werden, dass die beiden Marathon A2 Batches nur geringe Abweichungen bezüglich Partikelgrößenverteilungen, maximaler Bindungskapazität und Trockenmasseanteil zeigten. Der Marathon MSC Mikropartikel Batch scheint einen höheren Trockensubstanz Massenanteil zu haben als die beiden Marathon A2 Mikropartikel Batches (siehe Tabelle 9).

## 4.2. Flockulation

Der Inhalt dieses Kapitels betrifft die Flockenbildung durch Mikropartikel und aufgeschlossenen (siehe 4.2.1) bzw. intakten (siehe 4.2.2) E.coli Zellen. Die Absicht der durchgeführten Experimente war es, festzustellen ob durch Anwendung eines Two Resin Systems (TRS) die Flockengröße (bzw. die Flockenstabilität) erhöht werden kann. Insbesondere für die, unter Elutionsbedingungen (400mM NaCl) entstehenden Flocken, ist diese Frage von entscheidender Bedeutung, da hier durch vorangegangene Arbeiten eine erschwerte Separation der Flocken vom Überstand beobachtet wurde [35].

### 4.2.1. Flockulation im Homogenat

Um die Auswirkung einer MSC Zugabe (als Flockulationszusatz) zu untersuchen, wurden die Flockengrößen dreier unterschiedlicher Ansätze, unter variierenden Bedingungen (Rührerdrehzahl / NaCl-Konzentration) gemessen. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 11 abgebildet.



**Abbildung 11:** Ergebnisse der Flockengrößenmessungen (Homogenat)

Median der Flockengröße während unterschiedlicher Rührerdrehzahlen bzw. nach Erhöhung der Ionenstärke durch Salzzugabe (NaCl). Die abgebildeten Bedingungen wurden während einer Messung, nacheinander eingestellt. Dargestellt sind sowohl Ergebnisse eines Versuches unter Verwendung des ORS (0% MSC), als auch die Daten zweier TRS (35% MSC Trockenanteil w/w MPs). Die Marathon A2 Konzentration aller Ansätze betrug 140mg/g Feuchtbioasse (FBM). Einem der beiden TRS wurde zuerst Marathon A2 zugesetzt (grün), dem anderen zuerst Marathon MSC (violett). Versuchsmaßstab 400ml mit ~1% Biomassefeucht-Anteil (BFA) in 50mM Tris Puffer / pH8.

---

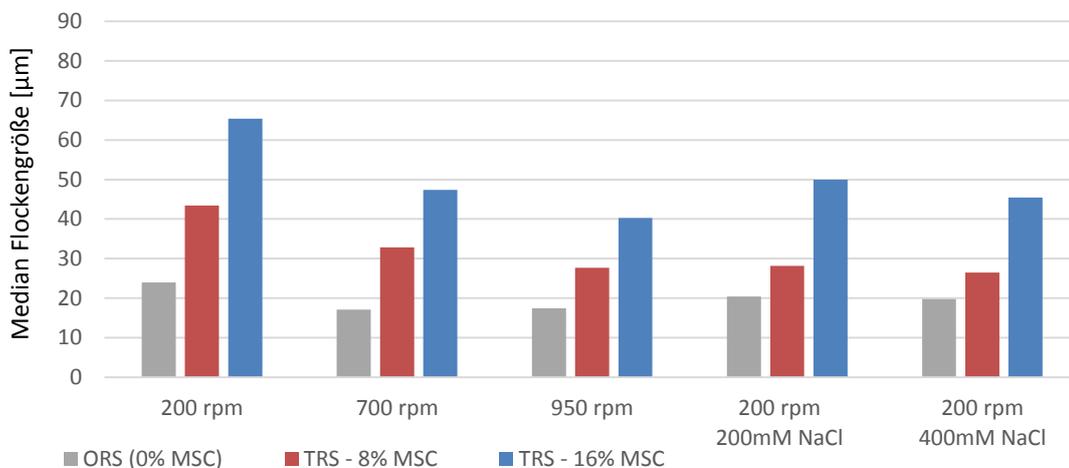
In der obenstehenden Abbildung ist jener Versuchsansatz, welcher ohne MSC Zugabe hergestellt (ORS – grau) wurde, jeweils als erster der drei Ansätze dargestellt. Der ORS Ansatz zeigt unter jeder getesteten Bedingung die niedrigste Flockengröße der drei Ansätze. Wird Marathon MSC (als Flockulationszusatz) sofort nach A2 zugegeben, sodass der MSC-Trockenmasseanteil 35% der gesamten Mikropartikel trockenmasse (MSC + A2) beträgt, wird die Flockengößen unter den verschiedenen Bedingungen deutlich gesteigert (grün). Für die im Bild ganz rechts dargestellte Bedingung, mit einer NaCl Konzentration des Extraktionspuffers von 400mM (Elutionsbedingung), beträgt diese Steigerung rund 60% des Wertes aus dem ORS-Ansatz. Der dritte untersuchte Versuchsansatz (violett) wurde ebenfalls mit 35% MSC (MP-Trockenmasseanteil) hergestellt. Bei dem Ansatz wurden die Mikropartikel jedoch in umgekehrter Reihenfolge zugegeben (zuerst MSC, danach A2). Bezogen auf, den in grüner Farbe, abgebildeten Balken (TRS - MSC nach A2), zeigt dieser Ansatz für die erste dargestellte Bedingung (Rührerdrehzahl 240rpm / 0mM NaCl) einen Anstieg der Flockengröße von ca. 54µm auf über 80µm. Für die restlichen Bedingungen, und vor allem für die Elutionsbedingung (400mM NaCl) ist der gemessenen Anstieg der Flockengrößen zwischen diesen beiden Ansätzen minimal. Betrachtet man die Ergebnisse der einzelnen Versuchsansätze gesondert, so ist ein Abwärtstrend der Flockengröße für die nacheinander eingestellten Bedingungen (von li. nach re.) zu erkennen.

Demnach wurde bestätigt, dass die gebildeten Flocken sowohl durch erhöhte Scherkräfte, als auch durch Erhöhung der Salzzugabe teilweise wieder zerstört werden. Durch die Zugabe von Marathon MSC als Flockulationsmittel konnte die Flockengröße beträchtlich erhöht werden, dies gilt ebenso unter Elutionsbedingungen. Auf Grund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass durch die Etablierung eines TRS (und der daraus resultierenden Bildung größerer Flocken) eine Filtration, auch unter Elutionsbedingungen (400mM) erleichtert werden kann.

#### **4.2.2. Flockulation der Mikropartikel Zell Extraktion (MPZE)**

Ergebnisse der Flockenuntersuchungen mit intakten Zellen sind in Abbildung 12 zusammengefasst. Wie bereits unter Punkt 4.2.1, „Flockulation im Homogenat“, wurden auch diesmal die Flockengrößen dreier unterschiedlicher Ansätze, unter variierenden Bedingungen (Rührerdrehzahl / NaCl-Konzentration) gemessen. Einer der 3 Ansätze wurde ohne MSC hergestellt (ORS - grau), die beiden anderen wurden als Two Resin System (unterschiedlicher MSC MP-Trockenmasseanteilen) ausgeführt. Das in den Zellen enthaltenen GFP wurde - bei allen drei Ansätzen - während des Experimentes in den Überstand extrahiert. In diesem Kapitel werden jedoch nur die gemessenen Flockengrößen behandelt.

Ebenso wie bereits unter „Flockulation im Homogenat“ (siehe Punkt 4.2.1) festgestellt, kann auch in Abbildung 12 beobachtet werden, dass durch die Verwendung des ORS (grau) jeweils die niedrigste Flockengröße der drei dargestellten Ansätze erzielt wurde. Die größten Flocken des ORS-Ansatzes wurden unter einer Rührerdrehzahl von 200rpm und Abwesenheit von NaCl gemessen (ca. 24µm). Die Flockengrößen der beiden untersuchten TRS-Ansätze liegen - unter jeder einzelnen Bedingung - über diesem Wert. Unter Elutionsbedingungen (400mM) zeigt der Ansatz mit 8% MSC (rot) immerhin noch einen Median der Flockengrößen von ca. 27µm. Jener Versuchsansatz mit 16% MSC (blau) zeigt unter denselben Bedingungen sogar einen Median von ca. 45µm.



**Abbildung 12:** Ergebnisse der Flockengrößenmessungen (intakte Zellen)

Median der Flockengröße während unterschiedlicher Rührerdrehzahlen bzw. nach Erhöhung der Ionenstärke durch Salzzugabe (NaCl). Die abgebildeten Bedingungen wurden - während einer Messung - nacheinander eingestellt. Dargestellt sind sowohl Ergebnisse eines Versuches unter Verwendung des ORS (0% MSC), als auch die Daten zweier TRS (8% bzw. 16% MSC Trockenanteil w/w MPs). Versuchsmaßstab 400ml mit ~1% BFA in 50mM Tris Puffer / pH8. Marathon A2 Konzentration: 100mq / q FBM.

Somit wurde bestätigt, dass die gebildeten Flocken sowohl durch erhöhte Scherkräfte, als auch durch Erhöhung der Salzzugabe teilweise wieder zerstört werden. Durch die Zugabe von MSC als Flockulationsmittel konnte die Flockengröße - bereits durch geringe MSC Zugaben - beträchtlich erhöht werden. Durch eine weitere Anhebung des MSC Anteiles war es möglich die Flockengrößen neuerlich zu steigern. Im Vergleich zum ORS konnte somit, unter Elutionsbedingungen, der Median mehr als verdoppelt werden (mit 16% MSC Trockenmasseanteil der MP). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Flockenseparation – vor allem unter Elutionsbedingungen – durch die Etablierung eines TRS deutlich erleichtert werden kann.

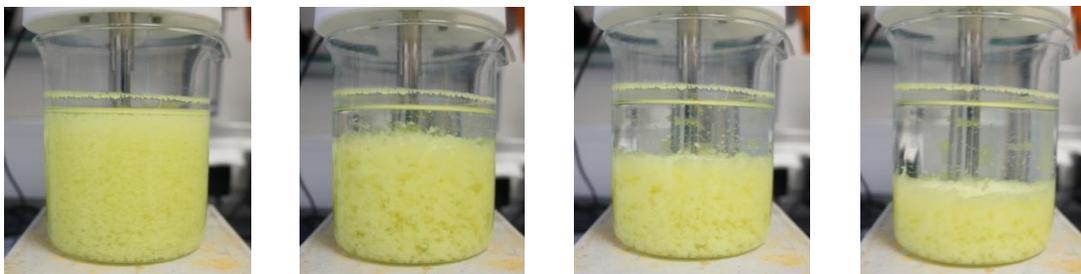
---

## Sedimentation der Flocken (MPZE - TRS)

Um die Flockenumbildung und die damit einhergehende Verminderung der Sedimentationsgeschwindigkeit, bei Erhöhung der NaCl Konzentration besser darzulegen wurden Bilderserien von Sedimentationsversuchen angefertigt.

Abbildung 13 zeigt die Bilderserie des Sedimentationsvorganges einer flockulierter Zellsuspension. Die Einzelbilder sind in einem Intervall von 10 Sekunden entstanden. Es wurde ein TRS (30% MSC – Trockenmasseanteil der MP) zur Flockulation eingesetzt. Dem verwendeten Puffer wurde kein NaCl zugesetzt.

Die entstandenen Flocken setzten sich innerhalb einer halben Minute ab und der entstandene Überstand war farblos und klar.



**Abbildung 13:** Bilderserie zur Sedimentation unter Adsorptionsbedingungen.

Bild Nr.1 zeigt Flocken eines „TRS“ mit 30% MSC Trockenanteil (w/w) der MP, bei einer Rührerdrehzahl von 400rpm. Anschließend wurde der Rührer abgeschaltet. Die weiteren Bilder zeigen die Sedimentation der TRS-Flocken in einem 10 Sekunden Intervall. Für den Ansatz wurde ein 50mM Tris Puffer / pH8,5 und ein BFA von 1% verwendet – Versuchsmaßstab 400ml. Marathon A2 Konzentration: 110 mg / g FBM.

Der gleiche Ansatz wurde anschließend auf eine NaCl-Konzentration von 400mM gebracht und eine weitere Bilderserie wurde angefertigt (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Bilderserie zur Sedimentation unter Elutionsbedingungen.

Bild Nr.1 zeigt Flocken eines „TRS“ mit 30% MSC Trockenanteil (w/w) der MP, bei einer Rührerdrehzahl von 400rpm. Anschließend wurde der Rührer abgeschaltet. Die weiteren Bilder zeigen die Sedimentation der TRS-Flocken in einem 20 Sekunden Intervall. Für den Ansatz wurde ein 50mM Tris Puffer / pH8,5 mit 400mM NaCl (GFP - Elutionsbedingung) verwendet. Versuchsmaßstab 400ml mit 1% BFA. Marathon A2 Konzentration: 110 mg / g FBM.

Durch die Salzzugabe wurde die Flockenbeschaffenheit deutlich verändert und die Sedimentation des Flockengroßteils dauerte mit ~1,5 Minuten entschieden länger als in Abbildung 13. Der entstandene Überstand war grün gefärbt (Elution des GFPs) und etwas trüb. Die abgesetzten Flocken scheinen kleiner als in Abbildung 13 zu sein und zeigen weniger Hohlräume.

---

### 4.3. Proteinaufreinigung

Während der praktischen Arbeiten wurden sowohl Experimente mit aufgeschlossenen Zellsuspensionen (Homogenat), als auch mit Zellsuspensionen intakter E.coli Bakterien ausgeführt. Ergebnisse aus den Versuchen im Zell-Homogenat sind nachstehend angeführt. Resultate der Zellextraktionsversuche (intakte E.coli) werden anschließend betrachtet. Für die GFP Aufreinigungsversuche wurden ausschließlich der Marathon A2 Mikropartikel Batch 03\_14 und der Marathon MSC Mikropartikel Batch 03\_15 eingesetzt.

#### 4.3.1. Reinigung aus Zell-Homogenat

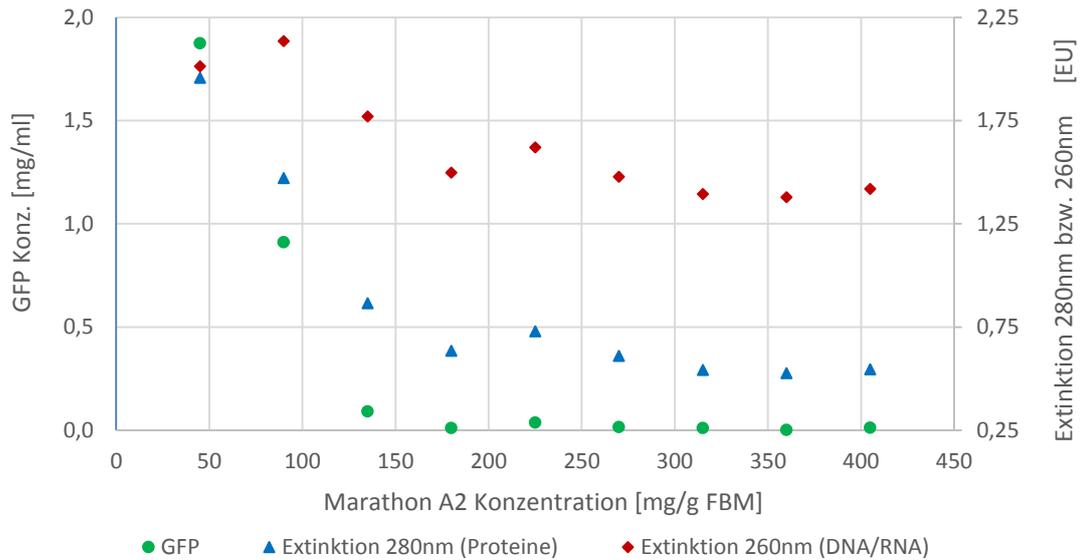
In diesem Abschnitt sind die ermittelten Daten, für das jeweils verwendete Flockulationssystem (ORS bzw. TRS), gesondert dargestellt.

##### 4.3.1.1. One Resin System (ORS)

In einem der ersten Versuche sollte abgeschätzt werden, welche Marathon A2 Mikropartikel (MP) Konzentration - bezogen auf die Feuchtbioasse (FBM) des aufgeschlossenen Zellsuspension - ausreichend ist, um das freigesetzte GFP zu adsorbieren (nach Aufschluss der Zellsuspensionen, siehe Kapitel 3.3.3.1 „Hochdruckhomogenisation“).

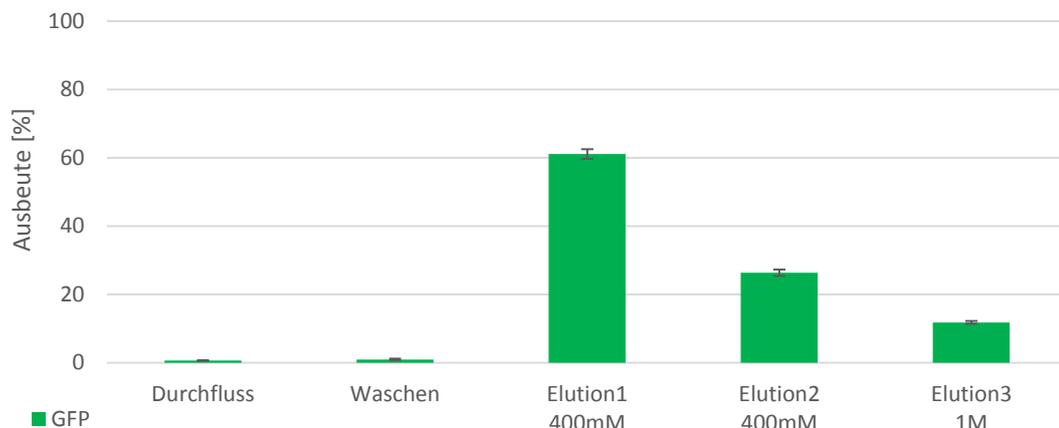
Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse dieses, im Zell-Homogenat durchgeführten, GFP Adsorptionsversuches. In grüner Farbe ist die im Überstand verbliebene GFP Konzentration (primäre vertikale Achse) bei ansteigender Marathon A2 Zugabe dargestellt. Für jede untersuchte Marathon A2 Konzentration sind zwei weitere Datenpunkte abgebildet, welche die Extinktion durch Verunreinigungen wiedergeben (sekundäre, vertikale Achse). Die durch Proteine hervorgerufen Extinktion (280nm) ist blau dargestellt. Nukleinsäuren wurden bei 260nm gemessen und sind in roter Farbe präsentiert.

Die Graphik zeigt, dass ab einer Marathon A2 Konzentration von ungefähr 140 mg/g Feuchtbioasse nahezu kein freies GFP mehr im Überstand vorhanden ist. Betrachtet man hingegen die Verläufe der Verunreinigungen, ist zu erkennen, dass diese ihre tiefsten Niveaus erst bei höheren Marathon A2 Konzentrationen erreichen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass eine Erhöhung der A2 Konzentration zusätzliche Verunreinigungen bindet, auch nachdem das gesamte GFP adsorbiert an den MP wurde.



**Abbildung 15:** Auswertung mehrerer Adsorptionsversuche für GFP, ECP und Nukleinsäuren. Im Überstand verbleibende GFP Konzentrationen (grün - primäre, vertikale Achse) beim Einsatz unterschiedliche Marathon A2 Konzentrationen. Für jede gemessene GFP-Konzentration sind zwei weitere Datenpunkte dargestellt: Extinktionswerte 280nm (blau - Proteine) bzw. 260nm (rot - Nukleinsäuren). Diese geben Auskunft über die im Überstand enthaltenen Verunreinigungen. Adsorptions-Puffer: Tris 50mM mit pH8,5; Biomassefeuchteanteil 15%; Versuchsmaßstab 2ml;

Mit dem Ziel, einerseits möglichst viel GFP und andererseits möglichst wenig Verunreinigungen an den Mikropartikel zu adsorbieren, wurde die Marathon A2 Konzentration für weitere Versuche auf 130 mg/g Feuchtbio-masse festgesetzt. Die GFP Ausbeuten eines Reinigungsversuches - unter Verwendung oben angeführter A2 Konzentration - sind in Abbildung 16 dargestellt. Bei der Durchführung wurde zunächst die Adsorption des GFPs an den A2 Mikropartikel angestrebt. Nach einem Waschschriff (50mM Tris, pH8) wurde das gebundene GFP, in mehreren Elutionsschritten wieder desorbiert. Absicht dieses ersten GFP Aufreinigungsversuches war es,

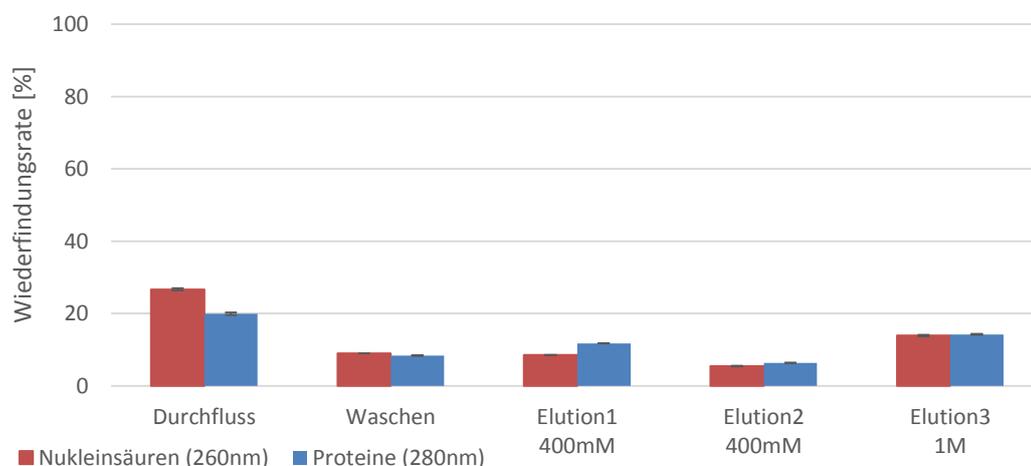


**Abbildung 16:** GFP Ausbeuten der GFP Aufreinigung aus dem Homogenat. Die GFP-Ausbeuten im Überstand (bezogen auf das Homogenat) sind für die einzelnen aufeinander folgenden Prozessschritte dargestellt. Die Adsorptionsphase wurde über ca. 5min erstreckt. Alle Prozessschritte wurden in 50mM Tris Puffer / initial pH8 durchgeführt. Biomassefeuchteanteil 20%; Versuchsmaßstab 2ml; 130mg A2/g Feuchtbio-masse; Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichungen, berechnet aus den Ergebnissen durchgeführter Mehrfach-ansätze (n=3). Konzentrationen der Elutionspuffer geben die NaCl Konz. an.

die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten der Firma BI zu reproduzieren. Ergebnisse vorangegangener Arbeiten siehe Literaturverzeichnis [35].

Der Überstand nach der Adsorptionsphase (Durchfluss) sowie der Waschpuffer waren nahezu frei von GFP (siehe Abbildung 16). Bezogen auf den Titer des Homogenats wurden ca. 60% des GFPs im ersten Eluat (400mM NaCl im Tris Puffer) wiedergefunden. Durch einen zweiten Elutionsschritt (gleicher Bedingung) konnten weitere 25% des GFPs, von den MP desorbiert werden. Ein nachfolgender dritter Elutionsschritt (400mM NaCl) lieferte etwas mehr als 10% des anfänglich im Homogenat enthaltenen GFPs.

Abbildung 17 zeigt die Wiederfindungsraten der einzelnen Prozessschritte, für Nukleinsäuren (RNA/DNA) und Proteine, bezogen auf die zuvor im Homogenat erfolgten Messungen (ohne Mikropartikel). Die dargestellten Ergebnisse stammen aus dem gleichen Versuch wie jene aus Abbildung 16. Es ist sehr gut zu erkennen, dass die beiden größten Anteile der Verunreinigungen (Nukleinsäuren/Proteinen) im Adsorptionsdurchfluss (> 20%) sowie im dritten Elutionsschritt (1M NaCl) zu finden sind. Der Rest der gemessenen Verunreinigungen teilt sich relativ gleichmäßig auf die verbleibenden drei Prozessschritte (Waschschrift; Elution 1 bzw. 2) auf.

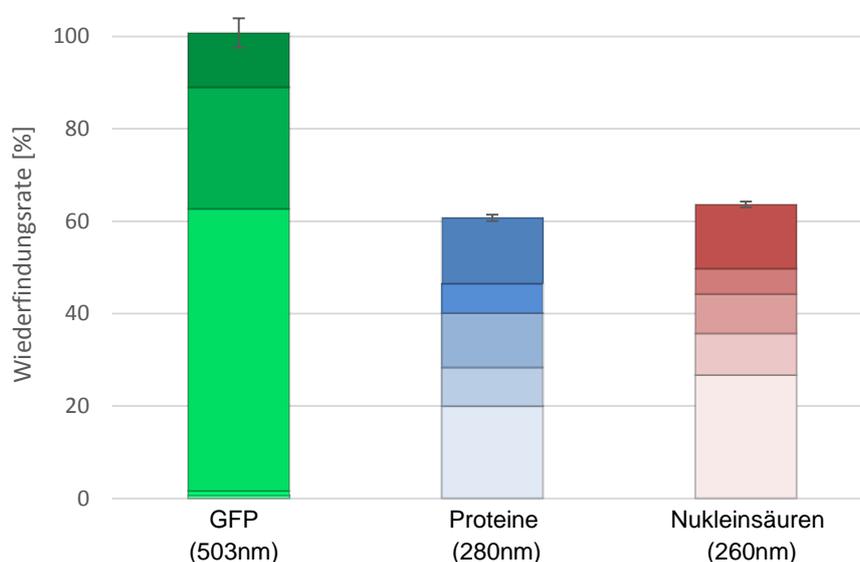


**Abbildung 17:** Balkendiagramm zur Wiederfindungsrate der Verunreinigung.

Prozentueller Anteil der Verunreinigungen (Proteine - blau / Nukleinsäuren - rot) im Überstand der einzelnen Prozessschritte, bezogen auf die Verunreinigungen entsprechender Zell-Homogenate. Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichungen, berechnet aus den Ergebnissen durchgeführter Mehrfachansätze (n=3). Die Konzentrationsangaben der Elutionspuffer 1 bis 3 geben die NaCl Konzentration an.

Für einen Reinigungsprozess, der als Produkt die beiden Eluate mit 400mM NaCl liefert, würden diese Resultate eine GFP Ausbeute von ca. 85%, bei einer Reduktion der Verunreinigungen (Proteine/DNA/RNA) von rund 80% bedeuten. Dies ist für einen ersten Aufreinigungsschritt ein sehr gutes Ergebnis.

Abbildung 18 gibt die Ergebnisse der beiden vorangestellten Abbildungen für den Gesamtprozess wieder. Die einzelnen Prozessschritte (Adsorbieren, Waschen, Eluieren 1 bis 3) sind innerhalb der drei Balken durch unterschiedliche Farbnuancen dargestellt (siehe Bildbeschreibung). Die Wiederfindungsrate des GFPs beträgt 100%, wohingegen die Wiederfindungsraten der Proteine bzw. der Nukleinsäuren bei ca. 60% liegen. Es konnte somit, durch Erhöhung der NaCl Konzentration auf 1M, das gesamte gebundene GFP wieder eluiert werden. Dennoch verblieb ein Anteil von 40% (der anfänglich im Homogenat anwesenden Verunreinigungen) an den Mikropartikeln adsorbiert. Betrachtet man ausschließlich die drei Elutionsschritte, so beträgt die Gesamtausbeute des GFPs weiterhin ca. 100%. Die Wiederfindungsraten der Verunreinigungen kommen in diesem Fall jedoch nur mehr auf knapp 35%.



**Abbildung 18:** Wiederfindungsraten nach dem GFP Aufreinigungsversuch aus dem Homogenat. Wiederfindungsrate von GFP, sonstigen Proteinen und Nukleinsäuren im Überstand, betrachtet für den kompletten Prozess (Adsorption bis Elution3). Innerhalb der Balken sind die Prozessschritte durch unterschiedliche Farbnuancen dargestellt, die Adsorptionsphase ist von unten gesehen (hellster Teilbereich) als erste dargestellt, ganz oben ist der dritte Elutionsschritt abgebildet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichungen, berechnet aus Ergebnissen durchgeführter Mehrfachansätze (n=3).

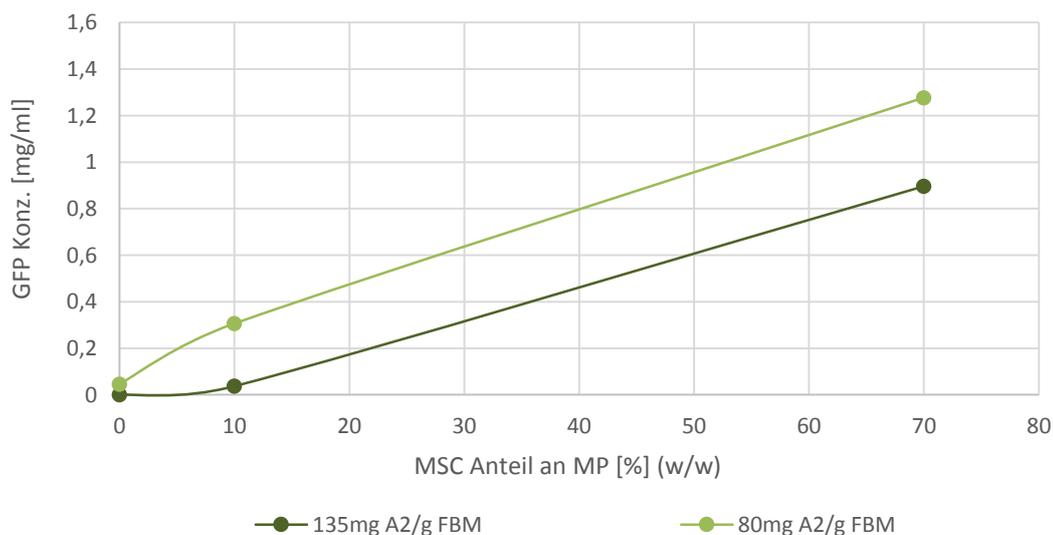
Die Ergebnisse früherer GFP Adsorptionsversuche bzw. Desorptionsversuche (Ausbeute; Reinheit) [35] - unter Verwendung der Marathon A2 Mikropartikel - konnten somit reproduziert werden.

#### 4.3.1.2. Two Resin System (TRS)

Im vorliegenden Abschnitt sind die Resultate jener Experimente angeführt, welche unter Verwendung eines „Two Resin Systems“ (TRS) durchgeführt wurden. Wie bereits unter den Ergebnissen der Flockengrößenuntersuchungen (siehe Kapitel 4.2.1) erwähnt, stellt die Etablierung eines TRS eine potentielle Lösung der festgestellten Schwierigkeiten eines

Filtrationsprozesses (siehe auch Diplomarbeit T. Schneider [35]) unter Elutionsbedingungen (50mM Tris; 400mM NaCl) dar.

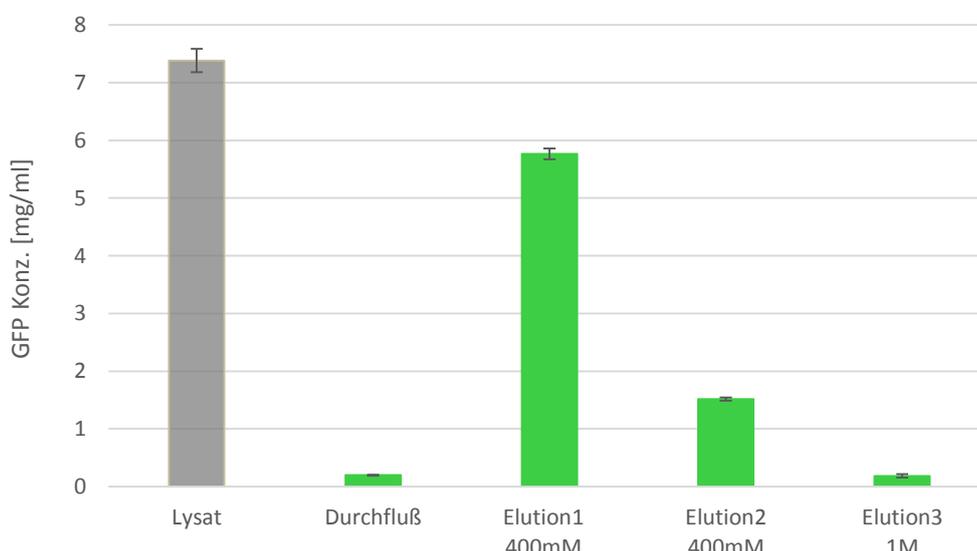
Abbildung 19 zeigt die Auswirkung einer MSC Zugabe auf die Konzentration der freien (desorbierten) GFP im Überstand. Vor der Mikropartikelzugabe wurde im Homogenat eine GFP Konzentration von ca. 7,5 mg/ml bestimmt. In der Abbildung ist gut zu erkennen, dass bei diesem Adsorptionsversuch eine Marathon A2 Konzentration von 80 mg/g Feuchtbio­masse (FBM) ausreichend war, um nahezu das gesamte im Homogenat vorhandene GFP zu binden – sofern Marathon MSC abwesend war. Bei der Verwendung eines TRS, mit 10% MSC (w/w) Trockenanteil der MPs und einer A2 Konzentration von 135 mg/g FBM, wurde annähernd das gleiche Ergebnis erzielt wie zuvor mit 80 mg A2/g FBM, unter Anwendung eines ORS (0% MSC). Für den Ansatz mit 10% MSC (w/w) und einer A2 Konzentration von 80 mg/g FBM kann bereits ein deutlicher Anstieg der GFP-Konzentration im Überstand festgestellt werden (auf > 0,3 mg/ml). Wird der MSC Trockenanteil (w/w) auf 70% der Mikropartikel erhöht, dann steigen die GFP-Konzentrationen im Überstand weiter an und erreichen eine GFP-Konzentration von bis zu 1,3 mg/ml.



**Abbildung 19:** Auswirkung einer MSC Zugabe auf die GFP Bindungskapazität der A2 Mikropartikel. GFP-Konzentration im Überstand nach der Adsorptionsphase (~5min). Es wurden zwei verschiedene Marathon A2 Konzentrationen getestet. Für beide Konzentrationen wurden jeweils ein Datenpunkt mit dem ORS (0%MSC) und zwei Datenpunkte unter Verwendung eines TRS generiert (10 bzw. 70%). Adsorptionspuffer: Tris 50mM mit pH8; Biomassefeuchtanteil 20%; Versuchsmaßstab 2ml;

Anhand der Abbildung ist die Konkurrenz um die Marathon A2 Bindungsplätze, zwischen GFP und Marathon MSC, gut zu erkennen. Die Resultate zeigen, dass bei der Anwendung eines TRS die Marathon A2 Konzentration - bereits bei geringen Marathon MSC Zugaben (10% MP-Trockenanteil) – stark erhöht werden müssen, um weiterhin das gesamte GFP des Homogenats zu adsorbieren (bei 10% MSC von ca. 80mg A2/g FBM auf ca. 135 mg A2/FBM).

Mit Hilfe dieser Informationen und der Daten aus den Experimenten zur Flockulation, (siehe Abschnitt 4.2.1) wurde für einen GFP Aufreinigungsversuch, eine A2 Konzentration von 160 mg/g FBM und ein MSC MP-Trockenanteil von 20% gewählt. Hierbei wurde berücksichtigt, dass der Feststoffgehalt - für etwaige Filtrationsprozesse - möglichst gering gehalten werden sollte. Die Ergebnisse der Flockengrößen Messungen haben bereits gezeigt, dass die Flockengrößen durch Anwendung des TRS erheblich gesteigert werden können (auch unter Elutionsbedingungen). Der GFP Aufreinigungsversuch sollte Auskunft darüber geben, welche GFP Ausbeuten bzw. Wiederfindungsraten, mit einem derartigem Aufreinigungsversuch (TRS) erreicht werden konnten. Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt. Die GFP-Konzentrationen sowohl im Homogenat ohne MPs (grau), als auch im Überstand der aufeinanderfolgenden Prozessschritte (grün) sind in Abbildung 20 abgebildet. Das eingesetzte Zell-Homogenat hatte eine GFP Konzentration von ca. 7,5 mg/ml. Im Durchfluss und auch im letzten Elutionsschritt (1M NaCl) wurden nur sehr geringe GFP Konzentrationen gefunden (<0,25 mg/ml). Im ersten Elutionsschritt (400mM) zeigt die Abbildung eine Konzentration von ca. 5,8 mg GFP/ml. Im darauffolgenden zweiten Elutionsschritt betrug die Konzentration 1,5 mg GFP/ml, wodurch sich eine Gesamtwiederfindungsrate des GFPs von 100% für den Prozess ergibt. Betrachtet man nur die beiden ersten Elutionsschritte (400mM NaCl) als das Produkt des Prozesses, so ergibt sich eine Ausbeute von 97% für den Prozess.



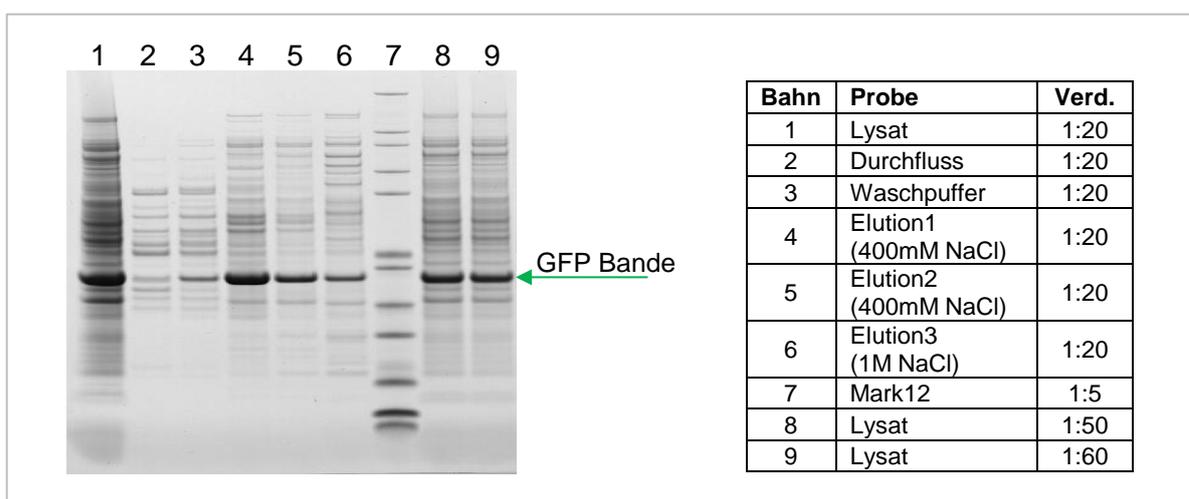
**Abbildung 20:** GFP Konzentrationen des Lysates und versch. Produktlösungen.

Experiment zur Bestimmung der GFP-Wiederfindungsrate unter Verwendung eines TRS (20% MSC). Die Balken zeigen die GFP-Konzentrationen des Lysates (grau) bzw. der Überstände aufeinanderfolgenden Prozessschritten (grün). Alle Prozessschritte wurden in 50mM Tris Puffer / pH8 durchgeführt. Marathon A2 Konzentration: 160mg/g Feuchtbioasse; Biomassefeuchtanteil 20%; Versuchsmaßstab 200ml. Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichungen aus den Mehrfachansätze (n=2).

Durch diese Resultate wird gezeigt, dass auch unter Anwendung eines „Two Resin Systems“ GFP Ausbeuten nahe 100% erreicht werden können. Die Reinheit des GFPs in den erhaltenen

Elutionen (bezogen auf die Gesamtproteine darin) wurde mit Hilfe von SDS PAGE bestimmt. Abbildung 21 zeigt das Gel der entsprechenden elektrophoretischen Analyse. Auf den Bahnen des Gels wurden dieselben Überstände aufgetragen, welche bereits in Abbildung 20 dargestellt sind. Die erste und die beiden letzten Gel-Bahnen zeigen den Überstand des geklärten Homogenats, in jeweils unterschiedlicher Verdünnung. Es ist gut zu sehen, dass die GFP Bande auch im Homogenat die dominante Bande ist. Mit Hilfe der Bahnen 8 und 9 wurde eine GFP Reinheit (bezogen auf Fremdproteine) von ca. 30% bestimmt. Der Verdünnungsfaktor der ersten 6 Gel-Bahnen (Homogenat/Durchfluss/Waschpuffer/Elution 1 - 3) war 20. Auf den Bahnen 2 und 3 sind nur geringe GFP Mengen zusammen mit ECP zu sehen. Wie bereits oben zur Abbildung 20 festgestellt wurde, war der größte GFP-Anteil im ersten Eluat (Bahn 4) zu finden. Das GFP im ersten sowie im zweiten Eluat hatte eine Reinheit von ca. 55%, bezogen auf die Gesamtproteine. Im dritten und letzten Elutionsschritt (1m NaCl) ist wieder relativ wenig GFP enthalten (Bahn 6) und abermals erscheinen mehrere Proteinbanden am Elektrophorese Gel.

Die Versuche mit dem TRS haben gezeigt, dass die erreichten GFP Ausbeuten bzw. Reinheiten, jenen aus Versuchen mittels ORS vergleichbar sind. Trotz dieser positiven Resultate und dem Nachweis gesteigerter Flockengrößen, durch Etablierung eines TRS (siehe 3.3.5 „Flockengrößenuntersuchungen und Sedimentation“), wurden keine Filtrationsversuche mit dem Homogenat durchgeführt. Dies lag daran, dass während der praktischen Arbeiten der Fokus stark auf die Weiterentwicklung eines geeigneten Extraktionsprozess gelegt wurde (siehe Kapitel 4.3.2.1 „Optimierung Extraktionsprozess“).



**Abbildung 21:** Scan eines SDS Gels zur Analyse versch. Produktlösungen eines GFP Aufreinigungsversuches. Elektrophorese Gel auf dem die Überstände der aufeinander folgenden Prozessschritte eines TRS, sowie Proben des Zellaufschlusses und ein Größenmarker aufgetragen wurden. Es wurde eine Marathon A2 Konzentration von 160mg/g FBM eingesetzt. 20% der eingesetzten MP-Trockenmasse waren Marathon MSC. Alle Prozessschritte wurden in 50mM Tris Puffer bei einem Start pH-Wert von 8 durchgeführt (zusätzliche NaCl Zugabe für die Elutionsschritte). Versuchsmaßstab: 40ml; das Auftragschema ist der zugehörigen Tabelle zu entnehmen.

### 4.3.2. Mikropartikel Zell Extraktion (MPZE)

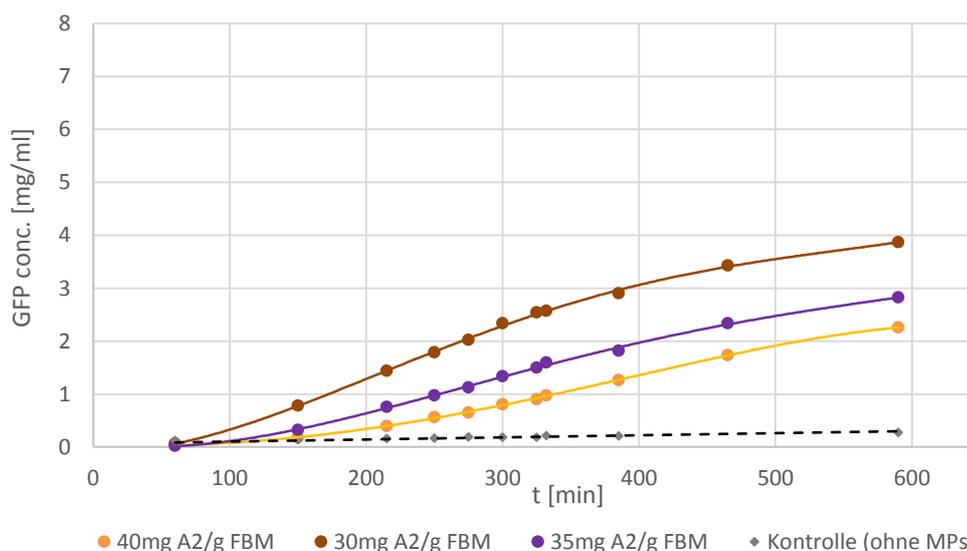
In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse unterschiedlicher Extraktionsversuche angeführt. Hierbei wird sowohl auf die GFP Konzentrationen der Extrakte, als auch auf die Verunreinigungen durch E.coli Proteine (ECP) bzw. Nukleinsäuren eingegangen. Anschließend werden die Resultate der durchgeführten Filtrationsversuche besprochen.

#### 4.3.2.1. Optimierung Extraktionsprozess

Um die wichtigsten Parameter einer Mikropartikel-induzierten Extraktion und die erreichbaren GFP Ausbeuten und Reinheiten festzustellen, wurden Extraktionsversuche unter verschiedensten Bedingungen durchgeführt. Variiert wurden dabei, unter anderem die Marathon A2 Konzentration, der Biomassefeuchteanteil (BFA) der verwendeten Zellsuspension oder der pH Wert des eingesetzten Tris Extraktionspuffers. Da ein Elutionsschritt vermieden werden sollte (siehe Kapitel 2, „Zielsetzung“).

war bei den Extraktionsversuchen stets das Ziel, so viel GFP wie möglich aus den Zellen in den Überstand zu überführen, dabei aber nur einen minimalen Anteil des GFPs an den MP zu adsorbieren.

In einem ersten Extraktionsexperiment wurden drei unterschiedliche Marathon A2 Konzentrationen eingesetzt (Abbildung 22). Ein Kontrollansatz (Zellsuspension ohne A2) wurde über die gesamte Extraktionsdauer (ca. 10h) mitgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in



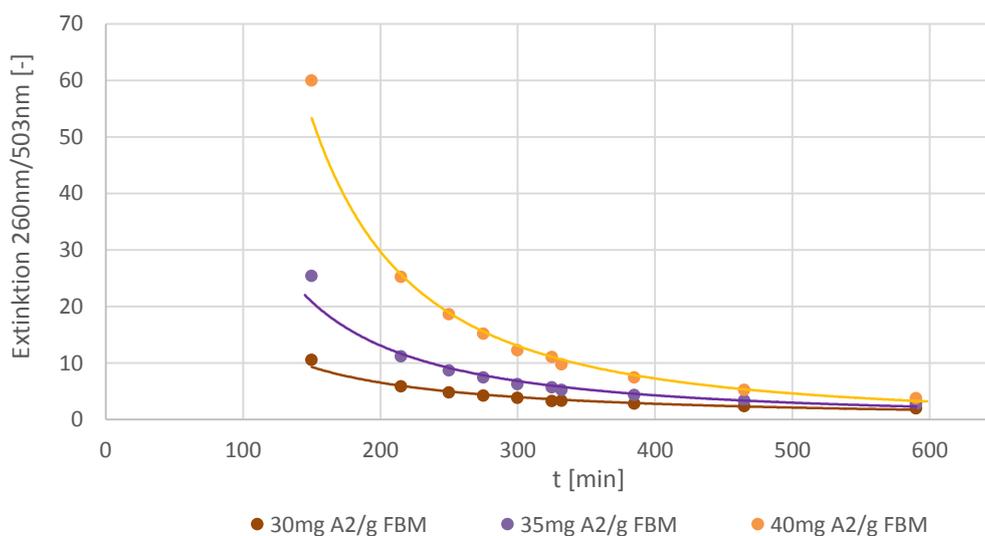
**Abbildung 22:** Zunahme der GFP-Konzentration im Überstand mit fortschreitender Extraktionszeit. Dargestellt sind die Verläufe unter Verwendung dreier unterschiedlicher Marathon A2 Konzentrationen, sowie eines Kontrollansatzes (Zellsuspension ohne Mikropartikel). Die Extraktion wurde in 50mM Tris Puffer mit einem Start pH von 8,5 und einem Biomassefeuchteanteil (BFA) von 30% durchgeführt. Versuchsmaßstab: 40ml.

Abbildung 22 in grauer Farbe abgebildet. Auch nach beinahe 10h ist kein nennenswerter Anstieg der GFP Konzentration im Kontrollansatz zu verzeichnen.

Bei Betrachtung der Ansätze mit Marathon A2 ist hingegen eine deutliche Zunahme der GFP Konzentrationen zu erkennen. Der Extraktionsansatz mit der geringsten Marathon A2 Konzentration (30 mg/g Feuchtbioasse) zeigt - mit ca. 4 mg/ml - die höchsten GFP Konzentrationen im Überstand. Anhand des Kurvenverlaufs dieses Ansatzes (braun) kann ein Abflachen der Extraktionskurve wahrgenommen werden, vollständig beendet scheint nach ca. 10h jedoch keiner der drei dargestellten Extraktionsvorgänge gewesen zu sein.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei den Ansätzen mit 35 bzw. 40 mg A2/g FBM mehr GFP an den Mikropartikeln adsorbiert wurden. Durch die Mitführung eines Kontrollansatzes konnte gezeigt werden, dass der GFP Konzentrationsanstieg in den Extrakten nicht durch spontane Lyse der Bakterienzellen zu erklären ist. Somit konnte die Mikropartikel induzierte Extraktion des GFP (aus gramnegativen Bakterienzellen) in diesem Extraktionsversuch gezeigt werden.

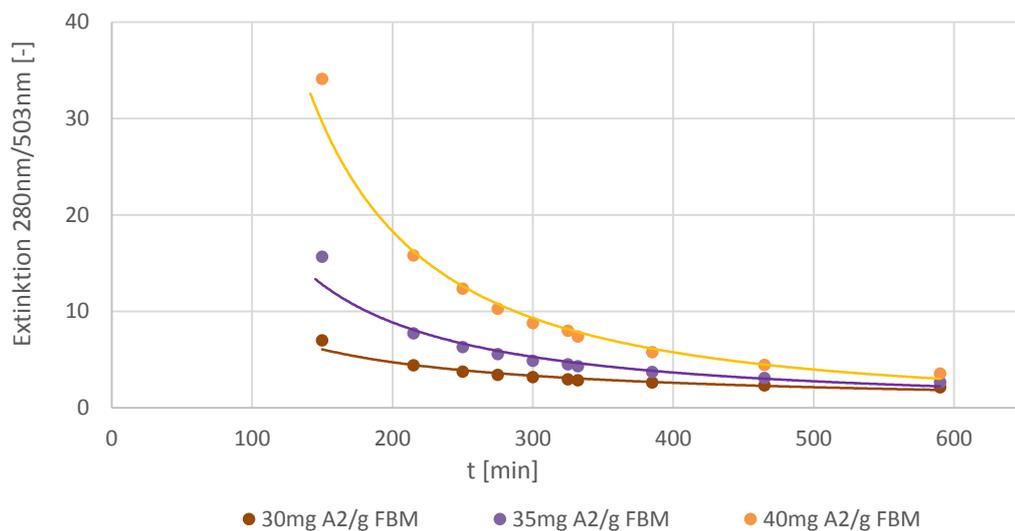
In Abbildung 23 sind Verläufe von Nukleinsäure-Verunreinigungen, bezogen auf die GFP Konzentration im Extrakt, dargestellt. Es werden die gleichen drei Versuchsansätze wie bereits in Abbildung 22 verglichen. Die Verunreinigungen der drei Ansätze sind als „Extinktion<sub>260nm</sub> (Nukleinsäure) / Extinktion<sub>503nm</sub> (GFP)“, dargestellt und haben - trotz anfänglich großer Differenzen - nach ca. 10h nur mehr vernachlässigbare Differenzen. Über die gesamte Extraktionsdauer zeigt der Ansatz mit 30mg A2/g FBM, zu jedem Zeitpunkt die geringsten Nukleinsäure-Verunreinigungen (bezogen auf die GFP Konzentration).



**Abbildung 23:** Zeitliche Verläufe der Nukleinsäure-Verunreinigungen während der GFP Extraktion. Dargestellt sind die Verunreinigungen als Extinktion<sub>260nm</sub>/Extinktion<sub>503nm</sub> (Nukleinsäure/GFP). Drei Extraktionsansätze unterschiedlicher Marathon A2 Konzentrationen sind abgebildet. Die Extraktion wurde in 50mM Tris Puffer mit einem Start pH von 8,5 und 30% Biomassefeuchtanteil durchgeführt. Versuchsmaßstab: 40ml.

Der Grad der GFP Nukleinsäure-Verunreinigung nimmt somit über die Dauer des gesamten Extraktionsprozess ab und trotz unterschiedlicher GFP Konzentrationen am Ende der Extraktion (siehe Abbildung 22), sind die Unterschiede (der entsprechenden Zeitpunkte) vernachlässigbar.

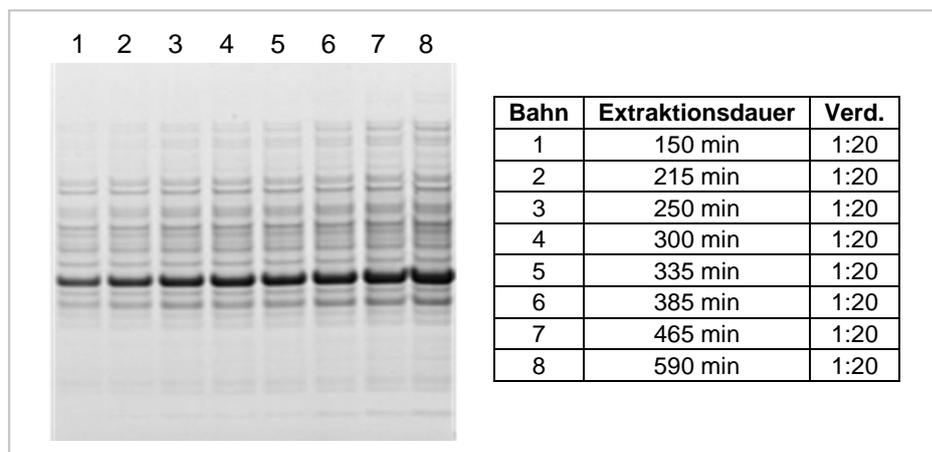
Neben den Verunreinigungen durch Nukleinsäuren wurden auch jene durch E.coli Proteine (ECP) untersucht. In Abbildung 24 sind die Protein-Verunreinigungen, auf die GFP Konzentration bezogen, dargestellt ( $\text{Extinktion}_{280\text{nm}}/\text{Extinktion}_{503\text{nm}}$ ). Die abgebildeten Ansätze sind wieder die gleichen wie bereits in den beiden vorangegangenen Abbildungen und die entsprechenden Verläufe der Protein-Verunreinigungen sind jenen der in Abbildung 23 dargestellten sehr ähnlich. Während des gesamten Extraktionsprozesses hatte der Ansatz mit 30mg A2/g FBM die geringste Protein-Verunreinigung. Nach ca. 10h sind die Unterschiede zwischen den Protein-Verunreinigungen der einzelnen Ansätze sind jedoch vernachlässigbar.



**Abbildung 24:** Zeitliche Verläufe der Protein-Verunreinigungen während der GFP Extraktion. Dargestellt ist die Protein-Verunreinigung als  $\text{Extinktion}_{280\text{nm}}/\text{Extinktion}_{503\text{nm}}$  (Proteine/GFP). Drei Extraktionsansätze unterschiedlicher Marathon A2 Konzentrationen sind abgebildet. Die Extraktion wurde in 50mM Tris Puffer mit einem Start pH von 8,5 und 30% Biomassefeuchteanteil durchgeführt. Versuchsmaßstab: 40ml.

Um die Änderung unterschiedlichster Proteinkonzentrationen (GFP und ECP) im Überstand des Ansatzes mit 30mg A2/g FBM besser darzustellen, wurde das in Abbildung 25 gezeigte Elektrophorese Gel angefertigt. Zu sehen sind die Proteine der Überstände aus unterschiedlichen Zeitpunkten der Extraktionsphase (siehe der Abbildung 25 zugehörige Tabelle). Auf jeder einzelnen Gelbahn (1-8) ist die Proteinbande des GFPs die am stärksten ausgeprägte. Das Gel zeigt die starke Zunahme des GFPs im Überstand mit fortschreitender Extraktionsdauer. Auch die Zunahme der ECPs kann deutlich wahrgenommen werden, wobei die Intensität einiger Proteinbanden stärker zunimmt als andere. Die Banden im oberen Drittel des Bildes nehmen zum Beispiel stärker an Intensität zu, als jene im unteren Drittel des Bildes. In den Überständen

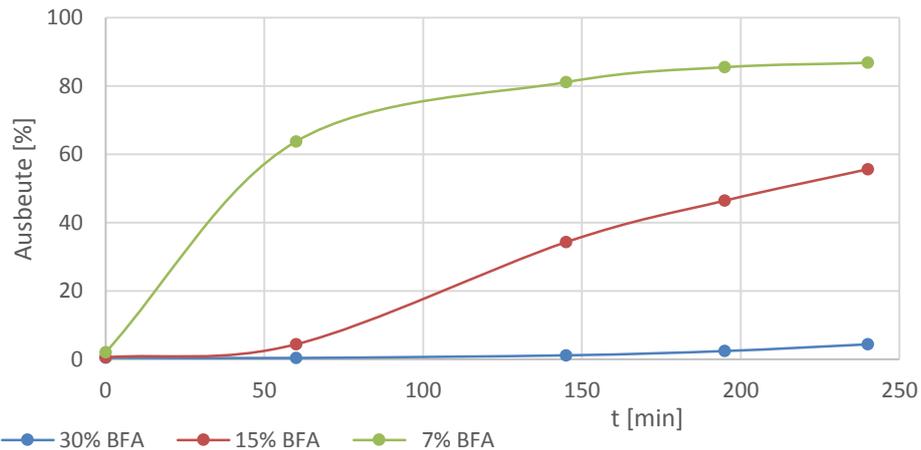
wurden durchwegs GFP Reinheiten (bezogen auf vorhandene Proteine) über 60% bestimmt. Nach ca. 10h Extraktionsdauer (Gel Bahn 8) wurde eine GFP Reinheit von ca. 65% im Extrakt gefunden.



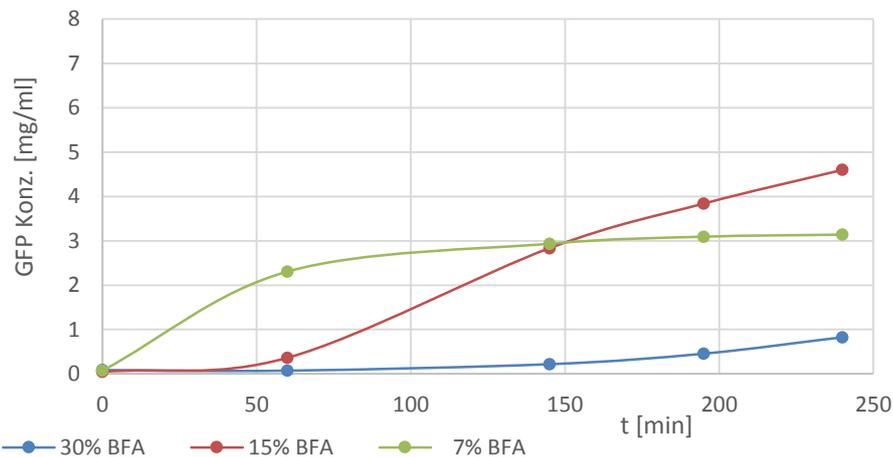
**Abbildung 25:** Elektrophorese Gel der Überstandsproben mit fortschreitender Extraktionsdauer. Extraktion wurde in 50mM Tris Puffer mit einem Start pH von 8,5 und 30% Biomassefeuchtanteil durchgeführt. Marathon A2 Konzentration: 30 mg/g Feuchtbioasse. Versuchsmaßstab: 40ml.

Für die Entwicklung eines effizienten und wirtschaftlichen Extraktionsprozesses müssen die zu bearbeitenden Volumina möglichst klein gehalten werden. Aus diesem Grund wurden Extraktionsvorgänge auf den Einfluss der eingesetzten Suspensions-Zelldichte geprüft.

Abbildung 27 und Abbildung 26 stellen die Ergebnisse dreier Extraktionsversuche mit unterschiedlichen Biomassefeuchtanteilen (BFA) dar. Die beiden Graphiken zeigen die selben Messpunkte, wobei die vertikale Achse einmal die GFP-Ausbeute [%] (Abbildung 27) und das andere Mal die GFP-Konzentration [mg/ml] (Abbildung 26) wiedergibt. In beiden Darstellungen ist jener Ansatz mit der höchsten Zelldichte, 30% Biomassefeuchtanteil (BFA), in blauer Farbe abgebildet. Die roten Verläufe beschreiben den Extraktionsversuch bei 15% BFA und die grünen Verläufe den Versuch mit 7% BFA. Abbildung 27 zeigt sehr deutlich, dass die GFP Ausbeuten der Extraktionen (nach ca. 4h), mit Anstieg der verwendeten Zelldichte (BFA), abnehmen. Während der Ansatz mit 7% BFA eine GFP Ausbeute von über 80% lieferte, wurde im Ansatz mit 30% BFA eine Ausbeute von weniger als 10% gefunden. Der Ansatz mit 15% BFA reiht sich mit annähernd 60% GFP Ausbeute zwischen den beiden anderen Ergebnissen ein.



**Abbildung 27:** Zunahme der GFP Ausbeute im Überstand während der Extraktionsphase. Es wurden Extraktionen mit drei verschiedenen Zelldichten durchgeführt (Biomassefeuchtanteil 30% / 15% / 7%). Für jeden Ansatz wurden 35mg Marathon A2/ g FBM eingesetzt. Puffer: 50mM Tris / pH 8.0; Versuchsmaßstab 30ml;



**Abbildung 26:** GFP Konzentrationen im Überstand mit zunehmender Extraktionsdauer. Es wurden Extraktionen mit drei verschiedenen Zelldichten durchgeführt (Biomassefeuchtanteil 30% / 15% / 7%). Für jeden Ansatz wurden 35mg Marathon A2/ g FBM eingesetzt. Puffer: 50mM Tris / pH 8.0; Versuchsmaßstab 30ml;

In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass der Ansatz mit 15% BFA im Überstand die höchste GFP Konzentration (> 4,5 mg/ml) nach 4h Extraktionsdauer hatte. Der entsprechende Kurvenverlauf des Ansatzes lässt auf einen weiteren Anstieg der GFP Konzentration, im nicht erfassten Zeitraum über 240 Minuten Extraktionsdauer, schließen. Die GFP Konzentrationen im Extraktionsansatz mit 30% BFA steigen nur minimal, jedoch in zunehmenden Maße. Durch den Kurvenverlauf entsteht der Eindruck, als würde nach 150 Minuten der Extraktionsvorgang dieses Ansatzes gerade erst beginnen. Zu diesem Zeitpunkt hat der Ansatz mit 7% BFA (Abbildung 26) bereits ein Plateau bei zirka 3 mg GFP/ml erreicht.

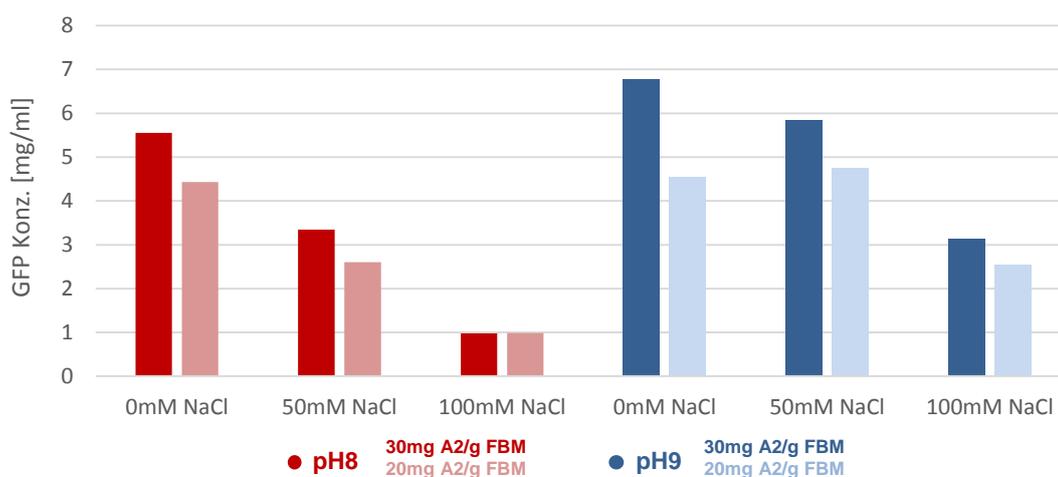
Die Resultate zeigen eine deutliche Abnahme der GFP Ausbeuten, bei zunehmenden Zelldichten. Für die beiden Ansätze höherer Zelldichte (30 bzw. 15% BFA) war eine Extraktionsdauer von 4 nicht ausreichend um die Extraktion abzuschließen. Auf Grund von Lag-Phasen, welche mit

zunehmender Zelldichte anscheinend ausgedehnt werden, konnte somit keine maximale Ausbeute für die beiden Ansätze bestimmt werden.

Nach Rücksprache mit Prozessingenieuren der Firma Boehringer Ingelheim RCV wurde das untere Limit der Zelldichte - für einen relevanten Extraktionsprozess - auf 20% BFA festgesetzt, um die nötigen Volumina einzugrenzen.

Die Ergebnisse eines weiteren Extraktionsexperiments sind in Abbildung 28 wiedergegeben. In der Abbildung sind die, nach ca. 20 stündiger Extraktionsphase, erreichten GFP Konzentrationen für unterschiedliche Bedingungen (Start pH/A2 MP Konz./NaCl Konz.) dargestellt. Ansätze die unter Verwendung eines Tris Puffers mit pH8 durchgeführt wurden sind in roter Farbe abgebildet, jene die unter Verwendung eines Puffers mit pH9 ausgeführt wurden in blauer Farbe. Für beide Bedingungen wurden Ansätze unterschiedlicher Marathon A2 Konzentrationen untersucht (30 mg/g Feuchtbioasse bzw. 20 mg/g Feuchtbioasse). Außerdem wurde im Zuge des durchgeführten Experiments, neben den Auswirkungen des Start pH-Wertes und der Mikropartikel Konzentration auf die GFP Extraktion, auch die Beeinflussung des Extraktionsansatzes durch Anwesenheit von NaCl in unterschiedlichen Ausmaß (50mM bzw. 100mM) untersucht.

Betrachtet man die Daten unterschiedlicher Start pH-Werte gesondert, erkennt man eine generelle Abnahme der GFP-Konzentration im Extrakt bei ansteigende NaCl Konzentrationen. Des Weiteren fällt auf, dass in den Ansätzen mit 20mg A2/g Feuchtbioasse (FBM), unter jeder Bedingung, niedrigere GFP-Konzentrationen gemessen wurden als in den Ansätzen mit 30mg A2/g Feuchtbioasse. Vergleicht man die Resultate unterschiedlicher Start pH-Werte untereinander, so ist gut zu sehen, dass die Extraktion bei pH9 deutlich höhere GFP Konzentrationen im Überstand lieferte.



**Abbildung 28:** GFP Konzentrationen im Überstand nach ca. 20h Extraktion.

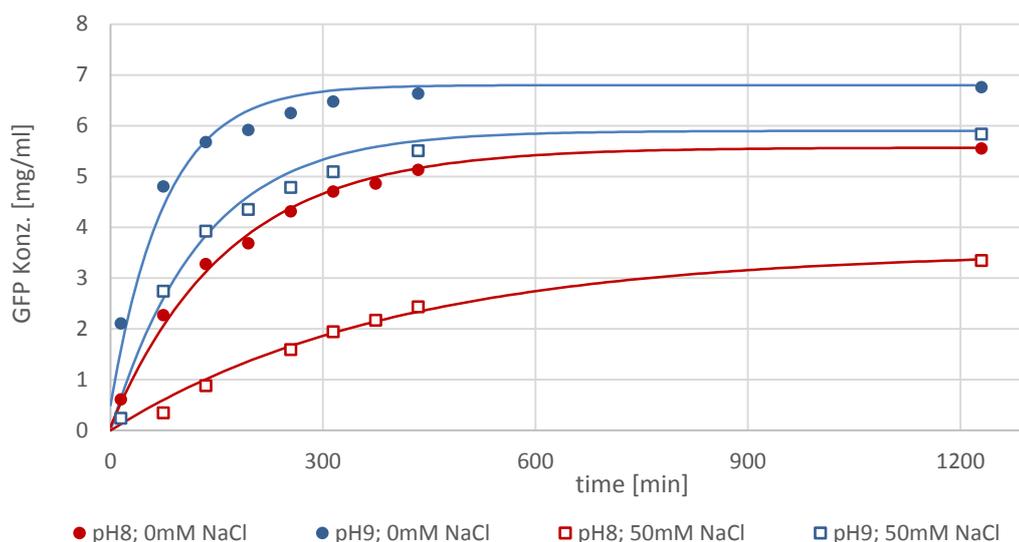
Dargestellt sind die Ergebnisse von Experimenten mit unterschiedlicher Extraktionspuffern (NaCl Konz. bzw. pH-Wert) sowie Marathon A2 Konzentrationen (30 bzw. 20mg A2/g FBM). Für alle Ansätze wurde ein 50mM Tris Puffer verwendet. Biomassefeucht-anteil (BFA) 20%; Versuchsmaßstab 30ml;

In Abbildung 29 sind die GFP Konzentration über die Zeit, für vier der eben besprochenen Versuchsansätze, abgebildet (alle mit 30mg A2/g FBM). Zur Darstellung der Daten wurde eine Kurvenanpassung, basierend auf den Verlauf einer exponentiellen Reaktion erster Ordnung:

$$GFP_{Extrakt} = GFP_{t_0} + c_{max} * (1 - e^{-k*t}) \quad (\text{Formel 17})$$

$GFP_{Extrakt}$ ... GFP Konz. im Extrakt zum Zeitpunkt t [mg/ml];  $GFP_{t_0}$ ... GFP Konz. im Extrakt zum Zeitpunkt t = 0 [mg/ml];  $c_{max}$ ...maximale erreichte GFP Konzentration im Extrakt [mg/ml]; t...beliebiger Zeitpunkt [min];  $t_0$ ...Zeitpunkt des Extraktionsstartes [min]; k...kinetische Konstante der exponentiellen Reaktion erster Ordnung [ $\text{min}^{-1}$ ];

Die kinetische Konstante k ist die Geschwindigkeitskonstante des Extraktionsvorganges. Es sei hier darauf hingewiesen, dass im weiteren Verlauf dieses Kapitels die dargestellten Konzentrationsverläufe (über die Zeit) alle mit derselben Funktion und unter gleicher Vorgehensweise erstellt wurden. Dabei wurden die kinetische Konstante und die maximal erreichte Konzentration variiert um die Residualabweichungen zu minimieren.



**Abbildung 29:** Zunehmende GFP Konzentrationen während der Extraktion.

Für die beiden abgebildeten Start pH-Werte (8 bzw. 9) sind jeweils zwei Verläufe dargestellt: einer für die Extraktion ohne NaCl Zugabe und ein zweiter Verlauf, welcher die Extraktion mit 50mM NaCl im Tris Puffer wiedergibt. Alle Ansätze wurden mit 30mg A2/g FBM in 50mM Tris Puffer, bei 20% BFA hergestellt. Versuchsmaßstab 30ml; Die Kurvenanpassungen erfolgten basierend auf einer exponentiellen Reaktion erster Ordnung (siehe Text).

Die Verläufe, der unter pH8 durchgeführten Versuche, zeigen deutlich größere Konzentrationsabweichungen voneinander als jene, welche unter pH9 durchgeführt wurden. In der Darstellung ist zu sehen, dass der Extraktionsverlauf bei pH9 und Abwesenheit von NaCl (0mM) die größte Steigung ( $k = 12 * 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) und zu jedem Zeitpunkt die höchste GFP Konzentration zeigt ( $c_{max} = 6,8\text{mg GFP/ml}$ ). Nach ca. 6h war der Extraktionsvorgang dieses Ansatzes beendet. Der Verlauf des Ansatzes bei pH9 mit 50mM NaCl im Extraktionspuffer zeigt einen ähnlichen Extraktionsverlauf ( $k = 8 * 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $c_{max} = 6\text{mg/ml}$ ) wie jener Ansatz bei pH8 ohne NaCl ( $k = 6 * 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $c_{max} = 5,6\text{mg/ml}$ ). Im vierte Extraktionsansatz (pH8 mit 50mM NaCl)

---

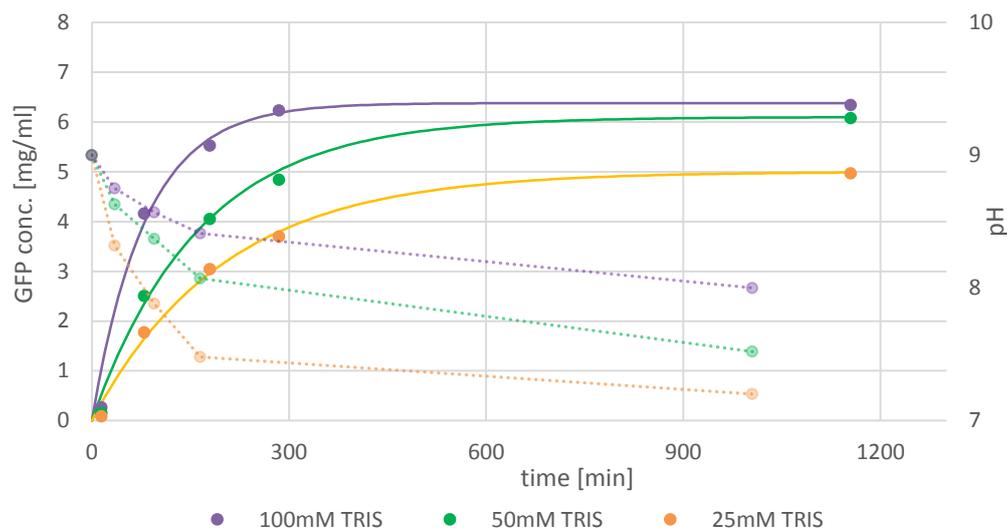
wurden deutlich niedrigere GFP Konzentrationen gemessen ( $c_{\max} = 3,5 \text{ mg GFP/ml}$ ) und auch die kinetische Extraktions-Konstante liegt mit  $k = 3 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  unter den Werten der drei anderen Ansätze.

Die Resultate dieser Extraktionsexperimente zeigen eindeutig negative Auswirkungen auf die GFP Extraktion, bedingt durch eine Steigerung der NaCl Konzentration im Extraktionspuffer. Es wurden eine Abnahme, sowohl der extrahierten GFP Mengen, als auch der kinetischen Konstanten der Extraktionsprozesse beobachtet. Ein deutlicher Anstieg der extrahierten GFP Menge - von maximal 5,6 mg/ml auf Werte bis zu 6,8 mg/ml - konnte durch die Erhöhung des Start pH-Wertes von pH8 auf pH9 erreicht werden. Die Ansätze mit einer Marathon A2 Konzentration von 20 mg/g FBM lieferten durchwegs niedrigere GFP-Konzentrationen im Extrakt, als jene Ansätze mit 30 mg A2/g FBM. Diese Resultate wurden bei der Planung weiterer Experimente berücksichtigt.

Bei einem weiteren Versuch wurde der pH-Wert unterschiedlicher Extraktionsansätze über die Zeit erfasst. Abbildung 30 zeigt die Messdaten dreier Extraktionsversuche unterschiedlicher Pufferstärken (25mM / 50mM / 100mM Tris). Für die Darstellung der Daten wurde eine Kurvenanpassung, basierend auf dem Verlauf einer exponentiellen Reaktion erster Ordnung, verwendet (siehe oben, Text zu Abbildung 29).

Neben den GFP Konzentrationen im Überstand (volle Linien – primäre vertikale Achse) sind in der Abbildung auch die pH-Wert Verläufe der entsprechenden Ansätze (gestrichelte Linien – sekundäre vertikale Achse) abgebildet. Die Extraktion wurde über mehr als 18h erstreckt und der Start pH-Wert jedes Ansatzes wurde auf pH9 eingestellt (einzige Nachstellung des pH-Wertes). Die Ergebnisse zeigen, dass im Zuge der Extraktion die pH-Werte aller Ansätze zumindest auf einen pH-Wert unter 8 fallen. Eine Abhängigkeit der pH-Wert Abnahme von der Pufferstärke kann, wie erwartet, eindeutig erkannt werden. Mit sinkender Tris Konzentration nimmt der pH Abfall zu. Betrachtet man den Verlauf der GFP-Konzentrationen ist zu sehen, dass jener Ansatz mit dem geringsten pH-Abfall (100mM Tris) die höchsten GFP-Konzentrationen ( $c_{\max} = 6,4 \text{ mg GFP/ml}$ ) erreichte. Der Ansatz mit dem ausgeprägtesten pH-Wert Abfall (25mM Tris) zeigt die niedrigsten GFP Konzentrationen ( $c_{\max} = 5,0 \text{ mg GFP/ml}$ ) der drei Ansätze. Auffällig ist, dass jener Ansatz mit 100mM Tris nicht nur die höchsten GFP Konzentrationen aufwies, sondern auch, dass der entsprechende Konzentrationsverlauf die größte kinetische Konstante der abgebildeten Verläufe hat ( $k = 12 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ). Aus diesem Grund ergab sich eine relativ kurze Zeit, welche zur Extraktion benötigt wurde (ca. 5h). Die Extraktionsvorgänge der anderen beiden Ansätze waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht beendet. Der abgebildete Verlauf des Ansatzes mit 50mM Tris Puffer hat eine kinetische Konstante von  $6 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , womit bei einem Vergleich mit dem 100mM Tris Ansatz eine Reduktion um 50% beobachtet wurde. Die kinetische Konstante des dritten

dargestellten Konzentrationsverlaufes (25mM Tris) hat einen Wert von  $5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Dieser Ansatz wies daher die niedrigste Extraktionsrate der drei untersuchten Ansätze auf. Die dargestellten Daten zeigen, dass die Höhe des pH-Wert Abfalles während der Extraktion einen maßgebenden Einfluss auf die Extraktionsrate (kinetische Konstante) hat und somit die Dauer eines derartigen Extraktionsprozesses mitbestimmt. Aber auch die maximale Menge an extrahierbaren GFP hängt vom pH Wert ab, wobei sich ein pH Wert zwischen 8,5 und 9 als vorteilhaft gezeigt hat.

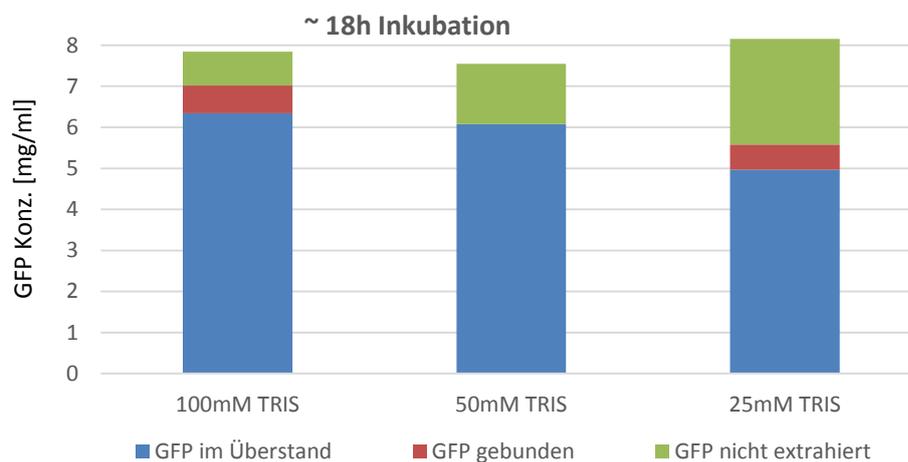


**Abbildung 30:** Verläufe der GFP Konzentrationen und der pH Werte während der Extraktion. GFP Konzentrationen im Überstand - unter Verwendung unterschiedlicher Pufferkonzentrationen (Tris 25mM / 50mM / 100mM) - sind als volle Linien dargestellt. Der jeweils zugehörige pH-Wert Verlauf ist als transparente Linie abgebildet (sekundäre, vertikale Achse). Alle Ansätze wurden mit 30mg Marathon A2/g FBM hergestellt und hatten einen Start pH-Wert von 9. Die Zelldichte betrug 20% BFA Versuchsmaßstab: 200 ml. Die Kurvenanpassung erfolgte basierend auf einer exponentiellen Reaktion erster Ordnung (siehe Text).

Die in Abbildung 30 dargestellten Extraktionsansätze wurden nach der Extraktionsphase (ca.18h) weiter prozessiert. Durch Elution der Mikropartikel-Zell Aggregate wurde das, an den Mikropartikel adsorbierte, GFP desorbiert (eluiert) und anschließend quantifiziert. In einem weiteren Aufarbeitungsschritt wurde das entstandene Eluat von den Feststoffen abgetrennt und die E.coli Zellen enzymatisch aufgeschlossen. Somit wurde auch das nicht extrahierte GFP aus den Zellen freigesetzt und konnte quantifiziert werden.

Die Resultate dieser Untersuchung sind in Abbildung 31 dargestellt. Die blauen Teilbereiche der Balken zeigen die GFP Konzentration im Überstand des Extraktes (nach ca. 18h Extraktion), die roten Balken jene Konzentrationen des Eluats und die grünen zeigen die GFP Konzentrationen im Überstand des enzymatischen Zell Aufschlusses. Wie bereits erwähnt, sind die gleichen Ansätze wie auch in Abbildung 30 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass der Anteil an nicht extrahiertem GFP, bei abnehmender Pufferkonzentration, zunimmt. Auf Grund der

vorhergehenden Resultate (pH Wert Effekt, siehe Abbildung 28 bzw. Abbildung 29) kann davon ausgegangen werden, dass der relativ starke pH-Wert Abfall des Ansatzes mit 25mM Tris Puffer (siehe Abbildung 30) für die deutlich verminderte GFP Extraktion verantwortlich ist. Bei allen drei Ansätzen konnten nur minimale bzw. keine GFP Konzentrationen im Eluat gefunden werden. Dies zeigt, dass (wie beabsichtigt) nur ein kleiner Anteil des GFP (< 10%) adsorbiert wurde.

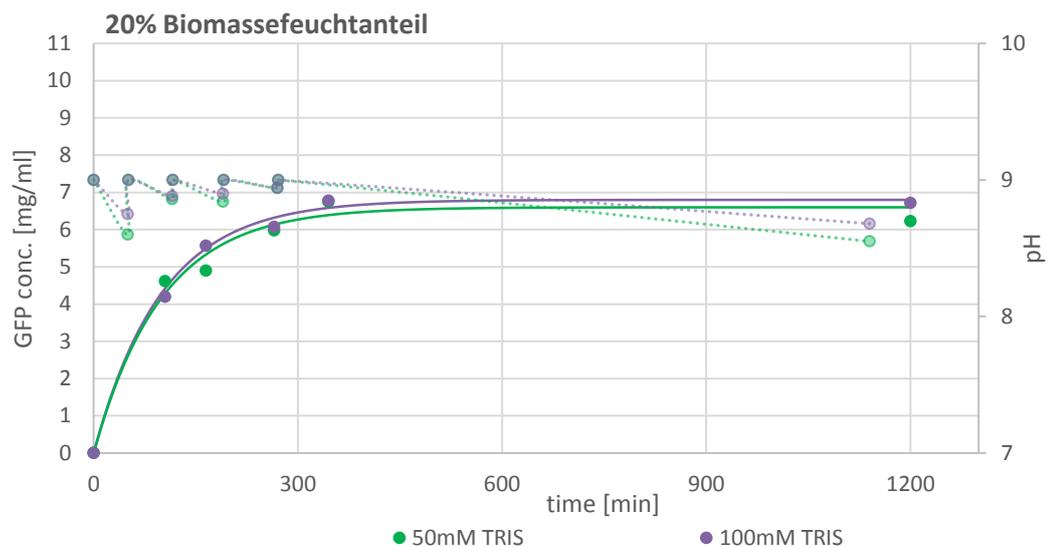


**Abbildung 31:** Ergebnisse dreier Extraktionsversuche unter Einsatz unterschiedlicher Pufferkonzentrationen. Darstellung der GFP Konzentrationen für Proben unterschiedlicher Pufferkonzentrationen. Für jede Probe ist ein Balken, bestehend aus drei Teilbereichen, dargestellt. Der blaue Teilbereich zeigt die GFP Konzentration im Überstand nach der Extraktionsphase und der rote Balken die Konzentration nach dem Eluieren (1M NaCl im Puffer) des gebundenen GFPs. Der grüne Balken zeigt die Konzentration im Überstand nach einem weiteren Aufarbeitungsschritt des zuvor erhaltenen Pellets: dem enzymatischen Zellaufschluss.

Die eingesetzte E.coli Zellsuspension (20% BFA) hatte einen GFP-Titer von ca. 7,7 mg/ml. Für die drei dargestellten Extraktionsversuche ergeben sich somit GFP-Wiederfindungsraten im Bereich von 97 - 106%. Das beste Ergebnis, bezogen auf die Ausbeute (nur im Überstand des Extraktionsansatzes enthaltene GFP, ohne Elution oder Aufschluss), zeigt der Ansatz mit 100mM Tris mit ca. 6,3mg GFP/ml (siehe auch Abbildung 30). Durch den Extraktionsvorgang dieses Ansatzes konnten daher ca. 80% des vorhandenen GFPs im Extrakt wiedergefunden werden.

In einem weiterführenden Experiment wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau gewählt. Die Resultate sind in Abbildung 32 bis Abbildung 34 dargelegt. Auch hier kamen Ansätze mit unterschiedlichen Pufferstärken zum Einsatz (50mM bzw. 100mM Tris). Im Gegensatz zu den vorherigen Extraktionsversuchen wurde der pH-Wert mehrfach - auf einen pH Wert von 9 - nachgestellt (4 Mal während der ersten 5h). Neben der Pufferstärke wurde auch der Biomassefeuchteanteil (BFA) der unterschiedlichen Ansätze variiert. Ziel war es zu beurteilen, ob die in Abbildung 27 bzw. in Abbildung 26 beobachteten Auswirkungen (durch eine Erhöhung der Zelldichten) auch bei konstantem pH Wert auftreten. Die beiden erwähnten Abbildungen haben gezeigt, dass die GFP Extraktionsrate bei Erhöhung des BFAs im Ansatz reduziert wird und die erreichten Ausbeuten dementsprechend niedriger ausfallen.

Die Ergebnisse der Extraktionsansätze mit 20% BFA sind in Abbildung 32 und jene aus Versuchen mit 30% BFA sind in Abbildung 33 angeführt. Beide Abbildungen zeigen, neben den GFP-Konzentrationsverläufen des Extraktes (volle Linien – primäre, vertikale Achse), auch die entsprechenden pH Wert Verläufe über ca. 20h (gestrichelte Linien – sekundäre, vertikale Achse). Für die Darstellung der Konzentrationszunahmen wurde eine Kurvenanpassung, basierend auf dem Verlauf einer exponentiellen Reaktion erster Ordnung, verwendet (siehe oben Text zu Abbildung 29).

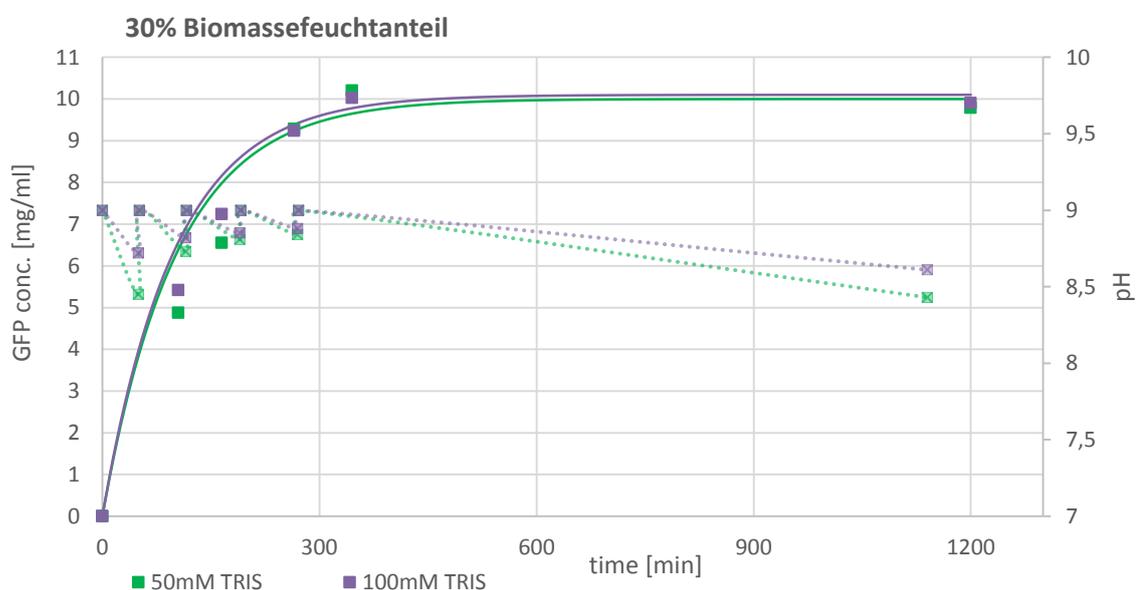


**Abbildung 32:** Ergebnisse zweier Extraktionsversuche mit pH Adjustierung während der Extraktion (20% BFA). Die GFP Konzentrationen im Überstand sind mit fortschreitender Extraktionsdauer, sowohl für einen 50mM als auch einen 100mM Tris Extraktionspuffer, dargestellt (volle Linien). Der jeweils zugehörige pH-Wert Verlauf ist als transparente Linie abgebildet (sekundäre, vertikale Achse). Alle Ansätze wurden mit 30mg Marathon A2/g FBM und 20% BFA hergestellt. Der pH-Wert zu Beginn der Extraktion war immer 9 und wurde (in den ersten 5h der Extraktion) vier Mal nachjustiert. Die Zelldichte betrug 20% BFA. Versuchsmaßstab: 300 ml. Die Kurvenanpassung erfolgte basierend auf einer exponentiellen Reaktion erster Ordnung.

In Abbildung 32 ist zu erkennen, dass der pH Wert der Ansätze in den ersten 100 Minuten am stärksten abfällt (bis zu ~0,5 pH-Wert Einheiten) und nach der ersten pH-Wert Nachjustierung der pH-Abfall deutlich niedriger ist. Ein Vergleich zwischen den Ansätzen unterschiedlicher Pufferstärke zeigt, dass der pH-Abfall des Ansatzes in 50mM Tris Puffer am Beginn der Extraktion merklich größer ist, als jener des Ansatzes in 100mM Tris Puffer. Betrachtet man die dargestellten Verläufe der GFP-Konzentration im Extrakt (volle Linien), so sieht man zwei annähernd idente Verläufe. In beiden Fällen erreichen die Konzentrationen nach ca. 6,5h ihr Maximum. Die dargestellte Kurve des Ansatzes mit 100mM Tris Puffer hat eine maximale Konzentration von 6,8mg GFP/ml Extrakt und eine kinetische Konstante von  $11 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Aus dem Verlauf des Ansatzes mit 50mM Tris Puffer gehen annähernd die gleichen Resultate hervor ( $c_{\text{max}} = 6,6 \text{ mg GFP/ml}$ ;  $k = 11 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ). Die Ergebnisse der 20% BFA Versuche lieferten somit die erwarteten

Ergebnisse. Durch die mehrfache pH-Wert Adjustierung, verliefen die GFP Extraktionsvorgänge - trotz unterschiedlicher Pufferkonzentrationen - beinahe identisch.

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit 30% Biomassefeuchtanteil sind in Abbildung 33 dargestellt und die beiden abgebildeten GFP Konzentrationsverläufe (mit 30% BFA) sind beinahe deckungsgleich. Der Verlauf des Ansatzes mit 100mM Tris Puffer erreicht eine maximale Konzentration von 10,1mg GFP/ ml Extrakt und liegt somit nur minimal über der Konzentration des Ansatzes mit 50mM Tris (10,0mg GFP/ml). Die kinetische Konstante ist in beiden Fällen  $11 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Somit konnten (wie auch bei den Ansätzen mit 20% BFA) keine nennenswerten Unterschiede der GFP Konzentrationen, in den Ansätzen verschiedener Pufferkonzentrationen, festgestellt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Grund dafür die mehrfache Nachjustierung des pH Wertes (während der Extraktion) ist.

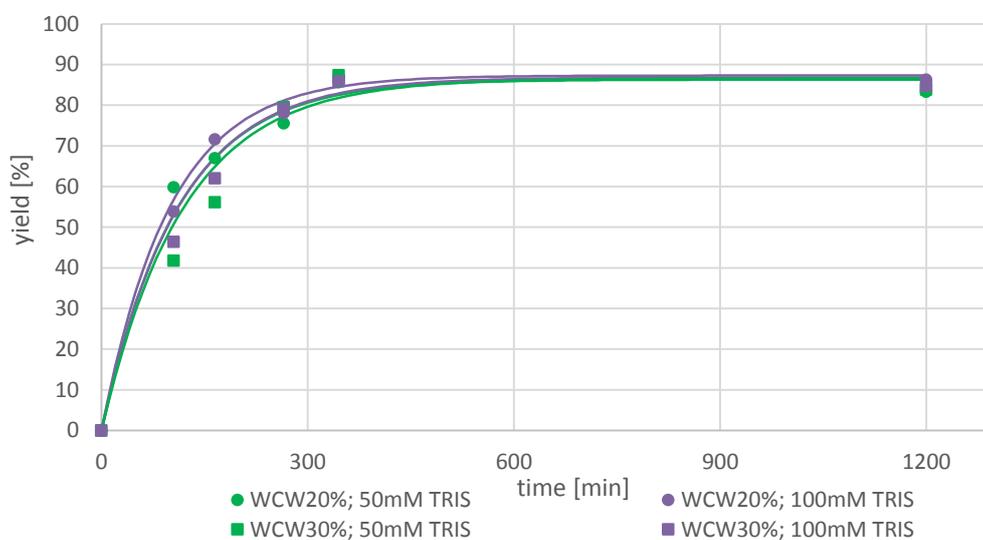


**Abbildung 33:** Ergebnisse zweier Extraktionsversuche mit pH Adjustierung während der Extraktion (20% BFA). Die GFP Konzentrationen im Überstand sind mit fortschreitender Extraktionsdauer, sowohl für einen 50mM als auch einen 100mM Tris Extraktionspuffer, dargestellt (volle Linien). Der jeweils zugehörige pH-Wert Verlauf ist als transparente Linie abgebildet (sekundäre, vertikale Achse). Alle Ansätze wurden mit 30mg Marathon A2/g FBM und 30% BFA hergestellt. Der pH-Wert zu Beginn der Extraktion war immer 9 und wurde (in den ersten 5h der Extraktion) vier Mal nachjustiert. Die Zelldichte betrug 20% BFA. Versuchsmaßstab: 300 ml. Die Kurvenanpassung erfolgte basierend auf einer exponentiellen Reaktion erster Ordnung.

Bei einer Gegenüberstellung der Daten mit jenen aus Abbildung 32 (30% BFA) stellen sich zwei wesentliche Unterschiede dar. Zum einen sind die pH Wert Abfälle (gestrichelte Linien – sekundäre, vertikale Achse) in Abbildung 33 deutlich stärker ausgeprägt, zum anderen sind die erreichten GFP-Konzentrationen deutlich höher als in Abbildung 32. Nach ungefähr 6,5h Extraktionsdauer haben die GFP Konzentrationen in Abbildung 33 (30% BFA) ihr Maximum erreicht.

Damit ein besserer Vergleich der Ansätze unterschiedlicher BFA möglich wird, zeigt Abbildung 34 noch einmal die Ergebnisse alle vier Ansätze, des oben besprochenen Experiments. In dieser Darstellung sind auf der vertikalen Achse (statt den GFP Konzentrationen) die GFP Ausbeuten abgebildet. Auf eine neuerliche Präsentation der pH Wert Verläufe wurde verzichtet.

Alle in Abbildung 34 dargestellten Ansätze erreichen eine GFP Ausbeute über 85% und zeigen annähernd gleich Verläufe ( $k = 11 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass frühere Probleme bei Extraktionsansätzen mit Zelldichten im Bereich von 30% BFA (siehe Abbildung 27 bzw. Abbildung 26), durch den stärkeren pH Wert Abfall im Extraktionspuffers und der damit einher gehenden Senkung der Extraktionsraten bedingt waren.



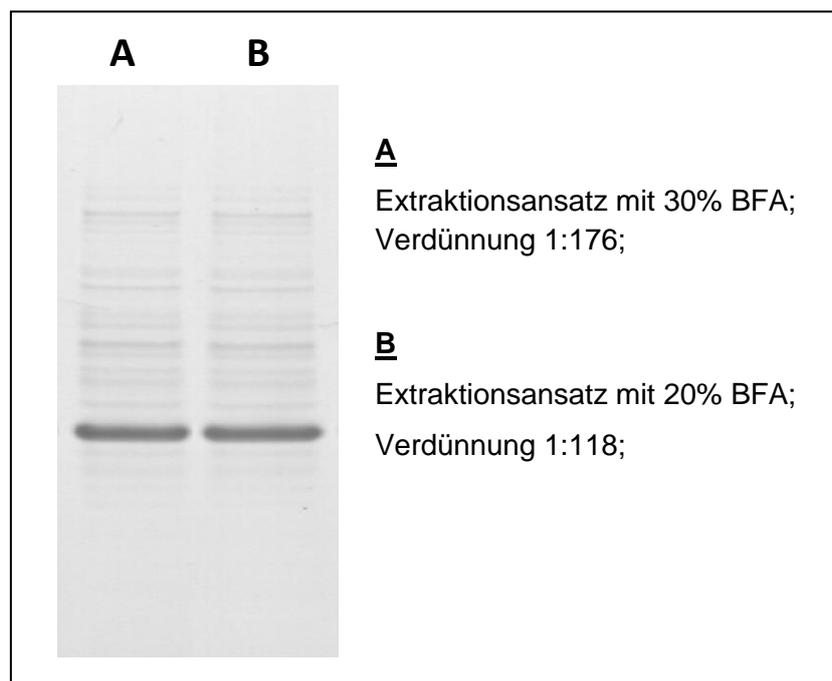
**Abbildung 34:** Zunahme der GFP Ausbeute im Überstand während der Extraktionsphase (20% bzw. 30% BFA). Alle Ansätze wurden mit 30mg Marathon A2/g FBM hergestellt und hatten einen Start pH-Wert von 9. Der pH-Wert wurde die ersten 5h in einem einstündigen Intervall nachadjustiert. Versuchsmaßstab: 300 ml. Die Kurvenanpassung erfolgte basierend auf einer exponentiellen Reaktion erster Ordnung.

Mit den Proben der Ansätze in 50mM Tris Puffer (siehe Abbildung 34) wurde ein Elektrophorese Gel angefertigt, um die Reinheit des GFPs in Bezug auf andere Proteine zu beurteilen. In Abbildung 35 ist ein Abschnitt des eingescannten Gels dargestellt.

Auf der linken Gelbahn (A) wurden die Proteine des Ansatzes mit 30% BFA aufgetrennt (1:176 verdünnt) und auf der rechten Gelbahn (B) war die Probe des Ansatzes mit 20% BFA aufgetragen (1:118 verdünnt). Die Bande des GFPs ist unverkennlich, da sie sich, aufgrund ihrer hohen Intensität, eindeutig von den restlichen Banden abhebt. Auf beiden Proteinlaufbahnen wurde eine GFP Reinheit (bezogen auf Fremdproteine) von über 65% festgestellt. Diese Ergebnisse sind für einen Zell-Extraktionsprozess sehr zufriedenstellen, vor allem bei einer Prozesszeit von ca. 6,5h.

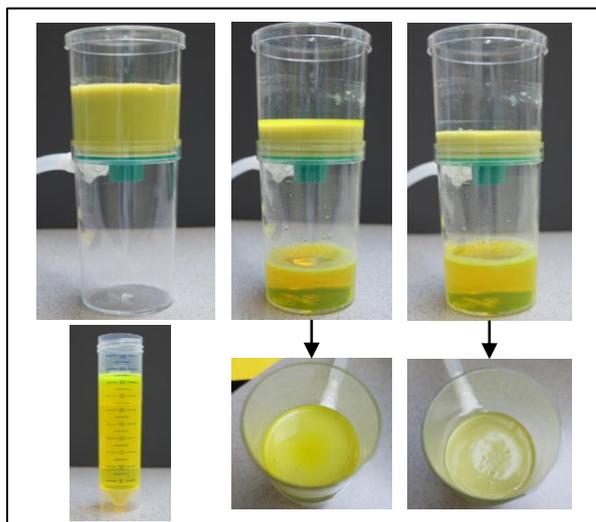
Für die Mikropartikel induzierte Extraktion des Modelproteins GFP, aus E.coli Zellsuspensionen mit Biomassefeuchtanteilen bis zu 30%, wurden Ausbeuten von über 85% erreicht. Ein pH Wert Abfall im Extraktionspuffer konnte mit den eingesetzten Pufferkonzentrationen (bis 100mM Tris) nicht vermieden werden. Da der pH Wert starken Einfluss auf den Extraktionserfolg hat, war daher während der Extraktionsphase eine mehrfache Nachjustierung des pH Werts (mit 2,5M NaOH) von Nöten. Die entsprechenden Extraktionsvorgänge konnten in einem Zeitraum von ca. 6,5h ausgeführt werden und die Reinheit des GFPs, bezüglich ECP-Verunreinigungen, lag bei über 65%. Es sei hier nochmals angemerkt, dass die angegebenen Ausbeuten lediglich aus dem im Überstand gelösten (nicht an MP adsorbiert) GFP berechnet wurden. Ein solcher Prozess der Proteinaufreinigung kommt demnach ohne Elutionsschritt aus, wodurch sich Vorteile wie kürzere Prozesszeiten oder ein reduzierter Materialaufwand ergeben. Es ist anzunehmen, dass dadurch auch ein anschließender Separationsschritt der Feststoffe vom Extrakt erleichtert wird. Frühere Untersuchungen haben nämlich gezeigt, dass Filtrationsprobleme erst durch Elutionsschritte auftreten (siehe auch Kapitel 1.2.1.2.1 "Protein Extraktion mittels kationischer Mikropartikel"). Auch die Resultate der durchgeführten Flockenuntersuchungen (siehe Kapitel 4.2 „Flockulation“) haben gezeigt, dass die Flockengröße durch NaCl Anwesenheit (im Extraktionspuffer) abnimmt.

#### 4.3.2.2. Filtration

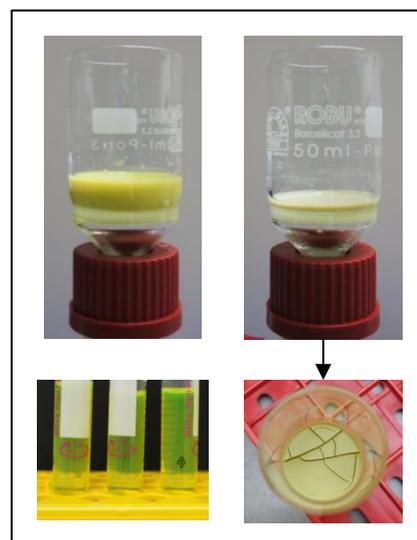


**Abbildung 35:** Scan eines SDS Gels zur Analyse zweier Extrakte (20% bzw. 30% BFA). Elektrophorese Gel der Überstandsproben - zweier Extraktionsversuche - nach ca. 6h Extraktionsdauer. Auf der linken Gelbahn (A) ist Probe aus einem Ansatz mit 30%BFA aufgetragen. Die rechte Bahn (B) zeigt die Proteine eines Ansatzes mit 20%BFA. Der Prozess wurde in 50mM Tris Puffer mit einem Start pH von 9 durchgeführt und der pH wurde mehrfach nachjustiert. Marathon A2 Konzentration: 30 mg/g Feuchtbioasse. Versuchsmaßstab: 350ml.

Um die Filtrierbarkeit durchgeführter Extraktionsansätze zu beurteilen, wurden Filtrationstests durchgeführt. Die beiden folgenden Abbildungen (Abbildung 36 und Abbildung 37) zeigen erste Versuche einfacher Unterdruckfiltrationen im Labormaßstab. Alle Filtrationen wurden nach ca. 9h Extraktionsphase durchgeführt. Die Details der Extraktionsbedingungen sind den Bildbeschreibungen zu entnehmen.



**Abbildung 36:** Unterdruckfiltration (Einweg).  
Fotoaufnahmen einer Einweg-Unterdruckfiltration ( $\Delta p \sim 0,5\text{bar}$ ) mit  $0,2\mu\text{m}$  Porengröße. Die vorangegangene Extraktion wurde mit 20% BFA und 35mg Marathon A2/g FBM durchgeführt. Startvolumen der Filtration  $\sim 65\text{ml}$ .



**Abbildung 37:** Unterdruckfiltration.  
Fotoaufnahmen der Unterdruckfiltration ( $\Delta p \sim 0,5\text{bar}$ ) mit einer Porengröße im Bereich von 16 bis  $40\mu\text{m}$ . Startvolumen ca. 11ml. Extraktion mit 20% BFA und 30mg Marathon A2/g FBM.

Die Fotosammlung der Abbildung 36 dokumentiert den Versuch mit einem  $0,2\mu\text{m}$  Einwegfilter. Das erhaltene Filtrat war klar und, wie erwartet, gelb-grünlich gefärbt. Nach ca. 1,5h war der Filtrationsvorgang beendet (40ml Filtrat) und der entstandene Filterkuchen hatte rund ein Drittel des, im Extraktionsansatz, eingesetzten Volumens (unfiltriert).

Abbildung 37 zeigt Bilder eines Filtrationsversuches mit Porengrößen zwischen 16 und  $40\mu\text{m}$ . Es konnte innerhalb von 7min rund 7ml klares Filtrat erzeugt werden. Der entstandene Filterkuchen hatte stark ausgeprägte Risse. Ein weiterer Filtrationsversuch gleichen Aufbaus, jedoch mit einer Porengröße zwischen  $1-1,6\mu\text{m}$ , lieferte annähernd gleiche Ergebnisse hinsichtlich Filterkuchen und Filtrat. Der einzige Unterschied der festgestellt werden konnte war, dass diesmal das Filtrat erst nach 11min ein Volumen von 7ml erreicht hatte.

Ein Nachweis der Filtrierbarkeit entsprechender Extraktionsansätze, wird durch diese Ergebnisse erbracht. Die Variation der Porengrößen zeigte deutliche Auswirkungen auf die Filtrationsraten. Poren bis zu  $40\mu\text{m}$  waren ausreichend, um die mittels Marathon A2 flockulierten Zellen zurückzuhalten.

---

#### 4.4. Zusammenfassung

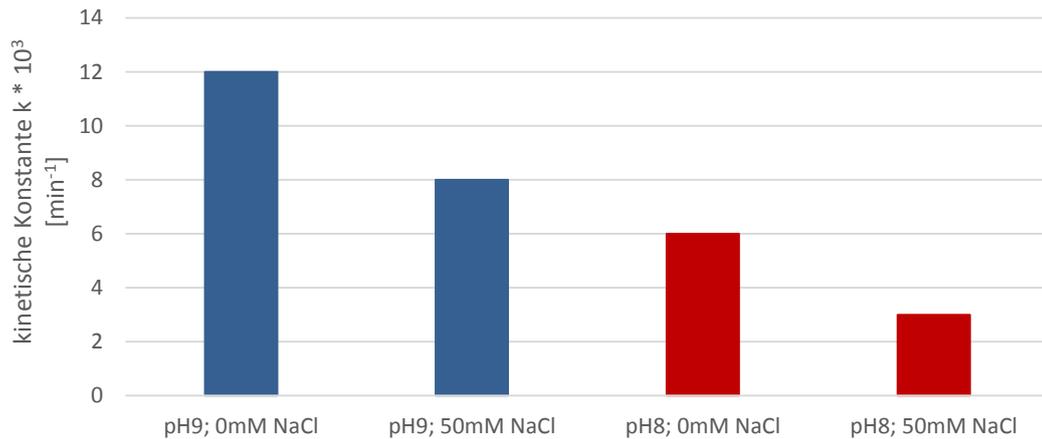
Die Ergebnisse der Mikropartikelcharakterisierung haben gezeigt, dass die beiden Marathon A2 Batches (unabhängiger Herstellung) annähernd gleiche Partikelgrößenverteilungen (siehe Tabelle 6 bzw. Tabelle 7), sowie BSA-Bindungskapazitäten (180 - 185 mg/ml) besitzen. Es wurden, mit 160 ml/mg bzw. 110 ml/mg, relativ hohe Adsorptionskonstanten (Langmuir Konstanten) bestimmt, welche eine schnelle Adsorption ermöglichen.

Die Größenmessungen der Flocken, welche durch Adsorption von negativ geladenen Biomolekülen bzw. Zellmembranen an den Marathon A2 MP entstehen, wurden unter Anwendung des One Resin Systems bzw. des Two Resin Systems durchgeführt. Durch die Zugabe von MSC als Flockulationsmittel (TRS) konnten die Größen der Flocken deutlich gesteigert werden. Im Vergleich zum ORS konnte mit dieser Methode, unter Elutionsbedingungen, der Median der Flockengrößen mehr als verdoppelt werden (mit 16% MSC Trockenmasseanteil der MP). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Flockenseparation – vor allem unter Elutionsbedingungen – durch die Etablierung eines TRS deutlich erleichtert werden kann.

Während den GFP Aufreinigungsversuchen aus dem Homogenat, wurden die gleichen GFP Ausbeuten wie bei einem Zellaufschluss mittels Hochdruck-Homogenisator erreicht. Die Verunreinigungen (ECP; RNA/DNA;) konnten (im Vergleich zum Homogenat) deutlich reduziert werden. Dies gilt sowohl für die Anwendung des ORS (nur Marathon A2 MPs), als auch bei Etablierung eines geeigneten TRS (zusätzlich Marathon MSC MPs als Flockulationsmittel).

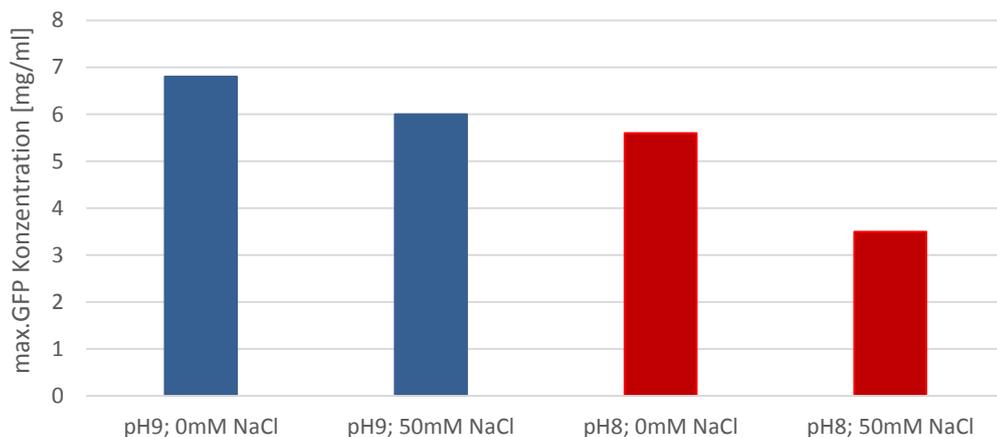
Für Mikropartikel-induzierte Extraktionsvorgänge wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Extraktionsbedingungen untersucht. In den nachfolgenden Balkendiagrammen (Abbildung 38 bis Abbildung 40) sind die erzielten GFP Konzentrationen (im Extrakte) und die kinetischen Konstanten (exponentielle Reaktion erster Ordnung) der Extraktionsversuche nochmals gegenübergestellt.

In Abbildung 38 sind die kinetischen Konstanten, für Extraktionsversuche bei unterschiedlichen pH-Werten bzw. NaCl Konzentrationen dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass die kinetischen Konstanten bei ansteigender NaCl Konzentration abnehmen. Bei einer Änderung des pH-Wertes von pH9 auf pH8 wurde eine Abnahme der Konstante von mindestens 50% festgestellt.



**Abbildung 39:** Vergleich der kinetischen Konstanten unterschiedlicher Extraktionsansätze (I). Einzelne Messpunkte siehe Abbildung 29.

Abbildung 39 vergleicht die im Extrakt vorgefundenen GFP Konzentrationen nach Beendigung der Extraktionsvorgänge. Es ist gut zu sehen, dass durch eine Erhöhung der NaCl Konzentration die erreichten GFP Konzentrationen abnehmen. Außerdem zeigt die Abbildung, dass ein pH-Wert im Extraktionspuffer von 8 deutlich niedrigere Konzentrationen hervorbrachte als eine Extraktion bei pH9. Somit konnte gezeigt werden, dass (für einen Extraktionsvorgang) ein Puffer pH-Wert von 9 und die Abwesenheit von NaCl vorteilhaft ist.

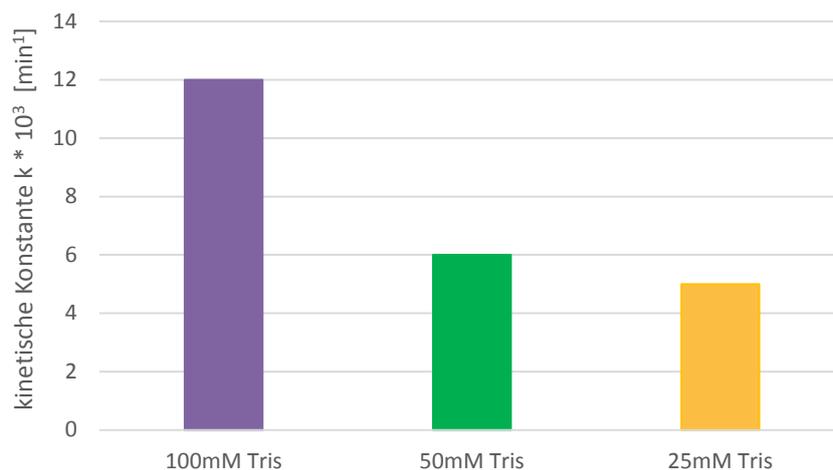


**Abbildung 38:** Vergleich der erreichten GFP Konz. unterschiedlicher Extraktionsansätze (I). Einzelne Messpunkte siehe Abbildung 29.

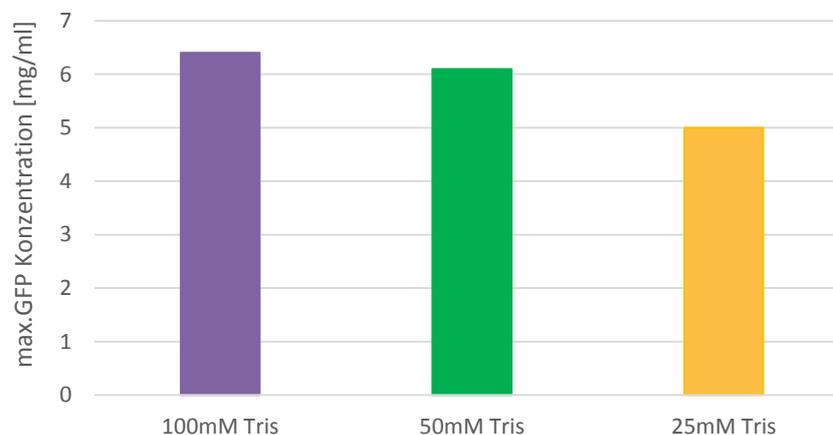
In Abbildung 40 sind die kinetischen Konstanten dreier Extraktionsversuche angeführt. Für alle Versuche wurde der pH Wert zu Beginn der Extraktion einmalig auf einen Wert von 9 gestellt. Die Konzentration des verwendeten Tris Puffers wurde variiert (25mM; 50mM; 100mM). Die Darstellung zeigt eine Abnahme der Konstanten bei Reduktion der Pufferkonzentration. So wurde, durch Reduktion der Tris Konzentration von 50mM auf 100mM eine Halbierung des Wertes (von  $12 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  auf  $6 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) beobachtet.

Die erreichten GFP Konzentrationen der, bereits in Abbildung 40 dargestellten, Ansätze sind in Abbildung 41 dargestellt. Es wurde eine Abnahme der GFP Konzentrationen durch Reduktion der Pufferkonzentration festgestellt.

Die in Abbildung 40 bzw. Abbildung 41 beobachteten Effekte können auf unterschiedlich stark ausgeprägte pH-Wert Abfälle (während der Extraktion) zurückgeführt werden (siehe Abbildung 30).



**Abbildung 41:** Vergleich der Kinetische Konstanten unterschiedlicher Extraktionsansätze (II). Einzelne Messpunkte siehe Abbildung 30.



**Abbildung 40:** Vergleich der erreichten GFP Konz. unterschiedlicher Extraktionsansätze (II). Einzelne Messpunkte siehe Abbildung 30.

Des Weiteren konnten, durch mehrfache pH-Wert Adjustierung (während der Extraktion) auf einen pH-Wert von 9, GFP-Ausbeuten von über 85% (Vergleich mit Zellaufschluss mittels Hochdruck-homogenisator) erreicht werden. Das GFP in den entsprechenden Extrakten wies eine Reinheit von über 65% (bezogen auf Gesamtproteine) auf. Die Extraktionen konnten innerhalb von 6,5h beendet werden und es waren keine Elutionsschritte von Nöten.

---

Mittels Filtration (0,2µm bis 40µm) konnte das Extrakt derartiger Prozesse, ohne Probleme von den Mikropartikel-Zell-Aggregaten abgetrennt werden.

---

## Literaturverzeichnis

- [1] W. Stroh, Industrial enzymes. 30, p. 13 . 35, 1999.
- [2] G. Walsh, „Biopharmaceutical benchmarks,“ Nat. Biotechnol. 28, pp. 917 - 924, 2010.
- [3] L. Sanchez-Garcia, L. Martin, R. Mangues, N. Ferrer-Miralles und E. Vazquez, „Recombinant pharmaceuticals from microbial cell: a 2015 update,“ Microb Cell Fact, 2016.
- [4] G. Walsh, „New biopharmaceuticals.techn,“ Biopharm Int., Nr. 25, pp. 34-48, 2112.
- [5] „Global Data,“ 2015. [Online]. Available: <https://www.globaldata.com>. [Zugriff am 03 2016].
- [6] E. Langer und J. Ranck, „Capacity bottleneck squeezed by downstream processes,“ BioProcess International, Nr. 4, pp. 14 - 17, 2006.
- [7] T. Overton, „Recombinant protein production in bacterial hosts,“ Drug Discovery Today, Nr. 19, pp. 590 - 600, 2013.
- [8] D. Anderson, „Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments,“ Curr. Opin. Biotechnol., Nr. 15, p. 456, 2004.
- [9] S. K. Rasmussen und H. Naested, „Recombinant antibody mixtures: production strategies and cost considerations.,“ Archives of biochemistry and biophysics , pp. 139 - 145, 2012.
- [10] H. Chmiel, Bioprozesstechnik, Spektrum - Akademischer Verlag, 2011.
- [11] S. Wheelwright, Protein purification, John Wiley & sons, INC., 1991.
- [12] J. Thommes und M. Etzel, „Alternatives to chromatographic separations,“ Biotechnol. Prog., Nr. 23, pp. 42 - 45, 2007.
- [13] J. Janson und L. Ryden, Protein Purification: Principles: High Resolution Methods and Applications 2nd edn., New York: Wiley-VCH, 1998.
- [14] B. Balasundaram, S. Harrison und D. Bracewell, „Advances in product release strategies and impact on bioprocess design,“ Trends biotechnol, pp. 477 - 485, Aug 2009.
- [15] S. Bailey, P. Blum und M. Meagher, „Improved homogenization of recombinant Escherichia coli following pretreatment with guanidine hydrochlorid,“ Biotechnol. Prog. 11, pp. 533 - 539, 1995.
- [16] Thömmes, J., Etzel und M., „Alternatives to Chromatographic Separations,“ Biotechnol. Prog., pp. 42 - 45, 2007.
- [17] J. Morrow, „Economics of Antibody production,“ Genet. Eng. News, pp. 1 - 39, 2002.

- 
- [18] D. Roush und Y. Lu, „Advances in primary recovery,“ *Biotechnol. Prog.*, Nr. 24, pp. 488 - 495, 2008.
- [19] A. Sommer und A. J. Lewis, „Effect of dithiothreitol on yeast: sphaeroplast formation and invertase release,“ *J. Gen. Microbiol.* 63, pp. 327 - 335, 1971.
- [20] C. French, E. Keshavarz-Moore und J. Ward, „Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the *Escherichia coli* periplasm,“ *Enzyme Microb. Technol.* 19, pp. 332 - 338, 1996.
- [21] A. L. Demain und P. Vaishnav, „Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms,“ *Biotechnol. Adv.* , Nr. 27, pp. 297 - 306, 2009.
- [22] H. Felix, „Permeabilised cells,“ *Anal. Biochem.*, Nr. 120, pp. 211 - 234, 1982.
- [23] H. Felix, „Permeabilized Cells,“ *Analytical Biochemistry*, Nr. 120, pp. 211 - 234, 1982.
- [24] C. French, E. Keshavarz-Moore und W. J.M., „Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the *Escherichia coli* periplasm,“ *Enzym. Microb. Techn.*, pp. 332 - 338, 1996.
- [25] A. Trefilov, M. Imendoerffer, G. Sekot, F. Strobl, A. Jungbauer und R. Hahn, „A microscale method of protein extraction from bacteria: Interaction of *Escherichia coli* with cationic microparticles,“ *Journal of Biotechnology* 207, pp. 21 -29, 2015.
- [26] J. Allen, A. Patkar, T. Frank, F. Donate, Y. Chiu, J. Shields und M. Gustafson, „Use of glycol ethers for selective release of periplasmic proteins from Gram-negative bacteria,“ *Biotechnol Prog.*, Nr. 5, pp. 1163 - 1170, 2007.
- [27] H. Neu und L. Heppel, „The release of ribonuclease into the medium when *E.coli* cells are converted to spheroplasts,“ *J. Biol. Chem.*, Nr. 239, pp. 3893 - 3900, 1964.
- [28] R. Bansal-Mutalik und V. Gaiker, „Cell permeabilization for extraction of penicillin acylase from *Escherichia coli* by reverse micellar solutions,“ *Enzyme Microb. Technol.*, Nr. 32, p. 14, 2003.
- [29] O. Ariga und e. al., „Release of thermophilic alpha-amylase from transformed *Escherichia coli* ba addition of glycin,“ *J. Ferment. Bioeng.*, Nr. 68, p. 243, 1989.
- [30] J. Falconer, B. O'Neill und A. Middelberg, „Chemical treatment of *Escherischia coli*: 1. Extraction of Intracellular Protein from Uninduced Cells,“ *Biotechnology and bioengineering*, pp. 453-458, 1997.
- [31] J. Falconer, B. O'Neill und A. Middelberg, „Chemical treatment of *Escherischia coli*: 1. Direct Extraction of Recombinant Protein from Cytoplasmic Inclusion Bodies in Intact Cells,“ *Biotechnology and bioengineering*, Nr. 57, pp. 382 - 386, 1998.

- 
- [32] F. Zhao und J. Yu, „L-asparaginase release from Escherichia coli cells with K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and Triton X100.“ *Biotechnol Prog.*, Nr. 3, pp. 490 - 494, 2001.
- [33] N. T. J. und H. Wang, „Recovery of a foreign protein from the periplasm of Escherichia coli by chemical permeabilization.“ *Enzyme Microb Technol.*, Nr. 8, pp. 603 - 611, 1990.
- [34] M. Malamy und B. Horecker, „Release of alkaline phosphatase from cells of Escherichia coli upon lysozym spheroplast formation.“ *Biochemistry* 3, 1889 - 1893.
- [35] T. Schneider, „Microparticles for Cell Extraction and Biomolecule Recovery - A new Capture Technology?“, Boehringer Ingelheim Regional Center Vienna, 2015.
- [36] A. Trefilov, M. Imendoerffer, G. Sekot und F. Strobl, „A microscale method of protein extraction from bacteria: Interaction of Escherichia coli with cationic microparticles“, *Journal of Biotechnology* 207, pp. 21 -29, 2015.
- [37] A. Jungbauer, M. Imendörffer und R. Hahn, „Project: 5.2 Continuous production of proteins; Work Package: WP4: Continuous capture with micro-particles and porous beads“, Austrian centre of industrial biotechnology, 2014.
- [38] O. Shimomura, F. Johnson und Y. Saiga, „Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.“ *J. Cell. Comp. Physiol.*, pp. 233 - 239, 1962.
- [39] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward und D. C. Prasher, „Green fluorescent protein as a marker for gene expression.“ *Science*, pp. 802 - 805, 1994.
- [40] R. Heim, A. Cubitt und R. Y. Tsien, „Improved green fluorescence“, *Nature*, pp. 663 - 664, 1995.
- [41] B. P. Cormack, R. H. Valdivia und S. Falkow, „FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).“, *Gene*, pp. 33 - 38, 1996.
- [42] Z. Vajo, J. Fawcett und W. C. Duckworth, „Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes: insulin analogs.“ *Endocr. Rev.*, Nr. 22, pp. 706-717, 2001.
- [43] N. Labrou, „Protein purification: an overview.“ *Methods Mol Biol.*, pp. 3 - 10, 2014.

---

## Abkürzungsverzeichnis

A2	Marathon A2
BFA	Biomassefeuchtanteil
BI	Boehringer Ingelheim
BSA	bovine serum albumin (engl. für Rinderalbumin)
bzw.	Beziehungsweise
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECP	Escherichia coli Proteine
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EU	Extinktions-Units
FBM	Feuchtbiomasse
FBRM	focused beam reflectance measurements (engl. für fokussierter Laserstrahl Reflexionsmessung)
FU	Fluoreszenz Units (engl. für Fluoreszenz-Einheiten)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MP	Mikropartikel
MPZE	Mikropartikel Zell Extraktion
MSC	Marathon MSC
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
ORS	One Resin System
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
rcf	Relative centrifugal force (engl. Für relative Zentrifugalkraft)
RCV	Regional Center Vienna
RNA	Ribonukleinsäure

---

SDS	Sodium-Dodecylsulfat
STD Abw.	Standardabweichung
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRS	Two Resin System
UV	Ultraviolett
uvm.	Und viele(s) mehr
versch.	Verschiedene
VIS	visible (engl. für sichtbar - Bezug zu elektromagnetisches Spektrum)
wt	Wildtyp
µm	Mikrometer

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Medizinische Anwendungsgebiete für rekombinante Proteine [3].	8
Abbildung 2: Bilder einer Fluoreszenz Mikroskopie von GFP produzierenden E.coli Bakterien [36].	14
Abbildung 3: Aminosäuresequenz der, während den Arbeiten, verwendeten GFP Variante.	19
Abbildung 4: Marathon A2 Partikelgrößenverteilung I.	35
Abbildung 5: Marathon A2 Partikelgrößenverteilung II.	35
Abbildung 6: Marathon MSC Partikelgrößenverteilung.	36
Abbildung 7: BSA-Adsorptionsisotherme des Marathon A2 Batches 03_14.	37
Abbildung 8: BSA-Adsorptionsisotherme des Marathon A2 Batches 07_25.	38
Abbildung 9: Mikropartikel Pellets.	39
Abbildung 10: Überstände der Mikropartikelsuspensionen.	39
Abbildung 11: Ergebnisse der Flockengrößenmessungen (Homogenat)	40
Abbildung 12: Ergebnisse der Flockengrößenmessungen (intakte Zellen)	42
Abbildung 13: Bilderserie zur Sedimentation unter Adsorptionsbedingungen.	43
Abbildung 14: Bilderserie zur Sedimentation unter Elutionsbedingungen.	43
Abbildung 16: GFP Ausbeuten der GFP Aufreinigung aus dem Homogenat.	45
Abbildung 15: Auswertung mehrerer Adsorptionsversuche für GFP, ECP und Nukleinsäuren.	45
Abbildung 17: Balkendiagramm zur Wiederfindungsrate der Verunreinigung.	46
Abbildung 18: Wiederfindungsraten nach dem GFP Aufreinigungsversuch aus dem Homogenat.	47

---

Abbildung 19: Auswirkung einer MSC Zugabe auf die GFP Bindungskapazität der A2 Mikropartikel.....	48
Abbildung 20: GFP Konzentrationen des Lysates und versch. Produktlösungen. ....	49
Abbildung 21: Scan eines SDS Gels zur Analyse versch. Produktlösungen eines GFP Aufreinigungsversuches.....	50
Abbildung 22: Zunahme der GFP-Konzentration im Überstand mit fortschreitender Extraktionszeit.....	51
Abbildung 23: Zeitliche Verläufe der Nukleinsäure-Verunreinigungen während der GFP Extraktion.....	52
Abbildung 24: Zeitliche Verläufe der Protein-Verunreinigungen während der GFP Extraktion. ..	53
Abbildung 25: Elektrophorese Gel der Überstandsproben mit fortschreitender Extraktionsdauer. .....	54
Abbildung 26: GFP Konzentrationen im Überstand mit zunehmender Extraktionsdauer.....	55
Abbildung 27: Zunahme der GFP Ausbeute im Überstand während der Extraktionsphase.....	55
Abbildung 28: GFP Konzentrationen im Überstand nach ca. 20h Extraktion.....	56
Abbildung 29: Zunehmende GFP Konzentrationen während der Extraktion.....	57
Abbildung 30: Verläufe der GFP Konzentrationen und der pH Werte während der Extraktion. ..	59
Abbildung 31: Ergebnisse dreier Extraktionsversuche unter Einsatz unterschiedlicher Pufferkonzentrationen.....	60
Abbildung 32: Ergebnisse zweier Extraktionsversuche mit pH Adjustierung während der Extraktion (20% BFA). ....	61
Abbildung 33: Ergebnisse zweier Extraktionsversuche mit pH Adjustierung während der Extraktion (20% BFA). ....	62
Abbildung 34: Zunahme der GFP Ausbeute im Überstand während der Extraktionsphase (20% bzw. 30% BFA). ....	63
Abbildung 35: Scan eines SDS Gels zur Analyse zweier Extrakte (20% bzw. 30% BFA). ....	64

---

Abbildung 36: Unterdruckfiltration (Einweg). .....	65
Abbildung 37: Unterdruckfiltration. ....	65
Abbildung 39: Vergleich der erreichten GFP Konz. unterschiedlicher Extraktionsansätze (I).....	67
Abbildung 38: Vergleich der kinetischen Konstanten unterschiedlicher Extraktionsansätze (I).....	67
Abbildung 41: Vergleich der erreichten GFP Konz. unterschiedlicher Extraktionsansätze (II).....	68
Abbildung 40: Vergleich der Kinetische Konstanten unterschiedlicher Extraktionsansätze (II).....	68

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Separationsmethoden zur Isolierung bzw. Aufreinigung von Biopharmazeutischen Molekülen [43].....	10
Tabelle 2: Reagenzien zur Permeabilisierung von Biomembranen gramnegativer Bakterien und die dabei freigesetzten Proteine [26] bis [27] .....	13
Tabelle 3: Liste des verwendeten Equipments.....	17
Tabelle 4: Chemikalienliste.....	18
Tabelle 5: Liste der Puffer und Lösungen .....	18
Tabelle 6: Partikelgrößenverteilung I .....	35
Tabelle 7: Partikelgrößenverteilung II .....	35
Tabelle 8: Partikelgrößenverteilung III .....	36
Tabelle 9: Ergebnisse diverser physikalischer Eigenschaften unterschiedlicher Mikropartikel Batches. ....	39