

**Biotechnologische Methoden zur  
effizienteren Rohstoffnutzung**

**Habilitationsschrift**

vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.**

**Roland Ulber**

**Hannover, Juni 2002**

Datum des Vollzugs der Habilitation: 05. November 2002

Referenten: Thomas Scheper (Hannover), Dirk Weuster-Botz (München),  
Kenneth Reardon (Fort Collins, USA)

Lernen wir träumen, dann finden wir vielleicht die Wahrheit.

August Kekulé



Diese Arbeit ist Teil eines Habilitationsverfahrens am Fachbereich Chemie der Universität Hannover. Die beschriebenen Arbeiten wurden dort im Zeitraum von 1997 bis 2002 durchgeführt. Der Dank geht an erster Stelle an Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper, der für diese Arbeiten eine hervorragende Ausgangsbasis zur Verfügung stellte und immer unterstützend zur Seite stand. Die fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit mit ihm ermöglichte mir die Umsetzung der eigenen Ideen in einem dafür idealen Umfeld.

Der Dank geht auch an Herrn Prof. em. Dr. Dr. h. c. Karl Schügerl, dem ich meine wissenschaftliche „Früherziehung“ verdanke. Durch ihn bin ich an wissenschaftliche Fragestellungen in der Industrie herangeführt worden, die meine heutigen Forschungsziele noch immer stark beeinflussen.

PD Dr. Bernd Hitzmann gebührt der Dank für viele Datenauswertungen mittels chemometrischer Modelle und die Zusammenarbeit bei der Bewertung der Substitutionspotentiale biotechnologischer Prozesse. Auch danke ich für die anregenden Diskussionen über den Stellenwert der Mathematik in der Biotechnologie und der Notwendigkeit praktischer Versuche.

Die im Folgenden geschilderten Untersuchungen wären nicht ohne die Mitarbeiter möglich gewesen, denen an dieser Stelle mein herzlichster Dank gilt:

Für die oft sehr mühsamen Untersuchungen mit den marinen Mikroorganismen danke ich Katrin Ackermann, Matthias Arndt, Thilo Hanke, Marc Laroche, Kai Muffler und Johanna Walter. Für Ihren Einsatz, aus der Molke das Wertvollste herauszuholen, danke ich Kerstin Plate, Dirk Steuber und Dr. Torsten Weiß. Im Bereich der Nitratanreicherung von Molke geht der Dank an Michael Fritsche, Johann Schwarz und Dirk Schnitzmeier. Bei der Kartoffel sind es Tom Heidrich (FH Hannover) und Dirk Kosemund gewesen, deren Experimente wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Dr. Ralf Quack danke ich für viele interessante Gespräche „rund um die Kartoffel“. Für die wirtschaftlichen Betrachtungen und für die Einführung in Ökobilanz und Zinsfüße beim Kartoffelprotein sei an dieser Stelle Prof. Dr. Udo Müller und seinem Team gedankt. Für die Experimente im Bereich der Biosensorik möchte ich Dr. Florian Irtel, Carsten Protsch, Dr. Adnan Ritzka, Dörte Solle und Dr. Peter Sosnitza meinen Dank ausdrücken. Bei der Analyse der Substitutionspotentiale geht der Dank an Dr. Hans-Bernhard Rhein und Sabine Katzer von der Umweltkanzlei Rhein.

Viele der vorgestellten Arbeiten sind in enger Zusammenarbeit mit der Industrie entstanden. Hier geht der Dank an Dr. Wolfgang Demmer (Sartorius, Göttingen), H.-J. Denzler (Biolac, Harbarnsen), Matthias Busse (Amino, Frellstedt), Dr. Robert Faurie (Amino, Frellstedt) und Dr. Helmut Rasche (Solvay, Hannover).

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. Heinrich Buchholz (Biolac, Harbarnsen) dafür bedanken, dass er auch einem „Newcomer“ in der Molke großzügige finanzielle Unterstützung der Forschungsarbeiten gewährt.

Für die finanzielle Unterstützung der Forschungsprojekte geht der Dank an dieser Stelle an das Land Niedersachsen, die Deutsche Bundesstiftung Umwelt und die Europäische Union.

Für den Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten in den Vereinigten Staaten, aber mehr noch für seine Freundschaft und herzliche Aufnahme in seinem Heim in Colorado danke ich Prof. Dr. Kenneth Reardon von der Colorado State University in Fort Collins.

Der Dank wäre mehr als unvollständig, wenn er nicht auch an die Werkstätten und an die Verwaltung des TCIs ginge. Wilhelm Behnsen und seinem Team den besten Dank für alle großen und kleinen „Basteleien“. Angelika Behnsen gebührt Dank für all die Abrechnungen und Formulare, durch die wir uns in den letzten Jahren kämpfen mussten. Anna-Marie Gieseke danke ich nicht nur für die freundschaftlichen Grüße am frühen Morgen.

Bei Dr. Sascha Beutel und Martina Weiß möchte ich mich ebenfalls auf das herzlichste Bedanken. Mit ihnen zusammen waren nicht nur die Mittagspausen im TCI sehr bereichernd!

Dafür, dass meine Eltern mir durch die Unterstützung während des Studiums auch letztendlich diese Arbeit ermöglicht haben, möchte ich mich an dieser Stelle noch einmal bedanken.

Alle wissenschaftliche Arbeit verblasst neben dem Lachen eines Kindes. Für diese Erkenntnis geht mein liebevoller Dank an Lisa-Catharina. Für dieses Geschenk und für vieles mehr danke ich vom ganzen Herzen Laurence.

## **Zusammenfassung**

Die Natur bietet eine Vielzahl von Organismen und Verbindungen an, deren Erforschung noch nicht annähernd als abgeschlossen betrachtet werden kann. Es gibt somit auch noch zahlreiche Mikroorganismen, die in Hinblick auf den Einsatz in der Biotechnologie noch nicht untersucht worden sind. Eine Vielzahl eventuell pharmakologisch wirksamer Wirkstoffe gilt es somit noch zu entdecken. Ebenso kann die noch unbekannte biokatalytische Aktivität der Stoffwechselwege dieser Organismen genutzt werden. Ein Gebiet, welches in diesen Bereichen die größten Potentiale aufweist ist sicherlich die marine Biotechnologie („Blaue Biotechnologie“). In der Arbeit wird daher an einigen erarbeiteten Beispielen aufgezeigt, wie marine Mikroorganismen unter reproduzierbaren Bedingungen zur Naturstoffproduktion kultiviert werden können. Anhand von marinen Enzymen werden Strategien zur Aufarbeitung von marinen Naturstoffen erläutert.

Neben der Erschließung neuer Ressourcen bietet die biotechnologische Verfahrenstechnik auch Methoden an, die eine effizientere Nutzung von Rohstoffen erlauben. Mittels innovativer Aufarbeitungstechniken können beispielsweise neue Produkte aus landwirtschaftlichen Rohstoffen isoliert werden, welches eine höhere Wertschöpfung bestehender Produktionsverfahren ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit werden exemplarisch die Rohstoffe Molke, Melasse und Kartoffelprotein behandelt. Bei der Verarbeitung dieser Rohstoffe fallen vielfältige Nebenprodukte an (z. B. Lactoferrin), deren Veredelung zu Hochwertkomponenten für den Einsatz in der Pharmakologie und der Ernährung genutzt werden können.

Es wird weiterhin gezeigt, wie die Biotechnologie durch die Entwicklung bioanalytischer Systeme dazu beitragen kann, dass bestehende industrielle Prozesse effizienter gestaltet werden können. Verdeutlicht wird ebenfalls, dass eine Optimierung in Hinblick auf die Umweltfaktoren eines Prozesses auch eine ökonomische Verbesserung mit sich führen kann (prozessintegrierter Umweltschutz). Vorgestellt werden Sensoren zur Messung von Serin, Uridin und Tryptophan.

Schlagwörter: Bioverfahrenstechnik, Biosensorik, Aufarbeitung

## Summary

Nature offers a variety of organisms and compounds whose investigation cannot be regarded as completed. There are still numerous microorganisms which haven't been examined for their use in biotechnology yet. A variety of perhaps pharmacologically effective active agents is therefore still valid to discover. One area in biotechnology which offers a high potential of new biological active substances is marine biotechnology. By using several examples new strategies for the reproducible cultivation of marine microorganisms for the production of secondary metabolites will be explained in this work. New downstream procedures in marine biotechnology are developed for the recovery of marine enzymes. The isolation of a sulfite oxidase from *Sulfitobacter pontiacus* and of a serine dehydratase from a new marine microorganism, *Paracoccus seriniphila*, is described in detail. New screening systems for the discovery of haloperoxidases and halogenases – both enzymes which can be used for the halogenations of e. g. aromatic compounds – are developed on the basis of two dimensional fluorescence spectroscopy (2D-fluorescence).

Beside the use of new resources, bioprocess engineering can help to improve the effectiveness of already implemented processes. Thus, innovative downstream procedures are developed for the separation of natural resources such as sweet whey, sugar beet molasses and potato protein. Using the described techniques minor components (e. g. lactoferrin) can be isolated for the use in food and pharmaceuticals. In this part this work focuses on the use of membrane adsorbers. The use of membrane adsorption techniques offers in relation to conventional column chromatographic procedure some advantages which lead to a better process performance, such as lower manufacturing costs, non diffusion controlled exchange kinetics so that higher fluxes are possible, easier handling in various module forms and easier up scaling. Raising the separation efficiency by maximizing mass transfer is the basic idea when using modified micro porous membranes as the stationary phase in liquid chromatography.

In addition, bioanalytical systems are developed which can be used for the control and monitoring of industrial processes. In this work biosensors for the measurement of serine, uridin and tryptophan are described.

Keywords: bioprocess engineering, biosensors, downstream processing

## Abkürzungsverzeichnis

ABE-Verfahren	Aceton-Butanol-Ethanol-Verfahren
Arg	Arginin
ASA	Aminosäueanalysator
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
bLF	Bovines Lactoferrin
BSA	Bovines Serum Albumin
BV	Bettvolumen
CA	Celluloseacetat
CAFCA	Computer Assisted Flow Control & Analysis
CD	Circulardichroismus
CIP	Cleaning in Place
CN	Cellulosenitrat
Con A	Concanavalin A
CPF	Co-current Permeate Flow
CPO	Chloroperoxidase
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
CSTR	Continuous Stirred Tank Reactor
Cys	Cystein
D-AAOD	D-Amino acid oxidase
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DSS	Danish Separation Systems
DTT	Dithiothreitol
EBT	1,1'-Ethyliden-bis-L-tryptophan
ED	Elektrodialyse
ELISCO	Entrepreneurial Life Science Companies
Em	Emission
EMS	Eosinophilie-Myalgie-Syndrom
Ex	Exzitation
F+E	Forschung & Entwicklung
FDA	Federal Drug Administration
FIA	Fließinjektionsanalyse
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
HS	Hydrosart®
HSA	Humanes Serum Albumin
Ile	Isoleucin
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie

## Abkürzungsverzeichnis

---

IPO	Initial Public Offering
KFW	Kartoffel Fruchtwasser
KPP	Kaliumphosphat
LAH	Lipid-Acyl-Hydrolase
Leu	Leucin
LF	Lactoferrin
LP	Lactoperoxidase
MB	Marine Broth
MF	Mikrofiltration
MoKo	Molybdän Kofaktor
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NF	Nanofiltration
NIC	National Institute of Cancer
NVK	Nutzbare Arbeitskapazität
Phe	Phenylalanin
pI	Isoelektrischer Punkt
PPL	Potatoe Protein Liquor
Pro	Prolin
PVA	Polyvinylalkohol
RO	Reverse Osmose
RP-HPLC	Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography
Ser	Serin
SIA	Sequentielle Injektionsanalyse
SOD	Sulfitoxidase
SwComplete	Seawater Complete
Thr	Threonin
TMP	Transmembrane pressure
Trp	Tryptophan
TTL	Transistor-Transistor-Logic
Tyr	Tyrosin
UF	Ultrafiltration
UTMP	Uniform Transmembrane Pressure
VA-Epoxy	Vinylacetat-Epoxyharz
WPC	Whey Protein Concentrates

---

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung.....	1
2	Entwicklung der Biotechnologie .....	7
3	Substitutionspotentiale der Biotechnologie .....	18
3.1	Der Stand der Biotechnologie in Hinblick auf Grund- und Feinchemikalien .....	18
3.2	Hemmnis oder Innovation? Die Biotechnologie auf dem Weg in die chemische Industrie .....	22
4	Marine Biotechnologie – Nutzung neuer Ressourcen in der Biotechnologie.....	31
4.1	Stand der marinen Biotechnologie.....	32
4.2	Der marine Biofilm als Ausgangsbasis zu neuen Naturstoffen .....	39
4.2.1	Isolierung der assoziierten Mikroorganismen .....	43
4.3	Kultivierung mariner Mikroorganismen.....	45
4.3.1	Bestimmung des optimalen Mediums .....	48
4.3.2	Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Mediumsoptimierung .....	51
4.4	Marine Enzymsysteme.....	57
4.4.1	Enzymscreening.....	60
4.4.1.1	Enzymscreening mit dem API ZYM <sup>®</sup> -System bei marinen Pilzen.....	61
4.4.2	L-Serindehydratase .....	63
4.4.2.1	Screening von Mischkulturen nach L-Serin umsetzenden Mikroorganismen.....	65
4.4.2.2	Charakterisierung des Stammes MBT-A4.....	68
4.4.2.3	Optimierung der Kultivierung von <i>Paracoccus seriniphila</i> .....	71
4.4.2.4	Isolierung und Charakterisierung der L-Serindehydratase .....	72
4.4.3	Sulfitoxidase .....	81
4.4.3.1	Sufitanalytik – Stand der Technik .....	84
4.4.3.2	Optimierung der Kultivierung von <i>Sulfitobacter pontiacus</i> .....	86
4.4.3.3	Verwendung immobilisierter Substrate .....	87
4.4.3.4	Aufarbeitung der Sulfitoxidase.....	93
4.4.4	Haloperoxidasen und Halogenasen.....	97
4.4.4.1	Screeningverfahren für Haloperoxidasen und Halogenasen.....	104
4.5	Fazit zur marinen Biotechnologie.....	109
5	Effizientere Nutzung landwirtschaftlicher Rohstoffe durch biotechnologische Verfahren .....	112

5.1	Landwirtschaftliche Rohstoffe und nachwachsende Rohstoffe .....	112
5.2	Downstream-Processing zur Proteingewinnung aus landwirtschaftlichen Rohstoffen .....	115
5.2.1	Membranfiltration .....	117
5.2.2	Grundlagen der Filtrationstechniken .....	119
5.3	Gewinnung von hochwertigen Proteinen aus Molke.....	126
5.3.1	Der Wertstoff Molke .....	127
5.3.2	Lactoferrin – Stand der Technik.....	133
5.3.2.1	Membranadsorber als Trenntechnik von Molkeproteinen .....	137
5.3.2.2	Aufbau einer Technikanlage zur Isolation von bLF aus Molke.....	140
5.3.3	Abschätzung der Auslegung eines industriellen Prozesses .....	154
5.4	Nitratentfernung aus Molke.....	157
5.4.1	Stand der Forschung bei der Nitratentfernung .....	158
5.4.2	Grundidee des neuen Verfahrens zur Nitratanreicherung in Molke.....	161
5.4.2.1	Aufbau und Optimierung der chromatographischen Stufe.....	164
5.4.2.2	Aufbau und Optimierung der biologischen Stufe.....	174
5.4.2.3	Kombination beider Verfahren.....	186
5.4.3	Abschätzung der Auslegung eines industriellen Prozesses .....	188
5.5	Aufarbeitung von Kartoffelprotein.....	196
5.5.1	Proteingewinnung beim Kartoffelstärkeprozess – Stand der Technik .....	200
5.5.2	Gewinnung von Aminosäuren aus Kartoffelprotein.....	204
5.5.2.1	Enzymatische Hydrolyse von Kartoffelprotein .....	212
5.5.2.2	Aufarbeitung der Hydrolysate .....	222
5.5.3	Wirtschaftliche Bewertung der enzymatischen Hydrolyse .....	226
5.6	Fazit zur verbesserten Nutzung von Rohstoffen .....	229
6	Entwicklung und Einsatz bioanalytischer Systeme für die industrielle Praxis .....	231
6.1	Bioanalytische Systeme.....	231
6.1.1	Prinzipien bioanalytischer Systeme.....	232
6.1.2	Bioanalytische Systeme in der Praxis .....	236
6.2	Einsatz von bioanalytischen Systemen in industriellen Chromatographieprozessen .....	239
6.2.1	Der Prozess der chromatographischen Melasseentzuckerung.....	240
6.2.2	Optimierung der Schnittgrenzen der Serinfraktion .....	244
6.2.2.1	Entwicklung eines D-Serinbiosensors.....	245

---

6.2.2.2	Aufbau und Einsatz der In-Time-Analytik für Serin .....	248
6.2.3	Ökonomische und ökologische Bewertung des Verfahrens .....	252
6.3	Einsatz bioanalytischer Systeme bei der Produktion von Tryptophan .....	254
6.3.1	Produktion von Tryptophan .....	255
6.3.2	Ankopplung einer In-Time-Prozessanalytik an die Biotransformation .....	257
6.3.3	Ökonomische und ökologische Bewertung des Verfahrens .....	263
6.4	Uridingewinnung aus Zuckerrübenmelasse .....	265
6.4.1	Aufbau einer In-Time-Analytik für Uridin .....	266
6.5	Fazit zum Einsatz bioanalytischer Systeme .....	273
7	Resümee .....	276
8	Anhang .....	281
8.1	Verfahrensschemata zu Kapitel 3.3 .....	281
8.2	Medium zum Vereinzeln der Mikroorganismen von <i>Bugula plumosa</i> .....	283
8.3	Zusammensetzung des MB-Mediums zur Kultivierung von MBT-A4 .....	283
8.4	Qualitativ und semiquantitativ nachweisbare Enzyme und zugehörige Substrate des APIZYM <sup>®</sup> -Test .....	284
8.5	Anwendungen einiger mit dem API ZYM <sup>®</sup> -System getesteter Enzyme .....	285
8.6	Medium für die Pilzisolat .....	286
8.7	Durchführung des API ZYM <sup>®</sup> -Tests .....	286
8.8	Medium zum Screening von L-Serin umsetzenden Mikroorganismen von <i>Ciona</i> <i>intestinalis</i> und <i>Aseidiella aspersa</i> .....	287
8.9	Getestete C-Quellen beim Wachstum von <i>Paracoccus seriniphilia</i> .....	287
8.10	Spektroskopischer Test zur Aktivitätsbestimmung der L-Serindehydratase .....	288
8.11	Herstellung der CaSO <sub>3</sub> -LentiKats <sup>®</sup> .....	288
8.12	Eigenschaften ausgewählter majorer Molkeproteine .....	289
8.13	Wichtige kinetische Parameter einer Kultivierung .....	290
8.14	Immobilisierung von <i>P. denitrificans</i> .....	291
8.15	Durchführung der Versuche zur Bestimmung der Kinetik der Denitrifizierung von <i>P. denitrificans</i> .....	291
8.16	Herleitung der Formeln zur Berechnung der Reaktorgröße bei der Denitri- fizierung .....	292
8.17	Hydrolyse von Kartoffelprotein .....	294
8.18	Aminosäureanalysator .....	295

8.19	Immobilisierung auf VA-Epoxy.....	295
9	Literaturverzeichnis.....	297

*(...) nicht wusste Enkidu, was Brot war und wie man es zu essen pflegt. Auch Bier hat er noch nicht gelernt zu trinken. Da öffnete die Frau ihren Mund und sprach zu Enkidu: "Iss nun das Brot, o Enkidu, denn das gehört zum Leben, trink auch vom Bier, wie es ist des Landes Brauch. (...) Er trank Bier - sieben Becher. Sein Geist entspannte sich, er wurde ausgelassen. Sein Herz war froh und sein Gesicht strahlte. (...) In dieser Verfassung wusch er sich und wurde so ein Mensch.(...)*

*Gilgamesch-Epos ca. 3.000 v. Chr.*

## **1 Einleitung**

Der Mensch hat seit jeher sein Leben mit der Hilfe von biotechnologischen Produkten gestaltet. Durch viele historische Schriftstücke wie das oben zitierte Gilgamesch-Epos [1] kann man heute die Entwicklung der „historischen Biotechnologie“ nachvollziehen. Nicht nur die für die Gärung verantwortlichen Mikroorganismen haben den Menschen durch seine gesamte Entwicklungsgeschichte begleitet und so früh auf den Bereich der Ernährung und natürlich auch auf die Gesundheit Einfluss genommen. In den letzten 150 Jahren hat sich die Biotechnologie von der reinen Empirie zur Wissenschaft und zu einem eigenständigen Wirtschaftszweig entwickelt (s. a. Kapitel 2).

Der Biotechnologie wird im Allgemeinen nachgesagt, dass sie neben der Informationstechnologie die „Mega-Technologie“ unseres noch jungen Jahrtausends sein wird. Die rasante Marktentwicklung in verschiedensten Segmenten der BioTech-Industrie [2, 3, 4, 5] hat auch die Politik auf den Plan gerufen, die viele Forschungsinitiativen startete, um die Wachstumspotentiale in den Bereichen Pharmazie, Medizin, Umwelt und Ernährung effizient zu erschließen. Eine der wichtigsten Initiativen aus deutscher Sicht ist dabei sicherlich der 1995 vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (bmb+f) ausgeschriebene Wettbewerb „BioRegio“, der zum Ziel hatte, neue biotechnologische Forschungs- und Entwicklungszentren in Deutschland zu etablieren und somit auch neue Arbeitsplätze zu schaffen [6]. Durch das bmb+f wurden über 76 Millionen Euro (150 Mio. DM) bis zum Jahr 2002 in die geförderten Forschungsvorhaben investiert. Aus dieser Initiative heraus ist der BioFuture-Wettbewerb [7] erwachsen, der jungen Wissenschaftlern die Gelegenheit bietet, über den Zeitraum von fünf Jahren eine eigenständige biotechnologische Forschergruppe aufzubauen. Dieses Vorhaben wurde mit weiteren 41 Millionen Euro (80 Mio. DM) gefördert. Eine direkte Fortsetzung des BioRegio-

Wettbewerbes fand 1999 unter dem Titel „BioProfile“ durch das bmb+f statt [8]. Der Wettbewerb wurde im Mai 2001 entschieden. Insgesamt 30 Bewerber-Regionen aus dem gesamten Bundesgebiet hatten auf die Bekanntmachung von Bundesministerin Bulmann im November 1999 reagiert. Davon wurden 20 Regionen aufgefordert, ihre Konzeptideen zu konkretisieren, was mit je 51.000 Euro (100.000 DM) gefördert wurde. Ziel der BioProfile-Förderung ist es, ausgewählte Regionen und ihre besonderen Kompetenzen auszubauen, um international wettbewerbsfähige Profile zu bilden. Zu diesem Zweck genießen diese Regionen für die kommenden 5 Jahre den Vorrang bei der Vergabe von rund 51 Millionen Euro (100 Mio. DM) Fördermittel aus dem neuen Rahmenprogramm der Biotechnologie. Ausgezeichnet wurden die Regionen Berlin-Potsdam, Braunschweig-Göttingen-Hannover und Stuttgart-Neckar-Alb. Die Region Berlin-Potsdam erhält 17,9 Millionen Euro (35 Mio. DM) für das Profil „Genomforschung und Pflanzenbiotechnologie im Dienst der Diagnostik, Verhütung und Therapie ernährungsabhängiger Krankheiten“. Niedersachsen erhält 15,3 Millionen Euro (30 Mio. DM) für das Konzept „Funktionelle Genomanalyse - Plattform für Diagnostik und Therapie“. Schließlich erhält die Region Stuttgart-Neckar-Alb 17,9 Millionen Euro (35 Mio. DM) für die Schwerpunktsetzung in der „Regenerationsbiologie“. Die BioProfile-Jury beurteilte auch die 17 Anträge der nicht ausgewählten Regionen als sehr anspruchsvoll und interpretierte, dass die Biotechnologie in Deutschland auf hohem Niveau und noch weiter entwicklungsfähig ist. Vermutlich werden auch die übrigen Regionen ihre tragfähigen Konzepte außerhalb des BioProfile-Wettbewerbes umsetzen [9].

Die Umsetzung der Bioinformatik beabsichtigt das bmb+f im Rahmen des Programms „Biotechnologie 2000“ zu fördern. Forschungs- und Entwicklungsvorhaben sollen in diesem Programm strategische Konzepte zur Vernetzung und Weiterentwicklung vorhandener Bioinformatik-Aktivitäten aufzeigen und einen Beitrag zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses leisten. Die Zusammenarbeit von Wirtschaft und Wissenschaft soll ausgebaut werden, um den Technologietransfer und damit die wirtschaftliche Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit Deutschlands zu verbessern. In diesem Förderprogramm integriert ist weiterhin die Ausschreibung „Neue effiziente Verfahren für die funktionelle Proteomanalyse“. Diese Ausschreibung ergänzt und unterstützt als Teil der bmb+f-Gesamtstrategie zur Genomforschung gezielt die bereits existierenden bmb+f-Genomforschungsprojekte DHGP („Deutsches Humangenomprojekt“) und GABI („Genomanalyse im biologischen System Pflanze“).

Öffentliche Förderungen können auch biotechnologische Unternehmen im Rahmen des BioChance-Wettbewerbes beantragen. Laut Meinung des bmb+f hat Deutschland sich in den vergangenen 20 Jahren in der modernen Biotechnologie zu einem international anerkannten Wissenschaftsstandort mit einer überwiegend institutionell verankerten Wissenschafts- und Forschungsinfrastruktur entwickelt. Seit einigen Jahren gibt es zudem einen stark wachsenden Trend, das vorhandene biotechnologische Wissen in die Anwendung zu transferieren. *„Träger des Trends sind vor allem kleine, neugegründete Biotechnologie-Unternehmen, die oftmals die von den Gründern während ihrer wissenschaftlichen Tätigkeit gewonnene Ergebnisse unter Anwendungsgesichtspunkten aufnehmen. Sie ermöglichen eine besondere Form des Wissenstransfers, die offensichtlich charakteristisch für das Entstehen einer neuen, wissensbasierten Industrie und Dienstleistungsbranche wie der modernen Biotechnologie ist“*, erklärte Forschungsministerin Bulmahn zum Start des BioChance Programms [10]. Insgesamt werden in dieses Projekt mehr als 51 Millionen Euro (100 Mio. DM) investiert.

Aus den genannten laufenden Förderprogrammen lässt sich erkennen, dass von Seiten der Bundesregierung ein großes Interesse an der Förderung der Biotechnologie in Deutschland besteht. Insgesamt wurde die biotechnologische Forschung und Entwicklung von Seiten der Bundesministerien durch die hier beschriebenen Forschungsschwerpunkte innerhalb der letzten fünf Jahre mit über 219 Millionen Euro (428 Mio. DM) gefördert.

Darüber hinaus stellte das bmb+f mit seiner Ausschreibung „Systembiologie“ vom 13. Dezember 2001 einen neuen Förderschwerpunkt vor. Das Konzept „Systeme des Lebens – Systembiologie“ stellt einen neuartigen Förderansatz dar, der das Ziel hat, dieses relativ junge Gebiet in Deutschland zu etablieren. Im Unterschied zur klassischen Biochemie und Molekularbiologie, in denen vornehmlich die Funktionsweise von Biomolekülen und ihren Komplexen untersucht werden, befasst sich die Systembiologie u. a. mit dem Verständnis, der Modellierung, sowie der Simulation von komplexen biologischen Funktionen. Dabei werden in der Systembiologie experimentelle, quantitative Daten erhoben, um realitätsnahe Modelle von physiologischen Vorgängen, Zellen, Zellverbänden und ganzen Organismen zu ermöglichen. Bei der Förderaktivität „Systeme des Lebens – Systembiologie“ handelt es sich um einen disziplinübergreifenden Förderschwerpunkt, der die Entschlüsselung metabolischer und regulatorischer Netzwerke im Organismus zum Ziel hat, um physiologische Leistungen theoretisch zu erfassen, zu modellieren und zu simulieren (quantitative Biologie) [11]. Dieses Projekt wird mit einem Gesamtvolumen von 50 Millionen Euro ausgestattet.

Insgesamt spiegeln die geförderten Projekte – insbesondere im BioProfile-Wettbewerb – und die Ausrichtung des Konzeptes „Systeme des Lebens – Systembiologie“ sehr gut die momentanen Forschungsschwerpunkte im Bereich der Biotechnologie wider. Ein starker Fokus liegt hierbei im Bereich der „roten Biotechnologie“ (Tissue Engineering, Biopharmaka, medizinische Biotechnologie etc.), da insbesondere in diesem Bereich die größte wirtschaftliche Bedeutung der Biotechnologie gesehen wird. Die „rote Biotechnologie“ stellt aber nur einen Teilbereich der Biotechnologie dar. Aus gängigen Definitionen der Biotechnologie heraus ergibt sich ein deutlich breiteres Anwendungsgebiet biotechnologischer Verfahren. In einer der ersten Definitionen der European Federation of Biotechnology aus dem Jahre 1989 wurde die Biotechnologie als „(...) die integrierte Verwendung von Naturwissenschaften und Ingenieurwissenschaften mit dem Ziel der technischen Anwendung von Organismen, Zellen, Teilen davon oder molekularen Analogen für Produkte und Dienstleistungen (...)“ verstanden [12]. Eine weitere Definition versucht die industrielle Ausrichtung der Biotechnologie hervorzuheben: „(...) Biotechnologie nutzt die biologische Aktivität von lebenden Zellen (Mikroorganismen, Pflanzen oder Säugerzellkulturen) oder Enzymen (Biokatalysatoren) zur Herstellung oder Umwandlung von Verbindungen in industriellen Prozessen (...)“ [13]. Jüngere Definitionsansätze werden vermehrt nicht mehr von Wissenschaftlern, sondern von Marktanalysten wie Ernst & Young aufgestellt. Darauf wird in Kapitel 2 dieser Arbeit eingegangen werden.

Es steht außer Frage, dass die „rote Biotechnologie“ in Hinblick auf die Verbesserung der menschlichen Gesundheit (Entwicklung neuer Pharmaka, Bekämpfung von Erbkrankheiten etc.) einen sehr wichtigen Stellenwert in der Forschungslandschaft Deutschland und weltweit einnehmen muss und daher auch angemessen über staatliche Förderprogramme finanziert werden sollte. Darüber hinaus sollte man aber auch die Weiterentwicklung der verfahrenstechnischen Grundlagen im Fokus behalten, um für neue Produkte auch innovative Verfahrenswege bereitstellen zu können. Des Weiteren gehen wirtschaftliche Impulse nicht nur von der „roten Biotechnologie“ aus. Auch in anderen Bereichen können über den Einsatz biotechnologischer Verfahren innovative Produkte hergestellt werden, die zu einer erhöhten Wertschöpfung beitragen können. Im Rahmen dieser Arbeit soll anhand von Literaturdaten und eigenen Arbeiten aufgezeigt werden, in welchen Bereichen moderne Biotechnologie heute ihre Anwendung findet oder finden könnte. Dabei sollen neben der Beschreibung der wissenschaftlichen Arbeiten auch folgende Fragestellungen diskutiert werden, die auch die

wirtschaftlichen Möglichkeiten von biotechnologischen Anwendungen abseits der „roten Biotechnologie“ behandeln:

- Welche Substitutionspotentiale besitzt die Biotechnologie in Hinblick auf bestehende chemische Prozesse?
- Können mittels biotechnischer Verfahren insbesondere landwirtschaftliche Rohstoffe effizienter genutzt werden?
- Welche Auswirkungen haben biotechnologische Schritte innerhalb eines Produktionsprozesses auf dessen ökonomische und ökologische Faktoren?

Es soll versucht werden, die erste Frage auf theoretischer Ebene anhand von verschiedenen Gutachten zu beantworten (Kapitel 3). Die beiden anderen aufgestellten Fragen sollen über praktische Beispiele beantwortet werden, wobei potentielle Einsatzgebiete der Biotechnologie konkret anhand der folgenden drei Themenbereiche diskutiert werden:

- Die Natur bietet eine Vielzahl von Organismen und Verbindungen an, deren Erforschung noch nicht annähernd als abgeschlossen betrachtet werden kann. Es gibt somit auch noch zahlreiche Mikroorganismen, die in Hinblick auf den Einsatz in der Biotechnologie noch nicht untersucht worden sind. Eine Vielzahl eventuell pharmakologisch wirksamer Wirkstoffe gilt es somit noch zu entdecken. Ebenso kann die noch unbekannt biokatalytische Aktivität der Stoffwechselwege dieser Organismen genutzt werden. Ein Gebiet, welches in diesen Bereichen die größten Potentiale aufweist [14, 15, 16, 17], ist sicherlich die **marine Biotechnologie** („Blaue Biotechnologie“). In Kapitel 4 soll daher an einigen erarbeiteten Beispielen aufgezeigt werden, wie marine Mikroorganismen unter reproduzierbaren Bedingungen zur Naturstoffproduktion kultiviert werden können. Anhand von marinen Enzymen sollen Strategien zur Aufarbeitung von marinen Naturstoffen aufgezeigt werden.
- Neben der Erschließung neuer Ressourcen bietet die biotechnologische Verfahrenstechnik auch Methoden an, die eine effizientere Nutzung von Rohstoffen erlauben. Mittels **innovativer Aufarbeitungstechniken** können beispielsweise neue Produkte aus landwirtschaftlichen Rohstoffen isoliert werden, welches eine höhere Wertschöpfung bestehender Produktionsverfahren ermöglicht. Die Fokussierung auf diese Rohstoffe ergibt sich in der vorliegenden Arbeit durch die hohe Anzahl

landwirtschaftlicher Unternehmen in Niedersachsen. Hier stehen große Anlagen zur Verarbeitung von Zuckerrüben, Milch und Kartoffeln. Bei der Verarbeitung dieser Rohstoffe fallen vielfältige Nebenprodukte an, deren Veredelung zu Hochwertkomponenten für den Einsatz in der Pharmakologie und der Ernährung genutzt werden können. In Kapitel 5 werden solche Verfahrensentwicklungen vorgestellt.

- In Kapitel 6 soll aufgezeigt werden, wie die Biotechnologie durch die **Entwicklung bioanalytischer Systeme** dazu beitragen kann, dass bestehende industrielle Prozesse effizienter gestaltet werden können. Es soll weiterhin gezeigt werden, dass eine Optimierung in Hinblick auf die Umweltfaktoren eines Prozesses auch eine ökonomische Verbesserung mit sich führen kann (prozessintegrierter Umweltschutz [18]). Dieses erfolgt ebenfalls am Beispiel von der Verarbeitung landwirtschaftlicher Rohstoffe.

Insbesondere zum besseren Verständnis von Kapitel 3 (Substitutionspotentiale der Biotechnologie), wird im Folgenden auf die geschichtliche Entwicklung der Biotechnologie eingegangen (Kap. 2). In Kapitel 2 wird auch auf den biotechnologischen Markt eingegangen, um das Umfeld aufzuzeigen, in dem sich neue Produkte und Verfahren zur Zeit etablieren müssen. Die Kapitel 2 und 3 sollen helfen, biotechnologische Entwicklungen über ihren wissenschaftlichen Anspruch hinaus zu betrachten und so ihre Bedeutung besser abschätzen zu können. In der vorliegenden Arbeit wird dabei insbesondere die Verfahrenstechnik in den Vordergrund gestellt. Daher sind Fragen der gentechnischen Sicherheit und der damit verbundenen gesellschaftlichen und ethischen Komplexität nicht erfasst. Diese hoch interessanten Fragen, die für die Bewertung biotechnologischer Prozesse ebenfalls relevant sind, verlangen eine detaillierte Betrachtung, wie sie hier nicht gewährleistet werden könnte.

## 2 Entwicklung der Biotechnologie

Kapitel 1 vorangestellt ist ein Zitat aus dem Gilgamesch-Epos [1] das vor ca. 5.000 Jahren von den Sumerern verfasst worden ist. In dem Text finden sich Hinweise auf zwei biotechnologische Produkte, die auch in unserer Zeit noch breite Nutzung finden: Brot und Bier. Es gibt eine Vielzahl historischer Dokumente, die die Produktion und die Verwendung klassischer Gärungsprodukte (alkoholische Gärung und Milchsäuregärung) beschreiben. Neben dem Gilgamesch-Epos ist sicherlich die Gesetzesstele des Hammurapi (Abb. 2.1) das bekannteste Zeugnis biotechnologischer Verfahren und Produkte aus dem Altertum.



Abb. 2.1: Gesetzesstele und Kopf des Hammurapi (1792 – 1750 V. Chr.); die Stele beinhaltet unter anderem Gesetzestexte über die Produktion und den Verkauf von Bier; das Original steht im Louvre, Paris [19]

Insbesondere die Produkte der alkoholischen Gärung haben den Menschen seit jeher sehr interessiert. Viele Völker haben Götter verehrt, die in ihren Augen für das Gelingen des Gärungsprozesses verantwortlich waren. Zu nennen sind hier sicherlich Bacchus bei den Griechen und Dionysos bei den Römern. Aber auch die Sumerer hatten mit Ninkasi eine Göttin, der das Bier geweiht war.

(...)You are the one who soaks the malt in a jar  
The waves rise, the waves fall.  
Ninkasi, you are the one who soaks  
the malt in a jar  
The waves rise, the waves fall. (...)

Hymne an Ninkasi[20]

Welche Bedeutung das Bierbrauen auch im antiken Ägypten hatte, lässt sich daran erkennen, dass die ägyptischen Schriftgelehrten ein eigenes Schriftzeichen für Bier einführten. Die Bedeutung des Bieres wird dadurch unterstrichen, dass das Zeichen für Mahlzeit aus den Zeichen für Brot und Bier zusammengesetzt war. Bier war bis weit in das Mittelalter hinein ein wichtiges Grundnahrungsmittel. Insbesondere in der Fastenzeit war es ein Ernährungsschwerpunkt, denn es galt „Liquida non frangunt ieiunum - Flüssiges bricht das Fasten nicht“. Bei den Mönchen war der Genuss von bis zu 5 Liter Bier pro Tag erlaubt [21]. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass der Gärprozess durch die eingetragenen Wildhefen noch nicht sonderlich effizient in Hinblick auf den Alkoholgehalt war.

Auch für das Brot als biotechnologisches Produkt finden sich mehrere tausend Jahre alte Belege. So war beispielsweise bei den Ägyptern die Produktion von Brot über Sauerteig bekannt (Abb. 2.2).

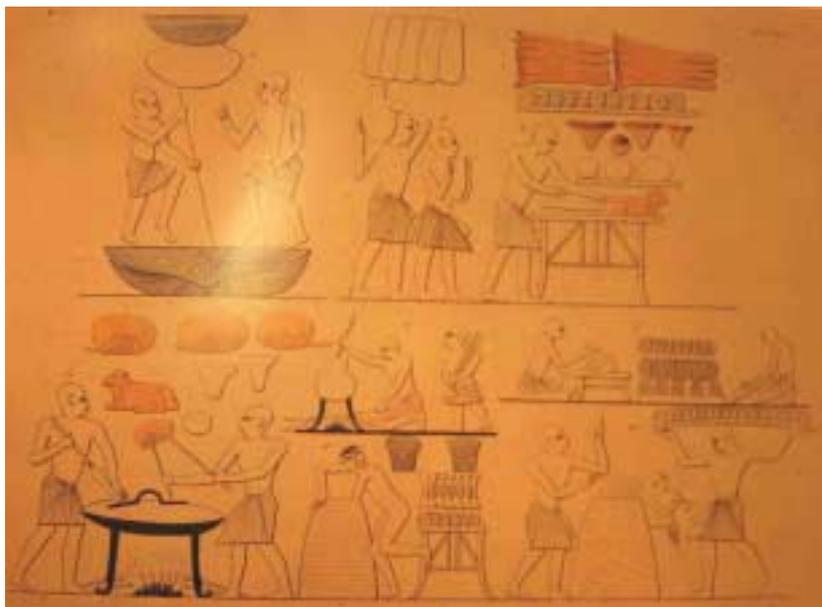


Abb. 2.2: Bäckerei am Hofe Pharaos Ramses III; Wandzeichnung in thebanischer Pyramide ca. 1400 v. Chr. [22]

Obwohl der Mensch damals über die Existenz von Mikroorganismen oder gar Enzymen keine Kenntnisse hatte, waren die Anwendungen über die Produktion von Brot und Bier hinaus sehr mannigfaltig. Belege hierfür finden sich beispielsweise in Texten von Plinius dem Älteren und Tacitus:

(...)Als Getränk dient den Germanen ein Saft aus Gerste und Weizen, der ähnlich dem Wein vergoren ist. Die in der Nähe des Rheines wohnen, verschaffen sich auch echten Wein. Die

Kost ist einfach: wildgewachsenes Obst, frisches Wildbret oder geronnene Milch. Sie kleiden sich in Felle sowie Wolle und Leinenstoffe, die sie blau färben. (...)

Tacitus; aus „Germania“ [23] ca. 100 n. Chr.

Etwa zur gleichen Zeit teilt Plinius mit, dass die Germanen mit dem Schaum auf gärendem Bier Brot backen. In diesen Textauszügen finden sich, neben der bereits angesprochenen Produktion von Brot und Bier, weitere biotechnologische Verfahren, die noch heute so oder in einer modernisierten Form großtechnisch angewendet werden: Die Produktion von Sauermilchprodukten, Blaufarbstoff (Indigo) und Leinen. Weitere bekannte historische fermentativ gewonnene Produkte, die in weiteren historischen Schriftstücken belegt sind, sind beispielsweise Sojasoße (Fermentation mittels Schimmelpilzen in China ca. 1500 v. Chr.) und Essig (ca. 300 v. Chr.). Ein Überblick über solche Verfahren findet sich in der Tabelle 2.1.

Tab. 2.1: Geschichtliche Entwicklung der Biotechnologie nach [24]

3000 v. Chr.	Alkoholische Gärung zuckerhaltiger Obstsäfte
2800 v. Chr.	Braustuben in Mesopotamien (älteste schriftliche Dokumente der Biotechnologie) Entwicklung des Sauerteiges in Ägypten
1500 v. Chr.	Phönizier gewinnen Kupfer mit Hilfe von Mikroorganismen Produktion von Sojasoße durch Schimmelpilze (China)
300 v. Chr.	Verwendung von Essig
1300	Spirulina-Mikroalgen als Nahrung bei den Azteken
1400	Produktion von Salpeter „Industrielle“ Essigsäureproduktion
1676	Antonie von Leeuwenhoek entdeckt mit Hilfe des Mikroskops Mikroorganismen („Animalculata“)
1837	Hefen als Verursacher der alkoholischen Gärung entdeckt
1849	„Wiener Verfahren“ zur Produktion von Bäckerhefe
1857	Louis Pasteurs Veröffentlichungen über die Gärung von Milchsäure und Alkohol
1881	Industrielle Milchsäureproduktion (Boehringer) Robert Koch veröffentlicht Methoden zur Kultivierung von Bakterien
1893	Mikrobielle Produktion von Zitronensäure aus Zucker Beginn der Enzymologie durch die Versuche von E. Buchner (Gärung durch Zellextrakte)
1913	Belebtschlammverfahren für Kläranlagen
1915	Patent zur Verwendung von Enzymen in Waschmitteln
1914-1916	Großbetriebe der technischen Mikrobiologie zur Produktion von Glycerin und Aceton
1928	Alexander Flemming entdeckt das Penicillin
1937	Mikrobielle Produktion von Vitamin C
1941/42	Aufbau der großtechnischen Produktion von Antibiotika

Durch die hier aufgeführten Beispiele lässt sich erkennen, dass die historischen biotechnologischen Verfahren zu Produkten führten, für die andere Produktionsprozesse nicht oder nur sehr unzureichend zur Verfügung standen. Man kann in diesem Zusammenhang von der Biotechnologie als Alleinstellungsmerkmal sprechen; d. h. eine Vielzahl von Produkten war und ist nur über die Biotechnologie darstellbar.

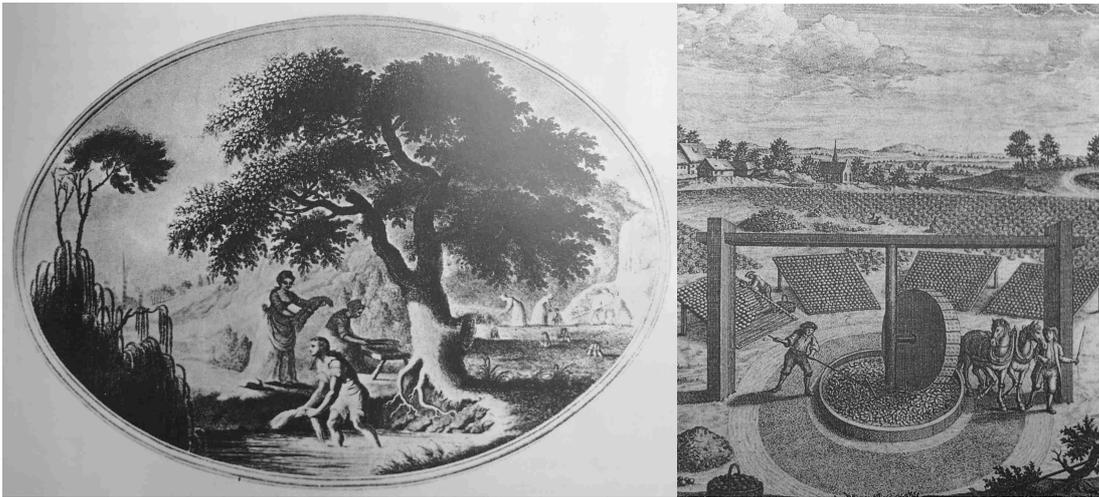


Abb. 2.3: Historische biotechnologische Verfahren; links: Flachs rüsten zur Leinenproduktion, zeitgenössische Darstellung aus dem 18. Jhd.; rechts: Waidmühle zur Indigoproduktion, zeitgenössische Darstellung aus dem 17. Jhd. [22]

Diese Tatsache findet sich in der heutigen Zeit insbesondere bei den Forschungsaktivitäten im Bereich der Biomedizin (rote Biotechnologie) wieder. Auch moderne organische Synthesen kommen an den Rand der Leistungsfähigkeit, wenn es um die Herstellung komplexer Naturstoffe (Pharmazeutika) geht. Deutlichstes Beispiel für die Alleinstellung ist das Tissue Engineering. Nur über die Zellkultivierung lassen sich „synthetische“ Gewebe effizient herstellen. Wo aber findet man Beispiele, die die Leistungsfähigkeit der Biotechnologie gegenüber anderen (chemischen) Verfahren aufzeigen, bei denen dieses Alleinstellungsmerkmal nicht zutreffend ist? Gibt es auch in der Historie Vorgänge, welche die eingangs gestellte Frage der Substitutionsfähigkeit der Biotechnologie unter Beweis stellen?

Häufig sind es äußere Zwänge (meist ökonomischer Art), die zur Entwicklung neuer Verfahren führen, um schwer zugängliche Produkte leichter und in Zeit von Engpässen überhaupt zur Verfügung zu stellen. Es stellt sich somit eine „zwanghafte“ Substitution

bestehender Verfahren ein. Die Tabelle 2.1 liefert für diese Fragestellung entsprechende Beispiele. So wurden bereits im späten Mittelalter Mikroorganismen eingesetzt, um kriegswichtige Güter zu produzieren. Gemeint ist die mikrobiologische Produktion von Salpeter (Kaliumnitrat) zur Herstellung von Schwarzpulver, wie sie im „Probirbuch“ des Königlich-Böhmischen Oberberg- und Münzmeister Lazarus Ercker beschrieben wird. Das Kaliumnitrat kam üblicherweise aus Indien nach Venedig. Von dort aus ging es über die Alpen-Handelstraßen nach Deutschland. Als man in Venedig, welches das Handelsmonopol mit Indien besaß, den Preis für Salpeter immer weiter anhub, suchten insbesondere die süddeutschen Städte wie Nürnberg nach einer neuen Quelle für dieses Produkt. Es entstanden die Salpeterwiesen, auf denen durch nitrifizierende Bakterien aus Gülle das Nitrat gewonnen werden konnte (Abb. 2.4).



Abb. 2.4: Mittelalterliche Salpeterplantage aus dem „Probirbuch“ des Lazarus Ercker (1529); Darstellung aus der Ausgabe von 1703; nach [22]

Zu Beginn des Ersten Weltkrieges konnte das Deutsche Reich aufgrund der Seeblockade der Briten nicht mehr die Pflanzenöle importieren, die zur Gewinnung von Glycerin und damit für die Sprengstoffproduktion benötigt wurden. Daraufhin ging man dazu über, Glycerin mit Hilfe von Hefen zu produzieren. Die Deutschen wiederum blockierten die Lieferung von Aceton und n-Butanol nach Großbritannien. Aceton wurde zur Munitionsherstellung und n-Butanol für die Gewinnung von künstlichem Gummi benötigt. In der Folge entwickelten die

Briten technische Verfahren zur Aceton-Butanol-Gärung, die mit Hilfe des Bakteriums *Clostridium acetobutylicum* durchgeführt wurden [25].

Während der beiden Weltkriege sind verschiedene industriell genutzte biotechnologische Verfahren etabliert worden, die auch heute noch Bestand haben. Genannt werden können z. B. die Produktion von Zitronensäure durch *Aspergillus niger* und die Produktion diverser Antibiotika. Die meisten im Laufe dieser Zeit entstandenen biotechnologischen Verfahren sind allerdings wieder aus der industriellen Landschaft verschwunden (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Produkte, deren biotechnische Produktionsverfahren durch chemisch-technische ersetzt worden sind; nach [26]

Stoffbezeichnung
Aceton
1-Butanol
2-Propanol (Isopropanol)
Oxalsäure
Kaliumnitrat
Indigo

Welches waren die Gründe, dass diese Verfahren wieder verschwanden? Eine Ursache wird bereits vor zweihundert Jahren bei der mikrobiellen Produktion von Salpeter deutlich. Das mikrobielle Verfahren konnte zu Beginn des 19. Jhd. ökonomisch mit dem billigen „Chilesalpeter“ nicht mehr konkurrieren und verschwand vollständig. Es sind in der Regel ökonomische Gründe, die den Fortbestand oder den Wegfall eines industriellen Produktionsprozesses bestimmen. Es sollte aber gefragt werden, ob eine solche rein wirtschaftliche Entscheidungsweise nicht zu oberflächlich ist. Man sollte bei der Bewertung eines biotechnischen Verfahrens folgende Überlegungen einfließen lassen [24]:

- Biotechnische Verfahren führen unter relativ milden Reaktionsbedingungen zu hoch selektiven bzw. hoch spezifischen Produkten.
- Biotechnische Verfahren verwenden häufig nachwachsende Rohstoffe als Ausgangsstoffe und können damit zur viel diskutierten „Nachhaltigkeit“ von Verfahren und Produkten („Sustainable Development“) beitragen.

- Biotechnische Verfahren lassen sich dank moderner Prozessanalytik unter eng gesetzten Verfahrensbedingungen optimal durchführen.

Vor diesem Hintergrund lassen sich nach heutigem Kenntnisstand relevante Bioprozesse ermitteln, die ein Substitutionspotential gegenüber klassisch-chemischen Verfahren besitzen oder erwarten lassen. Diese sollen in Kapitel 3 exemplarisch etwas näher betrachtet werden.

Wie aber sieht der heutige biotechnologische Markt aus, in den man mit neuen Verfahren oder Produkten einsteigen oder in dem man Substitutionsschritte vornehmen kann? Es soll an dieser Stelle in Grundzügen auf die Schilderung insbesondere des deutschen und europäischen Marktes eingegangen werden. Grundlage für die Schilderungen sind weitestgehend die von Ernst & Young und Consors Capital erstellten Reporte [4, 5, 27, 28].

Das Jahr 2000 war aus Sicht der Analysten für die europäische Biotechnologie-Industrie das bisher erfolgreichste Jahr. Hinsichtlich der Kapitalbeschaffung, der Marktbewertung, der Umsatzerlöse, der Anzahl der Firmen und der Beschäftigten erreichte der Biotechnologie-Sektor ein Rekord-Niveau. Allianzen, Fusionen und Unternehmenskäufe nahmen gegenüber dem Vorjahr um 41 Prozent zu. Insgesamt wurden Ende 2000 485 deutsche Firmen gezählt (1998: 360; 1999: 430), deren Hauptzweck die Kommerzialisierung der modernen Biotechnologie ist. Damit nimmt Deutschland die Spitzenposition in Europa ein. Die Gesamtzahl der Mitarbeiter in diesen Unternehmen lag bei knapp 11.000. Im europäischen Durchschnitt liegt der Zuwachs an Biotechnologie-Unternehmen bei 16 Prozent. Der Gesamtumsatz deutscher Biotechnologie-Unternehmen stieg im Jahr 2000 um 52 Prozent auf 786 Mio. Euro. Mit 10.673 Beschäftigten arbeiteten 31 Prozent mehr Menschen im deutschen Biotechnologie-Sektor als im Vorjahr. In Forschung und Entwicklung wurden 719 Mio. Euro investiert, mehr als doppelt soviel wie im Jahr 1999. Nach Einschätzung der Ernst & Young-Studie wird das Gewicht der Biotechnologie-Unternehmen gegenüber den großen Pharma-Unternehmen steigen. Wurden im Jahr 1998 beispielsweise noch 86 Prozent der Biotechnologie-Allianzen zwischen Pharma- und Biotechnologie-Unternehmen geschlossen, sank dieser Anteil im Jahr 2000 auf 64 Prozent. Hinsichtlich der Kapitalaufbringung, der Bewertung und des Marktzugangs werden die Biotechnologie-Unternehmen zunehmend unabhängiger von den großen Pharma-Unternehmen. Biotechnologie-Unternehmen werden künftig vermehrt Allianzen untereinander schließen. Dessen ungeachtet werden Pharmafirmen jedoch immer attraktive Partner für Biotechnologie-Unternehmen bleiben [29]. Die von Ernst

& Young erhobenen Daten beziehen sich zum großen Teil auf die Angaben sogenannter ELISCOs (Entrepreneurial Life Science Companies). Diese Unternehmen haben „(...) den ausschließlichen Geschäftszweck in der Kommerzialisierung der modernen Biotechnologie. Diese umfasst die Erforschung, Entwicklung und Vermarktung von Produkten, Technologien und Dienstleistungen auf Basis der modernen Biotechnologie. Die Anwendungsgebiete liegen im Bereich Gesundheit (Prophylaxe, Therapeutika und Diagnostik), Landwirtschaft, Ernährung, biotechnologische Feinchemikalien- und Grundstoffproduktion sowie Umweltschutz. Diese Sektoren werden generell zur sogenannten „Life Sciences-Industrie“ zusammengefasst (...)“ [5]. Unter der modernen Biotechnologie werden in dieser Definition „(...) alle innovativen Methoden, Verfahren oder Produkte verstanden, die die wesentliche Nutzung von lebenden Organismen oder ihrer zellulären und subzellulären Bestandteile beinhalten und dabei im Rahmen eines ursächlich verständnisbasierten Ansatzes von Erkenntnissen der Forschung auf den Gebieten Biochemie, Molekularbiologie, Immunologie, Virologie, Mikrobiologie, Zellbiologie oder Umwelt- und Verfahrenstechnik Gebrauch machen. (...)“ [5].

Welcher der eben genannten Zweige macht aber nach Einschätzung der Analysten den größten Markt im Bereich der modernen Biotechnologie aus? Eine Antwort findet sich in der Literatur [5] bei der Nennung der „Top Ten“ der Biotech-Produkte. Es sind ausschließlich Produkte aus dem Pharmabereich. Auf den Plätzen eins bis drei liegen Epogen, Procrit und Neupogen (alles Produkte des amerikanischen Unternehmens Amgen) mit einem Jahresumsatz von insgesamt 4,5 Milliarden US \$. So ist es nicht sehr verwunderlich, wenn das Interesse und die Aktivitäten der Kapitalmärkte (Venture Kapital etc.) auf diesen Bereich (inkl. der transgenen Tiere und des Tissue Engineerings) fokussiert sind. Ein Markt, der ebenfalls Beachtung findet, liegt im Bereich der Pflanzenbiotechnologie (hauptsächlich resistente Pflanzen) und der damit verbundenen Ernährung (Novel- und Functional Food).

Im Jahre 1999 akquirierten die ELISCOs, die in den oben genannten Bereichen tätig sind, in Deutschland rund 260 Millionen Euro an Venture Kapital und weitere 185 Millionen Euro aus Emissionserlösen durch Börsengänge [5]. Im Jahr 2000 konnten die europäischen Firmen insgesamt knapp 6 Milliarden Euro an den Börsen hinzu gewinnen und 39 Unternehmen führten einen IPO (Initial Public Offering) durch. Der komplette Börsenwert der europäischen Unternehmen lag Ende 2000 bei fast 75 Milliarden Euro [27, 30]. Aktuelle Zahlen für das Jahr 2001 lagen zum Zeitpunkt des Erstellens dieser Schrift noch nicht vor. Der allgemeine

Abwärtstrend an den Börsenplätzen im Jahr 2001 spiegelt sich natürlich auch in den Biotech-Unternehmen wider. Verdeutlicht wird dieses durch den Verlauf des NEMAX-Biotechindex im Zeitraum 2000 – 2002 (Abbildung 2.5).



Abb. 2.5: Verlauf des NEMAX-Biotechindex über den Zeitraum von Mai 2000 bis Februar 2002 [31]

Diese Entwicklung hat im Jahr 2001 starken Einfluss auf die ELISCOs genommen. Viele Börsengänge wurden verschoben und die Verfügbarkeit von Venture Kapital war rückläufig. Keinen Einfluss gab es aber anscheinend auf die strukturelle Ausrichtung der Biotechnologie-Unternehmen. Zentraler Fokus ist und bleibt der biomedizinische Sektor. Dieses gilt nicht nur für den europäischen und amerikanischen Bereich. Neueste Daten aus Australien [32] belegen dieses eindrucksvoll (Abbildung 2.6).

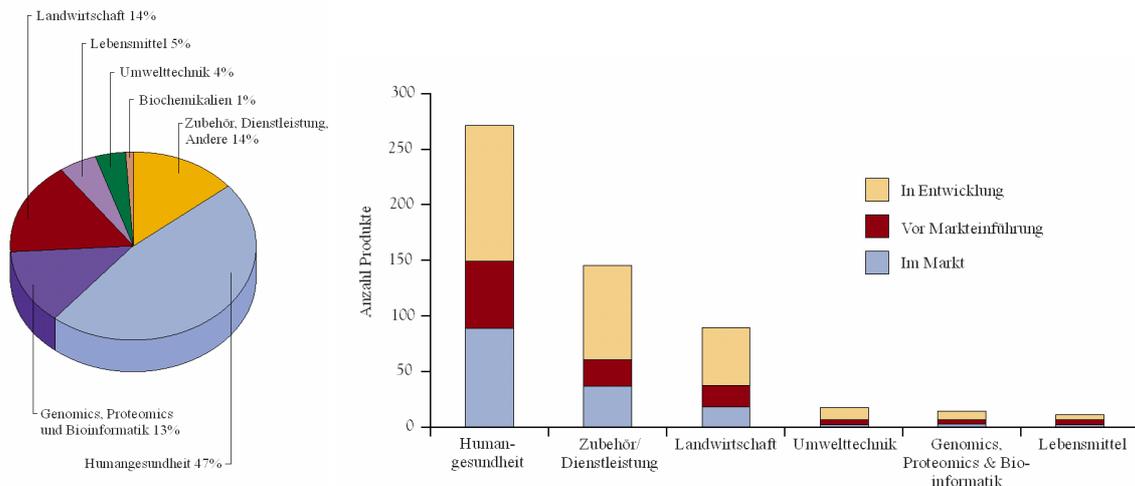


Abb. 2.6: Strukturierung des australischen Biotechnologiemarktes; Links: Verteilung der Unternehmen; Rechts: Produktentwicklungen im Jahr 2001 [32]

Kann diese Fokussierung der Förderung und der Finanzierung die so oft geforderte „nachhaltige Entwicklung“ im Bereich der Biotechnologie gewährleisten? Man sollte bei diesen Betrachtungen ebenfalls in Betracht ziehen, dass das Marktvolumen chemischer Produkte weltweit bei ca. 1.726 Milliarden US \$ [33] und der Weltmarkt für Nahrungsmittel bei ca. 3.000 Milliarden US \$ liegt. In diesen beiden Bereichen spielen biotechnologische Verfahren teilweise bereits eine wichtige Rolle, oder könnten eine solche einnehmen (s. a. Kap. 3, 5 und 6). Das Marktvolumen der europäischen und US-amerikanischen Biotech-Unternehmen liegt zusammen bei ca. 33 Milliarden Euro [27]. Davon stammen 786 Millionen aus Umsätzen deutscher ELISCOs (Jahr 2000). Der Börsenwert der europäischen ELISCOs wurde wie dargelegt Ende 2000 mit 75 Milliarden Euro gehandelt; dem stehen Umsätze in der Höhe von rund 8,6 Milliarden Euro gegenüber.

Ein direkter Vergleich dieser Zahlen mit den Umsatzzahlen der chemischen Industrie ist sicherlich nicht zulässig. Auch liegen die Umsätze bei etablierten Großunternehmen anderer Wirtschaftsbereiche in anderen Dimensionen. So setzte alleine Daimler-Chrysler im Jahr 2000 mehr als 160 Milliarden Euro um, also rund das fünffache aller Biotech-Firmen weltweit. Auch eine Handelskette wie Rewe oder Tengelmann weist Jahresumsätze nach, die bei 30 Milliarden Euro liegen. Dieses müssen auch die Analysten eingestehen. So findet sich in der Literatur [5] der Hinweis: „(...) Nach wie vor ist die Wirtschaftskraft der deutschen ELISCOs und Extended Core Companies nicht mit derjenigen etablierter Industriezweige zu vergleichen. So war der kumulierte Umsatz aller deutschen ELISCOs und Extended Core Companies mit fast 1,5 Milliarden Euro gerade mal so hoch wie der Umsatz eines mittelständischen Unternehmens der Maschinenbau-Industrie (...)“. Das große Interesse der Kapitalmärkte an der Biotechnologie besteht in den prognostizierten Wachstumsraten der Biotechnologie. Während die Wachstumsraten in den etablierten Industriezweigen eher verhalten sind, sehen Analysten noch exponentielles Wachstum in bestimmten Bereichen der Biotechnologie (vornehmlich wieder in der Biomedizin). Allein für den Sektor der therapeutischen Antikörper wird für den Zeitraum von 2002 bis 2010 eine Steigerung des Umsatzes von mehreren hundert Prozent erwartet. Derzeit sind zehn monoklonale Antikörpermedikamente auf dem Markt, drei weitere warten auf eine Zulassung. Nach Expertenschätzungen sollen bis 2010 bis zu 100 therapeutische Antikörper auf dem Markt sein. In den nächsten Jahren geht man von fünf bis zehn Zulassungen pro Jahr aus.

Durch die in diesem und in Kapitel 1 genannten Daten, wird der momentane Fokus von staatlicher Förderung und privater Finanzierung auf den pharmazeutischen Sektor verdeutlicht. Hohe Wachstumsraten in diesem Sektor sind insbesondere in Hinblick auf Venture Kapital ein attraktiver Faktor. Darüber hinaus sollte man aber berücksichtigen, dass im chemischen (verfahrenstechnischen) Sektor ein enormes Potential für mögliche biotechnische Prozesse liegt, welches das Volumen der von Analysten bevorzugten ELISCOs weit übersteigen könnte (zur Erinnerung: Umsatzvolumen der chemischen Industrie ca. 1,8 Billionen US \$). Ein Teil der enormen Wertschöpfung der chemischen Industrie könnte auch über biotechnologische Verfahren erlangt werden. Dass der Bereich der chemischen Industrie (Grund- und Feinchemikalien) ein interessantes Betätigungsfeld für die Biotechnologie darstellt, ist natürlich keine neue Erkenntnis dieser Arbeit. Dieses Potential versuchten verschiedenste Gutachten innerhalb der letzten Jahre zu erfassen und zu charakterisieren [5, 24, 26, 33, 34, 35, 36]. Diese Überlegungen und die mit im Rahmen dieser Arbeit entstandene Ausweitung auf Fragen der Minderung des Anlagenrisikos und der Senkung des Störfallpotentials sollen mit Kapitel 3 den naturwissenschaftlichen Ergebnissen vorangestellt werden.

### **3 Substitutionspotentiale der Biotechnologie**

Wie in Kapitel 2 beschrieben, wurden – wenn dieses auch eine stark vereinfachte Betrachtungsweise ist – in der Vergangenheit Innovationen durch ihre ökonomische Triebkraft oder durch ihr Alleinstellungsmerkmal „Biotechnologie“ im Markt umgesetzt. Diese Einstellung weicht in den letzten Jahren neuen Faktoren. Sicherlich spielt der letztendlich zu erzielende Gewinn immer noch eine zentrale Rolle; es wird aber auch zunehmend wichtiger sich in Hinblick auf ökologische Fragestellungen und Sicherheitsaspekte mit Alternativen zu chemischen Prozessen zu beschäftigen. Hier setzen verschiedensten Gutachten an, die in den letzten fünf bis zehn Jahren die Ist-Situation beschrieben und Anforderungen an die Zukunft gestellt haben. Anhand dieser Gutachten soll hier versucht werden, eine Antwort auf die eingangs gestellte Frage zu finden, ob und wenn ja in welchen Bereichen moderne biotechnologische Verfahren herkömmliche chemische Verfahren oder Prozessschritte substituieren können. Hierzu soll im Nachfolgenden diskutiert werden, welche Grund- oder Feinchemikalien zur Zeit biotechnologisch prinzipiell darstellbar wären und welche Hemmnisse zur Umsetzung dieser Verfahren bestehen.

#### **3.1 Der Stand der Biotechnologie in Hinblick auf Grund- und Feinchemikalien**

Spricht man von Substitutionspotentialen so wird es grundsätzlich für sinnvoll gehalten, zwei Arten von Substitutionen zu unterscheiden:

1. Biotechnische Verfahren, die klassisch-chemische Produktionsverfahren ganz oder teilweise ersetzen können.
2. Biotechnische Verfahren, die zu Substituten herkömmlicher Produkte führen, die durch klassisch-chemische Verfahren gewonnen wurden.

Im Bereich der klassisch-chemischen Verfahrensweise, z. B. der Grundchemikalienproduktion erweisen sich biotechnische Alternativen im Allgemeinen unter folgenden Aspekten als vorteilhaft:

- Biotechnische Verfahren führen unter relativ milden Reaktionsbedingungen zu hoch selektiven bzw. hoch spezifischen Produkten.
- Biotechnische Verfahren verwenden häufig nachwachsende Rohstoffe als Ausgangsstoffe und tragen damit zur viel diskutierten „Nachhaltigkeit“ von Verfahren und Produkten bei („Sustainable Development“).
- Biotechnische Verfahren lassen sich unter geringen Druck- und Temperaturverhältnissen durchführen.

Vor diesem Hintergrund lassen sich bei heutigem Kenntnisstand relevante Bioprozesse ermitteln, die ein Substitutionspotential gegenüber klassisch-chemischen Verfahren besitzen oder erwarten lassen. Beschränkt man die Betrachtung auf die Substitutionsmöglichkeiten der Biotechnologie gegenüber klassisch chemischen Verfahrensprozessen, so ergeben sich neben den oben genannten Gründen weitere Faktoren, die für den Einsatz biotechnischer Verfahren sprechen. Die verwendeten katalytischen Einheiten (Enzyme) sind in der Regel substrat- und wirkungsspezifisch, was gezielte Synthesen bis hin zur Enantioselektivität ermöglicht. Edukte können so gezielter eingesetzt werden, Nebenreaktionen vermieden und somit die Produktausbeuten gesteigert werden. Dieses sind alles Faktoren, die zu einer ökonomischen und ökologischen Optimierung des Verfahrens führen und damit ebenso zu einer Verbesserung des Umweltschutzes. Eine Reihe industriell biotechnisch hergestellter Stoffe belegt diese Vorteile. Eine Übersicht liefert Tabelle 3.1.

Tab. 3.1: Industriell, biotechnologisch hergestellte Stoffe [24, 26, 33, 36]

Produkt	Hersteller
Acrylamid	Nitto, DSM
6-Aminopenicillansäure	Smith Kline Beecham, Tanabe
7-Aminocephalosporansäure	Chemferm Hoechst, Asahi, Eli Lilly
Äpfelsäure	Tanabe
Aromastoffe	Haarmann & Reimer, Givaudan Roure
Asparaginsäure	Ajinomoto, Tanabe
Aspartam	Toyo Soda, DSM
Essigsäure	diverse

Produkt	Hersteller
Ethanol	diverse
Ethylenglycol	Industrial Development Co. (Südafrika)
Fumarsäure	diverse
Gluconsäure	diverse
L-Methionin	Degussa-Hüls, Tanabe
L-Milchsäure	ADM, Cargill
Nicotinamid	Lonza
optisch aktive Amine	diverse
Pantolacton	diverse
Propylenglycol	Industrial Development Co. (Südafrika)
semisynthetische Penicilline	diverse
Vitamin B <sub>2</sub>	BASF, Rhône-Poulenc, Hoffmann-La Roche
Zitronensäure	ADM

In verschiedenen Gutachten [5, 24, 26, 33, 34, 35, 36] wurden Produktionsbereiche hervorgehoben, in denen die größten Substitutionspotentiale gesehen werden. Hierzu zählen die Lebensmittel- und Getränkeindustrie, die Papier- und Zellstoffindustrie sowie die Textilindustrie. In diesen Bereichen hatte auch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt ihren Förderschwerpunkt zur nachhaltigen Biotechnologie „Einsatz biotechnologischer Verfahren und Produkte im Sinne eines produkt- bzw. produktionsintegrierten Umweltschutzes in ausgewählten Industriebranchen“ aufgebaut. Die Kernaussage der aufgeführten Gutachten lässt sich – natürlich stark vereinfacht – wie folgt zusammenfassen [24]:

**„Da biotechnische Verfahren zur Stoffproduktion und –umwandlung unter milden Bedingungen, in wässrigen Medien und mit hoher Selektivität und Spezifität ablaufen, scheinen sie ein erhebliches Potential für den (...) Umweltschutz zu bergen.“**

Innerhalb der Gutachten sind eine Vielzahl von biotechnologischen Verfahren identifiziert worden, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien beziehungsweise bereits in der industriellen Umsetzung befinden (s. Tabelle 3.1). Einen wichtigen Meilenstein stellt sicherlich die von der OECD erstellte Studie „Biotechnologie für umweltverträgliche industrielle Produkte und Verfahren“ dar [33]. In diesem Gutachten finden sich auch all jene

Verfahren wieder, die vor mittlerweile fast einhundert Jahren schon einmal industriell eingesetzt worden sind (siehe auch Kapitel 2; z. B. die Gärungsprodukte von *Clostridium acetobutylicum*), aber aus wirtschaftlichen Interessen eingestellt worden sind. Grund für diesen Rückzug war die rasante Entwicklung der Petrochemie. Durch sie konnten die Produkte preiswerter und auch effizienter hergestellt werden.

Studien im Auftrag des Umweltbundesamtes [24, 26] ermittelten mit der Blickrichtung der Substituierbarkeit 54 verschiedene Grund- und Feinchemikalien, die über biotechnologische Verfahren hergestellt werden könnten. Tabelle 3.2 listet die Chemikalien auf, bei denen eine biotechnologische Verfahrensvariante bekannt ist, diese aber industriell noch nicht umgesetzt worden ist bzw. sich gerade in der Umsetzung befindet.

Tab. 3.2: Grund- und Feinchemikalien für die biotechnologische Verfahren bekannt sind, der biotechnologische Prozess aber nicht industrialisiert ist; nach [24, 26]

<b>Grund- oder Feinchemikalie</b>	<b>Grund- oder Feinchemikalie</b>
1,3-Propandiol	Itaconsäure
2,3-Butandiol	L-Phenylalanin
2-Propanol (Isopropanol)	Mannitol (Mannit; D-Mannohehexan-1,2,3,4,5,6- hexaol)
Aceton	Methanol
Acrylsäure	Muconsäure
Adipinsäure	Oxalsäure
Bernsteinsäure	Propionsäure
Butanol	Propylenoxid
Buttersäure	Propylenoxid (1,2-Epoxypropan)
Dichlorethan	Sorbit
Epichlorhydrin	Vanilin (4-hydroxy-3- Methoxybenzaldehyd)
Ethanol	Vitamin B1 (Thiamin)
Ethylen	Vitamin B5 (Pantothensäure)
Ethylenoxid	Vitamin C
Formaldehyd	Vitamin E (Tocopherol)
Glycerin	Vitamin Niacin (Nikotinsäure)
Indigo	

Welche wirtschaftlichen Perspektiven lassen sich aus diesen potentiell biotechnologisch herstellbaren Produkten ableiten? Zwar ist es sehr schwer, konkrete Umsatzzahlen zu den einzelnen Produkten für Deutschland oder weltweit zu erhalten, anhand einiger Eckdaten [24,

36, 37] lässt sich aber eine Abschätzung anstellen. So finden sich allein in den Tabellen 3.1 und 3.2 mit Ethylen, Ethylenoxyd, Dichlorethan, Propylen, Formaldehyd und Propylenoxyd insgesamt sechs der „Top Ten“ der Top-Seller der chemischen Industrie mit einem ungefähren Gesamtumsatz von 16 Mrd. US \$ weltweit, für die zu mindestens im Labormaßstab biotechnologische Verfahren zur Verfügung stehen. Eine Weiterentwicklung bis hin zur Produktion würde hier einen großen Markt für die Biotechnologie öffnen.

An diesem Beispiel zeigt sich, dass die biotechnologische Verfahrenstechnik eine zentrale Rolle in großtechnischen Prozessen spielen könnte und es somit neben den Anwendungen im Bereich der Humangesundheit oder Pflanzenzüchtung vielfältige andere Betätigungsfelder auch innerhalb der chemischen Industrie gibt. Die reine Verfügbarkeit eines biotechnischen Verfahrens impliziert aber noch nicht dessen industrielle Tauglichkeit. Eine Substitution eines Verfahrensschrittes wird für ein Unternehmen nur dann sinnvoll, wenn daraus klare Vorteile für das Unternehmen resultieren. Welche Vorteile sich aus der Umsetzung in die industrielle Praxis ergeben könnten, soll anhand der Substituierung bestehender chemischer Prozesse im nächsten Abschnitt beispielhaft nachgegangen werden.

### **3.2 Hemmnis oder Innovation? Die Biotechnologie auf dem Weg in die chemische Industrie**

In Hinblick auf eine Umstellung eines chemischen Verfahrens stellen wirtschaftliche oder Marketinggründe bzw. rechtliche Rahmenvoraussetzungen bestimmende Faktoren dar. Es muss i.a. einen zwingenden betriebswirtschaftlichen Grund geben, um von einem etablierten chemischen Verfahren auf ein biotechnologisches Verfahren umzustellen. Daher ist in Hinblick auf eine Substituierbarkeit im Sinne der Nachhaltigkeit auch die Frage der Wirtschaftlichkeit zu stellen. Eine scheinbar unzureichende Wirtschaftlichkeit mag mit der Grund dafür sein, dass bisher nur wenige Verfahren in den letzten Jahren ersetzt worden sind (Wegfall des äußeren Zwanges).

Es soll an dieser Stelle auf eine Bewertung von Substitutionsmöglichkeiten in der chemischen Industrie eingegangen werden. Die hier getroffenen Feststellungen beruhen neben Literaturdaten auf eigenen Untersuchungen [24], die im Rahmen eines Gutachten für das Umweltbundesamt, Berlin, durchgeführt worden sind.

Die Herstellung chemischer Produkte folgt seit jeher dem technisch machbaren und effektivsten Verfahren einerseits und der wirtschaftlichsten Lösung andererseits. Selbstverständlich sind in der Abwägung hierbei auch Fragen der Sicherheit und nicht zuletzt des Umweltschutzes wie Ressourcenschonung und Emissionen etc. einbezogen worden. Von besonderer Bedeutung sind die Aufarbeitung des gewünschten Produktes und seine Reinheit im Rahmen effizienter Prozessführung. Anlässe, etablierte Verfahren zu ändern, können in allen Bereichen liegen, sind aber besonders dann zu erkennen, wenn neue Technologien zum Einsatz kommen oder technisch-wirtschaftliche Randbedingungen sich geändert haben. Die seit einigen Jahren zu erkennende Entwicklung biotechnischer Prozesse zur Herstellung von Grund- und Feinchemikalien ist sicherlich auch dem EDV-Einsatz in Prozessanalytik und Prozesssteuerung (siehe auch Kapitel 6) zu verdanken, der diese Prozesse effizienter und somit wirtschaftlicher ablaufen lässt. Gleichzeitig scheint es aber, als blieben im Rahmen des vorherrschenden Wettbewerbs Entwicklungen klassischer chemischer Verfahrensweisen eher auf die Optimierungen bestehender Prozesse beschränkt, als das im großem Maßstab Substitutionen durch biotechnologische Prozesse vollzogen werden.

Es lässt sich die These aufstellen, dass biotechnologische Produkte nur dann eine Chance erhalten, wenn sie wirtschaftlicher als die Produkte anderer Branchen herstellbar sind. Insgesamt gesehen müssen zur Einführung eines neuen biotechnologischen Verfahrens in der Regel die nachfolgenden Kriterien erfüllt bzw. deren negative Auswirkungen wiederlegt werden:

- Nachweis zumindest gleichbleibender Verfahrenszuverlässigkeit und Produktqualität
- Schnelle Amortisation des F+E-Aufwandes
- Kurzer Zeithorizont bis zur Produktreife
- Ausreichende Rohstoffverfügbarkeit für biotechnische Verfahren bei nachwachsenden Rohstoffen (siehe auch Kapitel 5)
- Reststoffverwertungskapazitäten des biotechnischen Verfahrens
- Vermeidung unerwünschter / nicht wirtschaftlich verwertbarer Koppelprodukte

Des weiteren zeigt sich, dass in der chemischen Industrie Skepsis gegenüber der Biotechnologie besteht, da aus der Sicht dieser Unternehmen

- ein großer Entwicklungsvorsprung der klassisch-chemischer Verfahren besteht,

- petrochemische Rohstoffe preisgünstig in ausreichender Menge zur Verfügung stehen,
- eine Substitution einzelner Prozessschritte den bestehenden Produktionsverbund negativ beeinflussen könnte,
- noch nicht genügendes biotechnologisches Know-how, insbesondere im Scale-up, zur Verfügung steht und das
- „technische“ Nachteile wie die Produktinhibierung, Infektionsanfälligkeit, enge Parametergrenzen und die hohe Automatisierungserfordernis hohe Kosten verursachen.

Einige dieser Punkte werden von Vertretern der chemischen Industrie spezifisch nur für biotechnologische Verfahren genannt, während andere Punkte für sämtliche Innovation zutreffen. Aber gerade in der Biotechnologie haben sich Vorurteile aufgebaut, die teilweise nur schwer argumentativ abgebaut werden können.

Stellt man die chemisch-technische Verfahrensweise der biotechnologischen gegenüber, so ergeben sich bereits in dieser sehr einfachen Betrachtungsweise Faktoren, die biotechnologische Verfahren chemischen Verfahren im Vorteil erscheinen lassen.

Tab. 3.3: Vergleich der Verfahrensweisen „chemisch“ / „biotechnologisch“ [24]

<b>Chemische Verfahrensweise</b>	<b>Biotechnologische Verfahrensweise</b>
Störfallpotential größerer Anlageneinheiten	kleine, parallel betriebene Anlageneinheiten
häufig hoher Druck, Temperatur	milde Reaktionsbedingungen
stoffliches Gefahrenpotential (toxische Reaktionskomponenten)	i.a. geringe Human-/Ökotoxizität
Nebenreaktion, Nebenprodukte	i.a. hohe Spezifität, Selektivität
Exschutz bei Einsatz von organischen Lösemitteln	wässrige Systeme, verminderter Exschutz (aber: Wasserstoffbildung möglich)

Im Allgemeinen wird die Anwendung biotechnischer Verfahren unter Berücksichtigung ihrer gesellschaftlichen Wirkung somit als „umweltverträglich“ dargestellt. Dabei ist es allerdings unstrittig, dass „(...) der Beitrag der Biotechnologie zu einer Umweltentlastung nur im Einzelfall zu beurteilen ist, da Biotechnologie nicht per se umweltfreundlicher als die chemische Verfahrenstechnik ist (...)“ [38].

Die in Tabelle 3.3 genannten Unterschiede der beiden Verfahrensweisen kann man zu einer Bewertung der Vor- und Nachteile einer biotechnologischen Substitution vor dem Hintergrund heranziehen, dass:

- der Wunsch nach Wettbewerbsfähigkeit im Sinne der Vorteilhaftigkeit umweltverträglicher Produkte und Verfahren in Bezug auf Kosten und Marktnischen besteht,
- staatliche Maßnahmen bezüglich Veränderungen der Herstellungspraxis einen Zwang ausüben bzw. durch Förderung bezuschusst werden und
- der Druck seitens der Öffentlichkeit mit Einfluss auf die strategische Ausrichtung von Unternehmen im Rahmen umweltrelevanter Glaubwürdigkeit zunimmt.

Die ökologischen Vorteile werden vorwiegend in der Ressourcenschonung (Material- und Energieverbrauch, nachwachsende Rohstoffe) sowie in der Senkung der Schadstoff- und Abfallproduktion gesehen [33] (s. hierzu auch Kap. 5.4.3, 5.5.3, 6.2.3 und 6.3.3). Konkret wird in der Literatur [26] die Entlastung der Umwelt an folgenden Kriterien gemessen:

- Humantoxizität
- Ökotoxizität
- Aquatische und terrestrische Eutrophierung
- Naturraumbeanspruchung
- Photochemische Oxidantienbildung (Sommersmog)
- Abbau stratosphärischen Ozons
- Treibhauswirkung
- Versauerung

Erweitert man diese Aspekte im Sinne einer Risikovorsorge in Bezug auf die Anlagensicherheit (in Hinblick auf das Bundesimmissionsschutzgesetz [39], die Bundesimmissionsschutzverordnung [40] und die Umsetzung der sogenannten Seveso-II-Richtlinie [41, 42]), so könnten sich für den Anwender eines biotechnologischen Verfahrens für Grund- und Feinchemikalien Wettbewerbsvorteile dadurch ergeben, dass:

- geringere Aufwendungen im Bereich der Anlagensicherheit einschl. Rohstoffbevorratung (Explosions- und Brandschutz; MSR bei toxischen, aggressiven und zündfähigen Medien; redundante Auslegung etc.) getroffen werden müssen,
- eine gezieltere Produktion durch erhöhte Spezifität/Selektivität (weniger gefährliche Nebenprodukte und Verunreinigungen, Fortfall sicherheitsrelevanter Aufarbeitungsschritte) erfolgt und
- eine Reduzierung des Freisetzungspotentials durch kleinere, parallel betriebene Anlageneinheiten, evtl. dadurch auch Produktionsmöglichkeiten außerhalb hoch-integrierter Chemiestandorte, möglich ist [24].

In einem Gutachten [24] wurde darüber hinaus festgestellt, dass aus diesen Tatsachen heraus auch eine vereinfachte Genehmigungspraxis für neue Verfahren und verringerte Anforderungen an die Prüfungen bzw. Überwachung von Anlagen resultieren sollte. Es ergeben sich weiterhin Vorteile im Sinne des Arbeitnehmerschutz. Die Verminderung von Schadensfällen durch biotechnologische Verfahren insbesondere mit Auswirkung auf die Umgebung (Störfälle) und die Risikoabsenkung durch Verminderung des Gefahrenpotentials (Fortfall gefährlicher Einsatzstoffe oder Nebenprodukte) würde zu einer erhöhten Akzeptanz in der Öffentlichkeit führen. Durch den Fortfall toxischer Substanzen käme es zu einer Verminderung des Transportaufkommens gefährlicher Güter und somit zu einer Vermeidung ökologischer Rechenschaftspflicht, welche durch Havarien erzwungen wird. Verdeutlichen lassen sich diese Annahmen anhand von vier Beispielen. Durch das Aufstellung von Rankingkriterien (Stand der Entwicklung des biotechnologischen Verfahrens; wirtschaftliche Bedeutung (Jahresproduktionsmenge); Störfallrelevanz (Einstufung der gefährlichen Stoffe und der entsprechenden Mengenschwelle)) wurden die Verfahren zur Produktion von Acrylamid, L-Phenylalanin, Propylenoxid und n-Butanol ausgewählt [24]. Durch diese Beispiele werden die vier relevanten Entwicklungsstadien biotechnologischer Verfahren repräsentiert:

- n-Butanol ist ein Vertreter der Chemikalien, die bereits durch biotechnische Verfahren produziert wurden, welche aber wieder eingestellt worden sind [43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50].

- Acrylamid ist eine Verbindung, die bereits im industriellen Maßstab mit Hilfe biotechnologischer Verfahren enzymatisch produziert wird [51, 52, 53, 54, 55, 56].
- L-Phenylalanin gehört zur Gruppe der Stoffe, deren biotechnische Produktion über mikrobiologische Verfahren zur Zeit weltweit eingeführt wird [54, 57, 58].
- Propylenoxid steht als Beispiel für eine Anzahl Produkte, deren biotechnische Produktionsverfahren sich einerseits im Entwicklungsstand befinden, andererseits neue enzymatische Verfahren auch großtechnische Herstellungen in Aussicht stellen [59, 60, 61, 62].

In der Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse der Untersuchung zusammenfassend für diese vier Beispiele dargestellt. Eine schematische Gegenüberstellung der chemischen und der biotechnologischen Verfahren sowie der Prozessparameter der biotechnologischen Verfahren findet sich im Anhang 8.1.

Tab. 3.4 Substitutionspotentiale biotechnologischer Prozesse anhand ausgewählter Beispiele in Deutschland [nach 24]

Substitution	Umweltvorteile nach [26]	Senkung des Störfallpotentials	Minderung des Anlagenrisikos	Realisierung im ind. Maßstab	Anmerkungen
n-Butanol anaerobe Fermentation aus Glucose (Wiener Verfahren) <u>anstatt</u> Oxosynthese aus Propen durch Hydroformulierung und Aldehydhydrierung [63]	+ Verbrauch fossiler Rohstoffe	ja Propen, Wasserstoff Kohlenmonoxid	ja Fermentation gegenüber p bis 100 bar und T bis 196 °C	ehemals ABE-Verfahren neue Vorteile d. Wiener Verfahren (kontinuierlich)	Hindernisgrund der Umsetzung ist die Wirtschaftlichkeit; Aufbau eines kontinuierlichen Verfahrens ist notwendig
Acrylamid aus Acrylnitril mittels Nitrilhydrase <u>anstatt</u> Acrylnitril-Hydratisierung mit Schwefelsäure [64]	o/+ Ökotoxizität ++ Human-toxizität + Verbrauch fossiler Rohstoffe + Treibhaus-effekt	(ja) Blausäure	ja Biotransformation anstatt T bis 120 °C und erhöhter Druck	ja Beispiel für Umstieg	Produktion wird zu einem Großteil bereits biotechnologisch durchgeführt, ist aber ein Einzelfall

Substitution	Umweltvorteile nach [26]	Senkung des Störfallpotentials	Minderung des Anlagenrisikos	Realisierung im ind. Maßstab	Anmerkungen
Propylenoxid z. B. zwei-stufiges Verfahren mit Monooxygeasen <u>anstatt</u> Chlorhydrin-synthese [65]	++ Human-toxizität + Ökotoxizität	unwesentlich Chlor ersetzt durch Methan/ Methanol	eingeschränkt Chlor ersetzt durch Methanol/ Methan	vereinzelt (Monooxyge-nasen)	Wirtschaftlich-keit des biotech. Verfahrens muss noch unter Beweis gestellt werden (Durchsatz)
L-Phenylalanin fermentativ aus Glucose <u>anstatt</u> Umsetzung von Benzylchlorid mit CO/H <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub> oder Acetamid [66]	+ Treibhaus-effekt + / ++ Verbrauch foss. Rohstoffe (Herstellung aus Glucose)	nein z. Zt. keine Herstellung in Deutschland abstrakt: ja	ja mikrobiolo-gische Bedin-gungen gegenüber 60 °C/50 bar	ja (außerhalb Deutschland)	Der Vorteil des biotechnisches Verfahren (Enantiomeren-reinheit) wird das chemische Verfahren verdrängen

- ++ hohes Entlastungspotential durch biotechnische Verfahren
- + mittleres Entlastungspotential
- o neutral

Es zeigt sich an den hier vorgestellten vier Verfahren, dass mit Hilfe der Biotechnologie Vorteile in Hinblick auf ökonomische Faktoren und in Bezug auf sicherheitsrelevante Faktoren erzielt werden können. Im einzelnen lässt sich folgendes feststellen [24]:

#### n-Butanol

Bei Einsatz der anaeroben Fermentation aus Glucose nach dem kontinuierlich arbeitenden Wiener Verfahren gegenüber der konventionellen Oxosynthese aus Propen durch Hydroformulierung und Aldehydhydrierung ergibt sich ein eindeutiges Potential zur Absenkung der Störfallrelevanz durch Fortfall der im klassischen-chemischen Verfahren beteiligten Komponenten Propen, Wasserstoff und Kohlenmonoxid. Das bereits seit längerem bekannte und ehemals eingesetzte ABE-Verfahren unterlag als biotechnisches Verfahren jedoch den Wirtschaftlichkeitskriterien und wurde eingestellt. Das neue Wiener Verfahren lässt hier eine mögliche Umkehrung dieser Entwicklung erkennen. Vorteile ergeben sich insbesondere im Bereich der Minderung des unmittelbaren Anlagenrisikos, in dem die milden Bedingungen der Fermentation den hohen Drücken bis 100 bar und Temperaturen bis 196 °C des konventionellen chemischen Verfahrens gegenüberstehen. Zugleich ergibt sich ein Vorteil für die Umwelt durch den reduzierten Verbrauch fossiler Rohstoffe.

### Acrylamid

Ein weiteres Beispiel großtechnisch hergestellter Produkte ist Acrylamid. Zwar gehen die biotechnische Verfahrensalternative (Einsatz der Nitrilhydratase) und das klassische Schwefelsäurehydratisierungsverfahren beidermaßen vom Acrylnitril als Ausgangsprodukt aus. Es entfällt beim biotechnischen Verfahren jedoch die Entstehung der sehr giftigen Blausäure. Acrylamid wird deshalb bereits auch industriell durch Biotransformation hergestellt. Neben den Vorteilen der Öko- und Humantoxizität, der Berücksichtigung fossiler Rohstoffreserven und dem Treibhauseffekt, ergibt sich wiederum ein Vorteil im Bereich des unmittelbaren Anlagenrisikos durch die Vermeidung hohen Drucks und hoher Temperatur.

### Propylenoxid

Ersetzt man die Chlorhydrinsynthese durch ein biotechnisch zweistufiges Verfahren mit Monooxygenasen, so wird zwar Chlor als giftiges, aggressives und störfallrelevantes Edukt ersetzt, dafür kommt aber brennbares und giftiges Methangas zum Einsatz. Dennoch ergeben sich Vorteile in der Human- und Ökotoxizität. Bislang begrenzen in der Regel Wirtschaftlichkeit und Durchsatz den Einsatz des biotechnischen Verfahrens, wobei sich die Erfahrungen allerdings auf die bisher eingesetzten Monooxygenasen beziehen. Die neuere Entwicklung lässt erkennen, dass das biotechnische Verfahren wettbewerbsfähig gegenüber den klassischen Verfahren werden könnte. Der Risikovorteil dürfte hierbei jedoch nicht so ausschlaggebend sein, insbesondere weil Chlor als Schlüsselprodukt in den meisten Chemiestandorten nicht wegzudenken ist.

### L-Phenylalanin

Gegenüber der Umsetzung von Benzylchlorid mit Kohlenmonoxid, Wasserstoff und Ammoniak oder Acetamid bietet die fermentative Herstellung aus Glucose eine erhebliche Senkung des stofflichen Gefahrenpotentials. Da zur Zeit keine Produktion in Deutschland stattfindet, und gemessen an der Weltjahresproduktionsleistung eher kleinere Anlagen zu erwarten sind, fällt das unmittelbare Störfallsenkungspotential allerdings gering aus. International hat das biotechnische Verfahren bereits das klassisch-chemische Verfahren abgelöst. Wiederum ergeben sich Vorteile bei der unmittelbaren Anlagensicherheit allein aus der Absenkung von Druck- und Temperaturbedingungen.

Wie bereits weiter oben angemerkt, kann der Biotechnologie aber nicht per se der Vorteil zugesprochen werden, umweltfreundlicher und sicherer zu sein. Völlig aus Betracht gelassen

wurde hier der Einsatz gentechnisch veränderter Organismen zur Realisierung dieser Verfahren. Eine mögliche Gefährdung durch GMOs ist noch nicht abschließend untersucht worden und auch die öffentliche Meinung ist zur Zeit in diesem Bereich noch stark sensibilisiert. Deutlich wird aber, dass neben den biomedizinischen Bereich (Human Health etc.) ein, auch in wirtschaftlicher Hinsicht, großes Potential der Biotechnologie vorhanden ist, welches eine ständige Weiterentwicklung der Verfahrenstechnik (inkl. der Bioprozessanalytik und –regelung), eine verbesserte Nutzung nachwachsender Ressourcen und die Bereitstellung neuer Biokatalysatoren (z. B. für Biotransformationen) erfordert. In den nächsten Kapiteln sollen nun Forschungsprojekte vorgestellt werden, die sich mit Entwicklungen in diesen Bereichen beschäftigen. Sofern es der erzielte Entwicklungsstand zuließ, wurde versucht, über die Beschreibung der wissenschaftlichen Ergebnisse hinaus, die aus den Entwicklungen resultierenden möglichen ökonomischen und ökologischen Effekte zu diskutieren.

#### **4 Marine Biotechnologie – Nutzung neuer Ressourcen in der Biotechnologie**

Die Suche nach neuen Naturstoffen – insbesondere nach neuen pharmazeutisch wirksamen Verbindungen – stellt, wie in Kapitel 2 und 3 geschildert, einen der größten wirtschaftlichen Antriebsmotoren der Biotechnologie des 21. Jahrtausends dar. Die sich verändernde Altersstruktur unserer Gesellschaft erfordert weitere neue Behandlungsmethoden für Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Parkinson. Auch für die Behandlung verschiedener Infektionskrankheiten oder Krebs stehen zur Zeit oftmals keine effizienten Therapeutika zur Verfügung. Zwar gibt es für solche Pharmaka vielversprechende organisch-chemische Syntheseansätze, jedoch liefert die Natur einen nahezu unerschöpflichen Vorrat an Naturstoffen, die für einen solchen Einsatz in Frage kommen könnten.

Auf der Suche nach bioaktiven Substanzen wurden bisher hauptsächlich terrestrische Organismen genutzt. In den letzten Jahren ist dieses Wirkstoffscreening auch auf marine Habitate ausgedehnt worden. Angesichts des Mangels an geeigneten Arzneimitteln bei vielen Krankheiten und zunehmenden Resistenzentwicklungen bestimmter Krankheitserreger wird die Suche nach Wirkstoffen aus marinen Organismen als besonders aussichtsreich eingestuft [14, 15, 16, 17], da gegenüber terrestrischen Organismen andersartige chemische Kommunikationswege entwickelt worden sind, die sich auch in der Produktion andersartiger Metabolite ausdrücken sollte.

Ausgangspunkt für die Entwicklung allen Lebens vor ca. 3,5 Milliarden Jahren waren die Urozeane. Über mehrere Milliarden Jahren hat die Entwicklung der Diversität des Lebens ausschließlich in diesem Habitat stattgefunden. Erst sehr viel später kam es zur Trennung in terrestrische und marine Lebensformen. Noch heute tragen die terrestrischen Formen Spuren ihrer marinen Herkunft in sich; so zum Beispiel in Form des notwendigen Salzgehaltes in den Körperflüssigkeiten. Marine und terrestrische Organismen haben sich aber auch deutlich voneinander weg entwickelt und somit andere Stoffwechselwege eingeschlagen. Dieses ist z. B. in der Tatsache begründet, dass in marinen Systemen ein Überleben oft nur in sehr komplexen Symbiosen möglich ist. Innerhalb dieser Symbiosen wird ein breites Spektrum von Naturstoffen produziert, von denen man heute weiß, dass sie auch außerhalb der marinen Habitate Wirkungen entfalten können, z.B. gegen Krebs, Entzündungen oder Malaria. Es ist daher ein lohnendes Forschungsziel, marine Organismen hinsichtlich ihrer speziellen

Stoffwechselwege zu untersuchen, um weitere pharmazeutisch aktive Substanzen industriell herstellen zu können. Neben den potentiellen Pharmazeutika können aus marinen (Mikro)Organismen verschiedenste Enzyme isoliert werden, die für den industriellen Einsatz genutzt werden können [67], oder die ebenfalls pharmazeutische Relevanz besitzen [68]. Problematisch ist in beiden Fällen die Handhabung der marinen Mikroorganismen im Labor. Es müssen spezielle Anforderungen an die Kultivierungstechniken gestellt werden, um ein Wachstum und vor allen Dingen die Produktion des gewünschten Naturstoffes im Bioreaktor zu ermöglichen. Nur über eine reproduzierbare und effiziente Kultivierung ist letztendlich eine wirtschaftliche Nutzung der marinen Mikroorganismen und ihrer Metabolite möglich. Gerade in diesem kritischen Bereich sind zur Zeit wenige Entwicklungen beschrieben. Es sollen daher in der vorliegenden Arbeit in den folgenden Abschnitten einige mögliche Strategien zur Kultivierung mariner Mikroorganismen diskutiert werden. Im Bereich der marinen Enzymsysteme werden neben Screening- und Aufarbeitsverfahren auch potentielle Nutzungsfelder der Enzyme aufgezeigt.

#### **4.1 Stand der marinen Biotechnologie**

Während marine Makroorganismen in der Regel für Untersuchungen ihres Spektrums an Naturstoffen relativ gut zugänglich sind, ergeben sich bei den marinen Mikroorganismen, deren Diversität im Vergleich zu den Makroorganismen wesentlich größer ist, erhebliche Probleme. Es wird geschätzt, dass von allen vorkommenden marinen Mikroorganismen zur Zeit nur etwa 1-5 % identifiziert worden sind. Man nimmt an, dass viele Mikroorganismen sich mit den zur Zeit bekannten Verfahren nicht kultivieren lassen und deshalb zwangsweise unbeachtet bleiben. Der übliche Weg über das Ausplattieren auf Agarplatten zur Isolierung und Vereinzlung eines Mikroorganismus führt bei vielen marinen Stämmen nicht zum Erfolg, da diese auf herkömmlichen Medien nicht oder nur sehr schlecht wachsen. Eine weitere Problematik liegt darin, dass ein vereinzelter Stamm sich unter natürlichen Bedingungen eventuell anders verhält, als dieses im Labor der Fall ist. Dieses wird dadurch verursacht, dass viele Stämme in der Natur in Symbiose mit Makro- und anderen Mikroorganismen vorkommen. Bei Schwämmen beispielsweise können vergesellschaftete Mikroorganismen bis zu 40% der Biomasse ausmachen. Somit ist auch eine eindeutige Zuordnung eines isolierten Naturstoffes zu einem einzelnen Organismus in der Symbiose oftmals sehr schwierig.

Bei den Schwämmen liegt auch der Ursprung der marinen Naturstoffforschung. Bereits in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden aus dem Schwamm *Crytothetia crypta* die Verbindungen Spongouridin und Spongothymidin isoliert. Sie führten zur Synthese einer neuen Klasse von Arabinose-Nucleosid-Analoga (Antivirale und Antitumor Wirkungen) [15, 69]. Rund 40 Prozent der in den Jahren 1995 und 1996 beschriebenen Verbindungen wurden aus Schwämmen isoliert. Die große Anzahl besonders aktiver Verbindungen (z. B. Halichondrin B) bei Schwämmen liegt sicherlich darin begründet, dass Schwämme keine wirksamen morphologischen Schutzmechanismen besitzen und ihr Verteidigungsmechanismus daher auf der Produktion bioaktiver Substanzen beruht [70]. Neben der Gewinnung von wichtigen grundlegenden Erkenntnissen gibt es auch bereits genügend gesammelte Daten, die eine wirtschaftliche Nutzung dieser Ressourcen als sehr wahrscheinlich gelten lassen kann. Zur Zeit sind insgesamt ungefähr 10.000 marine Naturstoffe bekannt, wobei bei einer Großzahl nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob sie von dem Makroorganismus stammen, aus dem sie isoliert worden sind, oder ob assoziierte Mikroorganismen für dessen Bildung verantwortlich sind.

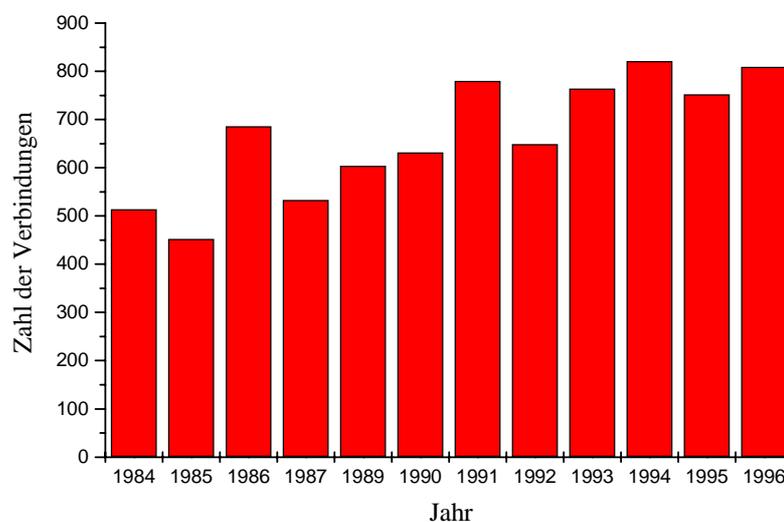


Abb. 4.1.1: Anzahl der jährlich identifizierten marinen Naturstoffe für den Zeitraum 1984 bis 1996

Einen Überblick für die Verteilung der Naturstoffe auf verschiedene Organismenklassen bieten die Veröffentlichungen von Faulkner [71, 72]. Neben den Schwämmen als Naturstofflieferanten sind hier insbesondere die Hohltiere zu nennen. Aus beiden Gruppen zusammen wurden über 61 % der marinen Naturstoffe im Jahr 1996 isoliert.

Tab. 4.1.1: Verteilung der identifizierten marinen Naturstoffe auf verschiedene Organismenklassen [71, 72]

Organismen	Anzahl 1995	Anzahl 1996
Meeresschwämme	256	276
Hohltiere	123	151
Mikroorganismen	74	46
Manteltiere	58	49
Stachelhäuter	38	66
Weichtiere	25	48
Rotalgen	18	29
Braunalgen	13	10
Moostierchen	5	15
Grünalgen	3	7
Sonstige	12	-

Interessant ist auch die Verteilung der unterschiedlichen Strukturtypen (Verbindungsklassen) innerhalb der marinen Naturstoffe. Eine sehr gute Übersicht bietet hierbei [73]. Wie in der Abbildung 4.1.2 ersichtlich, unterscheidet sich das Spektrum der aus marinen Makroorganismen gewonnenen Verbindungen deutlich von dem typischer terrestrischer Naturstofflieferanten. Findet man dort häufig Zucker, Makrocyclen und Peptide, so herrschen bei den marinen Verbindungen Alicyclen und N-Heterocyclen vor.

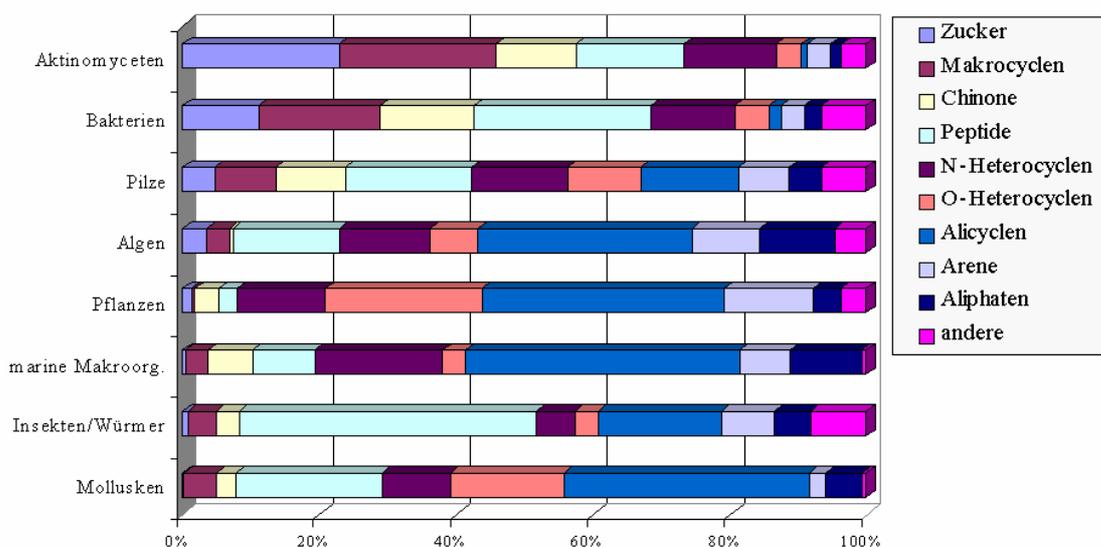


Abb. 4.1.2: Verteilung verschiedener Naturstofftypen auf terrestrische und marine Organismen [74]

Eine konkrete Auflistung pharmakologisch wirksamer Verbindungen, die innerhalb der letzten Jahren aus dem Meer isoliert worden sind, findet sich in der nachfolgenden Tabelle.

Tab. 4.1.2: Pharmakologisch wirksame Substanzen aus marinen Organismen [74]

Herkunft	Wirkstoff	Indikation
Moostierchen ( <i>Bugula neritina</i> )	Bryostatin 1	Antitumor
Schwamm ( <i>Halichondria okadai</i> )	Halichondrin B	Antitumor
Schwamm ( <i>Discodermia kiiensis</i> )	Discodermolid	Zytotoxisch, immunsuppressiv
Schwamm ( <i>Luffarellia variabilis</i> )	Monalid	Entzündungshemmend
Manteltier ( <i>Trichidemnum solidum</i> )	Didemnin B	Antitumor, antiviral, immunsuppressiv
Manteltier ( <i>Ecteinascidia turbinata</i> )	Ecteinascidin 743	Antitumor
Meeresschnecke ( <i>Dolabella auricularia</i> )	Dolastin 10	Antitumor
Kegelschnecke ( <i>Conus magus</i> )	Conotoxin MVIIA	Analgetisch
Lederkoralle ( <i>Eleutherobia albiflora</i> )	Eleutherobin	Zytotoxisch
Koralle ( <i>Pseudopterogorgia bipinata</i> )	Pseudopterosin B	Entzündungshemmend, analgetisch
Rotalge ( <i>Portieria hornemanni</i> )	Halomon	Zytotoxisch

Es ist auffällig, dass es anscheinend bei marinen Naturstoffen eine besonders hohe Wirkung gegenüber menschlichen Krebszelllinien gibt. Fünfzig Prozent der vom National Institute of Cancer (NIC) auf ihre Antitumor-Eigenschaften untersuchten Substanzen sind marinen Ursprungs [75]. Besonders zu nennen sind hier die Verbindungen Bryostatin und Ecteinascidin 743; zwei der wirkungsvollsten Antitumorsubstanzen überhaupt. Bryostatin wurde aus einer Bryozoe (Moostierchen) isoliert. Auf diese Organismen wird später noch einmal detaillierter eingegangen werden, da sie bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen eine wichtige Rolle spielen.

Einer kommerziellen Nutzung am nächsten ist das Bryostatin 1, welches aus der Bryozoe *Bugula neritina* isoliert worden ist. Neben dem Bryostatin sind mittlerweile 14 weitere Bryostatine aus diesem Makroorganismus isoliert worden [15, 69, 76, 77], die alle cytotoxische Eigenschaften aufweisen. Bryostatin 1 befindet sich in den USA und Europa zur Zeit in den klinischen Studien der Phasen I bzw. II. Es konnte bisher allerdings noch nicht geklärt werden, ob die Bryostatine direkt von den Bryozoen gebildet werden, oder ob an ihrer Bildung vergesellschaftete Mikroorganismen beteiligt sind.

Aus der Tunicate *Trididemnum solidum* konnte mit Didemnin B ein neuartiges, cyclisches Depsipeptid isoliert werden. Die Substanz zeigte sowohl antivirale, immunosuppressive als auch cytotoxische Eigenschaften. Klinische Studien der Phasen I und II zur Testung der Verbindung als Mittel gegen Nieren-, Eierstock- sowie Brustkrebs wurden durchlaufen. Aufgrund der zu hohen Toxizität des Didemnin B ist ein Einsatz als Therapeutikum aber nicht realisiert worden. Als neuartiger Vertreter cyclischer Peptide liefert die Verbindung aber eine wichtige Wirkstruktur zur Erforschung und Synthese von Didemnin-Analoga, die eventuell als Pharmazeutika eingesetzt werden können [15, 17]. Ebenfalls cytotoxische Wirkungen gegen verschiedenste Tumorzellen weisen die Verbindungen Halomon (pentahalogeniertes Monoterpen; isoliert aus der Rotalge *Portieria hornemannii*) und Dolastatin 10 (isoliert aus dem Seehasen *Dolabella auricularia*) auf. Bereits sehr geringe Dosen dieser Verbindungen zeigen sehr gute Wirkungen gegen Gehirn-, Nieren- und Dickdarmtumorzellen. Dolastatin 10 ist die stärkste bekannte antineoplastische Substanz und konnte bereits durch Totalsynthese hergestellt werden. Mit der Gruppe der Halichondrine (Polyether Macrolide; isoliert aus dem Schwamm *H. okadai*) steht eine weitere Verbindungsgruppe aus marinen Organismen zur Verfügung, die ebenfalls potentielle Antikrebsmittel darstellen. So zeigte sich zum Beispiel Halichondrin B *in vivo* als sehr aktiv gegen Leukämie- sowie Melanom-Zellen. Außerdem wurden in Schwämmen die Verbindung Dercitin (Aminoacridin-Alkaloid; isoliert aus dem Tiefsee-Schwamm *Dercitus sp.*) und die Theopederine A-E (multifunktionelle, heterocyclische Peptide; isoliert aus Schwämmen der Gattung *Theonella*) entdeckt. Auch diese Verbindungen zeigen, teilweise bereits im nanomolaren Bereich, sehr gute Wirkungen gegen verschiedene Tumorzelllinien. Dercitin besitzt darüber hinaus auch eine immunosuppressive Aktivität.

Naturstoffe aus Schwämmen (bzw. aus ihren vergesellschafteten Mikroorganismen) haben neben der Funktion als Antikrebsmittel teilweise auch andere pharmazeutisch sehr interessante Wirkungen. So ebnet die Batzelladine A und B (isoliert aus dem Schwamm *Batzella sp.*) eventuell den Weg für Therapeutika gegen AIDS [15, 16]. Diese Verbindungen blockieren die Kopplung von HIV-gp120 an den entsprechenden menschlichen CD4-Rezeptor. Die Verbindungen sind in ihrer Wirkung zwar zu unspezifisch und wirken sich somit auch nachteilig auf andere Funktionen der Zelle aus, sie können aber eventuell, wie das weiter oben erwähnte Didemnin B, als Modelle neuer Wirkstrukturen dienen.

Wo durch kommt es aber zu der so ausgeprägten Wirksamkeit und zu der großen Diversität mariner Naturstoffe? Marine Organismen müssen sich um zu Überleben teilweise an extreme Umweltbedingungen anpassen können. Ein Faktor dabei sind extreme Temperaturen. So finden sich marine Mikro- und Makroorganismen sowohl in den Polarregionen als auch in unterseeischen Vulkanen. Ein weiterer wichtiger Umweltfaktor ist die einfallende Sonnenstrahlung, die sich von den Küstengebieten bis zur Tiefsee hin drastisch verringert. Auch die hohen Drücke in großer Tiefe verlangen eine spezielle Adaption der dort lebenden Organismen. Selbst in scheinbar lebensfeindlichen Regionen, wie den Hydrothermalquellen mit hohen Kohlendioxid und Schwefelkonzentrationen, finden sich im Meer Organismen. Gerade solche Bereiche können für die Biotechnologie von großem Interesse sein, da zu vermuten ist, dass die dortige genetische Diversität sich deutlich vom terrestrischen Bereich unterscheidet. Die aus marinen Mikro- und Makroorganismen isolierten aktiven Naturstoffe scheinen eine wichtige Rolle bei der Anpassung an solch extreme Standorte zu spielen [78].

Eine weitere Ursache für die große Anzahl aktiver Naturstoffe könnte in der Verteidigung des Standortes liegen (Standortsicherung). Hierzu werden in marinen Systemen oftmals Antibiotika eingesetzt. Der größte Teil dieser Antibiotika wurde bisher aus invertebraten Tieren wie z.B. Schwämmen, Mollusken, Weichkorallen oder Meeresnacktschnecken isoliert. Diese Tatsache unterstützt die Theorie, dass die Sekundärmetaboliten ihren Produzenten zur Verteidigung gegen Fressfeinde und Konkurrenten dienen, da solche Substanzen bisher lediglich bei meist ortsgebundenen Weichtieren ohne Körperpanzerung gefunden wurden, die keine andere Möglichkeit haben, sich zu schützen. Mobile oder gepanzerte Weichtiere wie Tintenfische, Krustentiere, Stachelhäuter oder häusertragende Meeresschnecken hingegen produzieren offenbar keine Antibiotika [79].

Als weitere mögliche Ursachen der großen Vielzahl an biologisch wirksamen Naturstoffen in den Meeren könnten angeführt werden:

- Schutz vor Räubern
- Schutz vor Überwucherung
- Übermittlung von Informationen innerhalb und zwischen verschiedenen Arten (Quorum Sensing) [80]
- Schutz vor Sonnenstrahlung

Während über marine Naturstoffe somit in der Literatur bereits eine breite Wissensbasis publiziert worden ist, sind über marine Enzymsysteme deutlich weniger Arbeiten zu verzeichnen. Auf diese Thematik wird in Kapitel 4.4 näher eingegangen werden.

Wie aber sieht es mit der verfahrenstechnischen Seite der marinen Biotechnologie aus? Aufgrund der Tatsache, dass sich eine Vielzahl der marinen Mikroorganismen nur sehr schwer im Labor kultivieren lassen, ist hier sehr wenig als Wissensbasis vorhanden [81]. Die beschriebenen Naturstoffe werden häufig aus Originalproben isoliert und man beschränkt sich auf die Identifikation der Leitstrukturen in der Hoffnung, diese später im Labor auf organochemischen Wege synthetisieren zu können. Aber gerade an dieser Stelle ist der Einsatz von biotechnologischer Verfahrenstechnik von großer Bedeutung. Nur durch eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen könnten größere Mengen des Naturstoffes zur Verfügung gestellt oder komplette industriell nutzbare Produktionswege eines Naturstoffes aufgezeigt werden. Dieses kann einerseits durch eine deutliche Steigerung der Ausbeute des Endproduktes erfolgen. Andererseits könnten mit Hilfe eines optimierten Verfahrens Intermediate des Endproduktes zur Verfügung gestellt werden, die über einfache (organisch-chemische) Syntheseschritte zum Endprodukt umgesetzt werden können.

Erster Schritt, um einen neuen Naturstoff zu gewinnen, ist die Isolation einer marinen Lebensgemeinschaft (Abbildung 4.1.3). Um reproduzierbar arbeiten zu können, muss man in der Lage sein, diese Lebensgemeinschaft - oftmals ein mit Mikroorganismen besiedelter Makroorganismens - zu halten, um so spätere vergleichende Probennahmen zu ermöglichen. Die Vereinzelung der Mikroorganismen stellt einen weiteren zentralen Schritt dar, der es ermöglichen soll, den oder die Produzenten biologisch aktiver Substanzen zu identifizieren. Der Test auf solche Aktivitäten sollte sowohl mit der gesamten Lebensgemeinschaft, als auch mit den isolierten Mikroorganismen erfolgen. Ist eine solche Aktivität gefunden, setzt die Optimierung der Kultivierung des oder der Produzenten ein. Erst über diesen Schritt kann oftmals genug Biomasse und somit Sekundärmetabolit oder Enzym gebildet werden, um eine Identifikation der Substanz zu ermöglichen.

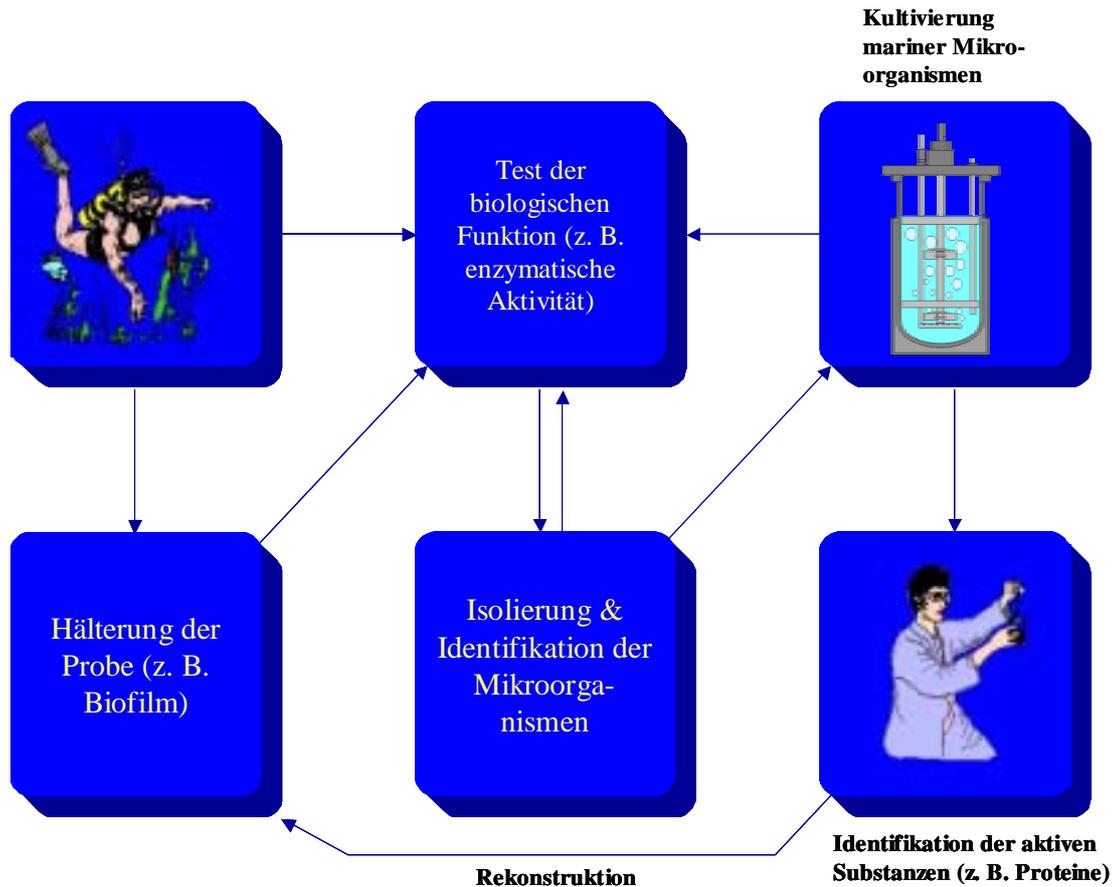


Abb. 4.1.3: Strategie zur Isolation und Produktion mariner Naturstoffe [82]

Für eine spätere kommerzielle Nutzung der Substanz muss im Bereich der Kultivierung eine effiziente Prozessoptimierung einsetzen. Aufgrund sehr geringer Wachstumsraten mariner Mikroorganismen und der damit verbundenen geringen Ausbeute an Metaboliten, hilft hier oftmals nur die Identifikation der kodierenden Gensequenz, die Klonierung und anschließende Produktion des Metaboliten in einem anderen, schneller wachsenden und produktiveren Organismus.

## 4.2 Der marine Biofilm als Ausgangsbasis zu neuen Naturstoffen

Den ersten Schritt zur Isolation eines neuen Naturstoffes oder eines Enzyms stellt wie im vorherigen Abschnitt geschildert die Probennahme dar. Im marinen System bietet es sich an, die Probennahme nicht in der Wassersäule vorzunehmen, sondern sich auf bewachsene Oberflächen oder Sedimente zu konzentrieren (Abb. 4.2.1). Die Dichte der dort anzutreffenden Organismen ist sehr hoch. Es kann abgeschätzt werden, dass auf einem

Quadratmeter eines tropischen Korallenriffs bis zu 1.000 verschiedene Makroorganismen zu finden sind.



Abb. 4.2.1: Bewuchs einer Oberfläche im aquatischen Bereich [83]

Man kann davon ausgehen, dass aufgrund der höheren Zelldichte (Sediment gegenüber der Wassersäule) Antagonismen und Synergismen bei sessil auf Substratoberflächen wachsenden, marinen Organismengemeinschaften häufiger anzutreffen sind als bei planktonischen oder vagilen Artengemeinschaften. Dies stimuliert eine höhere Intensität und Diversität in der Produktion von hydrophilen und hydrophoben Substanzen, Toxinen, Cytostatika, Antibiotika (s. o.) oder wuchsfördernden Substanzen wie Lectinen etc. In solchen Biofilmen sind in der Regel eine Vielzahl von Mikroorganismen vergesellschaftet, die ein hohes Potential an Naturstoffen erwarten lassen. So wurden z. B. in den tropischen Hartsubstrat-Assoziationen und Biofilmen bei mehr als 42 Arten von Makroorganismen Toxine gefunden. Die Toxinlieferanten bevorzugen die gegenüber den biologischen und physikalischen Steuerungsfaktoren besonders exponierten Substratzonen der Riffe [84].

Besonderes Augenmerk erfahren in der marinen Naturstoffsuche die sessilen Bryozoen. Dieses ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass das bereits weiter oben angesprochene Bryostatatin [85] in den achtziger Jahren aus der Bryozoe *Bugula neritina* isoliert worden ist – wenn auch in bescheidener Ausbeute: Für 18 g der Verbindung mussten 12 Tonnen des Moostierchens extrahiert werden [86]. Ebenso wenig ist geklärt, ob die Bryozoe die

Verbindung eigenständig synthetisiert, oder ob die vergesellschafteten Mikroorganismen hierfür verantwortlich sind [87]. Seit der Entdeckung des Bryostatins sind an die 200 Naturstoffe aus Bryozoen isoliert worden. Bryozoen an sich sind über die verschiedensten Habitate verteilt. Man kennt ungefähr 3.200 Arten, von denen ungefähr 40 Arten in heimischen Gewässern vorkommen. In der Nordsee kommen unter anderem die Bryozoen *Flustra foliacea* (Abbildung 4.2.2) und *Bugula plumosa* vor. Im niedersächsischen Forschungsverbund Meeresbiotechnologie [88, 89] wurde das Naturstoffpotential dieser Arten untersucht. Bei diesen Arbeiten wurden verschiedenste mit den Bryozoen assoziierte Mikroorganismen isoliert, die auch Gegenstand dieser Arbeit sind.



Abb. 4.2.2: Kolonie von *Flustra foliacea*

Die Bryozoe *Flustra foliacea* ist sicherlich eine der naturstoffchemisch am besten untersuchten Bryozoen. Aus diesem Organismus wurden über 20 Verbindungen isoliert. Dabei handelt es sich überwiegend um stickstoffhaltige Substanzen mit Phenylethyl- oder Isochinolin-Teilstruktur, sowie um Pyrrol- und Indolderivate (z. B. Flustramine A und B) [90, 91, 92]. In laufenden Arbeiten im Arbeitskreis König an der Universität Bonn [93] konnten weitere neue Verbindungen (Indolderivate) isoliert werden, deren biologische Funktion aber noch nicht geklärt werden konnte. Die Nordsee-Bryozoen sind in taxonomischer Hinsicht gut

beschrieben [94]. Hinsichtlich der mit ihnen vergesellschafteten Mikroorganismen (Abb. 4.2.3) sind allerdings nur sehr wenige Untersuchungen durchgeführt worden.

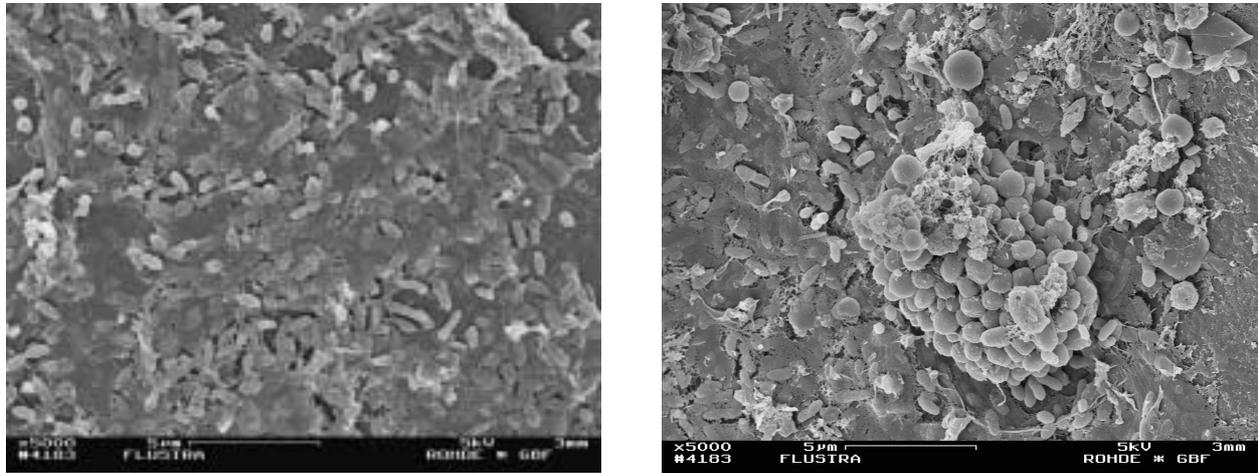


Abb. 4.2.3: Mikrobieller Bewuchs auf Flustrakolonien (Aufnahmen: Dr. Manfred Rohde, GBF, Braunschweig)

Nicht nur beim Bryostatin sondern bei vielen der marinen Naturstoffe ist es nicht gesichert, ob ein oder mehrere Mikroorganismen oder die Bryozoe selbst Produzent der isolierten Verbindungen sind. Auch eine symbiotische Synthese der Verbindungen ist denkbar. Es müssen daher Untersuchungen angestrebt werden, in denen die Mikroorganismen von der Flustra isoliert und anschließend kultiviert werden. Nur über diesen Weg können Informationen über die Naturstoffsynthese gewonnen werden.

Aber nicht nur die Suche nach den Naturstoffen an sich kann zu neuen Pharmazeutika führen. Auch das Potential der an der Synthese beteiligten Enzymsysteme wird bisher *in vitro* nur sehr wenig genutzt. Ein Fokus dieser Arbeit liegt daher in dem Screening nach marinen Enzymen und deren Aufarbeitung. Neben Isolaten von *Flustra foliacea* und *Bugula plumosa* wurde auch ein Stamm (*Sulfitobacter pontiacus*) aus dem Schwarzen Meer für diese Untersuchungen herangezogen. Ziel der Untersuchungen war es, Enzyme zu gewinnen, die für den Einsatz in der Biotransformation oder für den Aufbau von bioanalytischen Systemen geeignet sind. Einige Untersuchungen wurden weiterhin mit Pilzisolaten von der Bryozoe *Electra pilosa* durchgeführt (s. Kapitel 4.4.1.1).

#### 4.2.1 Isolierung der assoziierten Mikroorganismen

Die verwendeten Isolate von *Flustra foliacea* wurden an der DSMZ (Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig, im Rahmen des Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie hergestellt. Es soll daher an dieser Stelle kurz auf die an der DSMZ durchgeführte Isolierung eingegangen werden [95].

Bei diesem Verfahren wurden die Moostierchen in einem ersten Schritt mit sterilen, künstlichen Meerwasser gewaschen, um die aus der Wassersäule eingetragenen Bakterien herauszuverdünnen. In einem weiteren Schritt wurden unter dem Einsatz von oberflächenaktiven Verbindungen die assoziierten Mikroorganismen abgelöst. Eine zweite Fraktion von Mikroorganismen wurde durch das Homogenisieren der Probe mittels eines Stomacher Lab Blenders erzielt. Von den so erhaltenen zwei Bakteriensuspensionen wurden Verdünnungsreihen hergestellt und diese auf 21 verschiedenen Agarmedien ausplattiert. Von allen so erhaltenen Bakterienisolaten wurden in der DSMZ zunächst Reinkulturen hergestellt und in Form von Glycerin-Stammkulturen aufbewahrt. Eine weitergehende Charakterisierung erfolgte mit Hilfe molekularbiologischer DNA Fingerprinting Methoden sowie eine phylogenetische Zuordnung mittels 16S rDNA Partialsequenz-Analysen.

Dieses Verfahren wurde für verschiedene *Flustra*-Proben verwendet, die von verschiedenen Standorten in der Nordsee (Gewässerabschnitte vor Helgoland und dem Steingrund) und zu verschiedenen Jahreszeit genommen worden waren. Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass es bei *Flustra foliacea* keine spezifische Wirt-Prokaryonten-Gemeinschaft gibt. Die Besiedlung mit Mikroorganismen scheint vielmehr vom Standort und von der Jahreszeit abhängig zu sein (Tabelle 4.2.1).

Tab. 4.2.1: Mit *Flustra foliacea* vergesellschaftete Bakterienstämme [95]

Standort und Zeitpunkt der Probennahme	Helgoland (April 1998)	Steingrund (April 1999)
Identifizierte Bakterienstämme	Shewanella frigidimarina (40%)	Bacillus (45%)
	Pseudoalteromonas (30%)	Micrococcus (8%)
	Psychrobacter glacincola (17%)	Nocardioides (10%)
	Cytophaga/Flavobacterium (8%)	Roseobacter/Ruegeria (-)
	Pseudomonas (5%)	

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten weiterhin, dass die äußeren Wachstumszonen der Flustrakolonien kaum von Bakterien besiedelt werden (Abb. 4.2.4), während die darunterliegenden Bereiche zum Teil sehr stark besiedelt sind. Im Vergleich zu anderen untersuchten Bryozoen ist *Flustra foliacea* auch nicht signifikant mit anderen Organismen, wie Diatomeen, Pilzen oder Algen bewachsen.

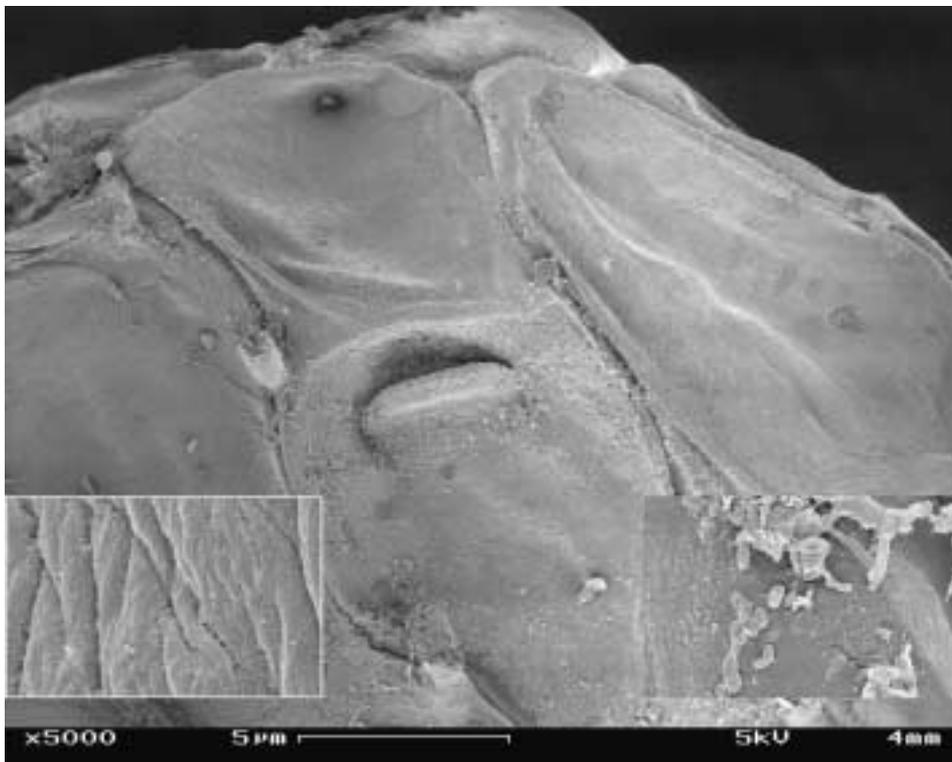


Abb. 4.2.4: Unbesiedelte äußere Wachstumszonen bei *Flustra foliacea* (Aufnahmen: Dr. Manfred Rohde, GBF, Braunschweig)

Die Homogenisierung der Bryozoe *Bugula plumosa* und die Isolierung der mit ihr vergesellschafteten Mikroorganismen wurde ebenfalls von der DSMZ vorgenommen. Die eingesetzten Bryozoen wurden im Sommer 1999 vor der Küste von Helgoland in einer Wassertiefe von 7 m gesammelt [96]. Die *Bugula plumosa* Proben wurden mehrfach mit sterilem, künstlichem Meerwasser gewaschen, um eingetragene mikrobielle Verunreinigungen von den Oberflächen zu entfernen. Das Ablösen der Mikroorganismen von der Bryozoe wurde mit dem Stomacher Lab Blender durchgeführt (1 g Probe in 9 ml künstlichen Seewasser).

Weiterführende Untersuchungen zur Bakterienpopulation auf *Bugula plumosa*, die an der DSMZ in Braunschweig durchgeführt worden sind, haben ergeben, dass 50 % der Stämme aus der *Vibrio splendidus* Gruppe stammen. Vertreter der *Pseudoalteromonas* und der *Shewanella* Gruppe machen jeweils 18 % der isolierten Stämme aus. Weiterhin wurden auf dieser Bryozoe auch Vertreter von *Halomonas* nachgewiesen.

Anders als bei *Flustra foliacea*, bei der Einzelisolate in Hannover untersucht worden sind, wurden in diesem Fall die bakteriellen Mischkulturen der Bryozoe zum Enzymscreening verwendet. Ziel war die Isolierung von Mikroorganismen, die in der Lage waren auf einem Serinminimalmedium zu wachsen (s. Kapitel 4.4.2.1). Die von der DSMZ erhaltenen Bakteriensuspensionen wurden daher zum Vereinzeln der Stämme auf ein Serinminimalmedium (s. Anhang Kap. 8.2) überführt [97].

### **4.3 Kultivierung mariner Mikroorganismen**

Ziel der hier beschriebenen Arbeiten war es, die isolierten Mikroorganismen unter reproduzierbaren Bedingungen im Bioreaktor zu kultivieren, um so beispielsweise neue Enzyme isolieren und charakterisieren zu können. Wie weiter oben bereits angesprochen, stößt man bei Versuchen, marine Mikroorganismen im Labor zu kultivieren, oftmals auf große Hindernisse. Wandelt man die üblichen Nährböden mit Hilfe von Salzen ab, um sie den Bedürfnissen mariner Organismen anzupassen, und beimpft sie mit etwas Seewasser, so wird man eine große Anzahl von Bakterienkolonien finden. Untersuchungen, bei denen die genetische Diversität in Meerwasserproben bestimmt wird, zeigen allerdings, dass über die Kultivierung nur ca. 1% der in der Probe vorliegenden Mikroorganismen erfasst werden [77].

Aber auch wenn sich ein marines Bakterium im Labor kultivieren lässt, bedeutet dieses noch nicht, dass der Stoffwechsel und somit das Sekundärmetabolitspektrum unverändert bleibt. Oftmals ändert sich dieses drastisch. Ein Beispiel hierfür soll anhand eines Gram-positiven Mikroorganismus aufgezeigt werden [69]. Dieser Mikroorganismus wurde aus einem Tiefsee-Sediment isoliert, konnte im Bioreaktor kultiviert werden und produzierte die Macrolactine A-F. Bei dem Sekundärmetabolit Macrolactin A wurde festgestellt, dass dieser nicht nur hemmend gegenüber Krebszellen und Herpesviren wirkt, sondern auch menschliche T-Lymphoblast-Zellen schützen kann, in dem er die Replikation von HIV-Viren hemmt. Der Stamm veränderte im Labor allerdings seinen Metabolismus und produzierte statt Macrolactin A eine andere, nicht biologisch aktive Substanz. Es war allerdings zu diesem Zeitpunkt bereits möglich das Macrolactin A auf synthetischen Wege herzustellen.

In Hinblick auf ihre Kultivierbarkeit im Bioreaktor muss daher bei den im Meer vorkommenden Mikroorganismen differenziert werden. Hierzu kann man eine grobe Einteilung der marinen Mikroorganismen in verschiedene Siedlungsbereiche vornehmen [98].

- Mikroorganismen, die frei schwebend in der Wassersäule vorkommen:  
Man weiß, dass ca. 90 % der in der Wassersäule vorkommenden Bakterien Gram-negativen und nur 10 % Gram-positiven Arten angehören. Zahlenmäßig der stärkste Vertreter ist hierbei die Gruppe der *Alteromonas sp.* Gerade die Mikroorganismen aus der Wassersäule sind oftmals nicht kultivierbar. Aufgrund der Nährstoffarmut der Wassersäule haben die freischwimmenden Arten Überlebensstrategien für lange Hungerphasen entwickelt. Die Mehrzahl von ihnen bildet auf den auch für marine Bakterien üblicherweise benutzten nährstoffreichen Agarsorten keine Kulturen. Daher ergibt sich bei der Bestimmung der Besiedlungsdichte von Bakterien direkt in der Wassersäule im Vergleich zu beimpften Agarplatten ein Unterschied von bis zu drei Größenordnungen.
- Mikroorganismen, die in Sedimenten vorkommen:  
Für Kultivierungen im Bioreaktor sind marine Bakterien aus Sedimenten oftmals sehr gut geeignet. Sedimente sind im Gegensatz zu der Wassersäule sehr nährstoffreich, wobei das Angebot an Nährstoffen stark ortsabhängig ist. Insbesondere in Küstennähe und im Bereich von Flussmündungen ist das Nährstoffangebot sehr groß. Neben der guten Versorgung mit C- und N-Quellen sorgen variierende geologische

Beschaffenheiten, unterschiedliche Sonnenbestrahlung und Temperaturgradienten für eine hohe mikrobiologische Diversität in den Sedimenten. Daher sind sie besonders lohnende Objekte bei der Suche nach neuen Stämmen und neuen Sekundärmetaboliten. In den Sedimenten finden sich oftmals Vertreter der *Actinomyceten*, die in der Wassersäule nur selten vorkommen und von denen bekannt ist, dass sie eine Vielzahl aktiver Naturstoffe produzieren .

- Mikroorganismen, die vergesellschaftet mit Makroorganismen vorkommen (s. a. Kapitel 4.2):

Eine Vielzahl von Mikroorganismen siedeln auf den verschiedensten Makroorganismen, die im Meer vorkommen. Man vermutet, dass sie auf diesem Wege der Nährstoffknappheit in der Wassersäule entgehen wollten. Durch die Vergesellschaftung sind im Laufe der Evolution Symbiosen entstanden, die die biotechnologische Nutzung erschweren, da der gewünschte Sekundärmetabolit oftmals nur in eben dieser Symbiose produziert wird. Eine Reinkultur des Bakterium oder Pilzes liefert dann kein brauchbares Ergebnis. Dies gilt vor allem für invertebrate Meeresbewohner, von denen der größte Teil in einem symbiotischen Verhältnis mit Mikroorganismen lebt und aus denen die meisten bisher gefundenen marinen Antibiotika isoliert wurden. In diesem Fall besteht die beste Möglichkeit in der Kultivierung der entsprechenden Makroorganismen in großflächigen Meeresfarmen, wie dies bereits mit der die Substanz Bryostatin 1 produzierenden Bryozoe *Bugula neritina* oder dem Schwamm *H. okadai*, aus dem das Halichondrin B isoliert wird, praktiziert wird [17].

Wie in dem Kapitel 4.2.1 bereits geschildert, wurde in dieser Arbeit hauptsächlich mit Mikroorganismen der letzten Gruppe gearbeitet. Grundlegende Optimierungsstrategien durch den Einsatz innovativer Bioprozesstechniken wurden aber auch mit Bakterien durchgeführt, die aus Meeressedimenten isoliert worden sind (z. B. Streptomycet B 8300). Mit dem *Sulfitobacter pontiacus* (s. Kapitel 4.4.3), wurde ein Mikroorganismus untersucht, der aus der Wassersäule isoliert worden ist.

### 4.3.1 Bestimmung des optimalen Mediums

Das beschriebene Verhalten mariner Mikroorganismen macht deutlich, dass für die Kultivierung die Auswahl und die Optimierung des Kulturmediums von entscheidender Bedeutung ist. Insbesondere bei Organismen aus der Wassersäule oder aus Vergesellschaftungen mit Makroorganismen kann die Wahl des Mediums sich erheblich auf die Wachstumsrate und das Metabolitenspektrum auswirken. Im Folgenden soll daher auf das Verhalten mariner Bakterien auf unterschiedlichen Nährmedien eingegangen werden und eine Möglichkeit aufgezeigt werden, wie sich dieses analytisch möglichst einfach erfassen lässt.

In der Regel versucht man zuerst die genommene Probe auf einem Seewasser-Komplettmedium (Seawater Complete) zu kultivieren. Hierfür wird steril filtrierte Seewasser verwendet. Zur Stammhaltung können hiervon auch Agarplatten angefertigt werden. Das große Problem dieser Vorgehensweise liegt aber auf der Hand. Die Zusammensetzung des verwendeten Seewassers ist nicht bekannt und eine Reproduktion der erzielten Ergebnisse bleibt dem Zufall überlassen. Es ist insbesondere im Hinblick auf eine wirtschaftliche Nutzung der isolierten Stämme zwingend notwendig, die Kultivierung unter reproduzierbaren Bedingungen, wie sie nur ein synthetisches Medium liefern kann, durchzuführen. Es muss dabei aber gewährleistet sein, dass der betreffende Stamm ein vergleichbares oder sogar besseres Wachstum aufweist und den gewünschten Metaboliten weiterhin produziert. Für das Arbeiten mit marinen Bakterien oder Pilzen stehen daher mittlerweile verschiedenste kommerziell erhältliche Medien zur Verfügung (z. B. Marine Broth, Difco oder Sea Salts, Sigma).

Die erheblichen Veränderungen, die marine Stämme beim Wechsel des Mediums aufweisen, sollen anhand einiger Beispiele verdeutlicht werden. Hierfür wurden verschiedene marine Bakterien verwendet. Darunter waren die folgenden Stämme:

- *Streptomyces B 8300*

Dieser Stamm wurde aus dem Sediment der Laguna de Terminos am Golf von Mexiko isoliert. Mit den Sekundärmetaboliten  $\beta$ -Indomycinon und  $\delta$ -Indomycinon produziert er zwei Antibiotika, die gegen Gram-positive Bakterien wirken [99].

- *Streptomyces B 903*

Über diesen Stamm liegen keine Herkunftsangaben vor. Mit der Verbindung 2,5-Bis-[4-(N-methyl-N-formyl-amino)benzyl]-3,6-dimethyl-pyrazin produziert er ein Antibiotikum, welches Aktivitäten gegen *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* besitzt [98].

- *Actinomyces B 9192*

Dieser *Actinomyces* stammt aus dem Sediment vor der chilenischen Pazifikküste. In seinem Sekundärmetabolismus finden sich verschiedene physiologisch interessante Verbindungen. Darunter sind die Antibiotika  $\zeta$ -,  $\eta$ - und  $\epsilon$ - Pyrromycinon, Pyrromycin, welches Aktivität gegen Gram-positive Bakterien zeigt, sowie Cinerubin B, das neben der Wirkung gegen Gram-positive Bakterien eine antivirale und Antitumor-Aktivität aufweist [100].

- *Actinomyces Stamm B 7747*

Über diesen Stamm liegen ebenfalls keine Herkunftsangaben vor. Er wurde am Alfred Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven, isoliert und wird dort in Reinkultur aufbewahrt. Auch dieser Stamm produziert mit Enterocin ein Antibiotikum. Enterocin kann als Breitband-Antibiotikum sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien verwendet werden. [101].

Sämtliche dieser Stämme wurden von Prof. Laatsch, Universität Göttingen, im Rahmen des Niedersächsischen Forschungsverbundes Meeresbiotechnologie zur Verfügung gestellt. Die Stämme wurden auf Nährböden unterschiedlicher Zusammensetzung ausplattiert und das Wachstum und die Pigmentierung untersucht. Abbildung 4.3.1 zeigt das Verhalten der vier genannten Stämme auf einem Seewasser-Komplettmedium und auf einem synthetischen Medium. Es lässt sich sehr gut das unterschiedliche Wachstumsverhalten und die verschieden starke Pigmentierung bzw. Verfärbung des Agars erkennen.



Wachstum auf Agarplatten mit Seawater Complete Medium



Wachstum auf Agarplatten mit Marine Broth Medium

Abb. 4.3.1: Wachstum verschiedener mariner Mikroorganismen auf unterschiedlich komplexen Medien; obere Reihe Wachstum auf Seewasserkomplettmedium (s. Text) – untere Reihe Wachstum auf Marine Broth Medium (s. Text) [82, 98]

Als synthetisches Medium wurde Marine Broth Medium verwendet. Es handelt sich um ein halbdefiniertes Medium, das neben verschiedenen im Meer vorkommenden Salzen als Nährstoffe Pepton und Hefeextrakt enthält (s. auch Anhang Kap 8.3). In der Abbildung 4.3.1 ist deutlich zu erkennen, dass alle vier Stämme auf dem Seewasserkomplettmedium ein deutlich stärkeres Wachstum aufweisen. Auch zeigt sich teilweise eine unterschiedliche Verfärbung der ursprünglich leicht gelblichen Agarplatten durch Stoffwechselprodukte der Bakterien bei den beiden Medien. So wächst der Stamm B8300 auf beiden Agarsorten in weißen, optisch nicht zu unterscheidenden Mycelen. Auf Marine Borth jedoch sondern die Kolonien einen Farbstoff ab, der den Agar nach wenigen Tagen kräftig rot färbt.

Marine Broth wurde von den vier Stämmen unterschiedlich gut angenommen. Zwei Stämme, B8300 und B9192, wiesen bereits schon nach zwei Tagen ein deutlich sichtbares Wachstum auf. Bei den Stämmen B7747 und B903 zeigte sich erst nach vier Tagen Wachstum.

Interessant ist ebenfalls, dass ein Stamm auf Marine Broth deutliche morphologische Unterschiede im Vergleich zum Wachstum auf Seewasserkomplettmedium aufweist [98]. Beim Stamm B9192 werden deutlich kleinere Kolonien gebildet. Während sie auf dem Komplettmedium eine weiß-rötliche Färbung annehmen, waren die Kolonien auf dem Marine Broth Agar leuchtend rot.

Durch welche Faktoren diese deutlichen Veränderungen hervorgerufen werden, lässt sich nicht ermitteln. Vom Salz- und Nährstoffgehalt sind beide verwendeten Medien ähnlich. Es sind aber wohl gerade minore Verbindungen, die im verwendeten Meerwasser vorkommen, die insbesondere den Sekundärmetabolismus (z. B. die Bildung des roten Farbstoffes) modifizieren. Eine Analyse dieser Faktoren wäre äußerst komplex und würde auch im Hinblick auf eine Reproduzierbarkeit der Kultivierungsergebnisse wenig Vorteile bringen, da die Zusammensetzung des Meerwassers von Charge zu Charge stark variieren kann. Die Bewertung der Qualität von Kulturmedien über den Bewuchs von Agarplatten oder die Biomassebildung in Schüttelkolbenkultivierungen vorzunehmen, wie es oftmals in der marinen Biotechnologie noch Standard ist, ist aus wissenschaftlicher Sicht sehr unbefriedigend. Die Bewertung sollte vielmehr auf einer möglichst quantitativen, analytischen Ebene erfolgen. Realisiert werden kann dieses zum Beispiel durch den Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie. Auf dieses Verfahren und seiner Anwendung bei der Kultivierung mariner Mikroorganismen soll im folgenden Kapitel eingegangen werden.

#### **4.3.2 Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Mediumsoptimierung**

Fluoreszenzspektroskopische Verfahren stellen nützliche Hilfen zur Bioprozesskontrolle dar, da eine große Anzahl von Prozessvariablen, wie die Zellaktivität und die Medienzusammensetzung, nicht-invasiv und in situ bestimmt werden können. Einige kommerziell erhältliche Fluorosensoren (z.B. Ingold Fluorosensor) sind für die Messung der Fluoreszenz des Mediums (auf der Basis des NAD(P)H-Anteils) optimiert worden. Sie sind on line und in situ einsetzbar, aber nutzen nur eine diskrete Exzitations- und Emissionswellenlänge. Mehr Informationen über den Bioprozess wie zellinterne Variablen und Produktbildungen können mit Fluorosensoren gewonnen werden, die mit mehreren Exzitations- und Emissionswellenlängen arbeiten, wie es bei der 2D-Fluoreszenzspektroskopie der Fall ist.

Der Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie bietet auch in der marinen Biotechnologie viele Vorteile. So kann mit diesem Verfahren eine Probe

- nicht invasiv,
- in line und
- in time

auf alle auftretenden Fluorophore in nur einer Minute analysiert werden. Das Verfahren beruht auf der Anregung sämtlicher Fluorophore einer Probe durch nacheinander erfolgendes Einstrahlen von Licht unterschiedlicher Wellenlänge [102]. Zu diesem Zweck wird das Licht über Gitter oder Wellenfilter in seine spektralen Bestandteile zerlegt. Für diese Systeme sind verschiedene Geräte kommerziell erhältlich. Bei dem System der Firma Delta, Light & Optics (Dänemark) [102] wird das Licht mit Hilfe von Filterrädern in Abständen von 20 nm in verschiedene Anregungswellenlängen zerlegt. Über eine Glasfaser wird das Exzitationslicht zur Probe geleitet. Dort werden die entsprechenden Fluorophore zur Fluoreszenz angeregt. Der rückwertige Anteil des Fluoreszenzlichtes wird über einen weiteren Lichtleiter eingefangen und mit Hilfe eines zweiten Filtrerrades (Emissionsfiltrerrad) analysiert. Ist dieser Vorgang abgeschlossen, so wird das nächste Exzitationslicht eingestrahlt. Der Vorgang wird so lange wiederholt, bis das gesamte Fluoreszenzspektrum abgescannt worden ist. Man erhält so ein Spektrum, welches die Lage und die Intensität aller enthaltenen Fluorophore der Probe angibt (Abb. 4.3.2).

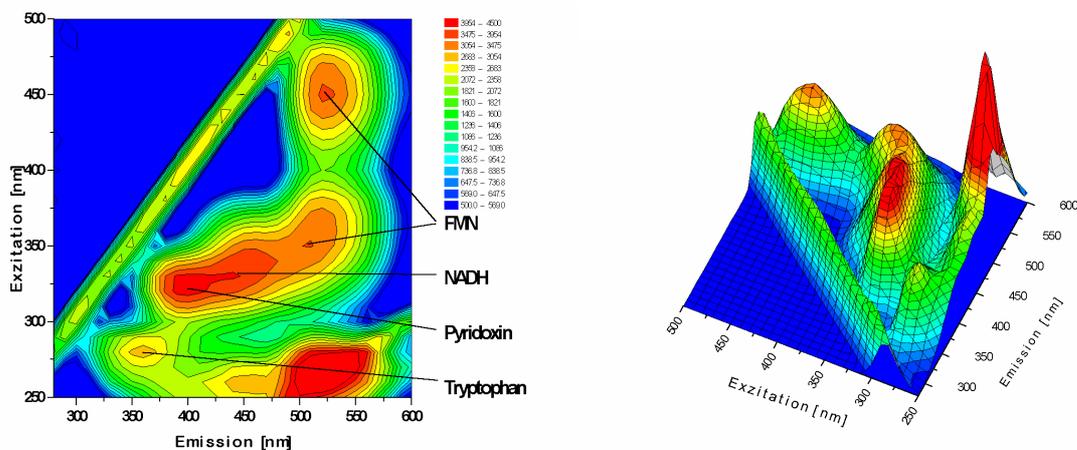


Abb. 4.3.2: Typisches 2D-Fluoreszenzspektrum eines komplexen Kultivierungsmediums; Links: Kontorplot, Rechts: isometrische Projektion

Das Verfahren wurde hier angewendet, um in Suspensionskulturen des Stammes B8300 die Auswirkungen unterschiedlicher Medienzusammensetzungen zu untersuchen.

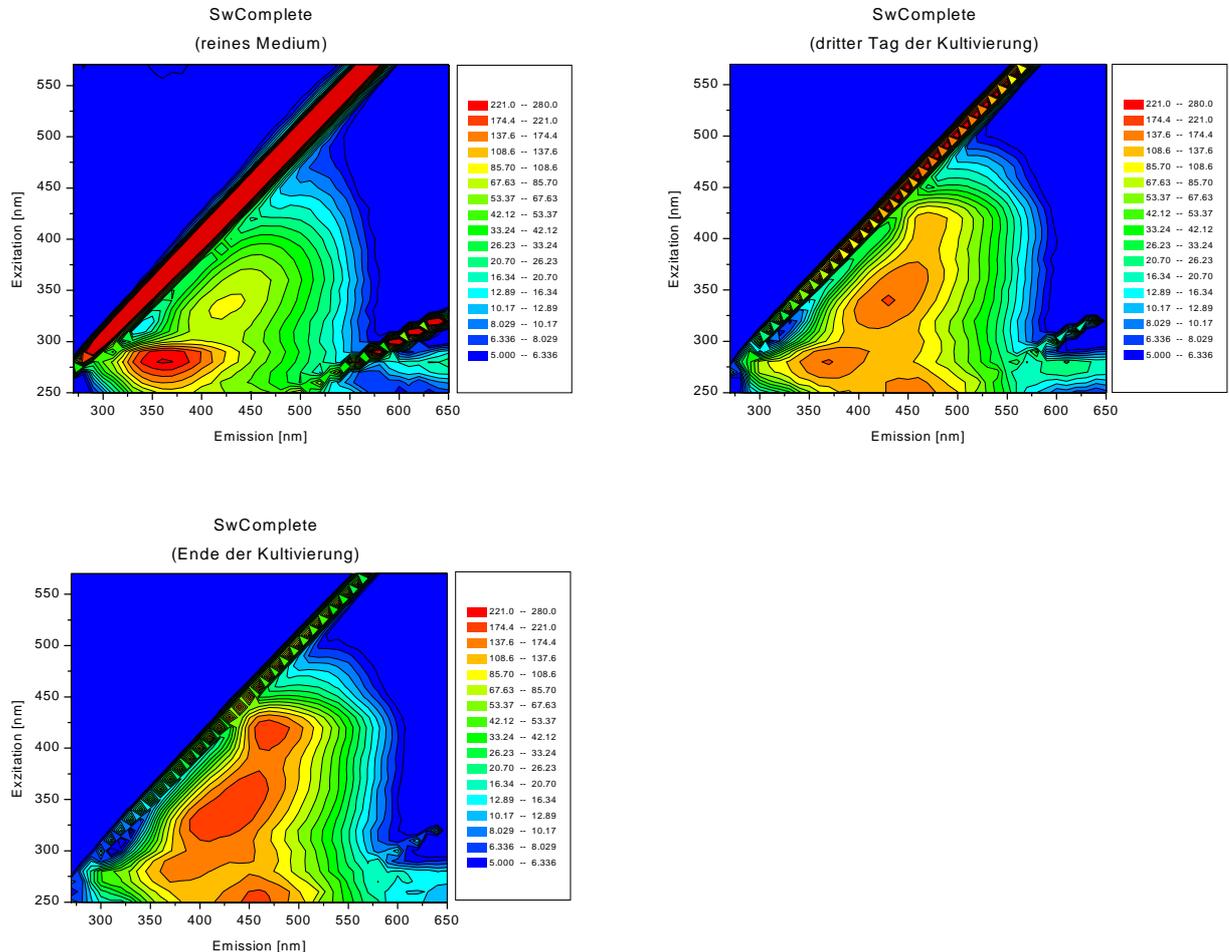


Abb. 4.3.3: 2D-Fluoreszenzspektren von der Kultivierung des Stammes B8300 in Seewasserkomplettmedium (SwComplete) [98]

Die Graphiken zeigen die während der Kultivierung im Medium vor sich gehenden Veränderungen. Im reinem Medium (Abb. 4.3.3; Spektrum oben links) ist deutlich ein Peak bei Ex280nm:Em360nm (Exzitation:Emission) zu erkennen. Dieser ist denen im Medium enthaltenen Proteinen zuzuordnen. Die Peakintensität nimmt im Verlauf der Kultivierung deutlich ab, was auf eine Verstoffwechslung durch den Streptomceten hinweist. Dafür treten im Bereich höherer Exzitations- und Emissionswellenlängen neue Peaks auf, die im Verlaufe der Kultivierung an Intensität zunehmen. Diese Peaks werden durch freigesetzte Stoffwechselprodukte der Bakterien verursacht.

Verwendet man ein synthetisches Medium (in diesem Falle das bereits mehrfach erwähnte Marine Broth), so zeigt sich ein deutlich anderes Verhalten.

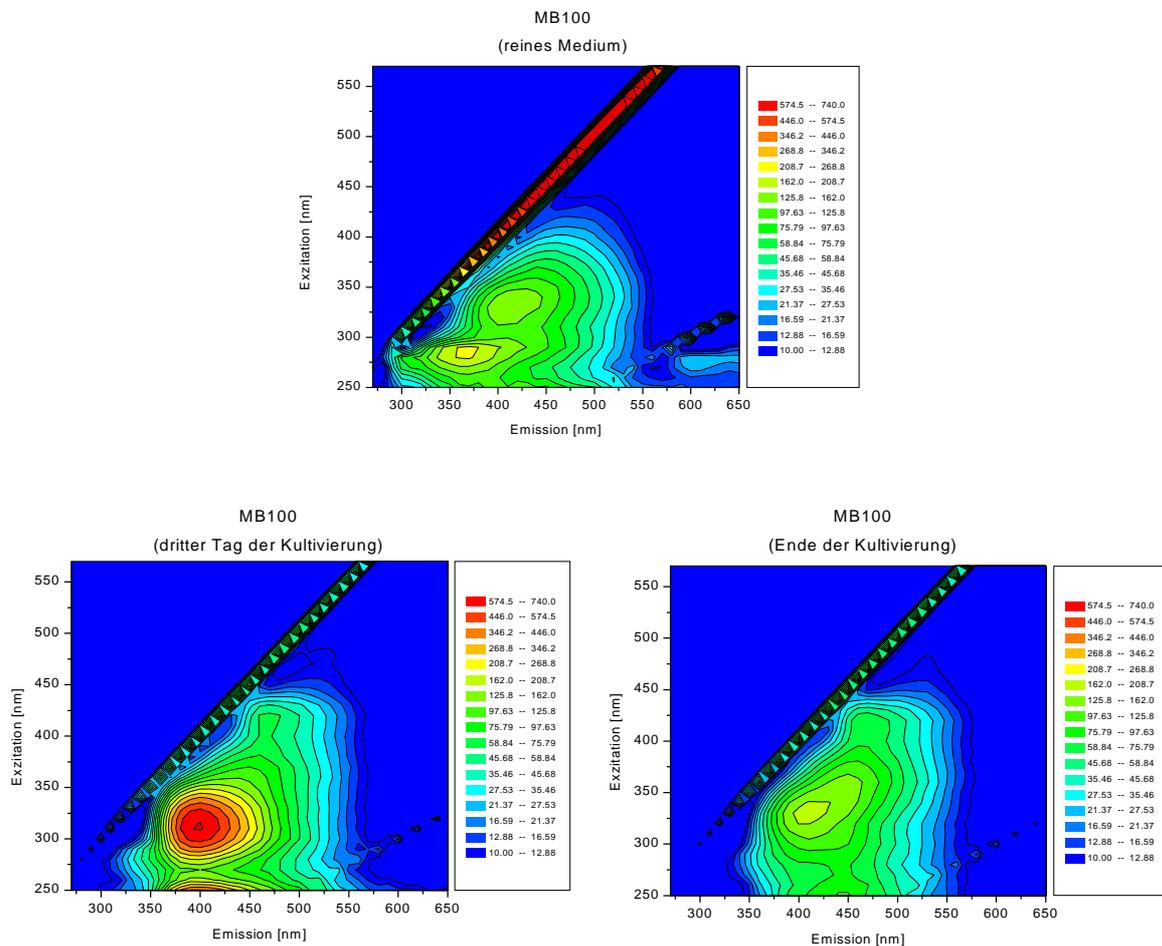


Abb. 4.3.4: 2D-Fluoreszenzspektren von der Kultivierung des Stammes B8300 in Marine Broth (MB100) [98]

Wie aus obigen Abbildung zu ersehen ist, nimmt die Intensität des Peaks bei Ex280nm:Em360nm im Verlauf der Kultivierung ab. Dies weist wiederum auf einen Abbau der im Medium enthaltenen Proteine hin. Im Gegensatz zur Kultivierung im Seewasserkompletmedium zeigen sich aber deutlich weniger entstehende Peaks und somit weniger fluoreszenzaktive Stoffwechselprodukte des Stammes B8300. Besonders auffällig ist der Peak bei Ex310nm:Em400 nm. Er wird offenbar von einer Substanz hervorgerufen, die während der ersten Kultivierungstage von den Organismen produziert und dann wieder abgebaut wird bzw. instabil ist. Deutlich wird dieses Verhalten, wenn man den Intensitätsverlauf bestimmter Fluoreszenzpeaks über die gesamte Kultivierungsdauer darstellt (s. Abb. 4.3.5).

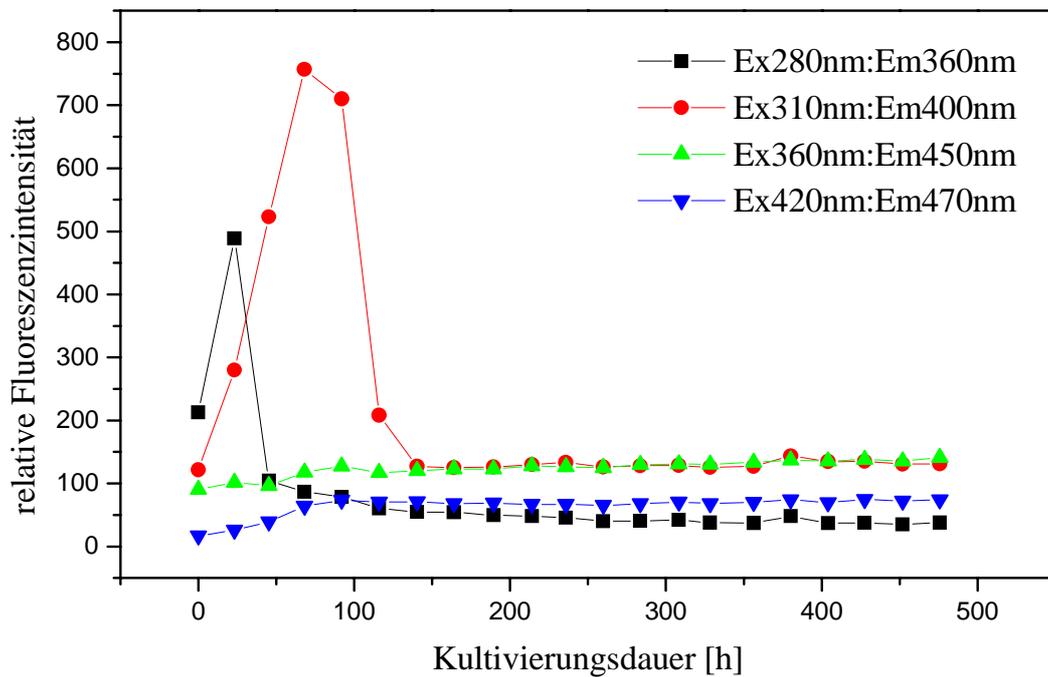


Abb. 4.3.5: Verlauf ausgewählter Fluoreszenzpeaks bei der Kultivierung von B8300 in Marine Broth [98]

Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie erhält man somit schnell Aufschluss über das Verhalten der Zellen bei Änderung der Medienzusammensetzung. Es lassen sich Daten über die Stoffwechselaktivität (Biomasseproduktion) gewinnen, wenn z. B. der Bereich der NADH- oder FMN-Fluoreszenz analysiert wird. Über die Fluoreszenzabnahme insbesondere des freien Proteins kann die Stoffwechselaktivität ebenfalls abgeschätzt werden. Es ist teilweise auch möglich, Stoffe zu analysieren, die selbst nicht fluoreszenzaktiv sind, wenn sie mit Fluoreszenzen von Begleitstoffen eindeutig korreliert werden können [119]. Eine Bewertung des Mediums sollte in einem ersten Versuch über eine Begleitanalytik (z. B. HPLC) der interessierenden Schlüsselkomponenten (z. B. Antibiotikaproduktion; Pigmentierung oder auch Biomasse) erfolgen. Kann dann eine erfolgreiche Korrelation mit den Fluoreszenzdaten erfolgen, so erhält man durch das Erstellen von Differenzspektren gute Vergleiche über die eingesetzten Medien. Dabei lohnt es sich nicht nur unterschiedliche Medien miteinander zu vergleichen. Über diese Technik kann auch sehr einfach bestimmt werden, wie weit ein eingesetztes Medium verdünnt werden kann, um eine ausreichende Biomasseproduktion zu erhalten (s. Abbildung 4.3.6).

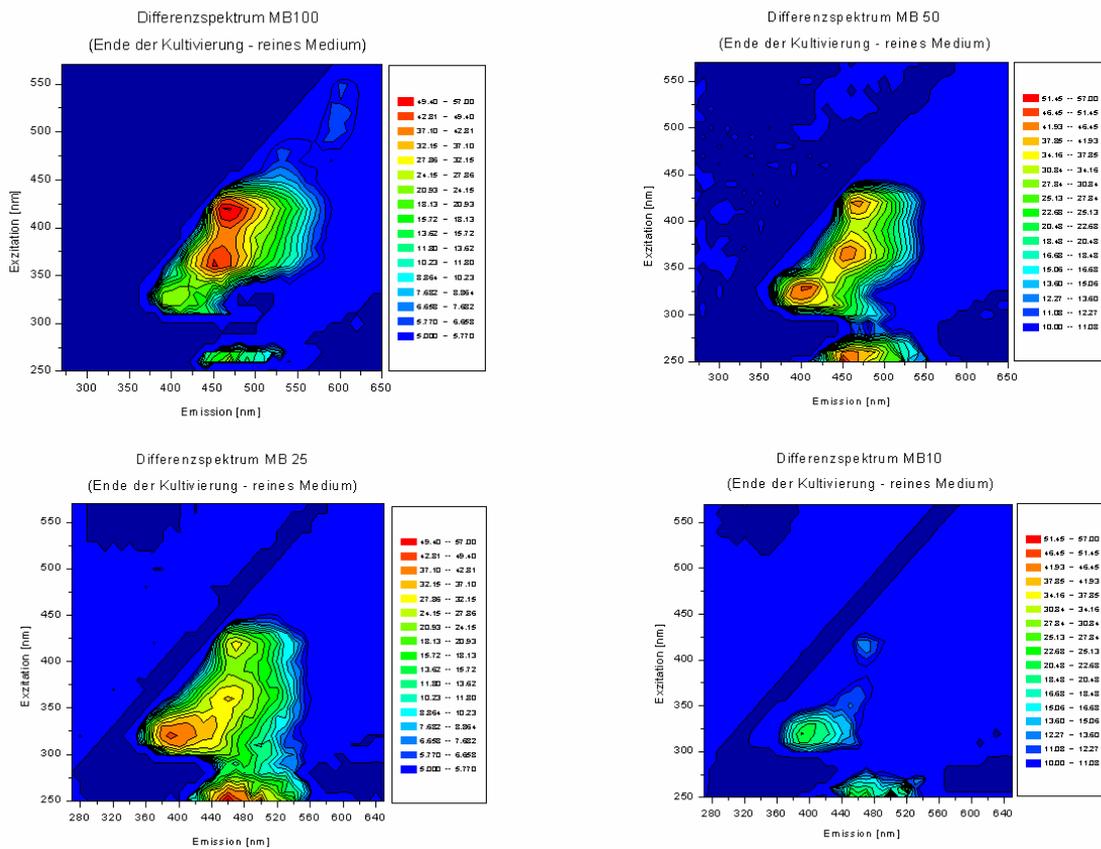


Abb. 4.3.6: Verdünnungsreihe von Marine Broth bei der Kultivierung des *Streptomyces* B8300; MB100 = 100%iges Medium; MB50 = 50iges Medium; MB25 = 25%iges Medium; MB10 = 10%iges Medium; der Gehalt an NaCl wurde jeweils konstant gehalten [82]

Bei der Bildung der Differenzspektren wird das Spektrum des reinen Mediums von dem der letzten Probe subtrahiert. Dadurch lässt sich erkennen, welche Peaks im Laufe der Kultivierung hinzugekommen und welche reduziert worden sind. Bei allen vier Verdünnungsstufen werden die eingesetzten proteinogenen Nährstoffe abgebaut (fehlender Peak bei Ex280nm:Em360nm; siehe auch Spektrum des reinen MB-Mediums in Abb.4.3.4). Es zeigt sich aber auch, dass in dem 50 %igen Medium gegenüber dem 100 %igen Medium weitere fluoreszenzaktive Substanzen auftreten, die auf eine gesteigerte Stoffwechselaktivität hindeuten können. MB10 hingegen ist als Medium zu schwach konzentriert, es ermöglicht zu wenig Wachstum und damit auch kaum die Produktion von Sekundärmetaboliten.

Es hat sich im Laufe der Untersuchungen gezeigt, dass die 2D-Fluoreszenzspektroskopie ein wertvolles Tool zur Optimierung mariner biotechnologischer Prozesse darstellen kann. Das

Verfahren kommt allerdings an seine Grenzen, wenn sehr starke Eigenfluoreszenzen des verwendeten Mediums oder wenn Fluoreszenzlöschungen auftreten. Auf weitere, speziellere Ansätze zur Mediumsoptimierung, wird bei den nachfolgenden ausführlichen Fallbeispielen der Gewinnung von Enzymen aus marinen Mikroorganismen eingegangen.

#### 4.4 Marine Enzymsysteme

Enzyme sind für die Stoffwechselvorgänge in sämtlichen Lebewesen verantwortlich. Durch sie werden Nährstoffe in Biomasse, (Sekundär)Metaboliten und Energie umgesetzt. Sie sind letztendlich auch die Baumeister der komplexen marinen Naturstoffe, die so viel versprechende Funktionalitäten im Bereich der menschlichen Gesundheit aufzeigen. Enzyme weisen durch ihre Spezifitäten (Enantio-, Gruppen-, Substrat- und Wirkungsspezifität) Eigenschaften auf, die auch außerhalb der Organismen für verschiedenste Anwendungen wertvolle Dienste leisten können. Enzyme finden daher in den Bereichen

- Biotransformation/Biokatalyse,
- Nahrungs- und Futtermittelindustrie,
- Textil-, Leder-, Papier- und Waschmittelindustrie,
- Pharma und
- Analytik

vielfältige Anwendungen. Der Beginn der technischen Nutzung von Enzymen lässt sich auf das Jahr 1908 datieren. In diesem Jahr hat die Firma Röhme, Darmstadt, ihr Waschmittel „Burnus“ vorgestellt, welches ein Enzym als waschaktive Substanz enthielt. Ebenfalls von Röhme stammt aus der gleichen Zeit das Enzymprodukt „Oropon“, welches aus tierischen Bauchspeicheldrüsen gewonnen wurde. Dieses Produkt ersetzte die Verwendung von Kot und Mist bei der Lederbeize (Entfernen von Haaren, Fleischresten und Fett von Rohleder) [103, 104]. Seit dieser Zeit sind die Applikationen von Enzymen in den oben genannten Bereichen nicht mehr wegzudenken. Verschiedene Schätzungen gehen davon aus, dass es 6.000 – 7.000 Enzyme gibt, von denen ungefähr 3.000 in ihrer Funktion beschrieben worden sind.

Interessanterweise werden bisher nur etwa 100 dieser Enzyme industriell genutzt. Der Weltmarkt für solche Biokatalysatoren, inklusive Forschung und Diagnostik, wird auf etwa 1 Milliarde US-Dollar geschätzt (mit einer Wachstumsrate von ungefähr 10 % pro Jahr) [104]. Die Anwendungen erstrecken sich über alle Enzymklassen, wobei der Großteil der Enzyme in der Waschmittel- und Lebensmittelindustrie verwendet wird (s. Tab. 4.4.1).

Tab. 4.4.1: Beispiele für die Verwendung von Enzymen [nach 103]

Enzymklasse	Enzym [EC]	Anwendung
Oxidoreduktasen	Peroxidase [1.11.1.7]	Bleichen von Papier
Transferasen	Aminotransferasen [2.6.1.x]	Aminosäuresynthese
Hydrolasen	Lipase [3.1.1.3]	Waschmittel
	Pektinase [3.2.1.15]	Fruchtsaftklärung
	Urokinase [3.4.21.31]	Blutgerinnsel-Hydrolyse
Lyasen	Fumarase [4.2.12.x]	Malatherstellung
Isomerasen	Aminosäureracemasen [5.1.1.x]	Racematspaltungen
Ligasen	DNA-Ligase [6.5.11.x]	DNA-Synthese

Es sei an dieser Stelle auch noch einmal an die in Kapitel 3 beschriebenen Verfahren erinnert. Gerade im Bereich der Grund- und Feinchemikalien wird mehr und mehr der Einsatz der Biotransformation mittels speziellen Enzymsystemen forciert [54, 105, 106]. Die damit verbundene Wertschöpfung liegt um rund zwei Größenordnungen höher, als der Weltmarkt für Enzyme (knapp 100 Milliarden US-Dollar). Einen sehr guten Überblick über industrielle Biotransformationen bieten Liese et al. [54].

Isoliert werden die Enzyme aus entsprechenden Mikro- oder Makroorganismen (Bakterien, Pilze, Pflanzen oder Tiere (meist in Form von Schlachtabfällen)). Hier setzt sich mittlerweile aber auch der Einsatz der modernen Biotechnologie unter der Zuhilfenahme der Gentechnik verstärkt durch. Ist ein Enzym mit der gewünschten Wirkung und Spezifität gefunden worden, so wird das entsprechende Gen in einen Produktionsorganismus (z. B. *Bacillus subtilis*) koloniert und meist überexprimiert. In vielen Fällen lässt sich nur auf diesem Wege ein Enzym ökonomisch sinnvoll herstellen.

Am Anfang steht aber immer das Screening nach geeigneten Enzymen für die gesuchte Funktionalität (z. B. Einsatz in Biotransformationen, Verwendung als biologische Komponente in der Biosensorik). Hier finden marine Enzymsysteme erstaunlich wenig Aufmerksamkeit. Von den ungefähr 100 industriell eingesetzten Enzymen ist zwar die Mehrzahl mikrobiellen Ursprungs, da mikrobielle Enzyme in der Regel stabiler sind als ihre entsprechenden Analoga in Tieren oder Pflanzen, aber unter den ca. 25 eingesetzten Produktionsstämmen befindet sich kein mariner. Auch in der Literatur sind Untersuchungen zum Thema mariner Enzymsysteme wenig vertreten [107, 108]. Beschrieben worden sind dabei unter anderem die nachfolgenden Enzyme, die auch eine gewisse wirtschaftliche Bedeutung erlangen könnten [109]:

- Phosphatase
- Arylsulfatase
- Agarase
- L-Asparaginase
- L-Glutaminase
- Chitinase
- Mannase
- Xylanase

Bedeutend mehr Aufmerksamkeit erhalten zur Zeit die sogenannten Extremozyme. Diese sind Enzyme, die aus extremophilen Mikroorganismen gewonnen werden [104, 110]. In den vergangenen Jahren gelang es, eine Vielzahl von Mikroorganismen aus extremen Biotopen wie z.B. kontinentalen und submarinen Vulkangebieten, heißen Solfatarenfeldern, alkalischen Gewässern, Salzseen, kalten Regionen oder extrem sauren Habitaten zu isolieren. Von diesen Extremophilen sind wiederum einige Stämme marinen Ursprungs (insbesondere im Bereich der thermophilen und halophilen Stämme). Entsprechend ihres natürlichen Lebensraums sind diese extremophilen Mikroorganismen in der Lage, bei Temperaturen von bis zu 105°C, bei pH Werten zwischen 0,7 und pH 11 oder Salzkonzentrationen von bis zu 30 % optimal zu wachsen. In Folge der Anpassung an derartige Biotope sind auch die von diesen Mikroorganismen produzierten Enzyme unter extremen Bedingungen stabil. So erhofft man sich von diesen Enzymen zum Beispiel den Einsatz in Biotransformation bei besonders niedrigen oder besonders hohen Temperaturen. Proteasen aus extrem thermophilen Mikroorganismen beispielsweise zeichnen sich neben ihrer ausgeprägten Thermostabilität

(Halbwertszeiten von bis zu 96 h bei 80°C) auch durch ihre hohe Spezifität und schnelle Reaktionskinetik aus. Eine bessere Bioverfügbarkeit der Substrate bei höheren Temperaturen, erhöhte Diffusionskonstanten, eine höhere Raum-Zeit-Ausbeute sowie die Vermeidung von Kontaminationen bei hohen Prozesstemperaturen lassen die Anwendung thermostabiler Proteasen gegenüber Enzymen aus mesophilen Mikroorganismen sinnvoll erscheinen. Eine weitere Klasse von marinen Enzymen, die in den letzten Jahren intensiver untersucht worden sind, sind die Haloperoxidasen und Halogenasen [111]. Über diese Enzyme wird weiter unten noch etwas ausführlicher berichtet werden (s. Kapitel 4.4.4).

Ein Ziel der im nachfolgenden beschriebenen Arbeiten war es, Enzymsysteme für spezielle analytische Applikationen aus marinen Mikroorganismen zu isolieren (L-Serindehydratase und Sulfitoxidase). Des Weiteren wurden Screeningverfahren unter Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Identifikation von Haloperoxidasen und Halogenasen entwickelt, die für die *in vitro* Halogenierung eingesetzt werden können. Am Beispiel des API ZYM<sup>®</sup>-Test wurde weiterhin der Einsatz eines kommerziellen Enzymtestsystems zur Charakterisierung der mit Nordseebryozoen vergesellschafteten marinen Pilze getestet.

#### 4.4.1 Enzymscreening

Zur effizienten Identifikation von Enzymen aus marinen Mikroorganismen muss man über möglichst schnelle und zuverlässige Testsysteme für die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten verfügen. Ein solches System, welches ohne eine Isolierung oder Kultivierung einzelner Spezies abläuft, wurde unter anderem von Qgunseitan entwickelt [112]. Bei diesem Verfahren wird ein Minimalmedium mit einer entsprechenden Meerwasserprobe angeimpft. Nach Abschluss der Kultivierung der Mischpopulation werden die gesamten Zellen geerntet und per Ultraschall aufgeschlossen. Mit Hilfe von Nitrocellulosemembranen werden die freigesetzten Enzyme immobilisiert. Zu diesen Immobilisaten werden anschließend verschiedene Substrate und Farbreagenzien gegeben. Dort, wo auf der Membran entsprechende Enzymaktivitäten zu finden ist, erscheinen farbige Partien.

Ein ähnliches System stellt der API ZYM<sup>®</sup>-Test der Firma bioMérieux, Frankreich, dar, der hier zum Enzymscreening von marinen Pilzen eingesetzt wurde, die von Nordseebryozoen isoliert worden waren. Das API ZYM<sup>®</sup>-System findet ursprünglich Anwendung in der

klinischen Mikrobiologie. Der große Vorteil des Systems liegt darin, dass es bereits nach 4 h verlässliche Unterscheidungen auch verwandter Organismen zulässt. Der Test kann aufgrund der Ausrichtung auf den klinischen Bereich nicht nur mit Zellkulturen und zellfreien Extrakten sondern auch mit Urin oder Serum verwendet werden [113]. Über die klinische Anwendung hinaus wird der Test in der Lebensmittelkontrolle eingesetzt [114, 115]. Der API ZYM<sup>®</sup>-Test kann parallel 19 verschiedene Enzyme semiquantitativ nachweisen. In Tabelle 4.4.2 (Seite 63) sind die entsprechenden Enzyme aufgelistet. Potentielle Einsatzgebiete einiger der über das API ZYM<sup>®</sup>-System getesteten Enzyme finden sich im Anhang in Kapitel 8.5 [116]. Der Test selbst besteht aus 20 Mikrovertiefungen in einer Kunststoffplatte, deren Böden mit verschiedenen Substraten (s. Anhang Kap. 8.4) beschichtet sind, wodurch der Kontakt der zu untersuchenden Flüssigkeiten mit den unlöslichen Substraten ermöglicht wird.

#### 4.4.1.1 Enzymscreening mit dem API ZYM<sup>®</sup>-System bei marinen Pilzen

Im Rahmen des niedersächsischen Projektes „Marine Biotechnologie“ wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Krumbein, Universität Oldenburg, die mit den Bryozoen vergesellschafteten Pilzen untersucht. Wie bereits weiter oben beschrieben worden ist, konnten auf *Flustra foliacea* keine Pilze nachgewiesen werden. Obwohl bei der Bryozoe *Electra pilosa* ähnliche Umweltbedingungen vorliegen, konnten in der Arbeitsgruppe Krumbein verschiedene Pilze von der Oberfläche dieser Bryozoe isoliert werden. Auf *Electra pilosa* wurden 64-500 Zellen/mm<sup>2</sup> festgestellt. Der mikrobielle Bewuchs umfasst ausschließlich Arten, die sich eng an die Oberfläche anheften können und kaum mobil sind. Im Rasterelektronenmikroskop konnten Diatomeen (*Navicula*, *Amphora*), Cyanobakterien (*Phormidium*, *Spirulina*) und dünne septierte und dichotom verzweigte Pilzhyphen festgestellt werden. Mittels molekularbiologischer Methoden (18S-rDNA) konnten drei Stämme der Gattungen *Acremonium*, *Penicillium* und *Phialophora* nachgewiesen werden. Durch Überführen der mit Tween-Lösung abgelösten Pilzhyphen auf antibiotikahaltige Festmedien (Streptomycinsulfat 100 µg/l, Chloramphenicol 30 µg/l, Penicillin G 100 µg/l und Bengalrose 60 µg/l), wurden die Pilze von den anderen vergesellschafteten Mikroorganismen isoliert [117]. Drei der so erhaltenen Pilzstämmen wurden mit dem API ZYM<sup>®</sup>-System untersucht [116].

Hierzu wurden die isolierten Pilze in einem Malzextraktmedium (siehe Anhang Kap. 8.6) kultiviert. Nach drei Tagen Kultivierungsdauer wurden die Zellen geerntet. Enzymatische Untersuchungen wurden mit dem Medium (extrazelluläre Enzyme; Zentrifugation bei 8000 g, 10 min, 4 °C) und den aufgeschlossenen Zellen durchgeführt. Der Aufschluss der Zellen wurde mittels Ultraschall vorgenommen (80 W; Intervall 0,2; 5 min pro 500 mg BFM). Einige der Pilzkulturen lassen sich nur schlecht abzentrifugieren. Daher werden dort Zellen und Medium gemeinsam dem Aufschluss und dem Enzymscreening zugeführt. Die Beschreibung der Durchführung des API ZYM<sup>®</sup>-Test befindet sich in Anhang (Kap. 8.7).

Tab. 4.4.2: Enzymscreening einiger mit *Electra pilosa* assoziierten Pilze [nach 116]

Enzym	Intensität der Farbreaktion				
	<i>Acremonium spec.</i> <sup>1</sup>	<i>Penicillium spec.</i> I <sup>2</sup>	<i>Penicillium spec.</i> I <sup>3</sup>	<i>Penicillium spec.</i> II <sup>2</sup>	<i>Penicillium spec.</i> II <sup>3</sup>
Ohne Enzym (Kontrolle)	0	0	0	0	0
Alkalische Phosphatase	0	0	5	0	5
Esterase (C 4)	2	2	2	1	3
Esterase Lipase (C 8)	0	1	2	1	1
Lipase (C 14)	0	0	0	0	0
Leucin-Arylamidase	1	0	3	0	5
Valin-Arylamidase	0	0	5	0	5
Cystin-Arylamidase	0	1	0	0	0
Trypsin	0	0	2	0	1
Chymotrypsin	0	0	0	0	0
Saure Phosphatase	5	3	5	3	5
Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase	5	3	5	3	5
α-Galactosidase	0	0	0	0	2
β-Galactosidase	1	0	0	0	1
β-Glucuronidase	0	0	0	0	0
α-Glucosidase	0	0	1	0	2
β-Glucosidase	0	0	1	0	2
N-Acetyl-β-Glucosaminidase	0	1	3	0	5
α-Mannosidase	0	0	0	0	1
α-Fucosidase	0	0	0	0	0

<sup>1</sup>Zellaufschluss mit Medium (Zellsuspension)

<sup>2</sup>Medium

<sup>3</sup>Zellaufschluss

Der API ZYM<sup>®</sup>-Test stellt ein sehr schnelles Verfahren zur Identifikation verschiedenster Enzymaktivitäten dar und kommt dabei ohne großen technischen Aufwand aus. Die Untersuchung an den aus der Nordsee stammenden Pilzen zeigte allerdings, dass bei den

Pilzen gerade die Enzymsysteme, die für eine industrielle Nutzung interessant wären (z. B. Lipase oder  $\beta$ -Galactosidase) nicht oder mit nur sehr geringer Aktivität vorkommen. Aufgrund dieser Tatsache und dem geringen Auftreten von vergesellschafteten marinen Pilzen bei den untersuchten Bryozoen, wurden in diesem Bereich keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Es erfolgte im Bereich der marinen Enzyme vielmehr eine Fokussierung auf die mit verschiedenen Makroorganismen vergesellschafteten Bakterien der Nordsee. Im Folgenden sollen diese Arbeiten am Beispiel des Screenings nach einer L-Serindehydratase und der nachfolgenden Isolierung und Charakterisierung des Enzyms beschrieben werden.

#### 4.4.2 L-Serindehydratase

Will man komplexe biotechnologische Prozesse effizient überwachen oder regeln, so wird hierfür eine zuverlässige und robuste Analytik benötigt (s. Kapitel 6). Für solche Aufgaben werden verstärkt bioanalytische Systeme eingesetzt. Hoch spezifische Systeme sind dabei die Biosensoren (s. Kapitel 6.1.2). Sie bieten die Möglichkeit auch in komplexen Medien einzelne Komponenten schnell zu detektieren. Voraussetzung hierfür sind entsprechend sensitive und spezifische Biokatalysatoren. Oftmals stehen für gegebene analytische Probleme die notwendigen Enzyme nicht kommerziell zur Verfügung. Im vorliegenden Fall wurde nach einem marinen Enzym zur spezifischen Umsetzung von L-Serin gesucht. Nähere Angaben zu der analytischen Fragestellung und dem damit verbundenen Prozess finden sich weiter unten im Kapitel 6.3.2 über die industriell durchgeführte Biotransformation von L-Serin und Indol zu L-Tryptophan.

Aminosäuren können mittels Enzymen über verschiedene Reaktionswege umgesetzt werden. Dieses kann zum einem über Oxidasen oder zu anderem über Deaminasen/Dehydratasen ablaufen. Aminosäureoxidasen (EC 1.4.3.3) sind oftmals nicht substratspezifisch und setzen somit eine Vielzahl von Aminosäuren um. Diese Querempfindlichkeiten wirken sich in komplexen Systemen, in denen mehrere Aminosäuren nebeneinander vorliegen, störend auf die Analytik von Serin aus, oder aber machen diese sogar unmöglich. Anders sieht es im Falle der Deaminasen/Dehydratasen aus. Hier gibt es substratspezifische Enzyme, die für den Einsatz in Biosensoren genutzt werden könnten. Hierzu gehört auch die L-Serindehydratase (EC 4.2.1.13) [118]. Sie weist in der Regel nur eine geringe Querempfindlichkeit zu Threonin

auf. Die L-Serindehydratase setzt L-Serin nicht oxidativ unter Deaminierung zu Pyruvat um. Analog läuft die Reaktion der D-Serindehydratase (EC 4.2.1.14) ab, auf deren Verwendung in Kapitel 6.2.2.1 eingegangen wird [119].

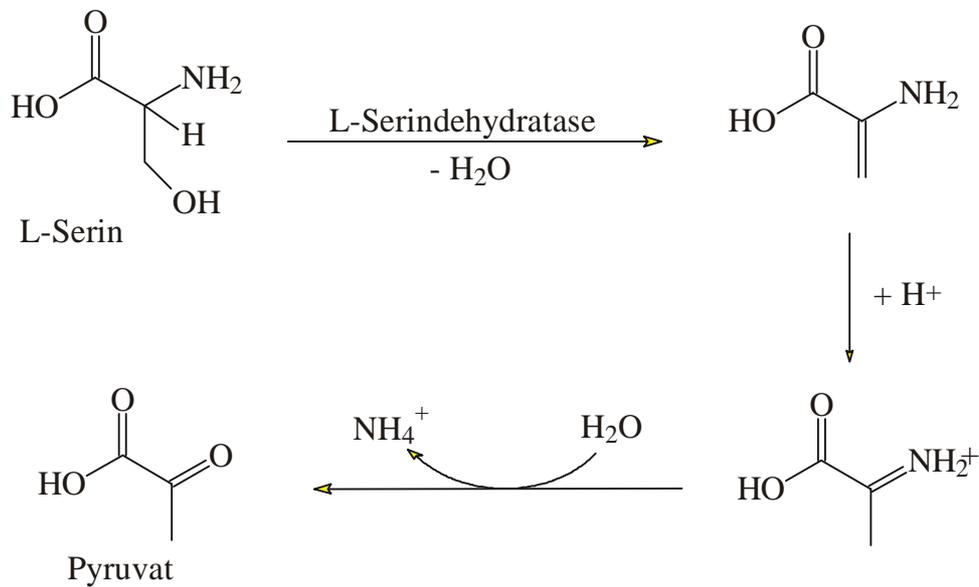


Abb. 4.4.1: Reaktionsschema der nichtoxidativen Deaminierung von L-Serin mittels L-Serindehydratase

Wie in Abbildung 4.4.1 zu sehen, wird im ersten Reaktionsschritt unter Abspaltung von Wasser das Aminoacrylat gebildet. Dieser  $\beta$ -Eliminierung folgt eine Umlagerung zum Imin. Das resultierende Amin wird im abschließenden Reaktionsschritt über Hydrolyse und Deaminierung zum Pyruvat umgesetzt.

Das Enzym kommt oftmals zusammen mit der L-Threonindehydratase vor. Die Umsetzung von L-Threonin verläuft über einen analogen Reaktionsmechanismus zum 2-Oxobutyrat. Beide Enzyme gehören zu der Enzymklasse der Hydrolasen und sind in der Literatur bereits mehrfach seit 1938 [120] beschrieben worden, wobei allerdings noch keine L-Serindehydratase aus einem marinen Organismus bekannt war und nur wenige der gefundenen Enzyme vollständig aufgereinigt worden sind. Eine vergleichende Auflistung einiger L-Serindehydratasen findet sich in Tabelle 4.4.3.

Tab. 4.4.3: Eigenschaften von verschiedenen mikrobiellen L-Serindehydratasen

Organismus	M <sub>r</sub> [kDa]	Unter- einheiten	T <sub>opt</sub> [°C]	pH <sub>opt</sub>	K <sub>M</sub> (L-Serin) [mM/l]	Anmerkungen
<i>Lactobacillus fermentum</i> [121]	150	4 mit ca. 40 kDa	45	8	65	Fe <sup>2+</sup> und PLP abhängig
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> [122]	180	α 30 kDa β 25 kDa	-	8,4	0,8	Fe-S-Cluster
<i>Clostridium propionicum</i> [123]	230	α 30 kDa β 26 kDa	-	-	5	Fe-S-Cluster
<i>Arthrobacter globiformis</i> [124]	-	-	-	7,5- 8,0	6,5	-
<i>Clostridium acidurici</i> [125]	72	-	-	8,5	7,7	Fe <sup>2+</sup> abhängig

Eine weitere Quelle für das Enzym ist der *Escherichia coli* Stamm K 12 [126, 127]. Darüber hinaus kommt die L-Serindehydratase auch in Säugetierzellen vor. Solche eukariotischen Enzyme benötigen in der Regel Pyridoxalphosphat als Cofaktor und setzen auch L-Threonin um [128]. Die mikrobiellen L-Serindehydratasen sind sämtlich sehr anfällig gegenüber Sauerstoff und werden unter Luftinfluss innerhalb weniger Stunden deaktiviert. Sie sind weiterhin vom Cofaktor Fe<sup>2+</sup> abhängig, da die Aktivität des Enzyms über Eisen-Schwefel-Cluster reguliert wird. Eine Reaktivierung einiger L-Serindehydratasen ist durch Zugabe von zweiwertigen Eisen daher möglich [97].

#### 4.4.2.1 Screening von Mischkulturen nach L-Serin umsetzenden Mikroorganismen

Aus dem Niedersächsischen Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie standen neben den in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Bryozoen weitere Makroorganismen zur Verfügung, deren vergesellschaftete Mikroorganismen einem L-Serindehydratase-Screening unterworfen worden sind [116]. Dabei handelte es sich unter anderem um *Ciona intestinalis* und *Aseidiella aspersa*.

Da es das Ziel der Screeningversuche war, ein Enzym zu identifizieren, welches spezifisch L-Serin umsetzt, wurden die Mischisolate zunächst in 500 ml schikanefreien Erlenmeyerkolben in einem Minimalmedium (s. Anhang Kap 8.8), welches außer Vitaminen und Spurenelementen als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle nur L-Serin enthält, bei 27 °C kultiviert. Die Kultivierungszeit bis zu einem sichtbaren Wachstum betrug zwei Wochen. Danach wurden die Mikroorganismen in verschiedenen Verdünnungen (1/1, 1/10, 1/100, 1/1000) auf das feste Minimalmedium gebracht und bei zwei verschiedenen Temperaturen, 26 °C und 37 °C, im Brutschrank inkubiert. Durch die unterschiedlichen Temperaturen sollte erreicht werden, dass verschiedenen Arten von Mikroorganismen Wachstumsvorteile geboten werden. Nach zwei Wochen zeigte sich auf den festen Medien ein verwertbarer Bewuchs.

Zur Vereinzelung wurde eine Kolonie ausgewählt, die von ihrer Morphologie her auf allen Kulturen zu finden war. Die Vereinzelungsausstriche wurden bei 26° C bzw. bei 37 °C bebrütet, wobei sich auch hier erst nach zwei Wochen ein Bewuchs zeigte. Zur Identifikation mittels der 16S-rDNA wurde der vereinzelte Organismus (ht98-E) an die DSMZ weitergeleitet.

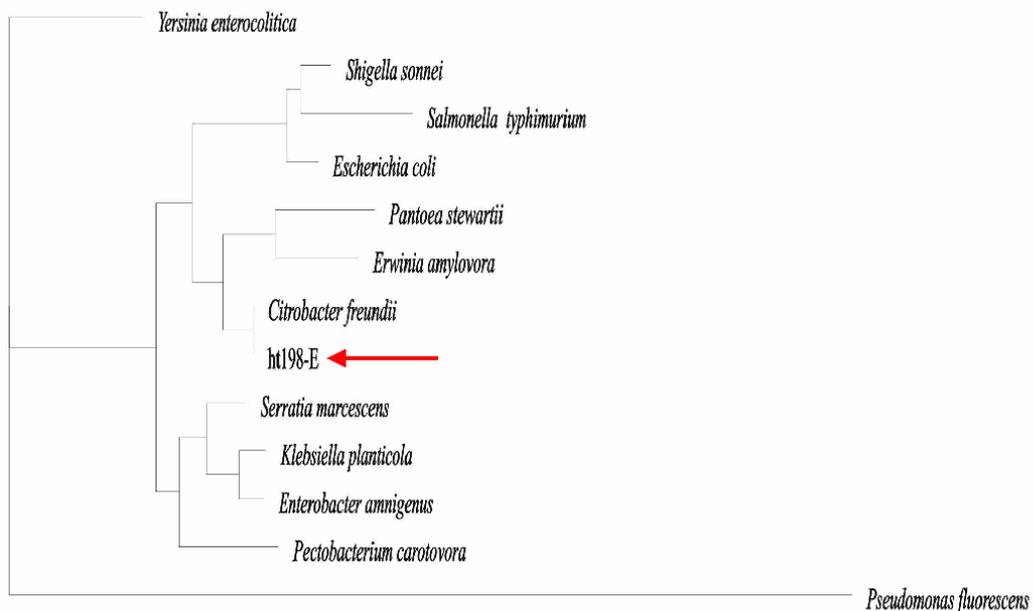


Abb. 4.4.2: Dendrogramm des Bakterienstammes ht98-E [116]

Das Dendrogramm in Abbildung 4.4.2 zeigt die phylogenetische Zuordnung des Bakterienstammes ht198-E, isoliert aus *Ciona intestinalis*. Der Baum beruht auf dem Vergleich der ersten 350 Nucleotide der 16S-rDNA einiger Vertreter aus der Unterklasse der  $\gamma$ -Proteobakterien, erstellt nach der Neighbor-Joining Methode. Der Balken im unteren Bereich des Dendrogramms symbolisiert 10 Nucleotid-Austausche per 100 Nucleotide. Die 16S-rDNA-Bestimmung ergab, dass die Mikroorganismen eine phylogenetische Übereinstimmung von mehr als 95 % zu *Citrobacter freundii* aufweisen. *Citrobacter freundii* stammt wahrscheinlich aus dem Darm der zum Screening eingesetzten Seescheide *Ciona intestinalis*. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass der isolierte Mikroorganismus nicht marinen Ursprungs ist, da er ebenfalls im Darm terrestrischer Organismen zu finden ist.

Dieses ist ein Problem, welches beim Screening mariner Mikroorganismen häufiger auftreten kann. Die Organismen, die bei einem solchen Screening gefunden werden, sind nicht zwangsläufig „marine“ Mikroorganismen, auch wenn man von einer Probe marinen Ursprungs ausgeht. Viele Mikroorganismen haben sich sowohl an marine, wie auch terrestrische und limnische Habitate angepasst. Beim isolierten *Citrobacter freundii* kommt weiterhin hinzu, dass es sich um einen Organismus handelt, der unter bestimmten Umständen Toxine bildet und der Risikogruppe 2 zuzuordnen ist. Da keine weiteren Mikroorganismen gefunden werden konnten, die auf dem L-Serin-Minimalmedium Wachstum zeigten, wurde das Screening an *Ciona intestinalis* und *Aseidiella aspersa* nicht weiterverfolgt. Die weiteren Untersuchungen wurden aus diesem Grund mit den in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Extrakten von *Bugula plumosa* durchgeführt. Bei diesen Experimenten wurden 200  $\mu$ l des Minimalmediums (s. Kap. 8.2 im Anhang) mit 4  $\mu$ l der Bryozoenextrakte versetzt und in Mikrotiterplatten mit 96 Wells (TechnoPlastic, Schweiz) auf einem Thermoschüttler inkubiert. In den Medien, die mit dem Extrakt der homogenisierten *Bugula plumosa* angeimpft wurden, konnte nach 6 Tagen bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C Wachstum festgestellt werden. Der isolierte Stamm, mit der Bezeichnung MBT-A4, wurde im nachfolgenden eingehend charakterisiert [96]. Dieses soll an dieser Stelle geschildert werden, da es sich im Laufe der Arbeiten herausstellte, dass es sich bei MBT-A4 um einen bisher nicht bekannten marinen Mikroorganismus handelt.

#### 4.4.2.2 Charakterisierung des Stammes MBT-A4

Zur Charakterisierung wurde der Stamm auf MB-Medium (s. Anhang Kap. 8.3) bei 30 °C kultiviert. Auf die Optimierung der Kultivierungsbedingungen bezüglich der Enzymaktivität wird im nachfolgenden Kapitel eingegangen. MBT-A4 ist ein nicht beweglicher aerober, Gram-negativer Stamm, der kugelförmig bis zylindrisch wächst (0,5 – 1 x 0,7-1 µm). Die Zellen wachsen einzeln oder in kurzen Ketten (s. Abb. 4.4.3).

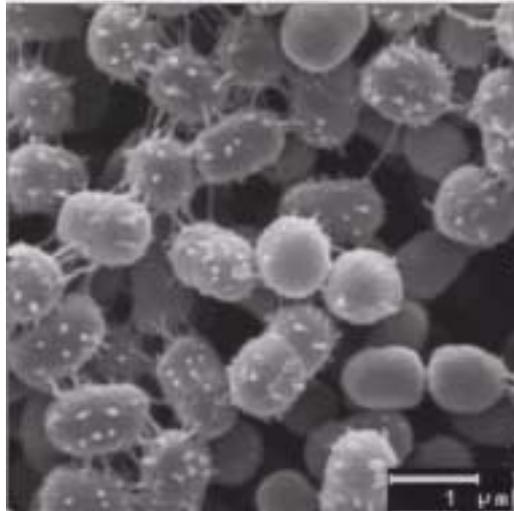


Abb. 4.4.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von MBT-A4 (Zellen aus der Mitte der exponentiellen Phase); Vergrößerung 15.000fach [96]

Die Morphologie des Wachstums verändert sich allerdings, wenn die Salzkonzentration im Medium unter 2 % abgesenkt wird (bei gleichzeitiger deutlicher Reduktion der Nährstoffe unter 20 %) (s. Abb. 4.4.4).

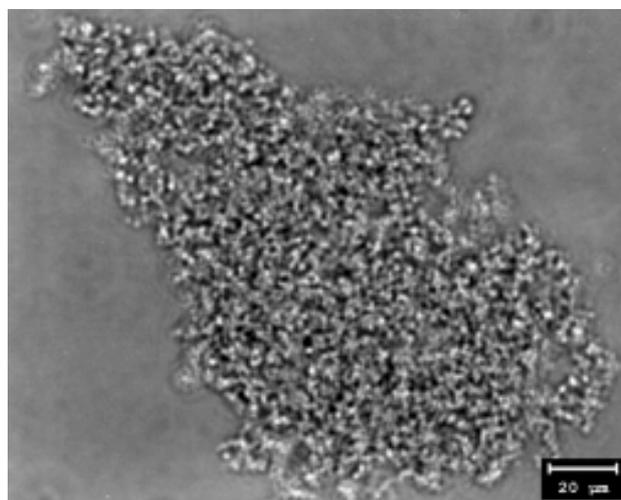


Abb. 4.4.4: Agglomeration von MBT-A4 bei geringen Salz- und Nährstoffkonzentrationen [129]

Zur Beschreibung der Stoffwechselaktivität wurde das Biolog GN2 System (Biolog Inc., Hayward, CA) verwendet. Mit Hilfe dieses Systems kann auf Mikrotiterplatten die Verstoffwechslung verschiedenster C-Quellen untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass MBT-A4 eine Vielzahl von C-Quellen, wie Glykogen, Fructose, Glucose, Essigsäure und Milchsäure oxidieren kann, während er z. B. auf Lactose, Maltose oder Raffinose keine Stoffwechselaktivität aufzeigt. Die komplette Liste der getesteten C-Quellen findet sich im Anhang (Kap. 8.9). Einen weiteren Aufschluss über die Stoffwechselaktivitäten gibt der weiter oben beschriebene API 20 NE Test der Firma Mérieux. Auf diesem Wege konnte festgestellt werden, dass MBT-A4 Cytochromoxidase- und  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten ausbildet. Hingegen konnte keine Aktivität für Urease und  $\beta$ -Glucosidase festgestellt werden.

Die Identifikation des Stammes wurde wiederum an der DSMZ, Braunschweig, mittels der 16S-rDNA-Methode durchgeführt. Bei diesen phylogenetischen Untersuchungen wurde *Paracoccus marcusii* als nächster Verwandter von MBT-A4 ermittelt. Eine vergleichende Untersuchung mit anderen *Paracoccus spec.* zeigt Tabelle 4.4.4.

Tab. 4.4.4: Vergleich ausgesuchter Charakteristika von MBT-A4 mit den nächsten phylogentischen Nachbarn [nach 96]

Eigenschaft	Stamm MBT-A4	<i>Paracoccus marcusii</i> [130]	<i>Paracoccus carotinifaciens</i> [131]	<i>Paracoccus alcaliphilus</i> [132]
Beweglichkeit	-	-	+	-
Pigmentierung	-	+	+	-
Urease	-	-	-	+
Nitratreduktion	+	-	-	+
$\beta$ -Glucosidase	-	+	+	<b>n.b</b>
Wachstum auf	6% NaCl	+	<b>s</b>	<b>s</b>
	Formiat	+	+	<b>n.b.</b>
	Saccharose	-	+	<b>n.b.</b>
	Glycerin	+	+	<b>n.b.</b>
	Mannitol	+	+	<b>n.b.</b>
	Inositol	+	+	<b>n.b.</b>
	L-Serin	+	-	<b>n.b.</b>

+: Positiv; -: Negativ; s: schwach; n.b.: nicht beschrieben

Das phylogenetische Dendrogramm (Abb. 4.4.5), welches auf der Basis der 16S-rDNA-Analyse erstellt wurde, ergibt Übereinstimmungen von 97,6 % für *Paracoccus marcusii*,

97,4 % für *Paracoccus carotinifaciens* und 97,1% für *Paracoccus alcaliphilus*. Andere Vertreter der *Paracocci* wiesen Übereinstimmungen zwischen 91,9 bis 96,8 % auf.

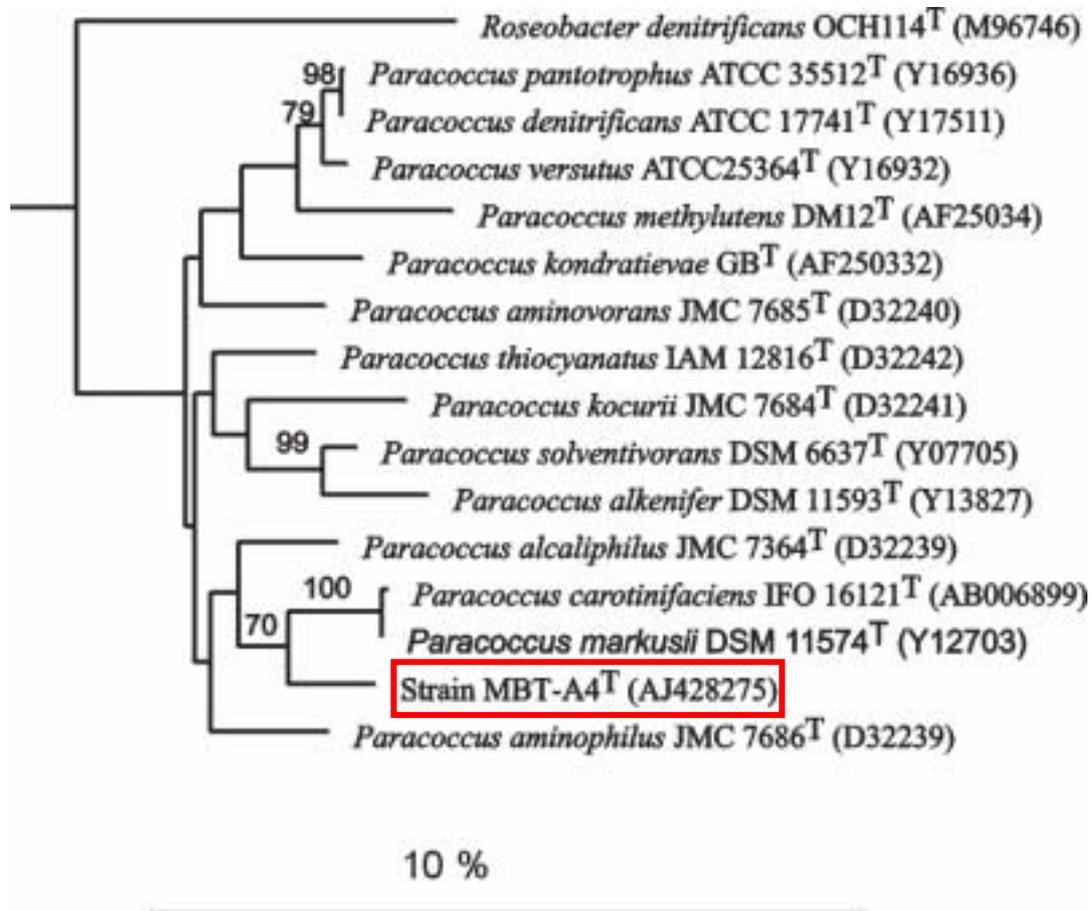


Abb. 4.4.5: Dendrogramm des Bakterienstammes MBT-A4; der 10% Maßstab steht für den Austausch von 10 Nucleotiden auf 100 Sequenzpositionen [96]

Der Genus *Paracoccus* gehört zu der  $\alpha$ -3 Untergruppe der Proteobakterien. Die Zuordnung von MBT-A4 in diese Untergruppe konnte durch die Bestimmung des charakteristischen Fettsäuremusters dieser Untergruppe ebenfalls bestätigt werden.

Aufgrund von DNA-DNA-Hybridisierungen und der Tatsache, dass der Stamm nicht auf Medien wachsen kann, wie sie für *P. markusii* beschrieben worden sind [130], wurde MBT-A4 als neuer Stamm eingestuft. Basierend auf seiner Fähigkeit auf Medien zu wachsen, die lediglich L-Serin als C- und N-Quelle aufweisen, wurde der Stamm als *Paracoccus seriniphila* bezeichnet (DSM 14827T / CIP 107400T).

#### 4.4.2.3 Optimierung der Kultivierung von *Paracoccus seriniphila*

Wie in Kapitel 4.3 beschrieben wurde, liegt eines der größten Probleme der marinen Biotechnologie darin, dass eine Vielzahl der isolierten Mikroorganismen nicht kultivierbar sind. *Paracoccus seriniphila* hingegen lässt sich bereits auf einem L-Serin-Minimalmedium anziehen und so von anderen Stämmen isolieren. Für eine Produktion des gewünschten Enzyms ist dieses Medium aber nicht geeignet, da die Biomasseausbeute viel zu gering ist. Es konnte auch durch Zugabe verschiedener anderer C-Quellen keine verbesserte Wachstumsrate erzielt werden. Es wurde daher dazu übergegangen, *Paracoccus seriniphila* in einem komplexen 100 %igen MB-Medium zu kultivieren. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und anschließend in ein L-Serin-Minimalmedium zur Induktion des Enzymsystems gegeben. Dieses Verfahren erbrachte zwar eine ausreichende Biomasse und enzymatische Aktivität, ist aber relativ aufwendig, was Zeit- und Arbeitsaufwand angeht.

Durch Einsatz eines Mediums, welches aus 34,3 g/l Sea Salts, 5 g/l Pepton und 5 g/l Hefeextrakt besteht, konnte bei Zusatz von 1 g/l L-Serin eine optimale Wachstumsrate bei hoher enzymatischer Aktivität für das Bakterium ermittelt werden. Für das optimale Wachstum wurden weiterhin 30°C bei einem weiten pH-Bereich von 6,5 bis 8,0 festgestellt. Der Stamm ist salztolerant; optimale Wachstumsbedingungen wurden bei 3 g/l Natriumchlorid erreicht. Einen Überblick über die Optimierung bietet Tabelle 4.4.5.

Tab. 4.4.5: Einfluss der Medienzusammensetzung auf das Wachstum von *Paracoccus seriniphila* und die L-Serindehydrataseaktivität

Medium	max. BTM [g/l]	$\mu_{\max}$	U/gBTM	max. OD	Effizienz <sup>1</sup>
L-Serin-Minimalmedium	~0,5	0,03	~2	0,57	1
L-Serin-Minimalmedium + C-Quellen	-	-	-	0,08	-
100%iges MB-Medium + Induktion in L-Serin-Minimalmedium	1,62	0,23	16	2,70	22
100%iges MB-Medium + Serin	1,62	0,23	18	2,70	26
Sea Salt + Pepton + Hefeextrakt + Serin	3,25	0,25	42	6,25	120

<sup>1</sup>Effizient: Die Effizienz eines Mediums wurde in Bezug auf die maximale Biotrockenmasse und die enzymatische Aktivität bezogen auf die Kultivierung im L-Serin-Minimalmedium (Effizienz = 1) bestimmt

#### 4.4.2.4 Isolierung und Charakterisierung der L-Serindehydratase

Zur Isolierung des Enzyms wurden Zellen verwendet, die bei den unter Punkt 4.4.2.3 beschriebenen optimierten Parametern kultiviert worden waren. Da das Enzym interzellulär vorliegt, wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen (55 W für 3 Minuten; Intervalle von 0,3 s/s). Der Zellrückstand wurde durch Zentrifugation (15 Minuten bei 14.000 rpm bei 4°C) abgetrennt. Das Enzym konnte dann anschließend aus dem Überstand isoliert werden.

Da bekannt ist, dass die meisten L-Serindehydratasen stark oxidationsempfindlich sind, wurden alle im folgenden verwendeten Lösungen per Ultraschall entgast und mit 1 mM L-Cystein als Antioxidanz versetzt. Der Verlauf der Dehydrataseaktivität über die verschiedenen Aufarbeitungsschritte wurde über einen photometrischen Aktivitätstest bestimmt (s. Kap. 8.10 im Anhang).

Die am häufigsten angewendete Methode Enzyme zu isolieren ist, sie durch Zugabe von Ammoniumsulfat auszusalzen [z. B. 133]. Die Proteine sollen vor der Fällung in einer Konzentration von etwa 0,01 % bis 2 % vorliegen. Ammoniumsulfat ist besonders gut geeignet, da es in Konzentrationen  $> 0,5$  M die biologische Aktivität auch empfindlicher Proteine schützt. Ammoniumsulfatpräzipitate sind normalerweise dicht und gut abzuzentrifugieren. Durch Ionenaustausch oder Dialyse ist das Salz leicht wieder von den Proteinen zu entfernen. Das Verfahren ist vor allem preiswert und somit auch für industrielle Maßstäbe einsetzbar. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass große Salzfrachten anfallen, die zu erheblichen Kosten in der Abwasseraufarbeitung führen können. Ein weiterer Nachteil von Ammoniumsulfat betrifft die Fällung von Proteinen, die für ihre Aktivität oder Struktur Calcium benötigen, da Calciumsulfat praktisch unlöslich ist und so das Calcium von den Proteinen entfernt wird.

Das Verfahren konnte erfolgreich für die Fällung der Dehydratase eingesetzt werden. Hierzu wurde der Zellaufschluss mit 60 % Ammoniumsulfat angereichert, um im ersten Schritt störende Proteine auszufällen. Der Niederschlag wurde bei 14.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert und der so erhaltende Überstand auf 80 % Ammoniumsulfat angereichert. Der neue Niederschlag wurde nach Zentrifugation in 2 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,6) aufgelöst.

Als nachfolgender Aufarbeitungsschritt wurde eine Auftragung über Hydroxylapatit [134] durchgeführt (5 ml-Säule CHT II von Bio-Rad). Die Säule wurde mit 1 mM KPP-Puffer (pH 7,6) equilibriert. Die Elution erfolgte über einen linearen KPP-Gradienten von 1 mM auf 400 mM (40 Minuten, 0,5 ml/min). Der Eluent wurde in 1 ml Schritten fraktioniert und die Fraktionen mit der größten L-Serindehydrataseaktivität wurden gepoolt und über eine Anionenaustauschchromatographie weiterverarbeitet. Die Austauschchromatographie wurde in einer 5 ml High-Q-Säule der Firma Bio-Rad durchgeführt (equilibriert mit 100 mM KPP, pH 7,6). Die Elution erfolgte mittels einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in 100 mM KPP-Puffer (40 Minuten, 2 ml/min). Es wurde in 4 ml Schritten fraktioniert. Die Fraktionen mit der gewünschten Aktivität wurden gepoolt und über einen Vivaspin-Konzentrator (Cut-off 30 kDa; Sartorius, Göttingen) aufkonzentriert.

Tab. 4.4.6: Aufreinigung der L-Serindehydratase aus *P. seriniphilia*

<b>Aufreinigungs- schritt</b>	<b>Gesamtprotein [mg]</b>	<b>Units Enzym</b>	<b>Aktivität [U/mg<sub>Protein</sub>]</b>	<b>Aufreinigungs- faktor</b>	<b>Ausbeute [%]</b>
Zellaufschluss (Überstand)	140	140	1,04	1	100
Ammoniumsulfat- fällung	21	95	4,56	4	68
Hydroxyapatit- Chromatographie	1,41	16	11,28	11	11
Anionenaustausch- Chromatographie	1	0,94	75,24	72	1

Der Grad der Aufreinigung lässt sich auch über die Gelelektrophorese verfolgen. Bei der durchgeführten SDS-Gelelektrophorese wird das Enzym in seine Untereinheiten gespalten, so dass zwei Banden im Gel zu erkennen sind (s. Abb. 4.4.6). Über das Verfahren von Weber und Osborn [135] konnten mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese die Molgewichte der beiden Untereinheiten zu 14,5 kDa ( $\alpha$ ) und 40 kDa ( $\beta$ ) bestimmt werden (s. Abb. 4.4.7).

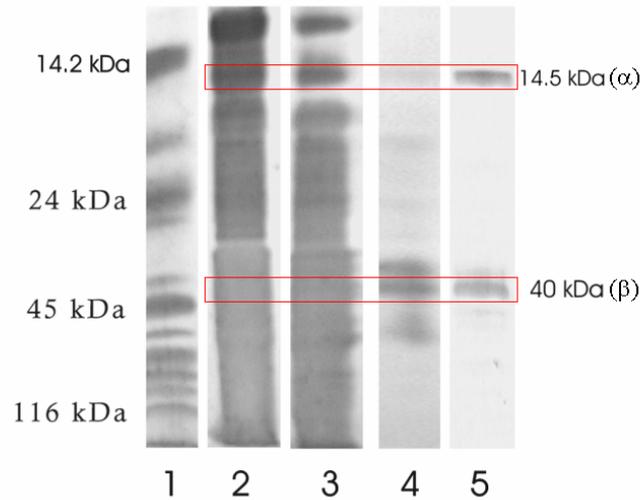


Abb. 4.4.6: SDS-PAGE verschiedener Stufen der Aufreinigung der L-Serindehydratase (20%iges Polyacrylamid-Gel; 1: Molekulargewichtsstandard, 2: Überstand des Zellaufschlusses (1:20), 3: Ammoniumsulfatfällung, 4: Fraktion der Hydroxyapatit-Chromatographie, 5: Anionenaustausch-Chromatographie; Silberfärbung) [97]

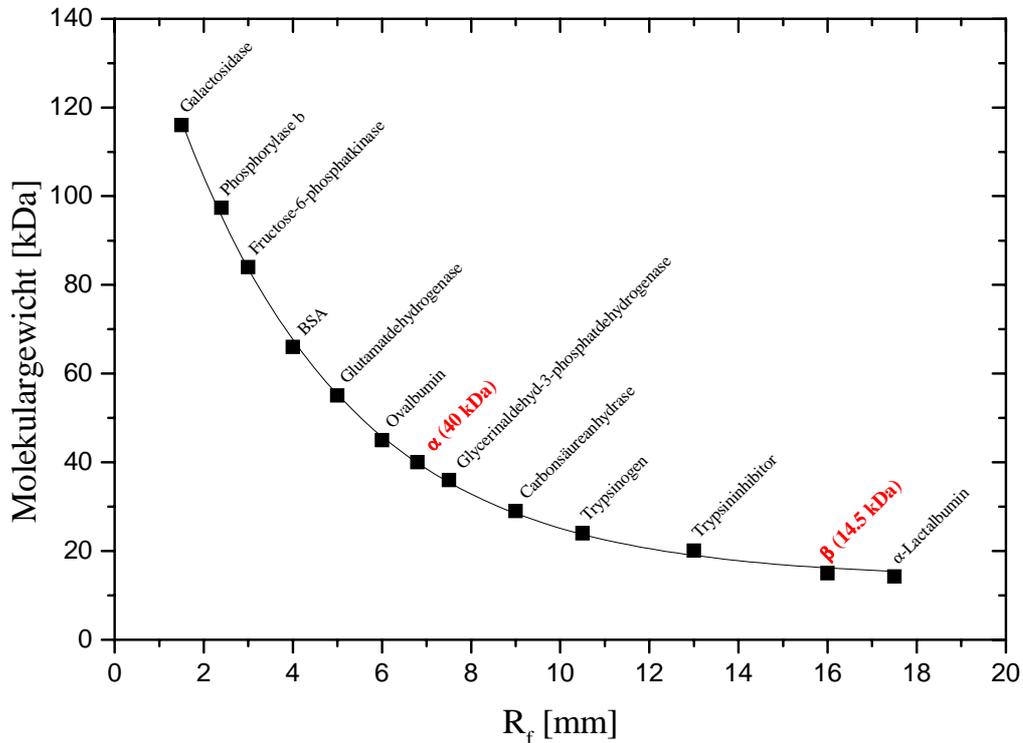


Abb. 4.4.7: Bestimmung des Molekulargewichtes der beiden Untereinheiten der L-Serindehydratase über SDS-Gelelektrophorese [97]

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen L-Serindehydratase wurde über eine Gelfiltration durchgeführt (Sephacryl S-100 Säule; 700 x 25 mm). Das System wurde über UV-aktive Substanzen kalibriert. Es ergab sich ein Molekulargewicht von ungefähr 53 kDa (s. Abb. 4.4.8). Damit liegt das Enzym im Bereich der Molekulargewichte der aus *E. coli* (50 kDa) [127] und aus *Pseudomonas cepacia* (60 kDa) [136] isolierten L-Serindehydratasen.

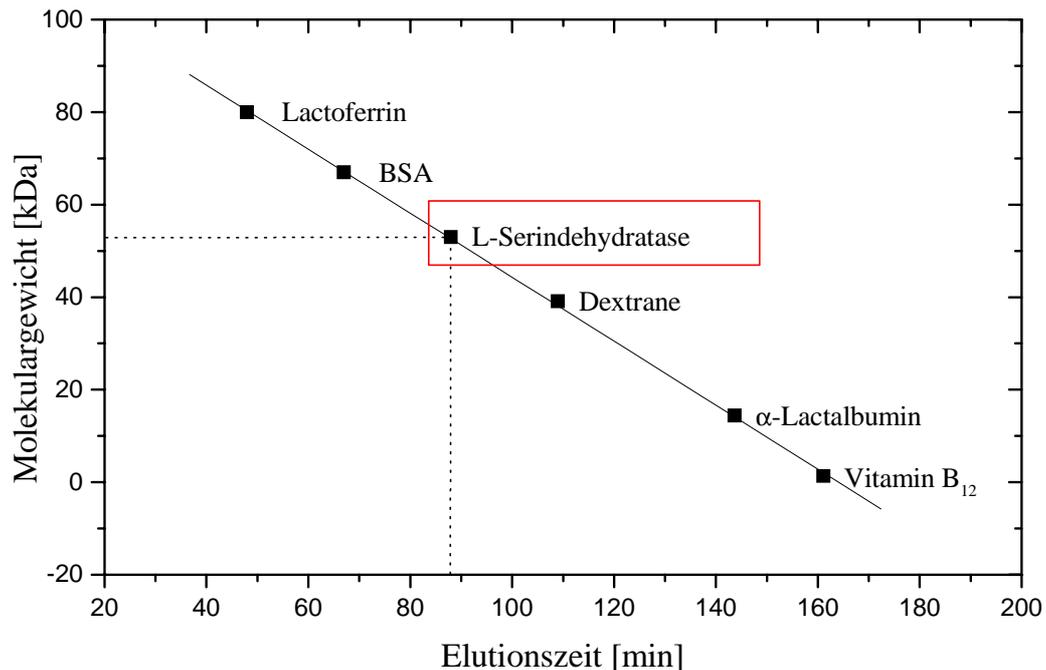


Abb. 4.4.8: Bestimmung des Molekulargewichtes nativer L-Serindehydratase mittels Gelfiltration (Sephacryl S-100 Säule; 700 x 25 mm; Aufgabevolumen 2 ml des Überstandes des Zellaufschluss; Elution: 100 mM KPP-Puffer + 1 mM Cystein, pH 7,6; 2 ml/min) [97]

Wie bereits weiter oben angesprochen worden ist, sind L-Serindehydratasen stark oxidationsanfällig und müssen entsprechend stabilisiert werden. Dieser starke Aktivitätsverlust wurde auch bei dem aus *Paracoccus seriniphila* isolierten Enzym festgestellt (s. Abb. 4.4.9).

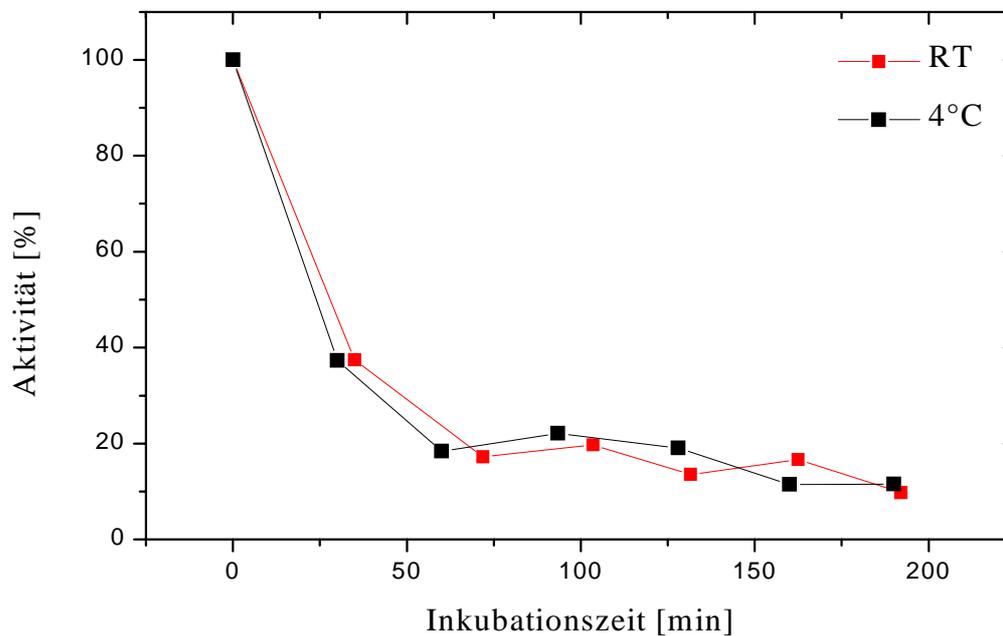


Abb. 4.4.9: Aktivitätsverlust der nicht stabilisierten L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphila* [97]

Der Aktivitätsverlust ist auf die Oxidation der Eisen-Schwefel-Cluster zurückzuführen, die für die katalytische Aktivität des Enzyms notwendig sind (s. Abb. 4.4.10). Dieses ist bei L-Serindehydratase aus eukaryontischen Zellen anders. Hier wird die Umsetzung des Serins über den Cofaktor PLP gesteuert. Man geht davon aus, dass die bakteriellen, oxidationsanfälligen L-Serindehydratase Relikte einer „Eisen-Schwefel-Welt“ sind, die durch die PLP-abhängigen Enzyme in vielen Organismen ersetzt worden sind [137]. So finden sich die metallabhängigen Dehydratase insbesondere in strikt anaeroben Bakterien [122]. Sie gehören in die Klasse der Eisen-Schwefel-Proteine ohne Redoxfunktionen. Diese Klasse ist seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen, da ihre Funktionen im Stoffwechsel noch nicht abschließend geklärt sind. Ursprünglich kannte man nur Eisen-Schwefel-Cluster, die in Redoxreaktionen eingebunden sind (Single-Electron-Transfer-Reactions). Durch Untersuchungen unter anderem an der L-Serindehydratase weiß man mittlerweile, dass die Fe-S-Cluster auch an nicht-oxidativen enzymatischen Reaktionen und der Proteinstabilisierung beteiligt sind [138]. Bei der hier isolierten L-Serindehydratase kann die Beteiligung von PLP an der Umsetzung ausgeschlossen werden, da weder die

charakteristische Absorptionsbande bei 400 bis 420 nm zu finden war [121], noch das Enzym durch typische PLP-Inhibitoren in seiner Aktivität beeinträchtigt worden ist.

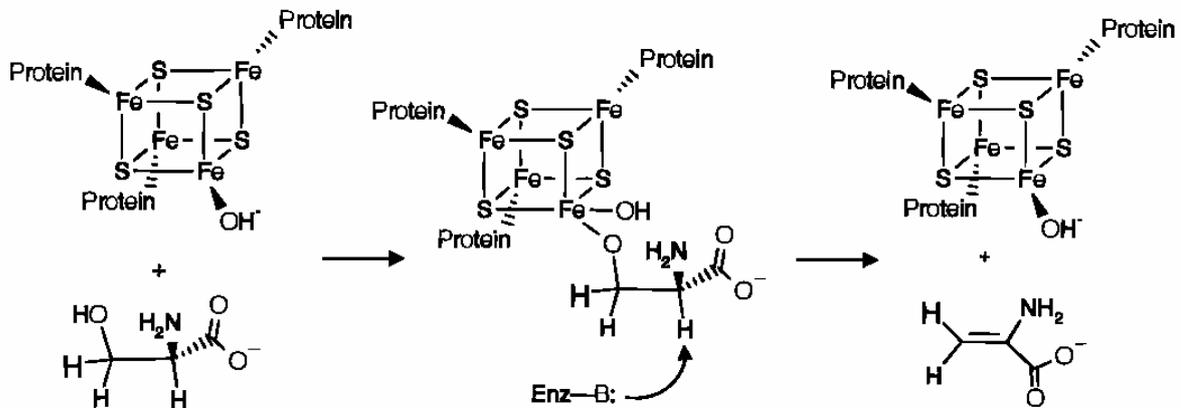


Abb. 4.4.10: Umsetzung von L-Serin am Fe-S-Cluster einer L-Serindehydratase [137]

Für eine eventuelle Nutzung des isolierten Enzyms in bioanalytischen Systemen (s. Kapitel 6) musste eine Stabilisierung der Aktivität erfolgen. Diese kann durch Zugabe von Fe<sup>2+</sup> und einem Oxidationsschutz wie Dithiothreitol (DTT) erreicht werden.

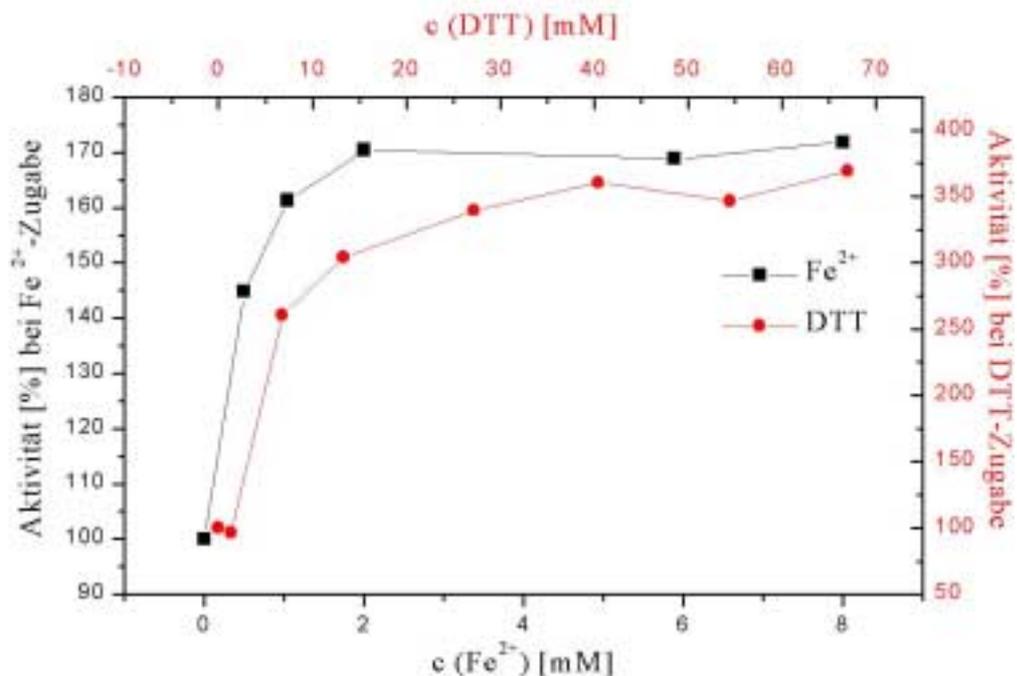


Abb. 4.4.11: Stabilisierung der aus *Paracoccus seriniphila* isolierten L-Serindehydratase durch Zugabe von Fe<sup>2+</sup> und Dithiothreitol (DTT); Aktivitätsbestimmung bei Zugabe von DTT mit c(Fe<sup>2+</sup>) = 1,8 mM (rote Kurve), Aktivitätsbestimmung bei Zugabe von Fe<sup>2+</sup> mit c(DTT) = 18 mM (schwarze Kurve) [97]

Wie aus der obigen Abbildung ersichtlich, erfolgt durch Zugabe der Verbindungen ein deutlicher Anstieg der enzymatischen Aktivität. Es konnte so auch eine verbesserte Langzeitstabilität des Enzyms erreicht werden. Unter Zugabe von 18 mM DTT und 5 mM Eisen(II)sulfat sind nach 8 Tagen noch 50 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden, wenn das Enzym zwischen den Messungen bei Raumtemperatur gelagert wird.

Ein weiterer Parameter, der für die zu erzielende enzymatische Aktivität von ausschlaggebender Bedeutung ist, liegt in dem Erntezeitpunkt der Zellen. Es wurde festgestellt, dass die höchste enzymatische Aktivität in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase auftritt.

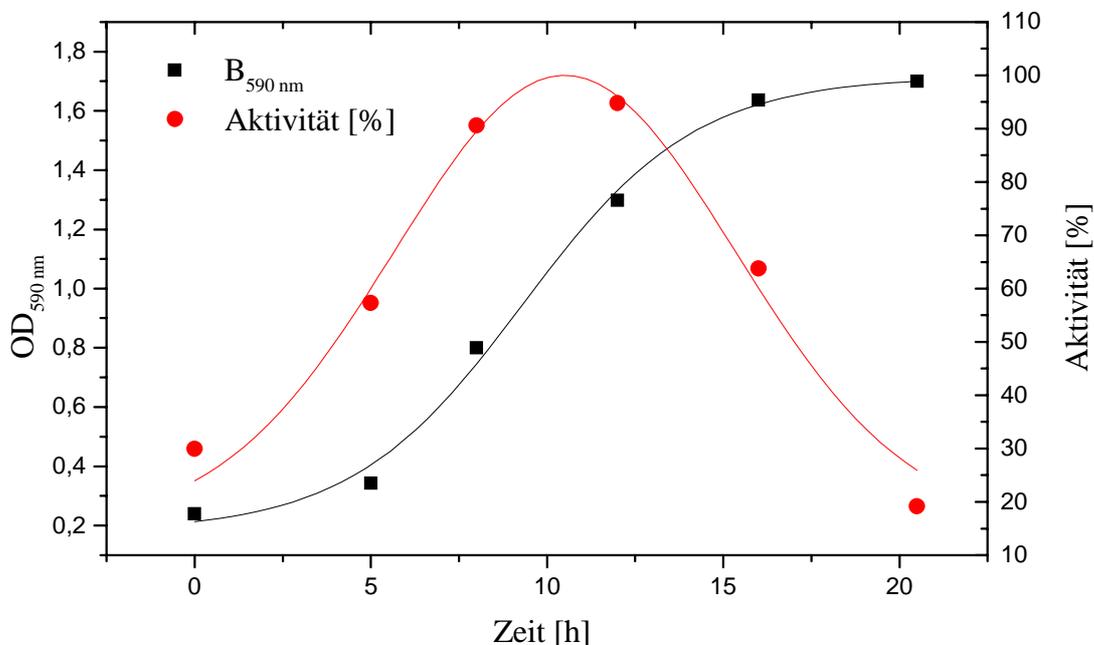


Abb. 4.4.12: Abhängigkeit der Aktivität der L-Serindehydratase von der Wachstumsphase des Stammes *Paracoccus seriniphilia* [129]

Mit dem stabilisierten Enzym wurden die kinetischen Parameter der Umsetzung von L-Serin zu Pyruvat ermittelt. Es wurde festgestellt, dass das Enzym ausschließlich L-Serin umsetzt. Es konnte keine Querempfindlichkeit zu anderen Aminosäuren festgestellt werden. Bei Untersuchungen des Rohextraktes wurde die Umsetzung von L-Threonin beobachtet. Dieses ist aber auf eine ebenfalls in *Paracoccus seriniphilia* vorkommende L-Threonindehydratase zurückzuführen, die im Verlauf der Enzymaufarbeitung abgetrennt werden konnte.

Eine Vielzahl von Aminosäuren wirken auf die L-Serindehydratase als Inhibitoren. Dieses könnte dadurch erklärt werden, dass zwar eine Bindung der Aminosäuren an den Fe-S-Cluster erfolgt, die weitere Umsetzung aber nicht ablaufen kann. Ebenfalls inhibiert wird das Enzym durch verschiedene Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ). Bei dem Enzym konnte keine Substrat- und keine Produkthemmung (in Bezug auf Pyruvat) festgestellt werden.

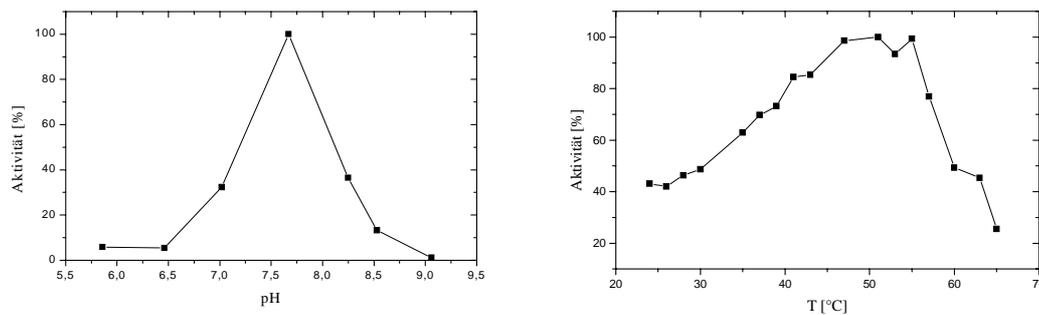


Abb. 4.4.13: Aktivität der L-Serindehydratase in Abhängigkeit vom pH-Wert (links) und von der Temperatur (rechts) [129]

Wie aus der Abbildung 4.4.13 zu entnehmen ist, weist das Enzym ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert von 7,6 und 51 °C auf. Bei diesen optimierten Bedingungen wurden Versuche zur Bestimmung der kinetischen Parameter des Enzyms durchgeführt (Abb. 4.4.14). Unter anderem wurden dafür Umsetzungen von L-Serin zu Pyruvat bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen untersucht. Über die Verfahren von Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk können so die Parameter  $v_{\max}$  und  $K_M$  ermittelt werden. Auffällig in der Abbildung 4.4.14 ist der leicht sigmoide Kurvenverlauf. Dieser Verlauf war sowohl bei Untersuchungen des Rohextraktes als auch des hochaufgereinigten Enzyms reproduzierbar. Dieser sigmoide Kurvenverlauf wird auch bei der Abhängigkeit der Produktbildungsgeschwindigkeit (Pyruvat) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (L-Serin) gefunden. Eine kinetische Aussage daraus abzuleiten ist schwierig, da verschiedenste Ursachen hierfür in Frage kommen könnten, die zur Zeit noch nicht abschließend geklärt werden konnten. Da der Effekt sowohl beim Enzym als auch bei Rohextrakten auftritt, kann eine Diffusionshemmung weitestgehend ausgeschlossen werden. Inwieweit allosterische Effekte oder Kooperativität für dieses Verhalten ausschlaggebend sind, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter des Enzyms erfolgte daher über den eingeschränkten linearen Umsatzbereich des Enzyms und liefert auf diesem Wege aber sicherlich sehr gute Näherungen für die kinetischen Parameter.

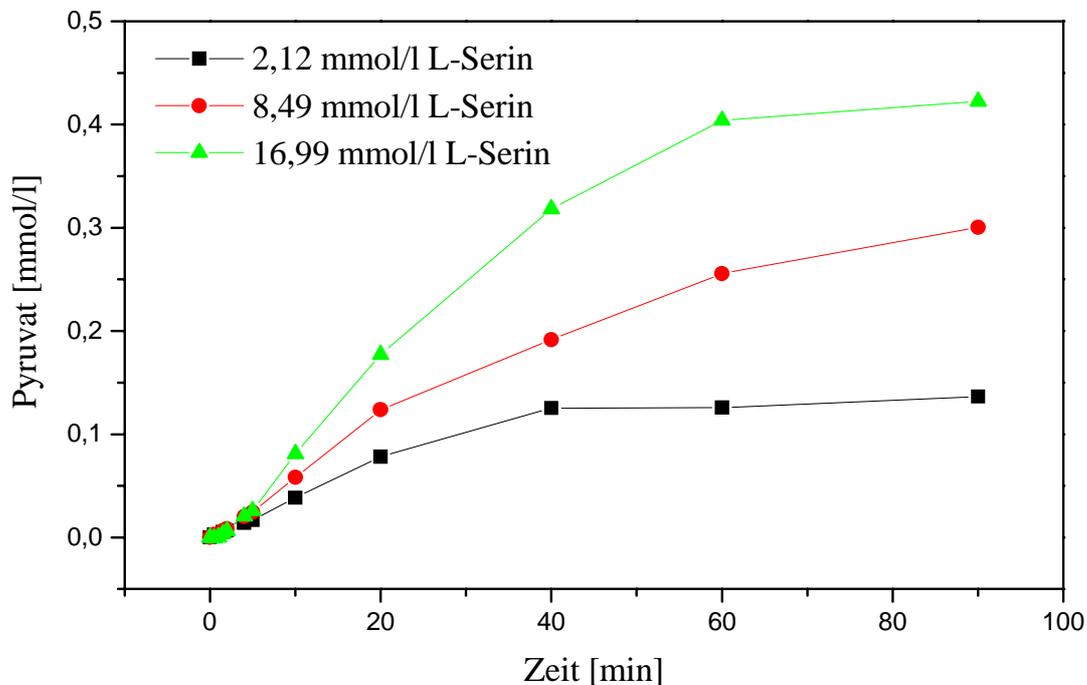


Abb.: 4.4.14: Produktbildung bei der enzymatischen Umsetzung von L-Serin zu Pyruvat in Abhängigkeit von der Substratkonzentration [129]

Für das Enzym ergeben sich in Bezug auf L-Serin als Substrat die folgenden Parameter:

$$v_{\max} = 1,3 \times 10^{-7} \text{ mol/(l s)}$$

$$K_M = 5,1 \text{ mmol/l}$$

$K_M$  liegt damit in einem Bereich, wie er für L-Serindehydratasen aus anderen Mikroorganismen beschrieben worden ist (s. Tabelle 4.4.3; *Clostridium propionicum*, *Arthrobacter globiformis* u. a.).

Mit Hilfe des optimierten Kultivierungs- und Aufreinigungsverfahrens konnte aus einem neu beschriebenen marinen Mikroorganismus eine gut zu stabilisierende L-Serindehydratase isoliert werden, die für Anwendungen im bioanalytischen Bereich eingesetzt werden könnte.

Zu diesem Zweck muss noch eine Immobilisierung des Enzyms erfolgen. Hierfür wurden unter anderem das LentiKats<sup>®</sup>-System (zum LentiKats<sup>®</sup>-System s. Kap. 4.4.3.3) getestet. Erste Untersuchungen zeigen, dass das Enzym auch im immobilisierten Zustand seine katalytische Aktivität über mehrere Tage behält. Es sind somit alle Voraussetzungen geschaffen worden, um ein bioanalytisches System aufzubauen, welches z. B. bei der Biotransformation von Indol und L-Serin zu L-Tryptophan (Kap. 6.3) zur Prozessüberwachung eingesetzt werden könnte.

#### 4.4.3 Sulfitoxidase

In diesem Kapitel soll auf die Gewinnung und Aufreinigung einer Sulfitoxidase (SOD; EC 1.8.3.1) [139] aus einem marinen Mikroorganismus eingegangen werden. Anders als im vorherigen Beispiel stand zu Beginn der Arbeiten mit *Sulfitobacter pontiacus* bereits ein Mikroorganismus zur Verfügung, von dem bekannt war, dass er das entsprechende Enzym exprimiert [140]. *Sulfitobacter pontiacus* (genauer: *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov.) ist ein heterotrophes Bakterium, welches aus der H<sub>2</sub>S-O<sub>2</sub>-Grenzschicht des Schwarzen Meeres isoliert wurde. Von Sorokin [140] sind bereits Angaben über die Kultivierung dieses Bakteriums gemacht worden. So wird *Sulfitobacter pontiacus* als mesophiles (4-35 °C, Optimum von 22-25 °C), neutrophiles (pH 6,5-8,5, Optimum bei 7,3-7,5), NaCl-abhängiges (5-80 g/l, Optimum bei 20-25 g/l) und strikt aerobes Bakterium beschrieben. In dieser Arbeit soll nunmehr eine Optimierung der Kultivierung hinsichtlich der Ausbeute an Sulfitoxidase (EC 1.8.3.1) und deren Aufarbeitung beschrieben werden. Die Produktion einer Sulfitoxidase ist hinsichtlich ihrer Verwendung in bioanalytischen Systemen für die Lebensmittelanalytik von großem Interesse (bzgl. bioanalytischer Systeme s. Kap. 6). Während im vorangegangenen Beispiel der L-Serindehydratase ausführlich über einzelne Optimierungsschritte berichtet worden ist, sollen bei der Sulfitoxidase nur einige Teilschritte betrachtet werden, die auch für andere Anwendungen in der marinen Biotechnologie von Interesse sein könnten.

Sulfitoxidase katalysiert die Oxidation von Sulfit zu Sulfat. Dabei transportiert das Enzym Elektronen auf Sauerstoff, Cytochrom C und eine Vielzahl anderer Elektronenakzeptoren [141]. In Säugetieren spielt SOD insofern eine wichtige Rolle, als dass sie als terminales Enzym für die Umsetzung schwefelhaltiger Aminosäuren zuständig ist. Weiterhin baut sie

endogenes Sulfit und Schwefeldioxid ab und übernimmt damit eine wichtige Aufgabe bei der Entgiftung des Körpers nach Aufnahme dieser Substanzen [142]. Eine Störung der Ausbildung von SOD im menschlichen Körper führt zu schwersten neurologischen Störungen, die in der Regel bereits beim Fötus zum Tode führen [143, 144]. Bei den bisher untersuchten Sulfitoxidasen handelt es sich um Metalloenzyme, bei denen Molybdän in Form des Molybdän-Kofaktors (Moko) enthalten ist. Der Moko (Abb. 4.4.15) besteht dabei aus einem Dioxomolybdänzentrum, welches über die Schwefelatome an Molybdopterin gebunden ist.

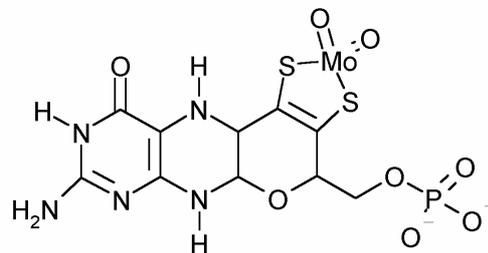


Abb. 4.4.15: Struktur des Molybdän-Kofaktors (Moko) der Sulfitoxidasen

Ein erworbener Mangel an Moko führt beim Menschen zu einer Reduktion der enzymatischen Aktivität der Sulfitoxidase. Dies führt zu schweren neurologischen Störungen wie zum Beispiel Schüttelkrämpfen und epileptischen Anfällen. Auch eine Linsenektomie wird beobachtet. Ursache für diese Symptome ist wahrscheinlich eine Anreicherung von Sulfit und Thiosulfat im Körper. Die toxische Wirkung des Sulfits beruht dabei zum einen auf seiner stark reduzierenden Wirkung, zum anderen besitzt Sulfit die Fähigkeit mit den SH-Gruppen verschiedener Enzyme zu reagieren. Das Sulfit wirkt dabei inhibierend. Sulfitoxidase selbst ist in verschiedenen Organismen nachgewiesen worden:

- Hühnerleber [145]
- Rinderleber [146]
- Rattenleber [147, 148]
- Menschliche Leber [147]
- Pflanzen [149, 150]
- *Thiobacillus ferrooxidans* [151]

- *Thiobacillus novellus* [152]
- Phototrophe Bakterien [153]

SOD ist kommerziell erhältlich und wird in der Regel als Präparat aus Hühnerleber angeboten. Neben dem reinen Enzym wird es auch als Bestandteil enzymatischer Testkits für Sulfit verkauft (Sulfite Test Kit, r-biopharm).

Die physiologische Bedeutung von Sulfitverbindungen im Metabolismus von Pflanzen und Tieren ist bisher noch größtenteils unbekannt. Die in sehr kleinen Konzentrationen vorkommenden Verbindungen scheinen aber im oxidativen Metabolismus eine spezifische Rolle zu spielen. Auftretendes Sulfit wird im Normalfall über die Sulfitoxidase sofort zu Sulfat umgewandelt. Alternativ kann Sulfit auch über eine Sulfitreduktase (EC 1.8.1.2) zu Sulfid reduziert werden. Dieses ist bei den meisten lithotrophen und thiotrophen Bakterien der Fall, bei denen Sulfit ein Schlüsselintermediat der Schwefeloxidation ist. Die Oxidation zu Sulfat kann in diesen Systemen über die Sulfitdehydrogenase (EC 1.8.2.1) ablaufen.

Aufgrund der beschriebenen starken reduzierenden Wirkung und der Eigenschaft von Sulfit mit den SH-Gruppen der verschiedensten Enzyme zu reagieren, sind die meisten Mikroorganismen sehr empfindlich gegenüber hohen Sulfitkonzentrationen. Auch für höhere Organismen ist Sulfit toxisch. Aufgrund der inhibierenden Wirkung gegenüber Mikroorganismen wird Sulfit in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel eingesetzt. Das bekannteste Beispiel ist wohl die Herstellung von Wein. Hier nutzt man den starken inhibierenden Effekt des Sulfits auf Enzyme insbesondere, um Phenoxidasen zu inaktivieren und dadurch die enzymatische Braunfärbung von Wein zu verhindern [154].

Die Schwefelung von Lebensmitteln ist allerdings auch kritisch zu hinterfragen, da bekannt ist, dass Sulfit auch beim Menschen unerwünschte allergische Reaktionen auslösen kann. Daher unterliegt der Sulfitgehalt in Lebensmittel gesetzlichen Höchstgrenzen. In Rotwein sind 160 mg/l und in Weißwein 210 mg/l SO<sub>2</sub> zulässig, wobei diese Werte von der Qualitätsstufe und dem Restzuckergehalt abhängen. Diese Grenzwerte sind allerdings relativ hoch angesetzt, da es zur Zeit keine alternativen Verfahren zur Weinschwefelung gibt. In anderen Lebensmitteln sind die Grenzwerte bedeutend niedriger. Eine Ausnahme bildet geschwefeltes Trockenobst (2000 mg/l), bei dem die enzymhemmende Wirkung des Sulfits zur Verlängerung der Haltbarkeit eingesetzt wird. Ebenfalls zur Verlängerung der Haltbarkeit

werden verschiedene Fruchtsäfte mit Sulfid versetzt. Hier liegt der Grenzwert mit 10 mg/l allerdings sehr niedrig. In Bier liegt der Grenzwert bei 20 mg/l (EG-Richtlinie RL Nr. 95/2/EG). Ein Teil des Sulfidgehaltes in Bier wird während der Fermentation durch die Hefen gebildet (ca. 10 mg/l), allerdings kann der Gehalt durch sulfidhaltige Rohstoffe bis auf die erlaubten 20 mg/l ansteigen. Die FDA (Food and Drug Administration) hat in den USA den Grenzwert von 10 mg/l festgelegt, ab dem der Zusatz von Sulfid in Lebensmitteln kennzeichnungspflichtig ist. In der Tabelle 4.4.7 sind die gängigen Sulfidverbindungen aufgeführt, die in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden dürfen.

Tab. 4.4.7.: Sulfidhaltige Konservierungsstoffe [155]

E-Nummer	Stoff
220	Schwefeldioxid
221	Natriumsulfid
222	Natriumbisulfid
223	Natriumdisulfid
224	Kaliumsulfid
226	Calciumsulfid
228	Kaliumbisulfid

Durch diese Grenzwerte besteht ein Bedarf an einer robusten und zuverlässigen Sulfidanalytik in Lebensmittel auf deren Stand der Technik im nächsten Abschnitt eingegangen werden soll.

#### 4.4.3.1 Sulfidanalytik – Stand der Technik

Das erste Verfahren, welches zur quantitativen Bestimmung von Sulfid in Lebensmittel beschrieben worden ist, stammt aus dem Jahr 1958 [156]. Das Verfahren beruht darauf, dass die durch die Oxidation von Sulfid zu Sulfat gebildete Schwefelsäure titriert wird. Dieses Verfahren wurde in verschiedenen Variationen weiterentwickelt. Letztendlich basiert auch die von der FDA vorgeschriebene Methode auf der Titration von Schwefelsäure. Bei dem, nach ihren Entwicklern benannten, Monier-William-Verfahren wird die Probe im ersten Schritt destilliert. Dabei entweicht Sulfid in Form von  $\text{SO}_2$ , welches in einer Vorlage mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufgefangen wird. Durch die oxidierenden Bedingungen wird das Schwefeldioxid zu

Schwefelsäure umgesetzt, die dann titriert werden kann. Dieses Verfahren ist gerätetechnisch sehr aufwendig und darüber hinaus auch langwierig. Es wurde weiterhin festgestellt, dass zum Beispiel leicht flüchtige Fettsäuren das Ergebnis erheblich beeinträchtigen können [157].

Die Verwendung einer enzymatischen Methode, die hochspezifisch auf Sulfid reagiert, könnte bei der Routineanalytik von Lebensmitteln eine große Vereinfachung darstellen. Enzymatische Testsysteme kommen in der Regel ohne großen apparativen Aufbau aus und liefern oftmals innerhalb weniger Minuten ein verlässliches Analyseergebnis. Als Enzym kann in solchen Verfahren zur Sulfidanalytik Sulfidoxidase verwendet werden. Erstmals wurde ein solches System vor rund 20 Jahren beschrieben [158]. Um solche Methoden auch bei der Bioprozesskontrolle einsetzen zu können, ist eine Automation des Testes notwendig. Dieses kann dadurch erreicht werden, dass der enzymatische Test zu einem Biosensor ausgebaut wird, der in eine Fließinjektionsanalyse (FIA) integriert werden kann (nähere Informationen zur Thematik der FIA-Technologie und zu Biosensoren finden sich in Kapitel 6.1.1). Solche FIA-Verfahren zur Sulfidanalytik sind in der Literatur für den Forschungseinsatz bereits mehrfach beschrieben worden [159, 160, 161, 162, 163, 164]. Neben dem Einsatz in der Lebensmittelkontrolle wurden diese Systeme auch zur Umweltüberwachung (Wasser- und Abwasseranalytik) entwickelt [165]. Die Kopplung von HPLC und einem Biosensor auf Basis immobilisierter Sulfidoxidase mit elektrochemischer Detektion wurde bei der Fa. Trace Biotech AG, Braunschweig, für die effektive Qualitäts- und Prozesskontrolle entwickelt. Potentielles Einsatzgebiet dieses Verfahrens ist die Bierproduktion. Zur Zeit schreibt der Gesetzgeber für die Lebensmittelanalytik allerdings die aufwendigeren und komplizierteren DIN-Verfahren vor, so dass Biosensorsysteme zur Bestimmung des Sulfidgehaltes in diesem Bereich nur als zusätzliche Analysensysteme eingesetzt werden dürfen, obwohl sie in der Spezifität den Verfahren über die Titration von Schwefelsäure deutlich im Vorteil liegen.

Neben dem Einsatz in der Lebensmitteltechnologie ergeben sich aber noch weitere Einsatzgebiete eines Sulfidbiosensors. So könnte er im klinischen Bereich zur Diagnostik eines Sulfidoxidasemangels eingesetzt werden. Bei Patienten, die unter einem SOD-Mangel leiden, sind erhöhte Sulfidkonzentrationen im Urin nachzuweisen [166]. Voraussetzung für einen solchen Biosensor ist die Verfügbarkeit einer selektiven und möglichst stabilen Sulfidoxidase. Aus diesem Grund wird im Folgenden die Gewinnung einer hoch aktiven marinen Sulfidoxidase aus dem Bakterium *Sulfitobacter pontiacus* beschrieben.

#### 4.4.3.2 Optimierung der Kultivierung von *Sulfitobacter pontiacus*

Wie weiter oben bereits angesprochen, sind aus der Literatur Daten bekannt, unter denen *Sulfitobacter pontiacus* im Labor kultiviert werden kann. Die Literaturdaten sind allerdings nur in Hinblick auf die optimale Wachstumsrate und nicht hinsichtlich einer optimalen Sulfitoxidaseaktivität hin ermittelt worden. In der hier vorgestellten Arbeit erfolgte die Optimierung mit Fokus auf eine möglichst hohe Enzymaktivität [167].

*Sulfitobacter pontiacus* ist ein Gram-negatives Bakterium, welches in einer Wassertiefe von 100-140 m an der H<sub>2</sub>S-O<sub>2</sub>-Grenzschicht im östlichen Teil der Schwarzen Meeres isoliert worden ist. *Sulfitobacter pontiacus* ist strikt heterotroph und ist somit nicht in der Lage autotroph auf H<sub>2</sub>, Thiosulfat oder Sulfit zu wachsen. Der Mikroorganismus ist auf Sauerstoff angewiesen und benötigt Kochsalz für sein Wachstum. Die NaCl-Konzentration kann dabei im Bereich von 5 – 80 g/l liegen. Ein Optimum findet sich bei 20 – 25 g/l. Der Stamm wächst bei Temperaturen von 4 – 35 °C und pH-Werten von 6,5 bis 8,5. In den beschriebenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass *Sulfitobacter pontiacus* in Acetat limitierten Kultivierungen extrem hohe Sulfitkonzentrationen bis zu 63 mmol/l toleriert. Wurde dieses Sulfit im Medium katalytisch zersetzt, so erfolgte eine Abnahme der Biomassekonzentration. Daraus lässt sich schließen, dass der Stamm durch die Umsetzung von Sulfit zu Sulfat Energie gewinnt.

Als Grundlage für die nun durchgeführten Untersuchungen diene das Medium Marine Broth 2216. Die Arbeiten fokussierten dabei insbesondere auf:

- den Einfluss von EDTA,
- den Einfluss der Acetatkonzentration als C-Quelle,
- die Auswirkungen von Natriumthiosulfat,
- den Einfluss von HEPES als Puffersystem und
- den Einfluss der Temperatur und der Sauerstoffversorgung.

Wie bereits bei der Optimierung des Stammes *Paracoccus seriniphilia* wurde ein Qualitätskriterium zur Bewertung der Einflüsse festgelegt. In diesem Fall ist es das Produkt aus Biomasse und enzymatischer Aktivität. Die Optimierung ist dahergehend als Maximierung dieses Qualitätskriteriums anzusehen.

#### 4.4.3.3 Verwendung immobilisierter Substrate

Optimierungen von Kultivierungen mariner Mikroorganismen erfolgen in den ersten Schritten, wie bei allen anderen Kultivierungen auch, über Schüttelkolbenkulturen. Will man Parameter wie pH-Wert, Temperatur oder Medieneinflüsse studieren, so ist dieses sicherlich die einfachste Methode. Problematisch bei der Verwendung dieser Technologie ist aber die Kontrolle und insbesondere die Regelung kritischer Parameter. Zwar gibt es Ansätze bereits in der Optimierungsphase regelnd einzugreifen [168], diese sind aber apparativ sehr aufwendig und noch nicht weit verbreitet. Soll oder darf eine Substanz nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich vorliegen, so ergibt sich bei Kultivierungen im Schüttelkolben nur die Möglichkeit zu Beginn der Kultivierung eine maximale Konzentration einzustellen. Wird die Substanz im Verlaufe der Kultivierung verstoffwechselt, so sind deren Auswirkungen auf Biomasse oder enzymatischer Aktivität nur eingeschränkt gültig. Interessant sind in der Regel Ergebnisse, die sich bei einer konstanten Konzentration eines Substrates ergeben (Fed-Batch oder Konti-Kulturen). Im Falle des *Sulfitobacter pontiacus* beziehen sich diese Überlegungen auf das Sulfit. Es ist bekannt, dass das Enzym SOD nur in Anwesenheit von Sulfit experimentiert wird, daher muss dieses im Medium zugegen sein. Sulfit wirkt aber auch auf dem Stamm toxisch, so dass zu Beginn der Kultivierung keine zu hohen Konzentrationen eingestellt werden dürfen. Bei Kultivierungen im Reaktor kann dieses durch eine Fed-Batch-Technik realisiert werden, die aber in einer Optimierungsphase im Schüttelkolben nicht oder nur sehr umständlich möglich ist. Führt man die Schüttelkolbenkultivierungen aber bei sehr niedrigen, für das Bakterium nicht toxischen, Konzentrationen an Sulfit durch, so ist die zu erzielende Ausbeute an Enzym zu gering. Optimal wäre daher ein konstanter Level an freien Sulfit über den gesamten Zeitraum der Kultivierung. Realisiert wurde dieses durch die Verwendung von „immobilisiertem Sulfit“ [169].

Sulfite bilden mit vielen Metallen schwer lösliche Salze. Verwendet man eines dieser schwerlöslichen Salze, so stellt sich über das entsprechende Löslichkeitsprodukt im Kolben eine Konzentration an freiem Sulfid ein. Diese Konzentration sollte über den gesamten Zeitraum der Kultivierung konstant sein, sofern das Salz im Überschuss eingesetzt wurde und nicht vollständig durch die Verstoffwechslung in Lösung geht. Zum einen kann dem Kulturmedium auf diesem Wege kontinuierlich Sulfid zugeführt werden. Zum anderen ist die Sulfidzufuhr dabei reproduzierbarer, als bei der sporadischen Zugabe von sulfidhaltiger Lösung. Bei der Wahl der zu immobilisierenden Sulfidspezies müssen zwei Faktoren berücksichtigt werden: Die durch das Löslichkeitsprodukt zu erwartende Sulfidkonzentration darf nicht zu hoch sein, damit es zu keiner Wachstumshemmung kommt. Außerdem muss die biologische Verträglichkeit des Gegenkations berücksichtigt werden. Im vorliegenden Fall bietet sich daher die Verwendung von Calciumsulfid an. Mit einem Löslichkeitsprodukt von  $6,8 \times 10^{-8} \text{ mol}^2/\text{l}^2$  ermöglicht es einen Sulfidlevel im millimolaren Bereich. Die freie Sulfidkonzentration ist dabei vom pH-Wert, von der Temperatur und der Zusammensetzung des Kulturmediums abhängig.

Problematisch wäre der direkte Einsatz des Salzes im Medium. Dieses würde zu starken Trübungen führen, welches die Bestimmung der optischen Dichte und somit der Biomasse erschweren würden. Des weiteren muss berücksichtigt werden, dass fein verteiltes Calciumsulfid schwer von den Zellen abzutrennen ist, was nachfolgende Aufreinigungsschritte erschwert. Daher wurde das Salz nicht direkt in die Schüttelkolben gegeben, sondern in immobilisierter Form eingesetzt. Zur Matrixeinhüllung wurde ein auf Polyvinylalkohol (PVA) basierendes Gel verwendet, welches von der Firma GeniaLab unter dem Namen LentiKats<sup>®</sup> angeboten wird [170]. Zur Herstellung der Calciumsulfid enthaltenden LentiKats<sup>®</sup> wurde das Salz in wenig Wasser aufgeschlämmt und in das zuvor durch Erhitzen verflüssigte PVA-Gel eingerührt. Zur Herstellung der LentiKats<sup>®</sup> wurde ein - ebenfalls von der Firma GeniaLab angebotener - LentiKat<sup>®</sup> Printer verwendet. Dieser besitzt einen Druckkopf mit über 400 Aluminiumstiften, welche in das PVA-Gel eingetaucht werden und dabei eine von der Eintauchtiefe abhängende Menge Gel aufnehmen. Das Gel wird anschließend vom Druckkopf auf Einmal-Petrischalen übertragen und getrocknet. Im Falle der hier verwendeten LentiKats<sup>®</sup> wurde eine vollständige Trocknung durch Stehenlassen an der Raumluft durchgeführt. Es konnten auf diese Weise relativ einheitliche linsenförmige LentiKats<sup>®</sup> mit einem Durchmesser von ca. 3 mm hergestellt werden. Zur Stabilisierung der Immobilisate wurde eine LentiKat<sup>®</sup> - Stabilizer-Lösung verwendet. Dabei handelt es sich um eine Elektrolytlösung. Die Gegenwart

von Salzen beim Rückquellungsvorgang erhöht die Stabilität der LentiKats<sup>®</sup>. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung findet sich im Anhang unter Kapitel 8.11. In der Abbildung 4.4.16 sind die so hergestellten Calciumsulfit-LentiKats<sup>®</sup> dargestellt.

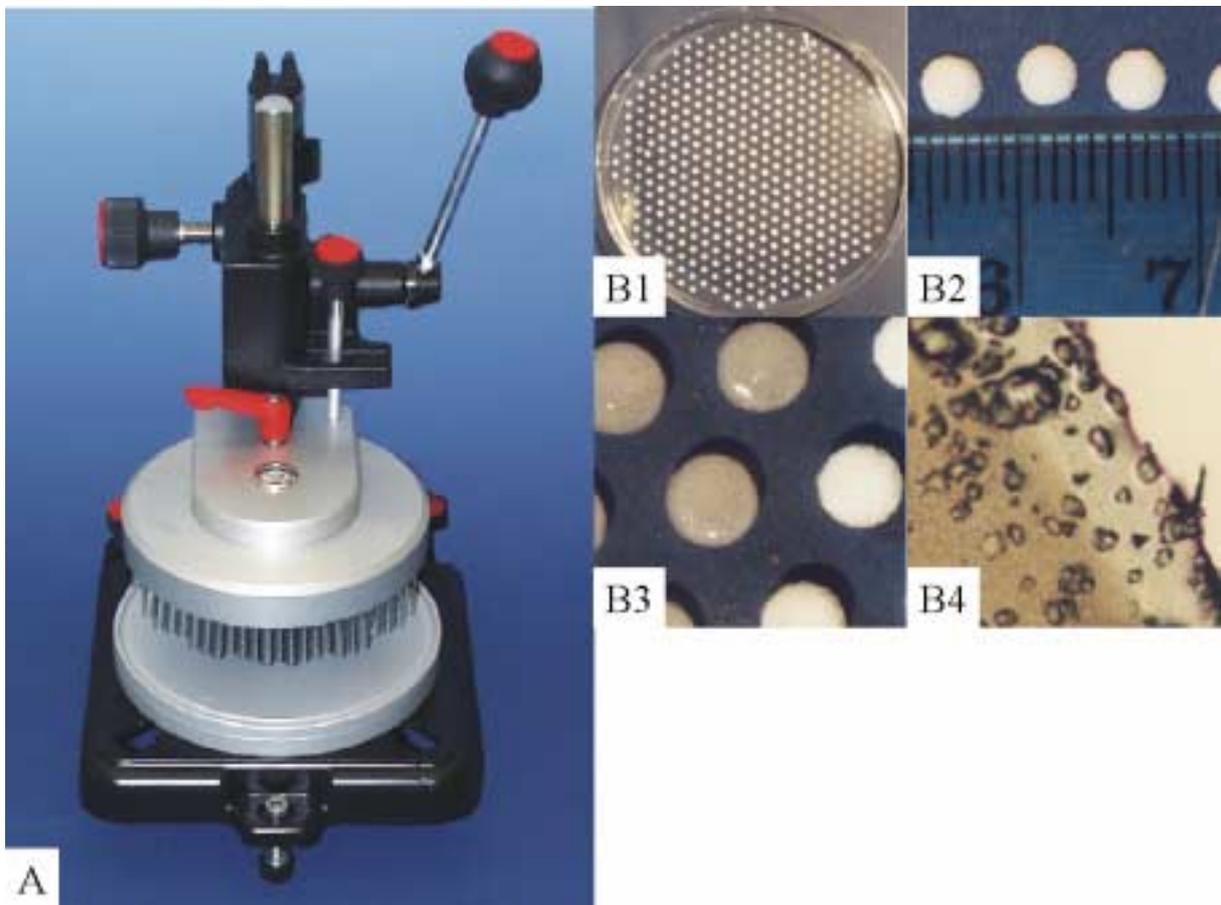


Abb. 4.4.16: LentiKat<sup>®</sup>-Printer der Firma GeniaLab, Braunschweig (A) und Aufnahmen der Calciumsulfit haltigen LentiKats<sup>®</sup> (B1-B4); in Aufnahme B4 sind deutlich die in der Polyvinylalkohol immobilisierten Calciumsulfit-Kristalle zu erkennen [169]

Dass mit diesem System eine konstante Sulfitkonzentration eingestellt werden kann, zeigt ein einfaches Experiment. Hierzu wurde das immobilisierte Salz in einen Schüttelkolben gegeben, der das reine Medium enthielt. Im Überstand wurde anschließend die freie Sulfitkonzentration iodometrisch bestimmt.

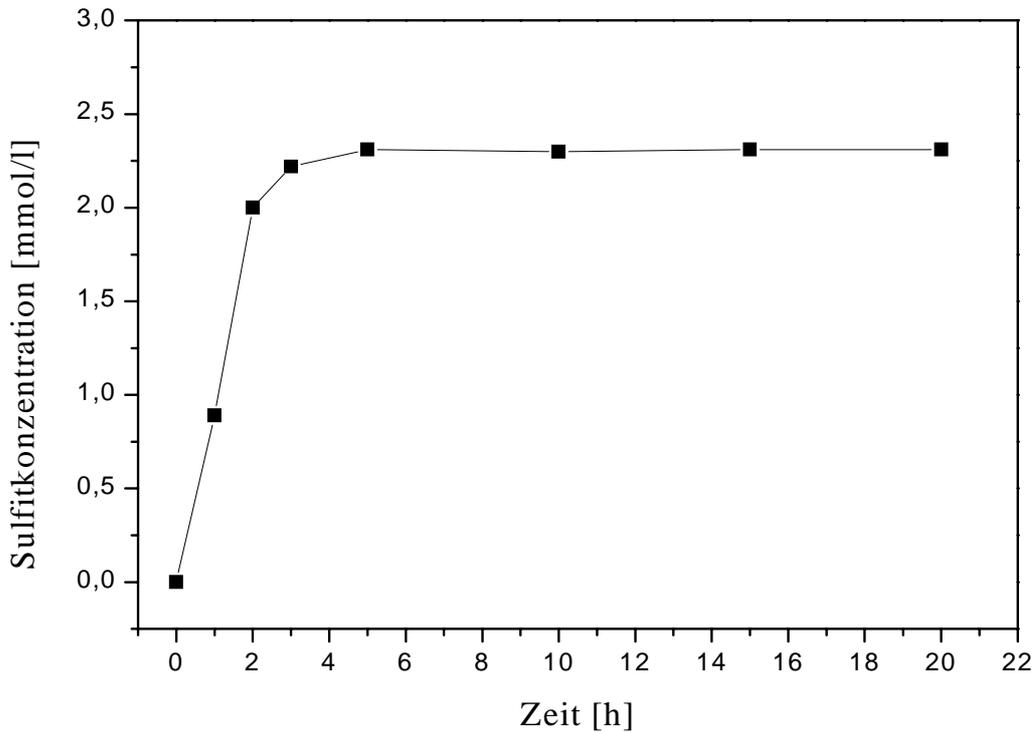


Abb. 4.4.17: Verlauf der freien Sulfitkonzentration im Diffusionsexperiment gegen 50%iges MB-Medium; 2 g Calciumsulfid-LentiKats<sup>®</sup> mit einem CaSO<sub>3</sub>-Gehalt von 34% der Trockenmasse [169]

Um die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens zu belegen, wurden mehrfach unter verschiedenen Bedingungen parallele Schüttelkolbenkultivierungen von *Sulfitobacter pontiacus* durchgeführt und der Verlauf der optischen Dichte bestimmt. In der Abbildung 4.4.18 ist beispielhaft dieser Verlauf für eine Versuchsreihe wiedergegeben. Es lässt sich aus der Abbildung entnehmen, dass das Verfahren sehr gut reproduzierbare Ergebnisse liefert.

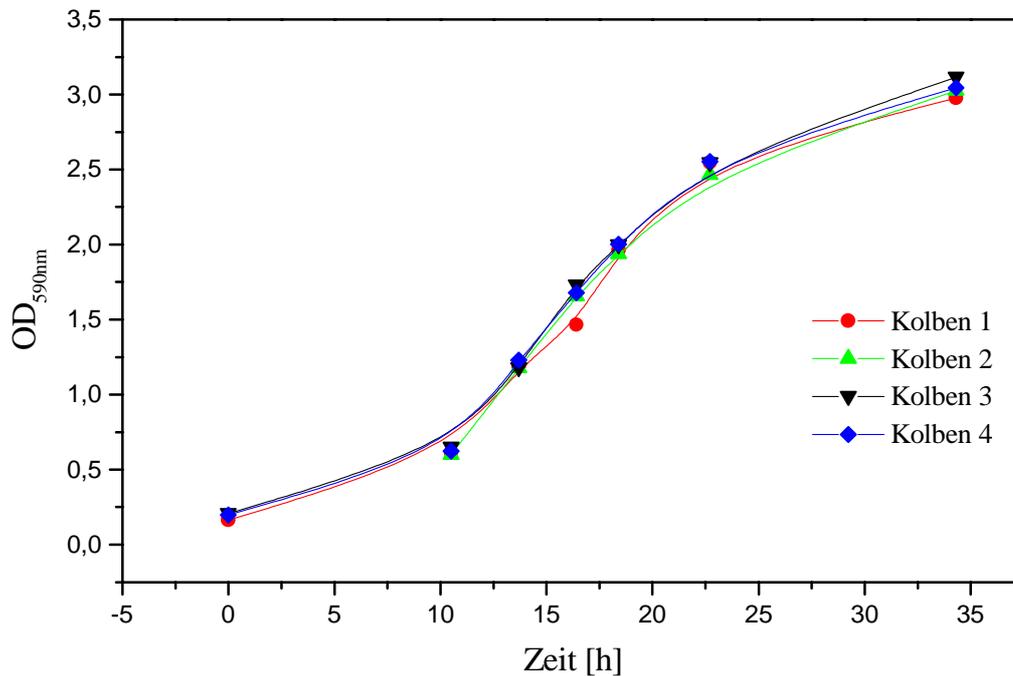


Abb. 4.4.18: Reproduzierbarkeit der Kultivierung von *Sulfitobacter pontiacus* im Schüttelkolben unter Zusatz von immobilisierten Calciumsulfid; V=50 ml MB-Medium + 2 g stabilisierte CaSO<sub>3</sub>-LentiKats<sup>®</sup>; T=26 °C; Animpfen nach 6 h mit jeweils 10<sup>7</sup> Zellen je ml [169]

Mit diesem Verfahren war es somit möglich, in den Schüttelkolben eine konstante freie Sulfitkonzentration einzustellen. Zwar lag diese Konzentration mit 2,3 mmol/l zu niedrig, um eine optimale Expression der Sulfitoxidase zu ermöglichen, allerdings konnte so der Einfluss der oben genannten Parameter auf die zu erzielende Aktivität unter reproduzierbaren Bedingungen hinsichtlich der Sulfitkonzentration im Schüttelkolbenversuch erfolgen. An dieser Stelle soll exemplarisch noch auf die Optimierung der EDTA-Konzentration im Medium eingegangen werden, da diese direkten Einfluss auf die freie Sulfitkonzentration nimmt.

Ein Problem bei der Induktion der SOD-Expression über Sulfid liegt darin, dass das Sulfid zum großen Teil durch chemische Oxidation verloren geht. Es ist bekannt, dass insbesondere Übergangsmetallionen (z. B. Cu<sup>2+</sup>) die Oxidation von Sulfid zu Sulfat katalysieren [171, 172]. Es ist möglich diese Umsetzung zu verhindern, indem man komplexierende Agenzien dem Medium zusetzt. Im vorliegenden Fall wurde hierzu EDTA verwendet. Die Untersuchungen

zeigten, dass mit steigender EDTA-Konzentration zwar die Ausbeute an Biomasse abnimmt, die erzielte SOD-Aktivität aber deutlich zunimmt. Die höchste spezifische Aktivität und den höchsten Wert für das weiter oben erläuterte Qualitätskriterium ergab sich bei einer EDTA-Konzentration von 51.3  $\mu\text{mol/l}$ .

Tab. 4.4.8: Einfluß der EDTA-Konzentration auf Zellwachstum und spezifische Enzymaktivität [167]

EDTA [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Generationszeit [h]	Biomasse [g/l]		spez. Spezifität [U/mg <sub>BTM</sub> ]		Qualitäts- kriterium
0	8.1	0.496	(100%)	6.0	(88%)	2.98
17.1	8.9	0.490	(99%)	6.2	(91%)	3.04
34.2	8.2	0.490	(99%)	5.8	(86%)	2.84
51.3	7.3	0.484	(98%)	6.8	(100%)	3.29

Auffällig ist die verkürzte Generationszeit bei steigender EDTA-Konzentration. Im Vergleich zur Kultivierung ohne komplexierendes Agens ist die Generationszeit beim Zusatz von 51,3  $\mu\text{mol/l}$  EDTA um 10 % verkürzt. Eine mögliche Erklärung wäre die Stabilisierung von Eisenionen und somit eine verbesserte Bioverfügbarkeit dieses Spurenelementes für *Sulfitobacter pontiacus*. Solche Effekte sind in der Literatur neben EDTA auch für Zitronensäure beschrieben worden [173]. Alle weiteren Experimente wurden daher in der Anwesenheit von EDTA durchgeführt. Im Laufe der Optimierungsarbeiten wurden folgende Parameter ermittelt, bei denen das höchste Qualitätskriterium erzielt werden konnte:

- pH 7,3
- Belüftung 0,4 VVM
- 600 rpm
- HEPES 50 mmol/l
- Acetat 20 mmol/l
- EDTA 51,3  $\mu\text{mol/l}$
- 50%iges MB-Medium
- NaCl 22g/l

Ein deutliches Temperaturoptimum wurde des weiteren bei 26°C festgestellt. Auf die Zugabe von anderen Schwefelverbindungen, die als Zwischenstufen in der biologischen

Schwefeloxidation auftreten, wie beispielsweise Thiosulfat sollte verzichtet werden, da dieses sich negativ auf die Sulfitoxidaseaktivität auswirkt [167].

#### 4.4.3.4 Aufarbeitung der Sulfitoxidase

Am Beispiel der L-Serindehydratase ist bereits auf verschiedene Strategien zur Aufreinigung von Enzymen eingegangen worden. Bei der Aufreinigung der Sulfitoxidase sollte über einen Ionenaustauscherschritt nach dem Zellaufschluss eine möglichst hoch aufgereinigte SOD-Fraktion erhalten werden. Schnelle und effiziente ionenchromatographische Verfahren sind auf der Basis von Ionenaustauscheradsorbentien möglich. Auf diese Systeme und deren Funktionsprinzip wird im Detail in Kapitel 5.3.2.1 bei der Aufreinigung von Molkeproteinen eingegangen, daher soll hier nur kurz das Funktionsprinzip vorgestellt werden.

Die eingesetzten Membranadsorber stammen von der Firma Sartorius AG, Göttingen. Die Steigerung der Effizienz der Auftrennung durch maximalen Durchsatz ist die Grundidee bei der Verwendung von modifizierten, makroporösen Membranen als stationäre Matrix in der Flüssigchromatographie. Makroporöse Membranen können durch chemische Modifizierung verschiedenste Funktionalitäten erhalten. Im vorliegenden Fall werden Kationenaustauschermembranen verwendet, die stark saure Tauschergruppen (Sulfonsäure) tragen (Sartobind S; Abb. 4.4.19).

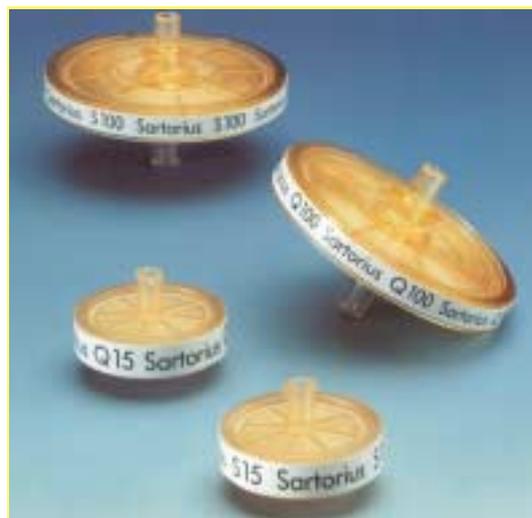


Abb. 4.4.19: Sartobind S Module für den Labormaßstab (Aufnahme: Sartorius AG, Göttingen)

Durch geeignete Wahl des pH-Wertes können an diesen Membranen positiv geladene Proteine adsorbiert und über einen Salzgradienten wieder eluiert werden. Neutrale und negativ geladene Moleküle passieren hingegen die Membranen ohne Wechselwirkungen und werden so abgetrennt. Bei der Aufreinigung der Sulfitoxidase wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen und die Zellrückstände mittels Ultrazentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde mittels Sartobind S-Membranadsorbent weiter aufgereinigt (Abb. 4.4.20).

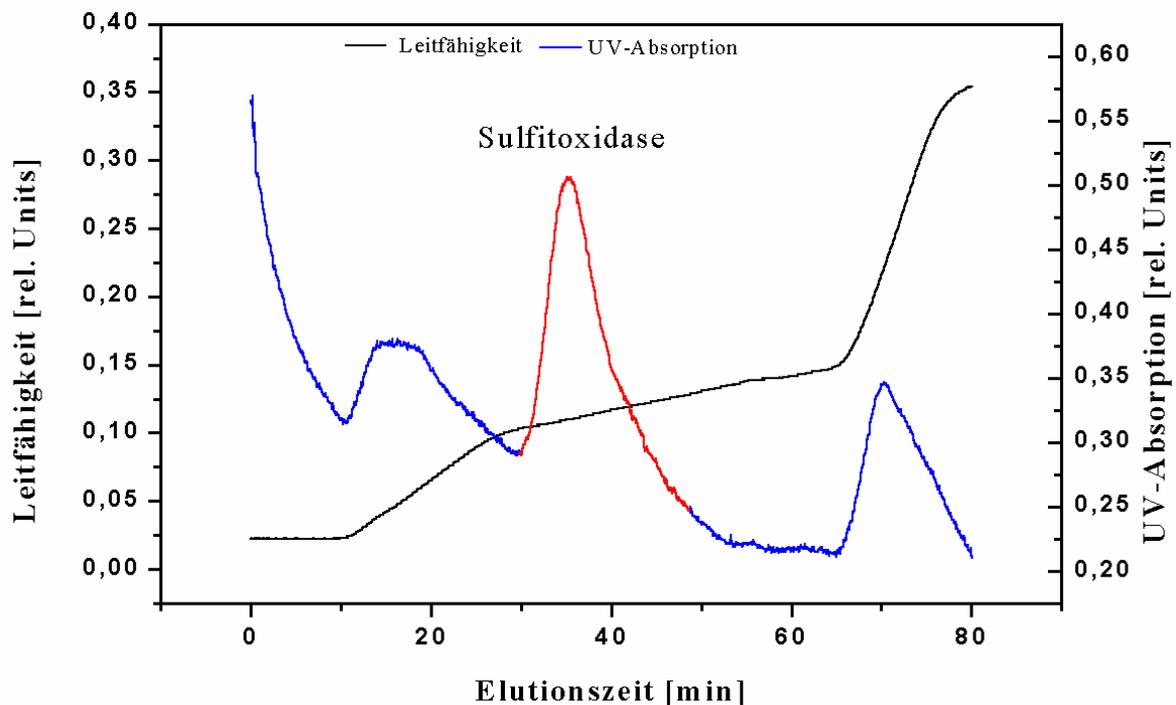


Abb. 4.4.20: Aufreinigung der Sulfitoxidase mittels Kationenmembranaustauscher; Bedingungen: pH 4,6; Puffer A: 20 mM Acetat; Puffer B: 20 mM Acetat + 0,2 M NaCl ; Gradient 0-5 min Puffer A; 5-20 min 0-20% Puffer B; 20-60 min 20-35% Puffer B; 60-70 min 35-100% Puffer B; 70-80 min Puffer B [174]

Wie aus der obigen Abbildung zu entnehmen ist, wird über diesen Aufarbeitungsschritt bereits eine hoch aufgereinigte SOD-Fraktion erzielt. Eine weitere Aufreinigung erfolgte durch eine Ultrafiltration bei 30 kDa (Verwendung von Zentrifugenfiltern). In der Abbildung 4.4.21 ist eine SDS-PAGE-Gelelektrophorese der verschiedenen Aufreinigungsstufen wiedergegeben.

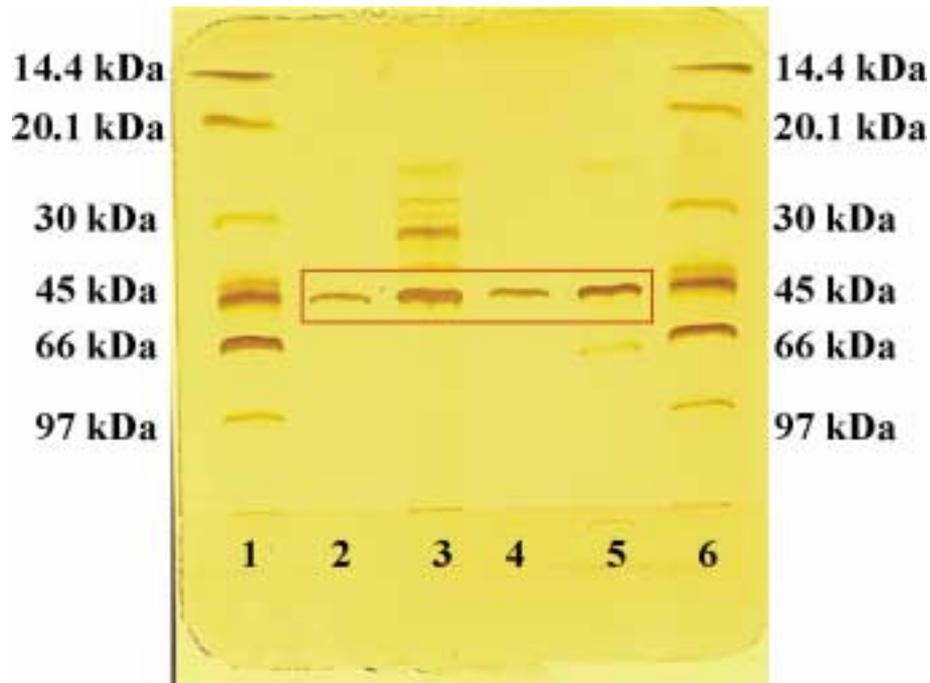


Abb. 4.4.21: SDS-PAGE-Gelelektrophorese von verschiedenen Stufen der SOD-Aufreinigung; Bahnen 1 u. 6: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2 und 4: SOD-Fraktion nach Kationenaustausch und 30 kDa Ultrafiltration; Bahn 3: Zellaufschluß, Bahn 5: Fraktion nach Kationenaustausch [174]

Nach Zellaufschluss, Kationenaustausch und Ultrafiltration kann eine hochaufgereinigte Sulfitoxidase gewonnen werden, die nach Lyophilisierung gekühlt gelagert werden kann. Einige Parameter des so aufgereinigten Enzyms sind in der Tabelle 4.4.9 im Vergleich mit Sulfitoxidasen anderer Herkunft aufgelistet.

Tab. 4.4.9: Eigenschaften der Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus* im Vergleich mit SODs anderer Herkunft [174]

	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	Hühnerleber	Rinderleber
Molekulargewicht [kDa]	45	110	83
Spezifische Aktivität [U/mg <sub>Protein</sub> ]	460	21,8	40
T <sub>opt</sub>	33	25	-
pH <sub>opt</sub>	7,5	8,5	8,6

Durch den Einsatz der Membranadsorber konnte ein effizientes und vor allem schnelles Aufreinigungssystem für die Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus* etabliert werden. Wie die Ergebnisse in Tabelle 4.4.9 zeigen, liegt mit diesem Enzym eine SOD vor, die über eine deutlich höhere spezifische Aktivität verfügt, als die bisher aus Säugetieren zu kommerziellen Zwecken isolierten. Die Aktivität liegt im Vergleich zu SOD aus Rinderleber um den Faktor 11,5 und bei Hühnerleber sogar um den Faktor 21 höher. Dieses kann darin begründet werden, dass Säugetiere das Enzym lediglich zu Entgiftung bzw. zur Umsetzung schwefelhaltiger Aminosäuren einsetzen, *Sulfitobacter pontiacus* hingegen über die Oxidation von Sulfit zu Sulfat den Energiestoffwechsel aufrecht erhalten kann.

In weiterführenden Arbeiten konnte die Sulfitoxidase zum Aufbau eines Biosensorsystems zur Messung von Sulfit in Wein herangezogen werden. Der schematische Aufbau eines solchen Biosensors ist in der Abbildung 4.4.22 dargestellt. Auf das genaue Funktionsprinzip von Biosensoren und deren Anwendung wird ausführlich im Kapitel 6.1.2 berichtet, auf das an dieser Stelle verwiesen sei.

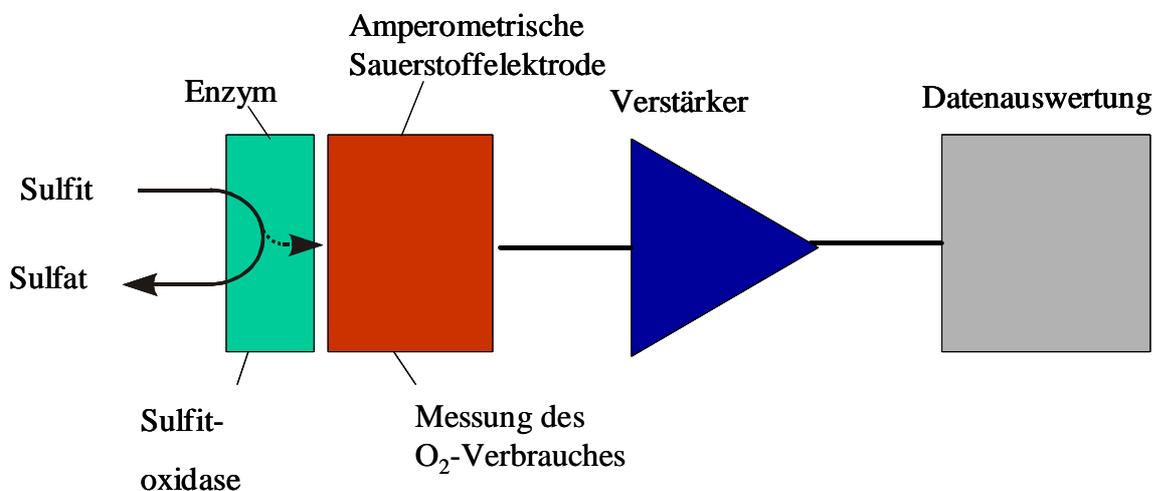


Abb. 4.4.22: Aufbau eines Biosensors zur Messung von Sulfit in Wein

Bei dem Biosensor wird die In-Vitro-Reaktion der Sulfitoxidase ausgenutzt. Während in vivo Cytochrom C als Elektronenakzeptor fungiert, übernimmt in vitro Sauerstoff diese Funktion. Daher kommt es bei einer Umsetzung von Sulfit zu Sulfat durch Sulfitoxidase zu einer Verringerung der Gelöstgaskonzentration von Sauerstoff. Diese Abnahme kann durch eine Sauerstoffelektrode registriert werden und mit der Sulfitkonzentration in Korrelation gebracht

werden. Zum Aufbau eines Biosensors muss das Enzym in geeigneter Weise immobilisiert werden, damit eine Kopplung mit dem Transducer (Sauerstoffelektrode) erfolgen kann. Im vorliegenden Fall wurde Sulfitoxidase daher auf verschiedenen Trägermaterialien immobilisiert und in einem Durchflussreaktor in ein Fließinjektionsanalysensystem integriert (zur Fließinjektionsanalyse s. Kap. 6.1.1). Den Einfluss verschiedener Immobilisationstechniken zeigt die Abbildung 4.4.23.

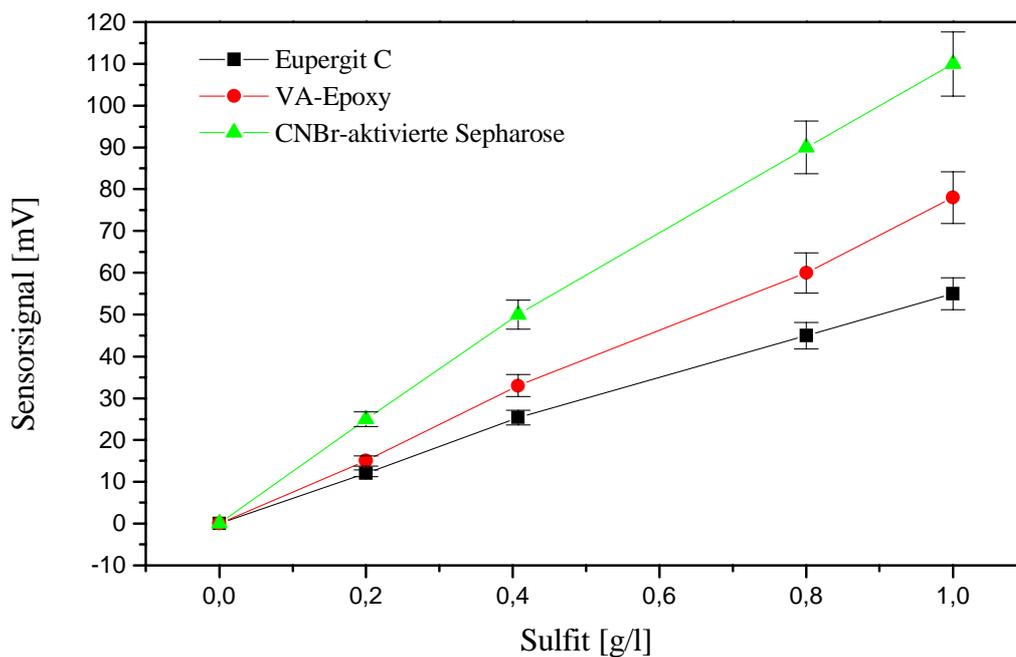


Abb. 4.4.23: Kalibration des SOD-Biosensors in Weißwein; Vergleich verschiedener

Immobilisationsverfahren; Standardzusatzverfahren; 25°C;  $\dot{V} = 0,3$  ml/min

Durch die Verwendung von cyanbromidaktivierter Sepharose lässt sich die höchste Sensitivität im Biosensorsystem erreichen. Messungen im relevanten Bereich von 100 bis 250 mg/l Sulfit können mit diesem System in Weinen realisiert werden. Eine weitere Optimierung des Sensorsystems ist zur Zeit aber noch nicht erfolgt.

#### 4.4.4 Haloperoxidasen und Halogenasen

Zentrale Schlüsselrollen in der chemischen Industrie aber auch in der Pharmazie nehmen halogenierte Verbindungen ein. Deren Produktion mittels Chlor oder Brom ist in der Regel sehr aufwendig und ökologisch bedenklich bzw. erfordern zur Einhaltung der gesetzlichen

Bestimmungen reichhaltige „End-of-Pipe-Techniken“ im Umweltschutzsektor. Des Weiteren sind vielfältige Maßnahmen im Bereich der Arbeitssicherheit zu treffen. Hauptproblem der Halogenchemie ist die Produktion von unerwünschten und oftmals hochtoxischen Nebenprodukten. Diese Nebenprodukte erschweren insbesondere im Fall von Stereoisomeren die Aufarbeitung der Produkte im erheblichen Maße. Ein besonderes Problem in der Chlorchemie stellt die mögliche Bildung von polychlorierten Dioxinen dar [175]. Der Einsatz halogenierender Enzymsysteme, welche die Halogenierung in wässriger Lösung über Chlorid oder Bromid vornehmen, wäre hinsichtlich des Arbeitsschutzes und der Umweltgefährdung von großem Nutzen, da die Gefahrstoffe Chlor und Brom aus der Produktionskette entfernt werden könnten. Wären die entsprechenden Enzyme weiterhin in der Lage, substrat- und regiospezifisch zu agieren, so könnte auch die Bildung von Nebenprodukten unterdrückt werden.

Lange Zeit war man der Ansicht, dass halogenierte Stoffwechselprodukte in der Natur nicht oder nur sehr selten vorkommen. Im Jahr 1960 kannte man gerade 29 halogenierte Verbindungen, die aus Organismen isoliert worden waren [176]. Diese Zahl ist in den letzten Jahren rasant angestiegen. Wurden Anfang der Neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts zwischen 800 [177] und 1000 [178] Verbindungen in der Literatur beschrieben, so waren es im Jahr 1996 bereits 2000 [179] und im Jahr 2001 über 3000 [180] beschriebene Strukturen. Hierzu gehört z. B. die Verbindung Chlormethan, die wesentlich zum Halogenkreislauf beiträgt (ca.  $5 \times 10^6$  t/a weltweit) [181]. Interessanter sind diejenigen der halogenierten Verbindungen, die eine pharmazeutische Anwendung ermöglichen. Hier sind insbesondere cytotoxische oder antibiotische Verbindungen wie Pyrrolnitrin [182], Chloramphenicol [183], Chlortetracyclin [184] oder Vancomycin [185] zu nennen. Treten chlorierte Verbindungen sowohl bei terrestrischen als auch bei marinen Organismen vielfach auf, so finden sich bromierte Verbindungen im größerem Maße bei marinen Organismen (insbesondere bei Invertebraten und Algen). Dieses ist auf den in Bezug auf terrestrische Habitate relativ hohen Gehalt dieses Halogenids im Meerwasser zurückzuführen. So findet sich im Meerwasser durchschnittlich 1 mM Bromid. Bei den terrestrischen Organismen sind insbesondere Pilze als Produzenten chlorierter Verbindungen zu nennen. Iodierte Verbindungen treten bedeutend seltener auf, finden sich aber wiederum sowohl in terrestrischen als auch in marinen Organismen. So ist z. B. das in Säugetieren vorkommende Hormon Thyroxin eine iodierete Verbindung [186]. Mit 3,5-Diiodotyrosin war es auch eine iodierete Verbindung, die 1896 von Drechsel als erster Halometabolit beschrieben worden ist [180]. Fluorierte Verbindungen

finden sich in der Natur äußerst selten, obwohl die Bioverfügbarkeit von Fluorid höher ist als die von Iodid und Bromid. Beschrieben sind einige hoch toxische Verbindungen in Pflanzen wie Fluoroacetat und Fluorocitrat [179].

Die Biosynthesewege dieser Verbindungen sind bisher nur wenig aufgeklärt, da sie oftmals sehr kompliziert sind und über zahlreiche Zwischenstufen verlaufen [179]. Für das Auftreten halogener Verbindungen müssen aber natürlich entsprechende Enzymsysteme vorhanden sein, die in der Lage sind, Halogenierungen vorzunehmen. Man kennt zur Zeit zwei große Gruppen solcher Enzyme, die entsprechende Reaktionen katalysieren können:

- Haloperoxidasen und
- Halogenasen

Die erste Klasse ist seit ungefähr 40 Jahren bekannt. Morris und Hagger isolierten 1966 aus dem Pilz *Caldariomyces fumago* die erste Haloperoxidase [187]. Dieser Stamm produziert das Antibiotikum Caldariomycin. Seit dieser Zeit sind diverse Haloperoxidasen beschrieben worden, von denen viele marinen Ursprungs sind [188]. Darunter befinden sich Chloro-, Bromo- und Iodoperoxidasen. Die Haloperoxidasen können in drei verschiedene Unterklassen eingeteilt werden, die die Halogenierung über unterschiedliche Reaktionsmechanismen katalysieren [179, 180]:

- Häm-haltige Enzyme; diese Enzyme enthalten als prosthetische Gruppe Protoporphyrin IX. Zur Halogenierung wird Wasserstoffperoxid und das entsprechende Halogenid benötigt, wobei hier die entsprechenden Substratspezifitäten hinsichtlich des Halogenids auftreten können. Die eigentliche Halogenierung wird dabei allerdings nicht vom Enzym, sondern von einem Intermediat der enzymatischen Reaktion durchgeführt. Das Enzym (hier Chloroperoxidase; CPO-Fe) bindet über das Eisen der Häm-Gruppe Sauerstoff aus dem Wasserstoffperoxid:



Dieser „Enzym-Substrat-Komplex“, der in der Literatur allgemein als „Compound I“ (CPO-Fe=O) bezeichnet wird, reagiert mit dem Halogenid zu einer enzymgebundenen hypohalogenierten Säure (CPO-Fe-O-Hal):



Dieser Komplex zerfällt in einer anschließenden Reaktion unter sauren Bedingungen in das Enzym und die hypohalogenierte Säure. Diese ist letztendlich für die Halogenierung verantwortlich:



- Vanadium-haltige Enzyme; Diese Enzyme enthalten gebundenes Vanadium im aktiven Zentrum. Der Mechanismus ist dem in Gleichungen 4.4.1 bis 4.4.4 beschriebenen ähnlich. Auch hier bindet Wasserstoffperoxid im aktiven Zentrum und unter Einlagerung des Halogenids kommt es zur sauren Abspaltung der hypohalogenierten Säure, die die Halogenierung durchführt.
- Häm- und Metallionenunabhängige Enzyme (Perhydrolasen); diese Gruppe von Enzymen wurde in der Literatur zuerst zu den Haloperoxidasen gerechnet [179]. Neuere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass es sich bei diesen Biokatalysatoren um  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen handelt, die in Gegenwart von kurzkettigen Carbonsäuren und Wasserstoffperoxid halogenierende Reaktionen katalysieren können [189]. Das aktive Zentrum ist aus einer katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Aspartat aufgebaut, an die beispielsweise Essigsäure binden kann. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid kommt es zu Bildung von Peroxoessigsäure unter Rückbildung des freien Enzyms. Durch Reaktion der Peroxoessigsäure mit freien Halogeniden wird wiederum die entsprechende Hypohalogenierte Säure gebildet, die für die letztendliche Halogenierung verantwortlich zeichnet.

Diese drei Reaktionsmechanismen zeigen das große Manko der Haloperoxidasen für gezielte biokatalytische Synthesen auf. Dadurch, dass die eigentliche Halogenierung nicht am aktiven Zentrum des Enzyms abläuft, sind die Halogenierungen wenig substrat- und regiospezifisch. Dieses sind aber gerade die Anforderungen, die bei der Synthese von Pharmazeutika gestellt werden müssen. Auch in der chemischen Industrie liegt das Bestreben darin, Halogenierungen ohne unerwünschte Nebenprodukte durchzuführen. Haloperoxidasen katalysieren aber neben

der Halogenierung auch die Oxidation verschiedener Substrate. Haloperoxidasen könnten daher technisch nur in den Fällen eingesetzt werden, wo die Halogenierung durch weitere Substituenten am Zielmolekül vorgegeben ist, oder wo die Produktion von mehreren Stereoisomeren von Interesse ist und wenn unerwünschte oxidative Nebenreaktionen ausgeschlossen werden können.

Neben den Haloperoxidasen/Perhydrolasen gibt es eine weitere Gruppe von halogenierenden Enzymen, die die Voraussetzung der Substratspezifität und der Regioselektivität erfüllen. Diese sind die Halogenasen. Die erste Halogenase wurde 1995 von Dairi et al. beschrieben [190]. Die Halogenasen wurden durch molekularbiologische Untersuchungen zur Entschlüsselung der Biosynthesewege für 7-Chlortetracyclin und Pyrrolnitrin entdeckt. Es wurde festgestellt, dass die Pyrrolnitrinbiosynthese auch dann noch abläuft, wenn die bis dahin bekannte Perhydrolase blockiert worden ist. Nach Klonierung und Sequenzierung des Genclusters stellte man fest, dass die ermittelten Sequenzen mit keiner bekannten Haloperoxidase oder Perhydrolase übereinstimmten [191]. Auch bei Arbeiten mit *Dictyostelium* wurden halogenierende Enzyme beschrieben, die eine bis dahin nicht bekannte Substratspezifität aufzeigten. Weiterhin waren die entsprechenden zellfreien Extrakte in der Lage, die Halogenierung auch in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid durchzuführen [192]. Im Falle der Biosynthese von Pyrrolnitrin konnten van Pée et al. [180] zeigen, dass es sich um mehrere Enzyme handelt, welche die Chlorierung vornehmen. Die erste Halogenase (PrnA) chloriert die Ausgangsverbindung Tryptophan in Position 7; die zweite Halogenase (PrnC) das gebildete Zwischenprodukt Monodechloroaminopyrrolnitrin in der Position 3 (s. Abb. 4.4.24).

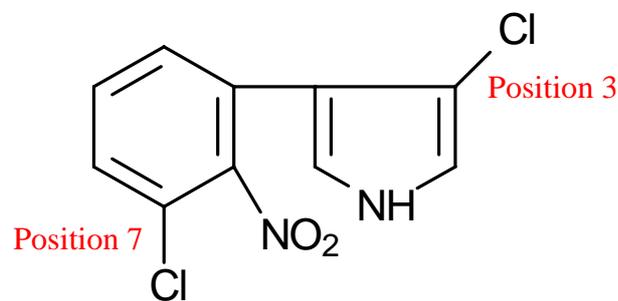


Abb. 4.4.24: Strukturformel von Tryptophan und Chlorierungsstellen der Halogenasen aus *Pseudomonas fluorescens* [nach 180]

Es wurde festgestellt, dass die Enzyme für ihre katalytische Aktivität  $\text{FADH}_2$  und Sauerstoff benötigen. In vivo wird dieses durch eine assoziierte Flavinreductase bereitgestellt. Bisher wurden Tryptophan-6- und Tryptophan-7-Halogenasen und verschiedene Enzyme, die Ähnlichkeiten zur Monodechloroaminopyrrolnitrin-3-Halogenasen aufweisen, identifiziert. Die Enzyme setzen neben Tryptophan auch andere Substrate wie z. B. methylierte Indole oder Tryptamine um. Durch Vorgabe der Substituenten am Substrat kann die Position der Halogenierung beeinflusst werden [193]. Über Halogenasen könnten somit Biotransformationen aufgebaut werden, mit deren Hilfe regioselektive In-Vitro-Halogenierungen durchgeführt werden könnten. Ein Ziel könnte dabei die Produktion von derivatisierten Tryptophanen sein, die für verschiedenste Indikationen eingesetzt werden (z. B. als Schlafmittel, Antidepressiva). Denkbar wäre die Umsetzung von Tryptophan zu 5-Bromtryptophan mittels einer Tryptophan-5-Halogenase (die bisher noch nicht beschrieben worden ist) zur Gewinnung von 5-Hydroxytryptophan (Oxitriptan) und dessen weitere enzymatische Decarboxylierung zu 5-Hydroxytryptamin. Eine solche zur Zeit noch hypothetische Biotransformationskaskade zur Herstellung von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

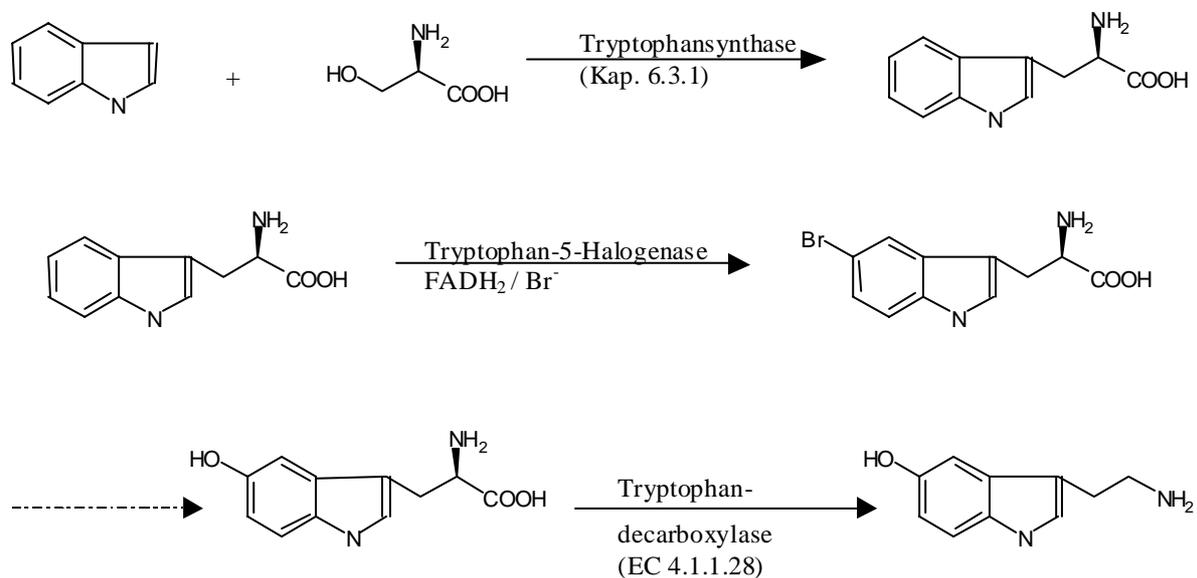


Abb. 4.4.25: Hypothetische In-Vitro-Biotransformationskaskade zur Herstellung von Serotonin; Schritt 1: Herstellung von Tryptophan aus Indol und Serin; Schritt 2: Regioselektive Bromierung von Tryptophan; Schritt 3: chemisches Einführen der Hydroxygruppe; Schritt 4: enzymatische Decarboxylierung

Serotonin wirkt im menschlichen Körper schmerzstillend und entzündungshemmend. 5-Hydroxytryptophan (Oxitriptan) ist ein sehr gut wirksames Antidepressivum. In pharmazeutischen Präparaten zur Behandlung von Depressionen müssen Serotonin-Vorläufer eingesetzt werden, da Serotonin selbst nicht aktiv transportiert wird und so die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann. Die Schlüsselrolle in der beschriebenen Biotransformation käme der Tryptophan-5-Halogenase zu, da über sie durch einfache Reaktionen weitere Derivate wie beispielsweise das Hydroxid zugänglich wären. Der Einsatz von entsprechenden chemisch hergestellten Indolderivaten zur direkten Herstellung von Brom- oder Hydroxytryptophanen ist möglich, da diese Derivate von der verwendeten Tryptophansynthase ebenfalls umgesetzt werden. Ihr Einsatz ist aber sowohl ökonomisch (Bromindol kostet auf dem Weltmarkt soviel wie das Produkt 5-Bromtryptophan) als auch ökologisch (Halogenchemie) nicht sinnvoll.

Halometabolite, die vom Tryptophan abgeleitet sind und deren Anwesenheit auf die Biosynthese von Pyrrolnitrin und somit auf regioselektive Halogenasen hinweisen, sind bei *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Serratia sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Burkholderia cepacia*, *Myxococcus fulvus* und *Cystobacter ferrugineus* gefunden worden. Einige, der von der DSMZ isolierten Stämme von den eingangs beschriebenen Isolaten der Bryozoen (Kap. 4.2.1), konnten der Gattung *Serratia sp.* zugeordnet werden. Ebenfalls vertreten sind *Pseudomonas sp.* Aus diesem Grund laufen an der DSMZ Untersuchungen im Rahmen des Niedersächsischen Verbundprojektes mit stark degenerierten Primern der Gene für die Halogenasen PrnA und PrnC. Mit Hilfe dieser Primer sollen weitere, neue Halogenasen in marinen Stämmen identifiziert werden. Es konnte mit MBT12 bisher ein Isolat identifiziert werden, welches ein Gen trägt, das eine Homologie von knapp 90 % des Genclusters aus *Pseudomonas fluorescens* aufweist [194]. Das Isolat ist bisher noch nicht phylogentisch charakterisiert worden. Es wird z. Z. davon ausgegangen, dass es in die Gattungen *Serratia* oder *Yersinia* eingeordnet werden kann.

Um eine biotechnologische Alternative zur chemischen Halogenierung aufbauen zu können, müssen die entsprechenden Enzyme in ausreichender Menge und mit hinreichend großer Stabilität zur Verfügung gestellt werden. Da die Halogenasen Enzymsysteme im Sekundärmetabolismus sind und somit nur in sehr geringen Maße expremiert werden, finden sich die Metabolite ebenfalls nur in sehr geringen Konzentrationen, was ein entsprechendes chemisches Screening erschwert. Daher ist, auch in Hinblick auf eine kommerzielle Nutzung

solcher Systeme, die Klonierung der für die Bildung der Halogenasen notwendigen Gencluster in schnell wachsende Produktionsstämme (z. B. *E. coli*) notwendig. Neben dem Screening von Wildstämmen muss auch für die Untersuchung dieser Klone ein schnelles und effizientes Screeningsystem zur Verfügung stehen. Dieses sollte möglichst on line eingesetzt werden können, um einen hohen Automationsgrad und somit einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen. Im Folgenden werden Screeningverfahren vorgestellt, die in der Lage sind, sowohl Stoffwechselprodukte von Halogenasen als auch Haloperoxidasen zu detektieren.

#### 4.4.4.1 Screeningverfahren für Haloperoxidasen und Halogenasen

In frühen Arbeiten über Haloperoxidasen wurde  $^{36}\text{Cl}$  als Marker verwendet und die entsprechenden Metabolite detektiert. Schnell setzten sich aber photometrische Assays durch, die die Änderung der Absorptionseigenschaften von Molekülen nach Einführen eines Halogenatoms ausnutzen. Der Standardassay beruht auf der Halogenierung von Monochlordimedon [188]. Die Abnahme der Enol-Form des Monochlordimedon wird bei diesem Test bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$  gemessen und ist proportional zur Aktivität der Haloperoxidase.

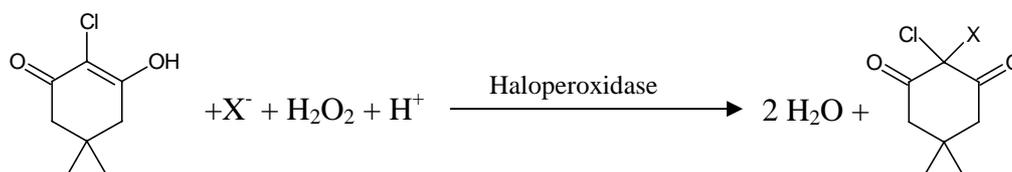


Abb. 4.4.26: Halogenierung von Monochlordimedon durch Haloperoxidasen; der spektroskopische Nachweis erfolgt bei 290 nm [188]

Die Verbindung Monochlordimedon wurde gewählt, da sie strukturelle Ähnlichkeiten zu Intermediaten der Biosynthese von Caldariomycin besitzt. Da mittlerweile bekannt ist, dass die Halogenierung durch die hypohalogenierten Säuren ausgelöst wird (s. o.), können auch andere Substanzen ausgewählt werden, die durch dieses Agens halogeniert und photometrisch detektiert werden können.

Eine für das Enzymscreening eingesetzte Methode sollte die Bedingungen erfüllen, dass sie schnell ist und das gleichzeitige Screening vieler Proben ermöglicht. Erfüllt werden diese Bedingungen durch das Kultivieren von Mikroorganismen auf 96er Mikrotiterplatten unter

Einsatz ausgewählter Kulturmedien. Dieses Verfahren bietet außerdem die Möglichkeit, gleichzeitig mehrere Referenzkultivierungen durchzuführen. Optimierungen können so auf einfache Weise durchgeführt werden [129]. Zur Erhaltung der Sterilität können die Mikrotiterplatten mit Glasplatten abgedeckt werden, die eine Wachstumskontrolle durch Messung der optischen Dichte mit Hilfe entsprechender Photometer bei  $\lambda = 560$  oder  $620$  nm und den Haloperoxidasenachweis bei  $\lambda = 290$  nm ermöglichen. Diese Glasplatten sind bei Kultivierungen über einen Zeitraum von länger als einem Tag notwendig, um ein Verdampfen größerer Mengen an Wasser aus dem Medium zu verhindern. Trotz des begrenzten Sauerstoffangebotes aufgrund des geringen Gasraumes über den Medien sind, abhängig vom Mikroorganismus, Kultivierungen bis zum Ende der exponentiellen Phase möglich.

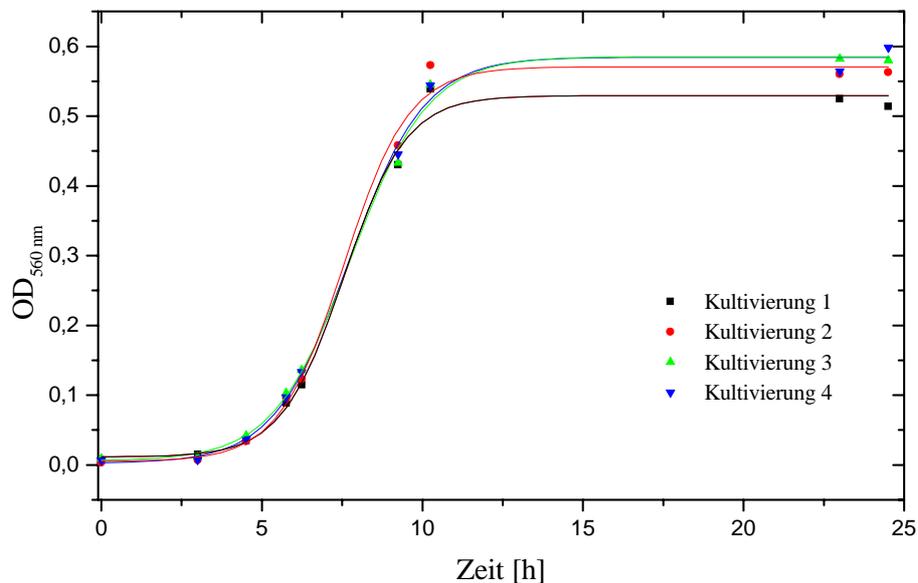


Abb. 4.4.27: Reproduzierbarkeit der Kultivierung des Isolates F15 von *Flustra foliacea* auf Mikrotiterplatten; Medium: MB 50, angeimpft mit  $10^6$  Zellen/ml; Volumen:  $200 \mu\text{l}$ ;  $900 \text{ rpm}$ ;  $37^\circ\text{C}$  (Schüttlertemperatur:  $40^\circ\text{C}$ ) [129]

Im Verlaufe der Arbeiten wurde zur Optimierung der Screeningverfahren untersucht, inwieweit man mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie Screening-Systeme für Haloperoxidasen und Halogenasen etablieren könnte. Eine Verwendung dieser Technologie böte die folgenden Vorteile:

- Trübung des Mediums durch die Mikroorganismen stört weniger als bei anderen photometrischen Messverfahren

- Neben Informationen über die Enzymsysteme könnten weitere physiologische Parameter wie Wachstumsrate; Zellaktivität etc. ermittelt werden
- Verschiedene Substrate mit unterschiedlichen Fluoreszenzmaxima könnten parallel in einer Probe getestet werden.

Als Modellversuch wurde die Umsetzung von Phenolrot zu Bromphenolblau gewählt. Es ist aus der Literatur bekannt, dass Haloperoxidasen aus *Caldariomyces fumago* diese Umsetzung katalysieren [188].

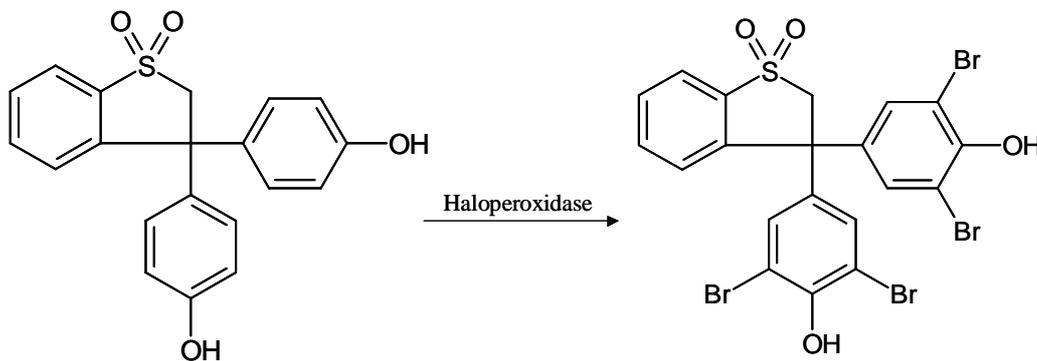


Abb. 4.4.28: Umsetzung von Phenolrot zu Bromphenolblau mittels Haloperoxidasen

Da Phenolrot und Bromphenolblau unterschiedliche Fluoreszenzmaxima aufweisen (Phenolrot: Ex360nm:Em530nm bzw. Bromphenolblau: Ex583nm:Em615nm) und die Fluoreszenzintensität im Bereich von pH = 5 – 10 nahezu konstant ist, sind mit diesem System auch quantitative Untersuchungen möglich. Erfolgreiche Tests dieses Systems konnten bei Kultivierungen von *Caldariomyces fumago* durchgeführt werden.

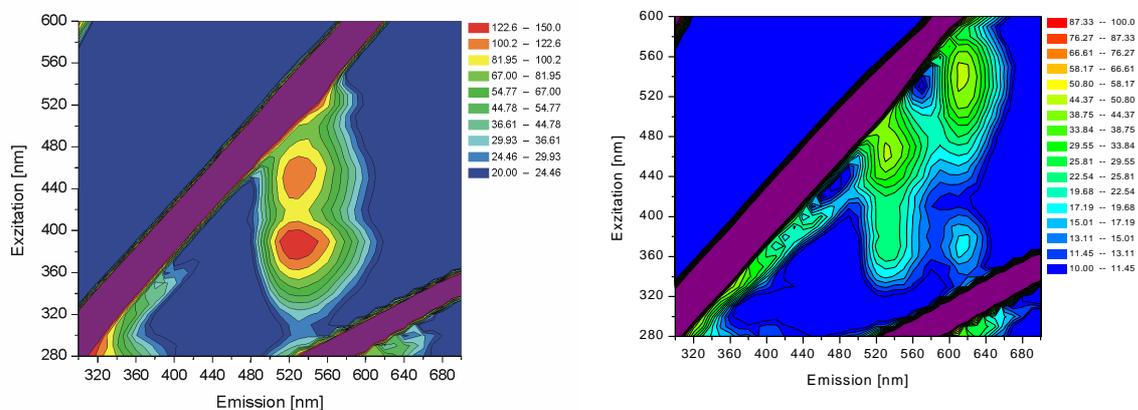


Abb. 4.4.29: 2D-Fluoreszenzspektrum Phenolrot-Lösung (links) und einer Bromphenollösung (rechts); Konzentration jeweils 1ppm

Für das Screening nach Halogenasen wurde ein Test auf Basis der 2D-Fluoreszenzspektroskopie entwickelt, welcher spezifisch die Suche nach bromierten Tryptophanen ermöglicht. Diese Verbindungen wurden ausgewählt, da gerade bromierte Tryptophane Hinweise auf pharmazeutisch interessante Sekundärmetabolite geben können. Zum Aufbau des Testsystems wurden 2D-Fluoreszenzspektren von Tryptophan, 5-Bromtryptophan und 7-Bromtryptophan aufgenommen. Da 7-Bromtryptophan kommerziell nicht erhältlich war, wurde es über die Umsetzung von 7-Bromindol und L-Serin mittels der in Kapitel 6.3 beschriebenen Tryptophansynthese hergestellt.

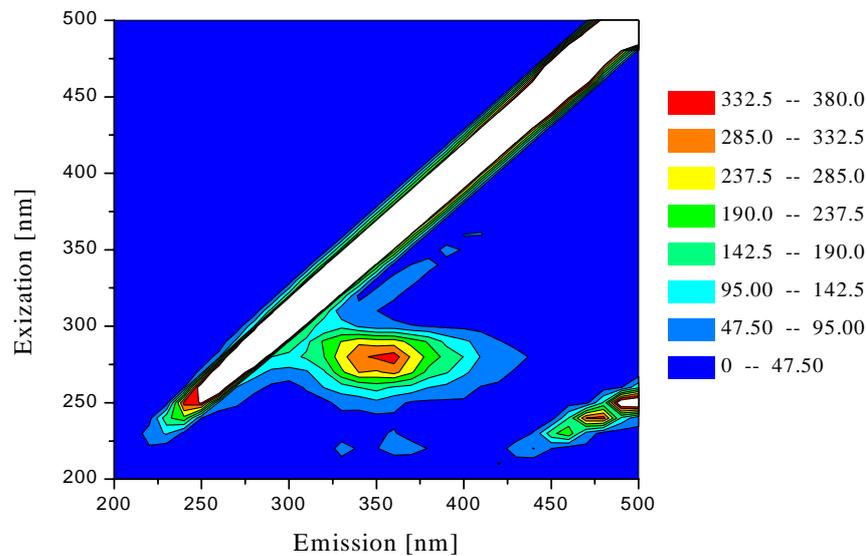


Abb. 4.4.30: 2D-Fluoreszenzspektrum von Tryptophan

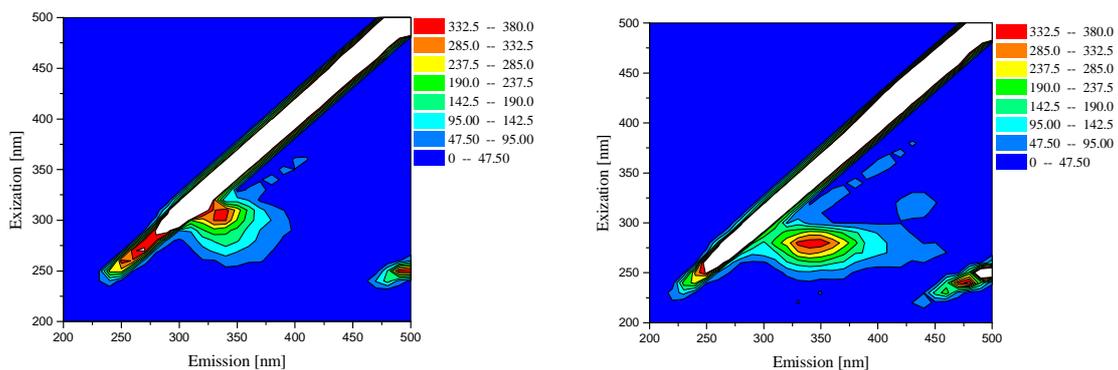


Abb. 4.4.31: 2D-Fluoreszenzspektrum von 5-Bromtryptophan (links) und 7-Bromtryptophan (rechts)

Wie aus den Abbildungen 4.4.30 und 4.4.31 zu erkennen ist, weisen die Substanzen jeweils eigene Fluoreszenzmaxima auf, die eine spezifische Detektion der drei Verbindungen

ermöglicht. Für Tryptophan wurde das Fluoreszenzmaximum bei Ex280nm:Em350nm, für 5-Bromtryptophan bei Ex310nm:Em340nm und für 7-Bromtryptophan bei Ex280nm:Em340nm ermittelt. Zwar liegen diese Maxima alle sehr dicht beieinander, durch die Bildung von Differenzspektren sollten aber die Konzentrationen der Tryptophanderivate bestimmt werden können. Um dieses zu testen, wurde das 2D-Fluoreszenzspektrum eines Gemisches aus Tryptophan, 5- und 7-Bromtryptophan aufgenommen (Abb. 4.4.32).

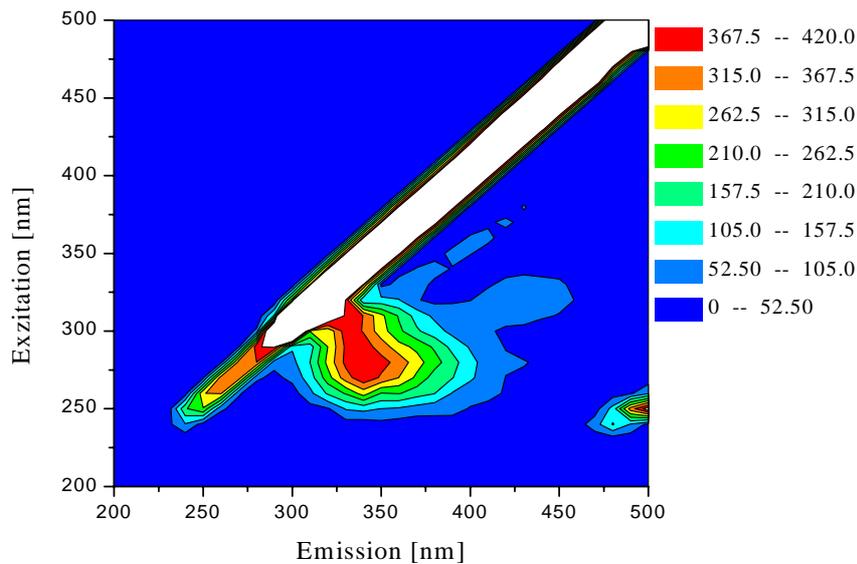


Abb. 4.4.32: 2D-Fluoreszenzspektrum eines Gemisches aus Tryptophan, 5- und 7-Bromtryptophan

Von diesem Spektrum wurde nun das Spektrum des reinen Tryptophan abgezogen. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 4.4.33. Es wird deutlich, dass mit Hilfe dieses Verfahrens auch die, durch die starke Tryptophanfluoreszenz überdeckten, Fluoreszenzen der Bromderivate detektiert werden können. Insbesondere das zum Auffinden einer möglichen Tryptophan-5-Halogenase (s. Abb. 4.4.25) wichtige 5-Bromtryptophan kann sehr gut nachgewiesen werden.

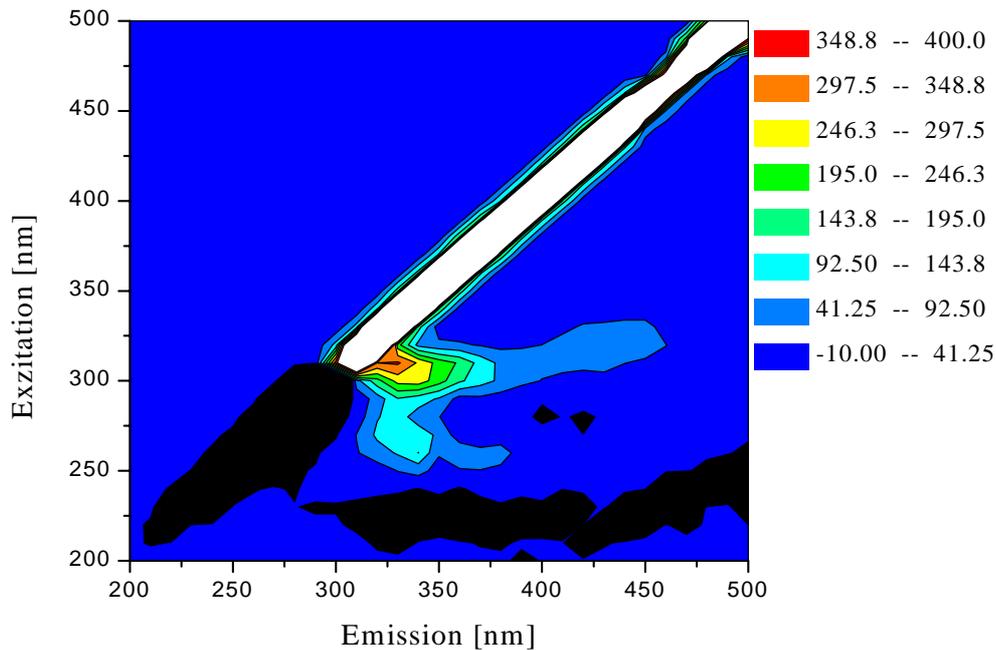


Abb. 4.4.33: Differenzspektrum gebildet aus dem Spektrum des Gemisches Tryptophan, 5- und 7-Bromtryptophan abzüglich des Spektrum von reinem Tryptophan

Durch Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie kann somit in Verbindung der Kultivierung und des Aktivitätstestes in Mikrotiterplatten ein Screeningverfahren zur Verfügung gestellt werden, welches einen hohen Durchsatz von Proben ermöglicht. Im Gegensatz zu Screeningverfahren, die Stoffwechselprodukte der Halogenasen über HPLC-Methoden oder direkt die Halogenase codierenden Gene nachweisen (PCR), kommt dieses Verfahren ohne eine weitere Probenvorbehandlung aus.

#### 4.5 Fazit zur marinen Biotechnologie

Obwohl das Leben auf der Erde seinen Ursprung im Meer hat, konzentrierte sich die Erforschung der Biosphäre lange Zeit fast ausschließlich auf terrestrische Habitate. Aus diesem Grund sind auch heutzutage noch die meisten Arzneimittelwirkstoffe terrestrischen Ursprungs. Erst in den späten sechziger Jahren wurde bei der Suche nach neuen pharmazeutisch wirksamen Metaboliten eine neue Richtung eingeschlagen und die Erforschung der Biosphäre weitete sich zunehmend auf Pflanzen und Tiere marinen Ursprungs aus. Vor dem Hintergrund zunehmender Resistenzentwicklungen bestimmter

Krankheitserreger und angesichts des Mangels an geeigneten Wirkstoffen zur Bekämpfung diverser Krankheiten, kann es sich heute keines der großen Pharmaunternehmen mehr leisten auf die Erforschung mariner Habitats zu verzichten. Während sich die Erforschung des Lebensraumes Meer anfangs hauptsächlich auf tropische Gewässer konzentrierte, werden mittlerweile auch gemäßigte Zonen und sogar die Polarregionen intensiv untersucht. Mittlerweile sind eine Vielzahl pharmazeutisch relevanter Verbindungen aus marinen Mikroorganismen in der Literatur beschrieben worden (Kap. 4.1). Es zeigt sich deutlich, dass insbesondere im Bereich der cytotoxischen und antibiotischen Wirkpalette die Organismen der Meere ein sehr großes Potential aufweisen. Aber nicht nur im Bereich der Gewinnung von Pharmazeutika stellen marine Mikroorganismen ein lohnendes Forschungsziel dar. Anhand von zwei Beispielen (L-Serindehydratase und Sulfitoxidase) konnte gezeigt werden, dass auch die Aufarbeitung mariner Enzyme ein interessantes Forschungsgebiet darstellt, da diese z. B. aufgrund ihrer hohen Aktivität für Anwendungen in der Bioanalytik eingesetzt werden können. Darüber hinaus sind mit den halogenierenden Enzymsystemen in der Zukunft Biotransformationen möglich, die in Teilbereichen die Halogenchemie substituieren könnten. Zur Zeit wird in verstärktem Maße nach spezifischen Halogenasen gesucht. Mit Hilfe der hier vorgestellten Screeningsysteme kann diese Suche effizienter gestaltet werden.

Durch das Kapitel 4.3 sollte der Versuch unternommen werden, die Komplexität der Kultivierung mariner Mikroorganismen zu verdeutlichen. Es gibt kein „Patentrezept“, welches bei marinen Stämmen garantiert zum erwünschten Erfolg führt. Es müssen daher möglichst viele und effiziente Tools zur Überwachung und Regelung dieser Prozesse entwickelt werden, damit die optimalen Parameter für einen bestimmten Stamm schnell ermittelt werden können. Neben analytischen Tools, wie der 2D-Fluoreszenzspektroskopie (Kap. 4.3.2), gehören dazu auch Kultivierungstechniken, die durch eine Vielzahl parallel geführter Versuche ein schnelles Auffinden des Optimums ermöglichen (s. Kap. 4.4.4.1; Kultivierung in Mikrotiterplatten, oder die Verwendung immobilisierter Substrate, Kap. 4.4.3.3). Zur Zeit wird an einem System gearbeitet, welches durch „Repeated-Fed-Batch-Kultivierungen“ und dem Einsatz genetischer Algorithmen eine Kultivierungsoptimierung im Bioreaktor ermöglicht [195]. Bei diesem Verfahren werden die Kultivierungsparameter nach Einstellen einer konstanten Wachstumsrate verändert und diese Auswirkung mittels des genetischen Algorithmus ausgewertet und einer neuer Satz Parameter ausgegeben. An Modellsystemen (*E. coli*) konnte dieses Verfahren bereits erfolgreich eingesetzt werden.

Ebenfalls deutlich geworden ist in den vorgegangenen Kapiteln, dass die Optimierung der Kultivierung nur einer der zentralen Punkte der marinen Biotechnologie ist. Es ist ebenfalls notwendig entsprechende Aufarbeitungssysteme für die Produkte – im vorliegenden Fall Enzyme - zur Verfügung zu stellen. Mit den Membranadsorbern wurde in Kapitel 4.4.3.4 ein System vorgestellt, welches eine schnelle Aufreinigung eines marinen Enzyms ermöglicht. Durch die Charakterisierung der aufgereinigten Enzyme konnte im Falle der L-Serindehydratase (Kap. 4.4.2.3) gezeigt werden, dass das marine Enzym im Vergleich zu seinen Analoga aus terrestrischen Organismen *in vitro* stabiler ist. Im Falle der Sulfitoxidase (Kap. 4.4.3.4) zeigte sich eine deutlich höhere spezifische Aktivität.

Es sollte aber auch verdeutlicht werden, dass die marine Biotechnologie noch mehr als andere Zweige der Biotechnologie nur durch interdisziplinäre Kooperationen erfolgreich ausgeübt werden kann. Beginnend mit der Probenahme, der Isolierung und Charakterisierung bis zur Kultivierung im Labor und der abschließenden Aufreinigung der Produkte kann nur ein Team aus Mikrobiologen, Molekularbiologen und Biotechnologen effizient arbeiten. Am Beispiel des marinen Biofilms (Kap. 4.2) als Ausgangsbasis wurden die einzelnen interdisziplinären Arbeitsschritte dargestellt, die notwendig sind, um einen neuen Mikroorganismus (*Paracoccus seriniphilia*) bzw. ein neues Enzym zu isolieren und zu charakterisieren.

Das wirtschaftliche Potential der marinen Biotechnologie wird jetzt auch in Deutschland erkannt und es ist davon auszugehen, dass eine große Anzahl an Firmenneugründungen in den nächsten Jahren in diesen Bereich fokussieren werden. Ein Beispiel dafür ist die im März 2002 gegründete Thetis (Institut für biomolekulare Naturstoffforschung GmbH) in Hamburg. Thetis erforscht weltweit Meeresorganismen mit dem Ziel, neue Leitstrukturen und Wirkstoffe zu identifizieren und zu charakterisieren. Die GmbH wurde mit insgesamt über 8 Millionen Euro Venture Kapital in der ersten Finanzierungsrunde gefördert. Für die schnelle Isolierung und Strukturaufklärung bedient sich Thetis modernster Hochleistungsanalytik, die in Kooperation mit dem Deutschen Elektron Synchrotron (DESY) aufgebaut wird. Es ist zu erwarten, dass der Forschungszweig der Marinen Biotechnologie in der nahen Zukunft ein stetes Wachstum erleben wird.

## 5 Effizientere Nutzung landwirtschaftlicher Rohstoffe durch biotechnologische Verfahren

In den folgenden Kapiteln soll aufgezeigt werden, dass mit Hilfe der Biotechnologie auch seit langem etablierte Verfahren optimiert werden können. So ist es möglich, über neue Verfahrensschritte die Qualität eines Produktes zu verbessern (siehe auch das Anwendungsbeispiel „Nitratentfernung aus Molke“ (Kapitel 5.4)), oder dadurch Zugriff auf neue Produkte zu erhalten, die bisher nicht oder nur schwer zugänglich waren (siehe auch das Anwendungsbeispiel „Gewinnung von hochwertigen Proteinen aus Molke“ (Kapitel 5.3) und „Aufarbeitung von Kartoffelprotein“ (Kapitel 5.5)). In Kapitel 5.1 wird zunächst auf die generelle Verwendung von landwirtschaftlichen Rohstoffen in der Bioprozesstechnik eingegangen.

### 5.1 Landwirtschaftliche Rohstoffe und nachwachsende Rohstoffe

Die Produktion nachwachsender Rohstoffe gehörte neben der Nahrungsmittelherstellung seit alters her zu den Hauptaufgaben der Landwirtschaft. Die Verdrängung landökonomischer Erzeugnisse, die nicht der Ernährung und Tierfütterung dienen, begann erst mit der industriellen Revolution in der Mitte des 19. Jahrhunderts. Nachwachsende Rohstoffe sind also seit langer Zeit vom Menschen genutzt worden. Neue Bedeutung bekommen die nachwachsenden Rohstoffe allerdings durch die zahlreichen Verwendungsmöglichkeiten, die sich durch moderne Technologien in der heutigen Zeit erschließen. Eine gängige Definition von nachwachsenden Rohstoffen besagt, dass diese „(...) land- und forstwirtschaftlich erzeugte Produkte sind, die einer Verwendung im Nichtnahrungsbereich zugeführt werden (...)“ [196]. Wird somit im Folgenden über Arbeiten berichtet, in denen die betrachteten landwirtschaftlichen Rohstoffe Molke, Melasse und Kartoffelprotein über Trennverfahren in Einzelkomponenten separiert und diese in der Nahrungsmittelindustrie (Functional Foods, Nutraceuticals) verwendet werden, so muss aufgrund der obigen Definition von *landwirtschaftlichen Rohstoffen* gesprochen werden. Liegt die Anwendung der gleichen Produkte im Bereich der pharmazeutischen Industrie könnte von *nachwachsenden Rohstoffen* gesprochen werden. In dieser Arbeit wird auf Grund dieser Begrifflichkeiten für die eigenen Arbeiten durchgängig die Bezeichnung *landwirtschaftliche Rohstoffe* verwendet.

Im Jahr 1999 wuchsen in Deutschland auf rund 740.000 Hektar nachwachsende Rohstoffe. Dieses entspricht etwa sechs Prozent der Ackerflächen Deutschlands. Die Anwendungsbereiche nachwachsender Rohstoffe weiten sich in den letzten Jahren immer mehr aus. Die Gründe dafür sind sowohl ökonomischer als auch ökologischer Art. So erhofft man sich, dass nachwachsende Rohstoffe ihre fossilen Analoga in vielen Bereichen ersetzen können und so dazu beitragen, deren begrenzte Vorräte für nachfolgende Generationen zu schonen. Der ökologische Vorteil wird im Allgemeinen darin gesehen, dass Produkte, die aus Pflanzen gewonnen werden, nach Gebrauch bei ihrer Verbrennung oder bei der Kompostierung immer nur die Menge an CO<sub>2</sub> freisetzen, die sie während des Wachstums der Atmosphäre entnommen haben. Im Gegensatz zu fossilen Rohstoffen sind sie dadurch weitgehend CO<sub>2</sub>-neutral; die Stoff- und Energiekreisläufe sind formal geschlossen. Es wird daher argumentiert, dass ihre Verwendung helfen kann, den sich verstärkenden Treibhauseffekt abzumildern und globalen Klimaveränderungen entgegenzuwirken. Dieses ist sicherlich nicht grundsätzlich verkehrt, kann aber den Produkten nicht per se zugesprochen werden. So muss bei der Erstellung einer Ökobilanz der gesamte Lebenszyklus eines Produktes betrachtet werden, wobei eine Ökobilanz als „(...) ein möglichst umfassender Vergleich der Umweltauswirkungen zweier oder mehrerer unterschiedlicher Produkte, Produktgruppen, Systeme, Verfahren oder Verfahrensweisen (...)“ [197] definiert werden kann. Da diese Erfassung sehr zeitaufwendig und in einigen Fällen auch unmöglich ist, werden in der Regel sogenannte „Screening-Indikatoren“ benutzt, um schneller zu ökologischen Aussagen zu gelangen. Ein klassischer Indikator ist zum Beispiel der kumulierte Energieaufwand. Daneben können aber auch branchenspezifische Schlüsselparameter wie FCKW-Emissionen herangezogen werden. Man kann also das Produkt nicht isoliert betrachten, sondern muss auch dessen Herstellungsprozess, Transportwege etc. bei der Ökobilanz mit berücksichtigen. Nach einem solchen Vergleich kann auch ein petrochemisches Produkt die günstigere Ökobilanz aufweisen.

Als Alternative zur Nahrungsmittelerzeugung bietet die Produktion nachwachsender Rohstoffe der Landwirtschaft allerdings andere direkte Vorteile. Um der Überproduktion an Nahrungsmitteln entgegenzuwirken, verpflichtet der Staat die Landwirte, jährlich einen bestimmten Anteil (1999: 10 %) ihrer Flächen stillzulegen, d.h. aus der Nutzung zu nehmen. Zum Ausgleich dafür erhalten die Landwirte finanzielle Entschädigungen. Der Anbau von Industriepflanzen ermöglicht nicht nur die Nutzung dieser Stilllegungsflächen, ohne auf die

Zahlungen verzichten zu müssen, sondern stellt eine sinnvolle Ergänzung zur Nahrungsmittelerzeugung dar.

Da Industrie und Chemie genau auf ihre Bedürfnisse zugeschnittene Rohstoffe benötigen, ist jedoch nicht nur die Landwirtschaft gefordert. Es bedarf innovativer Forschung, um die Rohstoffe optimal verarbeiten zu können. So ist es mittels Pflanzenzüchtung, Biotechnologie und Gentechnik möglich, die gewünschten Rohstoffqualitäten zu erzielen und die Erträge zu optimieren (z. B. spezielle Fettsäuren im Rapsöl). Auf diese Weise kann die Landwirtschaft heute hochwertige Ausgangsstoffe zur Verfügung stellen, die der Industrie aufwendige Umwandlungsschritte, wie sie bei fossilen Rohstoffen nötig sind, teilweise ersparen. Daneben bieten pflanzliche und tierische Produkte Inhaltsstoffe, deren Wert lange Zeit nicht erkannt wurde.

Neben der direkten Nutzung in Form von Energie, Schmierstoffen, Verpackungsmaterialien oder Fasern spielt die biotechnische Konversion in Rohstoffe für die chemische, pharmazeutische und kosmetische Industrie eine steigende Rolle. Bei diesen Biotransformationen werden Zellen oder isolierte Enzymsysteme verwendet, um beispielsweise organische Säuren, Zuckeralkohole, funktionelle Polycarbonsäuren, Aminosäuren oder Peptide herzustellen [198]. Dieser Bereich ist eng verknüpft mit den Beispielen, die in Kapitel 3 unter dem Begriff der Substitutionspotentiale dargestellt worden sind. Ein großer Teil der nachwachsenden Rohstoffe wird zu eben solchen Substitutionsprozessen herangezogen. Bekannteste Beispiele sind der sogenannte Biodiesel und die Biopolymere [199, 200]. Bei der Produktion von Grund- und Feinchemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen für verschiedenste Industriezweige sind als prominente Vertreter an dieser Stelle 1,3-Propanediol [201] und Aminosäuren (z. B. Tryptophan [202, 203]) zu nennen. Weitere Verbindungen, die aus nachwachsenden Rohstoffen per Biotransformation hergestellt werden könnten, finden sich Tabelle 3.2.

Aber auch in den sogenannten landwirtschaftlichen Reststoffen wie Molke, Melasse und Kartoffelprotein finden sich eine Vielzahl von Verbindungen, deren Aufarbeitung die Wertschöpfung aus den entsprechenden Rohstoffen Milch, Zuckerrübe und Kartoffel stark ansteigen lässt. Derartige Aufarbeitungsprozesse sind teilweise bereits etabliert. So wird in Kapitel 6 beschrieben, wie über moderne Prozessanalytik die chromatographische Isolierung von Aminosäuren aus Melasse optimiert werden kann. In diesem Kapitel sollen neue

Aufarbeitsverfahren an den Beispielen Molke [204] und Kartoffelprotein [205] skizziert werden. Sie bilden die kostengünstige Grundlage für neue hochwertige Produkte, beispielsweise in der Pharmazie, in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie und in der Kosmetik. Um sie herzustellen, müssen Techniken verwendet werden, bei denen das Veredelungspotential, das in diesen Rohstoffen steckt, optimal genutzt wird. Insbesondere in strukturschwachen, landwirtschaftlich geprägten Regionen kann durch eine solche intensivere Nutzung standortspezifischer Ressourcen eine Standortsicherung und damit verbunden die Schaffung regionaler Arbeitsplätze erreicht werden. Die im Sinne des Sustainable Development produzierten Güter und die neuartigen Verfahrenstechniken ihrerseits können global vermarktet werden.

Biotechnologische Veredelungsprozesse von landwirtschaftlichen Rest- und Nebenstoffen haben im Vergleich zu den herkömmlichen chemischen Synthesen neben der Verwendung landwirtschaftlicher bzw. nachwachsender Rohstoffe die Vorteile, dass:

- die angewandten physikalischen Trenn- und Aufarbeitungstechniken umweltfreundlich sind,
- die Weiterverarbeitung der in der Region anfallenden Rohstoffe und Nebenprodukte vor Ort erfolgen kann und somit der ökologisch fragwürdige und kostenintensive Transport in andere Gegenden vermieden wird (verbesserte Ökobilanz),
- da die Produkte natürlichen Ursprungs sind, bieten sie den Vorteil einer erleichterten Zulassung, Vermarktung und Akzeptanz; durch den daraus resultierenden frühen Markteintritt ergeben sich längere Patentnutzungszeiten.
- die eingesetzten Edukte (Molke, Melasse etc.) sehr geringe Kosten verursachen.

## **5.2 Downstream-Processing zur Proteingewinnung aus landwirtschaftlichen Rohstoffen**

Bei der Verarbeitung von landwirtschaftlichen Rohstoffen werden oftmals Membranverfahren zur Abtrennung einzelner Komponenten eingesetzt [206, 207]. Beispiele sind die Aufreinigung von Rohrzucker [208], die Hydrolyse von Kohlenhydraten und die

Stärkeverzuckerung [209]. Insbesondere bei der Aufarbeitung von Molke und Molkeprodukten spielen Trennprozesse mittels Membranen eine wichtige Rolle [210]. Membranverfahren werden weiterhin in der Bioverfahrenstechnik beginnend mit der Zellabtrennung aus einer Fermentationsbrühe bis hin zur abschließenden Feinreinigung des Endproduktes verwendet [211].

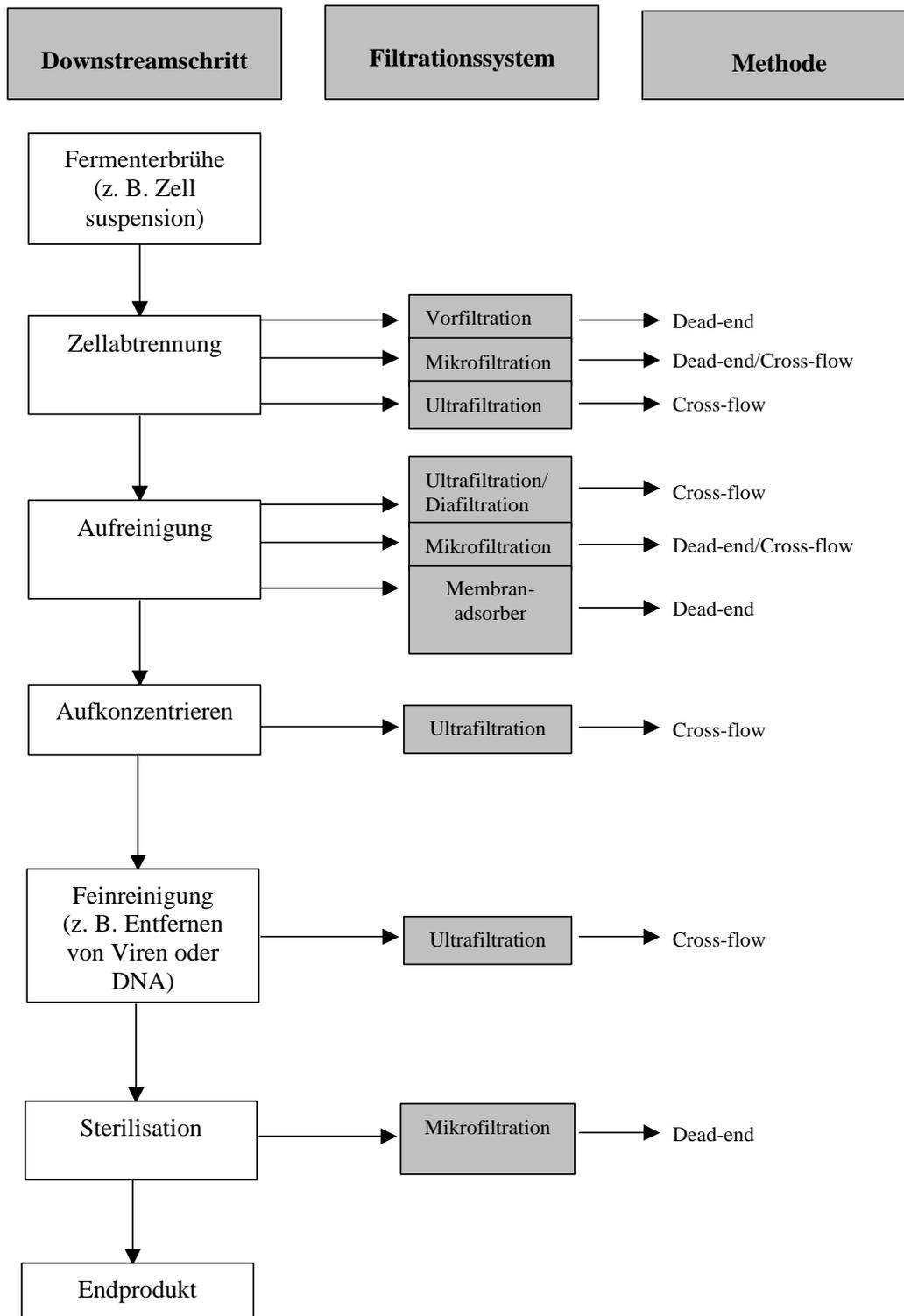


Abb. 5.2.1: Einsatzgebiete von Membranverfahren in der Bioverfahrenstechnik [211]

Bei Membranverfahren handelt es sich um die druckgesteuerte Trennung einzelner Komponenten aus einer Lösung oder einer Suspension. Bei der Trennung werden in der Regel Unterschiede in der Größe, der Ladung oder der Form der zu trennenden Partikel oder Moleküle genutzt. Da der Prozess über den Druck gesteuert wird, sind Membranverfahren in Hinblick auf thermischen Stress oder Veränderung der chemischen Umgebung sehr schonend und daher auch für empfindliche Verbindungen geeignet. Die Prozesse verhalten sich meist einfach im Scale-up, da gleiche Materialien und Konfigurationen verwendet werden können, was eine Validierung der Prozesse erheblich vereinfacht. Membranprozesse sind in ihrer Selektivität allerdings sehr beschränkt. Proteinfractionierungen können nur dann erreicht werden, wenn ausreichende Unterschiede in Größe und/oder Ladung vorliegen. Dabei muss daran gedacht werden, dass ein unterschiedliches Molgewicht nicht zwangsläufig eine unterschiedliche Größe bedeutet. Die Größe wird entscheidend durch Faltung, Ladung und Hydrathülle bestimmt. So können Proteine, die sich im Molgewicht um den Faktor zehn unterscheiden, aufgrund unterschiedlicher Faltung sich in der Größe lediglich um den Faktor drei unterscheiden. Daher wurden in letzter Zeit neue Membrantypen entwickelt, die nicht nur diese grobe Unterscheidung nach der Größe treffen können. Funktionelle Membranen können Moleküle anhand ihres chemischen Verhaltens selektiv binden. Über diese Verfahren wird eine Prozessintegration der Downstream-Schritte erheblich vereinfacht. Auf ein solches Beispiel und dessen Anwendung wird anhand der Membranadsorber in Kapitel 5.3.2.1 genauer eingegangen.

### **5.2.1 Membranfiltration**

In den vergangenen 30 Jahren sind eine Vielzahl von Prozessen entstanden, die zur Abtrennung und Fraktionierung von Molekülen verwendet werden können. Diese Verfahren können in vier Hauptgruppen unterteilt werden:

- Reverse Osmose (Hyperfiltration) (RO)
- Nanofiltration (NF)
- Ultrafiltration (UF)
- Mikrofiltration (MF)

Die Größenverteilung der Partikel, die in den jeweiligen Verfahren abgetrennt werden können, ist in der Abbildung 5.2.2, potentielle Einsatzgebiete der Verfahren im Bereich der Bioverfahrenstechnik sind in der Abbildung 5.2.1 dargestellt.

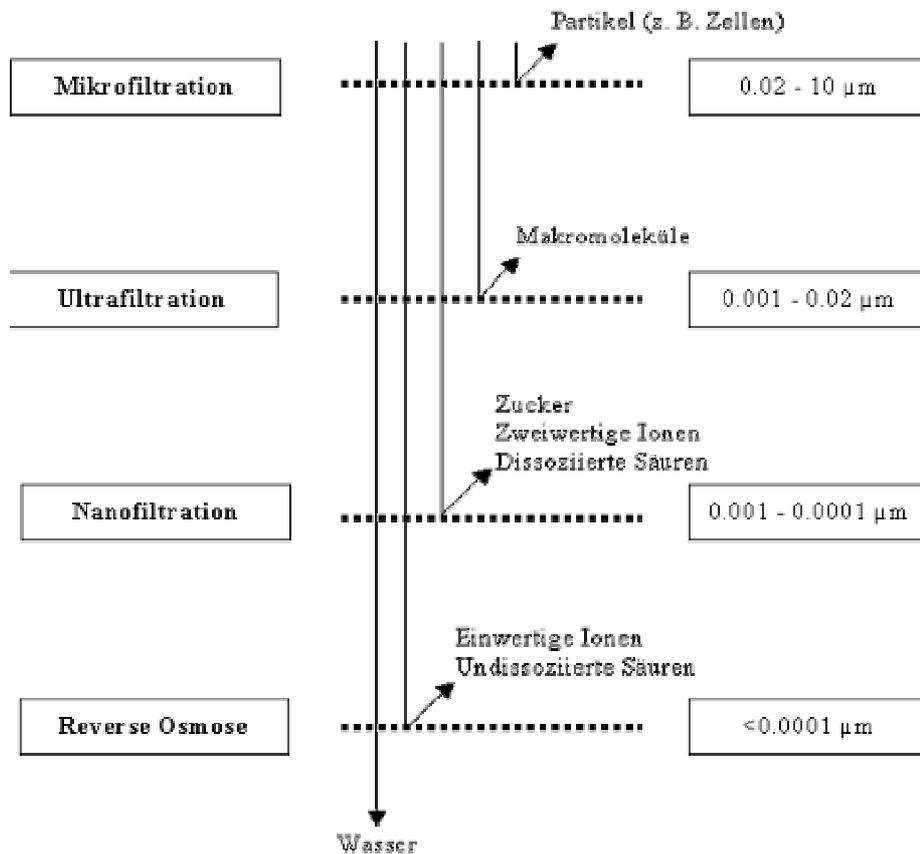


Abb. 5.2.2: Klassifizierung der Filtrationsverfahren [nach 212]

Die Verfahren der Reversen Osmose (RO) und der Nanofiltration (NF) werden angewendet, wenn man niedermolekulare Verbindungen wie Salze, Zucker oder Aminosäuren aus einer Lösung abtrennen möchte. Bei der Reversen Osmose werden auch einwertige Ionen wie  $\text{Na}^+$  oder  $\text{Cl}^-$  zurückgehalten. RO-Membranen weisen allerdings einen deutlich geringeren Fluss als NF-Membranen auf. Anwendungen finden diese Verfahren bei der Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.

Ultrafiltration(UF)-Membranen haben eine Porengröße zwischen 1 nm und 0,05 µm. Sie werden typischer Weise für die Abtrennung von Makromolekülen und Kolloiden aus einer Lösung verwendet. Das Trennverhalten dieser Membrantypen wird nicht über die Porengröße angegeben, sondern über den sogenannten „Molecular Weight Cut-Off“ (MWCO). Der

MWCO-Wert gibt das Molekulargewicht an, für das die Retention 90% beträgt. Aufgrund der oben genannten Gründe ist dieser Wert nicht als Absolutwert anzusehen. Neben den Faktoren Faltung und Ladung haben auch Interaktionen der Moleküle mit der Membran und die chemische Umgebung Einfluss auf das Trennverhalten einer UF-Membran. Aus diesen Gründen kann ein Trennproblem nur empirisch gelöst werden.

Mikrofiltration(MF)-Membranen haben eine Porengröße zwischen 0,05 µm und 10 µm. Sie werden benutzt, um Kolloide und Partikel von gelösten Bestandteilen abzutrennen. Die gebräuchlichsten Anwendungen sind die Sterilfiltration, Zellernte oder Reinwassergewinnung. Hydrophobe MF-Membranen werden zur Sterilfiltration von Gasen (z. B. Belüftung von Bioreaktoren) verwendet.

### 5.2.2 Grundlagen der Filtrationstechniken

Bei der Trennung von Substanzen über Membranverfahren wird eine niedrig viskose Feed-Lösung auf eine Seite der Membran aufgebracht. Der Feed-Strom passiert unter Druckeinfluss die Membran. Der Anteil der Flüssigkeit, der durch die Membran hindurchwandert wird als Permeat bezeichnet. Der Anteil der Lösung, der nach dem Filtrationsprozess zurückbleibt, wird Retentat genannt. Durch diesen Prozess findet eine Aufkonzentrierung statt, die über den Konzentrierungsfaktor (f) definiert wird. Der Konzentrierungsfaktor ist das Verhältnis zwischen dem Volumen der Feed-Lösung und dem Volumens des Retentates.

$$f = \frac{V_F}{V_c} \quad (\text{Gl. 5.2.1})$$

$V_F$  = Feed-Volumen       $V_c$  = Retentat-Volumen

Eine weitere wichtige Größe ist der Retentionsfaktor (R) des gewünschten Produktes. Er gibt die Verteilung der Komponenten zwischen Permeat und Retentat an (Gleichung 5.2.2).

$$R = \frac{c_F - c_p}{c_F} \quad (\text{Gl. 5.2.2})$$

$c_F$  = Konzentration in der Feed-Lösung       $c_p$  = Konzentration im Permeat

Der Retentionsfaktor liegt zwischen 0 und 1, wobei ein Wert von 1 bedeutet, dass die Komponente vollständig in der Feed-Lösung (Retentat) verbleibt. Ein Wert von 0 bedeutet, dass die Komponente ungehindert die Membran passieren kann und sich vollständig im Permeat wiederfindet. Daraus ergibt sich, dass eine ideale Reverse Osmose einen Retentionswert von 1 für alle Komponenten besitzen sollte und eine ideale Ultrafiltration einen Wert von 0 für gelöste niedermolekulare Verbindungen.

Filtrationstechniken können über zwei verschiedene Verfahren betrieben werden: Dead-End oder Cross-Flow (Abb. 5.2.3).

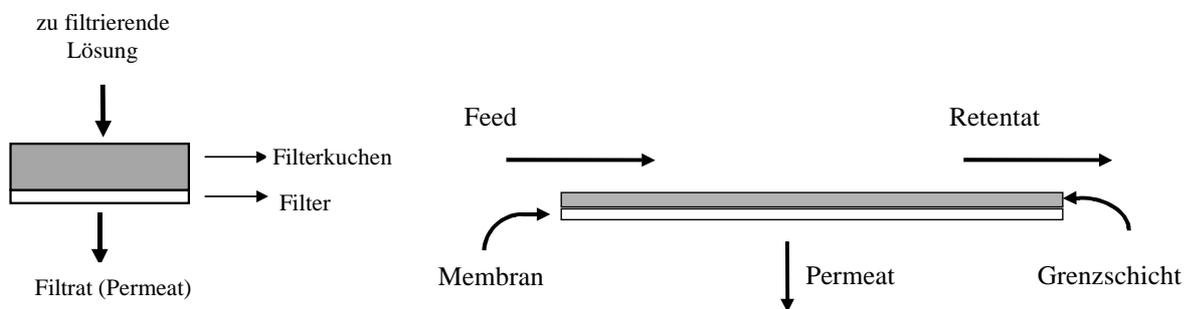


Abb. 5.2.3: Schema der Dead-End-Filtration (links) und der Cross-Flow-Filtration (rechts) [213]

Bei der Dead-End-Filtration fließt der gesamte flüssige Anteil des Feeds durch die Membran. Die ungelösten Bestandteile verbleiben auf der Membran und bilden den Filterkuchen. Da der Filterkuchen mit fortschreitender Filtrationsdauer immer weiter anwächst, steigt der Druckabfall über den Filterkuchen und die Membran an. Wird der Druckabfall zu groß, kann die Feedlösung nicht mehr die Membran passieren und der Fluss kommt zum Erliegen. Daraus ergibt sich, dass Dead-End-Filtrationen nur dann angewendet werden können, wenn Lösungen mit nur geringen Feststoffanteil zu filtrieren sind, oder das zu filtrierende Volumen klein ist. Daher werden diese Art von Filter meistens nur im Laborgebrauch eingesetzt. Im industriellen Betrieb werden sie teilweise als Schutzfilter (z. B. vor Sterilfiltrationen) als Einwegprodukte verwendet.

Das Ausbilden eines Filterkuchen kann durch Anwenden einer Cross-Flow-Filtration vermieden werden. Bei diesem Verfahren verläuft der Feed parallel zur Membranoberfläche. Der tangentielle Strom der Lösung entfernt Partikel, die sich auf der Oberfläche des Filters

anlagern. Auf diese Weise können längere Standzeiten des Filters realisiert werden. In dieser Fahrweise können auch stabilere Permeatflüsse erreicht werden. Cross-Flow-Filtration wird sowohl bei der RO, UF und MF angewendet, wenn Feststoffe im Feed enthalten sind. Von Zeit zu Zeit muss die Oberfläche des Filters gereinigt werden, da Ablagerungen nicht vollständig vermieden werden können. Dieses kann durch den Abfall des Permeatflusses leicht festgestellt werden. Eine Cross-Flow-Anlage bietet verfahrenstechnisch gesehen den großen Vorteil, dass sie sowohl im Batch als auch kontinuierlich betrieben werden kann. Bei der Batchmethode läuft das Retentat aus einem Vorrattank (Feed-Tank) über die Membran und dann zurück in den Tank. Bei der Feed and Bleed Methode läuft das Retentat in einem Kreislauf über der Membran, in den Feed ständig zu- und Retentat ständig abläuft.

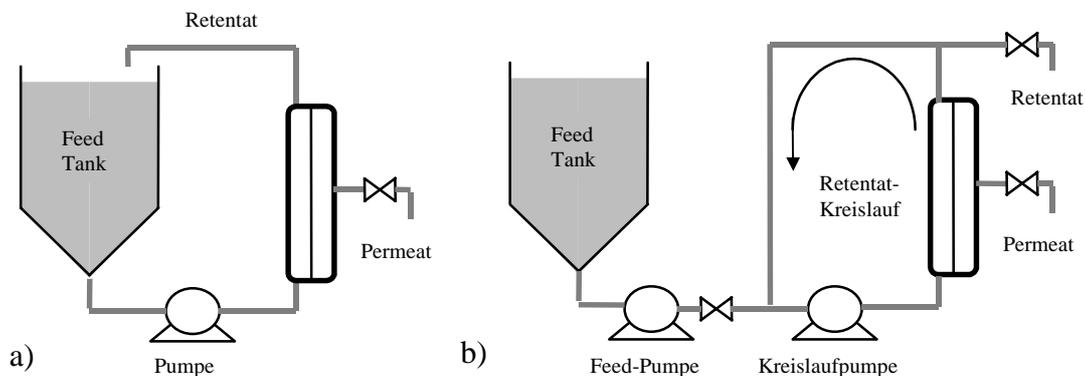


Abb. 5.2.4: Betriebsarten der Cross-Flow-Filtration; a) Batch Methode b) Feed and Bleed Methode [206]

Bei dem Batch Verfahren handelt es sich um eine diskontinuierliche Betriebsart, die vorwiegend im Labor- oder bei Pilotanlagen zum Einsatz kommt, da für sie nur ein geringer apparativer Aufbau notwendig ist. Für einen kontinuierlichen Cross-Flow-Filtrationsprozess wird häufig die Feed and Bleed Methode angewendet. Dabei sorgt die Feed-Pumpe für den Systemdruck (engl. TMP = Trans Membrane Pressure), während die Kreislaufpumpe für die Überströmung zuständig ist. Bei dieser Methode werden allerdings nur geringe Permeatflüsse erzielt. Um hohe Filtrationsleistungen zu ermöglichen, sind daher entweder große Membranflächen erforderlich, oder die Feed and Bleed Methode muss mehrfach hintereinander durchgeführt werden (Multistage Feed and Bleed) [213].

Es existieren für die mathematische Beschreibung der Vorgänge bei Cross-Flow-Filtrationen verschiedenste Modelle [206, 207]. Oftmals beschreiben diese Modelle den Verlauf der Filtration nur sehr ungenau, da eine Berücksichtigung der komplexen Zusammensetzung einer

Feedlösung nur sehr schwer möglich ist. So kann es im Verlaufe der Filtration durch verschiedenste Bestandteile der Feedlösung zu Veränderungen der Membraneigenschaften kommen, die sich erheblich auf die Filtrationsleistung auswirken. Die eigentliche Membran (Primärmembran) ist nur zu Beginn der Filtration für die Charakteristika einer Cross-Flow-Filtration verantwortlich. Kontrolliert wird der Filtrationsvorgang durch die Bildung einer Grenzschicht (oftmals auch als Sekundärmembran oder dynamische Membran bezeichnet). Die Bildung einer Sekundärmembran ist von suspensierten Partikeln (z. B. Lipiden) oder Makromolekülen (z. B. Proteinen) abhängig. Diese interagieren mit der Membranoberfläche und lagern sich dort ab. Mit fortschreitender Dauer der Filtration bestimmt die Sekundärmembran immer mehr den Permeatfluss und das Retentionsverhalten der Membran [214]. Dabei kann der Permeatfluss drastisch abfallen und der TMP stark ansteigen.

Ein Grund für die Ausbildung einer ausgeprägten Sekundärmembran ist ein zu geringer Retentatfluss. Durch Erhöhung des Flusses kann die Grenzschicht verringert werden. Ein weiteres, schwieriger zu lösendes Problem ist die unspezifische, irreversible Wechselwirkung von Proteinen mit dem Membranmaterial. Diese unspezifische Wechselwirkung ist von mehreren Faktoren abhängig:

- Proteine wechselwirken mit allen nassen Oberflächen
- Die Menge der gebundenen Proteine ist abhängig von:
  - Oberflächenladung der Membran
  - Molekulare Interaktionen zwischen Protein und Oberfläche
  - Proteinkonzentration
  - pH und Ionenstärke
  - Membranoberfläche

Durch die unspezifische Wechselwirkung kann es zu einer sehr starken Beladung der Membranen kommen. In der Tabelle 5.2.1 sind die Mengen an unspezifisch gebundenem IgG an verschiedenen Membranmaterialien aufgeführt. Deutlich wird aus der Tabelle, dass die Art des Membranmaterials entscheidenden Einfluss auf die unspezifischen Wechselwirkungen besitzt.

Tab. 5.2.1: Durch unspezifische Wechselwirkungen adsorbierte Menge IgG an verschiedenen Membrantypen

Membranmaterial	Adsorbiertes IgG ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Polyethersulfon	4,7
Cellulosetriacetat	2,7
Hydrosart	2,6

Aus diesen Gründen müssen für eine geplante Anwendung verschiedene Membranmaterialien getestet werden. Eine Vorhersage, welches Material für ein bestimmtes Trennproblem geeignet ist, kann nur durch entsprechende Erfahrungswerte zuverlässig getroffen werden. Eine rein theoretische Vorhersage ist nicht möglich. Eine Cross-Flow-Filtrationsanlage sollte daher möglichst flexibel aufgebaut sein und schnelle Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur oder der Flussrate zulassen.

Neben der Art des Membranmaterials spielt auch die Geometrie der verwendeten Membranmodule eine wichtige Rolle in der Effizienz eines solchen Verfahrens. Unter dem Membranmodul wird die Membran an sich und der Träger, auf dem die Membran aufgebracht ist, verstanden. Ein Träger ist notwendig, um die Membranen gegen Beschädigungen durch die auftretenden Drücke zu schützen. Der Träger muss ebenfalls aus einem porösen Material bestehen und darf die Filtration keinesfalls beeinträchtigen. Man unterscheidet hauptsächlich zwei große Gruppen verschiedener Modultypen. Zum einen sind dies die Plattenmodule und zum anderen tubulär aufgebaute Module. Tubuläre Module werden wiederum in Hohlfasermodule (Abb. 5.2.5) mit einem Faserdurchmesser von 0.001 bis 1.2 mm und in Röhrenmodule mit Durchmessern bis zu 25 mm unterschieden. Darüber hinaus gibt es seit neuerem keramische Module.

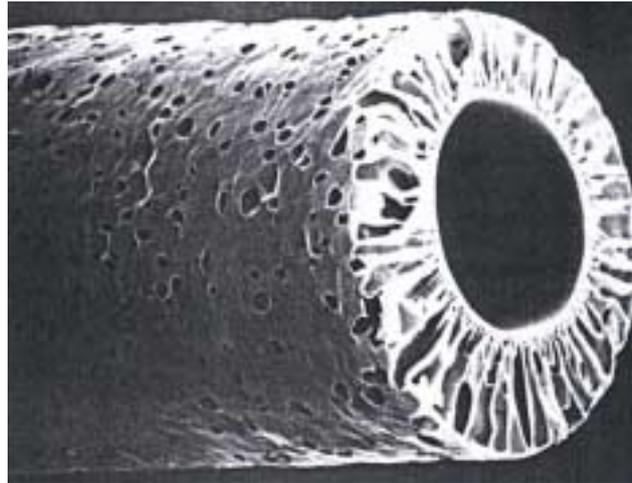


Abb. 5.2.5: Querschnitt durch ein Hohlfasermodul für Cross-Flow-Applikationen [211]

Hat man für ein gegebenes Separationsproblem für ein Protein ein geeignetes Membranmaterial und ein geeignetes Modul ermitteln können, so sollten bei der Auslegung und Dimensionierung der Anlage folgende Punkte beachtet werden:

- Hohe Temperaturen während der Filtration sollten vermieden werden, da es dadurch zum Entfalten und somit zur Denaturierung des Proteins kommen kann.
- Es muss darauf geachtet werden, dass keine Schaumbildung auftritt, da gerade an der Gas/Flüssig-Grenzschicht eine Inaktivierung von Proteinen stattfinden kann.
- Bei der Abtrennung von sehr großen Molekülen bzw. Aggregaten sollten hohe Scherkräfte vermieden werden, da auch diese zur Denaturierung führen können.

Wie bereits weiter oben angesprochen worden ist, werden Cross-Flow-Filtrationen oftmals durch das Fouling der Membran erheblich beeinträchtigt. Das Fouling der Membran verursacht ein Abfallen des Permeatflusses bis hin zum Erliegen des Filtrationsvorganges. Das Fouling kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden:

- Änderung der Membraneigenschaften durch physikalische oder chemische Vorgänge
- Änderung des Feed-Vorganges durch Änderung des Mediums
- Änderung der Oberflächentopographie (Rauheitsgrad der Membran)
- Oberflächenladung der Membran
- Ungünstige Porengröße für das gewählte Filtrationsproblem
- Unspezifische Bindung von Proteinen, Lipiden und Ölen (s.o.)

- Hohe Salzkonzentrationen
- pH
- Temperatur

Wie aus dieser Aufzählung ersehen werden kann, ist neben der möglichst stabilen Operationsweise der Filtrationsanlage deren Reinigung von zentraler Bedeutung. Bei der Reinigung der Membranmodule sollten folgende Punkte Berücksichtigung finden:

- Bei der Reinigung muss auf das eingesetzte Membranmaterial geachtet werden. Einige Materialien wie Celluloseacetat reagieren sehr sensibel gegenüber stark sauren und stark basischen Reinigungsmitteln; andere Materialien wie Polyamide können nicht mit chlorhaltigen Mitteln gereinigt werden.
- Die Reinigungsmittel sollten möglichst mit turbulenter Strömung durch das Modul gepumpt werden, um gebildete Deckschichten weitgehend zu entfernen.
- Die Reinigung sollte bei möglichst hohen Temperaturen erfolgen, da die Reaktionsgeschwindigkeiten mit der Temperatur ansteigen.

Viele Unternehmen bieten heutzutage spezielle Reinigungsmittel für Filtrationsmembranen an (z. B. Ecolab-Klenzage, Henkell, Diversery, Pfizer, Sigma). Weiterhin vertreiben auch einige Membranhersteller ihre eigenen Rezepturen. Generell können die nachfolgenden Empfehlungen zur Membranreinigung gegeben werden [206, 211]:

- Lipide, Öle und Proteine:  
0.5 M NaOH für 30-60 min bei 25 bis 55 °C oder  
0.1% SDS, 0.1% Triton X-100 für 30 min bis 12 h bei 25-55 °C
- Proteine:  
Proteolytische Enzyme für 30 min bis 12 h bei 30-40 °C
- Fette und Öle:  
20-50% Ethanol für 30-60 min bei 25 bis 50 °C
- DNA, mineralische Salze:  
0.1-0.5 M Säure (z. B. Essigsäure, Zitronensäure) für 30-60 min bei 25-35 °C

Durch diese Erläuterung sollte verdeutlicht werden, dass ein scheinbar einfacher Verfahrensschritt bei der Auslegung eines biotechnologischen Prozesses sich als sehr

komplex herausstellen kann. Die Anwendung von Dead-End- und Cross-Flow-Membranverfahren soll nunmehr in Kapitel 5.3 am Beispiel der Proteingewinnung aus Molke erläutert werden.

### 5.3 Gewinnung von hochwertigen Proteinen aus Molke

Wie bereits unter Kapitel 5.2 angedeutet wurde, finden Membranverfahren vielfältige Anwendungen in der Milch- und Molkeverarbeitung. Es wird geschätzt, dass weltweit über 300.000 m<sup>2</sup> Membranfläche in der milchverarbeitenden Industrie eingesetzt werden.

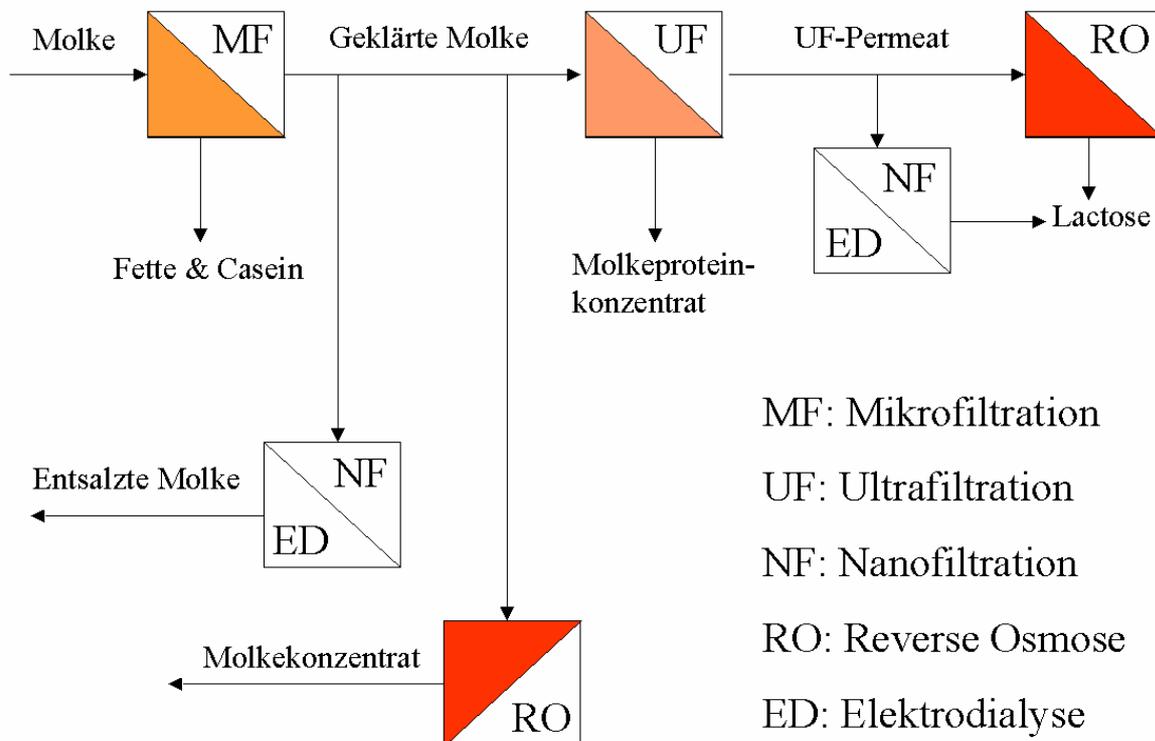


Abb. 5.3.1: Membranverfahren bei der Aufarbeitung von Molke [nach 206]

Der Hauptanteil der Anwendungen liegt im Bereich der UF. So werden die Retentate der UF von Milch zur Käseproduktion oder zur Gewinnung von Milchproteinen eingesetzt. Die UF-Permeate können zur Produktion von Lactose verwendet werden. Im Bereich der Molkeverarbeitung werden verschiedenste Filtrationstechniken zur Gewinnung von Fetten, Caseinen, Molkepulverkonzentraten bis hin zu einzelnen Molkeproteinen in der Industrie angewendet. Einen Überblick bietet die Abbildung 5.3.1.

### 5.3.1 Der Wertstoff Molke

Unter dem Begriff Molke werden die flüssigen Rückstände aus der Casein- und Käseherstellung sowie der Sojaverarbeitung zusammengefasst. Die Molken stellen gelbgrünliche Flüssigkeiten dar, die einen Großteil der Salze, Lactose und der wasserlöslichen Proteine der Milch enthalten [215]. Die Zusammensetzung dieser Molken ist sehr variabel, sie hängt sowohl von der eingesetzten Milch (artspezifisch) als auch von dem Verarbeitungsprozess ab.

Der häufigste Molkentyp ist Süßmolke, die bei der Herstellung von reifen Käsesorten wie Cheddar, Schweizer Käse, Provolone etc. anfällt. Der pH-Wert der Süßmolke liegt nur leicht unterhalb dem der Milch ( $\text{pH} > 5,6$ ). Bei der Herstellung von Hüttenkäse oder bei der Caseingewinnung entsteht Sauermolke ( $\text{pH} < 5,1$ ). Sie stellt mit weniger als 20 Prozent nur einen kleinen Anteil an der Gesamtmolke dar [216]. Bei Molkenkonzentrat handelt es sich um 5-fach aufkonzentrierte Dünnmolke. Molke besteht zu 93,7% aus Wasser. Die restlichen 6,3% Trockenmasse setzen sich wie folgt zusammen:

- |                              |              |
|------------------------------|--------------|
| • Fett                       | 4,1 %        |
| • Caseine                    | 2,7 %        |
| • <b>Molkeproteine</b>       | <b>0,6 %</b> |
| • Lactose                    | 4,7 %        |
| • Asche (anorg. Komponenten) | 0,7 %        |
| • Vitamine, org. Säuren      | ca. 0,1 %    |

Der hohe Wasseranteil und die geringen Proteinkonzentrationen lassen eine wirtschaftliche Nutzung der Molke auf den ersten Blick unrentabel erscheinen. Es muss aber bedacht werden,

dass allein in Deutschland jährlich etwa 10 Millionen Tonnen Molke (1998) anfallen. Die Tendenz ist weiter ansteigend.

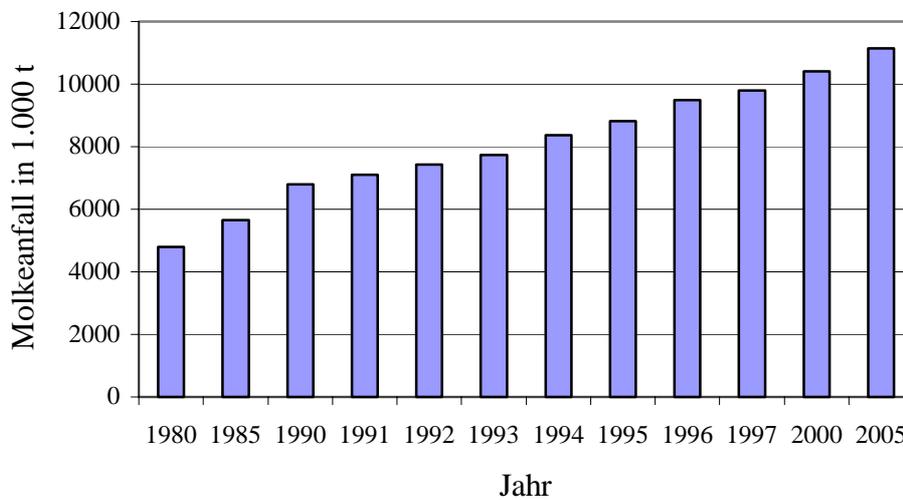


Abb. 5.3.2: Molkeaufkommen in Deutschland [217]

Daraus ergibt sich allein in Deutschland ein Wertschöpfungspotential von ungefähr 600.000 t Protein aus Molke. In der EU fielen 1996 insgesamt 52,69 Millionen Tonnen Molke an. Durch ihren hohen Gehalt an Stickstoff- und Kohlenstoff-Verbindungen ist die Molke eine große Belastung für die biologischen Stufen in den Kläranlagen. Eine Verwertung der Molke ist daher auch aus umweltpolitischen Gründen besonders wichtig.

Seit etwa 30 Jahren findet eine intensive Forschung auf dem Gebiet der Aufarbeitung und der Verwertung von Molke und deren Inhaltsstoffen statt. Pro Jahr erscheinen durchschnittlich 900 Artikel zum Thema der Molkeverarbeitung, die im Dairy Science Index gelistet werden. Die proteinreichen Produkte der Molkeaufarbeitung werden als Molke-Protein-Konzentrate (engl. WPC: Whey Protein Concentrates) bezeichnet. Der Ausdruck Molkeproteine bezieht sich traditionell auf jene Milchproteine, die nach der Fällung der Caseine bei pH 4,6 und 20 °C noch gelöst sind.

Neben der Einbeziehung der Proteine in die Käseherstellung [218] finden Molkenpulver, -konzentrate und -isolate in vielen Nahrungsmitteln Verwendung [219, 220, 221, 222]. Auch für diätische Lebensmittel und Sportlernahrung werden Molkenpräparate verwendet. Durch die Belastung mit Nitrat, welches durch den Käsereiprozess in die Molke eingebracht wird, sind nicht alle Molkepräparate für den Einsatz in diesen Bereichen geeignet. Auf diese

Problematik wird im Kapitel 5.4 detailliert eingegangen. Vorteilhaft ist der hohe Gehalt an essentiellen Aminosäuren in der Molke verglichen mit den Gehalten in anderen Nahrungsmitteln. Bezogen auf die „Proteinwertigkeit“ von Vollei, die mit dem Wert 100 definiert wird, liegt Lactalbumin bei 104, Kuhmilch bei 91 und Casein bei 77. Nahrungsmittel wie Rindfleisch (80), Kartoffel (71) oder Weizen (54) liegen deutlich niedriger. Der hohe Nährwert von Molkeproteinen war daher auch Gegenstand vieler ernährungsphysiologischer Untersuchungen [223]. Nicht weiterbehandeltes Molkepulver dient allerdings nur als Tierfutterzusatz, da der hohe Salz- und Lactosegehalt dieses Produkt als möglichen Zusatz für menschliche Nahrung ungeeignet machen. Um Produkte mit einem breiteren Anwendungsbereich zu erhalten, werden verschiedene Verarbeitungsprozesse angewandt. Dabei kommen neben den bereits erwähnten Membranverfahren (s. Abb. 5.3.1) auch die Gelfiltration und der Ionenaustausch zum Einsatz (Tabelle 5.3.1).

Tab. 5.3.1: Verarbeitungsmethoden für Süßmolke und resultierende Produktzusammensetzung [216]

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

Molke dient weiterhin als Substrat bei der Kultivierung verschiedenster Mikroorganismen. Produkte, die aus der Fermentation mittels Molke gewonnen werden können sind z. B.: Single-Cell-Protein, Fettsäureester, Zitronensäure, Essigsäure, Milchsäure, Ethanol, Glycerin, Butanol (s. Kapitel 3), Aceton, Gluconsäure, Carotinoide, Enzyme, Sterole, Methionin und Vitamin B12.

Die isolierten Proteinfractionen aus Molke finden insbesondere aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften Anwendungen in der Lebensmitteltechnologie. So können durch Molkeproteine die Viskosität, Elastizität oder Wasseradsorption von Lebensmitteln

entscheidend verändert werden. Zum Beispiel kann der Wasseranteil in Lebensmittel erhöht werden, ohne dass sich Beeinträchtigungen in der Konsistenz und somit der sensorischen Eigenschaften ergeben.

Tab. 5.3.2: Einsatzmöglichkeiten von Molkenproteinen in der Lebensmittelindustrie [224]

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

Ein großes Anwendungsgebiet für Molkeproteine ist die teildaptierte Babynahrung. Die Verwendung von Kuhmilch als Ersatz von Muttermilch ist nicht ratsam, da diese sich in ihrer Zusammensetzung erheblich unterscheiden [225]. Um eine ausgewogene Säuglingsnahrung anbieten zu können, muss eine Fraktionierung der Molkeproteine erfolgen. Die fraktionierten Proteine können in neuen Verhältnissen gemischt werden, die an die Verhältnisse in Muttermilch angepasst sind. Die unterschiedliche Zusammensetzung von Human- und Kuhmilch findet sich in der Tabelle 5.3.3. Deutliche Unterschiede zeigen sich z. B. bei dem majoren Protein  $\beta$ -Lactoglobulin und bei dem minoren Protein Lactoferrin.  $\beta$ -Lactoglobulin macht bei der Kuhmilch über 50% des Proteingehaltes aus, in Humanmilch ist es hingegen nicht vertreten. Das für die Eisenversorgung wichtige Lactoferrin (s.Kap. 5.3.2) ist in der Humanmilch deutlich stärker vertreten. Diese Defizite der Kuhmilch können nur dann

ausgeglichen werden, wenn die entsprechenden Komponenten in der Babynahrung an- bzw. abgereicht angeboten werden.

Tab. 5.3.3: Ausgewählte Inhaltstoffe in Human- und Kuhmilch [217]

	Anteil [g/l]	
	Humanmilch	Kuhmilch
Gesamtprotein	9,2	34,1
Casein	2,2	27,0
Molkenproteine	7,0	7,1
$\alpha$ -Lactalbumin	3,3	1,3
$\beta$ -Lactoglobulin	-	3,4
Lactoferrin	1,9	0,1
Serumalbumin	0,4	0,4
Immunglobuline	1,3	0,8
Sonstige	0,1	1,1
Lactose	70	48
Asche	20	70

Wie aus der obigen Tabelle zu ersehen ist, haben den größten Massenanteil bei den Molkeproteinen  $\beta$ -Lactoglobulin,  $\alpha$ -Lactalbumin, Serum Albumin und Immunglobuline. Zu diesen sogenannten majoren Molkeproteinen gehört noch das Proteose-Pepton - ein Protein aus der Fettkügelchenmembran und ein N-terminales Spaltprodukt von  $\beta$ -Casein durch Milch-Endopeptidase [226]. Einige Immunglobuline (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> und IgM) und das Serum Albumin werden nicht in der Milchdrüse produziert, sondern aus dem Blutserum transferiert. Der hohe Anteil von  $\beta$ -Lactoglobulin ist im Hinblick auf die Verwendung der Molkenprodukte problematisch, da  $\beta$ -Lactoglobulin eine hohe Allergenität aufweist. Einige Eigenschaften der wichtigsten Molkeproteine finden sich im Anhang 8.12.

Neben den majoren Molkeproteinen kommen noch eine Vielzahl von minoren Molkeproteinen vor. Während für die erste Gruppe bereits zahlreiche Verfahren zur Auftrennung etabliert sind, ist in dieser zweiten Gruppe von Molkeproteinen die Verfahrenstechnik noch nicht weitläufig etabliert. Aber gerade diese Proteine besitzen

physiologische Eigenschaften, die sie für Anwendungen im Babynahrungsbereich, der Sportlerernährung, der Diätetik und auch der Pharmazie äußerst interessant machen.

Tab. 5.3.4: Ausgewählte minore Molkeproteine [227]

	<b>Konzentration [mg/l]</b>	<b>Anzahl Aminosäuren</b>	<b>Molmasse [kDa]</b>	<b>isoelektrischer Punkt</b>
<b>Lactoferrin</b>	<b>100</b>	<b>708</b>	<b>80,0</b>	<b>8,8</b>
Lactoperoxidase	k. A.	712	80,6	8,6
Transferrin	100	704	76,0	6,7
b <sub>2</sub> -Microglobulin (früher: Lactollin)	4	98	11,6	7,8
Fibronectin	40	2.265	0,3	5,6
<u>F</u> reie <u>s</u> ekretorische <u>K</u> omponenten (FSC)	50	k. A.	k. A.	k. A.
Butyrophilin	k. A.	526	60,0	5,1
Ceruloplasmin	k. A.	1.062	121,4	5,4

Eines von den Eigenschaften her interessantesten Molkeproteine ist das Lactoferrin. Da es neben der Anwendung in Säuglingsnahrung zur Zeit auch für verschiedenste pharmakologische Applikationen getestet wird, verspricht seine Isolierung eine hohe Wertschöpfung. Der Marktpreis für ein Kilogramm Lactoferrin lag 2001 bei ungefähr 500 Euro. Es ergibt sich aus dem Molkeaufkommen Deutschlands eine – rein theoretisch mögliche – Aufarbeitung von 1.000 t Lactoferrin mit einem Marktwert von 5 Mrd. Euro. Diese Wertschöpfung kann selbstverständlich nicht annähernd erreicht werden, da der Marktpreis bei einer solcher Verfügbarkeit von Lactoferrin drastisch einbrechen würde. Aber selbst bei einem Marktpreis von nur 150 Euro und einem Marktvolumen von 100 t Lactoferrin bliebe eine Wertschöpfung von 15 Mio. Euro. Man erkennt leicht, dass eine kostengünstige Aufarbeitung von Lactoferrin aus Molke ökonomisch sinnvoll ist. Daher wird in dieser Arbeit ein neuartiges Verfahren zur Isolation dieses minoren Molkeproteins unter der Anwendung von Membrantechnologien beschrieben.

### 5.3.2 Lactoferrin – Stand der Technik

Lactoferrin (LF) ist ein Glykoprotein aus der Familie der Transferrine. Humanes Lactoferrin wurde zum ersten Mal von Sorensen [228] als „rotes Protein“ vor sechzig Jahren beschrieben und 20 Jahre später durch Johansson [229] aus Muttermilch isoliert. Lactoferrin findet sich in sämtlichen exokrinen Sekreten der Säugetiere wie Speichel, Blutplasma, Augen- und Schleimhaut-Flüssigkeit, hauptsächlich aber in der Muttermilch. Der Gehalt an Lactoferrin ist von der Spezies abhängig. Am höchsten ist seine Konzentration in humaner Muttermilch mit etwa 2 g/l. Während der ersten Tage nach der Geburt beträgt der Lactoferrin-Anteil sogar bis zu 10 g/l [230]. In Kuhmilch sind die Konzentrationen deutlich geringer. Sie liegen hier im Bereich 0,02 – 0,2 g/l [231]. Die Struktur von bovinen Lactoferrin (bLF) ist Ende der neunziger Jahre kristallographisch von Morre [232] aufgeklärt worden. Mittlerweile ist die Aminosäuresequenz von acht verschiedenen Lactoferrinen aufgeklärt worden (Mensch, Kuh, Büffel, Kamel, Ziege, Pferd, Maus und Schwein [233]). Bovines Lactoferrin besteht aus einem 708 Aminosäuren beinhaltenden Monopeptid-Strang, der zu zwei Schleifen (der N- und der C-Schleife) gefaltet ist. An jede dieser zwei Zonen kann ein  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion koordinativ gebunden werden. Die Affinität zum Eisen ist sehr hoch (ca. 250 mal größer als die von Transferrin), und erst bei sehr niedrigen pH-Werten  $< 2$  ist die Bindung reversibel. Beim bLF besteht eine Strukturhomologie von ca. 60 % zum Transferrin und von etwa 95 % zum humanen Lactoferrin. Die Molmasse von Lactoferrin beträgt in etwa 85.000 g/mol (Da) - je nach Eisengehalt und Glykolisierungsgrad. Die Fähigkeit Eisen zu binden, scheint eine der zentralen Aufgaben der Lactoferrine zu sein. Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden aber noch weitere Funktionalitäten von LF entdeckt. Unter anderem wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen festgestellt, dass Lactoferrine

- antibakterielle Wirkung zeigen [234] (im Falle einer bakteriellen Infektion kann bei Säugetieren ein Anstieg der Lactoferrin-Konzentration in der entsprechenden Region beobachtet werden [235]),
- antiviral wirken können [236],
- inhibierenden Einfluss auf die Metastasenbildung bestimmter Krebsarten zeigen [237] (die genaue Wirkungsweise des Proteins ist noch nicht bekannt, fest steht jedoch, dass LF wachstumsstimulierend auf Lymphocyten und Fibroblasten wirkt und somit die körpereigenen Abwehrkräfte steigert [238]),

- eine – bisher noch nicht eindeutig geklärte – Rolle bei neurologischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose spielt [239],
- die Wirkung antifungaler Mittel verbessern können [240] und
- entzündungshemmende Effekte aufweisen [241].

Man vermutet, dass diese immunologischen Effekte der Lactoferrine wahrscheinlich auf zwei Mechanismen beruhen:

- Lactoferrin ist in der Lage große Mengen an Eisen zu binden. Durch diesen Prozess wird das Eisen den Bakterien entzogen, die es für ihr Wachstum benötigen. Somit wirkt LF direkt hemmend auf das Wachstum von Krankheitserregern [242, 243]. Auffällig dabei ist allerdings, dass für den menschlichen Organismus wichtige Mikroorganismen in Mund und Darm nicht im Wachstum beeinträchtigt werden [244]. LF kann aufgrund dieses Effektes zur Regulation der Mund- und Darmflora eingesetzt werden und ist für diese Applikation in Japan bereits auf dem Markt.
- Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass Lactoferrin in der Lage ist, direkt an die Zellwände von verschiedenen Mikroorganismen zu binden. Die Zellwände werden durch diese Anbindung permeabilisiert, was zu einem Absterben der Zellen führt [238, 245].

Klinische Untersuchungen zur Anwendung von Lactoferrin bei den nachfolgenden Krankheiten oder Krankheitserregern laufen zur Zeit oder sind bereits abgeschlossen worden:

- |   |                                  |                         |
|---|----------------------------------|-------------------------|
| • Bronchial-<br>Entzündungen bei<br>Frühgeborenen | • HIV1-Infektionen               | • <i>Candida</i>        |
| • Arthritis                                       | • Rotavirus SA1-<br>Infektionen  | • Dermatophytosis       |
| • HCV-Infektion                                   | • Poliovirus1-<br>Infektionen    | • <i>Staphylococcen</i> |
| • HSV1/HSV2-<br>Infektionen                       | • <i>Helicobacter<br/>pylori</i> | • Salmonellen           |
|   |                                  | • Lungentumore          |
|   |                                  | • Zungenkrebs           |
|   |                                  | • Harnkrebs             |



Bedingt durch diese vielfältigen Applikationen wurden innerhalb der letzten zwanzig Jahre verschiedene Produktionsverfahren für LF beschrieben. Diese kann man in zwei Gruppen unterleiten:

- Klonierung der (humanes) Lactoferrin codierenden Gene in verschiedenste Organismen
- Isolierung und Aufarbeitung aus Milch oder Molke

In der ersten Gruppe ist als prominentester Vertreter sicherlich das Rind „Herman“ zu nennen [249]. Er trägt das Gen für humanes LF in seinem Erbgut. Die Milch seiner weiblichen Nachkommen enthält somit das gewünschte Protein. Des weiteren sind LF codierende Gene in Insektenzellen [250], Pflanzen [251], Hefe [252] und Mäusen [253] kloniert und zur Expression gebracht worden. Rekombinante Proteine sind für Anwendungen in der Medizin sicherlich sehr wertvoll. Im Bereich der Ernährung stellen sie zur Zeit immer noch ein großes Akzeptanzproblem dar. Daher isolieren immer mehr Firmen in Japan, USA und Westeuropa (vor allem in den Benelux-Ländern) das Lactoferrin aus der Molke [254]. In der Literatur sind dabei Verfahren unter der Verwendung von

- Membranfiltration mit Ultrafiltrationsmembranen [255] (die geringe Auflösung bei Membranfiltrationen führt aber nur zu ungenügend reinen Proteinfractionen),
- Anionenaustauschchromatographie [256],
- Kationenaustauscher vom Carboxymethyl-Typ [257],
- Kationenaustauscher vom Sulfopropyl-Typ [258],
- Kationenaustauscher vom Cellulosephosphat-Typ [259],
- Metallaffinitäts-Chromatographie [260],
- Hydrophobe Interaktions-Chromatographie [258],
- Gelfiltrations-Chromatographie [261],
- Affinitäts-Chromatographie mit Heparin [262],
- Affinitäts-Chromatographie mit Ferritin [263],
- Affinitäts-Chromatographie mit Cibacron Blue F3G-A [264],
- Affinitäts-Chromatographie mit DNA modifizierter Agarose [265] und
- Affinitäts-Chromatographie mit monoklonalen Antikörpern gegen Lactoferrin [266]

beschrieben. Es handelt sich dabei nicht nur um bLF-Isolierungen aus Süßmolke, sondern auch um Isolierungen aus anderen Molken (z.B. Sauermolke) oder Milch und um Lactoferrin anderer Spezies (z.B. Human-LF oder Schweine-LF). Die Methoden sind austauschbar, da der isoelektrische Punkt von Lactoferrin bei allen Spezies im basischen Bereich liegt. Dieser hohe isoelektrische Punkt wird auch bei der Isolierung mittels Membranadsorbern [204, 267, 268] ausgenutzt. Auf dieses Verfahren soll nun näher eingegangen werden.

### 5.3.2.1 Membranadsorber als Trenntechnik von Molkeproteinen

Chromatographische Prozesse, bei denen mittels Ionenaustausch, Affinitätsbindung oder Größenausschluss Proteintrennungen über Membranen vorgenommen werden, sind seit Anfang der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts bekannt [269]. Die Verwendung von Membranen als stationäre Matrix bei chromatographischen Prozessen ermöglicht

- geringere Produktionskosten,
- hohe Flüsse, da die Adsorption nicht diffusionslimitiert abläuft (die Austauscherguppen befinden sich direkt auf der Oberfläche der Membran),
- eine einfache Handhabung und
- durch verschiedenste Modulformen ein einfaches Up-Scaling.

Die Steigerung der Effizienz der Auftrennung durch maximalen Durchsatz ist die Grundidee bei der Verwendung von modifizierten, makroporösen Membranen als stationäre Matrix in der Flüssigchromatographie. Makroporöse Membranen können durch chemische Modifizierung verschiedenste Funktionalitäten erhalten. Kommerziell erhältlich sind Ionenaustauschmembrane mit stark sauren Tauscherguppen (Sulfonsäure), schwach sauren Gruppen (Carbonsäuren), stark basischen Tauscherguppen (Quartäres Ammonium) und schwach basischen Gruppen (Diethylamin). Weiterhin erhältlich sind Membranen, die chelatisierende Gruppen wie Iminodiacetat tragen. Diese Membransorber sind in den verschiedensten Bauformen vom Laboreinsatz bis hin zur industriellen Großanlage erhältlich. Zur Isolierung von bLF wurden Membranadsorber der Sartobind<sup>®</sup> Factor-Two Family der Sartorius AG, Göttingen, eingesetzt. Die verwendeten Module bestehen aus einer Sartobind<sup>®</sup> Membran, die gleich einer Papierrolle auf einem zylindrischen Träger aufgewickelt und anschließend verkapselt worden ist. Als funktionelle Gruppen tragen die Membranen

Sulfonsäuregruppen (Kationenaustausch). Erhältlich sind Module mit einer Baugröße von 0.12 m<sup>2</sup> bis 8 m<sup>2</sup>, wobei neben der Membranfläche auch die Anzahl der Membranlagen zwischen 15, 30 oder 60 Lagen variiert werden kann. Die Module werden im Dead-End-Modus von Innen nach Außen durchströmt (s. Abb. 5.3.4). Der innere Zylinder verteilt dabei die Feed-Lösung gleichmäßig auf die Membranoberfläche. Das Permeat wird am unteren Ende des Moduls gesammelt und nach Außen geführt. Für große Anlagen können die Module sowohl parallel als auch in Reihe geschaltet werden.

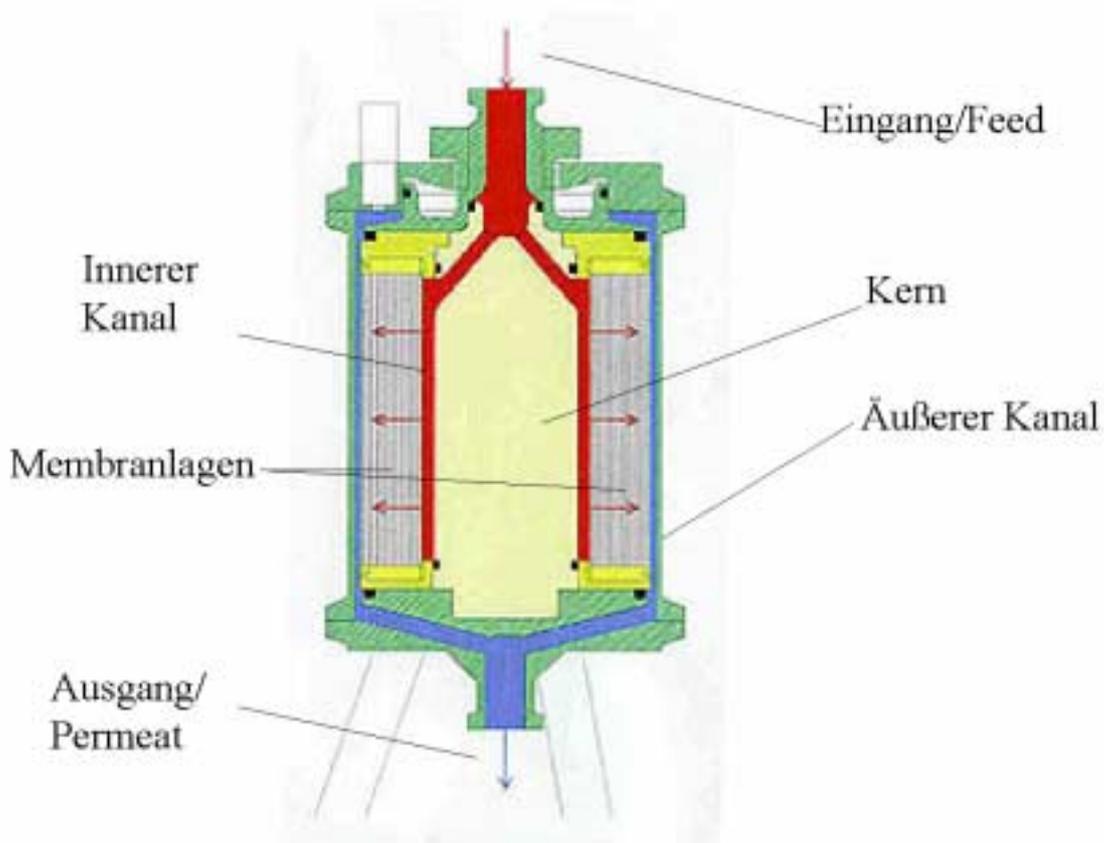


Abb. 5.3.4: Schemazeichnung eines Membranadsorbermoduls der Sartobind<sup>®</sup> Factor-Two Family [Quelle: Sartorius AG]

Die Module können mit sehr hohen Flüssen beladen und eluiert werden, da die Tauschergruppen direkt auf der Oberfläche der Membranporen liegen und die Moleküle nicht erst durch Porendiffusion zu den Bindungsstellen gelangen müssen. Dadurch ergeben sich deutlich kürzere Zykluszeiten als bei herkömmlichen säulenchromatographischen Verfahren. Da die Membranen auch bei höheren Drücken so gut wie keiner Kompression unterliegen und dadurch die Druckverteilung im Inneren des Moduls eine laminare Strömung erreicht wird, ergeben sich schmale Elutionspeaks. Ein weiterer Vorteil der Adsorber ist das „Cleaning-in-

Place (CIP)“, welches die Betriebskosten erniedrigt und die Effizienz dieses Verfahrens in Hinblick auf die Raum-Zeit-Ausbeute im Gegensatz zur Säulenchromatographie verbessert.

Typische Applikationen von Membranadsorbern sind die Aufkonzentrierung von Proteinen oder Antikörpern, die Entfernung von Verunreinigungen wie Endotoxinen oder DNA und die Entfernung von Viren aus pharmazeutischen Präparaten. Gebauer und Kula [269] und andere Autoren [270, 271] beschreiben die Aufarbeitung von Humanem Serum Albumin (HSA) aus Blutserum mittels der Membranadsorbertechnik. Tabelle 5.3.5 zeigt den Vergleich dieses Verfahrens mit einer herkömmlichen Aufreinigung mittels Fast-Flow-Sepharose [272]. Obwohl die dynamische Kapazität der Membranadsorber um den Faktor 10 niedriger ist als das der Fast-Flow-Sepharose, ist das Verfahren um den Faktor 9 effizienter. Dieses liegt an den deutlich kürzeren Zykluszeiten bei der Verwendung von Membranen als stationäre Matrix in der Austauschchromatographie.

Tab. 5.3.5: Aufreinigung von HSA mittels einer Tandem-Membranadsorber-Anlage (kombinierte Anionen- und Kationenaustauschchromatographie) [269]

	<b>Fast flow Sepharose (DEAE/CM)</b>	<b>Sartobind MA550 (Q/S)</b>
Flussrate (mL/min)	2.150	820
<b>Anionenaustausch</b>		
-HSA Produktivität [g/Lh]	26	79
-Zykluszeit [min]	70	5.6
-Druckabfall [bar]	3	0.2
-Ausbeute [%]	99	94
-dyn. Kapazität HSA [g/l]	31	7.5
<b>Kationenaustausch</b>		
-HSA Produktivität [g/lh]	26	40
-Zykluszeit [min]	70	4.5
-Druckabfall [bar]	3	0.2
-Ausbeute [%]	95/97	99/82
-dyn. Kapazität HSA [g/l]	30	3.0

Weitere Proteine für pharmazeutische Anwendungen, die mittels Membranadsorbentechnologie aus Plasma isoliert werden, sind IgG (im Maßstab von 10 t/a), Faktor VIII und Proteaseinhibitoren [273]. Zur Aufarbeitung von Lactoferrin macht man sich den hohen isoelektrischen Punkt des bLF zunutze. Mit einem pI von 8,8 liegt es auch bei hohen pH-Werten kationisch vor. Alle weiteren Molkeproteine mit der Ausnahme der Lactoperoxidase (LP) (pI 8,6) haben deutlich niedrigere pI-Werte und liegen neutral oder anionisch in der Molke vor. Somit kann man bLF und Lactoperoxidase durch einen Kationenaustausch von den restlichen Molkeproteinen abtrennen. Die Gewinnung von Lactoferrin unter Einsatz von Kationenaustauscher-Säulen ist in Japan und den USA bereits großtechnischer Standard. Membranadsorber erlauben im Vergleich zur Säulenchromatographie schnellere Zykluszeiten (s. Tabelle 5.3.5) und somit größere Raum-Zeit-Ausbeuten. Weiterhin ist der Bedarf an Elutions- und Pufferlösungen geringer, was einen weiteren ökonomischen und ökologischen Vorteil mit sich bringt.

Bei dem Einsatz von Membranadsorbern muss in den meisten Fällen vor der eigentlichen Isolierung eine Reinigung des Auftragsmediums erfolgen. Methoden wie Feststoffseparation, Zentrifugation oder auch die Caseinfällung sind aber nur für Forschungszwecke im Labormaßstab sinnvoll. Für den industriellen Bedarf ist der Einsatz einer kontinuierlichen Cross-Flow-Filtration vorzuziehen. Dieses gilt im besonderen bei der Aufreinigung von Molke zur Gewinnung von bLF. Ein direktes Auftragen der Molke auf die Kationentauschermembran ist auf keinen Fall möglich. Dieses würde zum augenblicklichen Verstopfen der Module führen. Daher musste als erster Schritt eine Cross-Flow-Filtration der Molke realisiert werden, die bei sehr geringer Retention von bLF eine gleichbleibende Permeatqualität liefert, die ohne Gefahr der Verblockung auf die Module aufgetragen werden konnte.

### **5.3.2.2 Aufbau einer Technikanlage zur Isolation von bLF aus Molke**

Ein Downstream-Prozess zur Isolation von bLF aus Molke ist aus industrieller Sicht nur dann von Interesse, wenn er neben der ökonomischen Rentabilität die Voraussetzungen erfüllt, dass er

- sich in die bestehenden Prozessabläufe integrieren lässt,

- die Produktivität des Gesamtprozesses in Hinblick auf Lactose, Molkepulver etc. nicht beeinflusst und
- kontinuierlich betrieben werden kann.

Erster Schritt, um diese Bedingungen erfüllen zu können, war die Etablierung einer kontinuierlichen Cross-Flow-Filtration, die die Molke derart aufbereitet, dass das Permeat ohne die Gefahr einer Verblockung auf die Membranadsorber aufgetragen werden kann und alle anderen Prozessströme in die etablierten Molkeaufbereitungsschritte zurückgeführt werden können. Ein solches Prozessschema ist in der Abbildung 5.3.5 wiedergegeben.

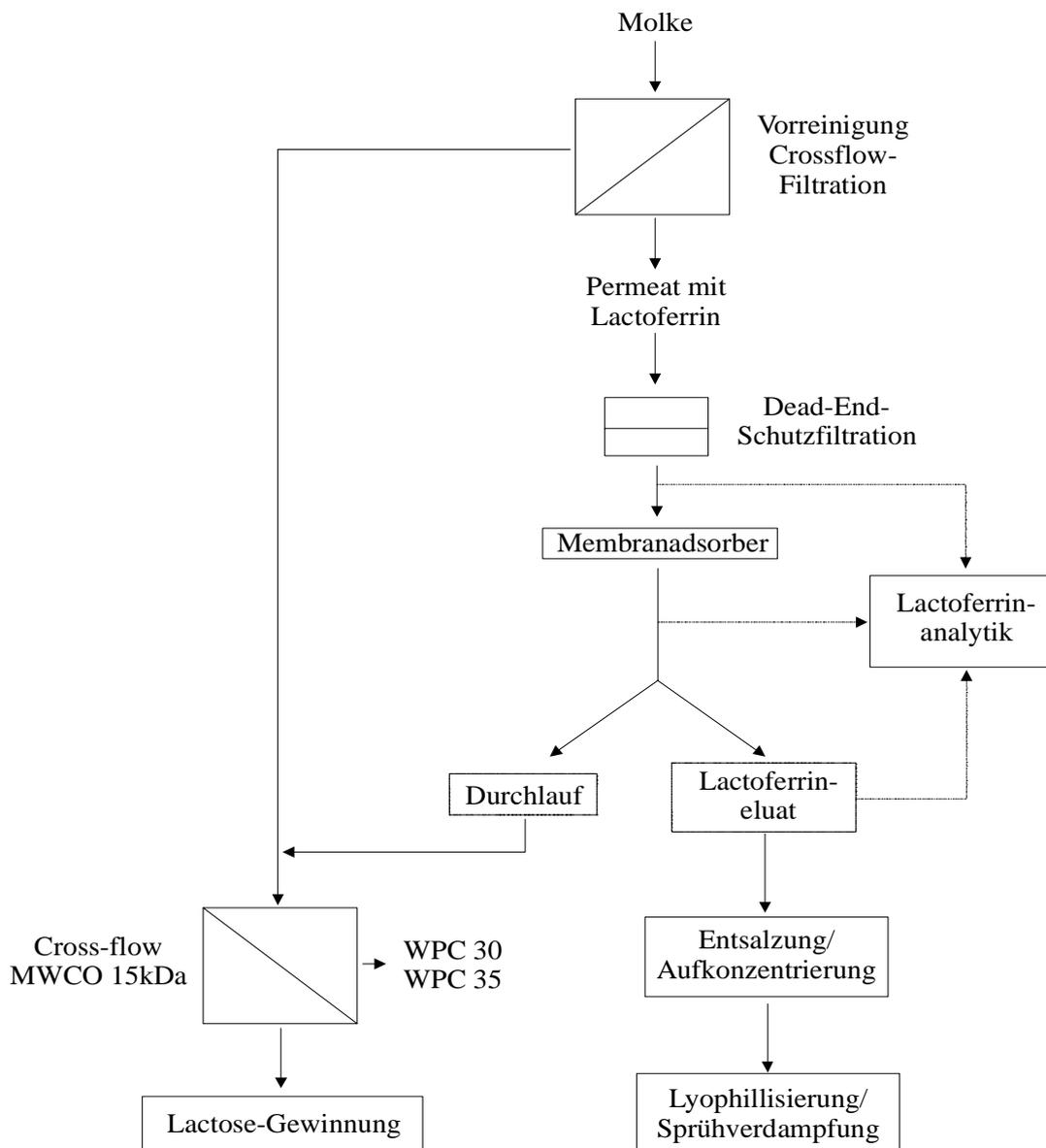


Abb. 5.3.5: Schematische Darstellung der Lactoferrin-Gewinnung [nach 274]

Wie weiter oben beschrieben worden ist, können bei einer Cross-Flow-Filtration verschiedene Betriebsweisen und Modultypen (Platten- oder Rohrmodule) verwendet werden. Zur Aufreinigung der Molke wurden zuerst Plattenmodule in einer Filtrationsanlage der Firma Sartorius AG, Göttingen, eingesetzt. Vom gegebenen Trennproblem her, der Abtrennung von gelösten Proteinen von Schwebstoffen, sollte eine Mikrofiltration durchgeführt werden. Zur Abtrennung eines relativ kleinen Proteins, wie das bLF es mit einer Molmasse von 80 kDa darstellt, sollte es im Prinzip unerheblich sein, welche Porengröße des Mikrofiltrationsbereiches verwendet wird. Die Permeation von bLF sollte sich bei 0,2 µm ähnlich gut verhalten wie bei 1,2 µm. Je geringer die Porengröße, desto eine bessere Qualität des Permeates sollte sich ergeben. Die Qualität des Permeates wurde anhand der Transmission bei 600 nm gegen Wasser bestimmt. Dabei wurde als Mindestgütekriterium eine Transmission von 30 ermittelt [275]. Permeate mit geringerer Transmission können nicht auf die Membranadsorber aufgegeben werden, da es zu Verblockungen des Membranadsorbers führen würde. Das zweite Gütekriterium ist die Permeation des Lactoferrins. Ein besonders klares Permeat kann wirtschaftlich völlig unbrauchbar sein, wenn das bLF im Retentat verbleibt. Hier wurde festgelegt, dass die Permeation bei 90 % liegen sollte. Für eine industrielle Umsetzung der Verfahren müssen weiterhin entsprechend hohe Permeatflüsse bei hoher Überströmung der Membran zu realisieren sein. Dieses ist aber in erster Linie ein Problem des Up-Scalings und wurde daher bei den ersten Versuchen niedriger gewichtet als die beiden ersten Gütekriterien.

Bei der Filtration von realen Medien sind die beschriebenen unspezifischen Wechselwirkungen und die damit verbundene Ausbildung der Sekundärmembran von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der Zusammensetzung des Mediums kann zwar eine gewisse Vorauswahl der Filtermaterialien erfolgen. Die letztendliche Festlegung auf Filtertyp (Modul & Material) kann in der Regel aber nur auf empirischem Wege erfolgen. Aus diesem Grunde wurden für die Abtrennung von bLF aus Molke verschiedenste Membranmaterialien wie Celluloseaccetat (CA) und -nitrat (CN) sowie Hydrosart<sup>®</sup> (HS) getestet. Bei Celluloseacetat und -nitrat handelt es sich um symmetrische Membranen. Hydrosart<sup>®</sup> ist eine asymmetrische Membran, da die eigentliche Membran zusätzlich auf einem Stützvlies aufgebracht ist. Durch diesen Aufbau wird die mechanische Stabilität deutlich erhöht. Weiterhin ist bei diesem Membrantyp die chemische Stabilität gegenüber Lösemitteln, Säuren und Laugen durch Modifikationen der Cellulosematrix verbessert worden. Hydrosart<sup>®</sup> ist stabil im pH-Bereich 1 – 14, allerdings instabil gegenüber oxidierenden Verbindungen.

Für das Membranscreening wurde eine UTMP (Uniform Transmembrane Pressure)-Cross-Flow-Filtration verwendet. Diese Technik wird auch als CPF (Co-current Permeate Flow) oder von Alfa-Laval als Bactocatch bezeichnet. Mit dieser Versuchsanordnung kann der Druck, der sich entlang der Membran aufbaut (TMP), reguliert werden und somit können Fouling-Effekte vermindert werden. Die Abbildung 5.3.6 zeigt den Aufbau einer solchen Filtrationseinheit.

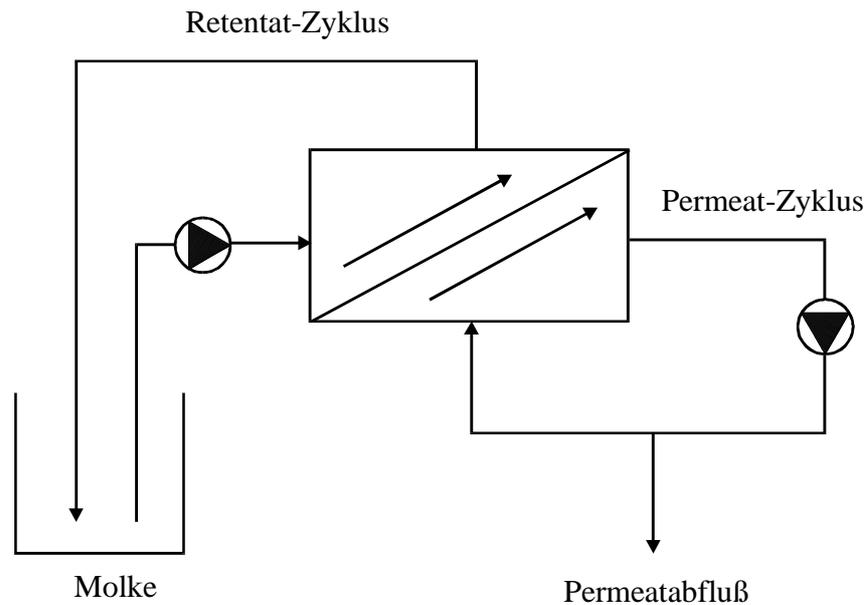


Abb. 5.3.6: Uniform Transmembrane Pressure Cross-Flow-Filtration von Molke [275]

Bei der UTMP-Anordnung wird auch auf der Permeatseite ein Pumpzyklus etabliert und der TMP über die Pumpengeschwindigkeit eingestellt. Während bei der konventionellen Anordnung auf der Retentatseite eine große Druckdifferenz zwischen Ein- und Ausgang besteht, sind die Druckverhältnisse auf der Permeatseite konstant niedrig. Durch diesen Effekt verändert sich der TMP nicht linear entlang der Membran. Am Eingangsbereich des Moduls ist er am größten und führt dort zu frühzeitigen Foulingserscheinungen. Dieses bedingt eine ineffiziente Ausnutzung der gesamten Membranfläche. Dieses kann bei der UTMP-Anordnung weitestgehend vermieden werden. Durch einen Druckabfall auf der Permeatseite wird ein konstanter TMP über die gesamte Membranfläche erzeugt, was ein schnelles Verblocken einzelner Membranflächen verhindert. Ein weiterer Vorteil von UTMP besteht in der Möglichkeit, eine Rückspülung (Backflushing) von Permeat ins Retentat durchzuführen, um die Deckschicht auf der Membran zu vermindern und so längere Standzeiten der Module zu erreichen.

Zur Bewertung unterschiedlicher Membrantypen hinsichtlich der Filtrationsleistung von Molke mussten die Betriebspunkte der Membranen bestimmt werden. Dafür wird das Medium im Recycled Batch-Modus filtriert, d.h. das gewonnene Permeat wird dem System wieder zugeführt, um dessen Zusammensetzung konstant zu halten. Ausgehend von einer hohen Überströmung und einem TMP von Null, also keinem Permeatfluss, wird die Permeatpumpe schrittweise heruntergeregelt und somit ein immer höherer TMP generiert. Vor jeder Neueinstellung des TMP muss das System den Gleichgewichtszustand erreicht haben (ca. 30 min), dann werden TMP und Permeatfluss bestimmt. Durch die Auftragung des TMP gegen den Permeatfluss kann der maximale TMP abgelesen werden, ab dem eine Druckerhöhung keinen Einfluss mehr auf den Permeatfluss hat. Bei diesem Übergang vom druckabhängigen in den druckunabhängigen Filtrationsbereich handelt es sich um Foulingeffekte, die die Membran bei zunehmendem TMP immer mehr verblocken. Die Abbildung 5.3.7 zeigt ein Beispiel eines solchen Verlaufes des Permeatflusses.

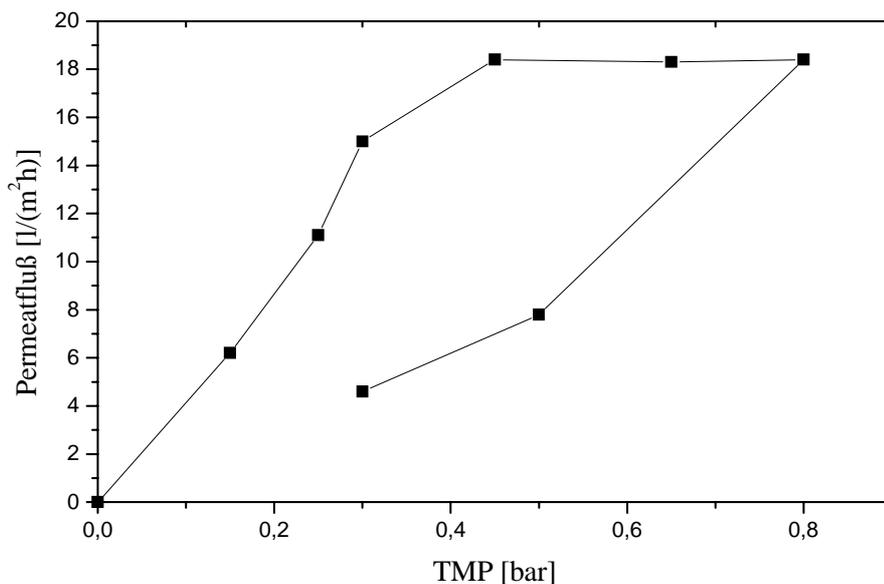


Abb. 5.3.7: Bestimmung der Arbeitspunkte eines Membranmoduls mit der Porengröße 1,2 µm [275]

Bei der eingesetzten Filtrationsapparatur handelte es sich um eine Anlage des Typs Sartocon II der Firma Sartorius. Eine solche Anlage kann mit bis zu zehn Filtrationskassetten bestückt werden. Die Membranen eines solchen Moduls sind abwechselnd mit Spacern fest in die Kassette eingeschweißt. Der Graph zeigt deutlich, dass der Übergang in den

druckunabhängigen Bereich bei einem TMP von ca. 0,4 bar erfolgt. Ein Absenken des TMP nach dem Eintritt in den druckunabhängigen Bereich hat deutlich verminderte Permeatflüsse zur Folge, was auf die aufgebaute Fouling-Schicht zurückzuführen ist. Das Filtrieren mit höheren Transmembrandrücken als 0,4 bar führt also zu vermehrtem Verblocken des Moduls ohne Erhöhung des Permeatflusses und ist somit zu vermeiden. Dieser Arbeitspunkt wurde bei allen getesteten Plattenmodulen gefunden.

Tab. 5.3.6: Einfluss der Porengröße auf die Filtrationsergebnisse (Transmission der Molken 10 – 20 %) [275]

Membrantyp	Filtrationstemperatur [°C]	Retention von bLF [%]	Transmission des Permeates [%]	Mittlerer Permeatfluss [l/(m <sup>2</sup> h)]
HS 1,2 µm	50	< 10	20 – 25	120 – 130
HS 0,8 µm	50	10	25 – 30	50 – 70
HS 1,2 µm	10	< 10	20 – 25	80 – 100
HS 0,8 µm	10	10	25 – 30	40 – 50
CA 0,65 µm	10	20 – 30	50 – 60	30 – 40
HS 0,45 µm	10	45 - 55	75 - 85	25

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, sind die geforderten Gütekriterien (Transmission min. 30%; Retention <10%) bei keiner der eingesetzten Membrantypen zufriedenstellend erfüllt. Auch die Variation der Porengröße oder der Filtrationstemperatur erbrachte keine deutliche Verbesserung. Obwohl die gewählten Porendurchmesser eine vollständige Permeation des bLF erlauben sollten, verbleiben z. B. bei der Verwendung einer 0,45µm HS-Membran 50 % des Lactoferrins im Retentat. Dieses wird durch das Membranfouling verursacht. Es scheint, dass bLF ausgeprägte unspezifische Wechselwirkungen mit der Membranoberfläche eingeht oder das andere Bestandteile der Molke dieses tun und die gebildete Deckschicht eine Permeation des bLF verhindert. Es ist möglich, diese Foulingeffekte durch hohe Scherraten zu minimieren. Dieses kann einerseits durch die Erhöhung der Überströmungsgeschwindigkeit oder andererseits durch Wechsel der Modulgeometrie erfolgen. Bei zu hohen Überströmungsgeschwindigkeiten nimmt die mechanische Belastung der Membranen zu und es kann zum Bruch des Membrangewebes kommen. Aus diesem Grunde wurden Hohlfasermodule für die Molkefiltration getestet. Bei dieser Modulform kann die Molke

ungehindert durch den Kanal fließen (Lumen 1 mm), während in Plattenmodulen die einzelnen Membranen durch Nylonspacer getrennt werden müssen. Dadurch ergeben sich im Kanal wesentlich höhere Scherraten, die den Aufbau einer Deckschicht (Fouling) minimieren. Bei Suspensionen und kolloidalen Lösungen kann zusätzlich ein „turbular pinch effect“ [206] auftreten; dabei bewegen sich die Partikel von der Membranwand weg in die Mitte des Filtrationskanals. Untersuchungen zeigten [275], dass unter identischen Flussbedingungen die Scherrate im Hohlfasermodule um 289% höher liegt als in einem vergleichbaren Plattenmodul. Daher wurde das Membranscreening ausgeweitet. Es sind neben Plattenmodulen mit hohen Scherraten der Firma Danish Separation Systems (DSS) auch Rohr- und Kapillarmodule von ENKA-Microdyn, eine keramische Membran von APV sowie ein Spiralmodul der Firma Koch-Abcor getestet worden. Das Ergebnis dieser Versuche ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 5.3.7: Ergebnisse der Molkenfiltration mit verschiedenen Modulen [204]

	Koch- Abcor	ENKA- Microdyn			DSS			APV
	0,2 µm Spiralm.	0,2 µm Rohr	0,4 µm Kapillar	1,0 µm Rohr	0,1 µm Plattenm	0,2 µm Plattenm	0,45 µm Plattenm	0,8 µm Keramik
<b>Transmission</b> 600 nm	54	80	80	23	70	73	20	70-90
<b>Ret.-fluss</b> [l/h]	1400	1600	560	1350	570	570	570	2000
<b>Perm.-fluss</b> [l/m <sup>2</sup> h]	45	450	200	1150	45	50	90	60
<b>Permeation LF</b> [%]	35	90	55	85	10	0	50 → 0	40 → 0

Die Tabellenwerte zeigen deutlich, dass die Rohrmembran der Firma ENKA-Microdyn mit einer Porengröße von 0,2 µm die besten Ergebnisse liefert: Die Transmission liegt weit über dem Mindestwert von 30, die Permeation von Lactoferrin liegt bei 90 % und der Permeatfluss stabilisiert sich bei 450 l/(m<sup>2</sup>h). Es kommt aufgrund der hohen Überströmung entlang der Membranoberfläche (Überströmung=620 cm/sec, Scherrate=8970 1/cm) zu keinem Fouling; sowohl die Permeation von Lactoferrin als auch der Permeatfluss bleiben über die gesamte Filtrationszeit hinweg konstant. Nachdem sich dieses Modul als zur Molkenfiltration geeignet erwiesen hat, ist ein Upscaling durchgeführt worden. Bei der Filtration von 1000 l Molke ist

ein Modul mit einer Membranfläche von 1 m<sup>2</sup> eingesetzt worden. Den Verlauf der Filtration dokumentiert die folgende Abbildung.

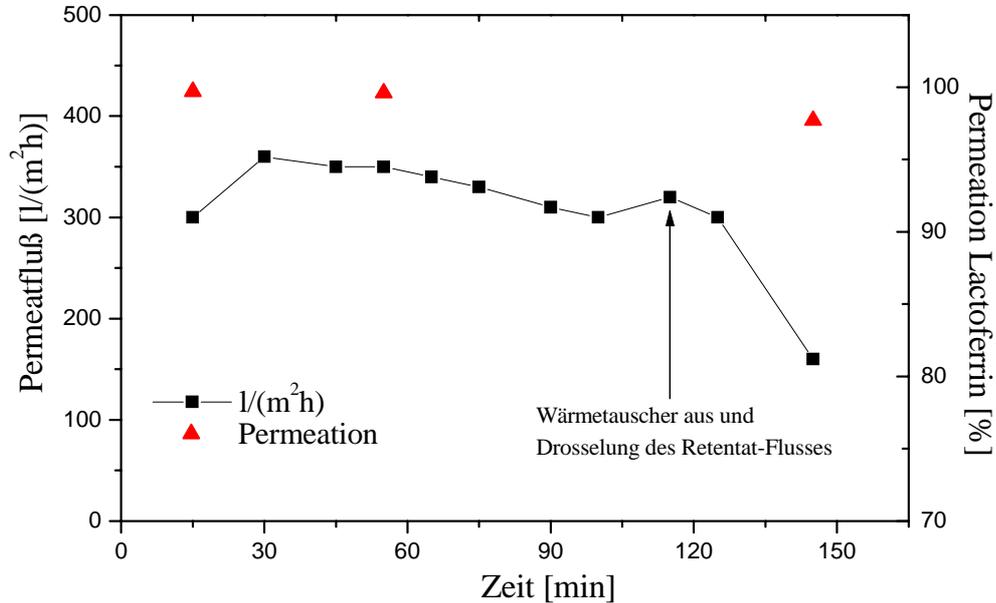


Abb. 5.3.8: Molkenfiltration mit 0,2µm ENKA-Microdyn-Rohrmembran, T=50°C, Membranfläche=1m<sup>2</sup> [276]

Die Permeation von Lactoferrin liegt über die gesamte Filtrationszeit hinweg bei über 95 %, während sich der Permeatfluss bei 300 l/(m<sup>2</sup>h) stabilisiert. Innerhalb der ersten 30 Minuten steigt der Permeatfluss, während das System auf Betriebstemperatur gebracht wurde und nach Abschalten des Wärmetauschers nach 2 Stunden fällt er stark ab. Dieses deutet auf eine Temperaturabhängigkeit des Filtrationsprozesses hin. Mit dem Einsatz des ENKA-Microdyn-Rohrmoduls zur Vorfiltration können große Mengen Molke in kurzer Zeit zur Auftragung auf die Adsorberstufe aufbereitet werden. Die erzielte Filtrationsleistung von 300 l/(m<sup>2</sup>h) liegt um den Faktor drei höher als bei den zuvor eingesetzten Plattenmodulen.

Nachdem das Filtrationsproblem durch den Einsatz des Polypropylen-Rohrmoduls gelöst worden ist, konnte ein weiteres Upscaling durchgeführt werden. Bei der Filtration von 1000 l Dünnmolke ist eine Microdyn-Komplettanlage mit einer Membranfläche von 4 m<sup>2</sup> (4 Module zu je 1 m<sup>2</sup>) in den Versuchsaufbau integriert worden.

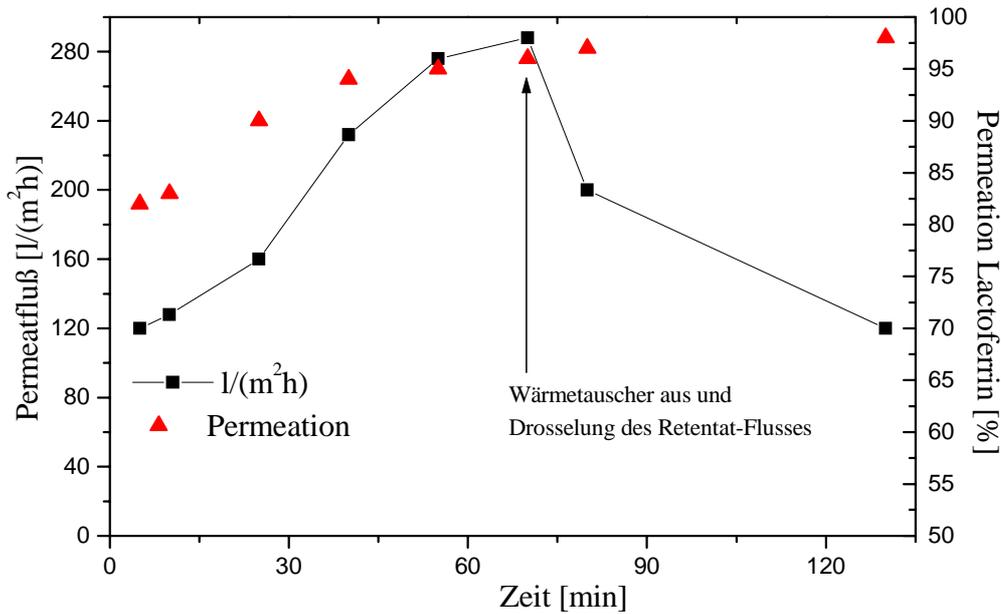


Abb. 5.3.9: Molkenfiltration mit 0,2 µm Microdyn-Rohrmembran, Membranfläche 4 m<sup>2</sup> [276]

Die Permeation von Lactoferrin liegt über die gesamte Filtrationszeit hinweg bei über 80% und steigt im Verlauf des Versuches kontinuierlich auf bis 96 % an. Dieser Anstieg ist dadurch zu erklären, dass der Versuch im recycled-batch-Modus ausgeführt worden ist. Das Retentat wird in den Vorlagebehälter zurückgeführt und die Molke im Verlauf der Filtration aufkonzentriert. Damit steigt auch der Lactoferringehalt im Filtrationsmedium an. Der mittlere Permeatfluss liegt mit 200 l/(m<sup>2</sup>h) unter den Werten, die mit der 1 m<sup>2</sup>-Anlage erzielt wurden. In Abbildung 5.3.9 wird wieder die Temperaturabhängigkeit der Filtrationsleistung deutlich. Fettreste im Filtrationsmedium setzen sich bei tiefen Temperaturen (begonnen wird die Filtration mit Molke bei 10°C) auf der Membranoberfläche ab und verringern sowohl Permeation als auch Permeatfluss. Mit zunehmenden Temperaturen werden diese Fettreste wieder von der Membran gelöst und Fluss und Permeation steigen an. Es zeigt sich aber, dass durch die Verwendung einer ENKA-Microdyn-Rohrmembran ein Permeat erzeugt werden kann, welches die geforderten Gütekriterien erfüllt. Die weitere Aufarbeitung des Permeates mittels Membranadsorber wird nun im Folgenden beschrieben.

Die Kationenaustauscheranlage (Membranadsorber) wurde direkt an die Filtrationsanlage gekoppelt, um die Problematik der Nachtrübung der Permeate, die eine Auftragung auf den Adsorber erschwert oder sogar unmöglich macht, zu umgehen. In Laboratoriumsversuchen

wurden vorab die dynamischen Kapazitäten der verwendeten Module und ein optimales Elutionsprofil zur Trennung der Lactoperoxidase und des bLF erarbeitet. Unabhängig von der Modulgröße wurde eine dynamische Kapazität von  $0,2 \mu\text{g}$  Lactoferrin/ $\text{cm}^2$  ermittelt. Die verwendete Technikumanlage bestand aus insgesamt  $4 \text{ m}^2$  Membranfläche mit einer Gesamtkapazität von  $8 \text{ g}$  Lactoferrin. Die maximal erreichbaren Volumenströme für diese Anlage betragen  $600 \text{ l/h}$ .

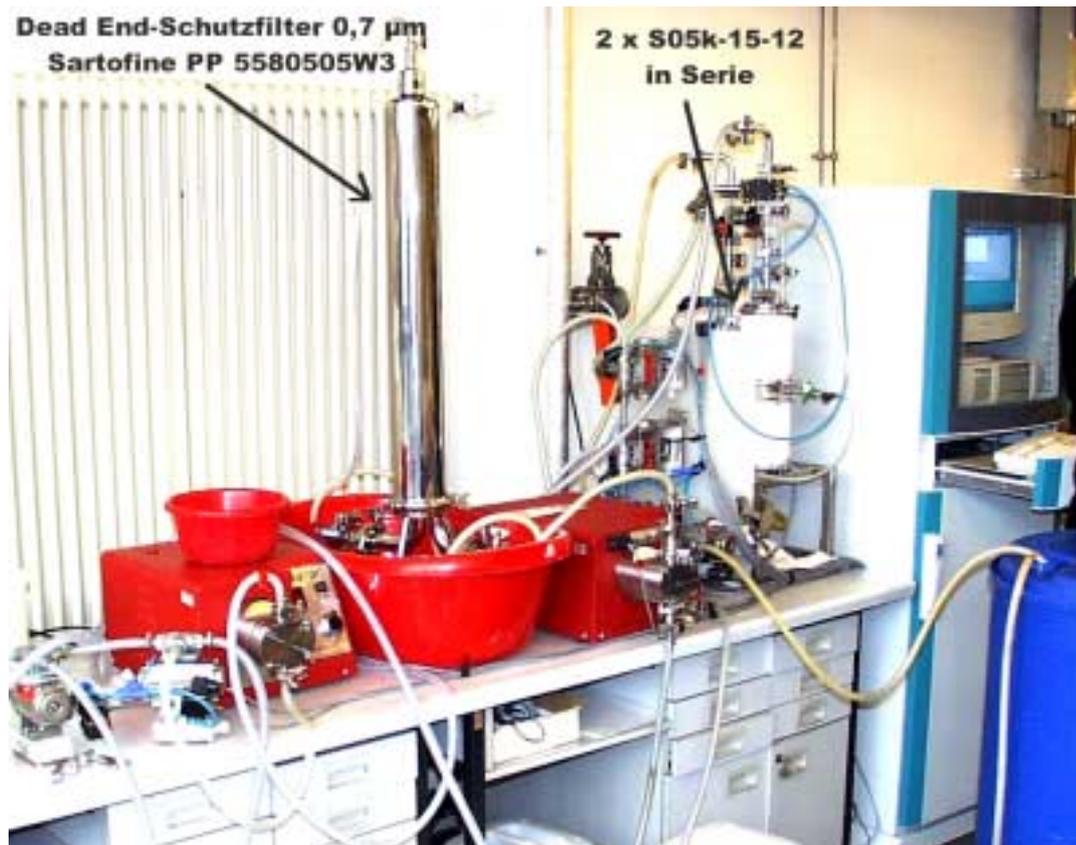


Abb. 5.3.10: Automatisierte Technikumsanlage mit 2 S05k-15-12-Modulen in Serie [276]

Die Anlage ist von der Firma Sartorius AG, Göttingen, automatisiert worden. Die Auftragszyklen wurden zeit- bzw. volumengesteuert programmiert und online via Infrarot- und Leitfähigkeitsmessung verfolgt.

Beim Kationenaustausch werden bLF und Lactoperoxidase gegen Natriumionen in der Molke ausgetauscht und binden so auf der Oberfläche der Membranadsorber. Durch einen NaCl-Gradienten können sie von der Membran eluiert werden. Wichtig ist dabei die Abstufung des Gradienten, um das bLF möglichst vollständig von der Lactoperoxidase abzutrennen. In

Abbildung 5.3.11 sind die Anteile an LP und bLF in den Einzelfractionen bei einer Elution mit einem Stufengradienten (0,2 – 1,0 M NaCl) dargestellt. Über 90 % der LP eluieren bei 0,2 M NaCl. Der Großteil des bLF wird ab einem Gradienten von 0,3 M NaCl eluiert. Ab 0,6 M NaCl können keine LP oder bLF-Anteile mehr in den Fractionen nachgewiesen werden.

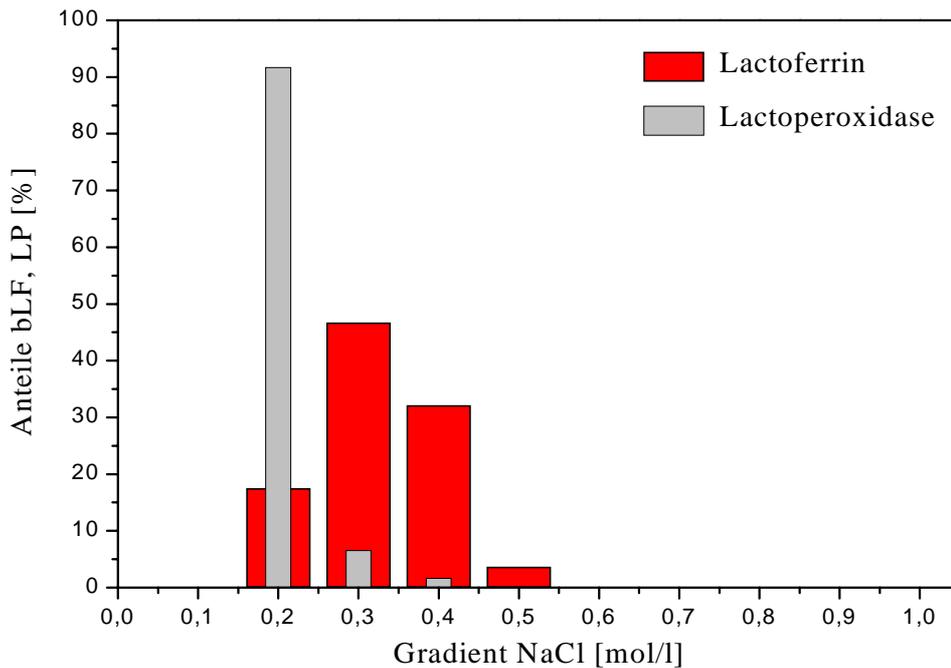


Abb. 5.3.11: Trennung von bLF und LP durch Elution mittels eines NaCl-Gradienten (Kationenaustausch an Sartobind S) [275]

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, tritt bei 0,2 M NaCl bereits eine Elution von ungefähr 15 % an Lactoferrin auf. Daher sollte die Trennung von LP und bLF bis zu einem Gradienten von 0,2 M NaCl abgeschlossen sein, da sonst der Lactoferrinverlust zu groß wird und der Prozess dadurch droht unrentabel zu werden. Der Gradient wurde daraufhin im Bereich bis 0,2 M NaCl näher charakterisiert (Abbildung 5.3.12). Dabei zeigte sich, dass ca. 80 % der LP bis 0,15 M NaCl eluiert werden. Der bLF-Verlust ist mit knapp 5 % sehr klein. In der Lactoferrin-Fraktion (0,2 und 1,0 M NaCl) befinden sich noch etwa 20 % der Lactoperoxidase. Nach Entsalzung und Gefriertrocknung wurden die Auswaagen der Einzelfractionen bestimmt. Der Absolutgehalt der Lactoperoxidase im Lactoferrin liegt demnach unter 5 %, es ergibt sich also eine gute Reinheit des isolierten Lactoferrins (> 95 %).

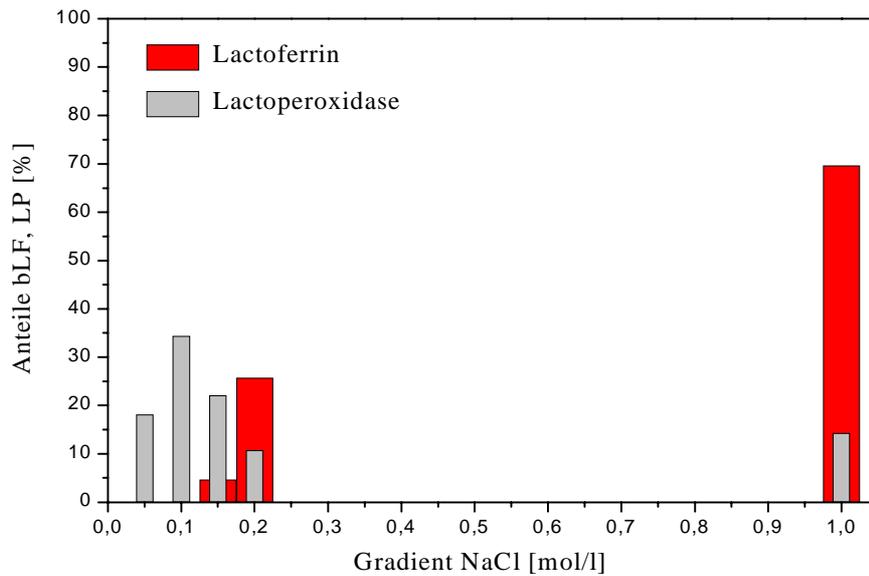


Abb. 5.3.12: Trennung von bLF und LP durch Elution mittels eines NaCl-Gradienten; Optimierung des Gradienten (Kationenaustausch an Sartobind S) [275]

Zur Isolierung des Lactoferrins ist ein Zweistufeneluent (0,15 M NaCl / 1 M NaCl) ausreichend. Ist man bestrebt, die Lactoperoxidase in möglichst reiner Form als Nebenprodukt mit zu isolieren, so ist eine Dreistufenelution notwendig, wie sie in der Abbildung 5.3.13 dargestellt ist.

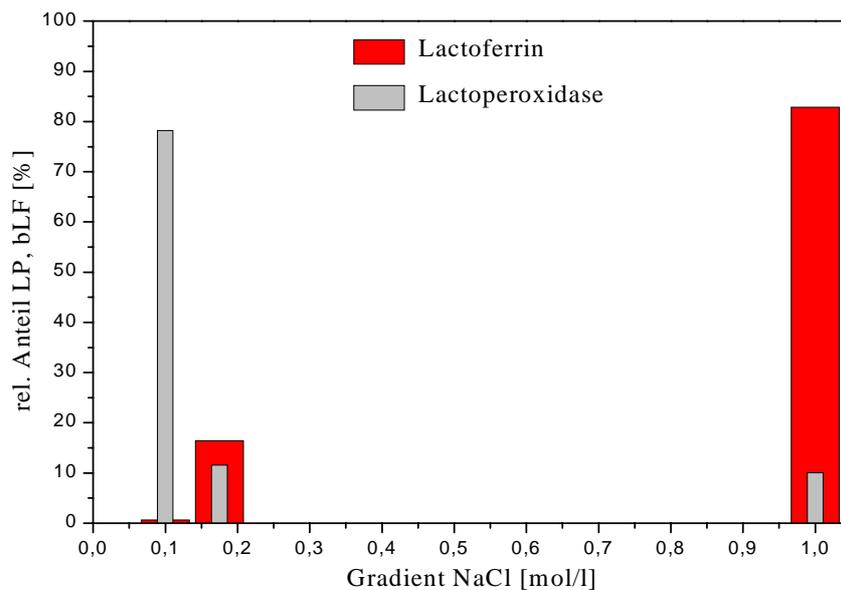


Abb. 5.3.13: Anteile an Lactoferrin und Lactoperoxidase in den Einzelfraktionen in der Dreistufenelution (0,1 M NaCl, 0,175 M NaCl, 1 M NaCl) [275]

Durch das dreistufige Elutionsprofil erhält man bei 0,1 M NaCl eine LP-Fraktion, die nur geringe Anteile an bLF enthält. Des weiteren wird eine Mischfraktion aus LP und bLF bei 0,175 M NaCl erzeugt, die notwendig ist, um hohe Verunreinigungen von LP im bLF zu vermeiden. Bei der Konzentration von 1 M NaCl wird schließlich die Hauptfraktion bLF gewonnen, die nur noch zu 5 % mit LP verunreinigt ist. Die Festlegung der Elutionsgradienten für eine optimale Trennung beider Proteine stellt einen wichtigen Schritt im gesamten Prozess dar. Im abschließenden Down-Streaming kann die Reinheit nur minimal verbessert werden. Die Reinheit des Lactoferrins wird letztlich durch die Wahl des Gradienten bei der Elution vom Membranadsorber bestimmt.

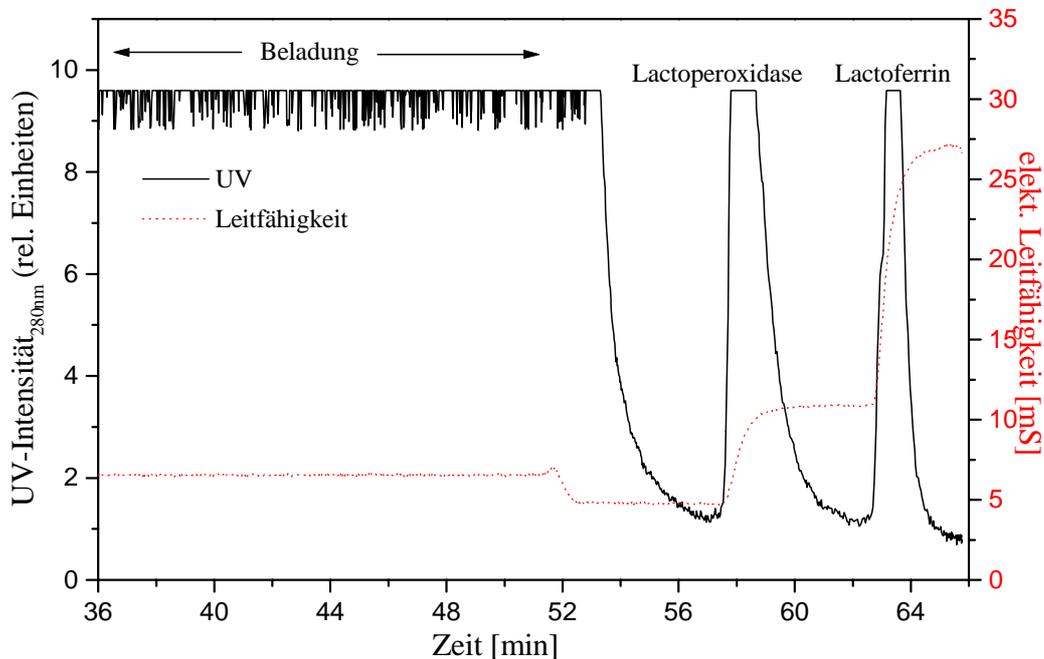


Abb. 5.3.14: Typisches Beladungs- und Elutionsprofil bei der Aufarbeitung von bLF und LP aus Molke (2-stufige Elution) [204]

Entscheidend für die Rentabilität des Prozesses ist neben der Ausbeute sowohl die Laufzeit einer jeden Auftragung als auch die Anzahl der Zyklen, die gefahren werden können, bevor die Adsorberstufe verblockt und einer Reinigung unterzogen werden muss. Die zunehmende Verblockung der Kationenaustauschermembran macht sich am steigenden Gegendruck der Anlage und somit an abnehmenden Flüssen bemerkbar. Die nachstehende Tabelle dokumentiert eine Reihe solcher Auftragungen.

Tab. 5.3.8: Auftragerungen von 690 l Molkenpermeat auf den Kationenaustauscher [276]

Auftragung	Permeat- volumen [l]	Auftragerungs- geschwindigkeit [l/min]	bLF-Gehalt 1M-NaCl-Fraktion		Zykluszeit [min]
			[g]	[%]	
1	90	7.8	6.044	88.95	15,1
2	200	7	7.001	87.51	16,7
3	100	6.5	6.715	88.94	17,8
4	100	6	6.673	88.38	20,2
5	100	5.7	6.152	81.48	23,5
6	100	5.2	5.303	70.24	32,2

Es konnten 6 Zyklen mit Molkenpermeat ohne Reinigungsstufe hintereinander durchgeführt werden. Von Auftragung zu Auftragung muss die Flussgeschwindigkeit gedrosselt werden, da der Gegendruck der Anlage zunimmt. Dadurch verlängern sich die Zykluszeiten kontinuierlich. Die Regeneration der Austauschermembran durch die Elution von Lactoferrin im Salzgradienten ist also nicht vollständig. Nach den ersten vier Auftragerungen sinkt auch die Ausbeute an Lactoferrin. Die Module sind zu diesem Zeitpunkt bereits so stark belegt, dass das Lactoferrin nicht mehr optimal mit den Austauschergruppen der Membranen wechselwirken kann; der Prozess nimmt an Effizienz ab. Spätestens nach der sechsten Auftragung muss somit ein Reinigungszyklus (Natronlauge, Zitronensäure) gefahren werden.

Die Lactoferrin enthaltende Elutionslösung aus der Membranadsorberstufe hat einen Salzgehalt von 1 Mol/l. Das Natriumchlorid muss aus der Proteinlösung entfernt werden, da das Lactoferrin sonst degeneriert und seine biologische Aktivität verliert. Jeder Auftragerungszyklus in der Technikumanlage liefert in etwa 6 l Salzlösung; es fallen also pro Versuchsreihe ca. 30 l zu entsalzende Lactoferrinlösung an. Als hierfür geeignet erwiesen hat sich eine Ultrafiltrationsanlage (LabStak® M20, Danish Separation Systems) mit einer Filtrationsfläche von 0,72 m<sup>2</sup>. Verbunden mit der Entsalzung, die über die Messung der elektrischen Leitfähigkeit verfolgt werden kann, ist eine Aufkonzentrierung der Proteinlösung von 30 l auf 5 l. Die Abbildung 5.3.15 zeigt einen solchen Entsalzungsprozess.

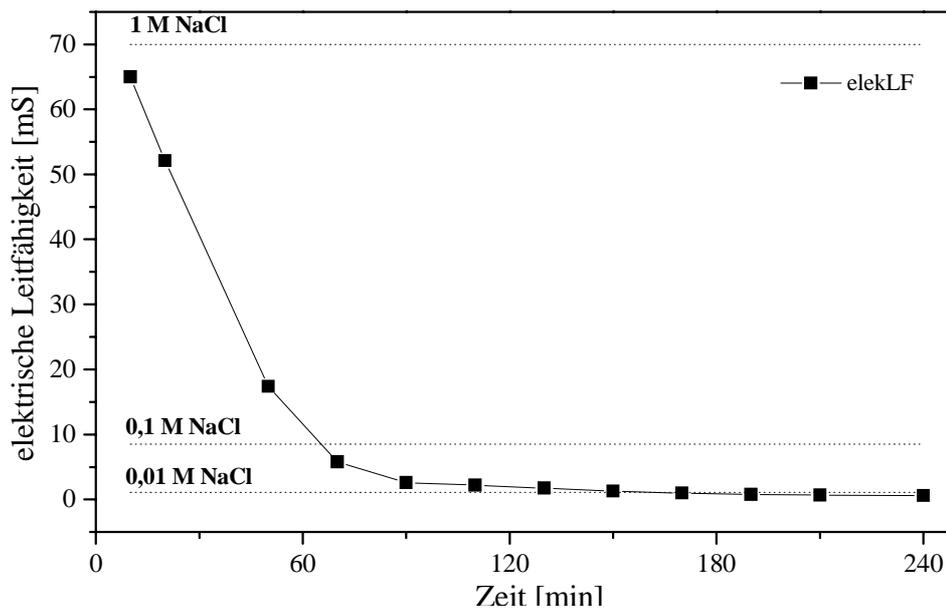


Abb. 5.3.15: Entsalzung der bLF-haltigen Eluate (30 l) mit einer DSS-Ultrafiltrationsanlage,  $A = 0,72 \text{ m}^2$ ,  $\text{MWCO} = 20 \text{ kDa}$  [276]

Nach ca. drei Stunden kann die Ultrafiltration beendet werden. Die erhaltenen 5 l Lactoferrinlösung wurden anschließend mit einem Wickelmodul (Koch-Abcor,  $A = 0,2 \text{ m}^2$ ,  $\text{MWCO} 20 \text{ kDa}$ ) weiter aufkonzentriert und abschließend lyophilisiert. Diese Aufarbeitung ist mit einem 20 %igen Verlust an bLF verbunden. Durch weitergehende Untersuchungen [277], die an dieser Stelle nicht näher dargestellt werden sollen, konnte der Erhalt der biologischen Aktivität des so aufgereinigten bLF sichergestellt werden. Ebenfalls etabliert wurden verschiedene Verfahren zur Kontrolle der Reinheit des Lactoferrins [278, 279], um die Effizienz des Downstream-Prozesses zu überprüfen.

### 5.3.3 Abschätzung der Auslegung eines industriellen Prozesses

Inwieweit sind diese Ergebnisse nun im Sinne einer ökonomischen Verfahrensentwicklung nutzbar? Um eine Abschätzung treffen zu können, wurde basierend auf den erzielten Leistungen der Technikumanlage eine Produktionsanlage für bLF rechnerisch ausgelegt. Die Betrachtungen beziehen sich dabei nur auf den Prozessschritt der Membranadsorber. Die Dimensionierung wurde derart gewählt, dass eine Integration in einen bestehenden Molkeverarbeitungsprozess erfolgen könnte. Die monetären Angaben über Abschreibungen

und Betriebskosten sind in Kooperation mit industriellen Partnern ermittelt worden. Für den Betrieb der Anlage wurden die folgenden Rahmenbedingungen festgelegt:

- Verarbeitungskapazität von Molke: 100.000 t/a
- Betriebsdauer: 20 h/d; 300 d/a
- Jahresproduktion an bLF: 7.140 kg
- Benötigte Membranfläche: 80 m<sup>2</sup>

Will man eine Kostenabschätzung durchführen, so müssen die sogenannten Fixkosten (Anschaffungskosten der Anlage) und die variablen Kosten (Betrieb) der Anlage möglichst genau kalkuliert werden. Diese Kosten sind für die Membranadsorberstufe in Tabelle 5.3.8 aufgelistet.

Tab. 5.3.8: Kostenabschätzung einer industriellen Anlage zur Isolierung von bLF aus Molke mittels Membranadsorbern [280]

<b>Kosten</b>	<b>Betrag p/a [€]</b>
<i>Fixkosten</i>	
Abschreibungskosten, 10% linear über 10 Jahre	51.000
Zinsen für Anschaffung (6-7% von 50% der Anlagenkosten)	15.500
Wartung (2% der Anlagenkosten)	10.500
<b>Summe der Fixkosten</b>	<b>77.000</b>
<i>Variable Kosten</i>	
Membranmodule (Listenpreis)	205.000
Chemikalien (NaCl, Puffer)	175.000
Prozesswasser (4 Euro/m <sup>3</sup> inkl. Abwasser)	77.000
Energie (18.000 kW)	2.500
Reinigung (Natronlauge, Zitronensäure)	76.500
Manpower	76.500
<b>Summe der variablen Kosten</b>	<b>612.000</b>
<b>Gesamtkosten</b>	<b>689.000</b>

Wie aus der Tabelle deutlich wird, überwiegen bei diesem Prozess die variablen Kosten. Für die Membranmodule wurde eine Standzeit von einem Jahr angenommen. In etablierten Anlagen (z. B. für die oben angesprochene Fraktionierung von humanem Serum) können solche Standzeiten problemlos erreicht werden. Hier ergibt sich von den Kosten her gesehen das größte Einsparpotential im Prozess. Je länger die Module eingesetzt werden können, desto geringer fallen die variablen Kosten aus. Die berechneten Chemikalienpreise beruhen auf entsprechenden Listenpreisen für Grundchemikalien. Mit 76.500 Euro stellen die

Reinigungskosten der Membranadsorber einen nicht unbedeutenden Kostenfaktor dar. Wie in der Tabelle 5.3.8 erläutert, muss bei der Technikumanlage nach spätestens sechs Auftragszyklen ein Reinigungszyklus erfolgen. Hier besteht noch ein Optimierungsbedarf, der zu einer Kostenreduktion beitragen könnte. Alle weiteren Prozessschritte dieser Aufreinigungsstufe sind weitestgehend optimiert. Energie- und Wasserkosten können sicherlich nur noch marginal verringert werden. Bezieht man die so berechneten Kosten auf die zu erzielende Menge an Lactoferrin, so ergibt sich ein Preis von 96,50 Euro pro Kilogramm.

Es stellt sich die Frage, ob mit diesen Produktionskosten eine ökonomisch sinnvolle Produktion von bovinen Lactoferrin etabliert werden kann. Fakt ist, dass der derzeitige Marktpreis von bLF mit ca. 500 Euro deutlich über diesem Wert liegt und eine Marge offerieren würde, die einen Gewinn ermöglicht. Die Akzeptanz des Produktes ist vorhanden. So wird insbesondere in Japan Lactoferrin vielfältig in verschiedensten Lebensmitteln und in der Fischzucht eingesetzt. Entsprechende Absatzmärkte in Europa und in den USA befinden sich zur Zeit im Aufbau. Inwieweit der Marktpreis stabil ist und in welchem Ausmaß das neue Produktionsverfahren den Preis beeinflussen könnte, kann hier nicht anhand einfacher Abschätzungen ermittelt werden. Dieses bleibt den Ökonomen überlassen, die sich bereits in einer frühen Entwicklungsphase mit diesem neuartigen Downstream-Prozess beschäftigt haben [281]. Deutlich wird an diesem Beispiel aber, dass Reststoffe der landwirtschaftlichen Verarbeitung äußerst interessante Inhaltsstoffe aufweisen, die nicht nur im Lebensmittelsektor sondern auch im Pharmabereich sinnvolle Anwendungen finden können. Mit Hilfe der Bioverfahrenstechnik kann aus dem Reststoff Molke der Wertstoff Lactoferrin schnell und effizient (80 %ige Ausbeute) isoliert werden, ohne dass die biologische Funktion beeinträchtigt wird. Ein solches Verfahren wäre isoliert gesehen natürlich nicht tragbar. Es kann nur dann zum Erfolg geführt werden, wenn eine reibungslose Integration in die bestehenden Aufarbeitungsprozesse von Molke erfolgen kann. Der in großen Mengen benötigte Rohstoff Molke steht prinzipiell kostenlos zur Verfügung, da alle bisherigen Produkte (z. B. Lactose, WPC) ohne Qualitätsminderung gewonnen werden können. Es ergibt sich somit eine verbesserte Wertschöpfung eines landwirtschaftlichen (nachwachsenden) Rohstoffes.

## 5.4 Nitratentfernung aus Molke

Wie im Kapitel 5.3 beschrieben, finden Molkeproteine vielfältige Anwendungen in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie. Bei verschiedenen Anwendungen, insbesondere bei der Herstellung von Babynahrung oder Süßwaren, liegen die Nitratkonzentrationen in der Molke und den Molkeprodukten zu hoch. Aber auch für andere Molkeerzeugnisse, die im Nahrungsmittelsektor eingesetzt werden (Stichwort Nutraceuticals und Functional Foods) ist ein Label „Nitratfrei“ von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Das Nitrat kommt zu überwiegenden Anteilen aus den Käsereien. Bei der Herstellung von Schnittkäse werden der Käsereimilch bis zu 0,15 g Nitrat pro Liter zugesetzt, um eine Spätblähung zu vermeiden [282]. Durch diese von *Clostridium tyrobutyricum* hervorgerufene unerwünschte Fermentation (Buttersäure-Gärung), wird Milchsäure zu Buttersäure, Essigsäure, Wasserstoff und Kohlendioxid abgebaut. In der Käserei wird das Wachstum von *Clostridium tyrobutyricum* durch Zusatz von Salpeter verhindert. Der große Nachteil dieses Verfahrens liegt bei den daraus resultierenden hohen Nitratgehalten in der als Nebenprodukt anfallenden Molke. In Abhängigkeit vom Käsereiprozess können diese bei etwa 60 mg/l liegen.

Nitrat an sich ist für den Menschen nur von geringer Toxizität. Die Problematik liegt darin, dass es durch bakterielle Reduktion zu Nitrit umgewandelt werden kann, welches gesundheitlich als sehr bedenklich anzusehen ist. Im menschlichen Körper kann Nitrit durch Reaktion mit nitrosierbaren Aminen N-Nitrosamine bilden, die kanzerogen wirken können. Darüber hinaus oxidiert Nitrit Hämoglobin zu Methämoglobin [283]. Bei Erwachsenen wird das gebildete Methämoglobin sehr schnell enzymatisch wieder zu Hämoglobin reduziert. Bei Säuglingen läuft dieser Prozess aber sehr langsam ab, so dass es bei hohen Nitritkonzentrationen zu einer Sauerstoffunterversorgung kommen kann, wenn die Hämoglobinkonzentration zu stark absinkt (Baby Blue Syndrom).

Die Anwendung von natürlichen Zusatzstoffen im Bereich der Lebensmittel (insbesondere Süßwaren und Babynahrung) stellt für die molkeverarbeitende Industrie ein großes wirtschaftliches Potential dar. Insbesondere in einem so sensiblen Bereich wie der Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern werden aber an die Produktqualität verständlicherweise hohe Ansprüche gestellt. So ist eine hohe Produktreinheit nachzuweisen und der Gehalt an den gesundheitlich bedenklichen Substanzen Nitrat und Nitrit meist noch unter den gesetzlich

vorgeschriebenen Grenzwerten zu belegen. Aus Wettbewerbsgründen ist für den EU-Bereich in der EG-Trinkwasser-Richtlinie ein Richtwert von 10 mg/l Nitrat für Mineral- und Tafelwässer festgesetzt worden, die mit dem Zusatz „Zur Zubereitung von Nahrungsmitteln für Säuglinge“ beworben werden. Neben dem Trinkwasser-Grenzwert von 50 mg/l gibt es in der EG-Trinkwasser-Richtlinie noch einen Richtwert von 25 mg/l. Dieser Richtwert basiert auf der Gefahr der Nitrosaminbildung.

Wie beschrieben liegt der Nitratgehalt bei der anfallenden Dünnmolke bei bis zu 60 ppm. In die Verarbeitung gelangt in der Regel aber das Molkekonzentrat (Konzentrierungsfaktor 3 bis 5), welches entsprechend mit bis zu 300 ppm belastet ist. Um die Verwendung dieses Rohstoffes zur Produktion von Babynahrung zu ermöglichen, ist eine Abreicherung des Nitratgehaltes auf unter 10 ppm von großer Bedeutung. Mit den in der Milchindustrie vorhandenen Techniken der Ionenaustauschchromatographie ist aber nur eine Abreicherung auf unter 50 ppm möglich. Um hier neue Märkte für Molkeprodukte wie beispielsweise Lactose, die über energiearme Verfahrensschritte wie die Filtration und die Chromatographie gewonnen werden, zu eröffnen, ist eine innovative Verfahrensentwicklung zur Absenkung des Nitratgehaltes unter 10 ppm notwendig.

#### 5.4.1 Stand der Forschung bei der Nitratentfernung

Die Entfernung von Nitrat aus den verschiedensten Matrices ist seit langem Gegenstand der Forschung, da die oben beschriebene Problematik in Hinblick auf die menschliche Gesundheit früh erkannt worden ist. So ist die Zahl der Veröffentlichung seit Jahren auf einem sehr hohem Niveau (ca. 300 p. a.).

Tab. 5.4.1: Anzahl der Veröffentlichungen zum Thema „Nitratbreicherung“

Jahr	1977-1981	1982 – 1986	1987 – 1991	1992 – 1996	1997	1998	1999
Anzahl der Veröffentlichungen	512	526	572	603	314	299	303

Am häufigsten werden chromatographische Verfahren unter Anwendung der Anionenaustausch-Chromatographie für die Nitratentfernung aus Flüssigkeiten eingesetzt [284, 285, 286, 287, 288]. Im Anionenaustauschverfahren werden Nitrat- und Sulfat-Ionen mittels stark basischer Anionenaustauscherharze gegen Chlorid- oder Hydrogencarbonat-Ionen ausgetauscht. Nach Erschöpfung der Kapazität des Austauschers muss dieser mit konzentrierten Lösungen von Kochsalz bzw. Natron regeneriert werden, was zu hohen Salzfrachten führt, die entsorgt werden müssen. Es wurde aber auch schon Meerwasser als alternativer Eluent ins Gespräch gebracht [289]. In der Trinkwasseraufbereitung ist der Ionenaustausch ein etablierter Prozess. Im Jahr 1992 waren allein in den Vereinigten Staaten 15 großtechnische Anlagen im Betrieb. Neben den chromatographischen Verfahren mit Anionenaustauscherharzen werden auch Verfahren bei der Wasserbehandlung eingesetzt, die mit Hilfe von Zeolithen Nitrat spezifisch binden können [290, 291].

Weitere Verfahren, die bei der Nitratentfernung aus Rohwässern eingesetzt werden, sind die Umkehrosmose, bei der das Rohwasser unter hohem Druck durch semipermeable Membranwände gepresst wird, und die Elektrodialyse [292]. Bei der Elektrodialyse wandern die gelösten Ionen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes durch Ionenaustauschermembranen. Möglich ist auch die chemische Denitrifizierung. Diese erfolgt durch Zugabe eines 15fachen Überschusses von Eisen(II)hydroxid. Nitrat wird dabei zu Ammoniak reduziert, welches durch Einblasen von Luft entfernt werden muss. Bei dem Verfahren entstehen große Mengen Eisenschlamm, dessen Entfernung Probleme bereitet. Bei dem Verfahren der katalytischen Denitrifizierung reduzieren Palladium/Aluminium-Katalysatoren das Nitrat in Gegenwart von Wasserstoff zu Stickstoff und Ammoniak. Das Verfahren befindet sich allerdings noch im Entwicklungsstadium und über die Langzeitstabilität der Katalysatoren ist noch wenig bekannt. Die Anwendbarkeit dieser Verfahren auf Molke ist problematisch, da auch die in der Molke enthaltenen Proteine teilweise abgetrennt werden würden bzw. es zur Verblockung der eingesetzten Membranen kommen könnte (s. Kap. 5.3.2.1). Zudem handelt es sich um sehr kostenintensive Verfahren, die bisher auch in der Abwasseraufbereitung keine großtechnische Anwendungen finden.

Die biologische Denitrifikation ist weit verbreitet in der Abwasseraufbereitung in Kläranlagen. Nitrat wird hier unter anaeroben Bedingungen von denitrifizierenden Bakterienmischkulturen über mehrere Zwischenstufen zu elementarem Stickstoff reduziert. Die Umsetzung dieser Technologie zur Trinkwasseraufbereitung erfolgt allerdings nur zögernd,

da Bedenken bezüglich der Kontaminierung des Trinkwassers mit Bakterien oder organischen Rückständen bestehen. Seit ca. 15 Jahren werden in Europa einige Testanlagen auch großtechnischen Maßstabs betrieben, in denen die Mikroorganismen in Festbettreaktoren eingesetzt werden. Die Mikroorganismen wachsen dabei z. B. auf Styroporkugeln oder Aktivkohle. Darüber hinaus finden Verfahren unter Verwendung immobilisierter Enzymsysteme [293] zum Abbau von Nitrat zu Stickstoff Anwendung.

Eine Kombination von Ionenaustausch und biologischer Denitrifikation umgeht die Hauptnachteile der beiden einzelnen Verfahren (Salzfrachten und Kontamination) [294, 295, 296, 297]. Durch die mikrobielle Behandlung des Eluenten aus dem Ionenaustauschverfahren kommt das behandelte Wasser nicht direkt mit den Mikroorganismen in Kontakt. In Versuchen konnte zudem eine 95 %ige Reduktion der zu entsorgenden Salzlauge erreicht werden. Es wurden dabei Salzkonzentrationen von 10 bis 30 g/l verwendet. Das kombinierte Verfahren zur Trinkwasseraufbereitung soll zur Zeit in den USA in einer mobilen Testanlage verwirklicht werden. Eine großtechnische Anwendung ist momentan allerdings nicht vorhanden. Ein solcher Kombinationsprozess ist bereits in Molke mit der Beschränkung eingesetzt worden sind, dass in dem beschriebenen Prozess Nitrit erzeugt wurde [298], welches bedeutend giftiger für den Menschen ist als Nitrat.

Ein neuer Ansatzpunkt ist die Kombination von Ionenaustausch und katalytischer Denitrifikation [289]. Der Eluent aus dem Ionenaustausch mit einer maximalen Salzkonzentration von 10 g/l wird in einem mit Pd-Cu/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Katalysator gefüllten Festbettreaktor denitrifiziert. Dieses Verfahren wurde bisher nur im Labormaßstab durchgeführt.

Der Großteil der Verfahren wird somit zur Abreicherung von Nitrat in Trink- oder Abwasser eingesetzt. Nur wenige Veröffentlichungen beschäftigen sich mit anderen Materialien wie Spinat [299], Fruchtsäften [300] und Gemüsebreien [301]. Ein japanisches Patent [302] beschreibt die Nitratbreicherung in Futtermitteln und pflanzlichen Nahrungsmitteln. Bei diesem Verfahren werden die Lebensmittel direkt mit Hefen des Typs *Pichia* versetzt, was zu einer Entfernung des Nitrats führt. Mehrere Veröffentlichungen [303, 304, 305, 306, 307, 308, 309] der Arbeitsgruppe von Professor Schubert, Karlsruhe, beschäftigen sich mit dem Nitratabbau in flüssigen Lebensmitteln. In diesen Artikeln wird die Nitratreduktion mittels *Paracoccus denitrificans* DSM 65 beschrieben. Die meisten beschriebenen Experimente

wurden dabei allerdings nicht in flüssigen Lebensmitteln, sondern in Modelllösungen, die neben Kaliumnitrat noch Phosphat-Puffer sowie Glucose bzw. Zucker-Mischungen enthielten, durchgeführt. Wurden reale Lebensmittel verwendet, so handelte es sich in der Regel um Karottensaft-Ultrafiltrat. Von Schubert et al. wurden unter anderem zwei Methoden untersucht, um Biokatalysator und Fluid zu trennen:

- die Immobilisierung mittels Geleinschluß und
- die Verwendung von Kapillarmembran-Reaktoren.

Beide Verfahren sind zur Nitratbereicherung in Modelllösungen und Karottensaft-Ultrafiltrat im Labormaßstab geeignet, die Übertragbarkeit auf Molkekonzentrat im technischen Maßstab ist aber wohl nicht zu realisieren. Ein Problem besteht darin, dass direkt im Lebensmittel biologisch denitrifiziert wird, in diesem also anaerobe Bedingungen vorliegen müssen. Dieses dürfte bei den zu behandelnden Mengen (alleine die Fa. Biolac verarbeitet ca. 800 Millionen Liter Molke pro Jahr) eine sehr schwer zu gewährleistende Voraussetzung sein.

#### **5.4.2 Grundidee des neuen Verfahrens zur Nitratbereicherung in Molke**

Dem Verfahren lag die Idee zugrunde, ein gekoppeltes chromatographisch-biologisches Verfahren aufzubauen, in dem das Nitrat möglichst ohne anfallende Abwässer zu Stickstoff umgesetzt wird und das die entsprechenden Volumina eines molkeverarbeitenden Betriebes bewältigen kann. Dazu sollte im ersten Schritt ein chromatographisches Verfahren entwickelt werden, welches spezifisch das Nitrat aus der Molke über einen Anionenaustausch entfernt. Bei diesem Prozess sollte die Matrix „Molke“ nicht weiter verändert werden. Das gebundene Nitrat sollte anschließend über einen Kochsalzgradienten vom chromatographischen Material eluiert und später mittels denitrifizierenden Bakterien zu Stickstoff abgebaut werden. Der so gereinigte Eluent sollte wiederverwendbar sein. Es ergibt sich somit ein Gesamtverfahren, bei dem Nitrat aus Molkekonzentrat zu Stickstoff abgebaut wird, ohne dabei große Mengen an Abwasser und Salzfrachten zu produzieren (s. Abb. 5.4.1).

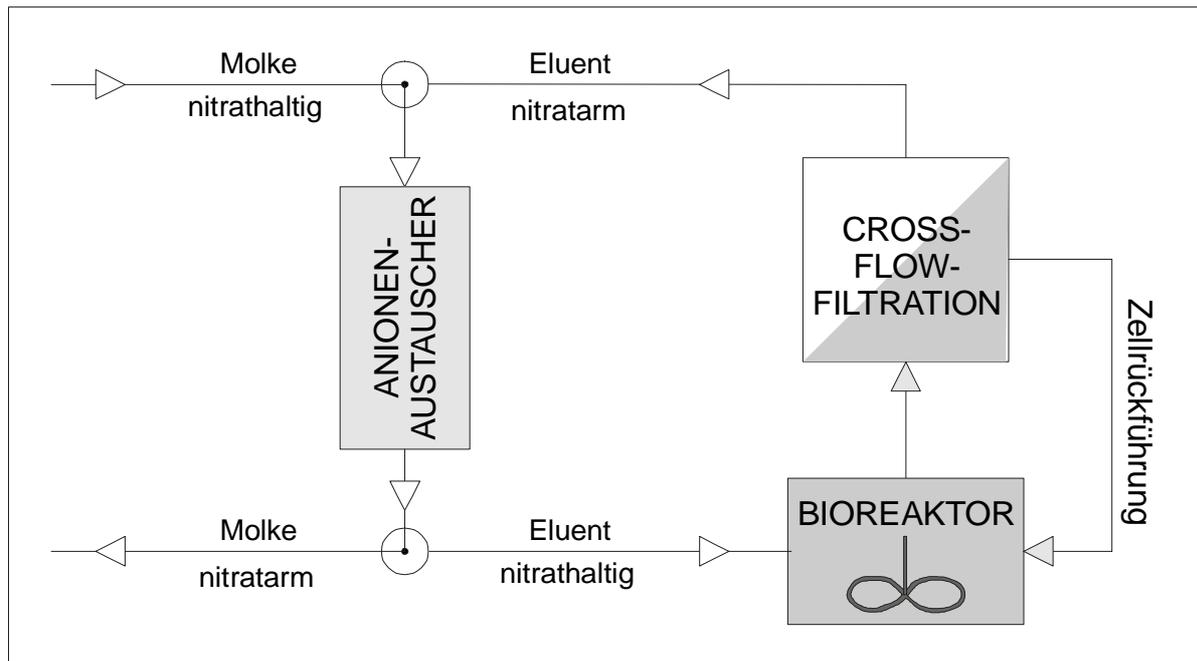


Abb. 5.4.1: Schematische Darstellung der Kombination von Anionenaustausch und Denitrifikation zur Nitratentfernung aus Molke

Eine derartige Kombination ist in der Literatur für die Nitratentfernung aus Grundwasser für prinzipiell durchführbar befunden worden [310]. Das Problem eines solchen Verfahrens liegt darin begründet, dass die biologische Denitrifizierung im Eluenten des Anionenaustauschers erfolgen muss. Dieser Eluent enthält hohe Konzentrationen an Natriumchlorid, damit für die Elution des Nitrates ein möglichst geringes Elutionsvolumen benötigt wird. Diese hohen Salzkonzentration üben aber einen großen Einfluss auf die Aktivität der verwendeten Mikroorganismen der biologischen Stufe aus. Dinçer und Kargi [311] konnten an Mischkulturen denitrifizierender Mikroorganismen zeigen, dass bei der Denitrifikation ein Effektivitätsverlust von 70 % hervorgerufen wird, wenn die NaCl-Konzentration 50 g/l beträgt. Ähnliche Aussagen treffen Yang, Nitorisavut und Wu [312]. Sie beobachteten in kontinuierlichen Versuchen mit immobilisierten Mischkulturen einen Rückgang des Nitratabbaus um knapp 40 %, wenn die Konzentration an Natriumchlorid von 10 auf 30 g/l erhöht wurde. Zum Aufbau eines kombinierten Prozesses zur Nitratentfernung muss somit ein Kompromiss bezüglich der Salzkonzentration im Eluenten getroffen werden. Auf der einen Seite muss eine effiziente Regeneration des verwendeten Harzes möglich sein, auf der anderen Seite sollten die denitrifizierenden Bakterien möglichst wenig in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden.

Wie geschildert besteht die erste Stufe der Denitrifizierung aus einem Anionenaustausch. Bei diesem Verfahren werden kugelförmige Austauscherharze von 0,5 – 1 mm Durchmesser verwendet, die mit Chlorid oder Hydrogencarbonat beladen sind. Im vorliegenden Fall werden Harze eingesetzt, die mit Chlorid beladen sind. Dieses Chlorid wird beim Chromatographieprozessprozess gegen Nitrat ausgetauscht. Harze für Anionenaustauschverfahren unterteilen sich in stark basische und schwach basische Anionenaustauscher. Die stark basischen Harze enthalten quartäre Amine als Austauschergruppen und sind im Gegensatz zu schwach basischen Anionenaustauschern auch bei  $\text{pH} > 7$  einsetzbar. Die schwach basischen Harze tragen primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppen, welche im sauren Milieu eingesetzt werden können [313]. Bei herkömmlichen stark basischen Anionenaustauschern nimmt die Affinität in der Reihenfolge

Sulfat > Nitrat > Chlorid > Hydrogencarbonat

ab. Durch Modifikation der Austauschergruppen (Einfügen längerer Kohlenstoffketten an den quartären Aminen) kann die Affinität zu Nitrat erhöht werden, so dass dieses gegenüber Sulfat bevorzugt gebunden wird. In der vorliegenden Arbeit werden derart modifizierte Harze verschiedener Anwender eingesetzt.

Die zweite Stufe der Nitratentfernung aus Molke soll über denitrifizierende Bakterien ablaufen. Hierzu werden Mikroorganismen benötigt, die in der Lage sind, bei Abwesenheit von Sauerstoff andere anorganische Elektronenakzeptoren wie zum Beispiel Nitrat für ihre Energiegewinnung zu nutzen [314]. Diese Anforderung erfüllen die Stämme *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thiobacillus denitrificans* oder der hier verwendete *Paracoccus denitrificans* [315]. Der enzymatisch ablaufende Prozess der Denitrifikation, bei dem Elektronen von einem geeigneten Donor auf den Nitrat-Stickstoff übertragen werden, läuft über verschiedene Zwischenstufen ab. Der Nitrat-Stickstoff wird dabei über Nitrit, NO und  $\text{N}_2\text{O}$  bis zum molekularen Stickstoff reduziert [316, 317]. In Abbildung 5.4.2 sind schematisch die Schritte der Denitrifikation durch *P. denitrificans* mit den daran beteiligten Enzymen dargestellt.

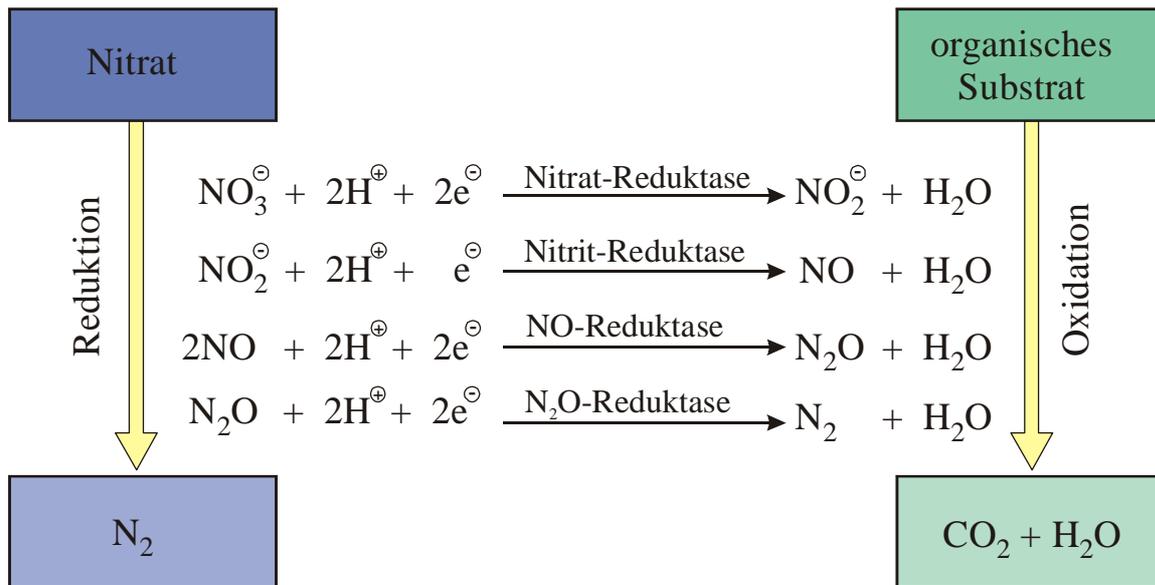
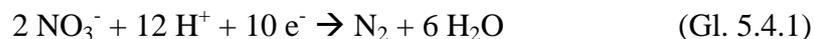


Abb. 5.4.2: Schematischer Verlauf der mikrobiellen Nitratreduktion

Aus den Reaktionsgleichungen für die Teilschritte ergibt sich als Gesamtgleichung für die Reduktion von Nitrat zu elementarem Stickstoff die Gleichung 5.4.1.



Bei der biologische Denitrifikation muss dringend darauf geachtet werden, dass es nicht zu einer Anreicherung des sehr viel giftigeren Nitrits kommt. Zu so einer Anreicherung kann es unter ungünstigen Reaktionsbedingungen kommen. Entscheidenden Einfluss hierauf hat der pH-Wert [318]. Zu einer pH-Wertänderung kann es während der Denitrifizierung kommen, wenn die Reaktionslösung über nur eine geringe Pufferkapazität und der Prozess über keine pH-Regelung verfügt, da pro Mol umgesetztes Nitrat sechs Mol Protonen verbraucht werden.

#### 5.4.2.1 Aufbau und Optimierung der chromatographische Stufe

Molke und insbesondere Molkekonzentrat sind viskose Flüssigkeiten mit einem hohen Feststoffanteil (Lactose). Aufgrund dieser Eigenschaft kann es bei säulenchromatographischen Verfahren sehr schnell zu Verblockungen und somit zum Erliegen des Flusses durch die Säule kommen. Um dieses Problem zu mindestens in der Anfangsphase der Verfahrensentwicklung zu umgehen, wurden die Voruntersuchungen in

einer dafür konstruierten Rührkesselkaskade durchgeführt [319]. Die Kaskade besteht aus vier gerührten Kesseln mit jeweils ca. 140 ml Reaktorvolumen. Alle Kessel sind temperierbar und werden aus einem ebenfalls temperierbaren Vorlagegefäß befüllt. Zudem besteht bei allen Kesseln sowohl am Zulauf als auch am Ablauf die Möglichkeit einer Probennahme. Das Chromatographiematerial wird über Siebböden (Maschenweite 0,40 mm) in den Reaktoren zurückgehalten. Die Rotoren sind so gestaltet, dass sie auf die Harzpartikel möglichst geringe Scherkräfte ausüben und einen Abrieb der Teilchen verhindern.

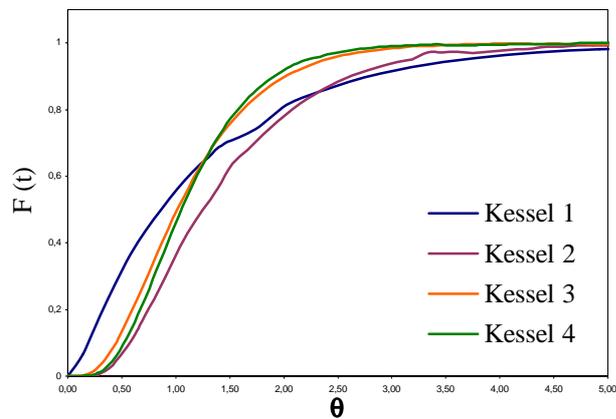


Abb. 5.4.3:  
Rührkesselkaskade zur Nitratbereicherung in Molke;  
Links: Photographie des Reaktorsystems; Oben:  $F(\theta)$ -  
Funktion der Rührkesselkaskade,  
Rührgeschwindigkeit  $210 \text{ min}^{-1}$ , RT [319]

Bevor Absorptionsversuche von Nitrat aus Molke in der Kaskade durchgeführt wurden, sind Versuche zur Charakterisierung der Kaskade unternommen worden. Dieses wurde durchgeführt um auszuschließen, dass Störungen (Totwasserzonen; Bypässe) das Absorptionsverhalten der eingesetzten Harze beeinträchtigen. Hierzu wurden nach Befüllung der Reaktoren mit jeweils 15 g eines Anionenaustauschers (Purolite A-520 E) Leitfähigkeitsmessungen an den Abläufen der Kessel bei Aufgabe einer Sprungfunktion durchgeführt. Über dieses Verfahren lässt sich die Verweilzeit-Summenfunktion  $F(t)$  direkt

durch die Messwerte bestimmen. Die Verweilzeit-Summenfunktion ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Volumenelement, welches zum Zeitpunkt  $t=0$  in den Reaktor eingespeist wurde, diesen innerhalb eines Zeitraumes zwischen 0 und  $t$  wieder verlassen hat [320]. Abbildung 5.4.3 zeigt die  $F(\theta)$ -Funktionen der einzelnen Reaktoren. Bei einer Kaskade aus idealen Rührkesseln sollte der Verlauf der  $F(t)$ -Kurve mit steigender Kesselzahl später und steiler ansteigen. In der Abbildung ist zu erkennen, dass dieses für die Kessel 1, 3 und 4 zutrifft, während der Kurvenverlauf des zweiten Kessel vom erwarteten Verlauf etwas abweicht. Um die Auswirkung dieser Abweichung besser quantifizieren zu können, wurde das Verweilzeitspektrum  $E(\Theta)$  der Kaskade mit dem theoretisch berechneten Verweilzeitspektrum einer entsprechenden 4-stufigen idealen Rührkesselkaskade verglichen (Abb. 5.4.4).

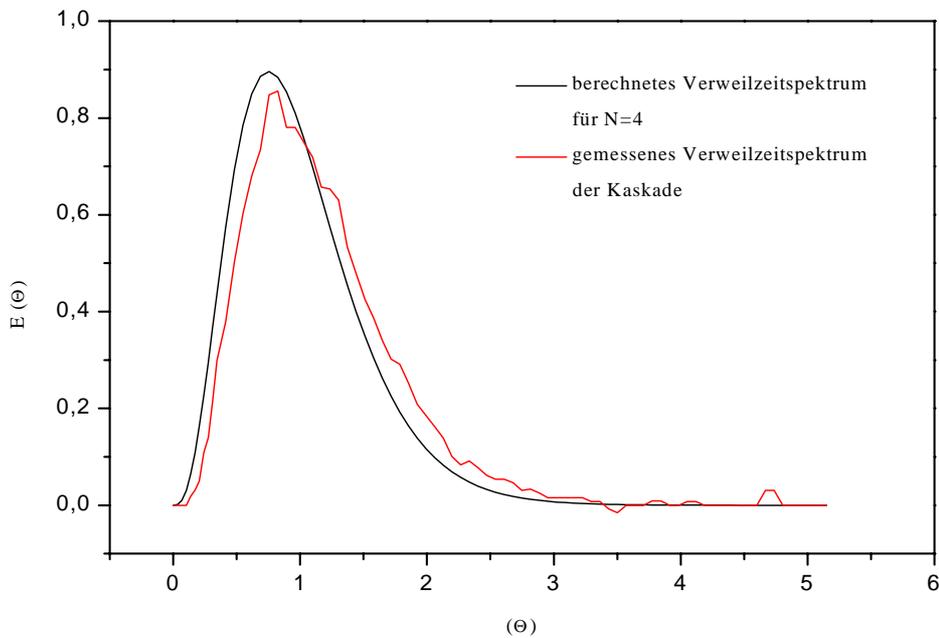


Abb. 5.4.4: Vergleich des berechneten und des gemessenen Verweilzeitspektrums der Kaskade

Das berechnete Verweilzeitspektrum wurde nach der Formel

$$E(t/\tau) = (N/(N-1)!) \cdot e^{-Nt/\tau} \cdot (Nt/\tau)^{N-1} \quad (\text{Gl. 5.4.2})$$

mit  $\tau$ : hydrodynamische Verweilzeit       $N$ : Anzahl der Kessel (hier 4)       $\Theta = t/\tau$

bestimmt. Die Funktion des Verweilzeitspektrums ist eine Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Volumenelement, welches im Zeitpunkt  $t=0$  in das Reaktorsystem eingetreten ist, dieses im

Zeitintervall zwischen  $t$  und  $t+dt$  wieder verlässt. Es lässt sich erkennen, dass das Verweilzeitenspektrum der gesamten Kaskade nicht sonderlich stark von der berechneten Kurve abweicht. Die Kurve ist leicht zu höheren  $\Theta$  verschoben, was dafür spricht, dass die mittlere Verweilzeit über der hydrodynamischen Verweilzeit liegt. Die hydrodynamische Verweilzeit der Kaskade berechnet sich nach

$$\tau = \frac{V}{\dot{V}} = 14,56 \text{ min} \quad (\text{Gl. 5.4.3})$$

Aus der ermittelten Verweilzeit-Summenfunktion  $F(t)$  lässt sich über Gleichung 5.4.4 die tatsächliche mittlere Verweilzeit der Reaktorkaskade berechnen.

$$\tau = \int_0^1 t dF(t) = 16,91 \text{ min} \quad (\text{Gl. 5.4.4})$$

Die tatsächliche mittlere Verweilzeit ist somit zu höheren Verweilzeiten verschoben (+13,9%). Ein solches Verhalten ist für ein reales System akzeptabel. Die Störung scheint hauptsächlich durch den Reaktor Nummer 2 verursacht zu werden, dessen mittlere Verweilzeit um 68,2% über der hydrodynamischen Verweilzeit liegt. Insgesamt lässt sich aus den erzielten Daten aber erkennen, dass in der Rührkesselkaskade eine ausreichende Durchmischung und Durchströmung stattfindet und somit das Adsorptionsverhalten der Harze nicht durch das Auftreten von Totwasserzonen oder Bypässen in der Summe stark beeinträchtigt wird.

Zur Ermittlung geeigneter stark basischer Anionenaustauscherharze wurden verschiedene Harzproben im Batch-Versuch mit nitrathaltiger Molke versetzt und die Abreicherung bestimmt. Wie aus Abbildung 5.4.5 zur erkennen ist, lieferten von den untersuchten Austauscherharzen die Produkte der Firma Purolite und der Firma Sybron (Ionac-Harze) die besten Ergebnisse. Im Falle von Purolite A520E wurde eine Beladung von  $3,5 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{g}_{\text{Harz}}$  erreicht, mit Ionac SR7  $4,45 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{g}_{\text{Harz}}$ . Bei diesen beiden Harzen handelt es sich um speziell für die Nitratbreicherung entwickelte Systeme.

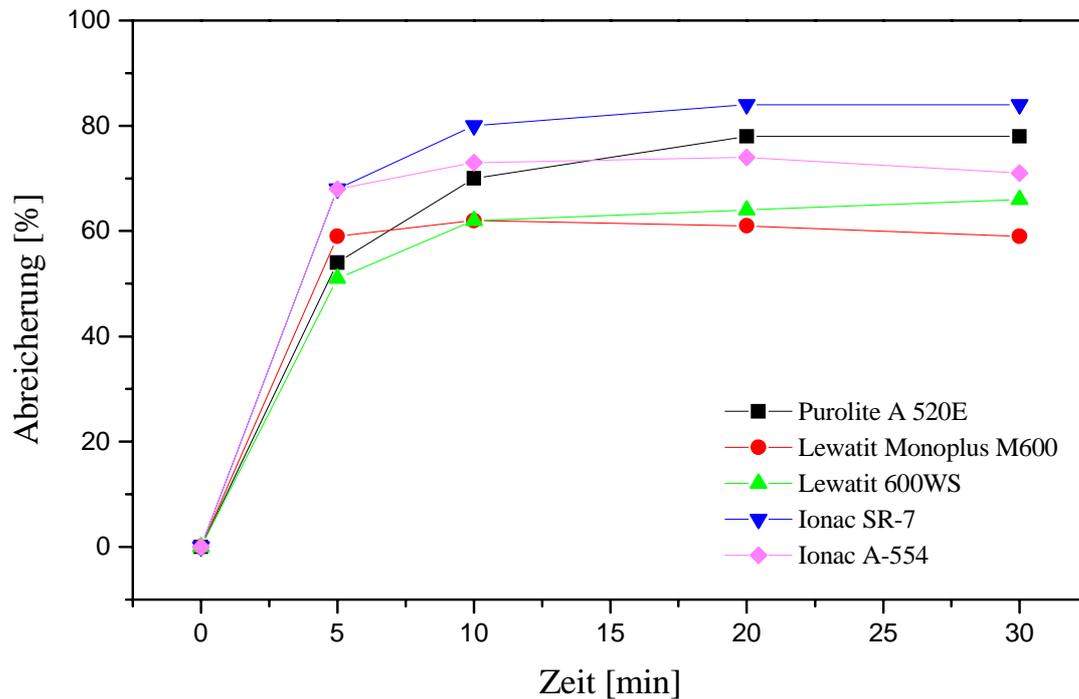


Abb. 5.4.5: Versuche zur Bestimmung eines geeigneten Austauschharzes, 150 ml Molke, Ausgangskonzentration 90 – 106 ppm Nitrat, RT [319]

Aufgrund der höheren mechanischen Stabilität wurde das Harz Purolite A 520 E ausgewählt. Im Gegensatz zur sonst üblichen Anionenaustauschreaktion bei der Vollentsalzung (z. B. von Trinkwasser), bei der die Anionen gegen Hydroxidionen ausgetauscht werden, findet bei dem stark basischen Purolite-Harz ein Neutralaustausch statt. Die gesundheitlich bedenklichen Nitrationen werden gegen unbedenkliche Chloridionen ausgetauscht. Die maximale Austauschgeschwindigkeit des Harzes für das vorliegende System wurde zu  $3,1 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/(\text{min g}_{\text{Harz}})$  bestimmt. Die Totalkapazität wird vom Hersteller mit mindestens  $1 \text{ eq/l}_{\text{Harz}}$  angegeben. Somit errechnet sich die Totalkapazität im Falle des Austausches von Nitrat zu  $62 \text{ g}_{\text{Nitrat}}/\text{l}_{\text{Harz}}$  bzw.  $57 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{g}_{\text{Harz}}$  (die Dichte des Harzes beträgt  $1,08 \text{ g/ml}$ ). Da Purolite A 520 E zur Wasseraufbereitung hergestellt wird, liegen für die nutzbare Arbeitskapazität (NVK) und den Nitratschlupf in komplexen Medien keine Daten vor. Der NVK-Wert weicht von der Totalkapazität ab, da der Austauscher auch andere Anionen (insbesondere  $\text{SO}_4^{2-}$ ) bindet. Diese werden schnell wieder an das Medium abgegeben. Durch diese Wechselwirkungen kommt es aber zu dem sogenannten Nitratschlupf, so dass eine größere Menge Austauscher benötigt wird als theoretisch notwendig wäre. So wären für die

Entfernung von 93 mg/l Nitrat (1,5 meq/l) aus 1.000 Litern Trinkwasser theoretisch 1,5 Liter Harz notwendig. Bei Anwesenheit von 98 mg/l Sulfat (2,0 meq/l) werden aber insgesamt 3,6 Liter benötigt.

Aufgrund dieser Daten wurden die Versuche in der Rührkesselkaskade so dimensioniert, dass sichergestellt werden konnte, dass der NVK-Wert deutlich über der tatsächlichen Belastung mit Nitrat liegt. So wies das verwendete Molkekonzentrat eine Startkonzentration von 172 mg/l Nitrat auf und wurde mit einem Volumenstrom von 0,96 l/h (4 BV/h; Bettvolumen) durch die Kaskade gepumpt. Es ist zu erkennen, dass mit dieser Versuchsanordnung über ca. 2 h eine konstante Abreicherung auf ca. 10 mg/l erreicht wird. Insgesamt wurden in diesem Versuch 1,9 l Molkekonzentrat abgereichert, die Nitratkonzentration sank dabei von 172 mg/l auf 10 mg/l. Dieses entspricht einer Abreicherung von 94 % des Nitratgehaltes.

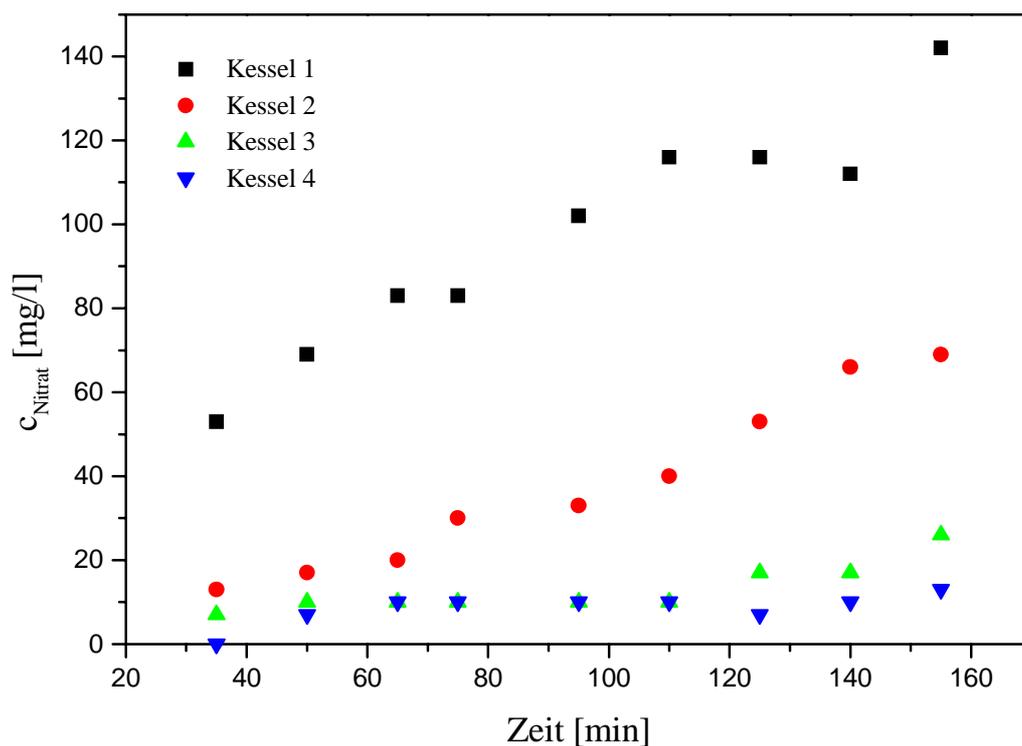


Abb. 5.4.6: Nitratbreicherung von Molkekonzentrat  $c(\text{NO}_3^-) = 172 \text{ mg/l}$  in vierstufiger Rührkesselkaskade; Volumenstrom 4 BV/h; 240 ml Purolite A-520 E; RT; bis  $t=30 \text{ min}$  Füllung des Arbeitsvolumens der Kaskade [319]

Die Regeneration der Reaktorkaskade wurde mittels einer Natriumchloridlösung durchgeführt. Die optimierte Zusammensetzung des Eluenten ergibt sich aus den Bedingungen für die biologische Stufe (s. Kap. 5.4.2.2). Es sei hier nur angemerkt, dass die Natriumchloridkonzentration nicht beliebig hoch sein kann, da sonst die eingesetzten Bakterien absterben würden. Verwendet wurde eine Lösung mit  $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/l}$ . Das Gesamtvolumen des verwendeten Eluenten betrug 5,1 Liter. Dieser enthielt nach der Regeneration eine Nitratkonzentration von 58 ppm. Aus diesen Zahlen lässt sich errechnen, dass das Harz mit 308 mg Nitrat beladen wurde und durch den Eluenten 296 mg Nitrat entfernt wurden. Die Differenz beträgt damit weniger als 4 % und kann durch Ungenauigkeiten in der Analytik verursacht werden.

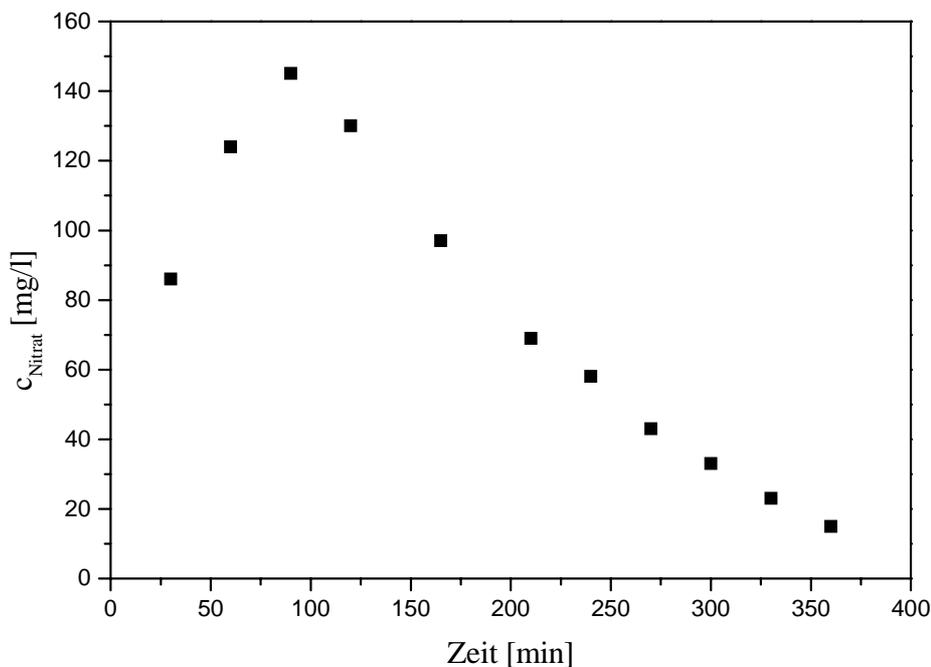


Abb. 5.4.7: Regeneration von Purolite A 520 E in vierstufiger Rührkesselkaskade;  $c(\text{NaCl}) = 35 \text{ g/l}$ ; Volumenstrom 5 BV/h; RT [319]

Es war weiterhin möglich, das eingesetzte Harz über mindestens 50 Zyklen zu regenerieren, ohne dass eine signifikante Verschlechterung der Austauscherkapazität eintrat. Für eine technische Umsetzung des Verfahrens ist eine solche Reaktorkaskade jedoch zu kostenintensiv. Es wurde daher - nachdem prinzipiell gezeigt werden konnte, dass eine Nitrat-Abreicherung aus Molke durch ionenselektive Harze möglich ist - zusammen mit den Unternehmen Biolac, Harbarnsen, und Applexion, Frankreich, begonnen, ein

säulenchromatographisches Verfahren zu entwickeln. Hierzu wurde in ersten Laborversuchen eine Chromatographie-Säule mit einer Höhe von 80 cm und einem Innendurchmesser von 2 cm eingesetzt. Die Säule wurde mit einem Bettvolumen von 210 ml Harz betrieben. Die Versuche wurde mit Molkekonzentrat bei einem Volumenstrom von 2 bis 3 BV/h durchgeführt. Versuche, bei denen der Volumenstrom des Molkekonzentrats auf bis zu vier Bettvolumen pro Stunde erhöht wurden, zeigten, dass ab 4 BV/h ein erhöhter Restnitratgehalt im Molkekonzentrat am Ablauf der Säule auftritt.

Die Abbildung 5.4.8 zeigt den Verlauf der Nitratkonzentrationen im Molkekonzentrat während der Beladung und des Eluents während der Regeneration am Ablauf der Säule.

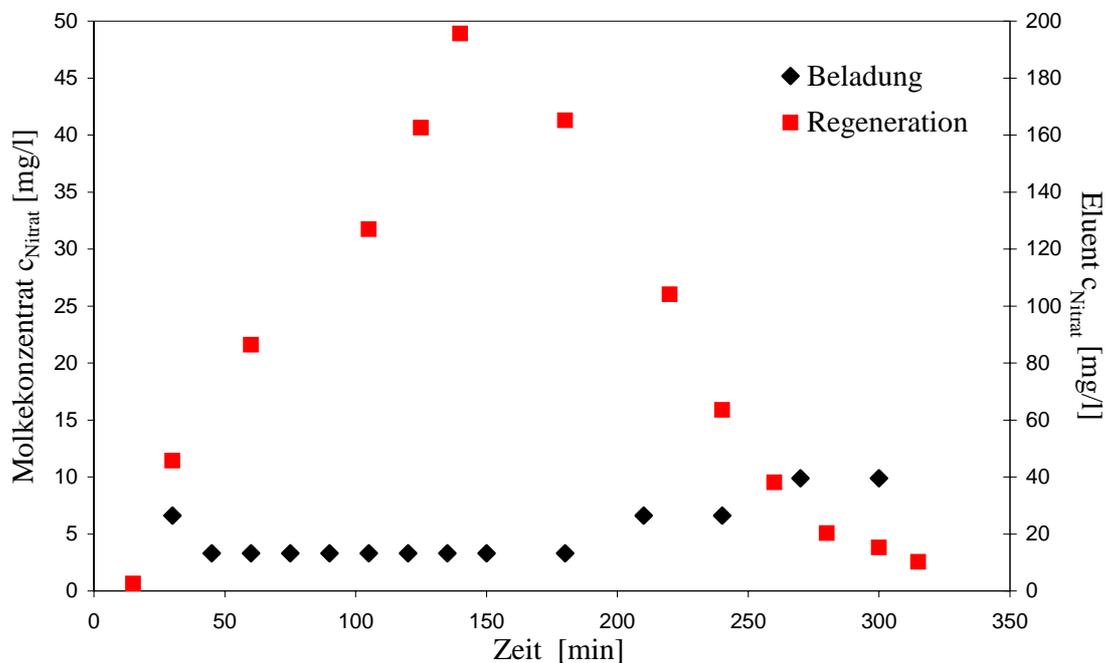


Abb. 5.4.8: Nitratanreicherung von Molkekonzentrat ( $c_{\text{Nitrat}} = 185 \text{ mg/l}$ ; Volumenstrom 2 BV/h; RT) und Regeneration des Harzes ( $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/l}$ ; Volumenstrom 4 BV/h; RT) in Chromatographie-Säule ( $V = 210 \text{ ml}$ ) [319]

Es ist zu erkennen, dass es ca. fünf Stunden lang möglich ist, die Nitratkonzentration im Molkekonzentrat bis auf die geforderte Konzentration von 10 mg/l zu senken. Die Beladung der Säule wurde dann aufgrund der ansteigenden Nitratkonzentrationen am Ausgang der Säule abgebrochen. Die Regeneration der Säule konnte mit dem für die mikrobielle Denitrifikation geeigneten Eluenten mit einer Natriumchlorid-Konzentration von 35 g/l vollständig erfolgen. Wie aus der Auftragung ersichtlich, enthielt der Eluent am Ablauf der

Säule nach ca. 6,5 h nur noch geringe Mengen an Nitrat. Die Bilanzierung des Versuchs ergab eine Beladung des Harzes mit 341 mg Nitrat und einen Nitratgehalt des Eluenten von insgesamt 335 mg. Ausgehend von der Annahme, dass die maximale Arbeitskapazität in dieser Versuchsanordnung unverändert bei 1 eq/l geblieben ist, müssten bei einem Arbeitsvolumen von 210 ml maximal 13 g  $\text{NO}_3^-$  gebunden werden. Es zeigt sich, dass in einer komplexen Matrix wie Molkekonzentrat bei den gewählten Prozessparametern der NVK-Wert sehr stark von der maximalen Arbeitskapazität nach unten abweicht. Zur Bestimmung des NVK-Wertes wurde die Säule bis zum Durchbruch des Nitrates beladen (Abb. 5.4.9).

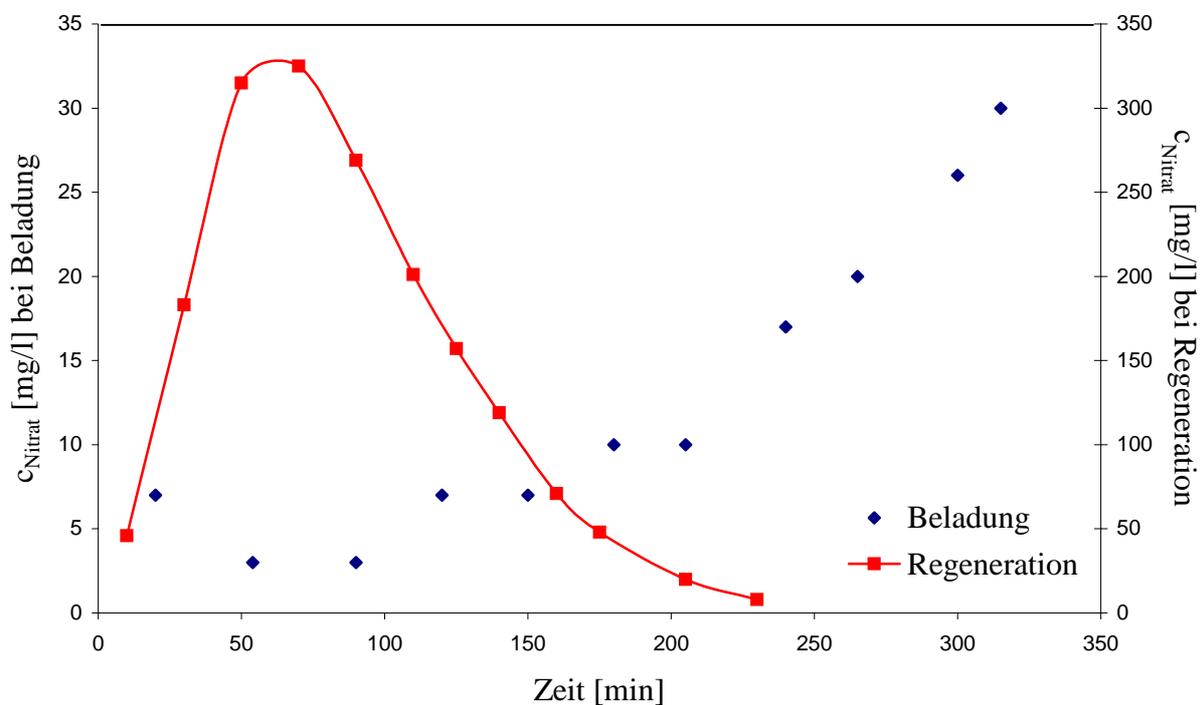


Abb. 5.4.9: Durchbruchkurve zur Bestimmung des NVK-Wertes der verwendeten Applexion-Säule ( $c_{\text{Nitrat}} = 238 \text{ mg/l}$ ; Volumenstrom 3 BV/h; RT) und Regeneration des Harzes ( $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/l}$ ; Volumenstrom 6,5 BV/h; RT) in Chromatographie-Säule (Bettvolumen = 230 ml) [319]

Der Durchbruch der Kurve wird hier so definiert, dass Ablaufkonzentrationen bis 10 mg/l Nitrat eine ausreichende Qualität darstellen. Ein Durchbruch erfolgt, wenn der Wert über 10 mg/l ansteigt. Aus Abbildung 5.4.9 ist zu erkennen, dass dieses nach ungefähr 205 min der Fall ist. Die Bilanzierung der Nitratkonzentrationen ergab, dass auf der Säule innerhalb von 205 Minuten 493 mg  $\text{NO}_3^-$  gebunden werden konnten. Bei einem Säulenvolumen von 230 ml entspricht dieses 2,14 g/l (rund 5 % der maximalen Arbeitskapazität).

Eine große Problematik bei der Molkeverarbeitung stellt die mikrobielle Belastung der Molke dar. Erwärmungen durch lange Prozessschritte sollten vermieden werden, da es dann zu einer starken Vermehrung der in der Molke enthaltenen Mikroorganismen kommen kann. Deren Stoffwechselaktivitäten können entscheidend die Zusammensetzung der Molke verändern, was zu Verlusten in der Produktausbeute führen würde. Bei zu starker mikrobiologischer Aktivität kann die Molke nicht mehr weiterverarbeitet werden. Daher ist auch bei der chromatographischen Abtrennung des Nitrates ein solches „Aufheizen“ des Molkekonzentrates zu vermeiden. Bei der Verarbeitung von Molke sollten daher möglichst niedrige Temperaturen angewendet werden ( $\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Aus diesem Grund wurden Beladung und Elution des Systems bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass bei niedrigen Temperaturen eine deutlich höhere Nitratbindungskapazität erreicht werden konnte. So ergibt sich bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  eine Bilanzierung der Nitratkonzentration zu  $6,25\text{ g}_{\text{Nitrat}}/\text{l}_{\text{Harz}}$ . Der NVK-Wert konnte somit um den Faktor 3 gegenüber der Beladung bei Raumtemperatur verbessert werden. Es können somit rund 15 % der maximalen Arbeitskapazität des Harzes für dieses spezifische Trennproblem genutzt werden.

Da sich eine deutliche Abhängigkeit der Beladung zeigte, wurde auch untersucht, inwieweit die Temperatur bei der Elution Einfluss nimmt. Hier sollte sich ein gegenläufiger Effekt zeigen. Wenn bei niedrigen Temperaturen der Austausch von Nitraten gegenüber anderen Spezies bevorzugt zu sein scheint, so sollten sich höhere Temperaturen positiv auf das Elutionsverhalten auswirken. Es wurden Elutionsversuche bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die maximale Temperaturbelastung des Harzes liegt bei  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Ergebnisse bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  sind in der Abbildung 5.4.10 dargestellt.

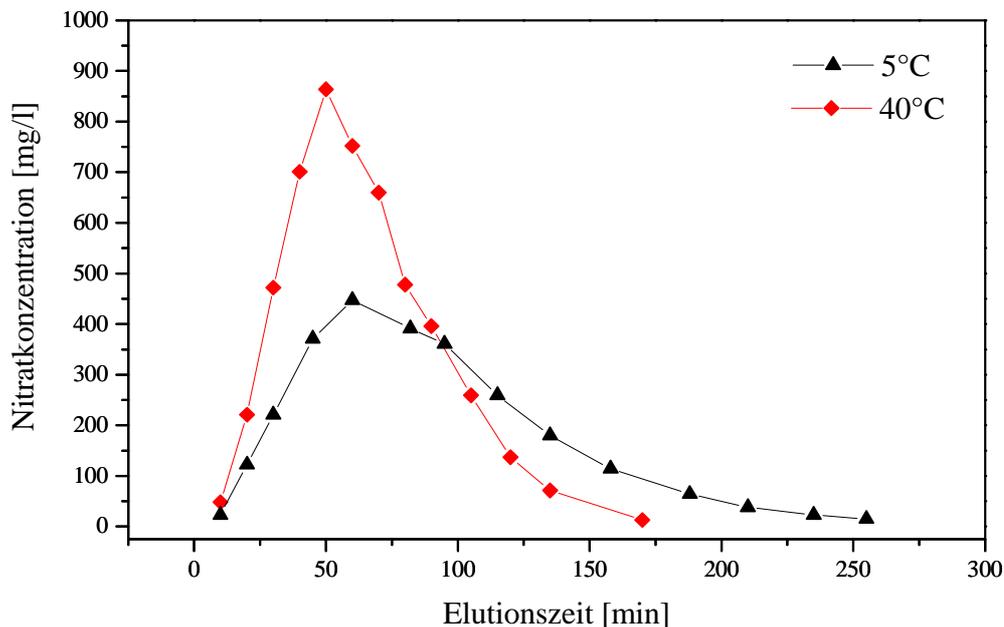


Abb. 5.4.10: Temperaturabhängigkeit des Elutionsverhaltens; Eluent:  $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/l}$ ; Volumenstrom 6,5 BVh; Bettvolumen = 230 ml [319]

Es zeigt sich deutlich, dass mit steigender Temperatur die Elution des Nitrates beschleunigt werden kann. Bei Temperaturen über 40 °C verläuft der Peak noch schmäler, es kommt aber durch starkes Ausgasen des Eluenten zu einer Zerstörung des Bettes, was eine neue Befüllung der Säule erforderte. Somit sollte die Beladung bei möglichst niedrigen und die Elution bei möglichst hohen Temperaturen erfolgen.

#### 5.4.2.2 Aufbau und Optimierung der biologischen Stufe

Wie bereits beschrieben, sind spezielle Mikroorganismen unter bestimmten Bedingungen in der Lage, Nitrat über die Zwischenstufen Nitrit und  $\text{NO}_x$  zu molekularem Stickstoff zu reduzieren. Diese Fähigkeit sollte für die Nitratabreicherung in dem Eluenten aus der Anionenaustauscher-Stufe genutzt werden. Hierfür wurde der Mikroorganismus *Paracoccus denitrificans* (DSM 413) gewählt. Dieser Stamm ist zu Beginn des letzten Jahrhunderts aus Gartenerde isoliert worden [321]. Die Bakterien sind Gram-negativ und treten entweder kugelförmig (Durchmesser: 1,1 – 1,3  $\mu\text{m}$ ) oder als kurzes Stäbchen (Länge: 0,9 – 1,2  $\mu\text{m}$ ) auf [321, 322]. *Paracoccus denitrificans* kommt neben dem Boden vor allem in Klärschlämmen

vor [323]. Die Bakterien sind fakultativ anaerob, d. h. der Stamm kann sowohl Sauerstoff als auch Nitrat, Nitrit oder Distickstoffmonoxid als terminalen Elektronenakzeptor für die Energiegewinnung nutzen. Des Weiteren ist *Paracoccus denitrificans* fakultativ autotroph [324], da er neben verschiedenen organischen Substanzen auch Kohlendioxid als C-Quelle nutzen kann. Aufgrund der ebenfalls möglichen Oxidation von molekularem Wasserstoff zählt *P. denitrificans* zu den Knallgasbakterien.

Eine Denitrifikation des Eluenten kann erst nach entsprechender Anzucht der Mikroorganismen durchgeführt werden. Daher wurden Voruntersuchungen zur Kultivierung von *Paracoccus denitrificans* durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in dem vom Hersteller empfohlenen komplexen Medium (Pepton, Fleischextrakt) bei 28 °C. Der pH-Wert wurde dabei mit Hilfe eines Phosphatpuffers auf 7,3 eingestellt [325].

Die folgenden Abbildungen zeigen das Wachstum von *P. denitrificans* unter aeroben sowie unter anaeroben Bedingungen. Da die Denitrifikation im Rahmen dieses Projektes bei erhöhten Salzkonzentrationen erfolgen musste, wurde jeweils eine Vergleichskultur angesetzt, bei der das Medium mit 25 g/l NaCl versetzt worden war.

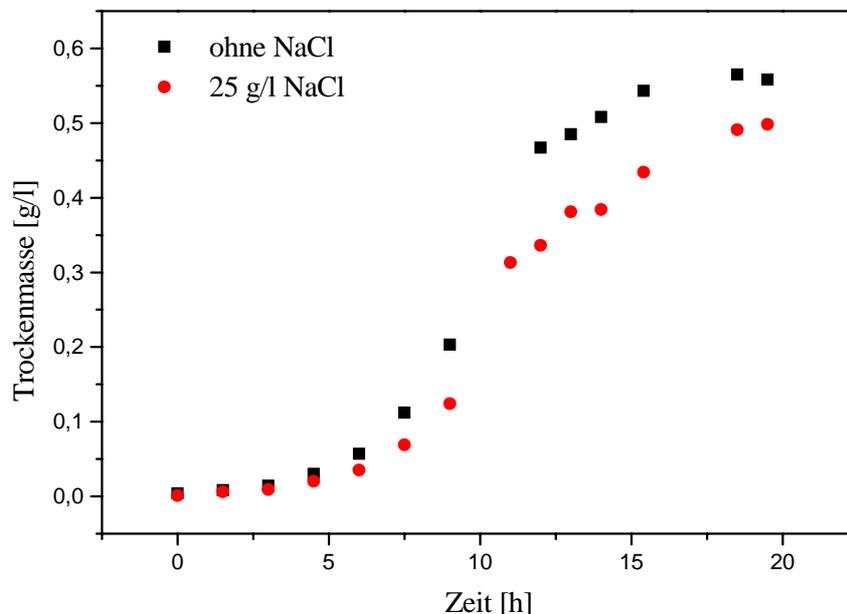


Abb. 5.4.11: Aerobes Wachstum von *P. denitrificans*, 28 °C, 120 U/min, Komplexmedium, pH 7,3 [326]

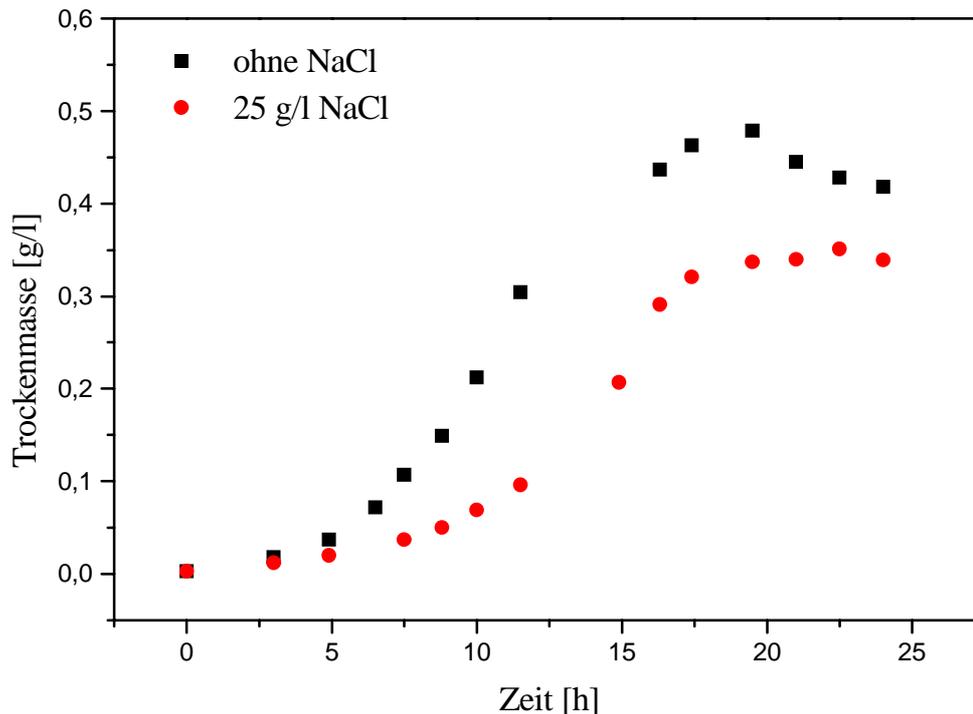


Abb. 5.4.12: Anaerobes Wachstum von *P. denitrificans*, 28 °C, 120 U/min, Komplexmedium, pH 7,3 [326]

Wie den Abbildungen 5.4.11 und 5.4.12 entnommen werden kann, erreichen die Kulturen sowohl im Falle der aeroben als auch der anaeroben Kultivierung nach ungefähr 19 Stunden die maximale Biomasse. Nach diesem Maximum scheint die Trockenmasse trotz gleichbleibender Zellzahl während der stationären Phase abzunehmen. Dieses Verhalten ist vermutlich auf die Verwendung von Speicherstoffen zur endogenen Atmung zurückzuführen und ist schon früh in der Literatur beschrieben worden [327]. Es ergibt sich aus diesen Untersuchungen weiterhin, dass das Zellwachstum bei erhöhter Natriumchloridkonzentration abnimmt und dass bei gleicher Kultivierungsdauer im aeroben Fall eine höhere Zelldichte erreicht wird. Die aus den gezeigten Wachstumskurven ermittelten Wachstumsparameter [326] sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 5.4.2: Parameter des aeroben und des anaeroben Wachstums von *P. denitrificans* jeweils mit und ohne Zusatz von 25 g/l Natriumchlorid zum Kulturmedium [326]

Wachstumsbedingungen	aerob		anaerob	
	ohne NaCl	25 g/l NaCl	ohne NaCl	25 g/l NaCl
$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	0,49	0,41	0,34	0,24
$t_d$ [h]	1,41	1,69	2,04	2,89
$X$ [g <sub>TM</sub> /l]	0,74	0,50	0,48	0,35
$t_l$ [h]	0,02	0,03	0,09	0,01

$\mu$ : Wachstumsrate

$t_d$ : Verdopplungszeit

$X$ : Ausbeute

$t_l$ : Anlaufzeit (s. a. Anhang Kap. 8.13)

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass unter anaeroben Bedingungen die Wachstumsrate  $\mu$  während der exponentiellen Phase um etwa 30 % niedriger ausfällt als unter aeroben Bedingungen. Auch die Ausbeute  $X$  ist um 35 % geringer als beim aeroben Wachstum. Nach Zusatz von 25 g/l Natriumchlorid zum Medium wurden nur noch rund 70 % der ursprünglichen Trockenmassekonzentrationen erreicht. Das NaCl wirkt sich somit auch entscheidend auf die Wachstumsrate aus. Diese war im aeroben Fall um 16 % bzw. im anaeroben Fall um 30 % verringert. Die berechneten Anlaufzeiten waren in allen Fällen kürzer als 0,1 h. Hinweise auf eine mögliche Verlängerung der Adaptionphase bei hohen Salzkonzentrationen können aus diesen Ergebnissen nicht erhalten werden. Um für die Denitrifikation schnell viel Biomasse zur Verfügung zu stellen, würde sich somit die aerobe Anzucht der Bakterien anbieten. Die Verwendung aerob gewachsener Kulturen für die Denitrifikation bringt jedoch das Problem mit sich, dass das entsprechende Enzymsystem unmittelbar nach dem Wechsel zu anaeroben Bedingungen noch nicht oder nicht vollständig vorhanden ist. Insbesondere die Bildung der Nitritreduktase setzt erst mit etwa 1,5 Stunden Verzögerung ein [323]. Deutlich wird dieses problematische Verhalten in der Abbildung 5.4.13. Während zwar das Nitrat sehr schnell vollständig abgebaut wird, reichert sich das Nitrit im Medium an. Damit ergibt sich wieder das bereits eingangs geschilderte Problem, dass aus einer gesundheitlich bedenklichen Verbindung (Nitrat) eine gesundheitsschädliche (Nitrit) produziert worden ist. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten liegt darin, dass zwar das Enzymsystem zur Umsetzung des Nitrates sehr schnell exprimiert wird, um den Energiegewinnung und somit den Stoffwechsel aufrecht zu erhalten, die nachgeschalteten Systeme zur Umsetzung des Nitrits im benötigten Zeitraum aber noch nicht ausreichend

gebildet werden. Aus diesen Gründen müssen bei dem kombinierten Verfahren Zellen verwendet werden, die anaerob produziert wurden.

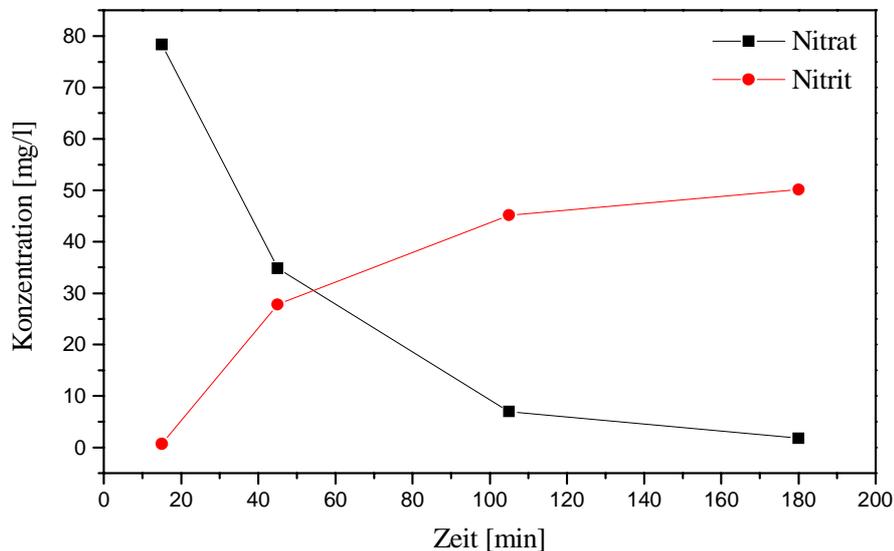
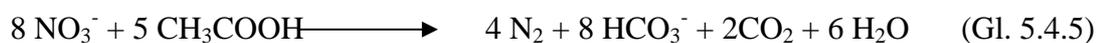


Abb. 5.4.13: Nitrat- und Nitritkonzentrationen bei der Denitrifikation mit aerob gewachsenen Zellen von *Paracoccus denitrificans*, 20 °C, Acetat als Elektronendonator, physiologische Kochsalzlösung (0,9 %), pH 7,5 [326]

Für die mikrobielle Reduktion von Nitrat ist die Anwesenheit eines Elektronendonors notwendig. Als Elektronendonatoren kommen bei der mikrobiellen Reduktion von Nitrat verschiedene organische und anorganische Verbindungen in Frage. Acetat hat sich für diesen Zweck als geeignet erwiesen. Die Reaktionsgleichung für diesen Prozess kann wie folgt formuliert werden:



Der Nitratabbau verläuft unter Verwendung von Acetat als Kohlenstoffquelle schneller als mit Glucose, Ethanol oder Methanol. Im Folgenden wurde die Geschwindigkeit der Nitratabbaus bei Verwendung von Molke, Lactose bzw. Lactat als Kohlenstoffquelle mit derjenigen verglichen, die unter Einsatz von Acetat beobachtet wurde. Abbildung 5.4.14 zeigt die Abbaugeschwindigkeiten aus diesen Versuchen. Da die Messdaten aus experimentellen Gründen nicht für eingehende kinetische Untersuchungen geeignet waren, wurden hier anstelle der enzymkinetischen Parameter lediglich die mittleren Abbaugeschwindigkeiten

errechnet, was für die folgenden Betrachtungen vollkommen ausreicht.  $v_m$  ist die durchschnittliche Geschwindigkeit der Denitrifikation bezogen auf die Zelldichte.

$$v_m = \frac{c_0 - c_E}{t \cdot D} \quad \text{(Gleichung 5.4.6)}$$

- $c_0$  = Nitratkonzentration zu Versuchsbeginn in  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- $c_E$  = Nitratkonzentration in  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  zu Versuchsende bzw. letzte gemessene Konzentration von mehr als  $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- $t$  = Dauer des Nitratabbaus in min
- $D$  = Zelldichte in  $\text{g}_{\text{TM}}\cdot\text{l}^{-1}$

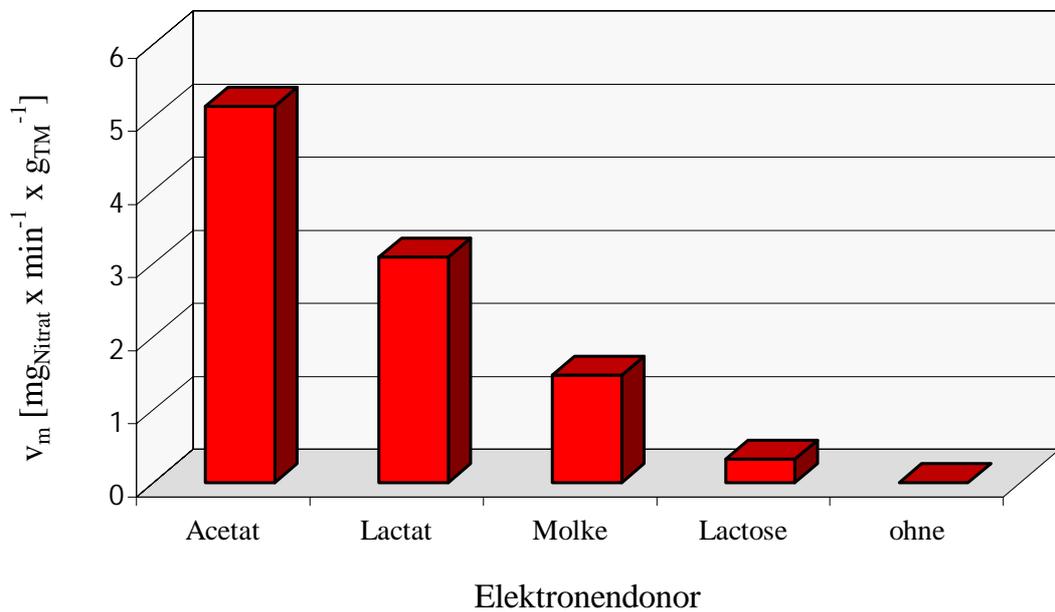


Abb. 5.4.14: Mittlere Geschwindigkeiten des Nitratabbaus bei verschiedenen Elektronendonatoren, *P. denitrificans*, anaerob, RT, pH 7,5, 0,9 % NaCl [326]

Wie in Abbildung 5.4.14 zu erkennen ist, verlief die Nitratreduktion mit Acetat als Elektronendonator deutlich schneller als mit den alternativen Kohlenstoffquellen. In Abwesenheit einer Kohlenstoffquelle wurde kein Nitratabbau festgestellt. Die zwischenzeitlich auftretenden Nitritkonzentrationen waren im Allgemeinen gering. Lediglich bei der Verwendung von Acetat wurden vorübergehend Werte von bis zu  $8 \text{ mg/l}$  gemessen. Nach vollständiger Reduktion des Nitrates konnte aber auch in diesem Fall kein Nitrit mehr nachgewiesen werden. In allen folgenden Versuchen wurde daher der Versuchslösung ca.

250 ppm Natriumacetat zugesetzt. Dieser hohe Wert sollte verhindern, dass sich die Konzentration der C-Quelle limitierend auf den Gesamtprozess auswirken kann.

Zum Nitratabbau im Eluenten der chromatographischen Nitratabreicherung von Molke ist es notwendig, dass die Denitrifikation in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen abläuft. Es musste also ermittelt werden, bei welchen Natriumchlorid-Konzentrationen noch ein zufriedenstellender Abbau möglich ist, beziehungsweise ob eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von Raumtemperatur bis auf 37 °C eine wesentliche Erhöhung der Abbaugeschwindigkeit unter diesen Bedingungen bewirkt. Eine Temperatur von 37 °C wird in der Literatur als optimal für die Denitrifikation beschrieben.

Die Experimente zum Nitratabbau in konzentrierten Kochsalzlösungen wurden bei Konzentrationen von 25, 35 und 45 g/l Natriumchlorid jeweils bei den drei Temperaturen 20, 30 und 37 °C durchgeführt. Als Vergleich dienten in allen Fällen parallel durchgeführte Experimente in einer physiologischen Kochsalzlösung mit nur 9 g/l NaCl. Wie in der Abbildung 5.4.15 zu erkennen ist, brachte eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 20 °C auf 37 °C bei allen Salzkonzentrationen eine deutliche Steigerung der Abbauraten mit sich. Wenn die Reaktionslösung auf 37 °C erwärmt wird, ist die Denitrifikation noch bei einem Gehalt von 35 g/l NaCl mit ähnlicher Geschwindigkeit möglich wie mit 9 g/l Salzgehalt bei Raumtemperatur. Bei einer Natriumchlorid-Konzentration von 45 g/l hingegen lag die Abbauraten auch bei erhöhten Temperaturen deutlich niedriger.

Da im Hinblick auf die Kombination der chromatographischen Stufe mit der mikrobiellen Denitrifikation ein Kompromiss zwischen einer möglichst hohen Salzkonzentration im Eluenten einerseits (geringes Elutionsvolumen) als auch einer möglichst schnellen Denitrifikation (hohe biologische Aktivität) andererseits gefunden werden muss, wurde für die folgenden Versuche eine Natriumchlorid-Konzentration von 35 g/l und eine Temperatur für den Nitratabbau von 37 °C festgelegt.

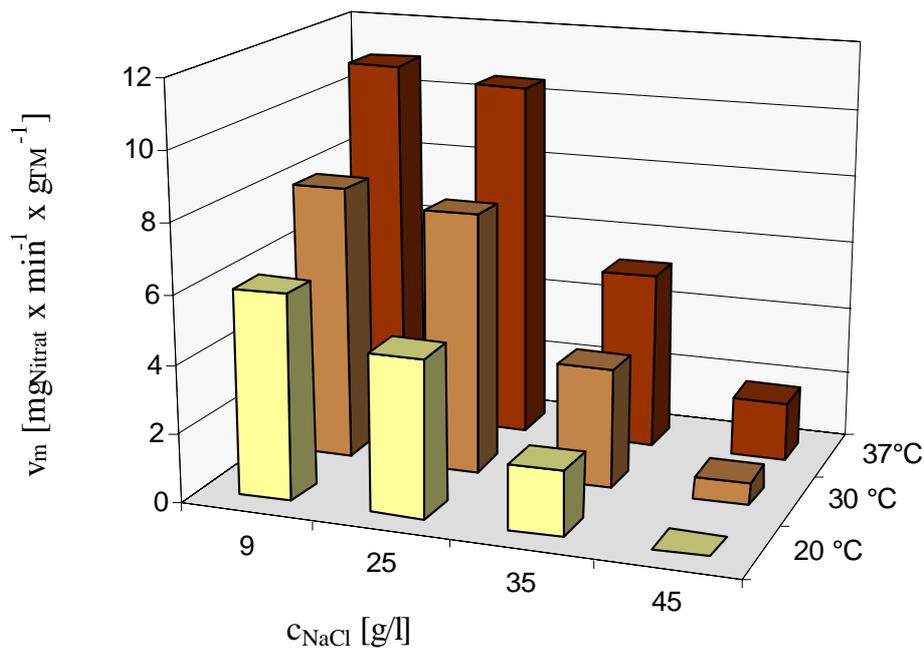


Abb. 5.4.15: Nitrat-Abbaugeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen und Temperaturen mit *P. denitrificans*, anaerob, pH 7,5 [326]

Wie bereits weiter oben beschrieben, war es das Ziel, den Eluenten der chromatographischen Stufe in der Denitrifizierungstufe soweit aufzuarbeiten, dass er für die Chromatographie wiederverwendet werden kann. Es ist daher wünschenswert, dass der Eluent möglichst wenig zusätzliche Bestandteile enthält, da diese den Anionenaustausch beeinträchtigen könnte. Die notwendige C-Quelle (Acetat) kann nach der chromatographischen Stufe dem Eluenten zugeführt werden. Das Acetat wird während der Denitrifikation verstoffwechselt. Die verbleibenden Acetatkonzentrationen zeigten keinerlei Einfluss auf den Anionenaustausch. Geklärt werden musste noch die Frage, ob der Eluent gepuffert werden muss. Der optimale pH-Wert des mikrobiellen Nitratabbaus liegt zwischen pH 7 und pH 8 [313], wobei für *Paracoccus denitrificans* ein pH-Optimum von 7,5 beschrieben worden ist [322]. Um den Einfluss von pH-Änderungen auf die Nitritakkumulation feststellen zu können, wurde die Denitrifizierung im Vergleich von gepufferter und ungepufferter Reaktionslösung durchgeführt. Durch den Verbrauch von Protonen während der Denitrifizierung (s. Gl. 5.4.6) steigt der pH-Wert im ungepufferten Fall an. Wie in der Abbildung 5.4.16 zu sehen ist, kommt es bei der ungepufferten Reaktionslösung zu einem starken Anstieg der Nitritkonzentration. Auch nach dem vollständigen Abbau des Nitrates sind noch 20 Minuten lang erhebliche Nitritkonzentrationen messbar. Der erste Schritt der Denitrifizierung, die

Reduktion vom Nitrat zu Nitrit, wird allerdings nicht beeinflusst. Die beiden Kurven zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf.

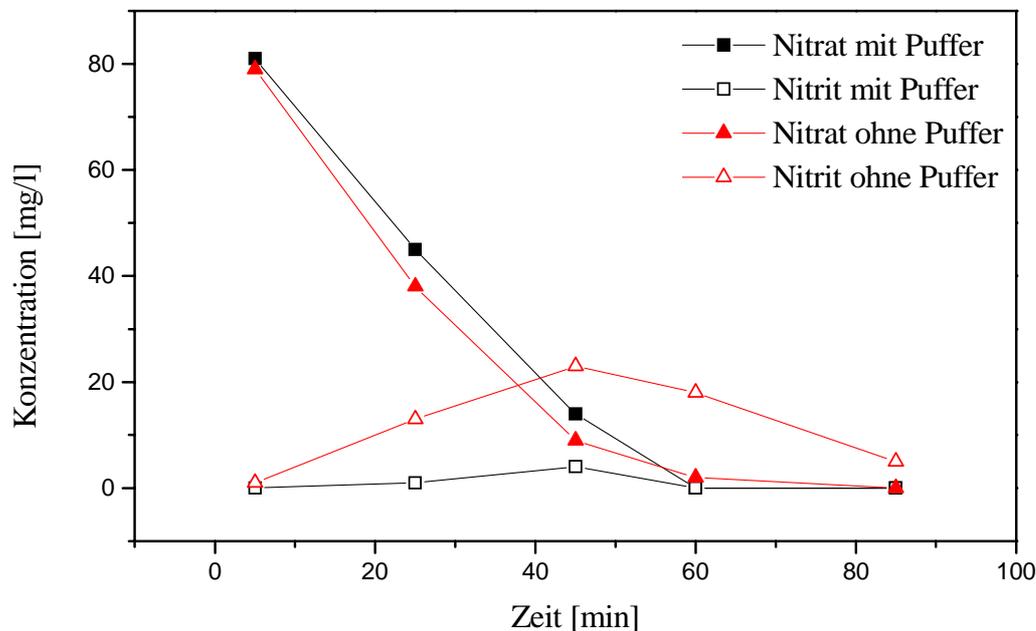


Abb. 5.4.16: Einfluss des Puffers (pH 7,5) auf den Nitratabbau durch *Paracoccus denitrificans*, 20 °C, Acetat als Elektronendonator, physiologische Kochsalzlösung (0,9 %); Puffer: 10 mM KPP-Puffer [326]

Erklärt werden kann dieses Verhalten mit den unterschiedlichen pH-Optima von Nitrat- bzw. Nitritreduktase. Für die Nitratreduktase aus *Paracoccus denitrificans* wird ein pH-Bereich von 5,8 bis 8,9 in der Literatur angeben. Die Nitritreduktion läuft hingegen nur bei pH-Werten zwischen 7,2 und 8,7 schnell genug ab, um eine Akkumulation von Nitrit zu vermeiden [328]. Aufgrund der erzielten Versuchsergebnisse ist die Einhaltung eines geeigneten pH-Wertes nötig, um zu verhindern, dass sich Nitrit im Reaktor anreichert und bei der Wiederverwendung des Eluenten auf die Chromatographiesäule aufgebracht wird und auf diesem Wege eventuell auch in die Produkte (Molkeproteine bzw. Lactose) gelangen könnte. Aus diesem Grund wurde im Laborversuch der Nitratabbau stets mit gepufferten Eluenten (pH = 7,5) durchgeführt. Bei der technischen Umsetzung in der Industrie muss der verwendete Reaktor für die Denitrifikation über eine pH-Regelung verfügen.

Aufgrund der durchgeführten Optimierung ergab sich folgende abschließende Parametrierung des Eluenten:

- pH-Wert: 7,5
- NaCl: 35 g l<sup>-1</sup>.
- KPP: 10 mM
- Acetat: 250 mM (Zugabe vor der biologischen Denitrifizierung)

Vor der Kopplung beider Verfahrensschritte musste noch das Problem gelöst werden, wie die Zellen wieder vom Eluenten abgetrennt werden können. Eine Rückführung des Eluenten mit Zellen ist nicht möglich, da diese die Molke zusätzlich biologisch belasten würden. Es wurden zwei Verfahren zur Zellabtrennung getestet:

- Mikrofiltration (0,2 µm) zur Abtrennung suspendierter Zellen
- Filtration (400 µm) zur Abtrennung immobilisierter Zellen

Die Abtrennung der suspendierten Zellen von der Eluenten-Lösung erfolgte mittels eines Mikrofiltrationsmoduls „Sartocon Slice“ der Sartorius AG, Göttingen, mit einer Porengröße von 0,2 µm. Die Verwendung eines Moduls mit einer Membranfläche von 0,1 m<sup>2</sup> macht die Abtrennung des Eluenten mit einem Permeatfluss von 5,3 l/h bei einem TMP von 1 bar möglich. Es zeigte sich aber in mehreren Versuchsreihen, dass die Membran im Verlaufe der Filtration sehr schnell verblockt (Membranfouling s. a. Kap. 5.2.1). Der Wasserwert der Membran betrug nach einmaliger Abtrennung von 4 l Lösung nur noch weniger als 10 % der Initialflüsse. Durch Reinigungsprozeduren mit 0,1 M NaOH, 1 M Zitronensäure und 1 M NaOH konnte die Membran zwar soweit wieder gereinigt werden, dass ein Wasserwert von ca. 90 % der Initialflüsse erreicht wurde, doch lässt sich eine derartig häufige und aufwendige Reinigung nicht in einem kontinuierlichen Prozess realisieren. Die Verwendung anderer Abtrennverfahren oder anderer Filtrationsmodule scheint hier sinnvoll.

Diese Schwierigkeiten bei der Abtrennung freier Zellen lassen die Immobilisierung von *P. denitrificans* sinnvoll erscheinen. Durch eine Immobilisierung der Zellen ergibt sich eventuell auch eine bessere Langzeitstabilität, was für die Prozessführung von großem Vorteil wäre. Sicherlich verursacht dieser Schritt zusätzliche Kosten bei einer industriellen Realisierung und muss bei einer Umsetzung des Verfahrens äußerst kritisch betrachtet werden. Im Labor

erleichtert ein solcher Schritt die weitere Vorgehensweise allerdings erheblich. Die Bakterien wurden für diese Versuche in die bereits in Kapitel 4.4.3.3 beschriebenen LentiKats® eingeschlossen (s. Anhang Kap. 8.14); eine Methode, die bei diesen Bakterien bereits erfolgreich angewandt wurde [329]. Die LentiKats® lassen sich über eine Filtration mit großen Porendurchmesser (z. B. 400 µm) oder per Zentrifugation problemlos von dem Eluenten abtrennen. Mit den bei freien Zellen optimierten Versuchsbedingungen (37 °C und 35 g/l NaCl) wurden mit den immobilisierten Zellen Abbauprobe durchgeföhrt. Die Versuchslösung enthielt etwa 0,4 g/l Trockenmasse an immobilisierten Bakterien. Um die Lagerfähigkeit des Biokatalysators zu bestimmen, wurden die Experimente zur Denitrifikation eine Woche bzw. einen Monat nach der Herstellung der LentiKats® wiederholt. Eine Lagerung der immobilisierten Zellen erfolgte zwischen den Messungen bei 4 °C in einer nitratfreien Versuchslösung unter Sauerstoffausschluss. Nach der letzten Messung wurde die Salzkonzentration auf 9 g/l erniedrigt und die Abbaukurve zum Vergleich unter diesen Bedingungen aufgenommen. Die folgende Abbildung 5.4.17 zeigt den Nitratabbau nach verschiedenen langen Lagerzeiten der immobilisierten Zellen. Es ist zu erkennen, dass eine einwöchige Lagerung praktisch keine Verringerung der Abbaugeschwindigkeit mit sich bringt. Nach einem Monat hat die Aktivität der Mikroorganismen aber stark nachgelassen (s. auch Tabelle 5.4.3).

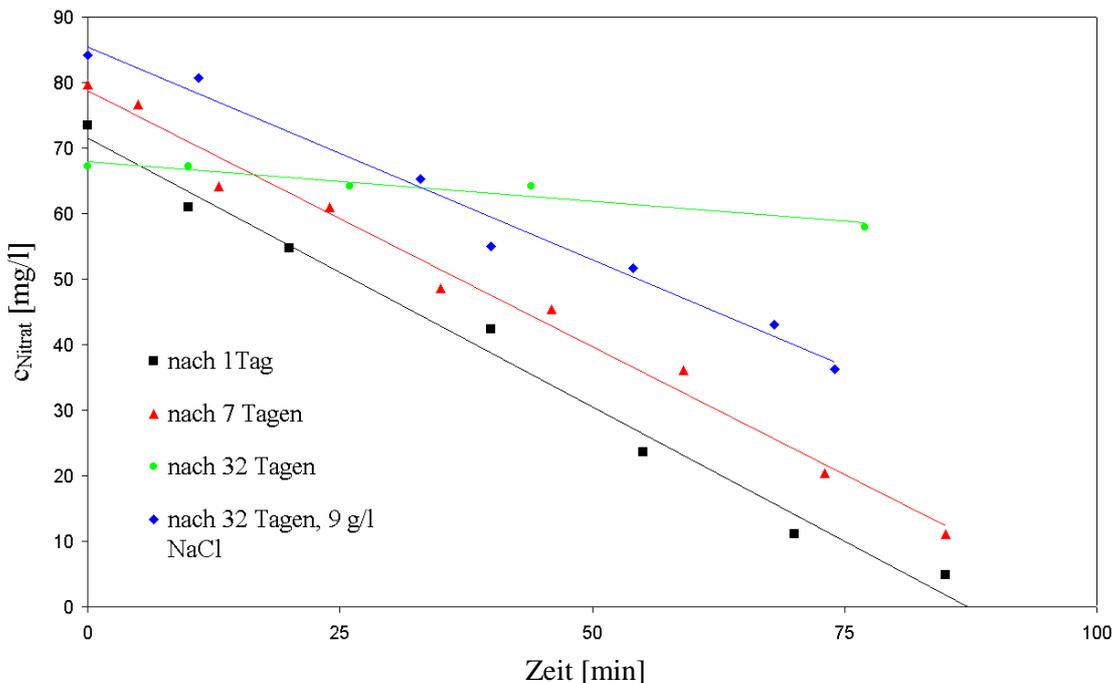


Abb. 5.4.17: Nitratabbau mit immobilisierten Zellen von *Paracoccus denitrificans* mit Acetat als Elektronendonator; 37 °C; 35 g/l NaCl; pH 7,5 [326]

Um eine Bewertung dieser Ergebnisse vorzunehmen, wurden die spezifischen Abbauraten für die immobilisierten Zellen ermittelt. Hierzu wurde die Steigung der Geraden durch die Zelldichte geteilt. Man erhält so die auf die Trockenmasse bezogenen Abbauraten  $v_z$ . Diese sind in Tabelle 5.4.3 zusammengefasst.

Tab. 5.4.3: Abbauraten  $v_z$  der Denitrifikation mit immobilisierten Bakterien [326]

Salzkonzentration	35 g/l			9 g/l
Alter des Biokatalysators in Tagen	1	7	32	32
$v_z$ [ $\text{mg}_{\text{Nitrat}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{TM}}^{-1}$ ]	2,0	1,9	0,3	1,6

Nach Erniedrigung der Salzkonzentration auf 9 g/l stieg die Reaktionsgeschwindigkeit auch nach einer Lagerzeit von über 4 Wochen wieder stark an und erreichte mit mehr als das Fünffachen des zuletzt bei 35 g/l gemessenen Wertes wieder 80 % der Ausgangleistung des ersten Tages. Die immobilisierten Bakterien können offensichtlich mehrere Wochen lang bei Abwesenheit von Nitrat und Sauerstoff gelagert werden. Durch Überführung in eine physiologische Kochsalzlösung kann die Aktivität fast vollständig wieder hergestellt werden. Die Abbaurrate  $v_z$ , die bei der Denitrifikation durch immobilisierte Mikroorganismen gemessen wurde, war mit  $2 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{TM}})$  allerdings deutlich geringer als mit freien Zellen. Dieses ist durch verschiedene Faktoren zu begründen. Zum einen sterben während der Immobilisierung Zellen ab, was zu einer Verringerung der effektiven Abbaurrate führt. Zum anderen ist im Falle der Verwendung von immobilisierten Biokatalysatoren immer damit zu rechnen, dass eine Hemmung der Reaktion durch diffusiv kontrollierte Schritte vorliegt. Dieses wird zwar bei der Verwendung von LentiKats<sup>®</sup> vermindert, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Welches Verfahren das wirtschaftlichere ist, lässt sich an dieser Stelle zur Zeit noch nicht beurteilen. Bei der Verwendung der freien Zellen ist eine aufwendige Reinigung der Filter notwendig, die erhebliche Kosten verursacht. Die Verwendung der immobilisierten Zellen erleichtert zwar die Zellabtrennung, führt aber zu einem erheblichen Verlust an katalytischer Aktivität. An dieser Stelle muss das Verfahren noch eingehend optimiert werden.

### 5.4.2.3 Kombination beider Verfahren

Kernstück des neuen Verfahrens ist die Kombination der beiden beschriebenen Stufen zur Nitratreduktion in Molke. Über diese Kombination sollte erreicht werden, dass

- der Nitratanteil in Molke zu Stickstoff umgesetzt wird,
- der verwendete Eluent im zweiten Verfahrensschritt recycelt und somit im ersten Schritt erneut wieder verwendet werden kann und
- somit das Verfahren minimale Mengen an Abwasser produziert.

Eine solche Kombination konnte im Labor realisiert werden. Die chromatographische Nitratanreicherung von Molkekonzentrat erfolgte in der in Kapitel 5.4.2.1 beschriebenen Chromatographie-Säule. Um eine schnelle Nitratbeladung des Ionentauschers zu gewährleisten, wurde der Volumenstrom des Molkekonzentrats auf drei Bettvolumen pro Stunde eingeregelt. Die Regeneration des Harzes wurde dem in Kapitel 5.4.2.1 beschriebenen Eluenten mit einem Volumenstrom von 6,75 BV/h durchgeführt.

Bei dem Versuch wurden 4,7 Liter Eluent benötigt. Dieser wurde in einen 5 Liter Reaktor überführt und mit ca. 0,4 g/l Biotrockenmasse *P. denitrificans* versetzt und 80 min bei einer Temperatur von 37 °C unter anaeroben Bedingungen zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden mittels der in Kapitel 5.4.2.1 beschriebenen Mikrofiltrationsmoduls 4 Liter des Eluenten von den Zellen abgetrennt. Mit diesem Eluenten wurde, nachdem mit frischem Eluenten auf 5 l aufgefüllt worden war, ein zweiter Regenerationzyklus gefahren (Abb. 5.4.18). In der Abbildung ist zu erkennen, dass sowohl die Nitratanreicherung von Molkekonzentrat, als auch die Regeneration des Anionenaustauscherharzes im beiden Zyklen einen fast identischen Verlauf zeigen.

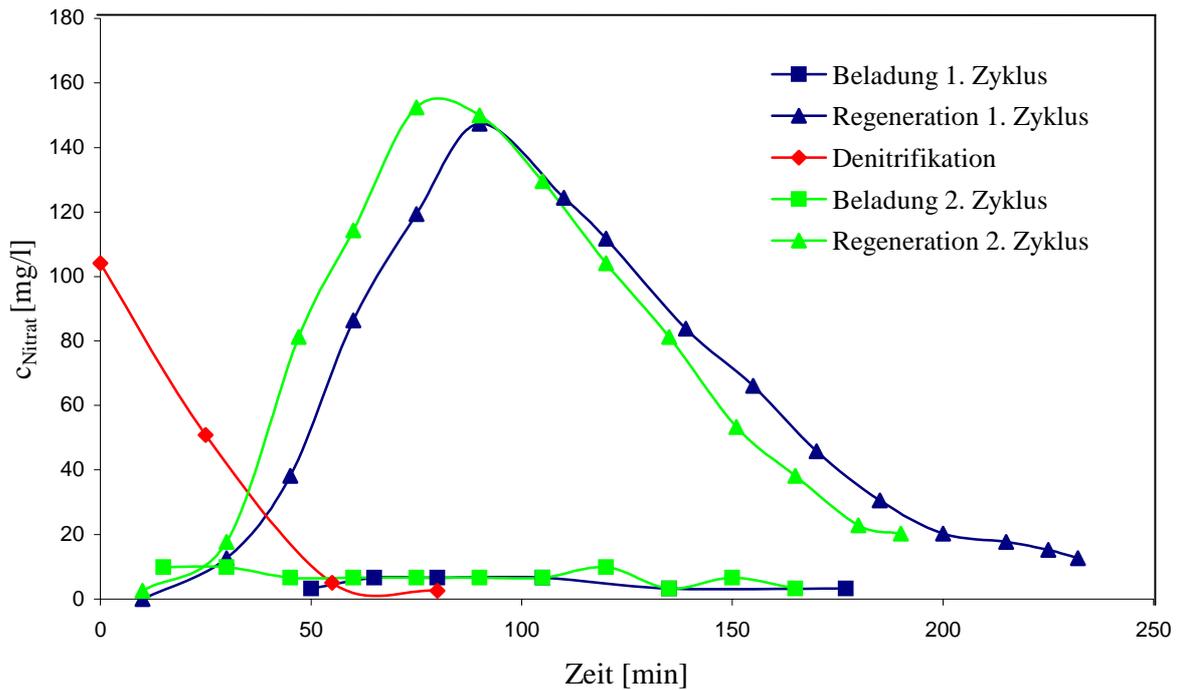


Abb. 5.4.18: Kombination der Nitratanreicherung von Molkekonzentrat in einer Chromatographie-Säule und mikrobieller Denitrifikation des Eluenten durch *P. denitrificans* [319]

In der nachfolgenden Tabelle 5.4.4 ist die Bilanzierung des Nitrates aufgeführt. Die Konzentrationen des Nitrats im Eluenten wurde dabei über die Integrale der Regenerationskurven berechnet. Diese Flächen sind in beiden Zyklen gleich, sie weisen nur eine Differenz von 0,4 % zueinander auf. Die abgetrennten Zellen von *P. denitrificans* waren in der Lage, nochmals mehrmals eine Modelllösung vollständig zu denitrifizieren. Dieses spricht deutlich dafür, dass die Kombination der beiden Verfahren möglich ist.

Tab. 5.4.4: Nitratbilanz der Kombination von chromatographischer Nitratanreicherung von Molkekonzentrat und biologischer Denitrifikation des Eluenten [319]

Zyklus- #	$c_{\text{Nitrat}}$ (Molkekonz.) [mg/l]		$c_{\text{Nitrat}}$ (Eluent) [mg/l]	$m_{\text{Nitrat}}$ [mg]	
	vor Anreicherung	nach Anreicherung		im Molke- konzentrat	im Eluenten
1	152	3	71	313	321
2	158	7	71	323	320

### 5.4.3 Abschätzung der Auslegung eines industriellen Prozesses

Für die Abschätzung der Auslegung eines industriellen Prozesses, oder zu mindestens einer Pilotanlage, sind bei der Denitrifizierung von Molke zwei Parameter von entscheidender Bedeutung. Zum einem ist es der NVK-Wert des Harzes und zum anderen die Kinetik der Denitrifizierung. Der erste Wert wird benötigt, um die Dimensionierung der Säulen festzulegen, der zweite Werte, um die notwendige Reaktorgröße zu ermitteln. Selbstverständlich sind weitere Parameter wie maximal zu erbringende Pumpleistung, Kühlleistung etc. zu berücksichtigen. Diese Parameter sind aber von anderen Prozessen in der molkeverarbeitenden Industrie bekannt oder können abgeschätzt werden.

Der hier vorgenommenen Abschätzung liegt die Annahme zugrunde, dass bei der Firma Biolac jährlich 800.000 Tonnen Molke (entsprechend 160.000 t Konzentrat) mit einer durchschnittlichen Nitratkonzentration von 250 mg/l anfallen. Zur weiteren Vereinfachung wurde angenommen, dass die eingesetzte Molke eine Dichte von 1 g/l hat. Es wird weiterhin davon ausgegangen, dass das gesamte Volumen denitrifiziert werden soll. Dieses ist wahrscheinlich nicht notwendig, da für viele Anwendungen insbesondere im Futtermittelbereich keine nitratfreien Endprodukte angeboten werden müssen. Da die Molkeverarbeitung kontinuierlich läuft (2 Tage Stillstand im Jahr) ergibt sich auf Grund dieser Annahme ein durchschnittlicher Nitratfluss von 76 g/min bei einem mittleren Volumenstrom von 304 l/min. Wie oben beschrieben wurde, kann das verwendete Harz mit einem Volumenstrom von max. 3 BV/h belastet werden. Daraus berechnet sich ein benötigtes Harzvolumen von 6,1 m<sup>3</sup>. Dieses ist in industriellen Maßstäben keine ungewöhnliche Größe. Gängige Anlagen der Firma Applexion, Frankreich, zur Entmineralisierung von Molke haben Volumina von 5 – 10 m<sup>3</sup>. Im Bereich der Melasseaufarbeitung (s. Kapitel 6.2) sind bei der Firma Amino, Frellstedt, Chromatographieanlagen mit Bettvolumen von bis zu 60 m<sup>3</sup> in Betrieb. Ein solches Harzbett hätte eine maximale Austauschkapazität von 5472 mol (~340 kg) Nitrat. Der NVK-Wert wurde, wie in Kapitel 5.4.2.1 beschrieben, zu 15 % der maximalen Austauschkapazität bestimmt. Unter der Berücksichtigung, dass sich dieser Wert im Up-Scaling nicht verändert, würde sich für das errechnete Bettvolumen eine Bindungskapazität von ungefähr 821 mol Nitrat ergeben. Dieses würde bedeuten, dass die Säule mit 206,84 t Molkekonzentrat beladen werden könnte, bevor der Durchbruch erfolgt. Dieses entspricht einer Beladungszeit von rund 11,3 h. Geht man davon aus, dass die Elution mit dem zehnfachen Bettvolumen erfolgen kann, ergibt sich ein Bedarf von rund 61 m<sup>3</sup> Eluent

(entsprechend 2,1 t Natriumchlorid). Für die Elution werden vom Hersteller des Harzes 2 bis 8 BV/h angegeben. Im Labor wurden bei 40°C mit rund 7 BV/h gute Ergebnisse erzielt. Die Elution würde entsprechend mit einem Volumenstrom von 710 l/min erfolgen und ca. 1,5 h dauern. Realisiert werden konnte bisher im Labor eine Elution innerhalb von 180 min, so dass hier noch weiterer Optimierungsbedarf besteht. Der Verlust an Natriumchlorid sollte dem NVK-Wert der Säule entsprechend bei rund 48 kg (821 mol) liegen (2,2 %). Diese Menge an Chlorid muss entsprechend vor dem nächsten Zyklus in Form von Salzsäure zugegeben werden. Die Konzentration an Nitrat im Eluenten beträgt nach der Elution 0,85 g/l. Für die nachfolgende biologische Denitrifikation muss der Eluent gepoolt werden. Das Harz muss anschließend mit dem vierfachen Bettvolumen Wasser gewaschen werden (24,4 m<sup>3</sup>). Der Waschvorgang kann mit bis zu 10 BV/h durchgeführt werden, so dass dieser Vorgang mit ungefähr 25 min zu kalkulieren ist. Die Säule steht somit nach ca. 2 h zum erneuten Beladen mit Molkekonzentrat zur Verfügung. Um kontinuierlich arbeiten zu können, ist somit eine Zwillingsanlage notwendig. Schaltet die erste Säule auf Elution, so wird die zweite Säule beladen.

Um für diese Konzentration entsprechend die Denitrifikationsstufe auszulegen, muss die Kinetik bekannt sein. Aus den oben genannten Kalkulationen ergibt sich, dass mindestens 61 m<sup>3</sup> Eluent mit einer Konzentration von 0,85 g/l vorliegen. Dieser Eluent sollte innerhalb von max. 9 h regeneriert werden, da er dann zur Elution des nächsten Zyklus auf der zweiten Säule benötigt wird. Daraus ergibt sich ein Volumenstrom von 113 l/min mit einer Belastung von 96 g/min Nitrat. Der Reaktor muss also so ausgelegt werden, dass er sowohl den Volumenstrom bewerkstelligen als auch die benötigte Abbauleistung aufbringen kann. Darauf soll nun an dieser Stelle etwas ausführlicher eingegangen werden.

Zur Bestimmung der Kinetik wurde von der Michaelis-Menten-Kinetik ausgegangen. Die Geschwindigkeit der Denitrifizierung wurde in Batchversuchen unter anaeroben Bedingungen in der Anwesenheit von 35 g/l NaCl (entsprechend der Salzkonzentration des Eluenten) ermittelt (s. Anhang 8.15).

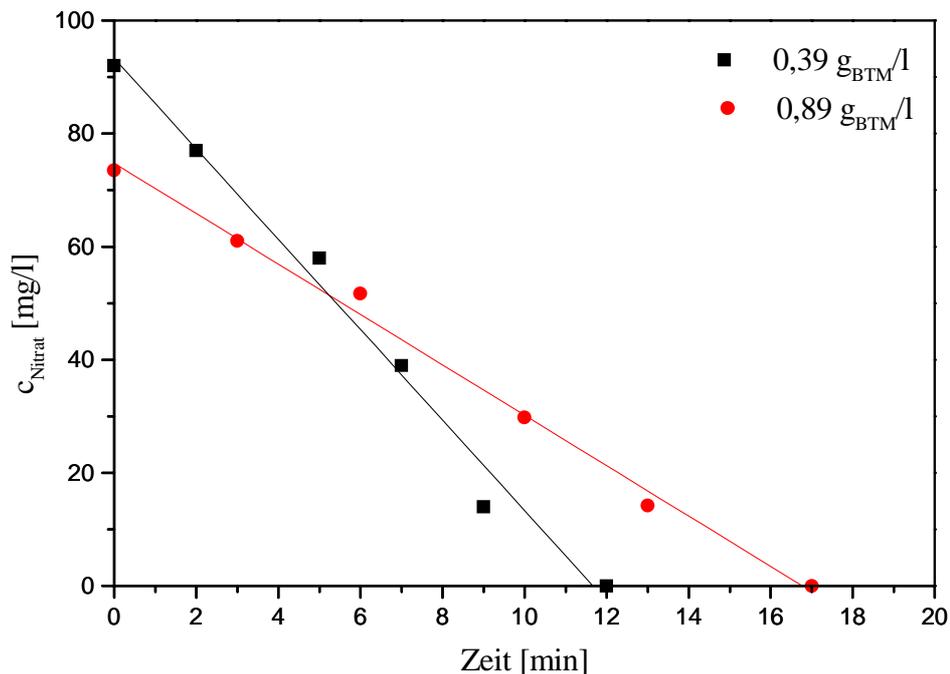


Abb. 5.4.19: Verlauf der Denitrifikation durch *Paracoccus denitrificans* bei 37 °C, pH 7,5;  $c_{\text{NaOH}} = 35 \text{ g/l}$ ; mit Acetat als Elektronendonator [326]

Wie aus der Abbildung 5.4.19 zu erkennen ist, zeigen die Kurven unabhängig von der eingesetzten Biomasse einen linearen Verlauf des Abbaues von Nitrat zu Stickstoff. Dieser Verlauf ist insofern ungewöhnlich, als das man eine asymptotische Annäherung an die Konzentration von 0 g/l Nitrat erwarten würde. Dieses ergibt sich aus den Annahmen der Michaelis-Menten-Kinetik. Für die vorliegende Abweichung liefert die Michaelis-Menten-Kinetik eine mögliche Erklärung. Für den Fall, dass die Michaelis-Konstante  $K_m$  klein gegenüber der Substratkonzentration ist, ist Geschwindigkeit der Reaktion unabhängig von der Substratkonzentration (Kinetik Nullter Ordnung) und entspricht der Maximalgeschwindigkeit. In diesem Fall würde sich für den Nitratabbau die beschriebene lineare Abnahme ergeben. Bei niedrigen Nitratkonzentrationen müssten allerdings Abweichungen vom linearen Verlauf auftreten. Dieses wird durch die aufgenommenen Messwerte nicht bestätigt. Daraus kann geschlossen werden, dass  $K_m$  derart klein, dass die Abweichungen vom linearen Abbau erst unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Analytik (2 mg/l bei 3,5 % NaCl) zum tragen kommen.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Annahme, dass die Denitrifikation bei einer Salzkonzentration von 35 g/l im betrachteten Konzentrationsbereich einer Kinetik nullter Ordnung gehorcht. Die aus der Steigung der Regressionsgeraden ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit entspricht somit der Maximalgeschwindigkeit  $v_{max}$  bei einer gegebenen Zelldichte im Reaktor. Es ist zu erwarten, dass eine Erhöhung der Zelldichte auch eine größere Reaktionsgeschwindigkeit mit sich führt. Daher bietet es sich an, dass man die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten  $v$  auf die Zelldichte normiert und somit eine auf die Zelldichte bezogene Reaktionsgeschwindigkeit  $v_z$  berechnet [326]. Die Reaktionsgeschwindigkeit oder Abbaurate  $v$  gibt dabei definitionsgemäß die Abnahme der Nitratkonzentration pro Zeiteinheit an.

$$v = \frac{dc}{dt} = \frac{dm_{Nitrat}}{dt} \cdot \frac{1}{V} \quad (\text{Gl. 5.4.7})$$

$$v_z = \frac{v}{D} = \frac{dm_{Nitrat}}{dt} \cdot \frac{1}{m_{Zellen}} \quad (\text{Gl. 5.4.8})$$

Unter der Annahme, dass keinerlei Wechselwirkungen zwischen den Bakterien untereinander vorliegen, sollte  $v_z$  bei gleichen Reaktionsbedingungen eine Konstante und damit unabhängig von der Zelldichte sein. Somit ließe sich aus der experimentell bestimmten Reaktionsgeschwindigkeit  $v_z$  durch Multiplikation mit der Zelldichte  $D$  die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  für andere Zelldichten berechnen lassen. Kinetische Untersuchungen zeigen, dass mit dem momentanen Optimierungsstand der Verfahren eine maximale Abbaurate von 5 mg/(l min) erzielt werden kann [330].

Aus der bestimmten Maximalabbaurate für Nitrat lässt sich nunmehr die Reaktorgröße bestimmen, die notwendig ist, um den anfallenden Eluenten der chromatographischen Stufe innerhalb von neun Stunden zu regenerieren. Man muss dafür die Annahme treffen, dass ein kontinuierlich betriebener idealer Rührkesselreaktor unter den gleichen Bedingungen betrieben werden kann, bei denen die Versuche zur Bestimmung der Kinetik durchgeführt wurden (37 °C; pH 7,5;  $c_{NaOH} = 35$  g/l). Zur Bestimmung des Reaktorvolumens muss die Design-Gleichung für einen CSTR gelöst werden.

$$\tau = \frac{c_0}{v} \cdot U \quad (\text{Gl. 5.4.9})$$

- $\tau$  = mittlere hydrodynamische Verweilzeit in  $\text{min}^{-1}$   
 $c_0$  = Nitratkonzentration im Zulauf in  $\text{mg/l}$   
 $U$  = Umsatz  
 $v$  = Reaktionsgeschwindigkeit in  $\text{mg}/(\text{l} \cdot \text{min})$

Unter der oben gemachten Voraussetzung, dass die Denitrifikation unter den gegebenen Reaktionsbedingungen im betrachteten Konzentrationsbereich nach einer Kinetik nullter Ordnung abläuft, kann die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  als konstant und somit als vom Umsatz unabhängig angesehen werden. Nach Ersetzen der Verweilzeit durch den Quotienten  $\dot{V}/V$  wird damit für das Reaktorvolumen  $V$  aus der Gleichung 5.4.9 die Beziehung erhalten:

$$V = \frac{\dot{V} \cdot c_0 \cdot U}{v} = \frac{\dot{m} \cdot U}{v} \quad (\text{Gl. 5.4.10})$$

- $\dot{V}$  = Volumenstrom durch den Reaktor in  $\text{l}/\text{min}$   
 $\dot{m}$  = pro Zeiteinheit eingeleitete Nitratmenge in  $\text{mg}/\text{min}$

Aus der chromatographischen Stufe wurde ein Volumenstrom von  $113 \text{ l}/\text{min}$  mit einer Belastung von  $96 \text{ g}/\text{min}$  Nitrat ermittelt. Der Reaktor muss also so ausgelegt werden, dass er sowohl den Volumenstrom bewerkstelligen als auch die benötigte Abbauleistung aufbringen kann. Nach Gleichung 5.4.10 ergibt sich für einen Umsatz von  $0,992$  – entsprechend einem Abbau der ursprünglich in der Molke enthaltenen  $250 \text{ ppm}$  auf  $2 \text{ ppm}$  – mit der ermittelten Maximalgeschwindigkeit von  $5 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/(\text{l} \cdot \text{min})$  ein benötigtes Reaktorvolumen von  $19 \text{ m}^3$ .

Bei dieser Berechnung wird allerdings davon ausgegangen, dass die katalytische Aktivität der Zellen über den gesamten Zeitraum konstant bleibt. Dieses ist aber keineswegs der Fall. Wie Untersuchungen der Kinetik gezeigt haben [330], nimmt die Aktivität der eingesetzten Zellen im Zeitraum von einer Stunde um den Faktor  $0,07$  ab. Der Aktivitätsverlust wurde über einen Zeitraum von  $32$  Tagen ermittelt. In dieser Zeit zeigte sich nahezu ein linearer Aktivitätsverlust. Dieser Verlust muss bei der Auslegung der biologischen Stufe berücksichtigt werden [326].

Die zeitliche Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit kann nach Einführen des Verlustfaktors  $\alpha$  nach folgender Gleichung beschrieben werden:

$$v(t) = \alpha^{\frac{t}{\Theta}} \cdot v_0 \quad (\text{Gl. 5.4.11})$$

Darin ist  $v_0$  die Abbaurrate frischer Zellen und  $\Theta$  die Zeit, auf die der Verlustfaktor  $\alpha$  bezogen wird, in diesem Fall 1 Stunde. Um eine kontinuierliche Abbauleistung des Nitrates zu gewährleisten, müssen entsprechend des Verlustfaktors frische Zellen dem System zugeführt werden. Hierfür gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

1. Die Denitrifikationsstufe wird in Hinblick auf den Biokatalysator im Satzbetrieb gefahren, d. h. nach X Zyklen des kontinuierlichen Abbaues von Nitrat wird der Prozess gestoppt und die Zellen im Reaktor komplett ausgetauscht. In diesem Fall berechnet sich das tatsächlich benötigte Reaktorvolumen nach Gleichung 5.4.12:

$$V = \frac{\bar{m} \cdot t_s \cdot U}{v_0 \cdot \frac{\Theta}{\ln \alpha} \left( \alpha^{\frac{t_s}{\Theta}} - 1 \right)} \quad (\text{Gl. 5.4.12}^*)$$

2. Dem System werden kontinuierlich frische Zellen zugeführt. Hier ergibt sich das notwendige Reaktorvolumen nach Gleichung 5.4.13:

$$V = \frac{1}{\frac{v_0}{\bar{m} \cdot U} + \frac{\ln \alpha}{\Theta \cdot \dot{V}_z}} \quad (\text{Gl. 5.4.13}^*)$$

$\bar{m}$  = mittlere Massefluss von Nitrat in den Reaktor [mg/(l min)]

$t_s$  = Standzeit des Systems beim satzweisen Austausch der Zellen [min]

$v_0$  = Abbaurrate frischer Zellen [mg/(l min)]

$\Theta$  = Einheitszeit [60 min]

$U$  = Umsatz

$\dot{V}_z$  = Volumenstrom der alten Zellen aus dem Reaktor [l/h]

\*Herleitung der Formeln im Anhang 8.16

Aus dem ermittelten Kinetiken ergibt sich ein Verlustfaktor von 0,993, d. h. nach 1 h sind noch 99,3 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden. Für den momentanen Entwicklungsstand des Verfahrens ergeben sich somit die folgenden Parameter zur

Berechnung der Reaktorgröße bei Verwendung einer Biotrockenmasse von 1,2 g/l *Paracoccus denitrificans*:

- $v_{max} = 5 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/(\text{l}\cdot\text{min})$
- $\bar{m} = 96.000 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{min}$
- $U = 0,992$
- $\alpha = 0,993$

Für den ersten Fall, dem satzweisen Austausch der Zellen, ergibt sich bei einer Standzeit von 24 h ein Reaktorvolumen von 20,7 m<sup>3</sup>. Für den zweiten Fall, der kontinuierlichen Zugabe frischer Zellen, ergibt sich für einen Zellstrom  $\dot{V}_Z$  von 300 l/h ein benötigtes Reaktorvolumen von 34,4 m<sup>3</sup>. Es zeigt sich, dass insbesondere im Bereich der biologischen Denitrifizierung noch Optimierungsbedarf besteht.

Welches Verfahren in einem industriellen Prozess realisiert werden kann, hängt neben diesen berechneten Größen auch von der Praktikabilität der beiden Verfahren ab. Bei der satzweisen Erneuerung der Zellen entstehen Totzeiten durch das Entleeren und erneute Befüllen des Reaktors. Dadurch wird sich die Auslegung der Anlage ändern, da am Anfang dieser Betrachtungen davon ausgegangen worden ist, dass die chromatographische Stufe kontinuierlich über eine Zwillingsanlage betrieben wird. Für die Dentrifikation stehen bei dieser Annahme keine Totzeiten zur Verfügung. Somit müsste auch hier mit einer Zwillingsanlage gearbeitet werden. Bei dem kontinuierlichen Austausch wäre das nicht der Fall. Hier ergibt sich aber das Problem, dass durch den Zellaustrag aus dem Reaktor der Eluent mit den Zellen belastet wird. Diese müssen dann außerhalb des Reaktors über eine Cross-Flow-Filtration bzw. Zentrifugation voneinander getrennt werden, wobei das Retentat nicht in den Reaktor zurückgeführt werden darf. Für diese Aufgabe könnten Durchflusseparatoren mit Feststoffauswurf eingesetzt werden.

Bei all diesen Betrachtung darf natürlich auch nicht vernachlässigt werden, dass der notwendige *P. denitrificans* mit einer entsprechenden Zelldichte in einem weiteren Bioreaktor unter anaeroben Bedingungen kultiviert und geerntet werden muss, was an dieser Stelle unberücksichtigt bleiben soll. Es wird durch das gezeigte Beispiel aber sehr deutlich, dass die Bestimmung des Verlustfaktors für die Prozessauslegung entscheidenden Einfluss hat.

Bei dem Aufbau eines solchen Verfahrens darf aber nicht nur die Effizienz der Bindung des Nitrates am Adsorberharz und die nachfolgende Denitrifizierung im Vordergrund stehen. Es ist ebenso notwendig, dass untersucht wird, inwieweit das chromatographische Verfahren Einfluss auf die Molke an sich hat. Es ist möglich, dass weitere Bestandteile der Molke (insbesondere Proteine) mit dem Harz interagieren und eventuell auf der Säule verbleiben und sich dann im Eluenten anreichern. Es ist notwendig, dass eine solche Proteinentfernung minimiert wird, um nicht spätere Ausbeuteverluste bei der Molkeverarbeitung zu verursachen. Um einen ersten Eindruck über diesen Faktor zu erhalten, wurden von dem Molkekonzentrat vor und nach der Chromatographie „Fingerprints“ über die SDS-PAGE-Gelelektrophorese angefertigt. Bei diesen sehr einfachen Untersuchungen konnte keine Veränderung der Zusammensetzung der Molkeproteine durch den Prozess festgestellt werden. Weiterführende detaillierte Versuche auf der Basis der MALDI-MS und der CE müssen dieses Ergebnis in der Zukunft noch bestätigen.

Denkbar ist auch ein alternatives Abreicherungsverfahren, bei dem die chromatographische Stufe eingespart werden könnte. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass unter der Verwendung von immobilisierten *Paracoccus denitrificans* eine direkte Reduktion von Nitrat zu Stickstoff in Molkekonzentrat möglich ist. Bei einem solchen Verfahren gilt es aber in Zukunft folgende Bedenken eindeutig zu widerlegen:

- Freisetzung von *Paracoccus denitrificans* in die Molke
- Freisetzung toxischer Stoffwechselprodukte
- Veränderung der Proteinzusammensetzung durch Verstoffwechslung

Betrachtet man den momentanen Entwicklungsstand des Verfahrens, so lässt sich zusammenfassend feststellen, dass eine Nitratabreicherung aus Molke auch im industriellen Maßstab möglich ist. Dadurch wird der Einsatz nitratarmer bzw. nitratfreier Molkeprodukte im Bereich der Diätetik, Babynahrung, Nutraceuticals und Functional Foods ermöglicht. Durch die Kombination mit der biologischen Denitrifikation kann der verwendete Eluent regeneriert werden und somit die Salzfracht im Abwasser um fast 98% reduziert werden.

## 5.5 Aufarbeitung von Kartoffelprotein

Kartoffelfruchtwasser (Abk. PPL = potatoe protein liquor) ist wie Molke und Melasse einer der landwirtschaftlichen Reststoffe, die in Deutschland in gewaltigen Mengen anfallen. Die jährliche Verarbeitungskapazität von Kartoffeln zu Stärke liegt bei ca. 3,4 Millionen Tonnen. Bei dieser Aufarbeitung fällt das Kartoffelfruchtwasser (KFW) an. Aus diesem können die Kartoffelproteine isoliert werden. Sie liegen im PPL mit einer Konzentration von ca. 20 g/l vor. Bei der oben angegebenen Kartoffelverarbeitungskapazität werden z. Z. ca. 45.000 t/a Kartoffelproteine durch Eiweißfällung aus dem PPL gewonnen. Insgesamt verfügen die Kartoffeln (*solanum tuberosum*) aber über einen Anteil von mindestens 68.000 t/a Kartoffelproteinen, die potentiell gewonnen werden könnten. Die Proteinwertigkeit der Kartoffel liegt hervorgerufen durch hohe Gehalte der essentiellen Aminosäuren Leucin, Lysin, Valin und Phenylalanin bei 71 (zur Proteinwertigkeit s. Kap. 5.3.1). Eine Nutzung der Proteine für die menschliche Ernährung ist also durchaus sinnvoll. Insbesondere im Hinblick auf eine Weiterverarbeitung, wie der Hydrolyse zu Aminosäuren oder Peptiden, ist PPL somit eine interessante Rohstoffquelle.

Über die Kartoffelproteine an sich ist erstaunlich wenig in der Literatur beschrieben. Dieses mag hauptsächlich daran liegen, dass die Kartoffel industriell zur Stärke- und nicht zur Proteingewinnung genutzt wird. Die Proteine der Kartoffel lassen sich in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe wird vom Patatin gebildet. Der Trivialname „Patatin“ bezeichnet eine Familie von Glycoproteinen, die mengenmäßig das wichtigste Kartoffelprotein darstellt. Die zweite große Gruppe der Kartoffelproteine sind die Proteasen-Inhibitoren. Diese Proteasen-Inhibitoren bilden einen Teil des Abwehrmechanismus der Kartoffel gegenüber Insektenbefall und Mikroorganismen. Die dritte Gruppe der Kartoffelproteine wird von einer großen Anzahl minorer Proteinfractionen gebildet. Beispiele hierfür sind eine Reihe von Enzymen, wie die Enzymsysteme der Stärkesynthese, die Protein-Kinasen, Phosphorylasen oder die Phenoloxidasen [331].

Patatin wurde erstmals 1980 isoliert, ausführlich untersucht, charakterisiert und beschrieben. Die Primärstruktur des Patatins – seine Aminosäuresequenz - besteht aus 362 Aminosäuren. Die Molekularmasse wird mit ca. 40 – 44 kDa angegeben. Im nativen Zustand bildet Patatin Dimere mit einer Molekularmasse von 88 kDa aus. Die Biosynthese des Patatins wird von

zwei Genklassen mit insgesamt ca. 50 – 70 Genen kodiert. Die Gene weisen laut Literatur mit 98 % eine hohe Homologie auf. Gegeben durch diese große Homologie der Gene haben die Isoformen des Patatins sehr ähnliche funktionelle Eigenschaften. Die bisher untersuchten Isoformen des Patatins unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Primärstruktur durch den Austausch einzelner Aminosäuren und bezüglich des Ausmaßes der N-glycosidisch gebundenen Kohlenhydratketten. Die einzelnen Isoformen des Patatins lassen sich analytisch mit elektrophoretischen Methoden wie der isoelektrischen Fokussierung IEF oder der Kapillarelektrophorese sowie durch Chromatographiemethoden wie RP-HPLC (Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography) unterscheiden. Für die Trennprobleme wie sie bei der Abtrennung der Kartoffelproteine während des industriell durchgeführten Kartoffelstärkeprozesses auftreten, ist es sicher gerechtfertigt, die einzelnen Isoformen des Patatins, insbesondere da sie sich auch hinsichtlich ihres thermischen Verhaltens (Folding, Unfolding) sehr ähnlich sind, technologisch als eine Gruppe zu betrachten [332]. Patatin gehört zu der Gruppe von Glycoproteinen, die N-glycosidisch verknüpft sind, also am Amid-Stickstoff vorhandener Asparaginsäurereste Oligosaccharid-Seitenketten tragen. Eine bis drei derartiger N-glycosidischer Verknüpfungen werden für das Patatinmolekül gefunden und zwar an den Asparaginsäureresten der Positionen 37, 67, 181 bzw. 92 und 301 innerhalb der Polypeptidkette des Patatins. Die gebundenen Oligosaccharid-Seitenketten bedingen eine erhöhte Hydrophilie des Patatins. Daraus folgt eine sehr gute Löslichkeit des Patatins in wäßrigen Medien. Unter den „denaturierenden“ Bedingungen beim Kartoffelstärkeprozess verlieren die Kartoffelproteine wie das Patatin weitestgehend ihre sehr gute Löslichkeit. Bemerkenswert ist der relativ hohe Tyrosingehalt des Patatins mit 17 Tyrosinresten, gekoppelt mit einem hohen Lysingehalt. Dieser Umstand hat Auswirkung auf die irreversible Präzipitation des Patatins aus dem Kartoffelfruchtwasser beim industriell durchgeführten Kartoffelstärkeprozess (s. unten). Patatin besitzt weiterhin eine enzymatische Aktivität. Es wirkt als Lipid-Acy-Lipid-Hydrolase (LAH) [333].

Die zweite große Gruppe der Kartoffelproteine sind die Protease-Inhibitoren. Das Vorkommen von Protease-Inhibitoren in Pflanzen ist seit 1938 bekannt. Nach heutigem Forschungsstand wird den Proteasen-Inhibitoren eine wichtige Funktion innerhalb der Pflanzenabwehr gegenüber Insektenbefall und Mikroorganismen zugeschrieben. So wird die Anwendung von Proteasen-Inhibitoren als Bioinsektizide in transgenen Pflanzen diskutiert. Weiteres Interesse an den Proteasen-Inhibitoren kommt von Seiten der Pharmaindustrie und dem Markt der funktionellen Lebensmittel. Proteasen-Inhibitoren wird eine Blutzucker

regulierende Wirkung, eine gewichtsregulierende Wirkung sowie eine gewisse anticarcinogene Wirkung zugeschrieben. Da 20 – 30 % der aus der Kartoffel extrahierbaren Proteine zur Gruppe der Proteasen-Inhibitoren gehören, stellt die Kartoffel eine sehr gute Quelle für die Gewinnung eines breiten Spektrums von Proteasen-Inhibitoren dar. Die Proteasen-Inhibitoren – die Kartoffelinhibitor I- und II-Familien – haben die Fähigkeit, gleich fünf Hauptverdauungsenzyme (Trypsin, Chymotrysin, Elastase und die Carboxypeptidasen A und B) bei höheren Tieren und Insekten zu inhibieren. Außerdem zeichnen sich die Proteasen-Inhibitoren durch eine hohe thermische Stabilität aus. Eine Inaktivierung der Proteasen-Inhibitoren gegenüber Trypsin erfordert eine Temperatur von 130 °C und eine Einwirkungsdauer von 30 Minuten. Das kommerzielle Interesse an den Proteasen-Inhibitoren kommt auch darin zum Ausdruck, dass in der neueren Patentliteratur Verfahren beschrieben werden, die es gestatten, die Proteasen-Inhibitoren effektiv aus der Kartoffel zu extrahieren [334]. Die Molekularmassen der Proteasen-Inhibitoren der Kartoffel liegen in einem Bereich von 9 - 25 kDa. Es werden aber auch Agglomerate von ca. 40 kDa gebildet. Im Unterschied zur Patatin-Fraktion zeigt die Proteinfraction der Proteasen-Inhibitoren nahezu keine Abhängigkeit der Löslichkeit vom pH-Wert. Untersucht wurde der pH-Bereich von pH 2 bis 12. Die Patatin-Fraktion zeigt ein Minimum der Löslichkeit im Bereich pH 4 bis 5. Gegenüber thermischer Denaturierung, wobei als Maß für die Denaturierung die Löslichkeit betrachtet wurde, zeigt sich die Proteinfraction der Proteasen-Inhibitoren resistenter als die Proteinfraction des Patatins. Temperaturen zwischen 20 – 60°C haben keinen Einfluss auf die Löslichkeit der Proteasen-Inhibitoren. Erst ab 80°C verringert sich je nach Salzgehalt der Lösung ihre Löslichkeit [331].

Bei der irreversiblen Präzipitation der Kartoffelproteine, wie sie bei der Abtrennung der Proteine während des Kartoffelstärkeprozesses stattfindet, kann mit ziemlich hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass ein großer Teil der Proteasen-Inhibitoren zusammen mit dem Patatin ausgefällt wird. Ein Teil der Inhibitoren wird aber wohl auch noch nach der üblichen Heißdampf-Injektion, die mit 110 - 115°C durchgeführt wird, im Kartoffelfruchtwasser gelöst zurück bleiben. Aufgrund ihrer hohen thermischen Stabilität ist es durchaus denkbar, dass ihre Proteasen hemmende Aktivität erhalten bleibt. Bei einer nachgeschalteten Behandlung des Kartoffelfruchtwassers mit Proteasen ist daher durchaus die Möglichkeit gegeben, dass eingesetzte Proteasen in ihrer Wirkung gehemmt werden. Auch in den beim Kartoffelstärkeprozess gewonnenen Kartoffelproteinisolaten

können mitgefällte Proteasen-Inhibitoren möglicherweise eine nachfolgende Hydrolyse der Kartoffelproteine mittels Proteasen negativ beeinflussen.

Neben der Proteinfraction des Patatins und der Proteinfraction der Proteasen-Inhibitoren gibt es eine große Zahl minorer Proteinkomponenten in der Kartoffel bzw. im Kartoffelfruchtwasser. Einzeln gesehen repräsentieren sie zwar jeweils für sich nur einen verschwindend kleinen Anteil am Gesamtproteingehalt der Kartoffeln, in ihrer Gesamtsumme sind diese minoren Proteine aber bedeutend. Ihr Anteil wird mit ca. 20 – 30 % am Gesamtproteingehalt der Kartoffel angegeben. Zu den minoren Proteinen zählen viele Enzyme wie z.B. die Enzyme der Stärkesynthese, die Protein-Kinasen oder die Phosphorylasen. Eine interessante Verbindungsklasse sind die in Kartoffeln vorhandenen Lectine oder Phytohämagglutine. Unter anderem bewirken sie die Mitose - die indirekte Zellteilung. Die meisten der minoren Proteine der Kartoffel sind bisher noch nicht charakterisiert und beschrieben worden [331].

Eine weitere wichtige Substanzklasse im PPL bilden die Polyphenoloxidasen. Andere Namen für diese Enzyme sind Catechol-Oxidasen oder Tyrosinasen. Diese Enzyme gehören zur Familie der sogenannten Typ-3-Kupferproteine. Polyphenoloxidasen oxidieren allgemein Phenole zu Diphenolen sowie durch nachfolgende Oxidation die Diphenole weiter zu Chinonen.

Kartoffeln enthalten neben der Stärke und den beschriebenen Proteinen eine Vielzahl phenolischer bzw. polyphenolischer Verbindungen, die sich ebenfalls im Fruchtwasser wiederfinden lassen. Die mengenmäßig wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind die Chlorogensäure und Isochlorogensäuren. Weiterhin kommen häufig die Kaffeesäure, Ferulasäure und p-Cumarsäure vor, sowie die in Pflanzen allgemein weit verbreiteten Farbstoffe aus der Gruppe der Flavone und Anthocyane, Aromastoffe wie Cumarinderivate und Vanillin und des weiteren hochpolymere polyphenolische Makromoleküle wie Tannin – ein Glycosid der Gallussäure – und Lignin als Gerüstsubstanz der Zellwände. Eine Sonderrolle nimmt die Aminosäure Tyrosin ein. Tyrosin kommt sowohl frei als Aminosäure im Kartoffelfruchtwasser vor als auch gebunden als Bestandteil der Polypeptidkette (d.h. in der Primärstruktur) des mengenmäßig wichtigsten Kartoffelproteins, des Patatins.

### 5.5.1 Proteingewinnung beim Kartoffelstärkeprozess – Stand der Technik

Derzeitiger Stand der Technik ist, dass aus dem Rohstoff Kartoffel neben dem Hauptprodukt Stärke als Nebenprodukte nur die Kartoffelproteine als Gesamtfraction während des industriell durchgeführten Kartoffelstärkeprozesses gewonnen werden. Die Kartoffelproteine werden dabei über Heißdampf-Injektion bei einer Temperatur von 110 – 115 °C bei einem pH-Wert von 4,8 bis 5,2 – also am isoelektrischen Punkt der Kartoffelproteine – aus dem Kartoffelfruchtwasser ausgefällt (koaguliert) [335]. Ein entsprechendes Prozessschema ist in der Abbildung 5.5.1 dargestellt.

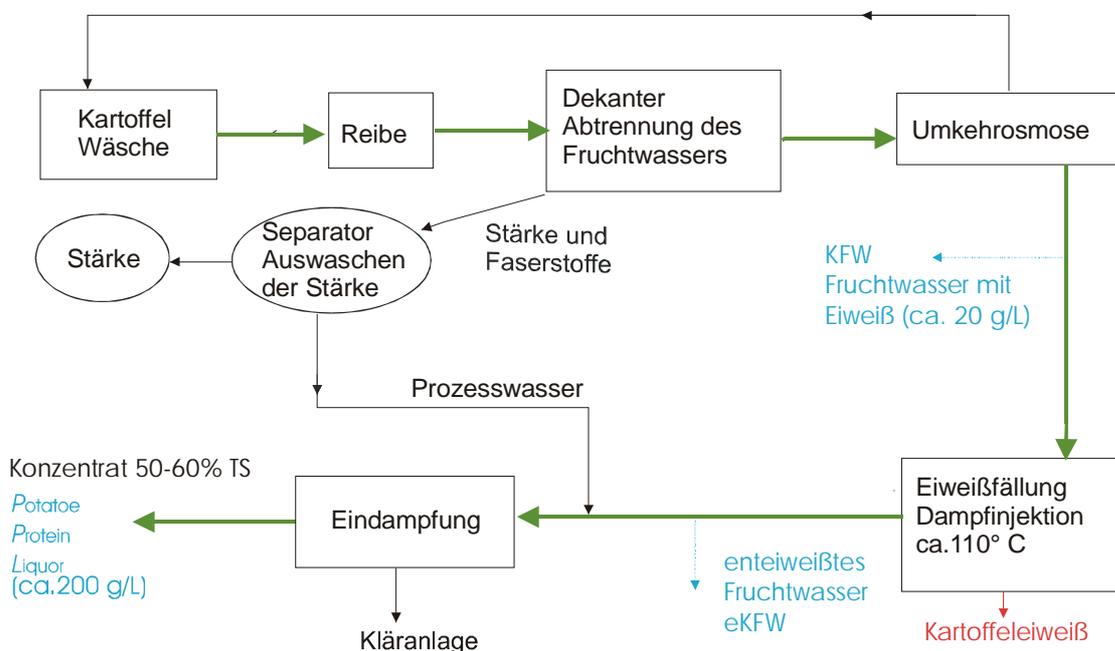


Abb. 5.5.1: Prozessschema zur Gewinnung von Kartoffelprotein (Quelle: Emslandstärke)

Der Mechanismus bei der thermisch induzierten Proteinfällung aus dem Kartoffelfruchtwasser beim industriellen Kartoffelstärkeprozess ist bisher weitestgehend unbekannt. Man kann aber davon ausgehen, dass unter den Bedingungen der Proteinausfällung im Kartoffelfruchtwasser die Kartoffelproteine mit zahlreichen Begleitkomponenten, die ebenfalls im Kartoffelfruchtwasser enthalten sind, reagieren. Als wesentliche, reaktive Begleitkomponenten sind hier zu nennen: Phenole, Polyphenole, Tannin, sowie die verschiedenen Kohlenhydrate.

Wichtig bei diesem Prozess sind auch die konformativen Änderungen der Kartoffelproteine. Erste Änderungen der Tertiärstruktur von Patatin wurden bereits bei Temperaturen oberhalb

28 °C beobachtet. Zwischen 25 und 35 °C ist die Enzymaktivität als Lipid-Acyl-Hydrolase maximal. Bei Temperaturen oberhalb 45 °C beginnt die Entfaltung der Sekundärstruktur. Zwischen ca. 50 und 55 °C setzt die Entfaltung der  $\alpha$ -Helix ein. In diesem Temperaturbereich geht auch die Enzymaktivität nahezu vollständig verloren [336]. Reines Patatin zeigt ein anderes Verhalten. Auch bei Temperaturen von 90 °C bleibt eine Lösung von reinem Patatin klar. Es wurden keine Aggregate des Patatins mittels Methoden wie Circulardichroismus (CD), Infrarot- oder Fluoreszenzspektroskopie gefunden. Reines isoliertes Patatin erleidet keine Präzipitation bei Erhitzung, ganz im Gegensatz zu der irreversiblen Präzipitation real im Kartoffelfruchtwasser. Die Präzipitation im realen Kartoffelfruchtwasser wird bei Temperaturen oberhalb der Denaturierungstemperatur des Patatins, also nach seiner Entfaltung des Proteinmoleküls, beobachtet. Nach der Entfaltung hat das Proteinmolekül die Möglichkeit, mit den zahlreichen Verbindungen im realen Kartoffelfruchtwasser zu reagieren. Insbesondere Reaktionen mit den zahlreich im Kartoffelfruchtwasser enthaltenen phenolischen Verbindungen wie z.B. Chlorogensäure, Kaffeesäure, Tyrosin usw. werden als Grund für die irreversible Präzipitation der Kartoffelproteine im Realmedium Kartoffelfruchtwasser vermutet.

Das komplexe System aus phenolischen bzw. polyphenolischen Verbindungen wie z.B. der Chlorogensäure oder der Aminosäure Tyrosin, der Enzymgruppe der Polyphenoloxidasen und der Kartoffelproteine im Kartoffelfruchtwasser spielt generell wohl eine entscheidende Rolle bei der irreversiblen Ausfällung der Kartoffelproteine wie sie bei der Heißdampf-Injektion während des Kartoffelstärkeprozesses durchgeführt wird. Verbindungen wie die Chlorogensäure werden durch die Phenoloxidasen zu ihren entsprechenden Chinonen oxidiert. Diese Chinonderivate der Chlorogensäure reagieren mit vorhandenen Proteinen im Kartoffelfruchtwasser [337]. So können sich hochmolekulare, komplex aufgebaute Agglomerate aus den Kartoffelproteinen und den zu ihren entsprechenden Chinonderivaten oxidierten Polyphenolen im Kartoffelfruchtwasser bilden. Die Folge ist, dass ein mehr oder weniger großer Teil der Proteine, die beim Kartoffelstärkeprozess aus dem Kartoffelfruchtwasser mittels Heißdampf ausgefällt werden, eben diese Polyphenole gebunden hat. Bei der Bindung der Polyphenole über ihre Chinonstufe handelt es sich um weitestgehend rein kovalente chemische Bindungen. Die Proteine liegen also in einer strukturell stark veränderten Form vor und werden aus diesem Grund ihre ursprünglichen funktionellen Eigenschaften mehr oder weniger verlieren. Dieser Vorgang, die Reaktion zwischen Protein und Polyphenol, entspricht mehr einer Proteinmodifizierung als dem

Prozess, der durch den Begriff der „Proteindenaturierung“ zu beschreiben wäre. Unter dem Begriff „Proteindenaturierung“ wird jede Veränderung der Konformation der Proteine im Bereich ihrer Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur verstanden, die ohne Veränderung der Primärstruktur abläuft. Allerdings werden die Kartoffelproteine bei der Heißdampf-Injektion, die bei einer Temperatur von 110 – 115 °C durchgeführt wird, durchaus thermisch denaturiert.

Eine Sonderstellung bei diesem Vorgang nimmt die Aminosäure Tyrosin ein. Tyrosin wird ebenso wie die anderen Phenol- bzw. Polyphenolverbindungen von den im Kartoffelfruchtwasser vorhandenen Polyphenoloxidasen über die Stufe des Diphenols (Dopa) zum Dopachinon oxidiert. Dies führt einerseits zu der bekannten Melaminbildung mit der daraus resultierenden Pigmentbildung. Weiter kann das Dopachinon des Tyrosins mit einer Vielzahl freier Aminosäuren, die im Kartoffelfruchtwasser vorhanden sind, reagieren. Reaktionspartner sind dabei die NH<sub>2</sub>-Gruppen der Aminosäuren. Bedeutungsvoller für das Problem der irreversiblen Präzipitation der Kartoffelproteine während des industriell durchgeführten Kartoffelstärkeprozesses dürfte allerdings sein, dass innerhalb des mengenmäßig wichtigsten Kartoffelproteins, des Patatins, die dort im beträchtlichen Umfang vorhandenen Tyrosinreste zum Dopachinon oxidiert werden und es innerhalb des Patatinmoleküls zu Quervernetzungsreaktionen mit den NH<sub>2</sub>-Gruppen bevorzugt der Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin kommt. Auch können durch diese Reaktion verschiedene Patatinmoleküle untereinander quervernetzt werden. Es bilden sich größere Aggregate bis hin zu gelartigen Strukturen. Die Proteine büßen auf Grund dieser Reaktionen ihre funktionellen Eigenschaften wie z. B. ihre Löslichkeit ein. Als Stütze für den beschriebenen Mechanismus kann gelten, dass für das Gebiet der medizinischen Klebstoffe tyrosin- und lysinreiche Proteinsequenzen, deren Vernetzung u.a. über Phenoloxidasen gestartet wird, patentiert wurden [338, 339].

Es lässt sich somit feststellen, dass bei den bisher etablierten Prozessen zur Kartoffelproteingewinnung die Proteine weitestgehend denaturieren und nahezu vollständig ihre funktionellen Eigenschaften verlieren. Die Qualität der so gewonnenen Proteinisolate, die einen Proteingehalt von 80 – 85 % aufweisen, gestattet derzeit lediglich eine Verwendung als Viehfutter, verbunden mit entsprechend geringer Wertschöpfung am Gesamtprozess. Geschmack, Geruch und Aussehen der Proteinisolate sowie auch die geringe Löslichkeit der Proteine – bedingt durch ihre Denaturierung – schließen deren Verwendung für die

menschliche Ernährung und in der Nahrungsmittelindustrie derzeit aus, obwohl gerade die Kartoffelproteine wegen ihres für ein Pflanzenprotein hohen Lysingehaltes von 7,5 % sehr gut für die menschliche Ernährung geeignet wären. Produkte wie z.B. Backwaren könnten so hinsichtlich ihres Lysingehaltes aufgewertet werden. Cerealien-Proteine enthalten vergleichsweise wenig Lysin [331]. Eine Einschränkung der Verwendung der Proteinisolate in der Lebensmittelindustrie oder auch als Viehfutter kann sich dadurch ergeben, dass derartige Proteinisolate Glycoalkaloide, hauptsächlich Solanin, in einer Menge von 500 – 5000 mg pro kg Proteinisolat enthalten können. Die Glycoalkaloide bewirken in höheren Konzentrationen einen bitteren Geschmack und können toxisch wirken, indem sie das Enzym Cholinesterase hemmen [340, 341]. Solanin und verwandte Substanzen können nach hoher Exposition akut toxische Symptome auslösen, so z.B. Erbrechen, Durchfall, Spasmen, Apathien, in schweren Fällen Nierenentzündungen, Hämolyse, bis hin zu Koma und Exitus. Insbesondere werden teratogene Effekte diskutiert, die in der Frühschwangerschaft nach dem Konsum Solanin-haltiger Lebensmittel auftreten können.

Neben der thermisch induzierten Proteinausfällung bieten sich Membrantrennverfahren wie die Ultrafiltration oder die Mikrofiltration für die Abtrennung von Proteinen aus Kartoffelfruchtwasser an. Allerdings konnten bisher die für die Trennung von Milchproteinen im großen Umfang genutzten beiden Membrantrennverfahren Ultrafiltration und Mikrofiltration (s. Kapitel 5.3) für die Abtrennung bzw. Auftrennung der Kartoffelproteine noch nicht wirtschaftlich eingesetzt werden. Die Gründe hierfür sind, dass derzeit die realisierbaren Filtrationsleistungen für das gegebene Trennproblem noch zu gering sind. Insbesondere Foulingprobleme reduzieren die Filtrationsleistung. Die Entwicklung neuer Membrantypen wie keramische Membranen mit optimierten Strömungsbedingungen können hier eine Verbesserung der Filtrationsleistung erbringen [342]. Ein Vorteil der Membrantrennverfahren ist sicherlich, dass dabei die Proteine weder thermisch belastet werden, noch besonderem mechanischen Stress ausgesetzt sind. Die Proteine behalten ihre funktionellen Eigenschaften wie Löslichkeit, Wasserbindungsvermögen, und Emulsionseigenschaften (s. hierzu auch Tabelle 5.3.2 am Beispiel der Molkeproteine).

Eine Anzahl von Arbeiten wurde unter dem Aspekt durchgeführt, die Kartoffelproteine während des industriellen Kartoffelstärkeprozesses möglichst nativ zu gewinnen. Eingesetzt wurden hierfür neben einer Reihe verschiedener Säuren wie Zitronensäure, Essigsäure, Phosphorsäure, Salzsäure oder Schwefelsäure auch Salze wie  $\text{FeCl}_3$  oder  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  zur

Präzipitation der Proteine, ebenso spezielle Koagulationsmittel wie Carboxymethylcellulose (CMC) oder Bentonite. Mit diesen Methoden konnte zwar eine effiziente Protein-Präzipitation erreicht werden, die funktionellen Eigenschaften der Proteine blieben dabei jedoch nicht in ausreichendem Maße erhalten [343, 344].

### 5.5.2 Gewinnung von Aminosäuren aus Kartoffelprotein

Es lässt sich somit feststellen, dass es bis heute keinen industriell eingesetzten Prozess gibt, der es erlaubt, Kartoffelproteine bzw. Kartoffelproteinisolate in einer für die Verwendung in Lebensmitteln geeigneten Qualität zu erzeugen, so dass die Proteine für die menschliche Ernährung bzw. in der Lebensmittelindustrie bisher nicht einsetzbar sind. Deshalb rückt eine andere Art der Nutzung dieser Proteine in den Mittelpunkt des Interesses. Über eine Hydrolyse der Proteine zu Aminosäuren oder Peptiden ließe sich zu mindestens der ernährungsphysiologische Wert der Proteine erhalten. Im Allgemeinen ist die Versorgung mit Aminosäuren bei der in Deutschland üblichen Ernährungsweise im Bevölkerungsdurchschnitt mehr als gesichert. Es existieren allerdings zahlreiche Situationen, in denen die gezielte Aufnahme hochwertiger Proteine oder Aminosäuregemische von Vorteil bzw. notwendig sein kann. Hierzu zählen die Ernährung von Kleinkindern, Zusatznahrungen für alte Menschen, Formelnahrungen für die enterale Ernährung, Formuladiäten zur Gewichtsreduktion sowie Diäten bei Malnutrition, der Muskelaufbau bei Sportlern oder die Ernährung bei verschiedenen Erkrankungen, die mit einem erhöhten Proteinbedarf eingehen (z.B. Krebserkrankungen, AIDS). Hierbei muss sichergestellt werden, dass eine ausreichende Verfügbarkeit der Aminosäuren gewährleistet ist und keine verarbeitungsbedingte Hitzeschädigung im Sinne einer vermehrten Bildung von Lysinoalanin oder anderer veränderter ungewöhnlicher Aminosäuren auftritt. Lange Zeit wurden zu diesem Zweck neben den bereits beschriebenen Milch- und Molkeproteinen verschiedene Sojaproteine eingesetzt. Die Diskussionen um mögliche Risiken durch „Gen-Soja“ haben dazu geführt, dass eine zunehmende Zahl von Verbrauchern diesen Rohstoff ablehnt und somit neue Proteinquellen erschlossen werden müssen.

In der Tabelle 5.5.1 ist der geschätzte Bedarf an essentiellen Aminosäuren für einen Erwachsenen mit dem Gehalt an Aminosäuren in der Kartoffel gegenüber gestellt. Es lässt sich sehr gut erkennen, dass der Gehalt an Aminosäuren im Kartoffelprotein eine

ausgezeichnete Basis zur Formulierung der oben genannten Spezialernährungen darstellt. Wie bereits im beschriebenen Fall der Molkeproteine kann hier ein landwirtschaftlicher Reststoff durch bioverfahrenstechnische Veredelung zur Herstellung von hochwertigen Komponenten für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie herangezogen werden.

Tab. 5.5.1: Geschätzter Bedarf an essenziellen Aminosäuren für einen Erwachsenen mit einem Körpergewicht von 70 kg und Gehalt in 100 g Kartoffel [345]

<b>Aminosäure</b>	<b>Täglicher Bedarf [mg]</b>	<b>Gehalt [mg/100g Kartoffel]</b>
Isoleucin	700	100
Leucin	980	140
Lysin	840	130
Methionin u. Cystein*	910	50
Phenylalanin u. Tyrosin*	980	180
Threonin	490	90
Tryptophan	280	30
Valin	700	130

\*Met und Cys bzw. Phe und Tyr können im Stoffwechsel ineinander überführt werden.

Zur Produktion der Aminosäuren, die neben den beschriebenen Anwendungsbereichen auch in großen Mengen für die Tierernährung benötigt werden, existieren folgende Verfahren:

- Extraktion (aus natürlichen Quellen und Proteinhydrolysaten)
- Chemische Synthese
- Produktion mit Hilfe von Mikroorganismen
- Enzymatische Katalyse

Durch Extraktion (in Sinne von Isolierung durch beispielsweise Ionenaustausch und fraktionierte Kristallisation) aus Proteinhydrolysaten lassen sich beinahe alle proteinogenen L-Aminosäuren gewinnen. Rohstoffe hierfür sind proteinreiche Produkte, wie z.B. Keratin, Federn oder Blutmehl. Bei der industriellen Herstellung von Ölen aus Ölsaaten von Raps, Hanf und Soja fallen überdies proteinreiche Rückstände an, die zu ca. 30% aus Proteinen

bestehen. Eine der bestverfügbaren natürlichen Quellen für Aminosäuren ist die Zuckerrübenmelasse. Auf diesen Prozess wird ausführlich in Kapitel 6.2 eingegangen.

Bei der chemischen Synthese entsteht im Allgemeinen ein racemisches Gemisch. Im Falle von D,L-Methionin für die Tierernährung kann dieses direkt vermarktet werden. Bei der Verwendung für die Humanernährung sind enantiomerenreine Aminosäuren einzusetzen. In Einzelfällen lässt sich die L-Aminosäure direkt durch chirale Synthese aus einer prochiralen Vorstufe darstellen. Durch die Verwendung von Mikroorganismen in Fermentationsprozessen lassen sich optisch reine Aminosäuren darstellen. Als Kohlenstoffquelle werden hier Saccharose (aus Melasse) oder Glucose (aus Stärkehydrolysat) eingesetzt. Die Stickstoffquelle bildet entweder Harnstoff oder Ammoniumsulfat. Wildstämme führen zu den Aminosäuren Glutaminsäure, Alanin, Valin [346]. Durch rekombinante oder gezielt selektierte Mikroorganismen zugängliche Aminosäuren sind Lysin, Threonin, Arginin, Citrullin, Ornithin, Homoserin, Phenylalanin und Histidin. Der Zusatz von Precursoren zur Fermentation liefert beispielsweise Aminosäuren wie Threonin, Isoleucin und Tryptophan.

Zur enzymatischen Katalyse werden entweder ganze Zellen oder aktive Zellkomponenten (welche die entsprechenden Enzyme enthalten) eingesetzt. Bei kontinuierlicher Reaktionsführung ist zusätzlich eine Immobilisierung der Biokatalysatoren nötig. Zugänglich sind durch diese Methode unter anderem Tryptophan, Lysin, Asparaginsäure, Alanin und D-p-Hydroxyphenyl-glycin.

Eine Übersicht über die bisher publizierten industriellen Darstellungsmethoden und die geschätzten Produktionsmengen von Aminosäuren in den Jahren 1986 bzw. 1996 ist in der Tabelle 5.5.2 dargestellt.

Tab. 5.5.2: Jahresproduktion an Aminosäuren 1986 und 1996; publizierte Darstellungsmethoden [347, 348]

Aminosäure	Produktion 1986 (jato)		Produktion 1996 (jato)	Produktionsmethoden				
	Japan	Weltweit	Weltweit	F	E	C	C+R	Ex
Glycin	3.500	6.000	8.000-100.000			x, o		
L-Alanin	150		100-1.000		x, o		x	
DL-Alanin	1.500					x		
L-Asparaginsäure	2.000	4.000	8.000-100.000		x, o			
L-Asparagin	30		100-1.000		x			x, o
L-Arginin	700	1.000	1.000-8.000	x, o				x, o
L-Cystein	300	1.000	1.000-8.000		x	o		x, o
L-Glutaminsäure	80.000	340.000	100.000-800.000	x, o				
L-Glutamin	850		100-1.000	x, o				o
L-Histidin	250		100-1.000	x, o				o
L-Isoleucin	200		100-1.000	x, o				o
L-Leucin	200		100-1.000	o				x, o
L-Lysin	30.000	70.000	100.000-800.000	x, o	x			
L-Methionin	150		100-1.000		o		x	
DL-Methionin	30.000	250.000	100.000-800.000			x, o		
L-Phenylalanin	1.500	3.000	8.000-100.000	x, o			x	
L-Prolin	150		100-1.000	x, o				x, o
L-Serin	60		100-1.000	x, o				x, o
L-, DL-Threonin	200		8.000-100.000	x, o		x		
L-, DL-Tryptophan	250		1.000-8.000	x, o	x	x	x	x
L-Tyrosin	60		100-1.000					x, o
L-Valin	200		100-1.000	x, o	o		x	

(F) Produktion mit Mikroorganismen (Fermentation), (E) Enzymatische Katalyse, (C) Chemische Synthese, (R) Enantiomerentrennung, (Ex) Extraktion x = 1986 o = 1996

Produktionsschätzungen für Aminosäuren sind wenig spezifisch, da die Produktionsdaten in diesem Sektor infolge einer starken Konzentration der Geheimhaltung unterliegen; allein die von den Unternehmen veröffentlichten Unternehmensdaten können zur Ermittlung des

Produktionsniveaus herangezogen werden. So übersteigt das Produktionspotential das Produktionsvolumen derzeit um durchschnittlich 50 Prozent, und dennoch geht der Trend in Richtung Produktionsausweitung: Marktführer wie Degussa erhöhen nicht nur die Marktpreise, sondern dehnen ihr Produktionsvolumen beispielsweise mit dem Bau der weltweit größten Methionin-Anlage mit einer Kapazität von 150.000 Tonnen pro Jahr und einer Verdoppelung der L-Threonin-Kapazität deutlich aus. Auf Basis dieser Daten liegt der geschätzte Umsatz bei Aminosäuren auf dem US-amerikanischen Markt beispielsweise bei 1,1 Mrd. US-Dollar, wobei eine steigende Nachfrage von über 5 % jährlich zu beobachten ist. Den größten Wachstumsmarkt weltweit stellen bei der Nachfrage Energiegetränke und kraftspendende Nahrungsmittel der Fitnessindustrie sowie Diätetika dar, während bei der pharmazeutischen Industrie in Zukunft eine Ausdehnung der Geschäftsaktivitäten auf nachfragestarke benachbarte Anwendungsgebiete wie Anti-Age-Kosmetika zu erwarten ist.

Der hohe Gehalt an essentiellen Aminosäuren in Proteinproben (z.B. Leucin 0,12 %, Lysin 0,96 %, Phenylalanin 0,08 %) aus dem Kartoffelverarbeitungsprozess belegt das große Potential zur Isolierung und Nutzung dieser biologischen Komponenten. Denn gerade die Aminosäuren sind neben ihrer positiven physiologischen Wirkung auch aufgrund ihrer Eignung als natürliche Aromastoffe und Geschmacksverstärker gefragt und auch in der Kosmetikindustrie als Basis hochwertiger Hautcremes geschätzt. Eine Abschätzung der möglichen Erträge bei Isolierung der Aminosäuren aus verschiedenen nachwachsenden Rohstoffen ist in Abbildung 5.5.2 dargestellt. Die Daten wurden anhand der Marktpreise der Rohstoffe und der Marktpreise der zu gewinnenden Aminosäuren berechnet. Hierzu wurde angenommen, dass sich die in den Proteinen enthaltenen Aminosäuren durch eine Hydrolyse ohne Verlust gewinnen lassen. Dieses ist verfahrenstechnisch natürlich nicht möglich. Es kann anhand der ermittelten Daten aber gezeigt werden, dass das Kartoffelprotein eine hervorragende Aminosäurequelle darstellt. Vom zu erwartenden Gewinn her, wird das Kartoffelprotein nur von Reiskleber, Sojaprotein und Weizenkleber übertroffen. Diese Rohstoffe stehen in Deutschland nicht in großer Menge zur Verfügung.

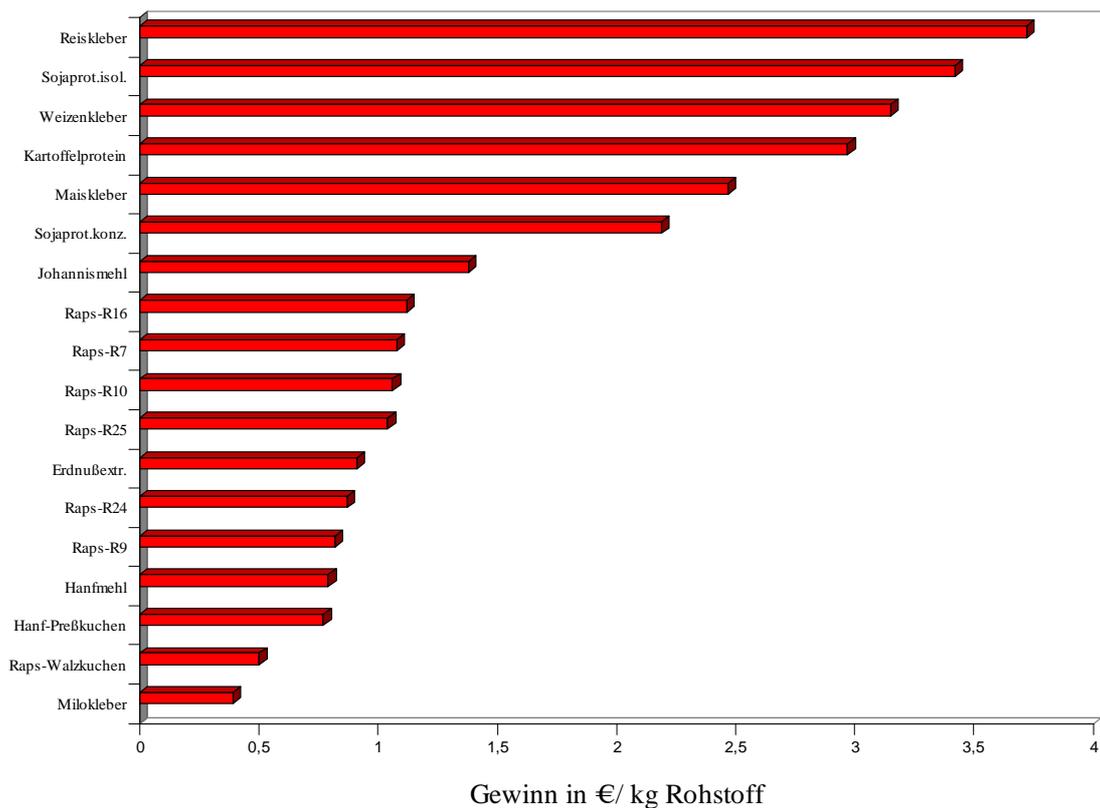


Abb. 5.5.2: Erträge der Aminosäuren bei Isolierung aus verschiedenen Rohstoffen

Um die Aminosäuren aus dem Protein zu gewinnen, muss dieses hydrolysiert werden. Stand der Technik bei der Herstellung von Proteinhydrolysaten sind saure Hydrolyseverfahren [349], die zwar ausgereift sind, aber neben einer schlechten Energiebilanz auch hohe Salzfrachten verursachen. Die sauren Hydrolyseverfahren sind von der Umweltbelastung aus gesehen bedenklich. So fallen bei der Hydrolyse pro Tonne gewonnener Aminosäure ca. 0,75 Tonnen Natriumchlorid an. Nachteilig bei diesem Hydrolyseprozess ist außerdem, dass die enantiomeren Reinheiten der Aminosäuren verloren gehen und Aminosäureracemate entstehen. Die Auftrennung der Aminosäurehydrolysate erfolgt durch Ionenaustauscherharze. Peptidreste werden insgesamt abgetrennt und nicht weiter verarbeitet.

Der Aufschluss aminogener Rohstoffe tierischen oder pflanzlichen Ursprungs geschieht durch saure Hydrolyse in emaillierten Autoklaven in 5,8 molarer Salzsäure, je nach Rohstoff über 6 - 10 h bei 130°C, wobei pro mol Peptidbindung ca. 1,2 mol Protonen benötigt werden. Nach erfolgter Hydrolyse wird der Reaktionsansatz von unlöslichen Bestandteilen (Faserstoffe, Huminstoffe etc.) durch Filtration befreit und der Filterkuchen nachextrahiert [350].

Der Hydrolysatrückstand kann in neutralisierter und gewaschener Form je nach Salzgehalt als Bodenverbesserer eingesetzt, oder muss verbrannt oder deponiert werden. Das flüssige Hydrolysat wird durch Aktivkohlefiltration entfärbt und neutralisiert. Dies geschieht entweder durch Zugabe von Natronlauge oder mittels eines schwachbasischen Anionenaustauschers auf Polystyrol- oder Acrylbasis, der allerdings in Folge auch mit noch größeren, überstöchiometrischen Alkalienmengen ( $\text{NH}_3$  und  $\text{NaOH}$ ) regeneriert werden muss.

Bei Erreichen eines pH-Wertes von 3,2, dem isoelektrischen Punkt der Glutaminsäure, lässt sich diese anteilmäßig wichtigste Aminosäure durch Fällungskristallisation zu 60 - 80% abtrennen. Eine quantitative Abtrennung der sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure erfolgt dann bei pH 4,7 durch Bindung auf einem schwachbasischen Anionenaustauscherharz in Chloridform, während sich die neutralen und basischen Aminosäuren im Durchlauf wiederfinden.

Die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin können dann analog bei pH 7 und Histidin bei pH 7,7 auf einem schwachsauren Kationentauscher in  $\text{H}^+$ -Form binden. Die aromatischen Aminosäuren werden schließlich durch Adsorption an spezifische Adsorberharze von den anderen neutralen Aminosäuren getrennt. Eine Trennung der verbleibenden aliphatischen Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin, Glycin sowie Threonin, Serin und Prolin kann durch chromatographische Trennverfahren sowie Extraktions- und fraktionierte Fällverfahren erreicht werden. Entsprechende Verfahren sind zumeist spezifisches Firmen-Know-How und nicht immer in der Literatur adäquat beschrieben.

Die Säureamide Glutamin und Asparagin sowie Cystein und Tryptophan werden größtenteils bei den oben beschriebenen Hydrolysebedingungen zerstört und sind deshalb nicht zugänglich. Die Gesamtausbeute  $Q_{AS}$  der einzelnen Aminosäure ist deshalb proportional zu

- dem Anteil der jeweiligen Aminosäure an der Proteinzusammensetzung  $X_{\text{prot}}$ ,
- der Ausbeute nach erfolgter Hydrolyse  $Q_{\text{hyd}}$  sowie
- der Ausbeute des verwendeten Aufreinigungsverfahrens  $Q_{\text{sep}}$ ,

so dass sich folgende Gleichung ergibt:

$$Q_{AS} = X_{\text{prot}} * Q_{\text{hyd}} * Q_{\text{sep}} \quad (\text{Gl. 5.5.1})$$

Somit müssen für einige Aminosäuren entweder sehr schonende Hydrolysen unter Schutzgasatmosphäre und Zusatz von Antioxidantien gewählt, oder falls  $X_{\text{Prot}}$  sehr klein ist (Methionin, Tryptophan), alternative synthetische Verfahren (chemisch oder biotechnologisch) zu deren Herstellung verwendet werden. Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die bisher verwandten sauren Hydrolyseverfahren folgende Nachteile aufweisen:

- Hoher Chemikalieneinsatz
- Anfall großer Mengen an Salzfracht
- Anfall von Stickstofffrachten
- Hoher Energieeinsatz
- Gewinnung von enantiomeren reinen Aminosäuren schwierig
- Problematische Entsorgung des Hydrolysatrückstandes

Eine alternative Methode zur Hydrolyse von Proteinen findet sich in der Anwendung von Enzymen (Proteasen). Die enzymatische Hydrolyse läuft unter moderaten Temperaturen und Drücken ab. Der Einsatz von Chemikalien und die damit verbundene Salzfracht im Abwasser ist stark reduziert. Die enzymatische Hydrolyse wird eher selten angewendet, da die Kosten für Enzyme in der Regel deutlich höher sind als für die entsprechenden Säuren. Bei einer etwas differenzierteren Betrachtungsweise der beiden Verfahren (s. weiter unten) kann aber festgestellt werden, dass enzymatische Hydrolyseverfahren auch im industriellen Maßstab sinnvoll sein können.

Einer der Vorteile von enzymatischen Verfahren liegt darin, dass mit Asparagin und Glutamin Aminosäuren zugänglich sind, die bei einer sauren Hydrolyse zerstört werden. Ebenfalls deutlich reduziert ist die Racemisierung der gewünschten Produkte [349]. Als Enzyme werden Proteasen (EC 3.4.21.x) verwendet, die in der Lage sind die Peptidbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren zu spalten. Dabei werden sowohl Endo- als auch Exoproteasen eingesetzt [351, 352, 353]. Der Aufbau eines solchen Verfahrens am Beispiel der Hydrolyse von Kartoffelprotein soll im Folgenden skizziert werden.

### 5.5.2.1 Enzymatische Hydrolyse von Kartoffelprotein

In der Abbildung 5.5.1 ist das Prozessschema zur Gewinnung von Kartoffelprotein dargestellt. Zur Zeit wird das Protein durch Heißdampf-fällung abgetrennt. Die entsprechenden Nachteile dieses Verfahrens in Hinblick auf die Proteinaktivitäten ist in den vorhergehenden Kapiteln erläutert worden. Durch dieses Verfahren ergeben sich aber auch Nachteile in Hinblick auf die Hydrolyse zu den Aminosäuren. Zum einem werden wie geschildert ein Teil der Aminosäuren durch oxidative Prozesse umgewandelt oder reagieren mit den phenolischen Bestandteilen im Kartoffelfruchtwasser. Diese Bindungen werden bei der Hydrolyse nicht wieder gelöst, so dass der effektive Gehalt an zugänglichen Aminosäuren herabgesetzt wird. Zum anderen sind die denaturierten Kartoffelproteine nur schwer löslich und meist für die Proteasen schlecht verfügbar. Es bietet sich daher an, die Hydrolyse mit nativem Kartoffelprotein durchzuführen. Dieses native Protein liegt im Kartoffelfruchtwasser vor. Für die hier skizzierten Untersuchungen stand industrielles KFW der Firma Emslandstärke mit einem Proteingehalt von 24 g/l zur Verfügung. Dieses KFW wurde vor den Hydrolyseversuchen per SDS-PAGE-Gelelektrophorese auf die Proteinzusammensetzung hin untersucht (Abb. 5.5.3).

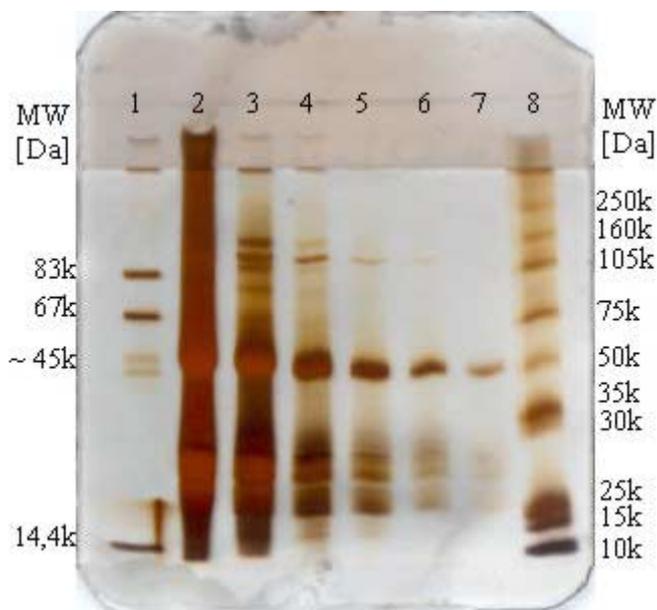


Abb. 5.5.3:  
12,5 %ige SDS-PAGE-Gelelektrophorese von Kartoffelfruchtwasser in verschiedenen Verdünnungen [354]  
Bahnen:  
1 = STD                      2 = KFW pur  
3 = KFW 1:2                4 = KFW 1:5  
5 = KFW 1:10              6 = KFW 1:20  
7 = KFW 1:50              8 = STD

Durch die Verdünnungsreihe lässt sich eine quantitative Abschätzung der Anteile der unterschiedlichen Proteinfractionen im verwendeten KFW machen. Die deutlichste Bande, die auch bei einer Verdünnung von 1:50 als einzige noch klar zu erkennen ist, liegt bei einem

Molekulargewicht von ca. 45 kDa. Anhand der vorliegenden Literaturdaten (s. Kapitel 5.5.1) kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um das Patatin handelt. Weitere Bandenintensitäten, die bis zu einer Verdünnung von 1:20 zu erkennen sind, liegen zwischen 10-30 kDa. Hierbei sollte es sich um die beschriebenen Proteaseinhibitoren handeln. Eine direkte Zuordnung zu bestimmten Proteine ist durch diese Untersuchungen nur schwer möglich, da lediglich ein Molmassenvergleich erfolgen kann. Es ist aber zu vermuten, dass die Banden um 20 kDa dem Trypsininhibitor (22 kDa) [355] und dem Kunitz-Typ-Serin-Protease-Inhibitor (22 kDa) [334] zuzuordnen sind. Bei geringen Verdünnungen ist eine Bande im Bereich von 70 kDa zu sehen. Hier könnte es sich um einen Vertreter der minoren Polyphenoloxidasen handeln (Laccase; 60-69 kDa) [356]. Des weiteren sind einige wenige Banden im Bereich um 100 bis 160 kDa vorhanden. Hier ist keine weitere Zuordnung über einen Literaturvergleich möglich. Wahrscheinlich handelt es sich um Protein-Agglomerate, die nicht vollständig denaturiert worden sind.

Die Hydrolyse des KFW erfolgte mittels enzymatischer Spaltung. Hierbei wurden technische Proteasen eingesetzt, da ein kostengünstiges Verfahren zur Gewinnung der Aminosäuren aufgebaut werden sollte. Die Effizienz der enzymatischen Hydrolyse wurde im Verhältnis zur sauren Hydrolyse bestimmt (Gleichung 5.5.2). Die jeweiligen Versuchsvorschriften finden sich im Anhang in Kapitel 8.17.

$$DH[\%] = \frac{\text{mg AS aus enz. Hydrolyse}}{\text{mg AS aus saurer Hydrolyse}} * 100 \quad (\text{Gl. 5.5.2})$$

DH = Hydrolysegrad  
AS = Aminosäure

Es zeigte sich relativ schnell bei den Untersuchungen, dass die Aktivität der im KFW vorliegenden Proteaseinhibitoren so groß ist, dass fast alle zum Einsatz gebrachten Proteasen inhibiert worden sind. Es konnten lediglich Hydrolysegrade von 20 % erreicht werden. Dieses schließt eine wirtschaftlich sinnvolle Weiterentwicklung des Verfahrens aus. Solange kein effizientes industrielles Verfahren zur Verfügung steht, um die Inhibitoren aus dem KFW ohne Denaturierung der anderen Proteine zu entfernen, könnte lediglich eine saure Hydrolyse – mit den beschriebenen Nachteilen - eingesetzt werden. Daher wurde zum Aufbau des enzymatischen Hydrolyseverfahrens auf das mit Heißdampf gefällte Kartoffelprotein (Kartoffelkleber) zurückgegriffen, dass bei der Stärkeproduktion in großen Mengen bei der Firma Emslandstärke anfällt.

Der Proteingehalt dieses Substrates wurde mittels der sauren Hydrolyse zu 68 % bestimmt. Er liegt durch die Konzentrationsschritte bei der Herstellung um den Faktor drei höher als im Kartoffelfruchtwasser. Die Aminosäurezusammensetzung der sauer hydrolysierten Proteine wurde mittels HPLC (s. Kap. 8.17) ermittelt. Da Trp, Gln und Asn während der sauren Hydrolyse zersetzt werden, sind die Werte für diese Aminosäuren nicht erhältlich. Die Aminosäuren Cys und Pro sind mit der angewendeten OPA-Methode mittels HPLC nicht messbar. Asn und Gln werden zum Teil in Asp und Glu umgesetzt, so dass diese Werte zu groß erscheinen. Auch der Wert für Lys ist zu groß, was allerdings ein bekanntes Problem der OPA-Methode ist. Die für die Isolierung interessanten Aminosäuren wie Leu, Ile, Phe, Tyr und Ser sind alle mit mehr als 5% im Protein des Kartoffelklebers enthalten, wobei Leu sogar über 10% des Proteins ausmacht. Abbildung 5.5.4 zeigt die ermittelte Aminosäurezusammensetzung des Hydrolysates.

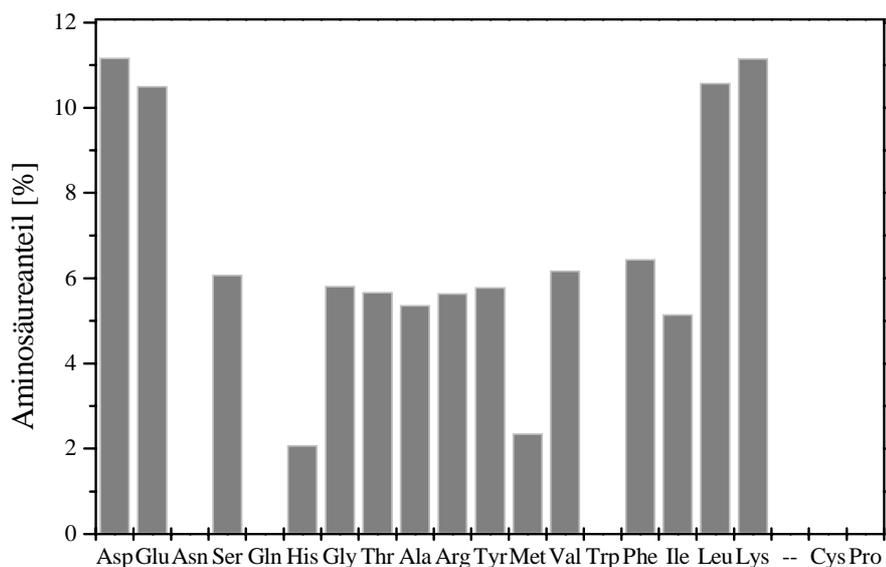


Abb. 5.5.4: Aminosäurezusammensetzung des sauren Hydrolysates von Kartoffelkleber; die Summe aller Anteile ist 100 % [357]

Dem Aufbau des enzymatischen Verfahrens lag die Idee zugrunde, dass das Protein über einen zweistufigen Prozess hydrolysiert wird. Im ersten Schritt sollte eine Endoprotease die Proteine in kleinere Bruchstücke zerteilen und somit die Löslichkeit des Kartoffelproteins zu

erhöhen. Über eine anschließend zugesetzt Exoprotease sollten diese Bruchstücke dann weiter in die einzelnen Aminosäuren gespalten werden.

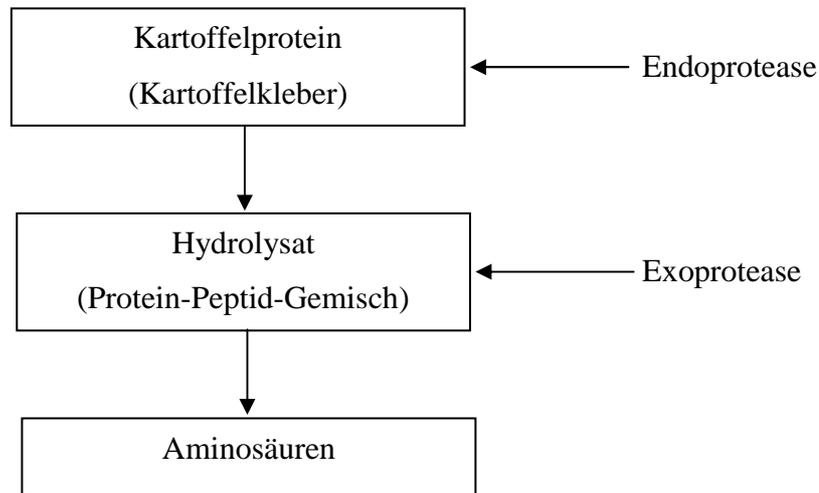


Abb. 5.5.5: Verfahrensschema zur enzymatischen Gewinnung von Aminosäuren aus Kartoffelprotein

Das Ergebnis eines entsprechenden Screenings nach geeigneten Proteasen ist in der Tabelle 5.5.3 wiedergegeben. Es zeigte sich, dass Subtilisine (EC 3.4.21.X) (= Endoproteasen, die im alkalischen Bereich arbeiten) das Substrat am besten hydrolysierten. Als Exoprotease konnten die besten Ergebnisse mit Flavourzym der Firma Novo Nordisk, Dänemark, erreicht werden. Als Vergleich zu diesen industriellen Proteasen wurde Pronase E als Endo-Exoproteasegemisch eingesetzt. Mit diesem Enzymgemisch ließen sich die größten Hydrolysegrade (60 bis 70 %) erzielen. Allerdings muss angemerkt werden, dass Pronase E für ein industrielles Verfahren zu teuer ist und somit lediglich im Labormaßstab als Vergleich eingesetzt werden kann.

Tab. 5.5.3: Effizienz unterschiedlicher Proteasen bei der Hydrolyse von Kartoffelprotein [357]

Protease	pH-Optimum	DH [%]	restliches Substrat [%]
Alcalase <sup>1</sup>	8 – 9	3,6	47,2
Bromealin	4,6	1,5	72,3
Esperase <sup>1</sup>	9	3,0	28,1
Papain	6,5	0,7	88,3

Protease	pH-Optimum	DH [%]	restliches Substrat [%]
Neutrase <sup>1</sup>	6 – 7,5	0,4	90,3
Flavorzym <sup>1</sup>	5 – 7	38	57,5
Pronase E	7 – 8,5	65	17,8
Savinase <sup>1</sup>	9-10	3,2	32,1
Pepsin	2	7,3	35,7

<sup>1</sup>Protease bzw. Proteasegemisch von Novo Nordisk, Dänemark

Die Endoproteasen vom Subtilisintyp sind in der Lage kleinere Proteinketten aus dem Kartoffelkleber in Lösung zu bringen. Die Exoproteasen hydrolysieren gelöste Proteine leichter als das Protein im ungelösten Substrat. Die Fähigkeit das Protein gut in Lösung zu bringen ist der erste entscheidende Schritt für die Hydrolyse bis zu den Aminosäuren. Pronase E hat mit einem Hydrolysegrad von 65 % schon einen Großteil der Aminosäuren freigesetzt. Bei der Verwendung von Flavourzym (Exoprotease) kann ein Hydrolysegrad von 38 % erreicht werden. Das Muster der Aminosäurezusammensetzung unterscheidet sich deutlich von dem der sauren Hydrolyse, wie in den Abbildungen 5.5.6 und 5.5.7 zu sehen ist.

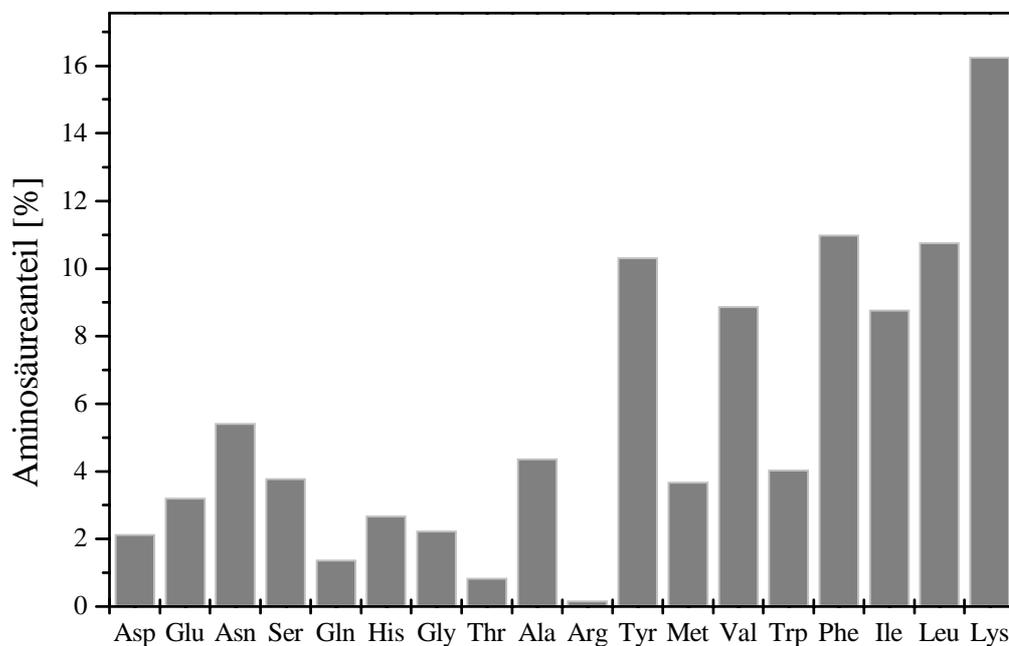


Abb. 5.5.6: Aminosäurezusammensetzung des enzymatischen Hydrolysates (Pronase E) von Kartoffelkleber; die Summe aller Anteile ist 100 % [357]

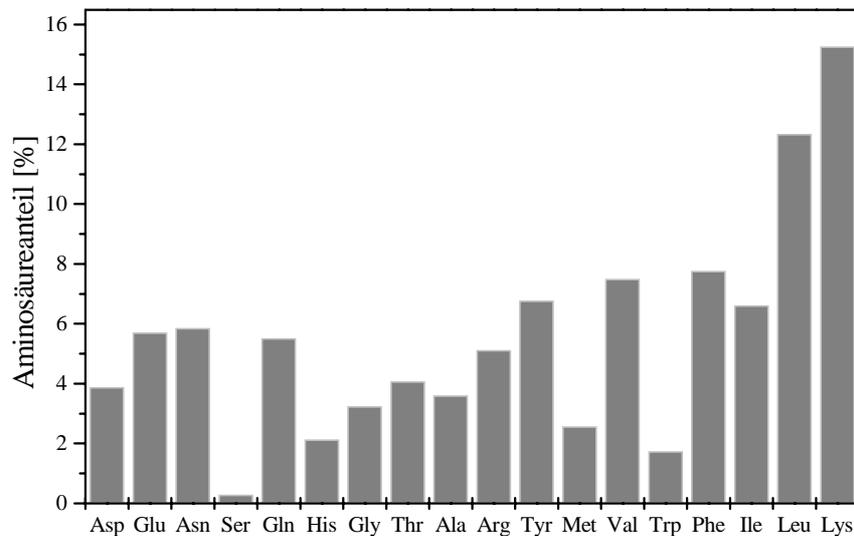


Abb. 5.5.7: Aminosäurezusammensetzung des enzymatischen Hydrolysates (Flavourzym) von Kartoffelkleber; die Summe aller Anteile ist 100 % [357]

Auffällig bei der Verteilung im Falle der Pronase E ist der geringe Gehalt an Arg und Thr. Die Exoprotease(n) der Pronase E sind offensichtlich nicht in der Lage terminal auftretendes Arg oder Thr abzubauen. Um dieses Problem zu umgehen sollte der Kartoffelkleber vorher mit einer anderen Endoprotease hydrolysiert werden, um der Exoprotease mehr Kettenenden anzubieten. Die Exoprotease alleine ergibt bereits deutlich mehr Arg und Trp. Bei der eingesetzten Exoprotease ist auffällig, dass sehr wenig Ser freigesetzt wird.

Um optimale Hydrolyseergebnisse zu erzielen, musste eine geeignete Kombination von Endo- und Exoproteasen gefunden werden, die an die Hydrolysegrade der Pronase E heranreicht und sich auch im industriellen Maßstab einsetzen lässt. Daher wurden unterschiedliche technische Endoproteasen getestet. Neben der Savinase (Novo Nordisk), die bereits beim ersten Screening getestet worden war, wurden Alcalase und Novopro D (beide Novo Nordisk) als mögliche Alternativen für Savinase getestet. Alcalase wird häufig für die Behandlung von Lebensmitteln eingesetzt. Sie ist mit ca. 20 €/kg etwas günstiger als Novopro D, besitzt allerdings nur 60 % der Aktivität von Savinase oder Novopro D. In der Abbildung 5.5.8 sind die freien Proteinkonzentrationen dargestellt, die während der Hydrolyse mit Alcalase, Savinase und Novopro D erreicht werden. Die Hydrolysen wurden in 200 ml Wasser mit 12 g Kartoffelprotein (= 6 % w/v, ca. 16 g Kartoffelkleber) bei 50 °C durchgeführt. Die Verläufe

der freien Proteinkonzentrationen sind nahezu identisch. Nach ca. 90 Minuten ist eine Proteinkonzentration von 35 g/l erreicht. Der maximal erreichbare Wert liegt bei 60 g/l. Somit ist jede der Proteasen in der Lage, nach 90 Minuten ca. 58 % des eingebrachten Proteins zu lösen und so für Exoproteasen für den weiteren Abbau leichter zugänglich zu machen.

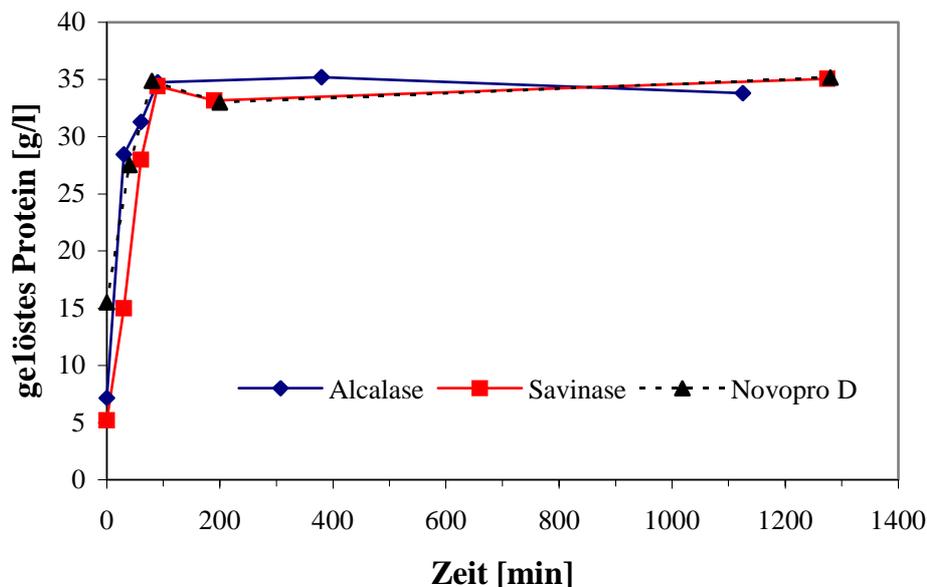


Abb. 5.5.8: Hydrolyse von Kartoffelprotein mit Alcalase, Savinase und Novopro D bei 50°C [357]

Um festzustellen, ob bei diesen Hydrolysen unterschiedliche Proteinfragmente entstehen, wurden SDS-Gele von Hydrolysen, mit Savinase und Alcalase als Endoprotease im ersten Hydrolyseschritt, erstellt. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei beiden Proteasen hauptsächlich Peptide mit Molekulargewichten kleiner als 15 kDa entstehen. Nach Zugabe von Flavourzym werden diese Peptide, unabhängig von der eingesetzten Endoprotease, zu immer kleineren Peptiden und Aminosäuren abgebaut. Es stehen somit verschiedene technische Endoproteasen zur Verfügung, die im ersten enzymatischen Hydrolyseschritt eingesetzt werden könnten.

Im zweiten Hydrolyseschritt erwiesen sich die Exoproteasen Flavourzym (Novo Nordisk) und Corolase LAP (Röhm Enzyme GmbH) als effizienteste Enzyme. Neben der Hydrolyseleistung ist hierbei der Kostenfaktor der verwendeten Enzyme zu berücksichtigen. Flavourzym ist mit

knapp 38 €/kg deutlich teuer als Corolase LP mit ca. 25 €/kg. In der Tabelle 5.5.4 sind die Hydrolyseleistungen der unterschiedlichen Enzymkombinationen gegenüber gestellt.

Tab. 5.5.4: Hydrolysegrade für Hydrolysen mit Flavourzym und Corolase LAP bei Einsatz unterschiedlicher Endoproteasen [357]

Eingesetzte Exoprotease in % (w/w) zur Proteinmenge	Vorbehandlung mit Savinase	Vorbehandlung mit Alcalase
3 % Corolase LAP	14,8 %	20,7 %
4 % Corolase LAP	19,3 %	20,8 %
5 % Corolase LAP	18,1 %	23,6 %
6 % Corolase LAP	20,1 %	21,6 %
49,5 U/g Protein Flavourzym 1000 L	41,6 %	43,9 %
49,5 U/g Protein Corolase LAP	23,8 %	19,2 %

Als geeignetste Kombinationen in Hinblick auf den Hydrolysegrad konnten die Kombination von Alcalase oder Savinase mit Flavorzym ermittelt werden. Bei der Verwendung von Corolase LAP lag der erreichbare Hydrolysegrad um 50 % niedriger, so dass der wirtschaftliche Vorteil durch die geringeren Enzymkosten wahrscheinlich bei einer industriellen Umsetzung keinen Ausschlag geben dürfte. Durch Erhöhung der Enzymkonzentration im Falle des Flavourzyms konnten letztendlich Hydrolysegrade von bis zu 60% erreicht werden. In Tabelle 5.5.5 sind die Eigenschaften der geeigneten Enzyme zusammengefasst.

Tab. 5.5.5: Übersicht über die getesteten technischen Proteasen

Protease	Hersteller	Preis [€/kg]	Proteasetyp endo/exo	Aktivität [U/g]*	pH- Bereich
Alcalase	Novo Nordisk	15-25	endo	1715,1	8 - 11
Corolase LAP	Röhm Enzyme GmbH	20-25	exo	0,47	--
Flavourzyme	Novo Nordisk	38	endo & exo	372,8	5 – 8
Savinase	Novo Nordisk	15	endo	3636,2	8 - 10

\*Gemessen in Bezug auf die Hydrolyse von Casein

Auf die einzelnen Optimierungsschritte bezüglich Puffer, Temperatur, pH-Wert, Enzymkonzentrationen und -verhältnisse und Hydrolysezeit [205] soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Abbildung 5.5.9 zeigt den Einfluss der Substratkonzentration auf die Effizienz der enzymatischen Hydrolyse.

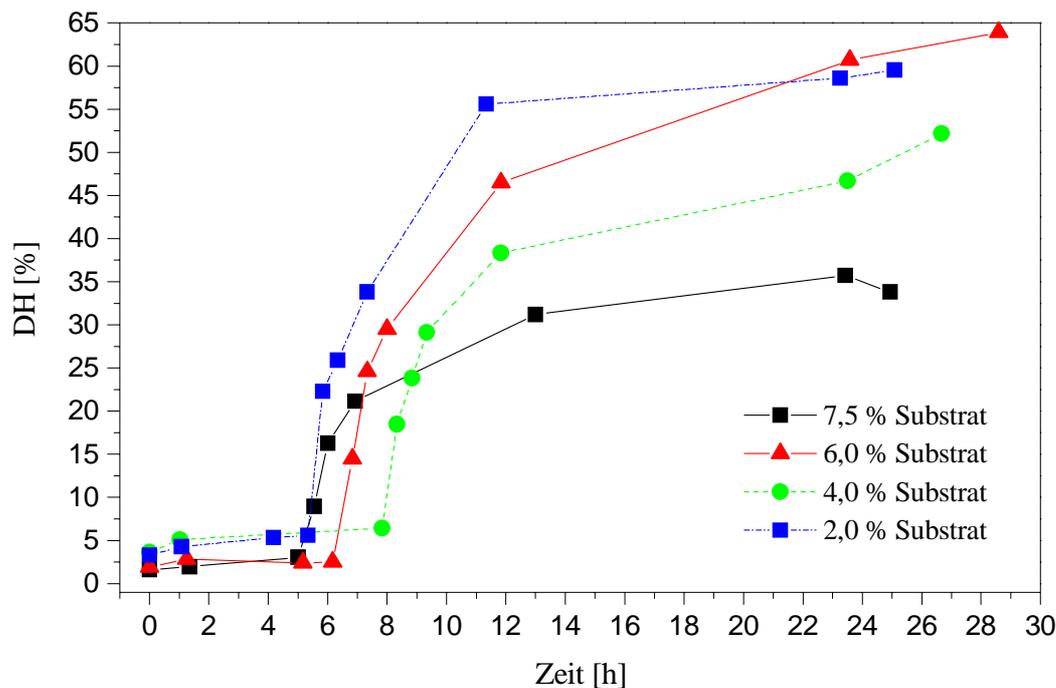


Abb. 5.5.9: Hydrolyse von Kartoffelkleber mit Savinase und Flavourzym [357]

Die Hydrolyseexperimente mit 2 und 6 % Proteingehalt zeigten hohe Hydrolysegrade. Die Hydrolyse mit 4 % Proteingehalt im Reaktor wies dagegen nur Hydrolysegrade bis ca. 45 % auf. Bei diesem Versuch dauerte die erste Hydrolyse etwas länger als bei den anderen Versuchen. Dadurch war der pH-Wert von 7,0 zum Zeitpunkt der Flavourzymzugabe etwas niedriger als der pH-Wert der anderen Versuche (zwischen 7,1 bis 7,3). Wie spätere Tests zeigen sollten, ist dies ein möglicher Grund für die niedrigeren Hydrolysegrade als bei den Versuchen mit 2 und 6 %. Bei Erhöhung des Anteiles des Substrates über 6% geht der Hydrolysegrad deutlich zurück. Eine solche „Substratgrenze“ wird auch von dem Hersteller der Enzyme angegeben. Gründe für den sinkenden Hydrolysegrad können erreichte Löslichkeitsgrenzen der Produkte oder aber auch Produkthemmungen der Enzyme sein.

Bei der enzymatischen Hydrolyse werden die Aminosäuren nicht gleichmäßig freigesetzt. Die Kettenenden der Peptide und Proteine werden von den Exoproteasen unterschiedlich schnell angegriffen. Je nach endständiger Aminosäure kommt es zu unterschiedlichen Umsetzungsgeschwindigkeiten für die Exoprotease. Setzt man die Aminosäuremenge der sauren Hydrolyse als Bezugswert ein, so kann man partielle Hydrolysegrade für jede Aminosäure angeben. Tabelle 5.5.6 zeigt einen derartigen Vergleich.

Tab. 5.5.6: Vergleich der sauren und enzymatischen Hydrolyse [357]

	enz. Hydrolyse [Mol/g Kartoffelkl.]	saure Hydrolyse [Mol/g Kartoffelkl.]	Hydrolysegrad [%]
Asp	7,80E-05	5,70E-04	13,683
Glu	7,93E-05	4,84E-04	16,382
Asn	2,41E-04	--	--
Ser	2,11E-04	3,92E-04	53,787
Gln*	1,23E-04	--	--
His*	1,16E-04	9,09E-05	127,422
Gly	1,68E-04	5,26E-04	31,879
Thr	1,99E-04	3,23E-04	61,468
Ala	2,28E-04	4,09E-04	55,693
Arg	1,38E-04	2,20E-04	62,758
Tyr	1,13E-04	2,17E-04	52,124
Met	6,62E-05	1,07E-04	61,579
Val	2,88E-04	3,57E-04	80,536
Trp	4,04E-05	--	--
Phe	1,96E-04	2,65E-04	74,131
Ile	2,22E-04	2,67E-04	83,173
Leu	4,59E-04	5,47E-04	83,912
Lys	2,47E-04	5,18E-04	47,736
<b>Summe :</b>	<b>0,00321</b>	<b>0,00529</b>	<b>60,681</b>

\* die Peaks für Gln und His liefen zusammen; -- nicht meßbar

Für Aminosäuren wie Leu, Ile, Phe und Val werden deutlich höhere Hydrolysegrade erzielt als der mittlere Hydrolysegrad von 60,7 % vermuten lässt. Für die Gewinnung dieser Aminosäuren aus Kartoffelkleber scheint dieser Prozess also besonders geeignet. Des weiteren sind über die enzymatische Hydrolyse Aminosäuren zugänglich, die bei der sauren Hydrolyse zerstört werden (Asn, Trp).

Da die enzymatische Hydrolyse selbst bei sehr hohen Hydrolysegraden unter den gewählten Bedingungen nicht vollständig abläuft, erhält man neben den Aminosäuren fast ebensoviel Peptide. Diese Peptide lassen sich eventuell ebenfalls vermarkten. Proteinhydrolysate mit

hohem Peptidanteil werden schon lange in der Sportlerernährung eingesetzt, wo sie vor allem wegen ihrer anabolen Wirkungen gefragt sind. Hier werden in der Regel Komplettprodukte angeboten, in denen ein lyophilisierter Cocktail verschiedener bioaktiver Peptide angereichert ist. Es existieren aber auch isolierte Produkte, wie Creatin, welches im Organismus aus den Aminosäuren Glycin, Arginin und Methionin synthetisiert wird, aber auch oral zugeführt werden kann. Es ist ein Energiespeichermolekül, das den ATP-Zyklus in den Muskeln unterstützt, so dass kurzfristige extreme Leistungssteigerungen erreicht werden können oder bei langer Verabreichung in Kombination mit Intensivtraining ein erheblicher Muskelaufbau stattfindet [358]. Ausgewählte bioaktive Peptide werden darüber hinaus in der Nutztierfütterung eingesetzt, wobei die Schweinemast und die Fischzucht als wichtigste Anwendungen zu nennen sind.

### 5.5.2.2 Aufarbeitung der Hydrolysate

Um die Aminosäuren aus den Hydrolysaten zu isolieren, mussten diese noch weiter aufgearbeitet werden. Besonders die Peptide sollten abgetrennt werden, da sie als Nebenprodukt noch einen hohen Marktwert besitzen und damit dazu beitragen, den Prozess wirtschaftlich interessanter zu machen. Dazu wurde ein Aufarbeitungsschema verwendet, welches einen industriellen Einsatz ermöglichen sollte (Abb. 5.5.10).

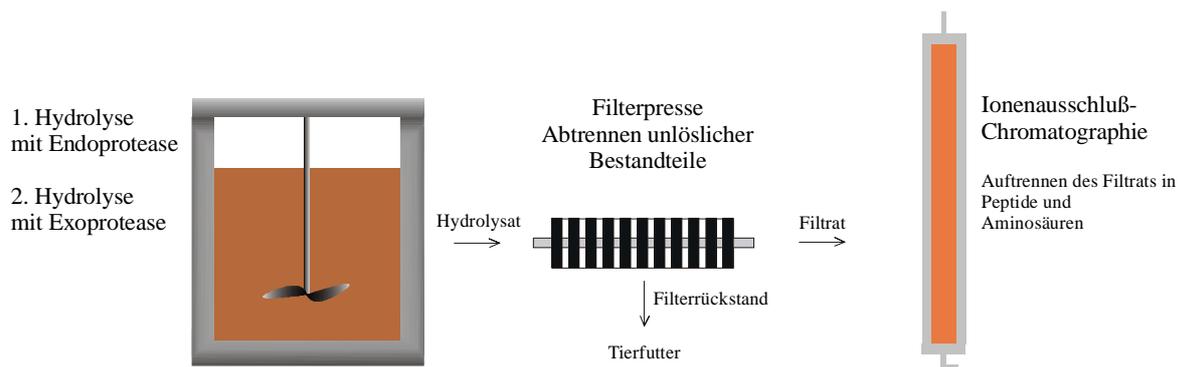


Abb. 5.5.10: Prozessschema zur Gewinnung von Aminosäuren aus Kartoffelprotein [205]

Für den industriellen Prozess stehen für die Abtrennung Filterpressen zur Verfügung, mit denen sehr dichte und trockene Filterkuchen erhalten werden. Diese Filterkuchen können als Tierfutter verwertet werden. Im Laborversuch wurde die Abtrennung über Zentrifugation und

anschließende Rotationsverdampfung des Überstandes durchgeführt, um ein aufkonzentriertes Filtrat zu erhalten (Konzentrat). Die der Filtration folgende Ionenausschluss-Chromatographie liefert eine Auftrennung von Peptiden und Aminosäuren. Da bei diesem Verfahren nur Wasser als Eluent verwendet wird, zählt es zu den umweltschonenden Methoden der Aufarbeitung. Die gewonnenen Peptidfraktionen der Ionenausschluss-Chromatographie können als Nahrungsmittelzusätze genutzt werden. Die Aminosäurefraktion sollte als Ausgangslösung für die schnelle Isolierung von Aminosäuren mit Zeolithen dienen.

Großtechnisch lässt sich Ionenausschluss-Chromatographie nicht mit Materialien wie Sephadex durchführen, da diese für den Einsatz in großen Säulen zu druckempfindlich und aus wirtschaftlicher Sicht zu teuer sind. Daher werden Kationentauscherharze aus Vinyl und Divinylbenzol eingesetzt. Die Austauscher werden vollständig mit Natriumkationen belegt. In dieser Form werden Austauschvorgänge weitgehend unterdrückt und die Trennung aufgetragener Substanzen weitgehend durch die Porengröße des Materials bestimmt. Auf diese Weise steht ein kostengünstiges und stabiles Material für Ionenausschluss-Chromatographie zur Verfügung. Der Nachteil ist, dass sehr basische Stoffe immer noch Austauschvorgängen unterliegen und die Benzolgruppen des Austauschermaterials zusätzlich für hydrophobe Wechselwirkungen sorgen. Bei den beschriebenen Versuchen wurden zwei Chromatographiesäulen mit jeweils 2 l (170 cm Schütthöhe) verwendet. Es wurden die Harze Finex CS 13 GC (Hersteller Fin sugar) und Amberlite CR 1310 (Hersteller Rohm and Haas SA.) eingesetzt. Als Eluent dient VE-Wasser. Das gesamte System, Säule und Eluent, wurde auf 70 °C temperiert.

Für die Versuche wurden 100 g erhitztes Konzentrat (TS-Gehalt 20-30 %) aufgetragen und mit 0,5 Bettvolumen pro Stunde (BV/h) eluiert. In der Abbildung 5.5.11 ist das Ergebnis einer auf diese Weise durchgeführten Ausschlusschromatographie unter der Verwendung von Finex CS 13 GC als Säulenmaterial dargestellt.

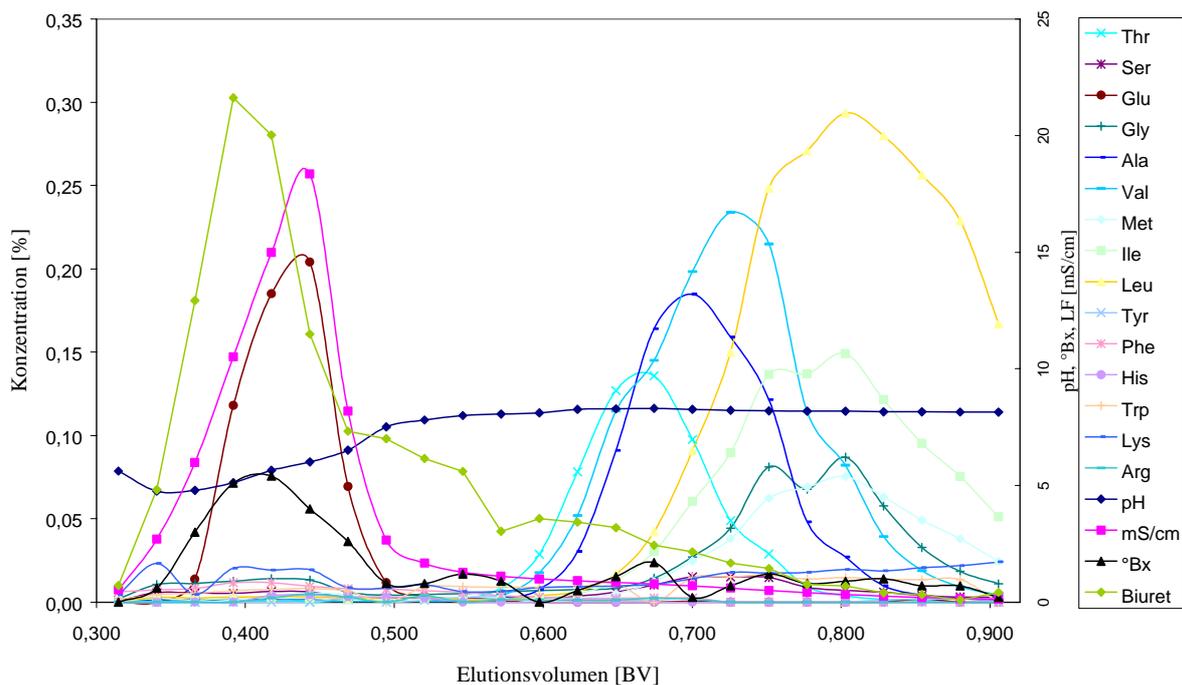


Abb. 5.5.11: Auftrennung von Kartoffelprotein-Hydrolysat über Ausschlusschromatographie mittels Finex CS 13 GC; Säulenabmessungen: 200 cm Höhe, 4 cm Innendurchmesser, Bettvolumen 1971 cm<sup>3</sup>; T = 70°C; Elution mittels VE-Wasser [357]

In der Abbildung sind deutlich zwei verschiedene Fraktionen zu erkennen. In der Fraktion von 0,3 bis 0,5 BV eluieren Salze und ein Teil der sauren Aminosäuren. Des weiteren liegen in dieser Fraktion Proteine vor, die mittels eines Proteintests (Biuret; grüne Rauten in der Abbildung 5.5.11) nachgewiesen werden konnten. Diese Fraktion wurde mittels einer Peptid-HPLC eingehender untersucht. Für diese Analytik wurde eine Säule der Firma Tosohaas (2500 PW-XL. 300 x 7,8 mm) benutzt. Die Detektion der Peptide wurde bei 210 nm durchgeführt. Da ein breites Spektrum an Peptiden während der Hydrolyse entsteht, lässt sich auch mit dieser Analysenmethode nur eine Zuordnung für Gruppen von Peptiden treffen. Die maximal feststellbare Peptidgröße liegt bei ca. 3000 Da. Der Hauptanteil aller Peptide besitzt Molekülgrößen zwischen 2000 und 230 Da. Da die Detektion bei 210 nm durch Aminosäuren gestört wird, ist die Analytik für kleine Peptide (<230 Da) nicht sehr aussagekräftig. Betrachtet man den Anteil der eluierten Peptide bis 0,6 BV, so lässt sich feststellen, dass ein Großteil der Peptide abgetrennt ist, bevor die nächsten Aminosäuren eluiert werden. Im Bereich von 0,6 bis 0,9 BV eluieren dann eine Vielzahl der Aminosäuren. Es zeigt sich allerdings, dass auch nach 0,9 BV weder die basischen Aminosäuren (Lys & His) noch die

aromatischen Aminosäuren (Phe, Tyr & Trp) wieder eluiert werden. Außerdem sieht man, dass eine Fraktionierung bis 0,9 BV nicht ausreicht um die Auftrennung vollständig zu verfolgen, da Leu, Ile und Met noch nicht vollständig eluiert sind. Es wurden daher die Versuche unter der Verwendung des Säulenmaterials Amberlite CR 1310 wiederholt. Das Ergebnis dieser Ausschlusschromatographie ist in der Abbildung 5.5.12 wiedergegeben. Es zeigt sich, dass das Elutionsprofil dem von Finex CS 13 GC sehr ähnlich ist.

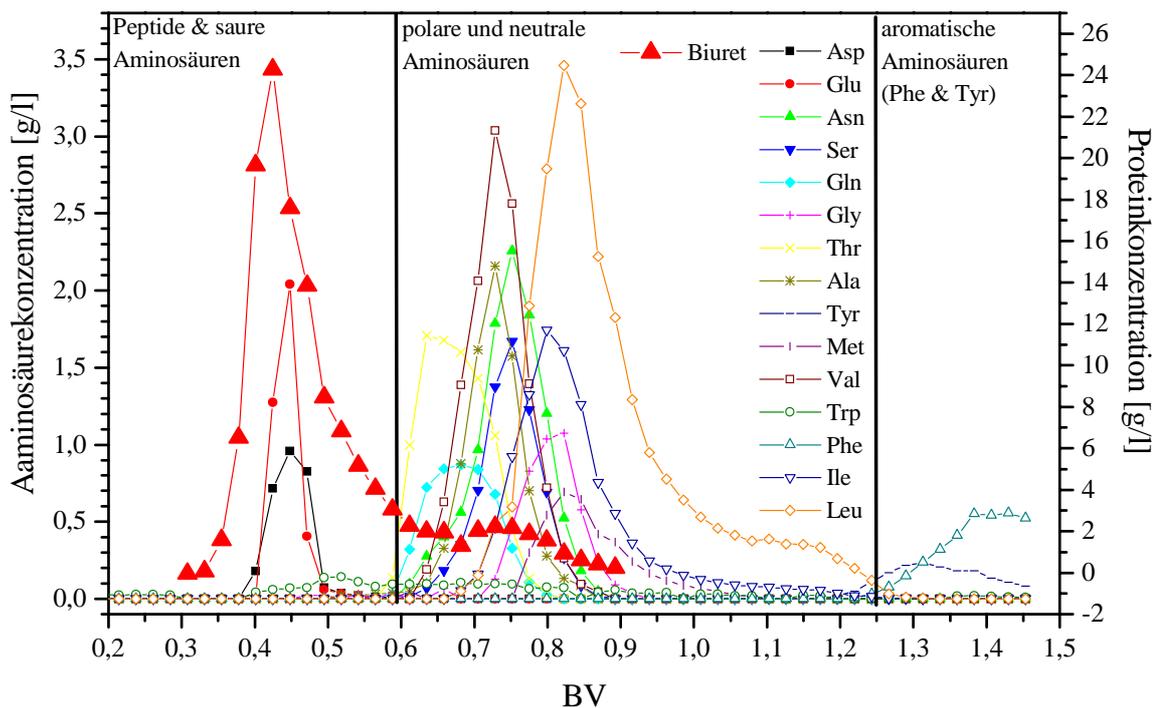


Abb. 5.5.12: Auftrennung von Kartoffelprotein-Hydrolysat über Ausschlusschromatographie mittels Amberlite CR 1310; Säulenabmessungen: 200 cm Höhe, 4 cm Innendurchmesser, Bettvolumen 2138 cm<sup>3</sup>; T = 70°C; Elution mittels VE-Wasser [357]

Die senkrechten Linien in der Abbildung zeigen mögliche Schnittgrenzen für das weitere Downstream-Processing an. Bis 0,6 BV erhält man die sauren Aminosäuren und die Peptide. Außerdem werden in diesem Bereich auch die Salze und die farblichen Verunreinigungen eluiert. Zwischen 0,6 und 1,25 BV erhält man die polaren und die neutralen Aminosäuren. Ab 1,2 BV werden bei der Verwendung von Amberlite CR 1310 als Trennmateriale auch die aromatischen Aminosäuren (Phe und Tyr) eluiert.

Zur Gewinnung von reinen Aminosäuren müssten weitere Aufreinigungsschritte in dem Prozess etabliert werden. Eine vollständige Auftrennung in sämtliche Aminosäuren wäre zwar wissenschaftlich gesehen interessant, wirtschaftlich aber nicht rentabel, da viele der Aminosäuren auf anderem Wege besser zugänglich sind, bzw. einen zu geringen Marktwert besitzen. Daher muss beim Design eines solchen Prozesses auch das entsprechende spätere Marktsegment berücksichtigt werden. Aus diesen Gründen wäre insbesondere die Gewinnung der Aminosäuren L-Isoleucin, L-Leucin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin aus den Hydrolysaten von Interesse. In Ergänzung zu dem hier vorgestellten Verfahrens wurde der Einsatz von Zeolithen zur Abtrennung einzelner Aminosäuren untersucht. Entsprechende Verfahren werden teilweise bereits im industriellen Maßstab zur Trennung von Aminosäuren und Peptiden eingesetzt [359]. Anhand von Untersuchungen an Modellgemischen [360], auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll, konnte prinzipiell gezeigt werden, dass ein solches Verfahren für einzelne Aminosäuren möglich ist. Die durch die enzymatische Hydrolyse erzielten Gemische aus Peptiden und Aminosäuren können aber ebenfalls in etablierten industriellen chromatographischen Prozessen der Aminosäuregewinnung verwendet werden. Ein solcher Prozess wird in Kapitel 6.2 am Beispiel der Aminosäuregewinnung aus Zuckerrübenmelasse vorgestellt.

### 5.5.3 Wirtschaftliche Bewertung der enzymatischen Hydrolyse

Es konnte in Kapitel 5.5.2.1 gezeigt werden, dass eine enzymatische Hydrolyse von Kartoffelprotein möglich ist. Hat ein solches Verfahren aber unter ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten in der Industrie Bestand? Bei dem vorhergehenden Beispiel der Molkeveredelung konnten Marktchancen und Produktionskosten aufgezeigt werden, so dass auch ein ökonomischer Nutzen der neuen Verfahren vorliegt. Im vorliegenden Fall ist das Verfahren noch nicht soweit vorangeschritten, dass dieses genau abgeschätzt werden könnte. Insbesondere die Aufarbeitung der Hydrolysate konnte erst im Labormaßstab getestet werden und ist auch noch nicht so weit entwickelt, dass die gewünschten Ziel-Aminosäuren über industrielle Verfahren isoliert worden sind.

Es ist daher zum momentanen Entwicklungsstand nur möglich eine solche Bewertung auf Teilbereich des Verfahrens zu fokussieren. Zum einen auf den Vergleich der ökonomischen und ökologischen Effekte der Aminosäureproduktion mittels enzymatischer bzw. saurer

Hydrolyse und zum anderen auf den Vergleich des „nachhaltigsten“ Rohstoffeinsatzes innerhalb der jeweiligen Prozesse. Diese Untersuchungen wurden mit der Abteilung für Ordnungs- und Prozesspolitik (AK Prof. Müller) der Universität Hannover durchgeführt [361, 362]. Aus methodischer Sicht ist dazu eine modulare Aufspaltung und Unterscheidung der Prozesse hinsichtlich der hypothetisch konkurrierenden Verfahren der sauren Hydrolyse auf der einen und enzymatischen Hydrolyse auf der anderen Seite sinnvoll. Es wurden dabei zunächst nur Aminosäuren berücksichtigt, die sowohl eine hohe Marktchance haben als auch in das Produktionsprogramm eines Unternehmens weitgehend problemlos integrierbar sind (L-Isoleucin, L-Leucin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin). Aufgrund der *low-scale* bedingten Datenunsicherheiten wurden alternative Szenarien berücksichtigt und Abschätzungen über die ökonomische Tragfähigkeit hinsichtlich der nachfolgenden Prozessschritte vorgenommen. Hier zeigt sich, dass vor allem in der höheren Qualität der Koppelprodukte der enzymatischen Hydrolyse Ertragspotentiale liegen, die das der sauren Hydrolyse um ein vielfaches übersteigen. Letztlich wird dadurch die Rentabilität des enzymatischen Prozesses stark erhöht und die Vorteilhaftigkeit gegenüber der sauren Hydrolyse steigt [205].

Hinsichtlich der ökobilanziellen Analyse ist aufgrund der Vielzahl umweltbedingter Wirkungsketten die Generierung eindimensionaler Aussagekategorien nicht mehr möglich. Es zeigt sich, dass der Beitrag der landwirtschaftlichen Rohstoffproduktion einen erheblichen Anteil auf die ökologische Gesamtbewertung der Verfahren hat. Aufgrund des bei der sauren Hydrolyse hohen Bedarfs an Salzsäure und Natronlauge auf der Inputseite (jeweils über 10 % der Masseanteile) zeigt sich, dass bei der Berücksichtigung der ökologischen Wirkungen der Produktion dieser Güter die saure Hydrolyse sich in vielen Wirkungskategorien relativ zur enzymatischen Hydrolyse als ungünstiger erweist. Dieses zeigt sich besonders deutlich bei den Salzfrachten, die bei der sauren Hydrolyse entstehen. Rechnerisch ergeben sich hier auf Basis der Produktion einer Tonne Zielaminosäurefraktion (Phe,Ile,Leu,Tyr) Salzfrachten in Höhe von rund vier Tonnen. Da bei dem jetzigen Sachstand die Aminosäureproduktion aus Kartoffelprotein im industriellen Maßstab nicht darstellbar ist, wurde bei der ökobilanziellen Bewertung eine fiktive Unterteilung der einzelnen Lösungen der Hydrolysen vorgenommen. So wurde die Annahme getroffen, dass die gesamte AS-Fraktion in Ziel-Aminosäuren und eine Restfraktion mit entsprechenden Koppelprodukten unterteilt werden kann. Diese Annahme legt fest, dass bei der Produktion von rund 2.000 kg der Zielaminosäuren (L-Isoleucin, L-Leucin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin) bei der sauren Hydrolyse eine Restfraktion mit 5.500 kg anderer Aminosäuren entsteht. Beim enzymatischen Prozess

ergeben sich rund 3.000 kg Restaminosäuren, 3.000 kg Rückstand, welcher als Tierfutter verwertet werden könnte und 2.500 kg der weiter oben angesprochenen Peptidfraktion. Darauf basierend ergeben sich Abschätzungen zu den ökologischen Auswirkungen des enzymatischen Verfahrens, wie sie in der Tabelle 5.5.7 aufgeführt sind.

Tab. 5.5.7: Abschätzungen der ökologischen Auswirkungen der enzymatischen Hydrolyse von Kartoffelprotein im Vergleich zur sauren Hydrolyse [361, 362]; Daten beziehen sich auf die Produktion von 1.000 kg der Ziel-Aminosäuren; bei der enzymatischen Hydrolyse ist ein Hydrolysegrad von 57 % angenommen worden

		Mengen [kg]	
		Enzymatische Hydrolyse	Saure Hydrolyse
Treibhauseffekt	Kohlendioxid	548,47	3.193,01
	Methan	0,2	0,26
	FCKW 11	k.A.	k.A.
Ozonabbau	Distickstoffoxid	1,53	2,05
Versauerung	Schwefeldioxid	8,28	38,16
	NO <sub>x</sub>	3,48	19,79
	NO	k.A.	k.A.
	NH <sub>3</sub>	2,72	3,63
Energiebedarf	Erdöl	13,93	208,18
	Erdgas	59,13	274,92
	Steinkohle	23,37	584,77
	Braunkohle	2,07	2,76
Abfälle	Abraum	5,57	164,31
	Abfälle, hausmüllähnlich	0,09	2,52
	Abfälle, unspezifiziert	0,81	24,78
	Aschen und Schlacken	4,74	364,31
	Sondermüll	38,74	0,05
Salzfrachten	NaCl	-	1.000

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich, ergibt sich bei der Einführung der enzymatischen Hydrolyse von Kartoffelfruchtwasser eine deutliche Verbesserung der ökologischen Faktoren bei der Aminosäuregewinnung. Bei der Gesamtbewertung muss berücksichtigt werden, dass aufgrund des geringeren Hydrolysegrades beim enzymatischen Verfahren ein höherer Substratbedarf besteht. Aufgrund der bisher erzielten Ergebnisse kann aber die Empfehlung gegeben werden, dass ein solches Verfahren weiterentwickelt werden sollte. Neben den

monetären Entscheidungen sollten hier auch insbesondere die ökologischen Faktoren zum tragen kommen. Die, auch weiter oben schon mehrfach angesprochene, Nachhaltigkeit industrieller Prozesse kann mit Hilfe eines solchen Verfahrens ökonomisch sinnvoll erreicht werden.

## 5.6 Fazit zur verbesserten Nutzung von Rohstoffen

Molke und Kartoffelprotein sind nur zwei der landwirtschaftlichen Reststoffe, die weltweit jährlich in enormen Mengen anfallen. Auch bei der Verarbeitung anderer landwirtschaftlicher Güter wie Mais, Reis, Soja oder Weizen fallen ähnliche Nebenprodukte ab, die bisher nur im geringen Maße weiterverarbeitet werden. Obwohl schon seit längerer Zeit in der Literatur beschrieben, werden die Aufbereitungsverfahren nur sehr zögerlich industriell umgesetzt. In den vorangegangenen Kapiteln wurde aufgezeigt, dass aus den Reststoffen nicht nur billige Massenprodukte wie Tierfutter erzeugt werden können. Mit der Isolierung von Lactoferrin aus Molke wird eine hochwertige Pharmakomponente gewonnen und auch die aus Kartoffelprotein zu gewinnenden Aminosäuren sind von großem Interesse für medizinische Applikationen. Darüber hinaus bieten die in der Literatur erläuterten Verfahren zur Biokonversion nachwachsender Rohstoffe in Grund- und Feinchemikalien ein hohes Wertschöpfungspotential.

Bei einer industriellen Umsetzung solcher Verfahren müssen natürlich auch unter dem Gesichtspunkt der zunehmenden Globalisierung der Wirtschaft die zu leistenden Investitionen zum Aufbau der Verfahren stark gewichtet werden. Was nützt ein ökologisch ausgewogenes Produktionsverfahren, wenn der hiesige Anbieter durch billigere, eventuell auf Umwelt unverträglichem Wege hergestellte, Konkurrenzprodukte aus anderen Ländern vom Markt gedrängt wird? Im Falle der Kartoffelproteinhydrolyse konnte aber aufgezeigt werden, dass der Prozess in Hinblick auf die Kosten für den Katalysator (Enzym statt Säure) zwar deutlich kostenineffizienter erscheint, dieser Malus durch höherwertige Koppelprodukte aber ausgeglichen werden kann. Über die allgemeinen Innovationshemmnisse gegenüber biotechnologischen Verfahren ist bereits in Kapitel 3 berichtet worden. Die hier aufgezeigten Beispiele sollten aber verdeutlichen können, dass viele der Vorurteile wirtschaftlich nicht begründet sein können. Unter den aufgezeigten Produkten ist mit Abstand keins, welches die Umsatzzahlen der Verbindungen im Bereich der roten Biotechnologie erfüllen kann. Es sollte

aber bedacht werden, dass die verwendeten Rohstoffe den meisten Betrieben „kostenlos“ durch bestehende Produktionsverbände zur Verfügung stehen. Durch die Integration neuer Verfahrensschritte in die bestehenden Produktionswege (Membranadsorber und Denitrifizierung bei der Molkeaufarbeitung bzw. enzymatische Hydrolyse bei der Kartoffelproteingewinnung) werden neue oder verbesserte Produkte für diese Firmen zugänglich. Es sollte auch an die enormen Mengen gedacht werden, in denen Molke und Kartoffelprotein anfallen. Die beschriebenen Verfahren können nicht zum Aufbau neuer Firmen genutzt werden, da sie nur in den bestehenden Produktionsverbänden sinnvoll einsetzbar sind. Sie erfüllen aber sehr eindrucksvoll die so oft geforderte Nachhaltigkeit industrieller Verfahren – sowohl ökonomischer als auch ökologischer Natur. Ohne eine stetige Weiterentwicklung biotechnologischer Verfahrenstechniken käme diese Entwicklung zum Erliegen.

## **6 Entwicklung und Einsatz bioanalytischer Systeme für die industrielle Praxis**

Wurden im vorhergehenden Kapitel neue Verfahren beschrieben, um mit Hilfe innovativer biotechnologischer Verfahren neue Produkte herstellen zu können oder in ihrer Qualität zu verbessern, soll in diesem Kapitel anhand einiger Fallbeispiele erläutert werden, dass durch den Einsatz bioanalytischer Systeme bestehende industrielle Prozesse optimiert werden können. Es geht dabei nun nicht mehr um die Produktion neuer Verbindungen, sondern um das Monitoring und die Regelung der Produktionsprozesse. Durch den Einsatz bioanalytischer Systeme soll der Verlauf der Edukt- und Produktkonzentrationen verfolgt werden, um so unerwünschte Nebenreaktionen, falsch gesetzte Chromatographieschnitte und damit verbundene Umweltbelastungen zu vermeiden. In einem einleitenden Teil werden zum besseren Verständnis der entwickelten Systeme generelle Erläuterungen zum Aufbau und zur Funktionsweise bioanalytischer Systeme gegeben. Der Einsatz solcher Systeme wird anschließend am Beispiel der chromatographischen Melasseentzuckerung und ihren Folgeprozessen erläutert.

### **6.1 Bioanalytische Systeme**

Biotechnologische Prozesse sind, wie anhand der Beispiele in den Kapiteln 4 und 5 gezeigt wurde, in der Regel hoch komplex. Betrachtet man Kultivierungsprozesse, so müssen die verwendeten Zellen und Mikroorganismen unter optimalen und definierten Bedingungen im Bioreaktor kultiviert werden, um reproduzierbar Produkte hoher Qualität erzeugen zu können. Der Zellmetabolismus und damit verbunden die Produktivität und Aktivität ist oftmals extrem von den äußeren physikalischen und chemischen Einflüssen (pH-Wert, Temperatur, Substratkonzentrationen etc.) abhängig und gegenseitig beeinflussbar. Um somit biologische Systeme optimal nutzen zu können, ist eine genaue Analytik und Regelung dieser äußeren Einflüsse und der biologischen Systeme selbst unerlässlich. In der biotechnologischen Forschung wurden daher in den letzten 15 Jahren eine immense Vielzahl von Analysensystemen entwickelt, die hochselektiv und –sensitiv einzelne Substanzen selbst in komplexen Proben erfassen [363, 364].

Zusätzlich bestehen biotechnologische Prozesse, wie weiter oben gezeigt wurde, in der Regel nicht nur aus Kultivierungsschritten sondern beinhalten Aufarbeitungsschritte, die oftmals den "Bottleneck" des Gesamtprozesses darstellen. Bei diesen Downstream-Verfahren gilt es Produkte aus einem hoch komplexen Reaktionsgemisch zu isolieren. Eine detaillierte Analytik der Aufarbeitungsschritte ermöglicht auch hier eine optimale Produktausbeute und -qualität. Analytische Verfahren spielen somit eine zentrale Rolle bei dem Verständnis und der Optimierung biotechnologischer Prozesse und der anschließenden Qualitätskontrolle. Weiterhin helfen diese Systeme gesetzliche, ökologische Bestimmungen einzuhalten, was in zunehmenden Maße an Bedeutung gewinnt.

Dabei helfen in neuer Zeit nicht nur die eigentlichen bioanalytischen Verfahren, sondern vermehrt auch sogenannte "Softwaresensoren". Aufbauend auf komplexen mathematischen Verfahren wie der Multilinearen Regression oder Neuronalen Netzen [365, 366, 367], können aus den Rohdaten der "Hardware Sensoren" eine Vielzahl von Informationen errechnet werden, die die Anwendungsbreite der Analysensysteme erheblich vergrößern. Zusätzlich sind Kombinationen aus Hard- und Softwaresensoren in der Lage über entsprechende Programme Störungen in dem Analysensystem zu erkennen und mit in der Datenauswertung zu berücksichtigen.

### **6.1.1 Prinzipien bioanalytischer Systeme**

Generell können bioanalytische Systeme in zwei verschiedenen Modi eingesetzt werden, als sogenannte In-Situ- oder Ex-Situ-Systeme (Abb. 6.1.1). Beide Systeme besitzen ihre Vor- und Nachteile. In-Situ-Systeme werden direkt in den Bioreaktor eingebaut und liefern kontinuierlich Informationen über den Bioprozess. Bekannteste Beispiele für diese Art von Sensoren sind z. B. pH-,  $pO_2$ -, Temperatur- und Druckfühler. Vorteilhaft bei dieser Art der Sensoren ist die in der Regel kontinuierliche Signalerzeugung verbunden mit einer sehr kurzen Verzögerungszeit. Diese Systeme müssen sterilisierbar sein, da sie in direkten Kontakt mit dem Medium stehen. Diese Bedingung kann für viele Sensortypen (z. B. Biosensoren) nicht erfüllt werden. Weiterhin besteht die Gefahr, dass auf der Sensoroberfläche Biofilme aufwachsen, die die Funktionsfähigkeit der Sensoren beeinträchtigen. Ebenso ist ein Fouling von Sensormembranen durch hohe Proteinkonzentrationen im Medium nicht auszuschließen.

Diese Probleme können umgangen werden, wenn Ex-Situ-Systeme zur Bioprozessanalytik eingesetzt werden. Diese werden außerhalb des Bioreaktor installiert und über ein Probenahmesystem mit dem Bioprozess gekoppelt. Über geeignete Probennahmesysteme können in der Regel die meisten etablierten Analysensysteme wie HPLC, GC, CE etc. mit einem Bioprozess gekoppelt werden. Je nach System können dabei zellhaltige oder zellfreie Proben verarbeitet werden. Werden zellhaltige Proben verwendet, so ist es unerlässlich, dass im Moment der Probennahme der Metabolismus der Zellen in der Probe gestoppt wird, da ansonsten keine repräsentative Aussage über den Zustand des Bioprozesses getroffen werden kann. Dieses geschieht in der Regel durch das Beimischen von Chemikalien.

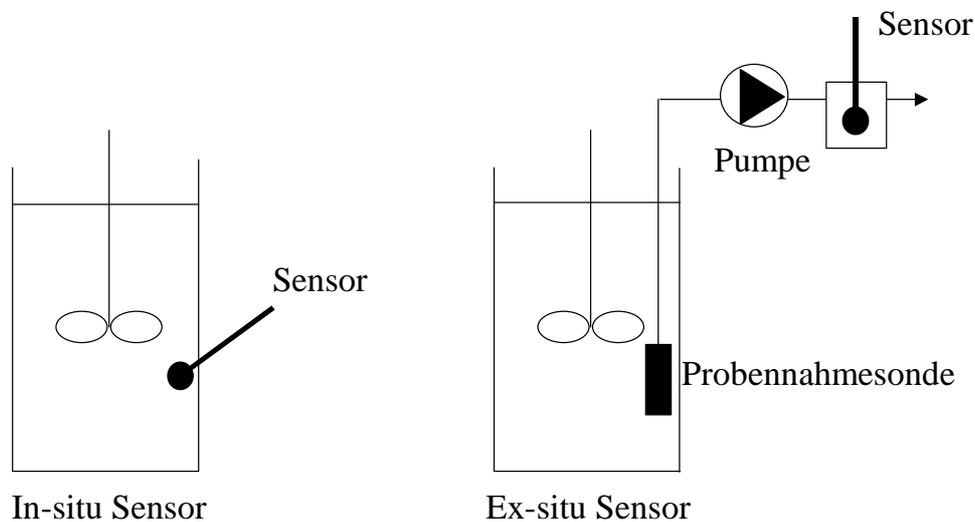


Abb. 6.1.1: Prinzipieller Aufbau von In-Situ- und Ex-Situ-Sensorsystemen [364]

Zellfreie Proben, wie sie beispielsweise über Filtrationssonden gewonnen werden können, weisen das Problem der metabolischen Veränderung der Probenbestandteile nicht auf und können daher einfacher verarbeitet werden. Allerdings besitzen derartige Probenahmesysteme eine größere Verzögerungszeit, so dass hier nur zeitversetzte Informationen über den Bioprozess gewonnen werden können.

Diese Verzögerungszeit stellt eines der größten Probleme bioanalytischer Systeme dar. Um einen Prozess optimal regeln zu können, müssen die analytischen Daten so schnell anfallen, dass sie unterhalb des kritischen zeitlichen Parameters des Prozesses liegen. Unter diesem Parameter wird der Zeitraum verstanden, in dem sich der Prozess so wenig verändert, dass eine ausgeführte Änderung physikalischer oder chemischer Parameter zu dem gewünschten Effekt führt. Dauert die Analyse und Datenauswertung länger, so hat sich der Prozess

während der Analyse bereits derart verändert, dass die anschließend durchgeführte Regelung nicht mehr greifen kann.

Diesem Fakt wird die sogenannte „In-Time-Analytik“ gerecht. Bei dieser Betriebsweise bioanalytischer Systeme steht nicht mehr im Vordergrund, wie das bioanalytische Systeme betrieben wird (in situ, ex situ, invasiv oder nicht invasiv), sondern das Einhalten des kritischen zeitlichen Parameters, um eine effektive Regelung des Prozesses zu ermöglichen.

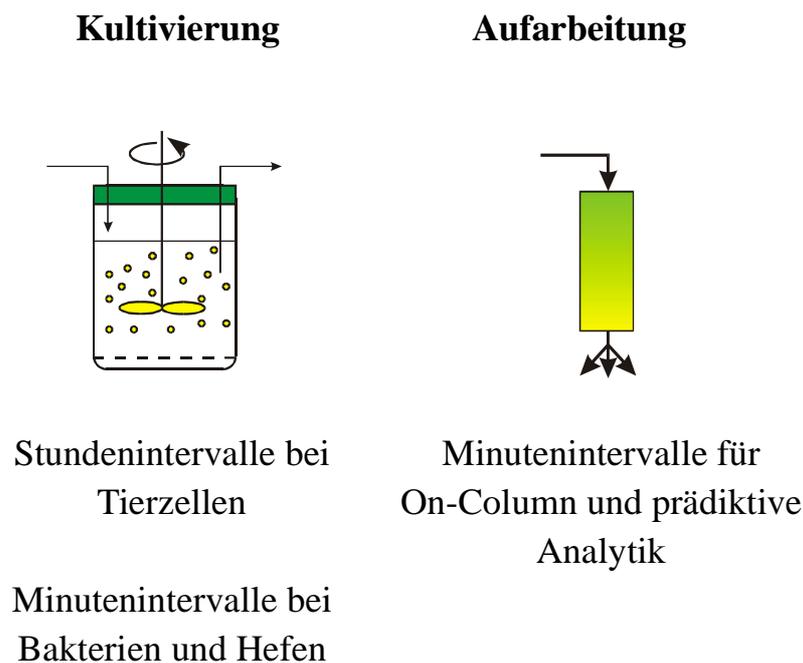


Abb. 6.1.2: Zeitintervalle verschiedener biotechnologischer Prozesse [364]

So kann ein Analysensystem mit einer niedrigen Analysenfrequenz ( $< 3 \text{ Analysen h}^{-1}$ ) für die Analytik einer Tierzellkultivierung durchaus sinnvoll sein, bei der Anwendung des Analysensystems bei der Kultivierung von Pilzen oder Bakterien mit Verdopplungsraten bis zu 20 Minuten ist solch ein System insbesondere bei hohen Biomassen nicht sehr nützlich.

Wenn ein System mit einer definierten Frequenz oszilliert, wie es beispielsweise bei quasi-kontinuierlichen chromatographischen Prozessen der Fall ist, so können die Analyseergebnisse eines Zyklus genutzt werden, um den nächsten Zyklus vorauszusagen. Um die Voraussage zu evaluieren, werden die Ergebnisse der Analytik des nachfolgenden Zyklus genutzt. Aufbauend auf diesen Daten kann eine erneute und eventuell verbesserte Vorhersage des nächsten Zyklus erfolgen. Auf diese Weise können auch sehr schnell ablaufende

chromatographische Prozesse mit Hilfe von z. B. Biosensoren überwacht werden, wie später noch gezeigt werden wird.

Neben der Fragestellung, ob das verwendete Analysensystem für den beobachtenden Prozesses die Analysendaten schnell genug liefert, ist es ebenso von großer Bedeutung, inwieweit die Messung den eigentlichen Prozess stört. Dabei ist es unerheblich, ob das System im In-Situ- oder Ex-Situ-Betrieb eingesetzt wird. Beide Systeme arbeiten invasiv und haben somit direkten Einfluss auf das biologische System. Mögliche Interaktionen sind dabei:

- Mechanische Belastung der Zellen durch Scherstress durch eine eingeführte Probennahmesonde
- Veränderung der Zusammensetzung des Kulturbrühe durch die Probennahme (An- bzw. Abreicherung von einzelnen Komponenten)
- Bei der zellfreien Probenahme reichert sich die Biomasse an
- Gefahr der Kontamination des Prozesses

Diese Probleme können umgangen werden, wenn nicht invasive Systeme zum Einsatz kommen. Bei der nicht invasiven Analytik werden weder Analyte durch die Messung verbraucht, noch ergeben sich Änderungen in der Zelldichte. In der Regel sind nicht invasive Techniken optische oder akustische (z. B. Ultraschall) Meßsysteme. Ein solches nicht invasives Verfahren stellt die 2D-Fluoreszenzspektroskopie dar, die bereits in Kapitel 4.3.2 in ihrer Anwendung bei der Optimierung der Kultivierungen mariner Mikroorganismen beschrieben worden ist.

Finden Ex-Situ-Systeme in der Bioprozessbeobachtung Anwendung und sollen diese im Onlinebetrieb eingesetzt werden, wie es in den meisten Fällen die Regel ist, so müssen diese Systeme in geeigneter Weise mit dem Bioprozess gekoppelt werden. Hierfür bieten sich die Fließinjektionsanalyse (FIA) oder die Sequentielle Injektionsanalyse (SIA) an. Die FIA-Technik wurde von Ruzicka und Hansen [368] Anfang der 80er Jahre insbesondere für den Laborbedarf entwickelt und ist komplizierter aufgebaut als die SIA-Technik. SIA-Systeme sind deutlich robuster und einfacher in der Bedienung und daher für die industrielle Praxis meist sinnvoller [369]. Eine SIA arbeitet in vier Schritten. Jede Messung startet mit dem Aufziehen einer Pufferlösung (Waschlösung) durch die Rückwärtsbewegung der Kolbenpumpe. Durch Umschalten der Ventilstellung werden dann die Probe und eventuell

benötigte Reagenzien in definierten Zonen in das System gezogen. In der nächsten Rückwärtsbewegung werden diese verschiedenen Zonen durch den Reaktions- und Detektionsbereich geführt. Im letzten Schritt werden nach Umschalten des Ventils die Lösungen durch die Vorwärtsbewegung der Pumpe aus dem System geführt. Beide Techniken sind in den letzten Jahren für eine Vielzahl von Anwendungen in der Bioprozesstechnik aufgebaut worden, wie beispielsweise für die Messungen von Kohlenhydraten (Glucose, Saccharose, Maltose, Lactose), Aminosäuren, Antibiotika oder intra- und extrazelluläre Proteine [370, 371, 372, 373].

### **6.1.2 Bioanalytische Systeme in der Praxis**

In bioanalytischen Systemen finden sehr häufig Biosensoren Anwendung (Abb. 6.1.3). Sie verwenden biologische Systeme, um eine Substanz sicher zu erfassen. Die biologische Komponente kann beispielsweise aus Enzymen, Mikroorganismen, Zellverbänden oder Antikörpern bestehen. Prinzipiell kann jede biologische Komponente verwendet werden, die mit der zu analysierenden Substanz eine vom geeigneten Sensor erfassbare spezifische Reaktion eingeht. Die biologische Komponente ist also als Signalgeber zu bezeichnen. Als Signalwandler stehen verschiedenste Sensoren (beispielsweise elektrochemische Sensoren, optische Detektoren, Halbleiterbausteine) zur Verfügung. Die Biosensoren sollten reversibel sein, also mehrfach genutzt werden können, um eine kontinuierliche Analytik zu ermöglichen. Seit der Entwicklung des ersten Sensors zur Bestimmung von Glucose durch L. C. Clark [374] im Jahre 1962, ist der Begriff der Biosensorik in der Forschung fest verankert. Die IUPAC definierte im Jahre 1989 in einem von der zuständigen Kommission eingebrachten Nomenklaturvorschlag [375] Biosensoren als „(...)miniaturisierte Messwertfühler, die in Verbindung mit einer biologischen Komponente chemische Verbindungen oder Ionen selektiv und reversibel erfassen und dabei konzentrationsabhängige Signale liefern(...)“. Die große Auswahl an Transducern und biologischen Komponenten ermöglicht zahlreiche Kombinationen zu den verschiedensten Biosensoren. Dementsprechend vielfältig sind die in der Literatur beschriebenen Anwendungen insbesondere für den Bereich des Monitorings biotechnologischer Prozesse. Ausführliche Abhandlungen und Übersichten zum Thema Biosensorik finden sich in den Literaturstellen [376, 377, 378, 379, 380, 381].

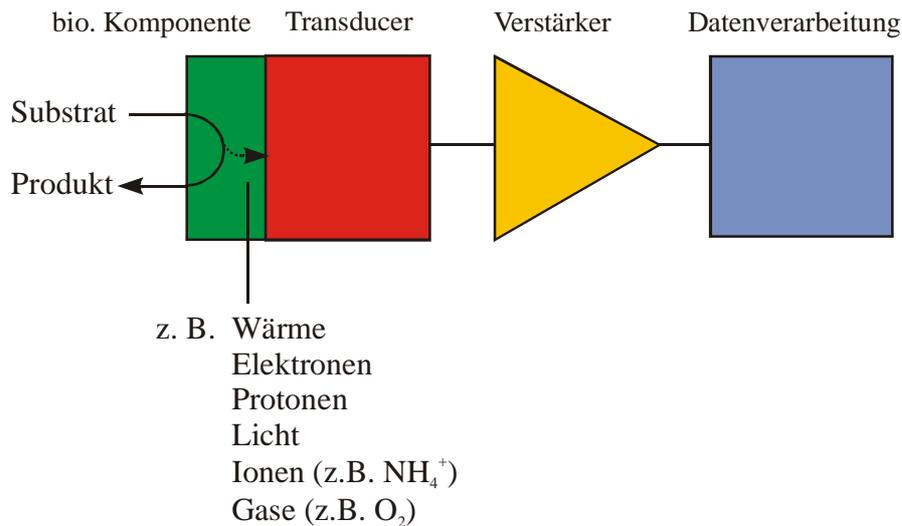


Abb. 6.1.3: Prinzipieller Aufbau von Biosensoren [382]

Aber nicht nur Biosensoren können für dieses Monitoring verwendet werden. Es hat sich vielmehr in den letzten 10 Jahren gezeigt, dass verschiedenste Sensoren zur Messung komplexer Größen genutzt werden können. So ist es möglich über elektrochemische oder optische Sensoren das biologische System zu erfassen, um Daten über dessen Zustand zu erhalten (z. B. Redoxpotential der Zellen). Diese Daten geben Auskunft über die Veränderungen des biologischen Systems und könnten damit zur Prozessregelung herangezogen werden, da sie einen direkten Einblick in die Bioaktivität geben können. Diese Sensoren müssen nicht invasiv arbeiten, um das biologische System bzw. den Gesamtprozess nicht zu stören. Denkbar ist es auch, ständig Zellproben aus dem Prozess zu entnehmen und dem bioanalytischen System zuzuführen. Hier ergeben sich jedoch größere Analysenzeiten durch die Probenahme und Möglichkeiten einer Prozessstörung.

Ein Beispiel für solche bioanalytischen Systeme stellt die Kernspinresonanzspektroskopie dar. Mit ihr kann ohne Beeinflussung des biologischen Systems ein Einblick in die Konzentration aller phosphorylierten Substanzen in den lebenden Zellen erhalten werden. Damit sind unter Quasiprozessbedingungen metabolische Untersuchungen möglich, da die Zwischenprodukte des Zellstoffwechsels online erfassbar sind. Leider sind diese Messungen extrem aufwendig und nur in speziellen miniaturisierten Reaktoren möglich, so dass sich für einen industriellen Einsatz bisher noch keine Möglichkeiten ergeben haben. Bei den elektrochemischen Sensoren sind sogenannte Impedanzsensoren im Einsatz, die die Messung der frequenzabhängigen makroskopischen Elektrizitätskonstanten in Suspensionskulturen aber auch von immobilisierten Mikroorganismen ermöglichen.

Da viele biologisch relevante Parameter bei einer Kultivierung oftmals gar nicht oder nur sehr schwer direkt bestimmt werden können, finden zunehmend sogenannte Softwaresensoren Anwendung. Mit Hilfe von z. B. einem Luenberger Beobachter oder Kalman Filter kann aus den erzielten Messdaten der Status der betrachteten Prozesse vorhergesagt werden, auch wenn direkte Messdaten z. B. der Substratkonzentration nicht zur Verfügung stehen. Mit Hilfe neuronaler Netze oder auch der Hauptkomponentenanalyse können weiterhin Daten vorangegangener Prozesse genutzt werden, um einen aktuellen Prozess zu bewerten. Die Hauptkomponentenanalyse kann aber auch genutzt werden, um Messwerte, die in einer engen Korrelation zueinander stehen, zur Vorhersage weiterer Prozessparameter zu nutzen. So kann beispielsweise bei der 2D-Fluoreszenzspektroskopie über die Hauptkomponentenanalyse und über eine multilineare Regression die direkt mit dieser Methode nicht erfassbare Glucosekonzentration vorhergesagt werden. Von besonderem Interesse ist der Einsatz von Biosensoren in Kombination mit Softwaresensoren in der biotechnologischen Prozessführung, da die heute verwendeten Hochleistungsmikroorganismen eine optimale Prozesssteuerung erforderlich machen, um eine maximale Raum/Zeit-Ausbeute zu erreichen. In der Literatur beschrieben sind z. B. Regelungen der Glucosekonzentration bei der Kultivierung verschiedener Mikroorganismen, die mit Hilfe eines Neuronalen Netzes bewerkstelligt werden [383, 384].

Neben der Datenauswertung ist bei der Verwendung von Biosensoren die Stabilität der biologischen Komponente von entscheidender Bedeutung. Der schnellste und genaueste Biosensor wird keine industrielle Anwendung finden, wenn er nur über eine kurze Zeit stabil betrieben werden kann. Großen Einfluss auf die Stabilität der biologischen Komponente hat deren Kopplung mit dem Transducer (Immobilisierung). Dieser Einfluss konnte bereits am Beispiel der Sulfitoxidase in Kapitel 4.4.3.4 dargestellt werden. Um Enzyme beim Einsatz in Biosensoren zu stabilisieren bzw. den Austausch denaturierter Enzyme ohne kompletten Austausch des Sensors zu ermöglichen, werden in der Literatur vermehrt Verfahren beschrieben, die eine reversible Immobilisierung ermöglichen. Hier sind insbesondere Verfahren zu nennen, die Glykoenzyme über ihre reversible Anbindung an Concanavalin A (Con A) [385, 386] oder über Metall-Protein-Wechselwirkungen [387] auf verschiedenen Trägermaterialien immobilisieren. Zur Erhöhung der biokatalytischen Aktivität der Sensoren wurden weiterhin die Verfahren des Bioaffinity- bzw. Immunoaffinity-Layering [388, 389] entwickelt. Bei diesen Verfahren werden Enzym und Bindungsmatrix (Con A bzw. Antikörper) wechselnd aufgebracht und bilden so ein sehr stabiles Netzwerk.

Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten bioanalytischer Systeme spiegeln sich in den letzten Jahren in einer Vielzahl von nationalen und internationalen Forschungskooperationen zwischen Forschungsinstitutionen und der Industrie wider. Ein Beispiel hierfür ist der „Verbund Sensorik in der Biotechnologie“ [382, 390, 391], der in den Jahren 1998 – 2001 von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt mit über 5 Millionen Euro gefördert worden ist. Der Verbund Sensorik in der Biotechnologie bestand aus insgesamt 34 Partnern, die in 14 Teilprojekten organisiert waren. Jedes der Teilprojekte bestand aus einem Partner, der die Entwicklung des bioanalytischen Systems durchführt, und mindestens einem industriellen Anwender des Verfahrens. In den Projekten sollte gezeigt werden, dass biotechnologisches Grundlagenwissen an industriellen Prozessen eingesetzt werden kann, um diese Prozesse ökonomisch und ökologisch sinnvoller zu gestalten. Ein Schlagwort heißt auch in diesem Zusammenhang „Sustainable Development“. Gemeint ist damit das nachhaltige Wirtschaften bei Industrieprozessen, bei dem Abfälle völlig vermieden werden und so Umweltschäden gar nicht erst anfallen. Diese Form des Umweltschutzes betrachtet den gesamten Produktionsprozess und soll gerade für kleine und mittelständische Unternehmen Zukunft haben. Diese Art des Umweltschutzes soll beweisen, dass umweltfreundliches Produzieren nicht etwa mehr Geld kostet, sondern ganzheitlich betrachtet wirtschaftliche Vorteile bietet.

## **6.2 Einsatz von bioanalytischen Systemen in industriellen Chromatographieprozessen**

Bei der Anwendung von bioanalytischen Systemen bei chromatographischen Prozessen kann eine ökonomische wie auch ökologische Verbesserung des Prozesses durch genaueres Bestimmen der Schnittgrenzen einzelner Fraktionen erreicht werden. Durch eine möglichst effiziente Trennung der Zielkomponenten werden unnötige weitere Prozessschritte vermieden, was zu einer Einsparung an Energiekosten, Elutionsmaterial und Abwasser führen kann. Der Einsatz von bioanalytischen Systemen bei der chromatographischen Aufreinigung von Proteinen ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden [392, 393, 394, 395, 396]. In den meisten beschriebenen Anwendungen wird aber nur ein Monitoring und keine Regelung des chromatographischen Prozesses durchgeführt. Ziel einer Prozessanalytik sollte es aber gerade sein, sowohl die Überwachung als auch die Regelung des Prozesses zu ermöglichen. Ansätze für solche Verfahren wurden unter anderem für die chromatographische Aufreinigung von IgG [397] und Alkohol-Dehydrogenase [398] entwickelt. Ebenfalls in der

Literatur beschrieben sind Immunosensoren, die für die Detektion von Blutfaktoren während des Downstreamprocessing eingesetzt werden können [399]. Diese Systeme weisen die höchste Nachweisspezifität auf. Aufgrund der hohen Kosten für die verwendeten Antikörper lohnt sich ihr Einsatz aber nur bei entsprechend hochwertigen Produkten.

Im nachfolgenden wird die Entwicklung und der Einsatz eines Biosensor zur Schnittgrenzenbestimmung bei der chromatographischen Aufarbeitung von Zuckerrübenmelasse, die bei der Zuckergewinnung aus Zuckerrüben in großen Mengen anfällt, vorgestellt. Zum besseren Verständnis des Einsatzgebietes dieses Sensors wird zunächst auf die Zuckerrübenmelasse und den Prozess der Melasseentzuckerung eingegangen.

### **6.2.1 Der Prozess der chromatographischen Melasseentzuckerung**

Aufgrund des hohen Trockensubstanzanteils, der überwiegend aus Saccharose besteht, ist die Melasse hochviskos. Melasse ist tiefbraun gefärbt, was im wesentlichen auf die Oxide und Carbonate der mineralischen Bestandteile zurückzuführen ist. Über viele Jahre wurde Melasse fast ausschließlich als Futtermittel in der Schweine- und Rindermast verwendet oder wurde als Substrat für Fermentationsprozesse eingesetzt [400]. Das hohe Veredelungspotential dieses landwirtschaftlichen Rohstoffes blieb unberücksichtigt. In den letzten Jahren wurden nunmehr vermehrt industrielle Großanlagen aufgebaut, die neben den in der Melasse enthaltenen Restzucker auch weitere Bestandteile für den Einsatz in der Pharma- und Lebensmittelindustrie aufarbeiten. So werden bei der Amino GmbH, Frellstedt, jährlich etwa 60.000 t dieser Zuckerrübenmelasse chromatographisch in ihre Bestandteile aufgetrennt. Neben der Gewinnung des 50 %igen Zuckeranteils, der als Flüssigzucker anfällt, erlaubt der seit 1983 betriebene chromatographische Prozess ebenfalls die gezielte Anreicherung anderer Komponenten. Darunter fallen die minoren Komponenten der Melasse. Diese sind Verbindungen, die nur zu einem geringen Anteil (<1 %) in der Melasse enthalten sind, deren Gewinnung sich jedoch aufgrund der großen Menge anfallender Zuckerrübenmelasse lohnen kann. Diese minoren Komponenten, die zusammen einen Anteil von etwa 30 % an der Melasse ausmachen, bestehen aus über 80 Substanzen in wechselnden Konzentrationen. Den größten Anteil machen dabei mit 40 % organische Stickstoffverbindungen (Aminosäuren) und

Oligosaccharide aus [401]. Eine ungefähre Aufteilung einzelner Verbindungsgruppen in der Melasse ist in der Abbildung 6.2.1 dargestellt.

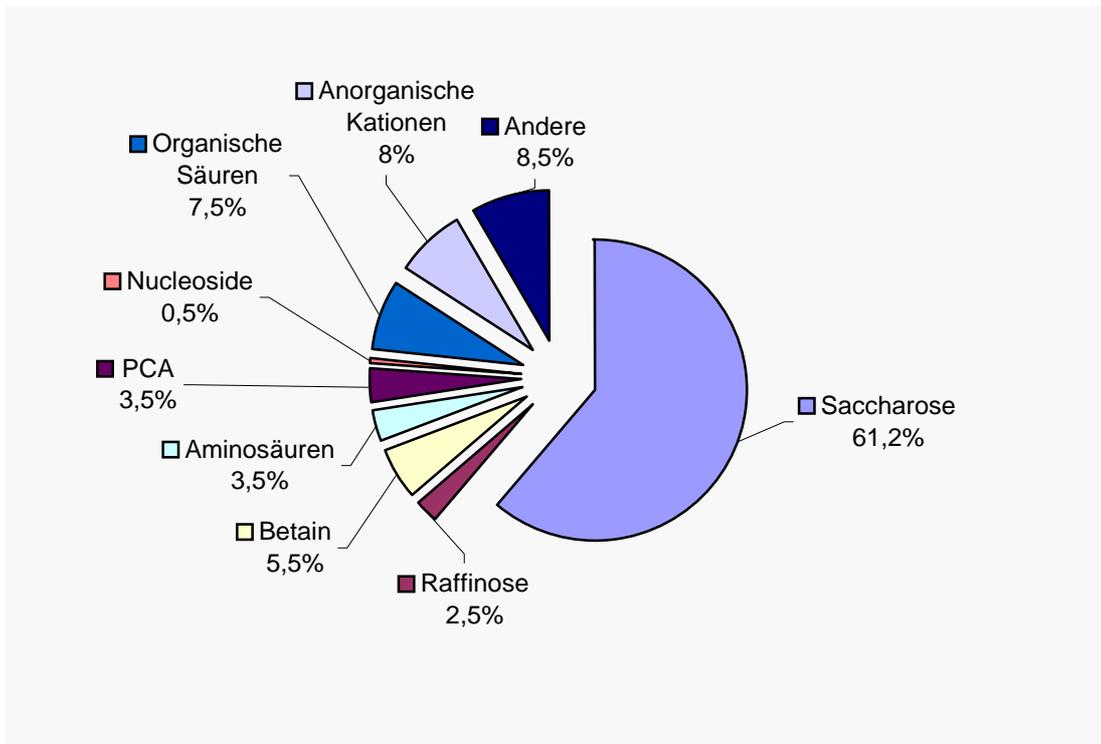


Abb. 6.2.1: Prozentuale mittlere Zusammensetzung von Zuckerrübenmelasse; Angaben in % Trockenmasse

Ein in der Industrie häufiger eingesetztes Verfahren für die Aufarbeitung von Zuckerrübenmelasse, wie es auch die AMINO GmbH in Frellstedt verwendet, ist das Finnsugar-Trennverfahren [402]. Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden in Kooperation mit der AMINO GmbH durchgeführt und der Biosensor daher auf die Prozessbedingungen im Finnsugar-Trennverfahren angepasst. Bei dem Verfahren wird die Melasse nach exakter Einstellung des Trockensubstanz-Gehalts, des pH-Wertes und anschließender Enthärtung durch Ionenausschluss-Chromatographie in einzelne Fraktionen getrennt. Ein vereinfachtes Chromatogramm dieses Prozesses ist in der Abbildung 6.2.2 wiedergegeben. Beim Finnsugar-Trennverfahren werden verschiedene Fraktionen auf die Säulen zurückgeführt, um eine möglichst hohe Auftrennung zu erhalten. Dadurch wird bei gleichem Elutionswasserverbrauch eine auch von modernsten SMB-Anlagen (Simulated-Moving-Bed) nicht übertroffene Zuckerreinigung erzielt [403]. Aufgrund der hohen Flexibilität der industriellen Anlage können bereits im ersten Trennschritt gleichzeitig mehrere Komponenten aufgereinigt werden.

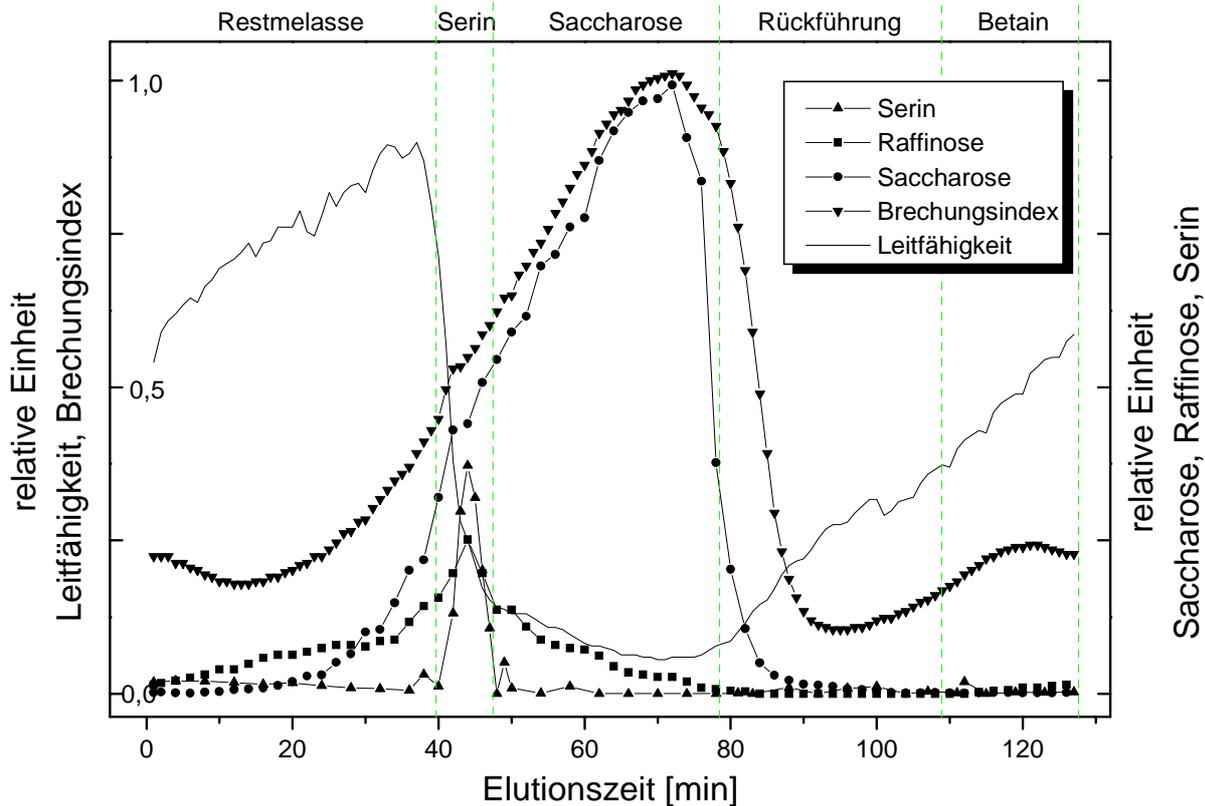


Abb. 6.2.2: Elutionsprofil einer Trennkolonne der chromatographischen Melasseentzuckerung, Amino GmbH, Frellstedt, mit Schnittführung der industriellen Anlage: Restmelasse, Serin, Saccharose, Rückführung, Betain (vereinfachte Darstellung) [404]

Gezeigt ist in Abbildung 6.2.2 ein Chromatogramm des ersten Schrittes der Melasseaufarbeitung. Bei diesem Prozessschritt wird die Trennung über monodisperse sulfonierte Polystyrol-DVB-Harze in sechs parallel laufenden 80 m<sup>3</sup>-Chromatographiesäulen durchgeführt. Die Elution wird bei 90 °C mit Wasser durchgeführt. Dabei werden für einen Chromatographiezyklus ca. 26 m<sup>3</sup> Wasser benötigt. Die hohen Temperaturen während der chromatographischen Melasseentzuckerung begünstigen zum einen die Diffusion verschiedener Inhaltsstoffe in die Poren des Harzes, zum anderen kann auf diese Weise unerwünschten Foulingeffekten vorgebeugt werden. Neben der Melasse werden auf die Säulen auch Rückführfraktionen aufgetragen. Bedingt durch die Säulenhöhe ist es weiterhin möglich nach zwei Stunden eine neue Melassecharge auf die Säule aufzugeben, obwohl ein kompletter Chromatographiezyklus von der Aufgabe bis zur Elution der letzten Fraktion etwa sechs Stunden benötigt. Durch diese Prozessführung befinden sich insgesamt drei Trennläufe gleichzeitig auf einer Säule und der Zyklus verkürzt sich auf knapp 2 Stunden. Die genaue Länge eines Trennzykluses hängt zum einen von dem leicht unterschiedlichen Verhalten der

einzelnen Trennsäulen ab, zum anderen haben die starken Schwankungen in der Melassezusammensetzung einen erheblichen Einfluss auf die Elutionszeiten der verschiedenen Fraktionen.

Die Abbildung 6.2.2 verdeutlicht die fünf Hauptfraktionen, die in diesem ersten Aufreinigungsschritt gewonnen werden:

- Bis zur 40. Minute eluiert die Restmelasse-Fraktion, die einen großen Teil der Salze organischer Säuren enthält. Diese Fraktion wird aufkonzentriert und gelangt als teilentzuckerte Melasse in den Handel.
- Bis ungefähr zur 45. Minute wird für einen Zeitraum von etwa 5 Minuten die Serin-Fraktion gewonnen. Auf diesen Schnitt wird in Kapitel 6.2.2 gesondert eingegangen.
- Bis etwa zur 80. Minute wird die Saccharose-Fraktion geschnitten, die Saccharose in hoher Reinheit liefert.
- Bis zur 110. Minute wird eine Rückführfraktion geschnitten, die erneut auf die Säulen aufgetragen wird.
- Bis zur 120. Minute wird abschließend das Betain gewonnen, anschließend wiederholt sich der Zyklus von vorne.

Die Chromatographiesäulen können ca. 20 Tage ohne Regeneration betrieben werden, bevor sich ihre Trennleistung deutlich verschlechtert. Durch Rückspülung des Harzes werden die Säulen dann regeneriert. Das Harz selbst besitzt eine ungefähre Haltbarkeit von 15 Jahren. Ersatz während der Lebensdauer der Harze ist nur für den geringen Verlust durch Bruch des Polymerharzes notwendig [404, 405].

Hauptprodukt der chromatographischen Melasseentzuckerung ist die gewonnene Saccharose, die noch weitere Aufreinigungsschritte zum Abtrennen von Salzen und Farbstoffen durchläuft. Sie wird aber nicht kristallisiert, sondern findet als Flüssigzucker in der Lebensmittelindustrie Verwendung. Durch die Saccharoseproduktion wird auch die Gewinnung anderer Inhaltstoffe der Melasse rentabel. Der Fokus der hier dargestellten Arbeiten liegt bei der Gewinnung der Aminosäure Serin, die als Rohstoff für Pharmawirkstoffe eingesetzt wird.

### 6.2.2 Optimierung der Schnittgrenzen der Serinfraktion

Die Prozessführung (Setzen der Schnittgrenzen der einzelnen Fraktionen) des Finnsugar-Trennverfahrens basiert bei der AMINO GmbH auf den online gemessenen physikalischen Parametern:

- Dichte
- Leitfähigkeit
- pH-Wert
- Temperatur

Des Weiteren kann durch eine densitometrische Messung des Trockensubstanzgehaltes ( $1^\circ\text{Bx} \hat{=} 1\% \text{ TS}$ ) und durch Bestimmung des Drehwinkels von linear polarisiertem Licht im Polarimeter ( $1^\circ\text{S} \hat{=} 1\% \text{ Saccharose}$ ) die Reinheit der Saccharosefraktion ermittelt werden. Hierzu wird der Quotient  $Q_z = \frac{^\circ\text{S}}{^\circ\text{Bx}}$  gebildet. Diese Analytik liefert jedoch keine Absolutwerte und wird durch alle Melasseinhaltsstoffe gestört, die ebenfalls den Brechungsindex oder die Ebene des polarisierten Lichtes verändern (z. B. Aminosäuren oder Raffinose). Aufgrund von Erfahrungswerten und aufgrund der geringen Konzentrationen in denen die Störsubstanzen auftreten, ist mit diesem Analyseverfahren eine gute Abschätzung der Saccharosekonzentration im Elutionsprofil möglich.

Für die Bestimmung der Schnittgrenzen der restlichen Fraktionen steht keine direkte Onlineanalytik zur Verfügung. Es werden daher die oben aufgeführten physikalischen Parameter zur Prozesssteuerung herangezogen. Bei der Gewinnung der Aminosäure Serin wird das Elutionsverhalten aufgrund von Erfahrungswerten abgeschätzt und in regelmäßigen Abschnitten durch Probenahme und Analyse im Labor offline kontrolliert. Diese Analytik wird über einen HPLC-Aminosäure-Analyser durchgeführt. Für eine Messung werden bei diesem Analyser etwa 60 Minuten benötigt. Um das Elutionsprofil des Serins bestimmen zu können, werden etwa 10-15 Proben meist über Nacht analysiert. Das Verfahren erfüllt somit nicht die Bedingungen der in Kapitel 6.1.1 vorgestellten In-Time-Analytik. Dieses liegt daran, dass das Serin ca. alle 2 Stunden von der Säule eluiert, die Analyseergebnisse aber erst mit einer zeitlichen Verzögerung von 12 – 24 h zur Verfügung stehen. Erst dann kann festgestellt werden, ob die Trennung optimal verlaufen ist. Durch zahlreiche Rückführfraktionen muss daher sichergestellt werden, dass nur geringe Verluste an Serin auftreten. Die Schnittführung

hat erheblichen Einfluss auf die Reinheit, Ausbeute und Konzentration der Serin-Fraktion. Bei einer schlechten Schnittführung gelangen große Mengen an Restmelasse in den Serin-Schnitt. Diese Verunreinigungen müssen im anschließenden Aufreinigungsprozess wieder entfernt werden. Je mehr Verunreinigungen in die nächste Chromatographiestufe überführt werden, desto eher muss diese Stufe regeneriert werden (Ionenausschlusschromatographie). Wäre man somit in der Lage das Serin in time im Chromatographieprozess zu messen und somit die optimalen Schnittgrenzen von Zyklus zu Zyklus zu bestimmen, so würden unnötige Prozessschritte eingespart werden. Damit verbunden wäre eine deutliche Kostenreduktion und eine Umweltentlastung, da weniger Prozesswasser, weniger Salze (für die nachfolgende Ionenausschlusschromatographie) und weniger Energie aufgewendet werden müsste.

### 6.2.2.1 Entwicklung eines D-Serinbiosensors

Wie weiter oben beschrieben worden ist, sind Biosensoren in der Lage, einzelne Verbindungen auch in komplexen Gemischen schnell und sicher zu detektieren. Es wurde daher ein biosensorisches Verfahren an dem Prozess etabliert, welches die Schnittgrenzen der Serinkonzentration in time und on column ermitteln und somit zur Prozesssteuerung eingesetzt werden kann [119, 406, 407]. Um einen solchen Sensor zu konstruieren, musste zu Beginn eine Auswahl der biologischen Komponente und des Transducers erfolgen. Durch Voruntersuchungen konnte festgestellt werden, dass im Bereich der Serin-Fraktion etwa zehn Aminosäuren in unterschiedlicher Konzentration eluieren. Will man einen enzymbasierten Biosensor am Prozess einsetzen, so muss darauf geachtet werden, dass ein Enzym gewählt wird, welches möglichst spezifisch das Serin neben den anderen Aminosäuren nachweisen kann. Durch die Prozessbedingungen und die Vorbehandlung der Melasse wird das Analysenproblem etwas vereinfacht. Der Rohsaft der Zuckerrüben wird in der Zuckerfabrik zur Abtrennung von Nicht-Zuckerstoffen bei Temperaturen oberhalb von 90 °C mit Calciumcarbonat und Kohlendioxid versetzt. Durch die hohen Temperaturen und den hohen pH-Wert ( $\text{pH} > 12,0$ ) racemisieren die Aminosäuren Serin und Tyrosin aufgrund ihrer CH-Acidität. In der Zuckerrübenmelasse liegen somit racemische Gemische von D,L-Serin und D,L-Tyrosin vor. Diesen Umstand kann man sich für die Entwicklung eines Biosensors zunutze machen, indem man das D-Enantiomer des Serins bestimmt. In ersten Versuchen wurde daher eine D-Aminosäureoxidase (D-AAOD) aus *Trigonopsis variabilis* verwendet. Bei der Umsetzung von D-Aminosäuren mit der Oxidase wird Sauerstoff verbraucht. Dieser

Sauerstoffverbrauch kann mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode detektiert und mit der D-Aminosäurekonzentration in Korrelation gebracht werden. Alle weiteren nicht racemisierten Aminosäuren in der Melasse sollten diese Reaktion nicht eingehen. Es zeigte sich allerdings sehr schnell, dass dieses Enzym zu unspezifisch ist, um eine konkrete Vorhersage der D-Serinkonzentration treffen zu können (Abb. 6.2.3).

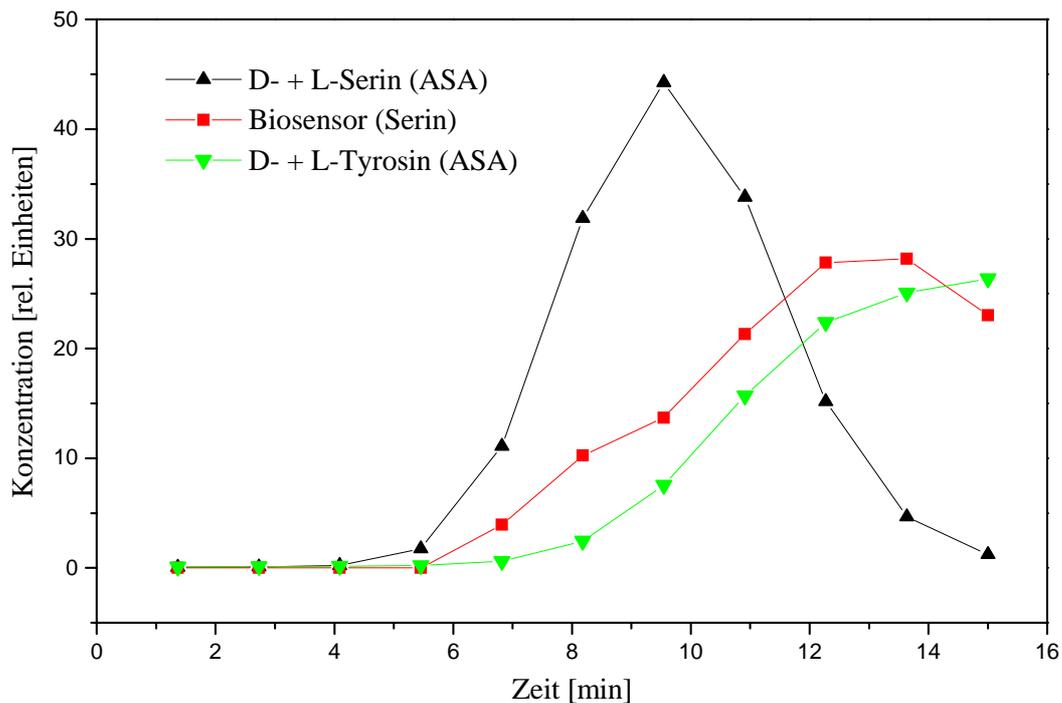


Abb. 6.2.3: Eluatproben aus der Serin-Fraktion, Messwerte des Biosensors mit D-Aminosäure-Oxidase und Vergleich der Werte mit der Referenzanalytik (Aminosäureanalytator; ASA; s. Kap 7.18) [407]

Der mit dem Biosensor vermessene Verlauf entspricht nicht dem Verlauf, der durch Messung mit dem ASA erzielt worden ist. Dieses liegt in der Tatsache begründet, dass das eingesetzte Enzym neben D-Serin auch D-Tyrosin umsetzt, welches über einen längeren Zeitraum in geringen Konzentrationen eluiert wird. Das System musste somit derart modifiziert werden, dass ein Enzym mit einer sehr hohen Spezifität D-Serin gegenüber eingesetzt wird.

Ein solches Enzym stand mit der D-Serin-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae* zur Verfügung [408]. Das Enzym setzt neben D-Serin (=100 %) geringe Anteile L-Serin (7,9 %), sowie L- (1,9 %) und (16,3 %) D-Threonin um [409]. Threonin ist in den untersuchten Fraktionen jedoch nicht enthalten. Durch D-Serin-Dehydratasen wird – analog zu den in

Kapitel 4.4.2 beschriebenen L-Serin-Dehydratasen - die Aminosäure durch eine nicht-oxidative Desaminierung in Pyruvat umgewandelt. Um diese Umsetzung möglichst sensitiv über einen Biosensor nachzuweisen, wurde eine zweite enzymatische Umsetzung mit dieser Reaktion gekoppelt. Als zweiter Reaktionsschritt wurde die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat über eine Lactat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion ausgewählt. Ein Schema dieser gekoppelten enzymatischen Reaktionen ist in Abbildung 6.2.4 dargestellt.

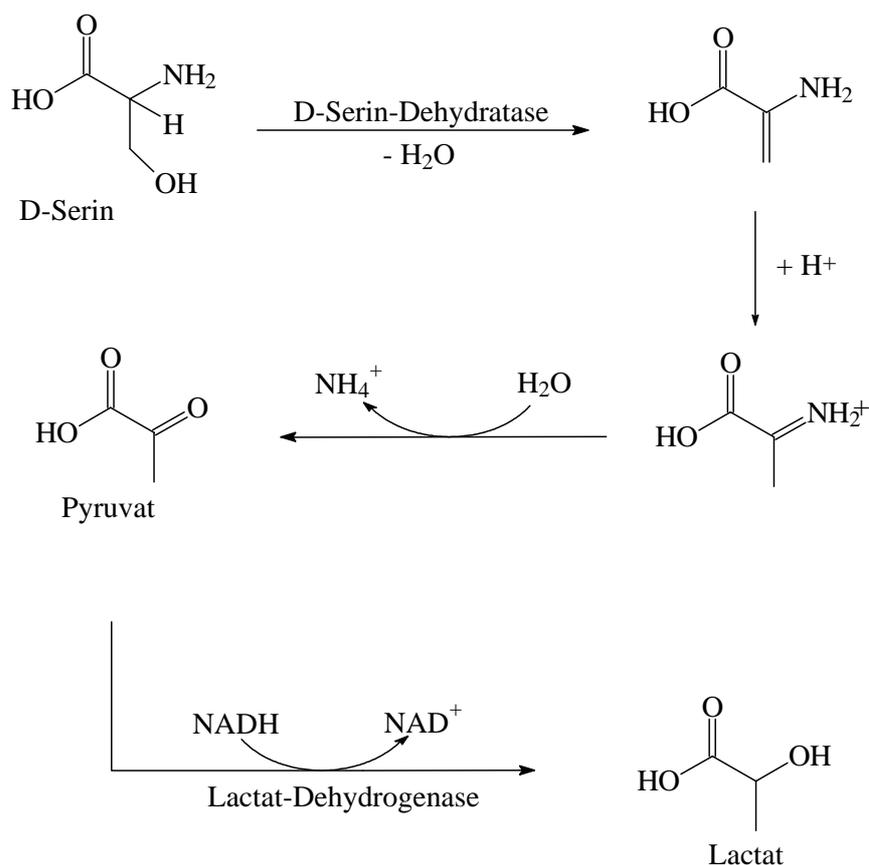


Abb. 6.2.4: Schema der gekoppelten Reaktion von D-Serin-Dehydratase und Lactat-Dehydrogenase zur Detektion von D-Serin [119]

Die Detektion erfolgt photometrisch über das bei der Umsetzung verbrauchte Cosubstrat Nicotinamidadenindinucleotid (NADH, reduzierte Form) in einem Durchflussphotometer bei 340 nm. Die Abnahme der NADH-Konzentration ist proportional zur D-Serin-Konzentration. Durch die gekoppelte Reaktion wird die Spezifität des Biosensors erhöht. Sollten im ersten Reaktionsschritt noch andere Substanzen durch das Enzym umgesetzt werden, hat dieses keinen Einfluss auf die eigentliche Detektionsreaktion. Im zweiten Schritt wird nur das aus D-Serin gebildete Pyruvat erfasst.

Zum Aufbau eines bioanalytischen Systems musste das gewählte Enzymsystem in geeigneter Art und Weise mit dem Transducer (Photometer) in einem FIA-System gekoppelt werden. Dafür bot sich die Verwendung von Durchflusskartuschen an, in denen die Enzyme auf VA-Epoxy immobilisiert eingesetzt werden (s. Anhang Kap. 8.19). Das so erzeugte Immobilisat kann bei  $-18^{\circ}\text{C}$  über einen Zeitraum von bis zu 30 Monaten gelagert werden. Es verfügt auch dann noch über eine ausreichend hohe Aktivität (61% der Ausgangsaktivität). Die optimalen Betriebsbedingungen dieses Systems wurden wie folgt ermittelt [404,405]:

- Temperatur:  $32^{\circ}\text{C}$
- Betriebspuffer: 50 mM KPP, pH 8
- Cosubstrat: NADH ( $c = 3,5 \text{ mM}$ )
- Volumenstrom: 0,5 ml/min
- Messmodus: Stopped-Flow
- Messdauer: 2 min pro Messzyklus

Mit diesem System können D-Serinkonzentrationen in einem linearen Messbereich von 33 bis 37,5 mg/l bestimmt werden. Eine direkte Ankopplung des Sensorsystems an die Chromatographiesäulen ist aber nicht möglich gewesen, da die Zeit für eine Messung mit zwei Minuten noch zu langsam für eine Optimierung des Prozesses ist. Wie weiter vorne gezeigt, eluiert die Serinfraktion innerhalb von 4-5 Minuten, so dass maximal zwei Messwerte aufgenommen werden könnten. Dieses ist nicht ausreichend, um den Verlauf der Serinfraktion hinreichend genau bestimmen zu können. Daher wurde das System derart erweitert, dass eine In-Time-Analytik möglich war.

### 6.2.2.2 Aufbau und Einsatz der In-Time-Analytik für Serin

Wie in Kapitel 6.2.1 erläutert, dauert ein kompletter chromatographischer Zyklus etwa zwei Stunden. Erste Offlineuntersuchungen mit dem Serin-Sensor haben gezeigt, dass sich das Elutionsverhalten der Trennkolonnen nur langsam ändert, so dass von Zyklus zu Zyklus nur geringe Unterschiede zu erwarten sind. Die Zeitbedarf des Biosensorsystems von zwei Minuten pro Analyse erlaubt es zwar nicht, dass die Schnittgrenzen während der Elution festgelegt werden, dieses ist aber auch nicht zwingend notwendig. Für eine Optimierung des chromatographischen Prozesses ist es ausreichend, wenn die Analysenergebnisse in der Zeit

zwischen zwei Serin-Peaks zur Verfügung gestellt werden können. Auf diese Weise können eventuelle Änderungen der Schnittgrenzen in time durchgeführt werden, bevor die nächste Serin-Fraktion eluiert. In Abbildung 6.2.5 wird dieses Prinzip verdeutlicht.

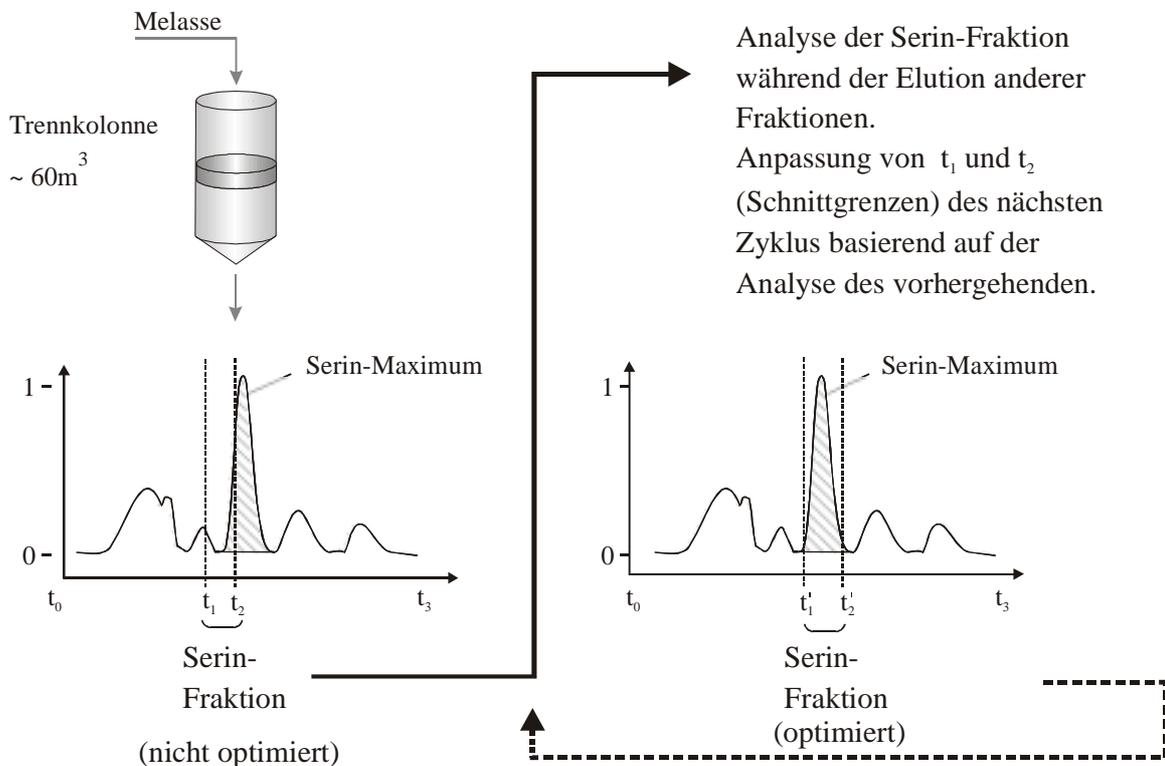


Abb. 6.2.5: Konzept der In-Time-Analytik der D-Serinkonzentration während der chromatographischen Melasseentzuckerung [119]

Der linke Teil der Abbildung beschreibt einen ehemaligen Ist-Zustand des Prozesses. Die Schnittgrenzen für die Serin-Fraktion wurden zu den Zeitpunkten  $t_1$  und  $t_2$  gesetzt. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, eluiert das Serin erst später und gelangt fast komplett in die Rückführ-Fractionen. Zur Optimierung des Schnittprofils wurden vom Zeitpunkt  $t_1-1\text{min}$  bis zum Zeitpunkt  $t_2+1\text{min}$  Proben gesammelt und mit dem Serin-Sensor analysiert. Diese Analytik kann ungefähr 90 Minuten lang dauern. Es steht dann noch ausreichend Zeit zur Verfügung, um die Analysenergebnisse an die Prozessanalytik weiterzuleiten und die Schnittgrenzen für den nachfolgenden Serin-Peak bei Bedarf zu korrigieren. Dieses Verfahren wird mit der nächsten Serin-Fraktion wiederholt. Auf diese Weise können die Schnittgrenzen der jeweils nachfolgenden Fraktion optimal gesetzt werden.

Das aufgrund dieser Überlegungen konzipierte bioanalytische System (FIA-Anlage) besteht aus einem Autosampler mit Pumpe (Gilson 222XL, Abimed, Langenfeld), einem Injektor (EVA-Line, Eppendorf, Hamburg) und einem UV-Detektor (UV-Detektor L-7400, Merck + Hitachi, Darmstadt). Das System ist modular aufgebaut, die Ansteuerung der Module wird durch eine A/D-D/D-Karte über TTL-Impulse (Transistor-Transistor-Logic) realisiert. Zur Steuerung der Anlage wird ein 486er PC mit dem Programm CAFCA 2.0 (Computer Assisted Flow Control & Analysis, Anasyscon, Hannover) benutzt. Das in Turbo Pascal 7.0 verfasste Programm ermöglicht neben der Ansteuerung der Module die Aufnahme und Auswertung der Messsignale. Der Aufbau des Systems ist in der Abbildung 6.2.6 wiedergegeben.

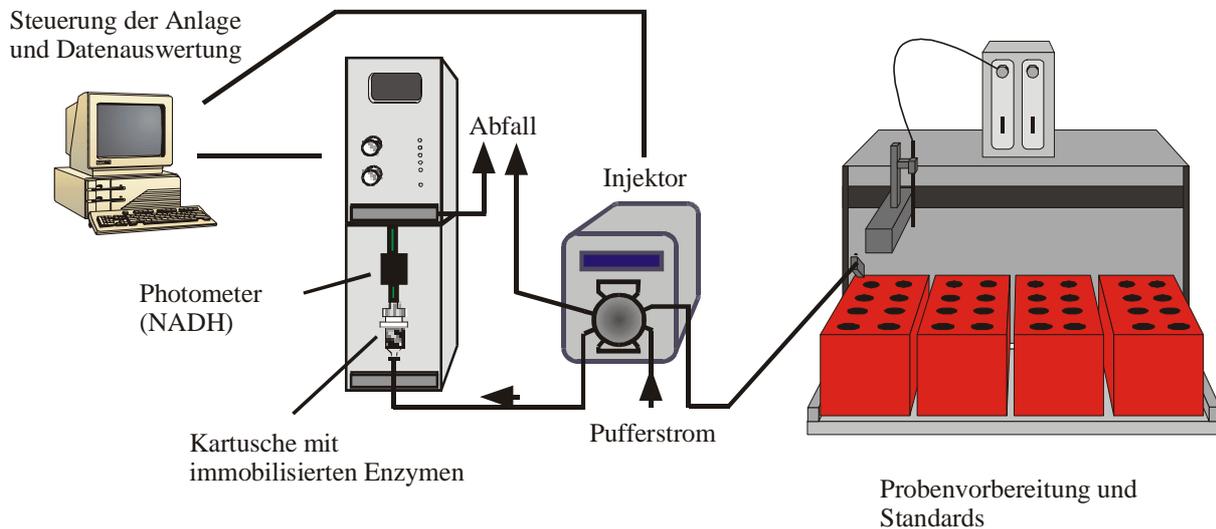


Abb. 6.2.6: Aufbau des bioanalytischen Systems zur In-Time-Analytik von D-Serin während der chromatographischen Melasseentzuckerung [119]

Dieses System konnte sehr erfolgreich bei der industriellen Melasseentzuckerung eingesetzt werden. In Abbildung 6.2.7 ist der Vergleich der Analysenergebnisse des Biosensors und des Aminosäureanalysators dargestellt. Zwar ergeben sich deutliche Abweichungen bei der Absolutkonzentration der D,L-Serinesamtkonzentration, welches aber für die Bestimmung der Schnittgrenzen unerheblich ist. Der Verlauf der Peaks stimmt sehr gut überein. Die Abweichungen in den Absolutkonzentrationen sind dadurch zu erklären, dass das Verhältnis von D-Serin zu L-Serin in der Melasse nicht konstant ist. Während die Referenzanalytik beide

Enantiomere erfasst, ermittelt das bioanalytische System nur die D-Komponente. Zur Berechnung der Gesamtkonzentration wurde ein D-Anteil von 80% angenommen.

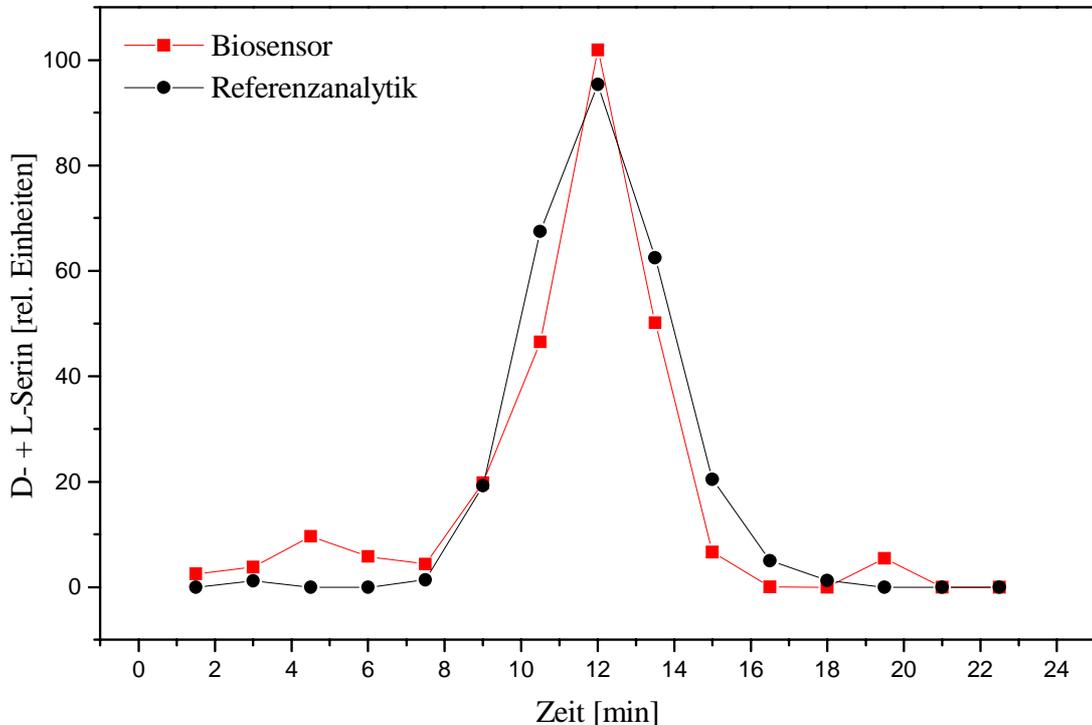


Abb. 6.2.7: Vergleich der Analysenergebnisse des Biosensors mit denen der HPLC-Referenzanalytik (ASA) [119]

Das Sensorsystem arbeitet unter Prozessbedingungen mindestens eine Woche stabil, nach dieser Zeit ist ein Austausch der Enzymkartusche notwendig. Bei Messungen über einen längeren Zeitraum konnte gezeigt werden, dass eine langsame Verschiebung der Serin-Fraktion zu späteren Retentionszeiten hin erfolgt. Abbildung 6.2.8 zeigt einen zeitlichen Verlauf der Schnittführung der chromatographischen Anlage über 20 Tage. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, verschlechtert sich die Trennleistung der Säulen in diesem Zeitraum um 10%. Da die Ausgangskonzentration von Serin über den betrachteten Zeitraum konstant war, kann die Abnahme der Peakflächen nicht durch geringere Serinkonzentrationen bedingt sein.

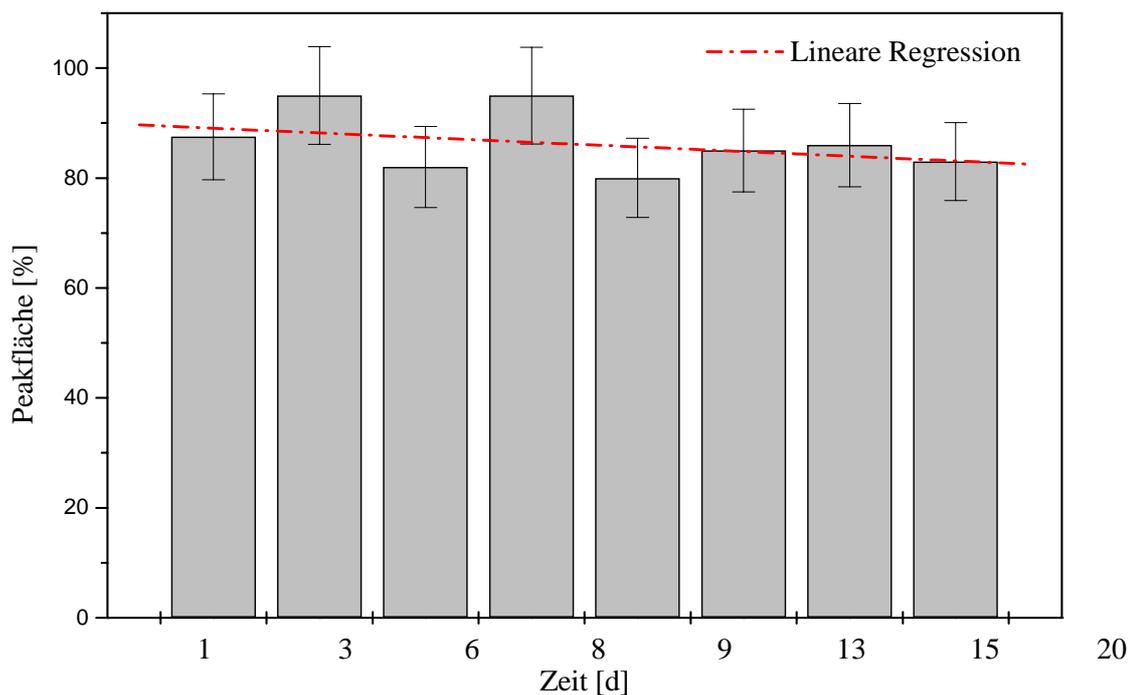


Abb. 6.2.8: Peakfläche von ausgewählten Serin-Fractionen über einen Zeitraum von 20 Tagen; ideale Schnittführung = 100 % [406]

### 6.2.3 Ökonomische und ökologische Bewertung des Verfahrens

Es konnte durch die Untersuchungen am industriellen Prozess gezeigt werden, dass die Serin-Fraktion oft nicht optimal geschnitten wurde und so ein erheblicher Teil des Serins in die Rückführfraktionen gelangte. Mit Hilfe eines Biosensorsystems konnte eine In-Time-Analyse des Chromatographieprozesses erfolgen, die zur Bestimmung der Schnittgrenzen für die Aminosäure Serin herangezogen werden kann. Durch die Anwendung der In-Time-Analytik und das optimale Setzen der Schnittgrenzen ließ sich der Verbrauch an Energie und Chemikalien deutlich verringern. Im Vergleich zum anfänglichen Zustand kann bei optimaler Auslegung des Prozesses eine bis zu 60 % höhere Produktkonzentration erzielt werden. Daraus können Einsparungen resultieren, die nicht primär bei der Ionenausschluss-Chromatographie, sondern bei den nachfolgenden Aufreinigungsschritten und der Umsetzung des Serins zu Tryptophan (s. Kapitel 6.3) zu erzielen sind. Durch die höhere Konzentration des Serins können bei der nachfolgenden Entfärbung durch Aktivkohle und Ionenaustausch geringere Mengen an Chemikalien, Prozesswasser und Dampf eingesetzt werden. Durch die

höhere Produktreinheit wird die Kristallisation erleichtert und gleichzeitig weniger Energie (in Form von Dampf) zum Konzentrieren der Lösungen benötigt. Die Einsparungen beim CSB (Chemischer Sauerstoffbedarf) resultieren aus der höheren Serinkonzentration und –reinheit bei der Umsetzung zu L-Tryptophan, die sich sowohl bei der Biotransformation als auch bei der anschließenden Aufreinigung positiv auswirken (Kap. 6.3). Konkret ergeben sich durch den Einsatz des Biosensors zur In-Time-Bestimmung der Schnittgrenzen der Serinfraktion die in Tabelle 6.2.1 angegebenen Optimierungseffekte.

Tab. 6.2.1: Erzielte Optimierungen durch Einsatz des Biosensorsystems; Angaben bezogen auf 1 Jahr

Erzielter Effekt	60 % höhere Produktkonzentration	25 % höhere Ausbeute	35 % weniger Abwasser
Einsparung von	200-250 t Dampf	3500 m <sup>3</sup> Elutionswasser <sup>1</sup>	3500 m <sup>3</sup> Abwasser
	30 % spezifische Produktionsenergie	110 t HCl <sup>1</sup>	180 t CSB
		80 t NaOH <sup>1</sup>	
		80 t NH <sub>3</sub> <sup>1</sup>	
		8 t Aktivkohle <sup>1</sup>	

<sup>1</sup>Die Angaben beziehen sich auf die Einsparungen bei den nachfolgenden Aufarbeitungsschritten

Durch dieses Beispiel wird deutlich, dass der Einsatz von Biosensorsystemen zur spezifischen Analytik einzelner Verbindungen in komplexen Gemischen auch in der industriellen Praxis sinnvoll sein kann. Die erzielten Effekte durch die Optimierung der Schnittgrenzen führen für das Unternehmen zu einer ökonomischen Verbesserung, da Rohstoffkosten (Chemikalien), Energie- und Entsorgungskosten reduziert werden. Aus der Optimierung resultieren aber auch deutliche ökologische Vorteile, da weniger Energie in den Prozess eingebracht werden muss und weniger Abwasser (und damit verbunden weniger CSB) in die Umwelt abgegeben wird.

### 6.3 Einsatz bioanalytischer Systeme bei der Produktion von Tryptophan

Bei der AMINO GmbH werden Aminosäuren für den pharmazeutischen Markt nicht nur über das beschriebene chromatographische Verfahren sondern auch über nachgeschaltete Biotransformationen (enzymatische Katalyse) gewonnen. So wird die gewonnene Serinfraktion (s. Kap. 6.2.2) durch eine biokatalysierte Reaktion mit Indol zum Tryptophan umgesetzt. Die Umsetzung erfolgt mit dem Enzym Tryptophansynthase (EC 4.2.1.20) als Biokatalysator und Pyridoxalphosphat als Coenzym (Abb 6.3.1). Für den patentierten Prozess wird nicht das reine Enzym sondern eine Wildtypmutante von *Escherichia coli* eingesetzt, die das Enzym konstitutiv überexprimiert [410, 411].

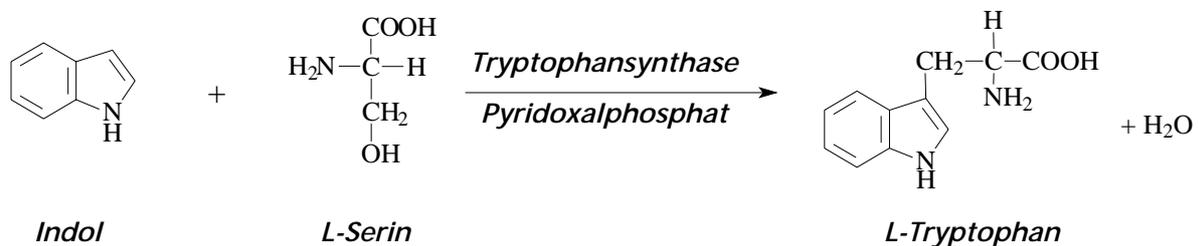


Abb. 6.3.1: Reaktionsschema der Biotransformation von L-Serin und Indol zu L-Tryptophan; Reaktionsbedingungen: wässrig, pH 8-9, 40 °C

Der Biokatalysator wird in der serinhaltigen Reaktionslösung suspendiert und das Indol im Fed-Batch-Verfahren zugegeben. Hierbei ist eine Onlineprozesskontrolle unabdingbar, um eine optimale Raum-Zeit-Ausbeute zu erzielen, da zum einen eine zu hohe Indolkonzentration vermieden werden muss, um eine inhibierende Wirkung des Indols auf die Prozesseffektivität zu verhindern. Zum anderen können bei unzureichender Einstellung der Konzentrationen Nebenreaktionen auftreten, die die Quantität und die Qualität des Produktes beeinträchtigen bzw. zusätzliche Aufarbeitungsschritte erfordern würden. Des weiteren ergeben sich bei nicht optimaler Reaktionsführung Umweltbelastungen derart, dass nicht umgesetztes Indol in die Umwelt gelangen könnte. Zu diesem Zweck wird die Indolkonzentration mittels Online-HPLC-Analyse (Meßfrequenz: 20 min) verfolgt und durch entsprechende Dosierung aufrecht erhalten.

Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war es, eine Prozessanalytik zu etablieren, die einerseits in kürzeren Zeitintervallen messen und andererseits neben der Indolkonzentration auch alle anderen Substrat- und Produktkonzentrationen bestimmen kann. So sollte die gesamte

Reaktionskinetik und die variierende Biokatalysatoraktivität erfasst und die Reaktandenkonzentration dementsprechend optimal eingestellt werden [412].

### 6.3.1 Produktion von Tryptophan

Das gesamte Prozessschema zur Herstellung von L-Tryptophan bei der Amino GmbH ist in der Abbildung 6.3.2 wiedergegeben. Der Biotransformationsprozess wird, wie aus der Abbildung ersichtlich, über verschiedene Stufen gefahren. Der abschließende Produktionsbioreaktor hat ein Volumen von 10.000 Litern. Die, in den Vorstufen kultivierten Bakterien, werden durch das zugegebene Indol permeabilisiert, so dass die Reaktanden zum Enzym gelangen können. Nach Beendigung des Prozesses wird die Biomasse abzentrifugiert und kann dann erneut eingesetzt werden. Die tryptophanhaltige Lösung wird durch Aktivkohle und mehrmaliges Umkristallisieren gereinigt. Das so erhaltene L-Tryptophan besitzt Pharmaqualität.

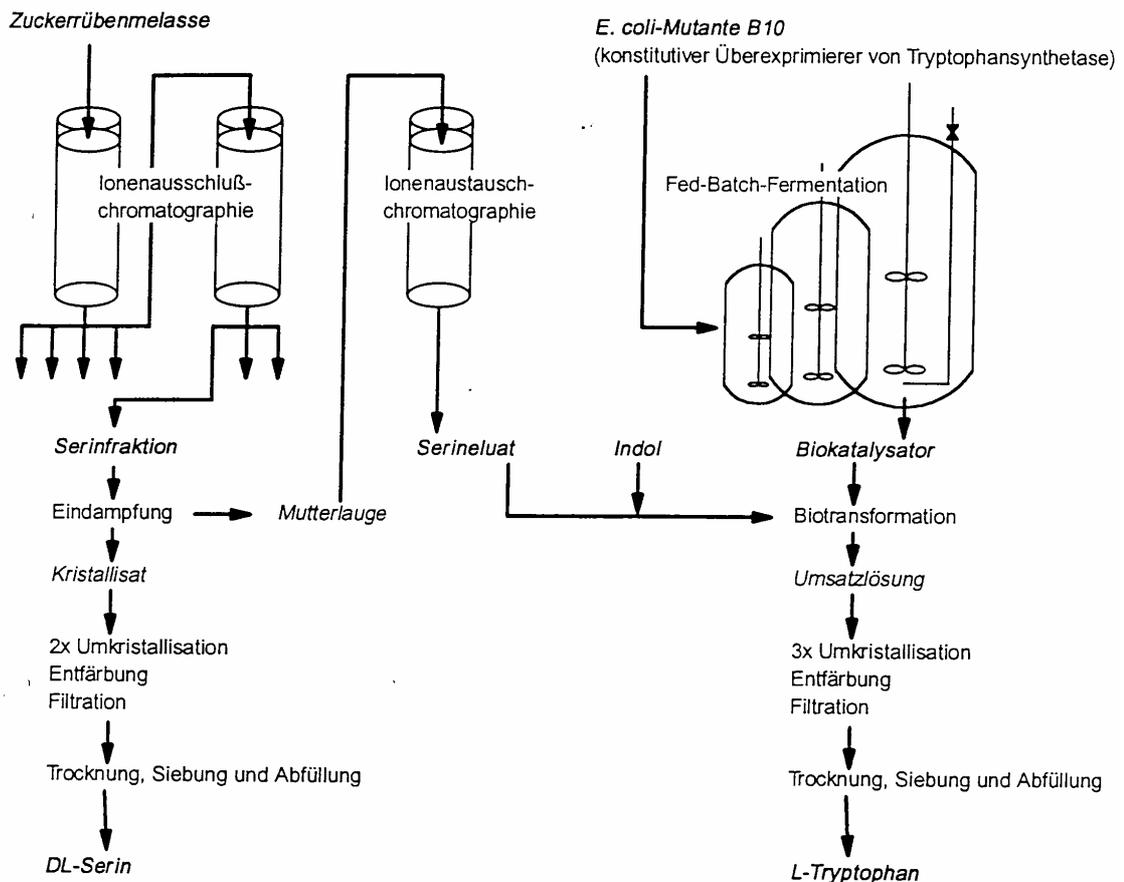


Abb. 6.3.2: Prozessschema der Produktion von L-Tryptophan [413]

Von den 20 proteinogenen Aminosäuren ist Tryptophan eine der weniger häufigen. Da es eine essentielle Aminosäure ist, vom menschlichen Körper also nicht hergestellt werden kann und daher mit der Nahrung aufgenommen werden muss, findet Tryptophan als Lebensmittelzusatzstoff sowie in der parenteralen Ernährung Verwendung. Im menschlichen Stoffwechsel wird ein Teil des Tryptophans zum Neurotransmitter Serotonin (Kap. 4.4.4) sowie dem Zirbeldrüsenhormon Melatonin metabolisiert. Aufgrund dieser Metabolite wird Tryptophan auch als Antidepressivum und Narkotikum eingesetzt [414].

Zur Darstellung von L-Tryptophan wurden neben dem hier vorgestellten Prozess weitere chemische, mikrobielle und enzymatische Prozesse entwickelt. Alle Darstellungsmethoden können in zwei unterschiedliche Wege unterteilt werden. Entweder wird Indol als Startmaterial benutzt oder der Indolring wird während der Synthese geformt. Durch die saure Hydrolyse von Proteinen ist Tryptophan nicht zugänglich, da es unter den sauren Hydrolysebedingungen zerstört wird (s. Kap. 5.5.2.1). Bei den chemischen Synthesen erhält man meist D,L-Tryptophan, aus welchem durch enzymatische Racematspaltung das L-Tryptophan gewonnen werden kann. Die früher benutzten chemischen Synthesewege für Tryptophan wurden mittlerweile vollständig durch mikrobielle und enzymatische Methoden verdrängt. In den enzymatischen Prozessen wird neben der beschriebenen Tryptophansynthetase auch Tryptophanase (L-Tryptophan-Indol-Lyase) eingesetzt. Normalerweise werden nicht die isolierten Enzyme sondern Mikroorganismen, die die Enzyme intrazellulär anreichern, verwendet. Da beide Enzyme Pyridoxalphosphat als Cosubstrat benötigen, kann dieses bei der Verwendung von intakten Zellen durch weitere Enzyme, die in den Zellen ebenfalls vorhanden sind, regeneriert werden. Der Hauptvorteil dieser Methoden liegt in der hohen Ausbeute von mehr als 100 g L-Tryptophan pro Liter Reaktionsansatz. Die biotechnologische Produktion von L-Tryptophan führte zu einer kontinuierlichen Abnahme des Weltmarktpreises bei gleichzeitig zunehmender Nachfrage [414].

Im Jahre 1989 trat in einigen Fällen nach der Einnahme von Tryptophan die schwere, zum Teil tödlich verlaufende Erkrankung Eosinophilie-Myalgie-Syndrom (EMS) auf. Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Tryptophanchargen des japanischen Produzenten Showa Denko für das Auftreten dieser Krankheit verantwortlich waren. Bei der Herstellung dieser Chargen war ein gentechnisch veränderter Stamm von *Bacillus amyloliquefaciens* verwendet worden. Daher wird der „Fall Tryptophan“ häufig als Beweis für die Gefährlichkeit der Gentechnik

genutzt. Mit der Einführung eines neuen Stammes wurde jedoch auch die Aufarbeitung des Produktes verändert. Mit Hilfe von HPLC-Untersuchungen wurde als eine direkte Folge der Reinigungsbedingungen das Auftreten von Verunreinigungen nachgewiesen, von denen zwei am häufigsten als Auslöser des EMS diskutiert werden. Besonders eingehend wird in diesem Zusammenhang eine Substanz diskutiert, die als „Peak E“ in die Literatur eingegangen ist und als 1,1'-Ethylyden-bis-L-tryptophan (EBT) erkannt wurde. Die Bildung von EBT trat in den betroffenen Chargen nicht während der Kultivierung sondern erst bei der Aufarbeitung mit stark sauren Kationenaustauschern durch Reaktion von Tryptophan mit Acetaldehyd, einem Nebenprodukt der Kultivierung, auf [414].

### 6.3.2 Ankopplung einer In-Time-Prozessanalytik an die Biotransformation

Damit im Verlauf des Tryptophan-Produktionsprozesses im Werk der AMINO GmbH eine regelmäßige Online-HPLC-Analyse von Tryptophan und Indol möglich ist, wird durch einen Bypass am Produktionsreaktor ein kontinuierlicher Volumenstrom (1 bis 2 l/min) gepumpt. Mit Hilfe eines Cross-Flow-Filtrationsmoduls wird ein zellfreier Probenfluss für die Online-HPLC-Analyse entnommen. An dieser Stelle sollte nunmehr ein weiteres Onlineanalysensystem angekoppelt werden, welches in der Lage ist, die geforderten Daten in einer höheren Messsequenz zur Verfügung zu stellen. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl Indol als auch L-Tryptophan fluoreszenzaktive Verbindungen sind, wurde in diesem Fall die im Kapitel 4.3.2 näher beschriebene 2D-Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt [202, 415]. Für die Fluoreszenzmessungen wurde in dem Bypass eine Durchflussmesszelle installiert, an die über einen Flüssiglichtleiter (Lumatec) ein Spektralfluorimeter (BioView, Delta Light & Optics, Dänemark) angekoppelt wurde. Dieses verfügt über einen Flüssiglichtleiter und kann daher äußerst flexibel (z. B. auch in ex-geschützten Räumen) eingesetzt werden. Die Steuerung des BioViews und die Datenaufnahme erfolgt durch einen Computer mit entsprechender Steuersoftware. Über einen weiteren Computer erfolgt die Auswertung der Messdaten. In die Messzelle ist gleichzeitig ein Probenahmenhahn integriert, durch den Proben zur späteren Offlinevergleichsanalytik entnommen werden können. Der Aufbau der Produktionsanlage mit integriertem Messsystem ist in der Abbildung 6.3.3 zu sehen.

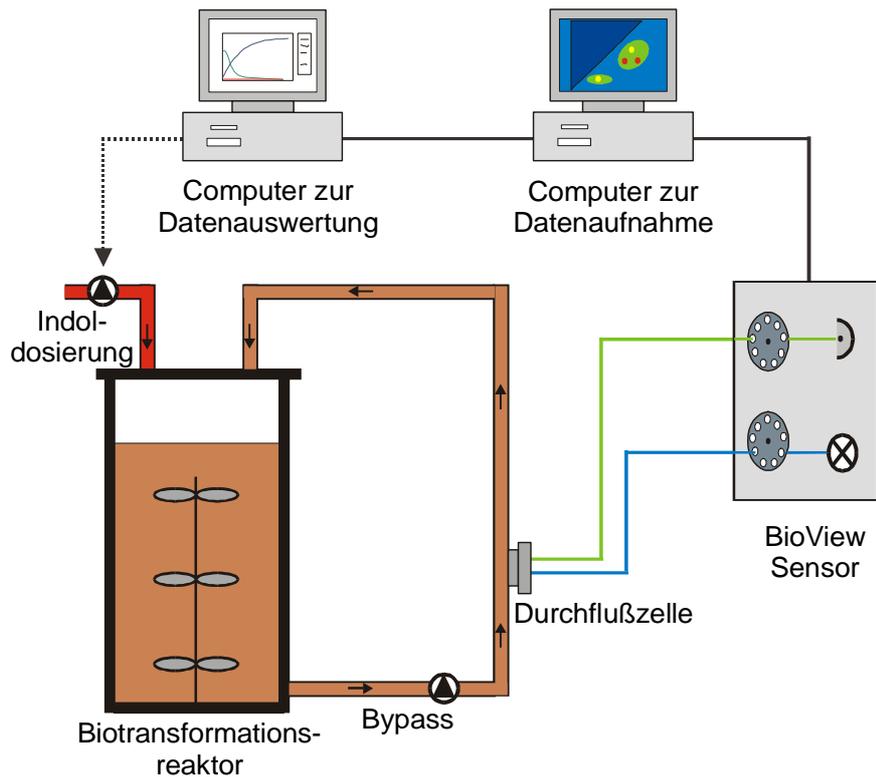


Abb. 6.3.3: Schematischer Aufbau des Messsystems [416]

Ein weiteres bioanalytisches System sollte in Form eines Biosensors für L-Serin an den Prozess angekoppelt werden. Hierfür wurde ein für L-Serin spezifisches Enzym benötigt. Wie in Kapitel 4.4.2 ausführlich beschrieben, wurde daher ein Screening nach solchen Enzymen durchgeführt, welches letztendlich auch erfolgreich abgeschlossen werden konnte. Mit der L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilia* konnte ein ausreichend selektives und stabilisierbares Enzym für einen solchen Biosensor aufgereinigt werden. Erste Untersuchungen zur Immobilisierung und Integration in ein Biosensorsystem sind bereits durchgeführt worden [129]. Die Arbeiten sind aber noch nicht soweit fortgeschritten, dass ein Einsatz am Prozess erfolgen konnte. Daher wird sich an dieser Stelle auf die Ergebnisse der 2D-Fluoreszenzspektroskopie beschränkt.

Mit Hilfe mathematischer Modelle konnten anhand der aufgenommenen Fluoreszenzspektren Vorhersagen über die Konzentrationsverläufe der beteiligten Substrate und des Produktes getroffen werden [412]. Über die 2D-Fluoreszenzspektroskopie kann so eine optimale Regelung der Indoldosierung erreicht werden. Abbildung 6.3.4 zeigt ein typisches 2D-Fluoreszenzspektrum, wie es im Verlauf des Produktionsprozesses aufgenommen wird. Als

fluoreszierende Substanzen liegen in der Reaktionsmischung zum einen Indol und L-Tryptophan vor, zum anderen fluoreszierende Bestandteile der eingesetzten Serinlösung. Serin selbst fluoresziert nicht. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind Inhaltsstoffe der Zuckerrübenmelasse, die auch durch die vorhergehende chromatographische Aufreinigung nicht entfernt werden können.

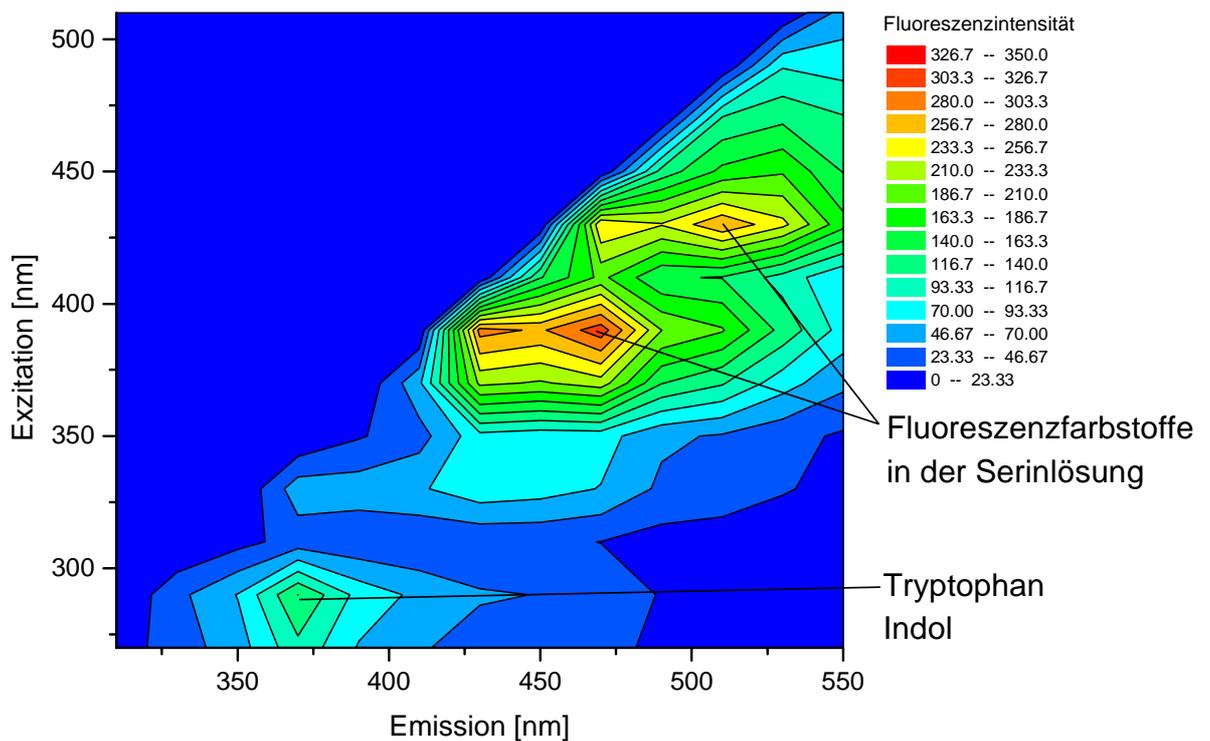


Abb. 6.3.4: 2D-Fluoreszenzspektrum der Biotransformation von Indol und L-Serin zu Tryptophan [416]

Um Aussagen über die Änderungen im Prozess treffen zu können eignen sich am besten Differenzspektren, wie sie in der Abbildung 6.3.5 dargestellt sind. Hierbei wird von jedem Spektrum das Spektrum vom Beginn des Prozesses abgezogen, wobei blaue Bereiche abnehmende und rote Bereiche ansteigende Fluoreszenzaktivität anzeigen. Beim Tryptophanproduktionsprozess treten im Prozessverlauf in zwei Bereichen des Fluoreszenzspektrums unterschiedliche Intensitätsverläufe auf. So ist eine Zunahme der Fluoreszenz im Tryptophan/Indol-Bereich und eine Abnahme im Bereich der Fluoreszenzfarbstoffe der Serinlösung zu beobachten (Abb. 6.3.5).

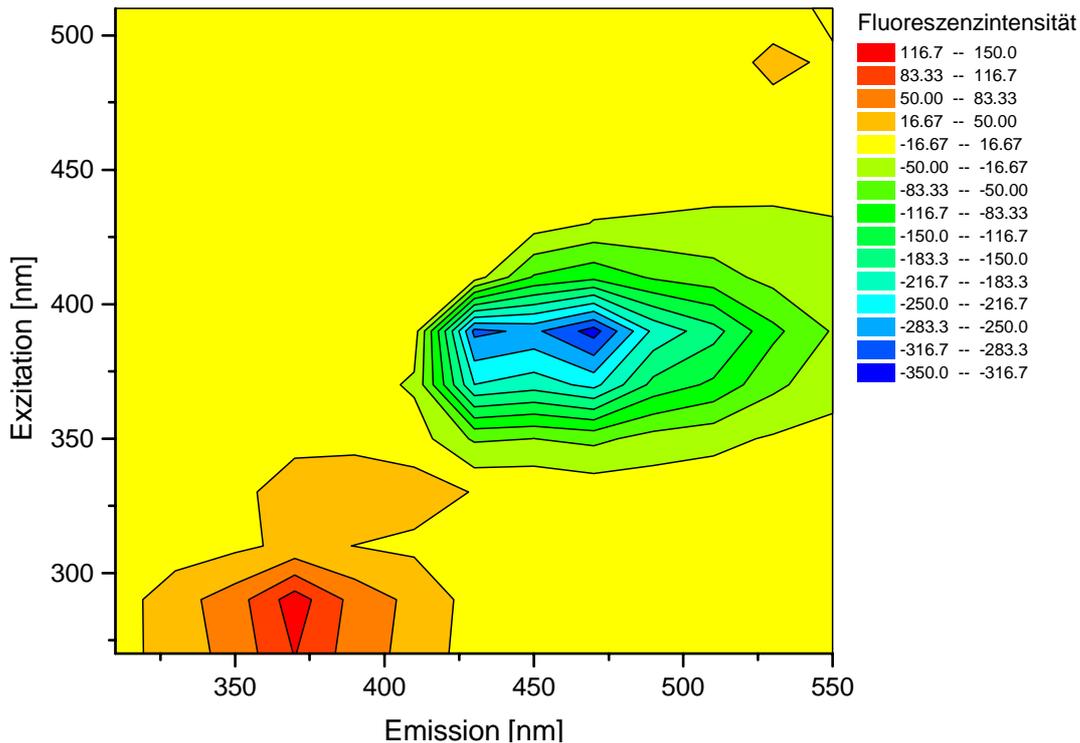


Abb. 6.3.5: Differenzspektrum (Prozessende – Prozessstart) der Biotransformation von Indol und L-Serin zu Tryptophan [415]

Die aus den Differenzspektren gewonnenen Daten lassen sich mit Hilfe von Sensitivitätsanalysen dahingehend überprüfen, welche Wellenlängenbereiche für die Ermittlung der Konzentrationen von Tryptophan, Serin und Indol ausschlaggebend sind. In der Abbildung 6.3.6 ist das Ergebnis einer solchen Sensitivitätsanalyse für die drei Verbindungen dargestellt. Die Relevanz der 2D-Fluoreszenzbereiche für die Ermittlung der entsprechenden Konzentration wird durch Werte zwischen Null (nicht sensitiv) und 1 (höchste Sensitivität) ausgedrückt. Aus diesen Daten und aus den Differenzspektren lassen sich bei der Biotransformation von Indol und Serin zu Tryptophan Fluoreszenzbereiche in den 2D-Spektren identifizieren, deren unterschiedliche Intensitätsverläufe sich der Zunahme der Fluoreszenz im Tryptophan/Indol-Bereich und der Abnahme im Bereich der Fluoreszenzfarbstoffe der Serinlösung zuordnen lassen. Das Sensitivitätsspektrum für Indol zeigt nur einen kleinen relevanten Bereich bei Ex270nm:Em330nm. Dieser Bereich liegt dicht neben dem Bereich der Indolfluoreszenz (Ex280nm:Em340nm bis Ex300nm:Em360nm). Das Sensitivitätsspektrum liegt nicht direkt im Bereich der Indolfluoreszenz, da auch Tryptophan in diesem Bereich fluoresziert und beide Fluorophore nebeneinander in unterschiedlicher Konzentration vorliegen. Für Serin stellt sich ein großer Bereich als sensitiv heraus, der

sowohl den Bereich der Co-Enzym-Fluoreszenz als auch den der Proteinfluoreszenz umfasst. Für Tryptophan zeigt sich ein kleiner Bereich der Tryptophanfluoreszenz, ergänzt durch geringe Sensitivitäten im Bereich der Co-Enzyme und Proteine, als besonders sensitiv.

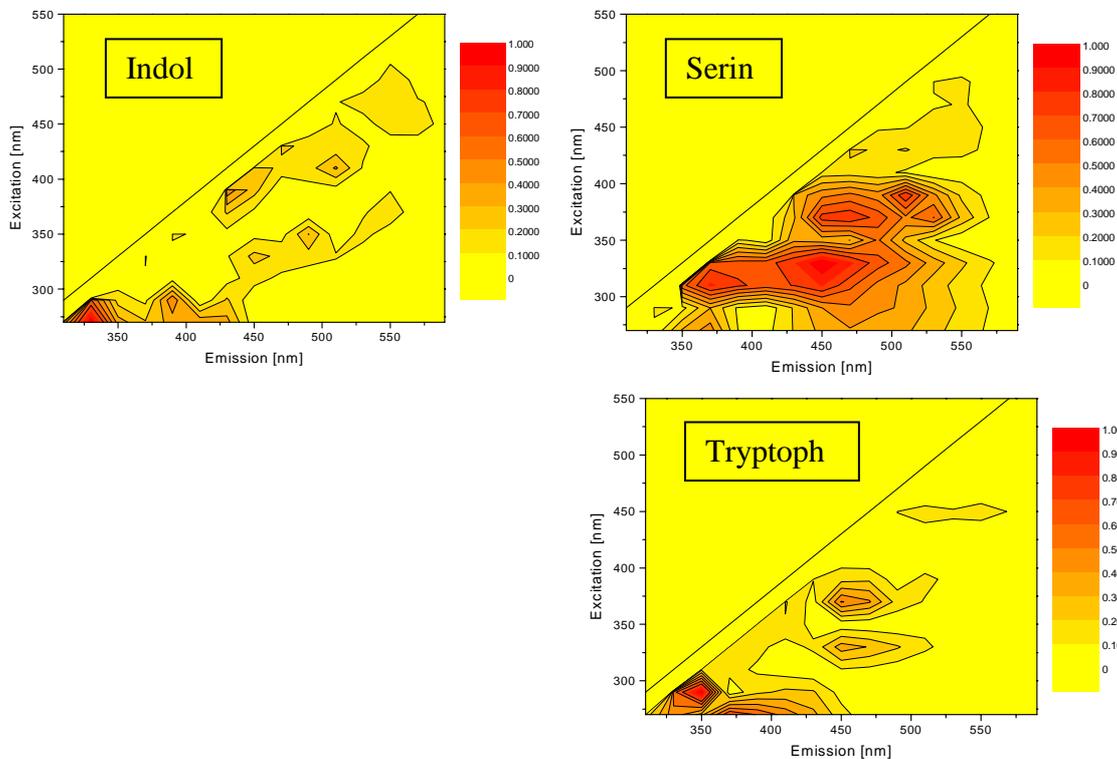


Abb. 6.3.6: Sensitivitätsspektren für Indol, L-Serin und L-Tryptophan bei der Biotransformation [412, 415]

Durch dieses Verfahren lassen sich die Konzentrationsverläufe dieser wichtigen Prozessparameter unter der Verwendung eines chemometrischen Modells [412] mit hoher Genauigkeit vorhersagen. In Abbildung 6.3.7 und 6.3.8 sind die mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie gemessenen Konzentrationsverläufe für Tryptophan und Serin bzw. für Indol im Vergleich zur einer Offline-HPLC-Analytik dargestellt. Die Offlineproben wurden zu Beginn des Prozesses alle 5 Minuten und im weiteren Verlauf des Prozesses alle 20 Minuten genommen. Das chemometrische Modell zur Datenauswertung (Messwertvorhersage) wurde unter Zuhilfenahme der HPLC-Messdaten und der Fluoreszenzdaten (Messfrequenz: 1 min) erstellt. Wie aus den Abbildungen zu erkennen ist, zeigt sich dabei eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen Offlinewerten sowie den Werten einer solchen Vorhersage. Lediglich bei längeren Prozesslaufzeiten ergeben sich Abweichungen bei den vorhergesagten Tryptophankonzentrationen. Mit der 2D-

Fluoreszenzspektroskopie steht somit eine Analysenmethode zur Verfügung, durch deren Einsatz die schnelle Vorhersage von Prozessdaten erreicht werden kann.

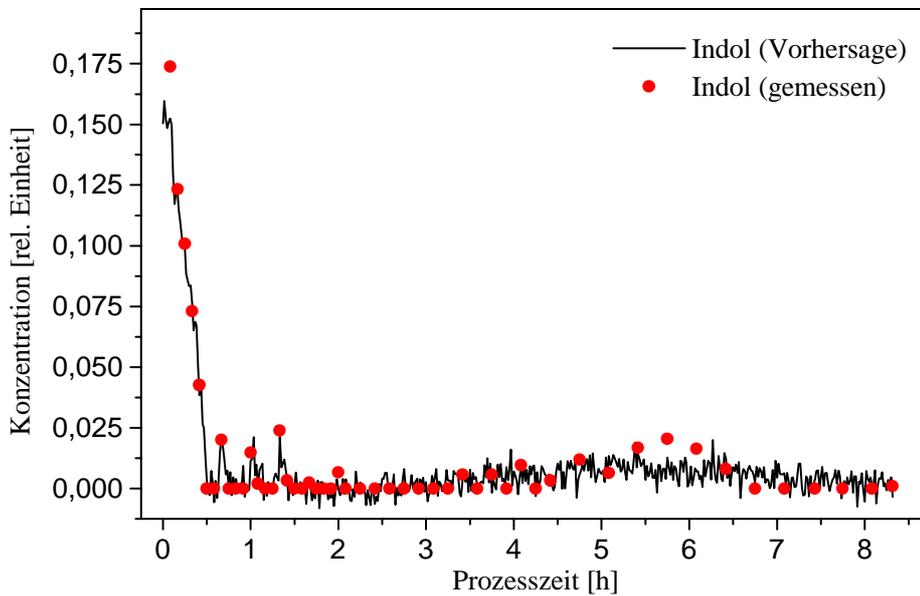


Abb. 6.3.7: Konzentrationsverläufe für Tryptophan und Serin während der Biotransformation (gemessen und vorhergesagt) [415]

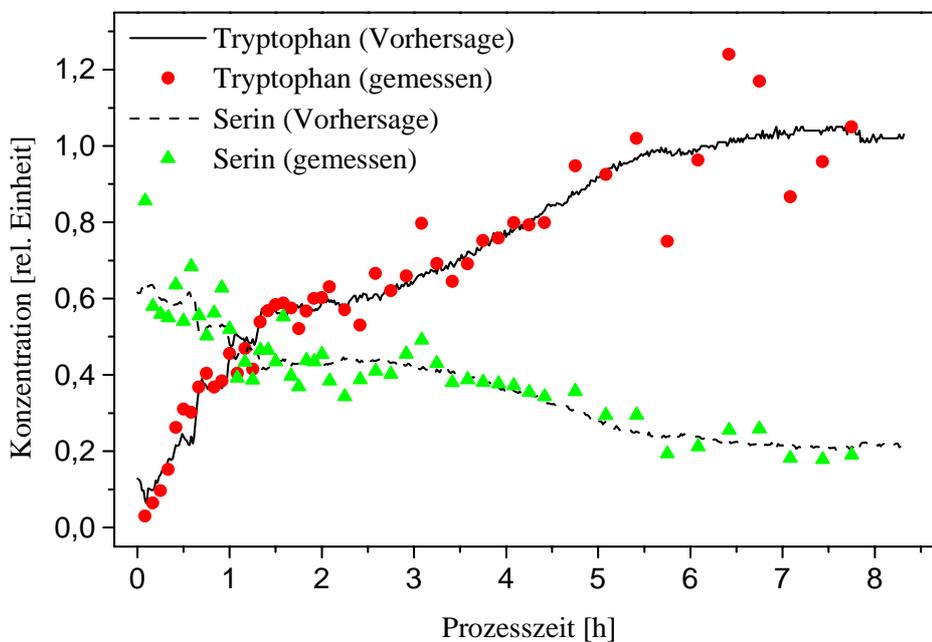


Abb. 6.3.8: Konzentrationsverläufe für Indol während der Biotransformation (gemessen und vorhergesagt) [415]

Durch das aufgebaute Analysensystem stehen Messdaten in hoher Frequenz zur Verfügung. Änderungen im Prozessverlauf können so sehr viel schneller festgestellt werden, als es bisher über die Online-HPLC möglich gewesen ist. Auf die Änderungen kann somit auch schneller in Form einer verminderten oder erhöhten Zugabe von Indol reagiert werden. Dieses führt letztendlich durch die optimalere Nutzung der eingesetzten Rohstoffe Serin und Indol zu einer höheren Ausbeute an Tryptophan. Auf die erzielten ökonomischen und ökologischen Effekte soll im nachfolgenden Kapitel eingegangen werden.

### 6.3.3 Ökonomische und ökologische Bewertung des Verfahrens

Als Ziele der Optimierung des Prozesses unter Einsatz der verbesserten Prozessanalytik wurden angestrebt:

- Eine höhere Produktausbeute, was zu einer Einsparung der Edukte Serin und Indol führt
- Eine höhere Produktkonzentration, welche den Energieeinsatz bei der Aufarbeitung vermindert
- Eine Verringerung der Abwassermenge und eine niedrigere Belastung des Abwassers

Bei einer nicht optimalen Prozessführung kommt es durch Nebenreaktionen zu signifikanten Serinverlusten. Die daraus resultierende geringere Produktkonzentration führt zu höheren Kosten bedingt durch einen großen Energieverbrauch bei der Aufkonzentrierung sowie zu einer großen Abwasser- und Salzbelastung bei der Aufarbeitung. Darüber hinaus gelangt aufgrund der unvollständigen Umsetzung der Problemstoff Indol während der Aufarbeitung in die Abluft. Die im Jahr 2001 im Werk der Amino GmbH produzierte Menge an Serin wird für die nachfolgenden Betrachtungen als 100% gesetzt. Bei der Produktion trat ein signifikanter Rohstoffverlust von Serin auf, während Indol nahezu vollständig umgesetzt wurde. Bei der Produktion fielen ca. 10.000 m<sup>3</sup> Abwasser mit 20 t CSB an. Um die erzielten optimierten Ausbeuten einordnen zu können, ist es wichtig zu wissen, dass die Qualität des eingesetzten Serin-Eluates im Verlauf des Jahres 2001 deutlich nachließ und die durchschnittliche Ausbeute der Prozesse darunter litt. Für die folgenden Betrachtungen wurden daher die Umsatzwerte für den Zeitraum, in dem die Versuche erfolgten, auf das gesamte Jahr hochgerechnet.

Tab. 6.3.1: Umsatzwerte für 2001 bezogen auf Jahresumsatz 20 t [412]

	Jahresumsatz [rel. Angaben]
Serin-Einsatz	100%
Trptophanproduktion	100%
Indol-Verlust	< 5%

Somit resultiert eine durchschnittliche Tryptophanausbeute bezogen auf eingesetztes Serin von ca. 45 %. Unter der Annahme, dass bei gleicher Menge des eingesetzten Serins auch die Abwassermenge sowie die Abwasserbelastung gleich bleiben, ergeben sich auch hier Abwassermengen von 10.000 m<sup>3</sup> mit einer Belastung von 20 t CSB.

Bei einer durchschnittlichen Ausbeute von 58,5 %, wie sie bei einem, unter dem Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie optimierten, Prozess erzielt werden konnte, ließe sich dieselbe pro Jahr produzierte Tryptophanmenge mit einem geringeren Serin-Einsatz erzielen. Wieder unter der Annahme, dass Abwassermenge und CSB proportional zur eingesetzten Serinmenge sind, ergeben sich daher für eine optimierte Prozessführung insgesamt die in Tabelle 6.3.2 ermittelten Werte.

Tab.6.3.2: Umsatzwerte pro Jahr für eine optimierte Prozessführung [412]

	Jahresumsatz [rel. Angaben]
Serin-Einsatz	75% (Senkung um 25%)
Tryptophanproduktion	100% (erhöhte Ausbeute auf 58,5%)
Serin-Verlust	Senkung um 25%
Abwasser	7.500 m <sup>3</sup> (Senkung um 25%)
CSB	15 t (Senkung um 25%)

Durch die optimierte Prozessführung ließen sich somit Einsparungen im Abwasser und CSB um 25% erzielen. Ebenfalls um 25% könnte der Serinverlust begrenzt werden, was einen bedeutenden ökonomischen Gewinn mit sich führt. Durch die daraus resultierende höhere Produktkonzentration ergibt sich – gerechnet auf die nachfolgenden Aufarbeitungsschritte – eine Ersparnis von 200 bis 300 t Dampf pro Jahr (20% der Produkt spezifischen Energiekosten). Es zeigt sich somit, dass der Einsatz moderner bioanalytischer Verfahren wie der 2D-Fluoreszenzspektroskopie durchaus zu einer Verbesserung der ökonomischen als auch

der ökologischen Faktoren eines industriellen Prozesses führen kann. Die optimierte Prozessführung ist in einer Pilotphase bisher nur exemplarisch im industriellen Maßstab eingesetzt worden. Durch weitergehende Untersuchungen soll das Verfahren in Zukunft eingehend validiert werden.

#### 6.4 Uridingewinnung aus Zuckerrübenmelasse

Als abschließendes Beispiel soll auf die Entwicklung eines bioanalytischen Systems zur Messung von Uridin eingegangen werden. Das Verfahren ist noch nicht so weit entwickelt, dass Daten über den Einsatz am industriellen Prozess vorliegen. Es stellt aber ein weiteres in time fähiges Analyseverfahren vor, welches an industriellen chromatographischen Prozessen eingesetzt werden kann.

Neben den Aminosäuren liegen in der Melasse noch weitere minore Komponenten vor, die im Laufe verschiedener Aufarbeitungsschritte isoliert werden können. Eine dieser Komponenten ist das Uridin. Der Gesamtanteil aller Nucleoside in der Melasse macht ungefähr 0,5% der Trockenmasse aus (s. a. Abb. 6.2.1). Dieser Gehalt ermöglicht aufgrund der enormen Mengen, die verarbeitet werden, eine wirtschaftliche Aufarbeitung. Aufgrund angestrebter Patentverfahren kann auf das neu entwickelte Verfahren der AMINO GmbH zur Uridingewinnung an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Uridin und Uridinderivate werden als Pharmawirkstoffe bereits vielfältig eingesetzt. Als Präparate werden meistens die Verbindungen Idoxuridin [417], Floxuridin [418], Bromodeoxyuridin [419] oder Fluorouracil [420] verwendet. Anwendungsgebiete solcher Uridinpräparate liegen z. B. bei [421]:

- Cardiovasculären Erkrankungen und Bluthochdruck
- Lungenerkrankungen
- Lebererkrankungen
- Unfruchtbarkeit
- Krebs
- AIDS
- Epilepsie
- Parkinson
- Angstzuständen
- Schlafstörungen

Aufgrund dieser vielfältigen Anwendungen von Uridin besteht ein entsprechend großer Bedarf von hoch aufgereinigtem Uridin. Neben der pharmazeutischen Applikationen ist Uridin aber auch als Zusatzstoff in Sportlernahrung und bei der Babyernährung von Interesse.

#### 6.4.1 Aufbau einer In-Time-Analytik für Uridin

Da das Uridin über verschiedene chromatographische Verfahren aus Zuckerrübenmelasse aufgearbeitet wird, musste wiederum ein Sensor entwickelt werden, der in der Lage ist, chromatographische Schnittgrenzen in time zu analysieren. Nur wenn ein solches Analyseverfahren zur Verfügung steht, ist eine entsprechend ökonomisch und ökologisch effiziente Aufreinigung von Uridin möglich. Die genauen Anforderungen an den Uridin-Sensor ergeben sich aus zwei neuen Prozessschritten bei der Melasseaufarbeitung. Der erste zusätzliche Verfahrensschritt zur Uridingewinnung besteht aus einer Anionenaustausch-Chromatographie. Die in diesem Schritt erhaltene Uridinrohfraktion eluiert über einen Zeitraum von etwa 40 Minuten. Über einen Autosampler könnten entsprechend dem in Abbildung 6.2.6 bezigten Versuchsaufbau während der Elution Proben gesammelt und anschließend analysiert werden. Um eine Vorhersage für den folgenden Chromatographiezyklus machen zu können, stehen 5 - 7 Stunden zur Verfügung. Der Einsatz eines Uridin-Sensors ist auch bei einem weiteren Chromatographieschritt vor einer anschließenden Kristallisation denkbar. Auch bei diesem Verfahrensschritt eluiert die Uridinfraktion über einen Zeitraum von etwa 40 Minuten. Allerdings sind die Zykluszeiten in diesem Fall mit 75 Minuten deutlich geringer. Durch Vorversuche wurde festgestellt, dass für eine zuverlässige Analytik des Uridinpeaks in beiden Chromatographieschritten acht Proben ausreichend sind. Aus diesen Vorgaben ergibt sich, dass eine Uridinanalyse maximal 9 Minuten dauern darf, um den Anforderungen einer In-Time-Analytik gerecht werden zu können. Da bereits zum Zeitpunkt der Anionenaustausch-Chromatographie der Uridingehalt in den Proben sehr hoch ist, sollte der Sensor in einem Konzentrationsbereich von etwa 1 – 10 g/l Uridin zuverlässig arbeiten [405].

In der Literatur beschriebene Standardverfahren für Uridin basieren fast ausschließlich auf HPLC-Methoden. Eine Ankopplung dieser Analysemethoden an den chromatographischen Prozess ist nicht sinnvoll. Bei der Anwendung ergäbe sich wiederum das in Kapitel 6.2.2 beschriebene Problem der großen Zeitverzögerung. In der Literatur ebenfalls beschrieben sind

enzymatische Nachweisverfahren für Uridinderivate, die prinzipiell für den Aufbau eines Uridinbiosensors modifiziert werden könnten. So kann z. B. Uridin-5'-diphosphat über eine Pyruvatkinase zum Triphosphat umgesetzt werden. Das bei der Reaktion als Cosubstrat eingesetzte Phosphoenolpyruvat wird dabei zu Pyruvat umgewandelt. Das entstehende Pyruvat kann in einer Folgereaktion mittels Lactat-Dehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu Lactat umgesetzt werden (entsprechend dem zweiten Reaktinsschritt bei dem D-Serinbiosensor, Abb. 6.2.4). Die NADH-Abnahme, gemessen an der Extinktionsänderung bei 340 nm, ist proportional zur Uridin-5'-diphosphatkonzentration [422]. Der enzymatische Nachweis von Uridin sollte auch über seine Nucleinsäure-Base Uracil möglich sein, da die Oxidoreduktase Uraciloxidase (EC 1.1.99.19) aus *Enterobacter aerogenes* eine Umsetzung von Uracil unter Sauerstoffverbrauch katalysiert [423]. Problematisch beim Aufbau von bioanalytischen Systemen, die auf diesen Enzymsystemen beruhen, ist die schlechte Verfügbarkeit und geringe Stabilität der entsprechenden Enzyme [405].

Basierend auf diesen Überlegungen wurde ein bioanalytisches System entwickelt, welches auf der Ausbildung von Kupfer-Uridin-Komplexen beruht [405, 424]. Als Grundlage für einen solchen Sensor diente die Hi-Trap<sup>TM</sup>-Chelating-Sepharose-Säule der Firma Amersham (Pharmacia Biotech, Schweden), die für die Aufreinigung von Proteinen und Peptiden entwickelt wurde. Die 1 ml große Säule enthält hochvernetzte Agarosekügelchen als Matrix, die über stabile Ethergruppen mit einem Spacer und Imidodiessigsäuregruppen als Liganden verbunden sind (Abb. 6.4.1).

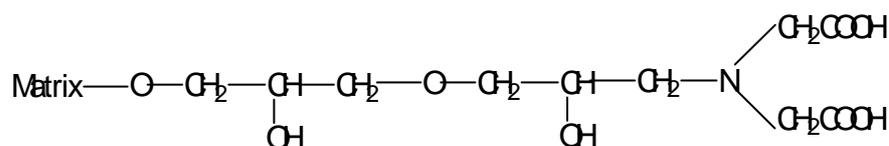


Abb. 6.4.1: Teilstruktur der Hi-Trap<sup>TM</sup>-Chelating-Sepharose-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) [405]

An diesem Material können Metallkationen (z. B.  $\text{Cu}^{2+}$ ) chelatisierend gebunden werden und an diesen wiederum weitere Moleküle komplexiert werden. Interaktionen zwischen freien Metallionen und Uridin sind in der Literatur bereits beschrieben worden. Lim et al. beschreiben beispielsweise die Koordination von Uridin und Adenosin in Palladium (II)-und

Platin (II)-Komplexen [425]. Ebenfalls beschrieben sind Komplexe zwischen freien Kupferionen und Uridin [426, 427]. Die Arbeiten von Reddy und Rao stellen die Grundlage für den Einsatz der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexen zur Uridin-Analytik dar [428]. Es konnte gezeigt werden, dass sich Uridin in Gegenwart eines Metallions wie ein zweizähniger oder ein einzähniger Ligand verhalten kann. In Abhängigkeit vom pH-Wert wird das Nucleosid entweder über das Stickstoffatom N (3) und das Sauerstoffatom O (4) oder allein über das Stickstoffatom N (3) koordiniert. Uridin unterscheidet sich bei der Ausbildung dieser Metallchelate von den anderen Nucleosiden dadurch, dass nur bei Uridin die Metallbindungskapazität vom pH abhängig ist. Das Optimum der Bindungsstärke liegt bei einem pH-Wert von 7,2. Die höchste Komplexstabilitätskonstante mit  $k = 5,90$  wurde bei der Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen festgestellt. Im Vergleich zu anderen Metallkomplexen mit z. B. Histidin oder Histamin zeigt der Uridinkomplex eine so große Stabilität, da hier das Sauerstoffatom O (4) als zusätzlicher Donator fungiert. Ebenfalls sehr stabile Metallkomplexe bildet Uracil aus, wobei Uracil nur als zweizähniger Ligand fungieren kann, der über das Stickstoffatom N (3) und das Sauerstoffatom O (2) koordiniert wird [429]. Da Uracil in geringen Konzentrationen in der Melasse vorkommt, kann der analytische Nachweis von Uridin über die Komplexbildung eventuell durch das Uracil beeinträchtigt werden.

Ziel der Untersuchungen war es, die ursprünglich zur präparativen Trennung einzusetzenden Hi-Trap<sup>TM</sup>-Chelating-Sepharose-Säulen in ein automatisches FIA-System zu integrieren und über reversible Interaktionen zwischen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und Uridin eine quantitative Analyse des Nucleosides in Eluenten der chromatographischen Aufreinigung zu ermöglichen. Ein entsprechender Analysenaufbau ist in der Abbildung 6.4.2 dargestellt.

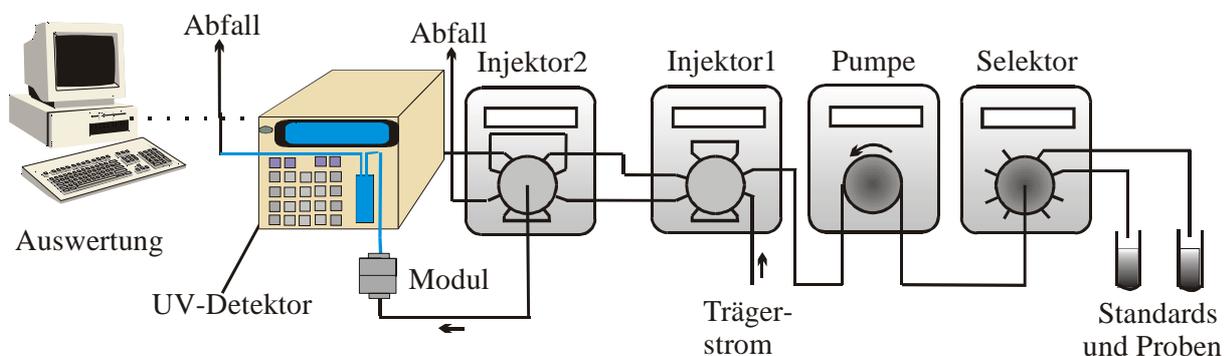


Abb. 6.4.2: Aufbau der FIA-Anlage zur Detektion von Uridin über Komplexbildung an  $\text{Cu}^{2+}$  [424]

Durch die Verwendung von zwei Injektoren war es möglich, die Anlage sowohl zeit- als auch volumengesteuert zu betreiben. Dieses ist notwendig, da im ersten Schritt die chelatisierende Sepharose mit Kupferionen beladen werden muss. Dieses erfolgt über den zeitgesteuerten Modus, da so große Mengen an Kupfer- und Waschlösung über die Säule geleitet werden können. Bei der eigentlichen Messung wird der volumeninduzierte Modus verwendet, bei dem ein exakt definiertes Probevolumen in den Trägerstrom injiziert werden kann. Mit dieser Methode konnte sichergestellt werden, dass zu jeder Messung die gleiche Menge Analyt-Lösung zur Verfügung stand. Die Detektion des Uridins erfolgte über UV-Absorption bei 260 nm. Die eingesetzten FIA-Module entsprechen denen der Serin-Analytik (Kap. 6.2.2.2).

Vor Beginn der eigentlichen Messung muss die Säule mit Kupfersulfat beladen werden. Dieses erfolgt durch die zeitgesteuerte Injektion von 500 µl einer 0,1 M CuSO<sub>4</sub>-Lösung. Nach dem mehrfachen Waschen der Säule mit bidestillierten Wasser kann der eigentliche Messzyklus gestartet werden. Hierzu wird die Säule mit dem Startpuffer (0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 M NaCl, pH 7,2) über fünf Bettvolumen (BV) equilibriert. Anschließend wird das System auf Injektion der Probe geschaltet und das Probenvolumen (75 µl) wird in die Hi-Trap™-Säule injiziert. Danach erfolgt für 100 s die Elution (Elutionspuffer: 0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 M NaCl, pH 3,5) des auf der Säule gebundenen Uridins über einen pH-Shift. Der Volumenstrom beträgt jeweils 1,3 ml/min. Nach der Elution und der erneuten Equilibrierung mit dem Startpuffer kann die nächste Probe injiziert werden. Ein vorheriges Beladen mit Kupfersulfat ist dann nicht mehr erforderlich. Es empfiehlt sich jedoch, einmal am Tag die Säule neu mit Kupferionen zu belegen, da deren Bindung an der chelatisierenden Sepharose durch die Elutionsbedingungen beeinträchtigt wird. Ein Absenken des pH-Wertes des Elutionspuffer unter 3,5 für eine schnellere Elution war nicht möglich, da dann ebenfalls das Kupfer komplett von der Säule gewaschen worden wäre. Ein typisches UV-Diagramm einer solchen Analytik ist in der Abbildung 6.4.3 gezeigt.

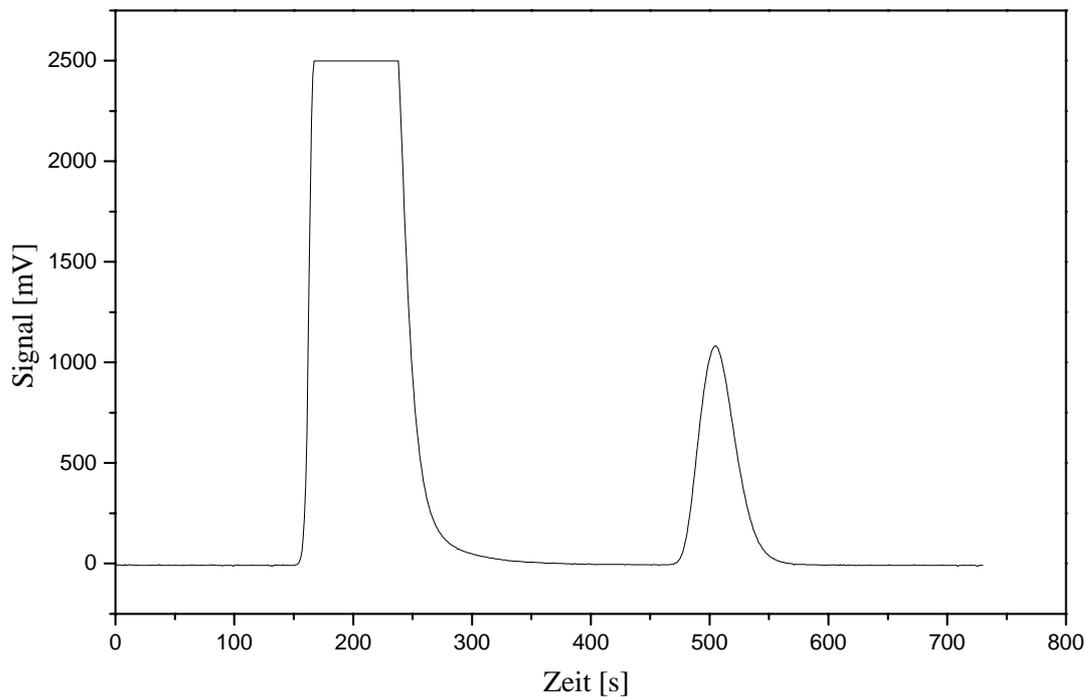


Abb. 6.4.3: Chromatogramm einer Uridinbestimmung, FIA-Anlage mit Hi-Trap<sup>TM</sup>-Chelating-Sepharose-Säule, Startpuffer 0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 M NaCl, pH 7,2, Elutionspuffer 0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 M NaCl, pH 3,5, Volumenstrom 1,0 ml/min, Detektion bei 260 nm [424]

In der Abbildung sind zwei Peaks zu sehen. Der Peak nach ca. 150 s entspricht dem Ausschlussvolumen der Säule. Auf der Säule wird nicht das gesamte Uridin gebunden, sondern ein Großteil passiert die Sepharose ohne Komplexbildung. Der Peak bei ca. 500 s zeigt den Anteil des Uridins, welches durch die Elutionbedingungen aus der Säule eluiert wird. Es wurde festgestellt, dass das Verhältnis von ungebundenen und gebundenen Uridin konzentrationsabhängig ist. Daher konnten mit diesem System konzentrationsabhängige Kalibrationskurven aufgenommen werden. In der Abbildung 6.4.4 sind diese in Abhängigkeit von der Auftragungsgeschwindigkeit dargestellt.

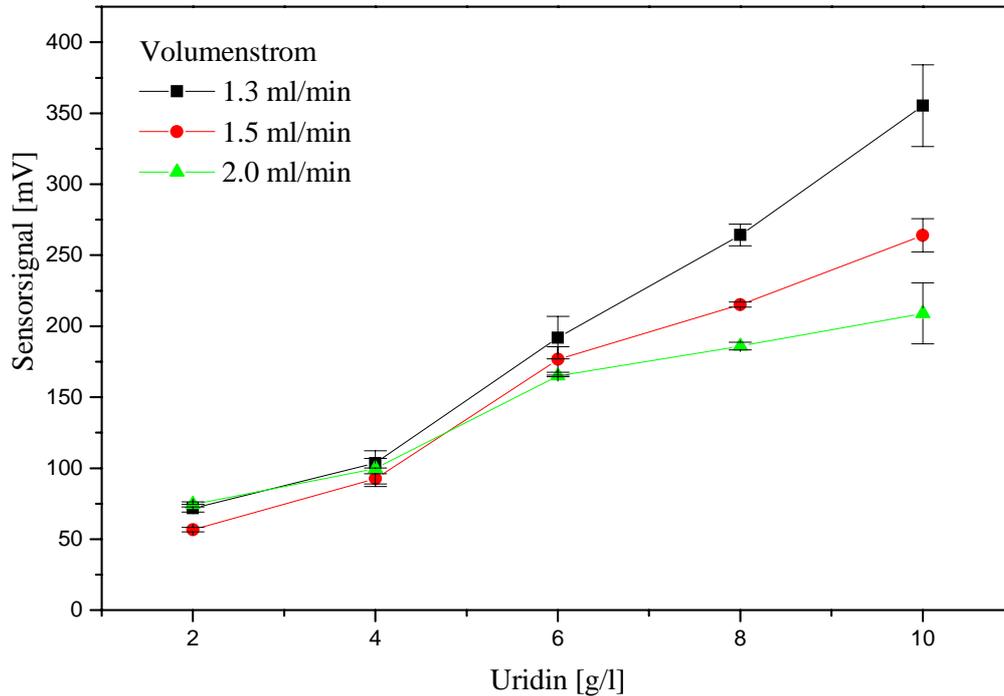


Abb. 6.4.4: Kalibration des Uridin-Sensors in Abhängigkeit des Volumenstroms [424]

Wie aus der Abbildung ersichtlich, ergeben sich bei einer Flussrate von 1,3 ml/min die besten Ergebnisse. Bei höheren Volumenströmen ist die Verweilzeit in der Säule zu gering, um die Komplexierung des Uridins im ausreichenden Maße stattfinden zu lassen. Wurden geringere Volumenströme eingestellt, so ergab sich das Problem, dass das Uridin in sehr breiten und flachen Peaks eluiert wurde, was die Genauigkeit der Analyse beeinträchtigt. Bei der Flussrate von 1,3 ml/min konnte die Peakhöhe mit der Uridinkonzentration in einem Messbereich von 4 bis 10 g/l linear korreliert werden.

Wie bereits im Falle des Serins erläutert, ist neben der Sensitivität einer Analysenmethode auch deren Selektivität für den Einsatz am realen System ausschlaggebend. Daher wurden verschiedene Substanzen, die in der Matrix Melasse im Prozessverlauf auftreten können, mit dem Sensorsystem auf Querempfindlichkeiten hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Tabelle 6.4.1 zusammengefasst.

Tab. 6.4.1: Querempfindlichkeiten des bioanalytischen Systems zur Messung von Uridin über die IMAC-Methode in Abhängigkeit vom pH-Wert [nach 424]

Verbindung(en)	Konzentration [g/l]	pH-Wert		Signal [%]
		6,0	7,2	
Uridin	6	100	100	
Guanosin	0,4	15,1	0,1	
Uracil	1	38	0,1	
Saccharose	6	13,5	55,6	
Uridin & Guanosin	6 + 0,4	106,9	51,8	
Uridin & Uracil	6 + 1	115,8	51,9	
Uridin & Saccharose	6+6	86,9	49,2	

Die gewählten Konzentrationen beruhen einerseits auf den Löslichkeiten der Verbindungen im gewählten Puffersystem und zum anderen auf den Verhältnissen, in denen sie bei der chromatographischen Aufreinigung auftreten könnten. Das Signal der reinen Uridinlösung wurde bei den Untersuchungen als 100 % gesetzt. Einen deutlichen Einfluss zeigen alle drei gewählten Begleitstoffe bei einem pH-Wert von 7,2. Dieses verdeutlicht die geringe Selektivität des Systems. Diese kann aber durch die Änderung des pH-Wertes deutlich verbessert werden. Wie bereits eingangs geschildert, erfolgt die Komplexierung des Uridins in Abhängigkeit vom pH-Wert über unterschiedliche Stellen des Pyrimidinrings. In neutralen oder leicht alkalischen Medien erfolgt die Bindung zu Metall-Ionen über das Stickstoffatom N (3). Dies gilt auch für Uracil und Guanosin. Im Gegensatz dazu koordiniert Uridin im leicht sauren pH-Bereich über das Sauerstoffatom O (4) an Kupfer (II)-Ionen. Dieses wird durch die durchgeführten Untersuchungen bestätigt. Bei Absenkung des pH-Wertes auf 6,0 ergibt sich eine deutlich bessere Selektivität des bioanalytischen Systems. Im leicht sauren Medium erweist sich der Uridin-Metall-Komplex aufgrund der im Pyrimidinring zusätzlich vorhandenen Donorgruppe O (4) als deutlich stabiler. Bei weiteren Untersuchungen bei pH 6,0 konnte kein negativer Einfluss auf die Kalibration des Sensors festgestellt werden. Es ergab sich derselbe lineare Bereich bei etwas verringerter Signalintensität.

Eine ökonomische und ökologische Bewertung der Effekte des Einsatzes dieses bioanalytischen Systems bei der chromatographischen Uridingewinnung ist nicht möglich, da der Sensor bisher noch nicht an den Prozess angekoppelt worden ist. Der Stand der

Entwicklung zeigt aber, dass prinzipiell auf diesem Wege eine In-Time-Analytik von Uridin im Industrieprozess etabliert werden könnte. Zur Zeit werden im Prozess die chromatographischen Schnittgrenzen der Uridinfraktion über eine Offline-HPLC-Analytik überprüft. Wie bei der Ausgangslage der Serinaufreinigung (Kap. 6.2.2), kann so nur mit einer großen Zeitverzögerung (12 – 24 h) auf schlechte Schnittgrenzen reagiert werden. Bei schlechter Schnittführung resultieren auch hier hohe Verluste an gewünschtem Produkt und unnötige Energie- und Chemikalienkosten. Wenn sich der Uridinsensor erfolgreich an den Prozess ankoppeln lässt, sollten auch in diesem Fall entsprechende ökonomische und ökologische Vorteile erzielt werden können.

## 6.5 Fazit zum Einsatz bioanalytischer Systeme

Nur durch eine effiziente Prozesskontrolle und der damit ermöglichten Prozessregelung können komplexe biotechnologische Systeme optimal geführt werden. Während in der universitären Forschung hierfür schon seit langem bioanalytische Systeme eingesetzt werden, ist deren Einsatz in der industriellen Praxis eher selten. Man vertraut dort meist auf etablierte, einfache (physikalische) Messmethoden. Das Risiko, einen Produktionszyklus durch ein unzuverlässig arbeitenden Biosensor zu verlieren, wurde bisher meistens als zu hoch angesehen. Erstaunlich in diesem Zusammenhang ist das große Vertrauen der Medizin in die Leistungsfähigkeit der Bioanalytik und –sensorik. Millionen von Diabetikern stellen z. B. ihren Blutzucker über die Kontrolle mittels Biosensorik ein. Gerade im Bereich der Humangesundheit aber wird nach nahezu absoluter Zuverlässigkeit gestrebt. Warum also das verhaltende Interesse in der Industrie? Es mag hier wieder auf die mehrfach angesprochenen Innovationshemmnisse verwiesen werden. Aber gerade bei der Biosensorik kommt hinzu, dass sehr früh versucht wurde Systeme im Markt zu etablieren, die den industriellen Anforderungen nicht gewachsen waren. Ausfälle dieser Systeme führten zu Produktionsverlusten und somit zum Desinteresse der Industrie an diesen Sensoren. Des Weiteren wurde versucht, für möglichst alle Parameter Biosensoren im Markt einzuführen. Dieses macht aber nicht unbedingt Sinn. Wenn in einem Unternehmen z. B. der Glucosegehalt im Medium über etablierte Messverfahren (z. B. Bestimmung des Respirationskoeffizienten durch Messung der Abgaswerte) zuverlässig bestimmt werden kann, macht die Ankopplung eines Glucosebiosensors wenig Sinn. Im Bereich der Biotechnologie können die bioanalytischen Systeme aber äußerst effizient für spezielle

analytische Fragestellungen eingesetzt werden. So z. B. der beschriebene D-Serin-Biosensor bei der chromatographischen Melasseenzuckerung. Mit Hilfe eines relativ einfachen aber robusten Messsystems konnten erhebliche Verbesserungen am industriellen Prozess erzielt werden. Mit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie wurde ein nicht invasiver Sensor vorgestellt, der bei der Biotransformation von Indol und L-Serin zu Tryptophan ebenfalls die ökonomischen und ökologischen Faktoren eines seit langem laufenden industriellen Prozesses positiv beeinflussen konnte. Inwieweit des ebenfalls entwickelte Uridinsensor zur einer Leistungssteigerung beitragen kann, bleibt noch abzuwarten.

Gerade die optischen Sensoren, die auf der Fluoreszenz-, UV- oder IR-Spektroskopie beruhen, können in Verbindung mit chemometrischen Verfahren am ehesten den Wunsch nach einer universellen Prozessanalytik gerechtfertigt werden. Aber auch diese Verfahren stoßen an ihre Einsatzgrenzen und müssen dann um spezifischere Sensorik ergänzt werden. Die Leistungsfähigkeit der bioanalytischen Systeme konnte unter anderem im „Verbund Sensorik in der Biotechnologie“ für verschiedenste Industriezweige verdeutlicht werden. Dort konnten zum Beispiel die Produktion von Essigsäure [430], die Entalkoholisierung von Bier [431] oder die Überwachung von Gärungsprozessen [432] durch den Einsatz von Biosensoren in der industriellen Praxis effizienter gestaltet werden. Des Weiteren etablieren sich zur Zeit vermehrt Unternehmen auf dem Markt, die ihre bioanalytischen Geräte zur Bioprozesskontrolle und -regelung auch entsprechend in der Industrie platzieren können. Der Einsatz erfolgt zwar oftmals nur in den Forschungs- und Entwicklungsabteilungen der Unternehmen; es ist damit aber ein wichtiger Schritt zur Etablierung dieser Systeme im Markt vonstatten gegangen. Die Verschmelzung der Molekularbiologie und der Biosensorik eröffnet ebenso neue Betätigungsfelder für die Bioanalytik. Der Einsatz von DNA-Array-Chipsensoren im Bereich des High-Through-Put-Screenings ist dafür nur ein Beispiel. Mit Hilfe der modernen DNA-Sensoren können Abhängigkeiten zwischen der Proteinexpression und der Genregulation im Bioprozess untersucht werden. Durch das bessere Verständnis dieser Vorgänge könnten eventuell Produktionsraten gesteigert werden, in dem die Expression der zur Produktion eines bestimmten Zielproteins (z. B. Blutfaktoren) notwendigen Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt der Kultivierung induziert wird, der für die Produktivität am effizientesten ist.

Es steht zu erwarten, dass in naher Zukunft ein verstärkter Einsatz spezifischer, bioanalytischer Verfahren in der Industrie erfolgen wird. Nicht nur die hier geschilderten

Beispiele haben innerhalb der letzten 5 Jahre die Leistungsfähigkeit im industriellen Einsatz unter Beweis gestellt. Das Vertrauen der Industrie in solche Systeme dürfte daher erheblich gesteigert worden sein. Es steht zu hoffen, dass sich auch im Bereich der Biosensorik der Wunsch von dessen Begründer L.C. Clark erfüllt, dass „(...) *all this work with sensors will be used only for the good of man, for better mental and physical health, for better food, for a cleaner environment, for a better understanding of the human condition on this fragile little blue dot in space that we all share(...)*“.

## 7 Resümee

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Biotechnologie den Menschen seit Jahrtausenden begleitet hat (Kap. 2). Sie war lange ein eher unbeachteter Begleiter, der aber empirisch immer weiter entwickelt worden ist. Die Biotechnologie hat so stetig zur gesellschaftlichen Entwicklung des Menschen beigetragen. In Zeiten materieller Engpässe wurden im rasanten Maße biotechnologische Prozesse entwickelt. Genannt werden sollen hier noch einmal die Verfahren zur Herstellung von Aceton, Glycerin oder Butanol während des Ersten Weltkrieges und die Entwicklung der Antibiotika während des Zweiten Weltkrieges. Es konnte anhand verschiedener Beispiele aber auch verdeutlicht werden, dass biotechnologische Verfahren nur dann Bestand haben, wenn sie anderen – meist chemischen – Verfahren wirtschaftlich überlegen sind, oder es keine Verfahrensalternative gibt (Alleinstellungsmerkmal). Ein genaues Verständnis der zellulären molekularbiologischen Vorgänge der Mikroorganismen hat den Menschen innerhalb der letzten 40 Jahre in die Lage versetzt, immer effizientere biotechnologische Prozesse zu entwerfen. Dabei wurden auch die verwendeten Mikroorganismen über gentechnische Verfahren mit in die Optimierung einbezogen. In den letzten Jahren rückten verstärkt Entwicklungen im Bereich der „roten Biotechnologie“ in den Mittelpunkt der öffentlich geförderten Forschungsvorhaben. Auch der wirtschaftliche Erfolg der Biotechnologie wird immer stärker an den Entwicklungen dieses Segmentes gemessen. In Kapitel 2 wurde daher der Versuch unternommen, auf den biotechnologischen Markt einzugehen, wie er sich zu Beginn des 21. Jahrhunderts darstellt. Es zeigt sich, dass bei einer Ausweitung der wirtschaftlichen Betrachtungsweise der Biotechnologie auf die chemische Industrie (Grund- und Feinchemikalien) und die Nahrungsmittelindustrie, weitere ökonomisch sehr interessante Einsatzfelder zur Verfügung stehen.

Dass biotechnologische Verfahren nicht nur positive ökonomische Entwicklungen mit sich führen, sondern oftmals auch in ökologischer Hinsicht eine vernünftige Alternative zu chemischen Produktionsprozessen aufzeigen können, wurde in Kapitel 3 behandelt. Seit ungefähr 10 Jahren laufen Untersuchungen, inwieweit die Biotechnologie Beiträge zur Nachhaltigkeit liefern und somit zur Verbesserung der Umweltbedingungen industrieller Prozesse beitragen kann. In Kapitel 3 wurde diese Sichtweise um die Aspekte der Senkung des Störfallpotentials und der Minderung des Anlagenrisikos ergänzt. Es kann festgestellt

werden, dass sich die Biotechnologie im Einzelfall sehr wohl positiv in Hinblick auf die ökologische Faktoren und die Sicherheit eines Produktionsverfahrens auswirken kann, dieses aber nicht per se zutrifft.

Darüber hinaus wurde aufgezeigt, dass für die Produktion von Grund- und Feinchemikalien eine Vielzahl biotechnologischer Verfahren zur Verfügung stehen, die aber oftmals nur sehr zögerlich in die industrielle Praxis umgesetzt werden (Kap. 3.2). Die zögerliche Haltung der chemischen Industrie scheint aber insbesondere im Bereich der Biokatalyse zurückzugehen. So beschrieb die Chemical & Engineering News [433, 434, 435] in ihrer Maiausgabe 2001 aktuelle Entwicklungen in der Biokatalyse in Hinblick auf die „Global Player“ im Bereich der Grund- und Feinchemikalien (DowChemical, DuPont, BASF, Degussa, Celanese). Als wichtigste Entwicklung wird von den Firmen angesehen, dass die zur Verfügung stehende Anzahl von Biokatalysatoren durch die modernen Methoden der Gentechnik kontinuierlich ausgebaut werden kann. Die Beschränkung auf die natürlich zur Verfügung stehenden Enzyme wurde bisher als die große Einschränkung in der Entwicklung effizienter biokatalytischer Verfahren in der Industrie angesehen. So hat beispielsweise die BASF in Zusammenarbeit mit Integrated Genomics das Genom von *Corynebacterium glutamicum* entschlüsselt. Die gewonnenen Informationen über den Stoffwechsel und die darin involvierten Enzymsysteme soll zur Optimierung der biotechnologischen Lysin-Produktion genutzt werden. Die Firma Integrated Genomics hat weiterführende Kooperationen mit den Unternehmen Roche, DowChemical, Genecor, Maxygen, Cargill und Archer Daniels Midland. In allen Kooperationen sollen neue enzymatische Industrieprozesse aufgebaut werden (z. B. die Biokonversion von Methan zu Methanol als Baustein in der Petrochemie).

Der weltweite Marktanteil biotechnologischer Verfahren im Bereich der Feinchemikalien wird von der Firma Maxygen auf 50 Mrd. US \$ geschätzt (Gesamtvolumen 800 Mrd. US \$). Für weitere 200 Mrd. US \$ seien Potentiale in der Forschung vorhanden, die innerhalb der nächsten 10 bis 20 Jahre in der Industrie umgesetzt werden. Beispiele hierfür sind die biotechnologische Produktion von Ascorbinsäure durch die Firmen Eastman Chemical und Genecor (Pilotanlage in Betrieb genommen) oder die Produktion von Methoxyisopropylamin durch die BASF (Industrieanlage mit 2.500 t/a). Die BASF hat weiterhin in Ludwigshafen eine Multifunktionsanlage aufgebaut, in der jährlich bis zu 1.000 t von chiralen Intermediaten über biokatalytische Verfahren gewonnen werden können. Der große Vorteil der Biotechnologie wird von den Firmen darin gesehen, dass in relativ einfachen Verfahren

chirale Bausteine wie Amine, Alkohole und Hydroxycarbonsäuren hergestellt werden können, die zuvor auf synthetischem Wege nicht zugänglich waren. Es wird der Einsatz von isolierten Enzymsystemen bevorzugt, da diese, anders als fermentative Prozesse mit Zellsystemen, wie traditionelle heterogen katalysierte Reaktionen betrieben werden können.

Diese Beispiele verdeutlichen, dass sich die Biokatalyse in vielen Industriezweigen immer stärker durchsetzt. Der Konflikt, dass biologische Systeme deutlich ineffizienter sind als chemische Synthesen bei der Produktion von Grundchemikalien, scheint beigelegt zu sein. Man hat erkannt, dass insbesondere im Bereich der chiralen Verbindungen die Biologie Vorteile bieten kann. Um die Palette der biokatalytisch hergestellten Grund- und Feinchemikalien weiter vergrößern zu können und so immer nachhaltigere Prozesse aufbauen zu können, ist es zwingend notwendig, dass neue Enzymsysteme entschlüsselt und industriell nutzbar gemacht werden. Es ist sicherlich eine gute Strategie, auf der Genomebene komplette Organismen zu untersuchen und die Stoffwechselfvorgänge auf diesem Wege nach neuen Biokatalysatoren zu untersuchen. Aber auch das Screening nach neuen Stämmen sollte verstärkt unter dem Gesichtspunkt der Biokatalyse fortgeführt werden. Darüber hinaus können neue Enzyme durch den Einsatz in Biosensorsystemen zu einer effizienteren Überwachung und Regelung derartiger Prozesse eingesetzt werden (Kap. 6). Als Quelle interessanter Biokatalysatoren ist in Kapitel 4 die marine Biotechnologie untersucht worden. Anhand der Enzyme L-Serindehydratase (Kap. 4.4.2) und Sulfitoxidase (Kap. 4.4.3) wurden Verfahren zur Produktion und Aufreinigung mariner Enzyme demonstriert. In Kapitel 4 wurde auch das große Potential an pharmazeutisch wirksamen Substanzen marinen Ursprungs aufgezeigt. Gerade in symbiotischen marinen Lebensgemeinschaften finden sich interessante Verbindungen, die im Bereich innovativer Pharmaka in Zukunft ihre Anwendungen finden werden. Es wurde aber auch erläutert, dass gerade bei der Kultivierung mariner Mikroorganismen zur Zeit noch erhebliche Probleme auftreten können. Eine Vielzahl der Stämme müssen unter Einsatz der zur Verfügung stehenden Verfahren und Methoden als nicht kultivierbar betrachtet werden. Daher ist in diesem Bereich noch erhebliche Forschungsarbeit zu leisten, um sich das mikrobiologische Potential der Meere auch wirtschaftlich erschließen zu können.

Zu Beginn der Arbeit wurde die Frage gestellt, ob mit Hilfe biotechnologischer Verfahren landwirtschaftliche Rohstoffe effizienter genutzt werden können und so ein Beitrag zur Nachhaltigkeit geliefert werden kann. In Kapitel 5 lag der Fokus der beschriebenen Arbeiten

auf der Gewinnung neuer bzw. der Veredelung bestehender Produkte aus landwirtschaftlichen (nachwachsenden) Rohstoffen. An den Beispielen der Gewinnung von Lactoferrin (Kap. 5.3), der Veredelung von Molke durch Denitrifizierung (Kap. 5.4) und der Hydrolyse von Kartoffelprotein (Kap. 5.5) konnte gezeigt werden, dass über innovative Bioprozesstechniken eine solche verbesserte Nutzung sehr wohl möglich ist. Diese Schilderungen sind eng verknüpft mit den Optimierungsarbeiten bei der chromatographischen Melasseentzuckerung und ihren Folgeprozessen, die in Kapitel 6 beschrieben wurden. Hier wurden bioanalytische Systeme vorgestellt, die zur Prozessoptimierung eingesetzt werden können. Durch diese Arbeiten wurde ebenfalls die in Kapitel 1 gestellte Frage beantwortet, ob mittels der Biotechnologie ökologische Verbesserungen in industriellen Prozessen erreicht werden können. Am Beispiel der effizienteren Bestimmung der Schnittgrenzen der Serinfraktion und der In-Time-Analytik wichtiger Parameter bei der Biotransformation von Serin und Indol zu Tryptophan konnte eine solche Verbesserung belegt werden. Verbunden mit der Optimierung der Umweltbedingungen (verminderter Energieeinsatz, verminderte Abwassermenge etc.), ergab sich auch eine ökonomische Verbesserung (Einsparung von Chemikalien etc.) der vorgestellten Prozesse.

Ist die Biotechnologie somit zur Zeit wie eingangs beschrieben eine „Megatechnologie“, wie es aus Sicht vieler Wirtschaftsexperten propagiert wird? Der Blick auf die Umsatzzahlen der ELISCOs und Extended Core im Vergleich zu anderen Großindustrien widerspricht eigentlich dem Mythos der Megatechnologie (Kap. 2). Zu weit sind die Umsatzzahlen beispielsweise von der chemischen Industrie entfernt, zu wenige Menschen verdienen durch die Biotechnologie ihr tägliches Brot. Es wird daher von den Analysten auf die Wachstumsraten verwiesen, die diese Zahlen in naher Zukunft rasant ansteigen lassen werden. Schaut man weiterhin über die Bereiche hinaus, die zur Zeit von den ELISCOs abgedeckt werden, so ergeben sich weitere Wachstumsmärkte, die der Biotechnologie durchaus eine Zukunft als „Mega-Technologie“ in Aussicht stellen (z. B. die Biokatalyse). Geht man weiterhin davon aus, dass der Gedanke der Nachhaltigkeit global wirklich umgesetzt wird, so wird sich die Biotechnologie auch aufgrund der aufgezeigten ökologischen Effekte in vielen Bereichen der Industrie und somit des täglichen Lebens etablieren. Ökonomisch effiziente und gleichzeitig umweltverträgliche Produktionsverfahren sind sicherlich eine zwingende Voraussetzung für eine stetige zukünftige Entwicklung unserer Industrie.

Es bestehen somit neben der „roten Biotechnologie“ wissenschaftlich und wirtschaftlich interessante Betätigungsfelder in der modernen Biotechnologie. Die Biotechnologie stellt dabei ein vielschichtiges Gebilde dar, welches in allen Bereichen eine stetige Entwicklung benötigt. Durch eine zu starke, frühzeitige Fokussierung auf einen Themenbereich ist die effiziente Entwicklung der gesamten Biotechnologie gefährdet. Es sind nicht nur die „vertikalen“ Bereiche der Biotechnologie, sondern auch die „horizontalen“ Bereiche, die entsprechend gefördert werden müssen (Abb. 7.1).

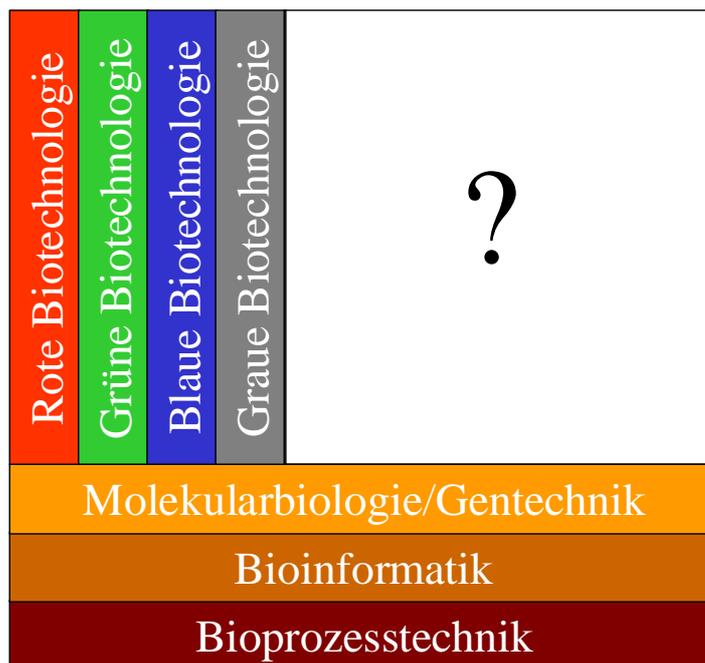


Abb. 7.1: Horizontale und vertikale Bereiche der Biotechnologie

Betrachtet man die Biotechnologie als ein Haus, so wird ein stabiles Fundament benötigt, auf welchem innovative Entwicklungen aufbauen können – die horizontalen Bereiche der Biotechnologie. Die vertikalen Bereiche symbolisieren die Zimmer. Zu vielen Zimmer sind die Türen geöffnet, aber wir stehen in einem langen Gang, auf dem noch viele Türen zu öffnen sind – durch Innovation und Forschergeist.

## 8 Anhang

### 8.1 Verfahrensschemata zu Kapitel 3.3

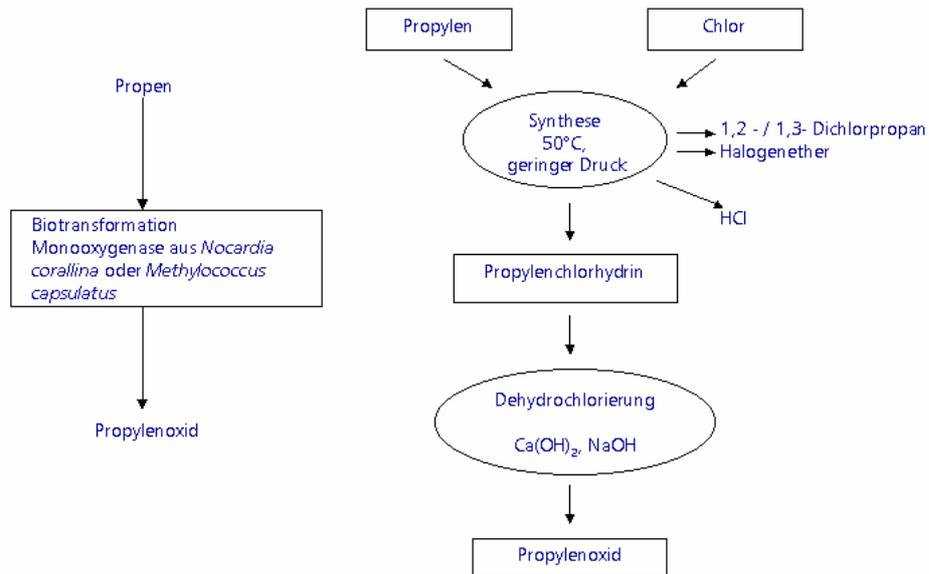


Abb. 8.1: Gegenüberstellung der chemischen und biotechnologischen Produktion von Propylenoxid [24]

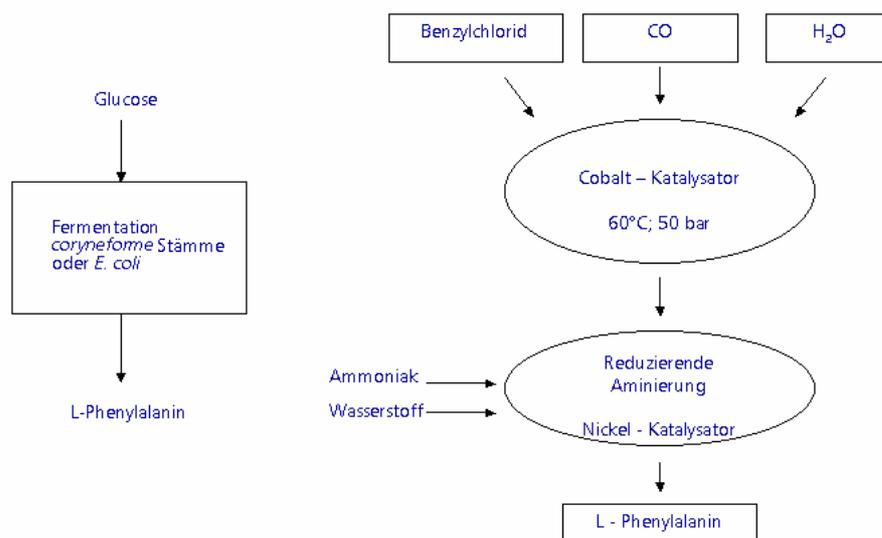


Abb. 8.2: Gegenüberstellung der chemischen und biotechnologischen Produktion von L-Phenylalanin [24]

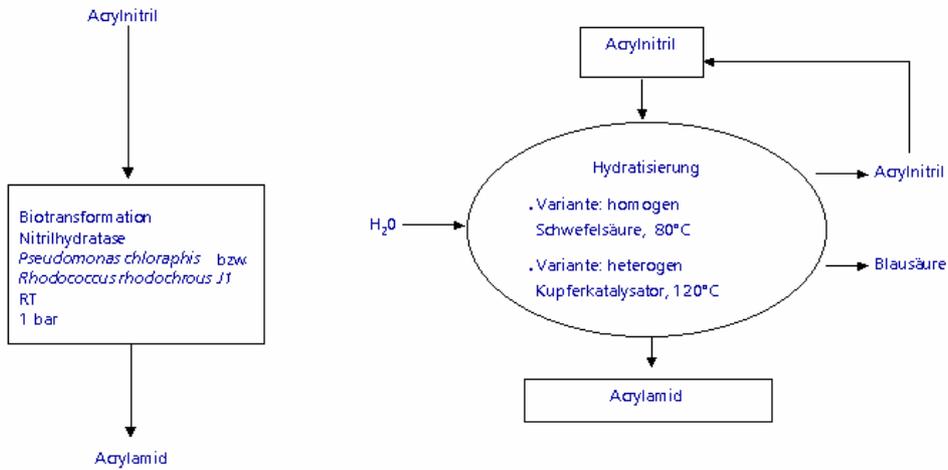


Abb. 8.3: Gegenüberstellung der chemischen und biotechnologischen Produktion von Acrylamid [24]

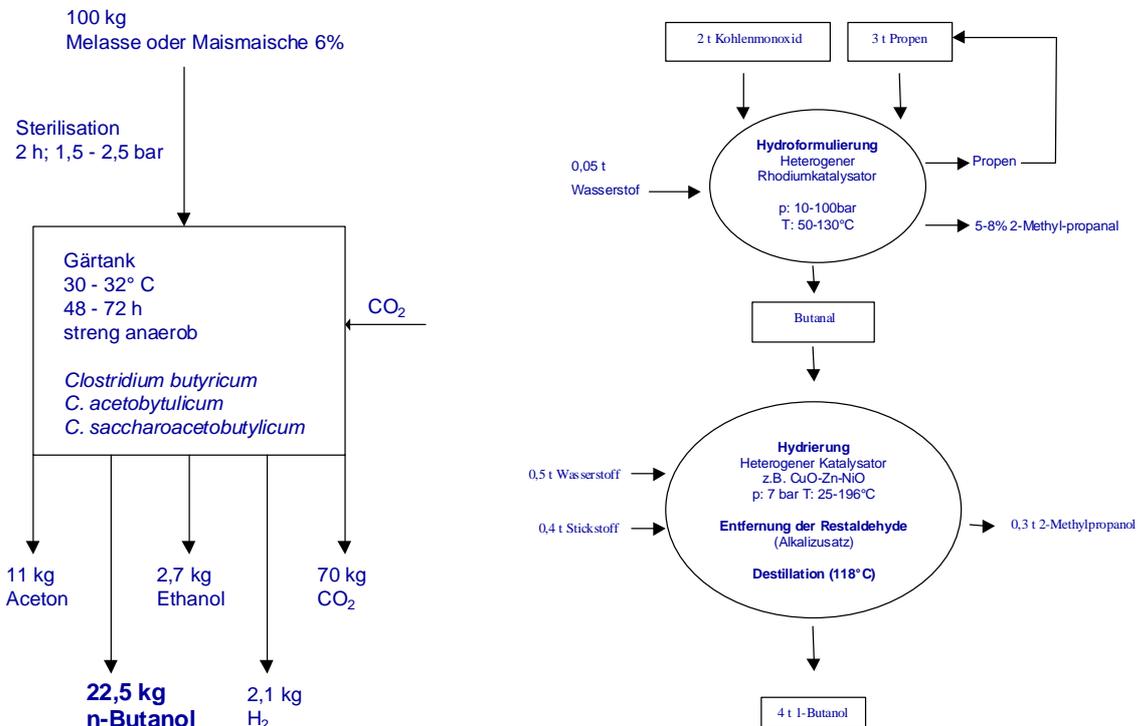


Abb. 8.4: Gegenüberstellung der chemischen und biotechnologischen Produktion von n-Butanol [24]

## 8.2 Medium zum Vereinzeln der Mikroorganismen von *Bugula plumosa*

L-Serin	3 g/l		
Sea Salts (Sigma)	34.3g/l		
1 ml/l Spurenelementlösung mit jeweils (I <sup>-1</sup> ):		0.1 g ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	
		0.03 g MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	
		0.3 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	
		0.2 g CoCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	
		0.01 g CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	
		0.02 g NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	
		0.03 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	
1ml/l Vitaminlösung mit jeweils (I <sup>-1</sup> ):		6.00x10 <sup>-2</sup> g m-Lnosite	
		3.0x10 <sup>-2</sup> g Ca-Pantothentat	
		0.6x10 <sup>-2</sup> g Thiamin x HCl (B <sub>1</sub> )	
		0.015x10 <sup>-2</sup> g Pyridoxol x HCl (B <sub>6</sub> )	
		0.3x10 <sup>-4</sup> g Biotin	

## 8.3 Zusammensetzung des MB-Mediums zur Kultivierung von MBT-A4

NaCl	19,45g/l	Hefeextrakt	1,0g/l	SrCl <sub>2</sub>	0,03g/l
MgCl <sub>2</sub>	8,8g/l	KCl	0,55g/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,02g/l
Pepton	5,0g/l	NaHCO <sub>3</sub>	0,16g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0mg/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	3,24g/l	Eisencitrat	0,1g/l	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	4,0mg/l
CaCl <sub>2</sub>	1,8g/l	KBr	0,08g/l	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,6mg/l

#### 8.4 Qualitativ und semiquantitativ nachweisbare Enzyme und zugehörige Substrate des APIZYM®-Test

Enzym	Nr.	Substrat
Ohne Enzym (Kontrolle)	1	—
Alkalische Phosphatase	2	2-Naphthyl-phosphat
Esterase (C 4)	3	2-Naphthyl-butyrat
Esterase Lipase (C 8)	4	2-Naphthyl-caprylat
Lipase (C 14)	5	2-Naphthyl-myristat
Leucin-Arylamidase	6	L-Leucin-2-naphthylamid
Valin-Arylamidase	7	L-Valyl-2-naphthylamid
Cystin-Arylamidase	8	L-Cystin-2-naphthylamid
Trypsin	9	N-Benzoyl-DL-arginin-2-naphthylamid
Chymotrypsin	10	N-Glutaryl-phenylalanin-2-naphthylamid
Saure Phosphatase	11	2-Naphthyl-phosphat
Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase	12	Naphthol-AS-BI-phosphat
$\alpha$ -Galactosidase	13	6-Br-2-Naphthyl- $\alpha$ -galactopyranosid
$\beta$ -Galactosidase	14	2-Naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
$\beta$ -Glucuronidase	15	Naphthol-AS-BI- $\beta$ -D-glucuronat
$\alpha$ -Glucosidase	16	2-Naphthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid
$\beta$ -Glucosidase	17	6-Br-2-Naphthyl- $\beta$ -D-glucopyranosid
N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	18	1-Naphthyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid
$\alpha$ -Mannosidase	19	6-Br-2-Naphthyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid
$\alpha$ -Fucosidase	20	2-Naphthyl- $\alpha$ -L-fucopyranosid

## 8.5 Anwendungen einiger mit dem API ZYM<sup>®</sup>-System getesteten Enzyme

### Lipasen (E.C. 3.1.1.3)

- Breite Anwendungen in der Lebensmittelindustrie (Aromaproduktion oder -verstärkung, Teigverbesserung bei Backwaren, Abbau von Fetten etc.)
- Deinking von Altpapier
- Entfernung von Rückständen an Maschinen in der Papierindustrie
- Kontinuierlichen Hydrolyse von Olivenöl
- Reaktionen in organischen Lösungsmitteln
- Bedeutende industrielle Verfahren (Biotransformationen) mit Lipasen werden unter anderem bei Unilever (seit 1983), DSM (seit 1992) und BASF (seit 1996) durchgeführt

### Trypsin (E.C. 3.4.21.4) und Chymotrypsin (E.C. 3.4.21.1)

- Anwendungen in der Lebensmittelindustrie (Fleischzartmacher)
- Spezialanwendungen in der Tierzellkultivierung

### $\alpha$ -Galactosidase (E.C. 3.2.1.22)

- Behandlung der Melasse zur Erhöhung der Ausbeute an Saccharose
- Als Zusatz zu Futtermitteln zur besseren Verwertung im Verdauungssystem der Tiere
- Vereinzelt auch bei Diät-Lebensmitteln

### $\beta$ -Galactosidase (E.C. 3.2.1.23)

- Produktion von lactosefreier Milch (großtechnisches Verfahren seit 1977)

### $\alpha$ -Glucosidase (E.C. 3.2.1.20)

- Modifizierung von Stärke und Stärkeprodukten

### $\beta$ -Glucosidase (E.C. 3.2.1.21)

- Protoplastengewinnung aus Pflanzenzellen
- Virusfreisetzung

## 8.6 Medium für die Pilzisolat

Substanz	Menge [g/l]
Malzextrakt	20
Glucose	20
Pepton	1

Herstellung des Mediums [116]:

Malzextrakt und Pepton wurden in 500 mL bidest. H<sub>2</sub>O gelöst und 30 min bei 121°C autoklaviert. Die Glucose wurde ebenfalls in 500 mL bidest. H<sub>2</sub>O gelöst und 30 min bei 121°C autoklaviert. Danach werden die Lösungen unter sterilen Bedingungen vereinigt.

## 8.7 Durchführung des API ZYM<sup>®</sup>-Tests

Der API ZYM<sup>®</sup>-Test wurde wie folgt durchgeführt [116]: Die Inkubationskammer wurde mit 5 ml bidest. Wasser befüllt und anschließend ein Substratstreifen in die Kammer gelegt. In jede der Mikrovertiefungen wurde anschließend eine Probe der zu untersuchenden Lösung (Zellüberstand, Zellaufschluss etc.) pipetiert. Die Kammer wurde dann für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die zum Test gehörigen Lösungen Zym A, Zym B und Fast Blue BB in die Mikrovertiefungen pipetiert. Nach weiteren 10 min wurde die Farbintensität anhand einer mitgelieferten Farbskala beurteilt. Die Skala erlaubt Abstufungen von 0 bis 40 Nanomol hydrolysiertes Substrat pro Mikrovertiefung nach nachfolgender Einteilung (Tab. 8.7.1)

Tab. 8.7.1: Semiquantitative Einstufung mittels des API ZYM<sup>®</sup>-Tests [116]

Abstufung der Aktivität	Menge an hydrolysiertem Substrat
1	5 Nanomol
2	10 Nanomol
3	20 Nanomol
4	30 Nanomol
5	40 Nanomol

### 8.8 Medium zum Screening von L-Serin umsetzenden Mikroorganismen von *Ciona intestinalis* und *Aseidiella aspersa*

Sea Salts-(Sigma)	40 g/l
L-Serin	3 g/l
Spurenelementlösung (s. 7.2)	1 ml/l
Vitaminlösung (s. 7.2)	10ml/l

### 8.9 Getestete C-Quellen beim Wachstum von *Paracoccus seriniphilia*

Wachstum erfolgt auf:

Glycogen, Tween 40, Tween 80, N-Acetyl-D-galactosamin, Adonitol, D-Arabitol, I-Erythol, D-Fructose, D-Galactose,  $\alpha$ -D-Glucose, m-Inositol, D-Mannitol, D-Mannose, D-Mellobiose, D-Sorbitol, Xylitol, Methylpyruvat, Essigsäure, cis-Aconitsäure, Essigsäure, D-Galactonsäurelacton, D-Gluconsäure, D-Glucuronsäure,  $\alpha$ -Hydroxybuttersäure,  $\beta$ -Hydroxybuttersäure, p-Hydroxyphenylelessigsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, D,L-Milchsäure, Propionsäure, Succinamidsäure, Glucuronamid, Alaninamid, D-Alanin, L-Alanin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Glutamatsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Ornithin, L-Prolin, L-Pyroglutaminsäure, L-Serin, D,L-Carnitin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Urocansäure, Inosin, Uridin, Thymidin, 2,3-Butandiol und Glycerin.

Keine Stoffwechselaktivität konnte bei den folgenden Kohlenstoffquellen festgestellt werden:

$\alpha$ -Cyclodextrin, Dextrin, Glycogen, N-Acetyl-D-glucosamin, L-Arabinose, Cellobiose, L-Fuctose, Gentiobiose,  $\alpha$ -D-Lactose, Lactulose, Maltose, D-Mannose,  $\beta$ -Methyl-D-glucose, D-Psicose, D-Raffinose, L-Rhamnose, Saccharose, D-Trehalose, Furanose, Monomethylsuccinat, D-Galacturonsäure, D-Glucosamin,  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure, Itaconsäure,  $\alpha$ -Ketobuttersäure,  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure,  $\alpha$ -Ketovaleronsäure, D,L-Milchsäure, Malonsäure, Quinonsäure, D-Saccharinsäure, Sebacon, Succinsäure, Bromsuccinsäure, Succinamidsäure, Glucuronamid, Alaninamid, L-Alanyl-glycin, Glycyl-L-aspartinsäure, Glycyl-L-glutamatsäure, Hydroxy-L-prolin, L-Phenylalanin, D-Serine, L-Threonin, Phenylethylamin, Putrescin, 2-Aminoethanol, D,L- $\alpha$ -Glycerinphosphate, Glucose-1-phosphat und Glucose-6-phosphat.

### 8.10 Spektroskopischer Test zur Aktivitätsbestimmung der L-Serindehydratase

Für den spektroskopischen Assay wurden 300  $\mu\text{l}$  KPP-Puffer (pH 7,6) mit 50  $\mu\text{l}$  einer 20 g/l Stammlösung L-Serin versetzt und auf 51°C thermostatisiert. Zu dieser Lösung wurden 50  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Probe gegeben. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten durch Zugabe von 160  $\mu\text{l}$  einer 1 g/l Stammlösung (in 2 M HCl) DNPH gestoppt. Nach weiteren 10 Minuten wurden 560  $\mu\text{l}$  3 M NaOH zugegeben. Die bei der Reaktion gebildeten Hydrazone wurden bei 550 nm nach weiteren 10 Minuten spektroskopisch nachgewiesen.

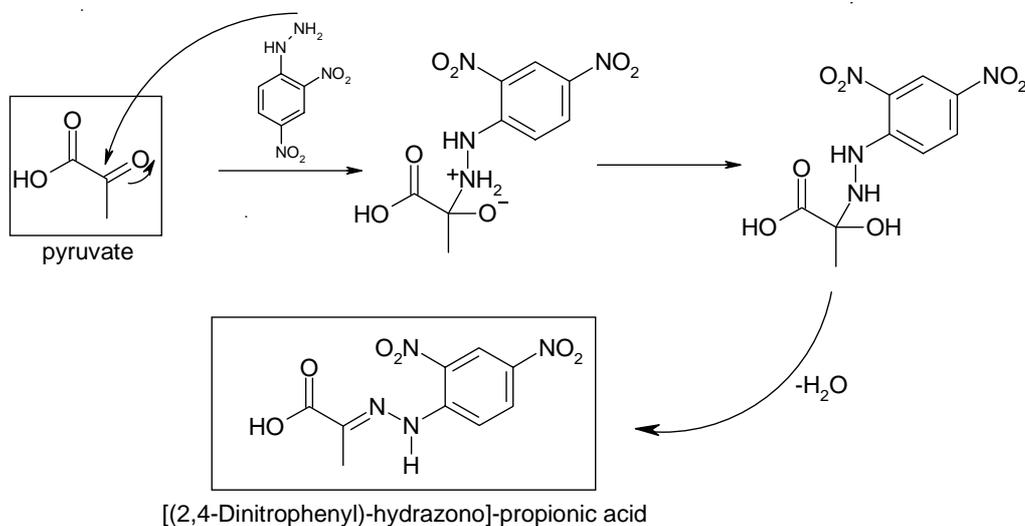


Abb. 8.5: Reaktionsschema des Nachweises des gebildeten Pyruvats über Hydrasonbildung

### 8.11 Herstellung der $\text{CaSO}_3$ -LentiKats<sup>®</sup>

Die Fällung des Calciumsulfits erfolgte durch Vereinigung von jeweils 100 ml 2 M  $\text{CaCl}_2$ - und 2 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Lösung. Es wurde zunächst mit 500 ml destilliertem Wasser und dann mit 100 ml Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum konnten 27,44 g Produkt isoliert werden. Von diesem Calciumsulfid wurden 12,5 g in 15 ml Bidest aufgenommen und in 128 g LentiKat<sup>®</sup>-Liquid eingerührt. Die Herstellung des Immobilisates erfolgte mit Hilfe des LentiKat<sup>®</sup>-Printers, die Trocknung erfolgte an der Raumluft. Der Calciumsulfidgehalt der fertigen LentiKats<sup>®</sup> betrug 34% der Trockenmasse. Ein Teil der LentiKats<sup>®</sup> wurde stabilisiert, der andere wurde ohne weitere Behandlung eingesetzt.

## 8.12 Eigenschaften ausgewählter majorer Molkeproteine

### *$\alpha$ -Lactalbumin:*

Dieses Protein ist für die Synthese von Lactose notwendig. Mit Galactosyltransferase wird Harnstoff-diphosphat-glucose in N-Acetylglucose umgewandelt. Ohne  $\alpha$ -Lactalbumin ist Glucose ein sehr seltenes Substrat für die Galactosyltransferase. Das Molekulargewicht von  $\alpha$ -Lactalbumin liegt bei 14000 Da und der isoelektrische Punkt (IP) bei ca. 4,8.

### *$\beta$ -Lactoglobulin:*

Bisher wurden vier Varianten von  $\beta$ -Lactoglobulin gefunden. Die Bezeichnung der Varianten erfolgt mit Großbuchstaben A, B, C und D. Die Molekulargewichte liegen zwischen 18 und 20 kDa und die isoelektrischen Punkte zwischen 5,14 und 5,39.  $\beta$ -Lactoglobulin neigt leicht zur Dimerisierung. Je nach pH-Wert und Temperatur bilden diese Dimere dann Tetra-, Hexa- oder Octamere, wobei unterschiedliche Varianten beteiligt sein können.

### *Bovine Serum Albumin (BSA):*

Serum Albumin wird nicht in den Milchdrüsen der Säuger produziert. Das in der Milch vorkommende BSA stammt aus dem Blutserum. Das BSA aus Blut ist eingehend untersucht worden. Danach besteht BSA aus 582 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 66267 Da und einem IP zwischen 4,71 und 4,84.

### *Caseine:*

Die Caseine teilen sich in drei Hauptgruppen auf, die  $\alpha$ ,  $\beta$  und die  $\kappa$ -Caseine. Für jede dieser Gruppen findet man weitere Untergruppen, wie z.B.  $\alpha_{s1}$ - bis  $\alpha_{s6}$ -Casein. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Caseine sind calciumsensitive Proteine. Ihre Funktion liegt wahrscheinlich in der Lagerung und Bereitstellung von Calcium. In der Milch sind die Caseine untereinander verbunden. Dabei scheinen die  $\kappa$ -Caseine die Funktion von strukturbildenden Einheiten zu übernehmen. Die Molekulargewichte der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Caseine liegen zwischen 20 und 25 kDa, die der  $\kappa$ -Caseine zwischen 19 und 22 kDa. Die isoelektrischen Punkte der Caseine liegen zwischen 3,3 und 5,3.

*Immunoglobuline:*

Immunoglobuline (Ig) werden in den B-Zellen des Körpers gebildet und treten dann als zelluläre oder sekretorische Immunoglobuline auf. Die Immunoglobuline der Milch gehören zu den sekretorischen Immunoglobulinen. Nach der Transkription der m-RNA im endoplasmatischem Retikulum erfolgt die weitere Umwandlung, wie anhängen und modifizieren von Kohlehydratketten, im Golgi-Apparat, über den das Immunoglobulin nach außen abgegeben wird. Man unterscheidet fünf Klassen von Immunoglobulinen mit den Bezeichnungen: IgA, IgD, IgE, IgM, und IgG. Das am häufigsten auftretende Immunoglobulin ist das IgG mit ca. 9 mg/mL. Die Molekulargewichte der Immunoglobuline liegen zwischen 150 und 200 kDa.

*Globuläre Milchfett-Membran-Proteine:*

Die in kleinen globulären Einheiten auftretenden Fette in der Milch sind von einer Membran aus Proteinen und Lipiden umgeben. Sofern bei der Käseherstellung diese Membranproteine nicht schon präzipitiert sind, findet man sie in der Molke mit den restlichen Fettanteilen assoziiert.

### **8.13 Wichtige kinetische Parameter einer Kultivierung**

Ertrag X:

Der Ertrag ist die Differenz zwischen der maximalen und der anfänglichen Zelltrockenmasse und gibt somit den Zuwachs an Biomasse während der Kultivierung an.

Wachstumsrate  $\mu$  und Verdopplungszeit  $t_d$ :

Die Wachstumsrate wird aus dem exponentiellen Teil der Wachstumskurve ermittelt. Sie ist gegeben durch die Steigung der Geraden, die man bei Auftragung des natürlichen Logarithmus der Zelldichte gegen die Zeit erhält. Aus der Wachstumsrate lässt sich die Verdopplungszeit  $t_d$  bestimmen:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Gl. 8.13.1})$$

Anlaufzeit  $t_l$ :

Die Anlaufzeit  $t_l$  ist das Zeitintervall zwischen einem Zeitpunkt  $t_r$  in der exponentiellen Phase, zu dem die Kultur die Zelldichte  $D_r$  erreicht hat, und demjenigen Zeitpunkt, zu

welchem diese Zelldichte erreicht worden wäre, wenn sich die Bakterien von Anfang an exponentiell vermehrt hätten. Sie wird berechnet nach

$$t_1 = t_r - \frac{\ln D_r - \ln D_0}{\mu} \quad (\text{Gl. 8.13.2})$$

#### 8.14 Immobilisierung von *P. denitrificans*

*Paracoccus denitrificans* wurde für die Versuche in linsenförmigen Perlen aus Polyvinylalkohol, sogenannten LentiKats®, eingeschlossen [326, 436]. Bei diesem Immobilisierungsverfahren wird die Suspension der gewaschenen Bakterien mit dem zuvor aufgeschmolzenen Polyvinylalkohol (LentiKat® Liquid) im Verhältnis 1:4 gemischt und anschließend durch eine Kanüle auf Kunststoffschalen aufgetropft [437]. Die Tropfen gelieren bei Raumtemperatur unter Verlust von Wasser und bilden flache Linsen von ca. 3 mm Durchmesser. Nachdem diese bis auf etwa 25 % ihres Nassgewichtes getrocknet sind (Der Grad der Trocknung richtet sich nach der Empfindlichkeit der Mikroorganismen), werden sie zum Ablösen von der Unterlage mit einer Mineralsalzlösung übergossen und anschließend zur Stabilisierung zwei Stunden in dieser Lösung gerührt bzw. geschüttelt. Im vorliegenden Fall wurden für die Herstellung zwei Bakterienkulturen von je 100 ml verwendet. Die abzentrifugierten Zellen wurden nach zweimaligem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung mit dieser auf etwa 1,2 ml verdünnt. Mit 4,8 ml LentiKat® Liquid wurden daraus 261 LentiKats (ca. 5,2 g) mit einem Trockenmassegehalt von ungefähr 0,047 g erhalten.

#### 8.15 Durchführung der Versuche zur Bestimmung der Kinetik der Denitrifizierung von *P. denitrificans*

Als Reaktionsgefäß diente eine 100-ml-Schottflasche mit Magnetrührer, die mit einem Silikonseptum verschlossen und im Wasserbad auf 37 °C gehalten wurde [326]. Die Versuchslösung (V=115 ml), in der die gewaschenen Zellen suspendiert wurden, enthielt 35 g/l Natriumchlorid und 0,01 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,5). Vor dem Verschließen wurde das Reaktionsgefäß mit Stickstoff gespült, um den Luftsauerstoff über der Suspension zu verdrängen. Der Nitratgehalt wurde vor jedem Versuchsdurchlauf durch Zugabe von 1 ml Kaliumnitrat-Lösung auf ungefähr 80 mg/l eingestellt. Die Nitrat-Lösung enthielt neben 13 g/l

KNO<sub>3</sub> außerdem das als Elektronendonator erforderliche Acetat (46 g/l NaAc · 3 H<sub>2</sub>O). Um die Mikroorganismen an die Reaktionsbedingungen zu akklimatisieren, wurde vor Aufnahme der Konzentration-Zeit-Kurven ein vollständiger Abbau von 80 mg/l Nitrat abgewartet. Zur Nitrat- und Nitritbestimmung wurden für jede Messung etwa 0,3 ml Probe durch einen Sterilfilter entnommen.

### 8.16 Herleitung der Formeln zur Berechnung der Reaktorgröße bei der Denitrifizierung

#### Reaktorvolumen bei satzweiser Erneuerung der Zellen [326]

Unter der Annahme, dass die Reaktionsgeschwindigkeit des Nitratabbaus von dem Alter der Zellen abhängig ist, muss für einen konstanten Umsatz  $U$  der Zufluss an Nitrat  $\dot{m}$  während der Standzeit  $t_s$  variiert werden. Durch Einsetzen der zeitabhängigen Reaktionsgeschwindigkeit

$$v(t) = \alpha^{\frac{t}{\theta}} \cdot v_0 \quad (\text{Gl. 8.16.1})$$

in

$$V = \frac{\dot{V} \cdot c_0 \cdot U}{v} = \frac{\dot{m} \cdot U}{v} \quad (\text{Gl. 8.16.2})$$

erhält man für den Nitratstrom den folgenden zeitlichen Verlauf:

$$\dot{m}(t) = \frac{V}{U} \cdot v(t) = \frac{V}{U} \cdot \alpha^{\frac{t}{\theta}} \cdot v_0 \quad (\text{Gl. 8.16.3})$$

Der Mittelwert über die Zeitspanne  $t_s$  ergibt sich durch die Beziehung

$$\bar{\dot{m}} = \frac{1}{t_s} \int_0^{t_s} \dot{m}(t) dt \quad (\text{Gl. 8.16.4})$$

Nach Einsetzen der Gleichung 8.16.3 in Gleichung 8.16.4 erhält man nach Integration und Auflösen nach  $V$  die Gleichung 8.16.5 zur Berechnung des Reaktorvolumens bei satzweisen Austausch der Zellen:

$$V = \frac{\bar{m} \cdot t_s \cdot U}{v_0 \cdot \frac{\Theta}{\ln \alpha} \left( \alpha^{\frac{t_s}{\Theta}} - 1 \right)} \quad (\text{Gl. 4.2.4.12})$$

### Reaktorvolumen bei kontinuierlicher Erneuerung der Zellen [326]

Für die Altersverteilung der Bakterien in einem idealen Rührkesselreaktor ergibt sich unter der Voraussetzung, dass kontinuierlich frische Mikroorganismen zugeführt werden und eine durchmischte Suspension aus Zellen unterschiedlichen Alters den Reaktionsraum mit dem gleichen Volumenstrom  $\dot{V}_z$  wieder verlässt, die normierte Funktion:

$$I(t) = \frac{1}{\tau_z} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_z}} \quad (\text{Gl. 8.16.4})$$

$\tau_z$  = mittlere hydrodynamische Verweilzeit der Zellen im Reaktor

Mit Hilfe der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Zellalter (Gleichung 5.4.11) kann daraus das Reaktorvolumen als Funktion von  $\dot{V}_z$  und  $\alpha$  bestimmt werden. Um die benötigte mittlere Reaktionsgeschwindigkeit  $\bar{v}$  im Reaktor zu bestimmen, ist das Produkt aus  $I(t)$  (Gleichung 8.16.4) und  $v(t)$  (Gleichung 5.4.11) über  $t$  zu integrieren:

$$\bar{v} = \int_0^{\infty} v(t) \cdot I(t) dt = \frac{\Theta \cdot v_0}{\Theta - \tau_z \cdot \ln \alpha} \quad (\text{Gl. 8.16.5})$$

Wenn die Verweilzeit der Zellen  $\tau_z$  durch den Quotienten aus Reaktorvolumen  $V$  und Zellstrom  $\dot{V}_z$  ausgedrückt wird, ergibt sich nach Einsetzen von Gleichung 8.16.5 in Gleichung 5.4.10 und durch Umstellen nach  $V$  die Abhängigkeit des Reaktorvolumens von dem Zellstrom und des Verlustfaktors bei kontinuierlichen Austausch der Zellen:

$$V = \frac{1}{\frac{v_0}{\bar{m} \cdot U} + \frac{\ln \alpha}{\Theta \cdot \dot{V}_z}} \quad (\text{Gl. 4.2.4.13})$$

## 8.17 Hydrolyse von Kartoffelprotein

### *Saure Hydrolyse:*

Die saure Hydrolyse wurde mit 1 g Probe in 100 ml 6N HCl unter N<sub>2</sub>-Strom bei 110-115°C über 24 h durchgeführt. Nach Filtration und Neutralisation mit 4 N Natronlauge des Hydrolysats wurden die Aminosäuren mit der HPLC (OPA-Methode) bestimmt.

### *HPLC-OPA-Methode:*

Die Probe wurde 1 : 5 mit Methanol verdünnt, um restliche Peptide zu fällen. Danach wurde mit 0,4 N Boratpuffer die endgültige Verdünnung eingestellt (AS-Gehalt: 5-50 µmol/l). Diese HPLC-Methode ist eine Vorsäulenderivatisierung, bei der die Probe 1,5 min mit OPA-Reagenz umgesetzt wurde. Die Trennung erfolgte über eine RP-C-18 HPLC-Säule von 15 cm Länge und 4 mm Durchmesser. Die Signale wurden mit einem Fluoreszenzdetektor (Ex330nm:Em420nm) aufgezeichnet. Die Trennung erfolgt über einen linearen Gradienten von Puffer A zu Puffer B und dauerte insgesamt 67 min

Puffer A: 0,05 M Carbonatpuffer + 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7 + 2% THF + 2% Methanol

Puffer B: 54% Methanol

### *Versuchsdurchführung für Screening nach Proteasen:*

Die enzymatischen Hydrolysen wurden in 2 mL Eppendorfgefäßen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Substratmengen (0,5-2 %ig) mit unterschiedlichen Mengen (2, 5 und 10 % (w/w)) einer entsprechenden Protease (oder Proteasegemisches) versetzt und über 24 h bei 45-50 °C inkubiert. Das Testvolumen betrug jeweils 2 ml. Der pH-Wert des Puffers und die Temperatur richteten sich nach den Literaturangaben für das jeweilige Enzym.

### *Bestimmung der restlichen Substratmenge:*

Nach der Hydrolyse wurde das Eppendorfgefäß 10 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der feste Rückstand für 24 h bei 70 °C getrocknet. Das zu Beginn des Versuchs ausgewogene Gefäß wurde nach der Trocknung erneut ausgewogen. Bei Mengen größer als 5 mg schwanken die Werte um ca. 5 %. Bei kleineren Restmengen beträgt der Fehler ca. ±10 %.

## 8.18 Aminosäureanalysator

Folgende Parameter wurden für die Aminosäure-Bestimmung in Melasse verwendet [438]:

### Lösungen

- Eluent: Puffersystem mit pH- und Temperaturgradient
- Ninhydrinlg.: 20,0 g Ninhydrin in 5 ml 15 % Titan(III)-Chloridlg., 750 ml Ethylenglycol-Monoethylether und 250 ml Na-acetat-Puffer
- Probenvorbereitung: 4 M NaOH, 2 M HCl

### Apparatur und Parameter

- Aminosäure-Analyser: Biotronik 5001, bestehend aus Steuerung, Injektor, Pumpen
- Vorsäule: 6\*85 mm (Füllhöhe 25 mm), Harz BTC F
- Trennsäule: 3,2\*400 mm (Füllhöhe 205 mm), Harz BTC 2710
- Säulenthermostat
- Reaktionsschlaufe: 11 m Länge
- Detektor: Photometer ( $\lambda = 570$  nm und  $\lambda = 440$  nm)
- Flow (Puffer): 0,30 ml/min
- Flow (Reagenz): 0,165 ml/min
- Reaktionstemp.: 125°C
- Probenvolumen: 50  $\mu$ l, membranfiltriert (0,2  $\mu$ l)
- Integrator: Shimadzu C-R3A

## 8.19 Immobilisierung auf VA-Epoxy

Der Polymerträger VA-Epoxy ist ein synthetisches Copolymerisat aus Vinylacetat und N,N'-Divinylethylenharnstoff. Durch gezielte Hydrolyse ist der Gehalt an Oxirangruppen und damit die Eigenschaften des Epoxyharz-Trägers einstellbar. Die Oxirangruppen reagieren mit freien Aminogruppen des Enzyms und bilden eine feste kovalente Bindung. Abbildung 8.19.1 zeigt den Mechanismus der Bindung zwischen Enzym und Träger.

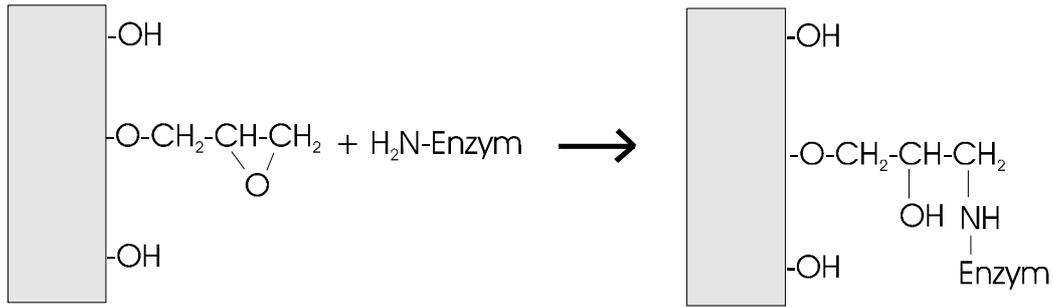


Abb. 8.19.1: Kopplungsmechanismus zwischen Enzym und dem Polymerträger VA-Epoxy [439]

Das Polymer wurde in Enzymkartuschen (V=1 ml) verwendet. Die Partikelgröße des Trägermaterials (125-250  $\mu\text{m}$ ) garantiert gute Fließeigenschaften im FIA-System. Zur Immobilisierung wurden 200 mg des Trägermaterials in 1 M Kaliumphosphat-Puffer (KPP) bei pH 7,0 für 24 h bei Raumtemperatur mit der D-Serindehydratase und der L-Lactatdehydrogenase zur Reaktion gebracht.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Gilgamesch – Epos; Lyrik online; Online in Internet:  
<http://www.lyrik.ch/lyrik/spuren1/gilgame/gilgam01.htm> [15.02.2002]
- [2] Pieter Lucas et al.; European Biotech 96 – Volatility and value; Ernst & Young International, Stuttgart (1996)
- [3] Alfred Müller et al.; European Biotech 97: A new Economy; Ernst & Young International, Stuttgart (1997)
- [4] Alfred Müller et al.: Aufbruchstimmung 1998; Schittag, Ernst & Young, Stuttgart (1998)
- [5] Thilo Rohrhirsch et al.; Gründerzeit; Schittag, Ernst & Young, Stuttgart (2000)
- [6] Bundesministerium für Bildung und Forschung; BioRegio; Online in Internet:  
<http://www.bioregio.com/> [15.02.2002]
- [7] Bundesministerium für Bildung und Forschung; Initiativen des bmb+f; Online in Internet:  
<http://www.bioregio.com/deutsch/bioregio/index.htm> [15.02.2002]
- [8] Bundesministerium für Bildung und Forschung; BioProfile; Online in Internet:  
<http://www.bioregio.com/deutsch/bioregio/profiframe.htm> [15.02.2002]
- [9] Biotechnica; Data-Pool der Biotechnologie; Online in Internet:  
<http://www.texys.de/biodata/biorregio.html> [15.02.2002]
- [10] Bundesministerium für Bildung und Forschung; BioProfile; Online in Internet:  
<http://www.bioregio.com/deutsch/bioregio/chance/chance.htm> [15.02.2002]
- [11] Bundesministerium für Bildung und Forschung; Richtlinien zum Förderschwerpunkt "Systeme des Lebens - Systembiologie" im Förderprogramm der Bundesregierung "Rahmenprogramm Biotechnologie – Chancen nutzen und gestalten"; Online in Internet;  
[http://www.bmbf.de/677\\_3807.html](http://www.bmbf.de/677_3807.html) [15.02.2002]
- [12] European Federation of Biotechnology; Online in Internet: <http://www.efbweb.org/> [02. 06. 2002]
- [13] Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie; Definition der Biotechnologie; Online in Internet: <http://www.fz-juelich.de/ibt/allgemein.html> [02.06.2002]
- [14] D. A. Cowan; The Marine Biosphere: A Global Resource for Biotechnology, *Marine Biotechnology* 15 (1997) 129-131
- [15] G. M. König, A. D. Wright; Marine Natural Products Research: Current Directions and Future Potential, *Planta Medica* 62 (1996) 193-211
- [16] W. Fenical; New Pharmaceuticals from Marine Organisms; *Marine Biotechnology* 15 (1997) 339-341
- [17] P. R. Jensen, W. Fenical; Strategies for the Discovery of Secondary Metabolites from Marine Bacteria, *Annual Review of Microbiology* 48 (1994) 559-584
- [18] S. Heiden, C. Burschel, R. Erb (Eds.); Biotechnologie als interdisziplinäre Herausforderung; Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heiderberg – Berlin (2001)
- [19] Louvre; Gesetzesstele des Hammurapi; Online in Internet; <http://www.uzo.de/louvre/gesetzesstele.htm> [15.02.2002]
- [20] M. Civil; The Hymn to Ninkasi - Making Beer; Online in Internet:  
<http://www.piney.com/BabNinkasi.html> [13.02.2002]
- [21] Die Bierbörse; Die Geschichte des Bieres ; Online in Internet;  
<http://www.bierboerse.com/entstehung/geschichte.html> [13.02.2002]
- [22] K. Soye; Biotechnologie; Birkhäuser Verlag, Basel (1990)
- [23] Medieval Sourcebook; Tacitus: Germania; Online in Internet;  
<http://www.fordham.edu/halsall/source/tacitus-germ-latin.html> [12.02.2002]
- [24] B. Hitzmann, S. Katzer, D. Schnitzmeier, H.-B. Rhein, R. Ulber; Ermittlung von Substitutionspotentialen von chemischen Verfahrenstechniken durch bio-/gentechnische Verfahren zur Risikovorsorge; Studie im Auftrag des Umweltbundesamtes Berlin (2002) im Druck
- [25] S. B. Primose; Biotechnologie; Spektrum-Verlag Heidelberg (1990)
- [26] A. Brellocks, A. Schmolke, H. Wolff, K. Kämpf; Substitution chemisch-technischer Prozesse durch biotechnische Verfahren am Beispiel ausgewählter Grund- und Feinchemikalien; Studie der Prognos AG im Auftrag des Umweltbundesamtes, Berlin, UBA-Text (2001) 16/2001
- [27] Alfred Müller et al.; Intergration – Annual European Life Science Report 2001; Ernst & Young International Ltd., Lobdon (2001)
- [28] B. Ehring, H.C. Hinz, P. Hinz, M. Moser; Gene, Gründer, Going Public – Biotechnologie in Deutschland; Consors Capital Bank AG – Sektor Review (2002)
- [29] D.-S. Rittmeister; Europäische Biotechnologie-Industrie boomt weiter; Online in Internet:  
[http://www.ey.com/GLOBAL/gcr.nsf/Germany/26\\_04\\_01\\_Europaeische\\_Biotech\\_Industrie\\_](http://www.ey.com/GLOBAL/gcr.nsf/Germany/26_04_01_Europaeische_Biotech_Industrie_)

- boomt\_weiter [13.02.2002]
- [30] A. Polak; Transparencies; Online in Internet: <http://www.dechema.de/biotech/vbu/fohlen.htm> [14.02.2002]
- [31] Stockworld; Aktien und Indices; Online in Internet: <http://www.stock-world.de/kurse/> [14.02.2002]
- [32] Keith Hardy et al.; Australian Biotechnology Report 2001; Ernst & Young and Freehills (2001)
- [33] OECD; Biotechnologie für umweltverträgliche industrielle Produkte und Verfahren; OECD Publications, Paris (1998)
- [34] Umweltbundesamt Österreich; Umweltbiotechnologie in Österreich; Monographien Band 85A, Wien (1997)
- [35] J. Dürkop, W. Dubbert, I. Nöh; Beitrag der Biotechnologie zu einer dauerhaft umweltgerechten Entwicklung; Studie des Umweltbundesamtes, Berlin. UBA-Text (1998) 1/99
- [36] B. Hüsing, S. Gießler, G. Jaeckel; Stand der Möglichkeiten von Prozessintegrierten biotechnischen Präventivtechniken zur Vermeidung oder zur Verminderung von Umweltbelastungen. Studie des Fraunhofer-Institut für Systemtechnik und Innovationsforschung Karlsruhe im Auftrag des Umweltbundesamtes, Berlin.; UBA-Text (1998) 68/98
- [37] Statistisches Bundesamt; Fachserie 4, Reihe 3.1 (1999-2000)
- [38] Umweltbundesamt (Ed.); Stand der Möglichkeiten von prozessintegrierten biotechnischen Präventivtechniken zur Vermeidung oder Verringerung von Umweltbelastungen; Arbeitsgespräch vom 22./23.2.1999 im Umweltbundesamt, Berlin. UBA-Text 4/00 (2000)
- [39] Bundesimmissionsschutzgesetz - BImSchG i.d.F. vom 14.05.1990 (BGBl. I S. 880), zuletzt geändert durch Art.1 des Gesetzes vom 19.10.1998 (BGBl. I)
- [40] 12.BImSchV/Störfallverordnung vom 19.05.1988 (BGBl. I)
- [41] Richtlinie 96/82/EG vom 09.12.1996 (Seveso-II-RiLi) zur „Beherrschung von Gefahren bei schweren Unfällen mit gefährlichen Stoffen“
- [42] P. Knopf; Leitfaden – Ermittlung von Betriebsbereichen im Sinne der StörfallV 2000 (Anwendung der Additions-/Quotientenregel) des Arbeitskreises Seveso-II-Richtlinie der SFK. Verabschiedet auf der 31.Sitzung der SFK am 12.10.1999, überarbeitet im Mai 2000
- [43] L. Pasteur; Animacules infusoires vivant sans gaz oxygène libre et déterminant des fermentations; C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. 52 (1861) 344-347
- [44] P. Dürre, H. Bahl; Microbial Production of Acetone/Butanol/Isopropanol; In: H.J. Rehm, G. Reed (eds): Biotechnology 2nd completely revisited edition, Vol. 6, Volume editor: M. Roehr, VCH, Weinheim (1996) 230-268
- [45] C. Weizmann; Production of acetone and alcohol by bacteriological processes; US 1315585 (1919)
- [46] O. Mutschlechner, H. Swoboda, J. Gapes; Continuous two-stage ABE-fermentation using *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 operating with a growth rate in the first stage vessel close to its maximal value; Journal of molekular mikrobiology and biotechnology. 2 (1) (2000) 101-105
- [47] N. Qureshi, H.P. Blaschek; Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA101 hyper-butanol producing mutant strain and recovery by pervaporation; Applied biochemistry and biotechnology. 84-6 (2000) 225-235
- [48] J. Formanek, C.K. Chen, H. Blaschek, B. Annous; A Method of Producing Butanol using a mutant strain of *Clostridium Beijerinckii*; US 9809726 (1998)
- [49] I.S. Maddox, S. Qureshi, N.A. Gutierrez; Utilization of whey by clostridia and process technology; in: The Clostridia and Biotechnology, Stoneham: Butterworth-Heinemann (1994) 343-369
- [50] D. Nimcevic, J.R. Gapes; The Acetone-Butanol Fermentation in Pilot Plant and Pre-Industrial Scale; Journal of molekular mikrobiology and biotechnology. 2 (1) (2000) 15-20
- [51] A. Commeyras, A. Arnud, P. Galzy, J.C. Jallageas; Demande de brevet D'invention (1973); US 3 940 316
- [52] A. Commeyras, A. Arnud, P. Galzy, J.C. Jallageas; Process for the preparation of amides by biological hydrolysis (1977); US 4 001 081
- [53] T. Arai, S. Kuroda, I. Watanabe; Biodegradation of acrylamide monomer by a *Rhodococcus strain*. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt. I Suppl. 11 (1981) 297-307
- [54] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey; Industrial Biotransformations; Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim (2000)
- [55] A.W. Bunch; Biotransformation of nitriles by rhodococci; Antonie van Leeuwenhoek 74 (1998) 89-97
- [56] J. Hughes, Y.C. Armitage, K.C. Symes; Application of whole cell rhodococcal biocatalysts in acryl polymer manufacture; Antonie van Leeuwenhoek 74 (1998) 107-118
- [57] I. Shiio; Tryptophan, phenylalanine, and tyrosine; in: K. Aida, I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami, H. Yamada (eds.): Biotechnology of amino acid production, Kodansha, Tokyo/Elsevier, Amsterdam (1986) 188 – 206

- [58] Dr. M. Wubbolts; DSM Biotech GmbH, Biotechnische Forschung und artverwandte Tätigkeiten; persönliche Mitteilung (2001)
- [59] J.W. Drozd; Hydrocarbons as feedstocks for biotechnology; in: Carbon substrates in biotechnology. Soc. Gen. Microbiol. Special Pub. 24 (1987) 119-138
- [60] G. Hamer, N. Al-Awadhi; Biotechnological Applications in the Oil Industry; Acta Biotechnolo. 20 (2000) 3-4, 335-350
- [61] A. Richards, S.H. Stanley, M. Suzuki, H. Dalton; The biotransformation of propylen to propylen oxide by *Methyloccus capsulatus* (Bath): 3. Reactivation of inactivated whole cells to give a high productivity system; Biocatalysis 8 (1994) 253-267
- [62] F.J. Small, S.A. Ensign; Alkene Monooxygenase from Xanthobacter Strain Py2; The Journal of Biological Chemistry 272/40 (1997) 24913-2920
- [63] H.-D. Hahn, G. Dämbkes, N. Rupprich; Butanols; in: Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry; Online in Internet: <http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/index.html> [17.02.2002]
- [64] Takashi Ohara; Acrylic Acid and Derivatives; in: Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry; Online in Internet: <http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/index.html> [17.02.2002]
- [65] G. Sienel, R. Rieth, K. T. Rowbottom; Epoxides; in: Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry; Online in Internet: <http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/index.html> [17.02.2002]
- [66] K. Drauz, B. Hoppe, A. Kleemann, H.-P. Krimmer, W. Leuchtenberger, C. Weckbecker; Amino Acids; in: Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry; Online in Internet: <http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/index.html> [17.02.2002]
- [67] M. Chandrasekaran; Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian scenario; J. Mar. Biotechnologie 5 (1997) 86-89
- [68] A. Lauwers, S. Scharpe (Eds.); Pharmaceutical Enzymes; Marcel Dekker Inc. (1997)
- [69] B. K. Carté; Biomedical Potential of Marine Natural Products; BioScience 46 (1996) 271-286
- [70] A. S. Sarma, T. Daum, W.E.G. Müller; Secondary metabolites from marine sponges; Ullstein Mosby, Berlin (1993)
- [71] D. J. Faulkner; Marine natural products; Nat. Prod. Rep. 14 (1997) 259-302
- [72] D. J. Faulkner; Marine natural products; Nat. Prod. Rep. 15 (1998) 113-158
- [73] T. Henkel, R. M. Brunne, H. Müller, F. Felix; Statistische Untersuchungen zur Strukturkomplementarität von Naturstoffen und synthetischen Substanzen; Angew. Chem. 5 (1999) 688-691
- [74] H. Terlau, G. Bach, A. Zeeck; Das medizinische Potential von Naturstoffen; Gynäkologe 33 (2000) 6-10
- [75] M. H. G. Munro et al. ; The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential; Journal of Biotechnology 70 (1999) 15-25
- [76] W. Balk-Bindseil; Neue Naturstoffe aus dem Screening mariner Actinomyceten – Isolierung und Strukturaufklärung der Lagumycine und des Oceanmycins; Dissertation, Göttingen 1995
- [77] G. Liles; Gambling on Marine Biotechnology; BioScience 46 (1996) 250-253
- [78] D. A. Cowan; The Marine Biosphere: A Global Resource for Biotechnology; Marine Biotechnology 15 (1997) 129-131
- [79] J. R. Pawlik; Marine Invertebrate Chemical Defenses. Chemical Reviews 93 (1993) 1922-1922
- [80] S. Schauder, B. I. Bassler; The languages of bacteria; Genes & Development 15 (2001) 1468-1480
- [81] R. Osinga, J. Tramper, J.G. Burgess, R. H. Wijffels (Eds.); Marine Bioprocess Engineering; in: Journal of Biotechnology 70 (1999) Nos. 1-3
- [82] R. Ulber, M. Arndt, T. Hanke, M. Laroche, K. Ackermann, T. Scheper; Tools zur Optimierung der Kultivierung mariner Mikroorganismen; BIOforum 11 (1999) 773-775
- [83] St. Louis Science Center; Online in Internet: <http://www.slsc.org/> [20.02.2002]
- [84] D. Mebs; Gifte im Riff – Toxikologie und Biochemie eines Lebensraumes; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1986)
- [85] D. P. Gordon, A.G. Clark, J.F. Harper; Bryozoa – Animal Ebergetics 2 (1987) 173-199
- [86] D.E. Schaufelberger et al.; The large-scale isolation of bryostatin 1 from *Bugula neritina* following good manufacturing practices; J. Nat. Prod. 54 (1991) 1265-1270
- [87] S. K. Davidson, M.G. Haygood; Identification of sibling species of the bryozoan *Bugula neritina* that produce different anticancer byrostatins and harbor distinct strains of the bacterial symbiont “*Candidatus* Endobugula sertula”; Biol. Bull 196 (1999) 273-280
- [88] J. Bitzer; Niedersächsischer Forschungsverbund Meeresbiotechnologie; Online in Internet: <http://www.gwdg.de/~ucoc/zeck/hom3.html> [20.02.2002]
- [89] A. Zeeck, G. Bach; Initiativen zur marinen Naturstoffforschung in Deutschland; Deutsche Hydrographische Zeitschrift Supplement 10 (1999) 91-95

- [90] J.L.C. Wright; A new antibiotic from the marine Bryzoan *Flustra foliacea*; Journal of Natural products 47 (5) (1984) 893-895
- [91] P.B. Holst, U. Anthoni, C. Christophersen, P.H. Nielsen; Marine alkaloids .15.2 alkaloids, flustramine-E and debromoflustramine-b from the marine bryzoan *Flustra foliacea*; Journal of Natural Products 57 (7) (1994) 997-1000
- [92] M.S. Morales-Rios, O.R. Suarez-Castillo, J.J. Trujillo-Serrato, P. Joseph-Nathan; Total syntheses of five indole alkaloids from the marine bryozoan *Flustra foliacea*; Journal of Organic Chemistry 66 (4) (2001) 1186-1192
- [93] L. Peters; Naturstoffe aus Makroorganismen der Nordsee; laufende Dissertation, Universität Bonn
- [94] D. Jebram; Preliminary observations on the influence of food and other factors on the growth of Bryozoa; Kieler Meeresforschungen 24 (1973) 50-57
- [95] R. Pukall, I. Kramer; Taxonomic diversity of cultivable bacteria associated with the bryozoan *Flustra foliacea*; Marine Biology, in Vorbereitung
- [96] R. Pukall, E. Stackebrandt, M. Laroche, P. Schumann, R. M. Kroppenstedt, R. Ulber; *Paracoccus seriniphila* sp. nov., a marine L-serine-dehydratase producing coccus isolated from the bryozoan *Bugula plumosa*; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; submitted
- [97] M. Laroche, P. Schauer, R. Ulber; Purification and properties of a iron-dependent L-serine dehydratase from *Paracoccus seriniphila*; eingereicht (2002)
- [98] K. Ackermann; Optimierungsstrategien zur Kultivierung mariner Mikroorganismen Diplomarbeit Universität Hannover (1998)
- [99] Dictionary of Natural Products; Chapman & Hall Chemical Database, London (1994)
- [100] persönliche Mitteilung Prof. Laatsch, Universität Göttingen
- [101] W. Balk-Bindseil; Neue Naturstoffe aus dem Screening mariner Actinomyceten – Isolierung und Strukturaufklärung der Lagumycine und des Oceanmycins; Dissertation, Universität Göttingen (1995)
- [102] T. Scheper, B. Hitzmann, E. Stärk, R. Ulber, R. Faurie, P. Sosnitzer, K. Reardon; Bioanalytics: Detailed insight into bioprocesses; Anal. Chim. Acta. 400 (1999) 121-134
- [103] K. Buchholz, V. Kasche; Biokatalysatoren und Enzymtechnologie; VCH Verlagsgesellschaft Weinheim (1997)
- [104] R. Grote, C. Bertoldo, G. Antranikian; Extremozyme – Biokatalyse unter extremen Bedingungen; in: S. Heiden, C. Burschel, R. Erb (Eds.); Biotechnologie als interdisziplinäre Herausforderung; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (2001) 295 - 322
- [105] T. Scheper (Ed.); New Enzymes for Organic Synthesis; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1999)
- [106] K. Faber (Ed.); Biotransformations; in: T. Scheper (Ed.); Advances in Biochemical Engineering Biotechnology; Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1999)
- [107] N. F. Haard; Specialty Enzymes from Marine Organisms; Foodtechnology 52 (1998) 64-67
- [108] M. Chandrasekaran; Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian scenario; J. Mar. Biotechnol. 5 (1997) 86-89
- [109] T Araki, S Tani, K Maeda, S Hashikawa, H Nakagawa, T Morishita; Purification and characterization of  $\beta$ -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. XY-214; Biosci. Biotechnol Biochem 63 (1999) 2017-2019.
- [110] D. W. Hough, M. J. Danson; Extremozymes; Current Opinion in Chemical Biology 3 (1999) 39-46
- [111] K.-H. van Pée; Microbial biosynthesis of halometabolites; Arch. Microbiol 175 (2001) 250-258
- [112] O. A. Ogunseitán; Direct extraction of proteins from natural microbial communities; J. of Microbiological Methods 28 (1997) 55-63
- [113] E. Gruner, A. v. Graevenitz, M. Altwegg; The API ZYM system: a tabulated review from 1977 to date; J. of Microbiological Methods 16 (1992) 101-118
- [114] R. Carle, S. Knödler, R. Müller; Technological importance of phosphatase activity in treated and untreated wheat flours and roux; Getreide, Mehl, Brot 52 (5) (1998) 310-314
- [115] W. E. Townsend, L.C. Blankenship; Enzyme profile of raw and heat-processed beef, pork and turkey using the “APIZYM” system; J. Food Sci. 52 (2) (1987) 511-512
- [116] T. Hanke; Untersuchungen zur Isolierung und Charakterisierung von Enzymen aus marinen Mikroorganismen; Diplomarbeit Universität Hannover (1999)
- [117] E. Krumbein; Abschlussbericht zum Themenbereich 2, Wettbewerb an Oberflächen; in: Niedersächsischer Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie, Bericht über die wissenschaftliche Tätigkeit im Forschungsschwerpunkt für die Zeit 1998-2000
- [118] BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System; L-Serine dehydratase; Online in Internet: [http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result\\_flat.php3?ecno=4.2.1.13](http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result_flat.php3?ecno=4.2.1.13) [15.04.2002]

- [119] R. Ulber, R. Faurie, P. Sosnizza, L. Fischer, E. Stärk, C. Harbeck, T. Scheper; Monitoring and control of industrial downstream processing of sugar beet molasses; *J. of. Chromatogr. A*, 882 (2000) 329-334
- [120] E.F. Gale, M. Stephenson; Factors influencing the activity of D,L-serine deaminase in *Bacterium coli*; *J. Biol. Chem.* 32 (1938) 392-404
- [121] M.E. Farias, A.M. Strasser de Saad, A.A.P. de Ruiz Holgado, G. Oliver ; Purification and Properties of L-Serin Dehydratase from *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931; *Cur. Micro.* 22 (1991) 205-211
- [122] R. Grabowski, W. Buckel; Purification and properties of an iron-sulfur-containing and pyridoxal-phosphate-independent L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*; *Eur. J. Biochem.* 199 (1991) 89-94
- [123] A.E.M. Hofmeister, R. Grabowski, D. Linder, W. Buckel; L-Serine and L-threonine dehydratase from *Clostridium propionicum*; *Eur. J. Biochem.* 215 (1993) 341-349
- [124] F. Gannon, E.S. Bridgeland, K.M. Jones; L-Serine Dehydratase from *Arthrobacter globiformis*; *Biochem. J.* 161 (1977) 345-355
- [125] J.E. Carter, R.D. Sagers; Ferrous Iron-Dependent L-Serine Dehydratase from *Clostridium acidurici*; *J. Bacteriol.* 109 (1972) 757-763
- [126] S. Isenberg, E.B. Newmann; Studies on L-Serin Deaminase in *Escherichia coli* K 12; *J. Bacteriol.* 118 (1974) 53-58
- [127] H. Su, E.B. Newmann; A novel L-serine deaminase activity in *Escherichia coli* K 12; *J. Bacteriol.* 173 (1991) 2473-2480
- [128] J. Hoshino, H. Kröger; Properties of L-Serine Dehydratase purified from Rat Liver after Induction by Fasting or Feeding Casein Hydrolysate; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350 (1969) 595-602
- [129] M. Laroche; laufende Dissertation; Universität Hannover
- [130] M. Harker J. Hirschberg, A. Oren; *Paracoccus marcusii* sp. nov., an orange Gram-negative coccus; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (1998) 543-548
- [131] A. Tsubokura, H. Yoneda, H. Mizuta; *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic Gram-negative astaxanthin-producing bacterium; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1999) 277-282
- [132] T. Urakami, J. Tamaoka, K.-I. Suzuki, K. Komagata (1989); *Paracoccus alcaliphilus* sp. nov., an alkaliphilic and facultatively methylotrophic bacterium; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (1989) 116-121
- [133] P.R. Foster, P. Dunhill, M.D. Lilly; Kinetics of protein salting out – presipitation of yeast enzymes by ammonium-sulfate; *Biotech. & Bioeng.* 18 (4) (1976) 545-580
- [134] F. Lottspeich, H. Zorbas; Bioanalytik; Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heiderberg (1998)
- [135] K. Weber, M. Osborn; The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis; *J. Biol. Chem.* 244 8 (1969) 4406-4412
- [136] H.C. Wong, T.G. Lessie; Hydroxy Amino Acid Metabolism in *Pseudomonas cepacia*: Role of L-Serine Deaminase in Dissimilation of Serine, Glycine and Threonine; *J. Bacteriol.* 140 (1) (1979) 240-245
- [137] R. Grabowski, A.E.M. Hofmeister, W. Buckel; Bacterial L-serine dehydratases: a new family of enzymes containing iron-sulfur clusters; *TIBS* 18 (1993) 297-300
- [138] H.F. Flint, R.M. Allen; Iron-Sulfur Proteins with Nonredox Functions; *Chem. Rev.* 96 (1996) 2315-2334
- [139] BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System; Sulfite oxidase; Online in Internet: [http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result\\_flat.php3?ecno=1.8.3.1](http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result_flat.php3?ecno=1.8.3.1) [15.04.2002]
- [140] D. Sorokin; *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov. – A new heterotrophic bacterium from the black sea, specialized on sulfite oxidation; *Microbiology* 64/3 (1995) 295-305
- [141] K.V. Rajagopalan; Sulfite Oxidase. In: M. Coughlan (Ed.). Molybdenum and molybdenum-containing enzymes; Oxford Pergamon Press (1980) 242.
- [142] R. Parini, V. Briscioli, U. Caruso, C. Dorche, R. Fortuna, G. Minniti, A. Selicorni, E. Vismara, G. Mancini; Spherophakia associated with molybdenum cofactor deficiency; *Am J Med Gen* 73 (1997) 272-275
- [143] M.C. Edwards, J.L. Johnson, B. Marriage, T.N. Graf, K.F. Coyne, K.V. Rajagopalan, I.M. MacDonald; Isolated sulfate oxidase deficiency - Review of two cases in one family; *Ophthalmology* 106 (1999) 1957-1961
- [144] C.A. Rupa, J. Gillett, B.A. Gordon, D.A. Ramsay, J.L. Johnson, R.M. Garrett, K.V. Rajagopalan, J.H. Jung, G.S. Bachevie, A.R. Sellers; Isolated sulfite oxidase deficiency; *Neuropediatrics* (1996) 27:299-304
- [145] C.A. Kipke, J.H. Enemark, R.A. Sunde; Purification of Prosthetically Intact Sulfite Oxidase from Chicken Liver Using a Modified Procedure; *Arch Biochem Biophys* 270 (1989) 383-390
- [146] I. Fridovich, H.J. Cohen; Hepatic sulfite oxidase; *J Biol Chem* 246 (1971) 359-382
- [147] K.V. Rajagopalan, J.L. Johnson; Tryptic cleavage of rat liver sulfite oxidase. Isolation and characterization of molybdenum and heme domains; *J Biol Chem* 252 (1977) 2017-2025

- [148] W.M. Southerland, K.V. Rajagopalan; Domain interactions in oxidized and reduced forms of rat liver sulfite oxidase; *J Biol Chem* 253 (1978) 8753-8758
- [149] P. Jolivet, E. Bergeron, J.-C. Meunier ; Evidence for sulfite oxidase activity in Spinach leaves; *Phytochemistry* 40/3 (1995) 667-672
- [150] T. Eilers; Identifizierung, Klonierung und biochemische Charakterisierung der Sulfitoxidase aus *Arabidopsis thaliana*; Dissertation; Universität Braunschweig (2001)
- [151] T. Sugio, T. Katagiri, M. Moriyama, Y.L. Zhen, K. Inagaki, T. Tano; Existence of a new type of sulfite oxidase which utilizes ferric ions as an electron acceptor in *Thiobacillus ferrooxidans*; *Appl Environ Microbiol* 54/1 (1988) 153-157
- [152] U. Kappler, B. Bennett, J. Rethmeier, G. Schwarz, R. Deutzmann, A.G. McEwan, C. Dahl; Sulfite:Cytochrome c Oxidoreductase from *Thiobacillus novellas*; *J Biol Chem* 275/18 (2000) 13202-13212
- [153] D.C. Brune ; Sulfur compounds as photosynthetic electron donors; in: R.E. Blankenship, M.T. Madigan, C.E. Bauer (Eds.); *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (1995) 847-870
- [154] H.-O. Beutler; Sulphite, in: H. U. Bergmeyer (Ed.); *Methods of Enzymatic Analysis*; 3<sup>rd</sup> Ed. Vol. 7 VCH Weinheim (1985) 585-591
- [155] Verbraucher Initiative e. V.; Zusatzstoffe; Online in Internet: <http://www.zusatzstoffe-online.de/> [19.04.2002]
- [156] J.F. Reith, J.J.L. Willems; Über die Bestimmung der schwefligen Säure in Lebensmitteln; *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* 108 (1958) 270-280
- [157] Y.-C. Su, S.L. Taylor; Sulfite analysis of food ingredients: False positive response with butter flavourings in the optimized Monier-Williams method; *Food Additives and Contaminants* 12/2 (1995) 153-160
- [158] H.-O. Beutler, I. Schütte; Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Sulfit in Lebensmitteln; *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 79 (1983) 323-330
- [159] K. Matsumoto, H. Matsubara, H. Ukeda, Y. Osajima; Determination of Sulfite in White Wine by Amperometric Flow Injection Analysis with an Immobilized Sulfite Oxidase Reactor; *Agric. Biol. Chem.* 53/9 (1989) 2347-2353
- [160] V.J. Smith; Determination of Sulfite using a Sulfite Oxidase Enzyme Electrode; *Anal. Chem.* 59 (1987) 2256-2259
- [161] M.D. Luque de Castro, J.M. Fernández-Romero; Development of an optical flow-through biosensor for the determination of sulphite in environmental samples; *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 281-287
- [162] T. Yao, M. Satomura, T. Nakahara; Simultaneous determination of sulfite and phosphate in wine by means of immobilized enzyme reactions and amperometric detection in a flow-injection system; *Talanta*, 41/12 (1994) 2113-2119
- [163] L.-T. Ng, J.T. Guthrie, Y.J. Yuan; UV cured biocompatible membrane for biosensor application; *Polym Int* 49 (2000) 1017-1020
- [164] M. Situmorang, D.B. Hibbert, J.J. Gooding, D. Barnett; A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polytyramine: application to wine analysis; *Analyst* 124 (1999) 1775-1779
- [165] M.H. Ho; Use of enzymes for the determination of environmental pollutants; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 31 (1987) 1-9
- [166] R. Parini, V. Briscioli, U. Caruso; Spherophakia Associated With Molybdenum Cofaktor Deficiency; *American Journal of Medical Genetics* 73 (1997) 272-275
- [167] M. Arndt, T. Hanke, R. Ulber; Sulfite Oxidase from the marine bacterium *Sulfitobacter pontiacus* - Optimisation of medium composition and cultivation conditions based on a commercially available medium; in Vorbereitung
- [168] D. Weuster-Botz, J. Altenbach-Rehm, M. Arnold; Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks; *Biochemical Engineering Journal* 7 (2001) S. 163-170
- [169] R. Ulber, J. Walter, M. Arndt; The use of immobilised substrate for the optimisation of batch cultivations of *Sulfitobacter pontiacus*; in Vorbereitung
- [170] GeniaLab® Biotechnologie Produkte und Dienstleistungen GmbH; LentiKats®; Online in Internet: <http://www.genialab.de/3.htm> [19.04.2002]
- [171] C.M. Cooper, G.A. Fernstrom, S.A. Miller; Performance of agitated gas-liquid contactors; *Ind Eng Chem* 36 (1944) 504-509
- [172] K. Van't Riet; Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels; *Ind Eng Chem Process Des Dev* 18 (1979) 357-364
- [173] S. Isaac, D. Jennings; *Kultur von Mikroorganismen*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1996)
- [174] M. Arndt; laufende Dissertation; Universität Hannover

- [175] G.W. Gribble; The natural production of chlorinated compounds; *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994) 310A-319A
- [176] M.A. Petty; An introduction to the origin and biochemistry of microbial halometabolites; *Bacteriol. Rev.* 25 (1961) 111-130
- [177] M.C.R. Franssen; Haloperoxidases: useful catalysts for halogenation and oxidation reactions; *Catalysis Today* 22 (1994) 441-457
- [178] H. Laatsch, H. Pudleiner, B. Pelizaeus, K.-H. van Pée; Enzymatische Bromierung von Pseudilinen und verwandten Heteroarylphenolen mit der Chloperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* Tü 24; *Liebigs Ann. Chem* (1994) 65-71
- [179] K.-H. van Pée; Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria; *Annu. Rev. Microbiol* 50 (1996) 375-399
- [180] K.-H. van Pée; Microbial biosynthesis of halometabolites ; *Arch. Microbiol.* 175 (2001) 250-258
- [181] K. Naumann; Chlorchemie der Natur; *Chemie in unserer Zeit* 27 (1993) 33-41
- [182] K. Arima, H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuda, G. Tamura; Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance produced by *Pseudomonas*; *Agr. Biol. Chem.* 28 (1964) 575-576
- [183] J. Ehrlich, Q.R. Bartz, R.M. Smith, P.R. Burkholder; Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete; *Science* 106 (1947) 417
- [184] D.M. Duggar; Aureomycin, a product of the continuing search for new antibiotics; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51 (1948) 177-181
- [185] D.H. Williams, V. Rajananda, M.P. Williamson, G. Bojesen; The vancomycin and ristocetin group of antibiotics; *Top. Antibiot. Chem.* 5 (1980) 119-158
- [186] C.R. Harington, G. Barger; Tyroxine III. Constitution and synthesis of thyroxine; *Biochem. J.* 21 (1927) 169-183
- [187] L.P. Hagger, D.R. Morris, F.S. Brown, H. Eberwein; Chloroperoxidase II. Utilization of halogen anions; *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 1769-1777
- [188] A. Butler, J.V. Walker; Marine Haloperoxidases; *Chem. Rev.* 93 (1993) 1937-1944
- [189] M. Piccard, J. Gross, E. Lübbert, S. Tölzer, S. Krauss, K.-H. van Pée, A. Berkessel; Metal-free bacterial haloperoxidases as unusual hydrolases: activation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the formation of peracetic acid; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36 (1997) 1196-1199
- [190] T. Dairi, T. Nakano, K. Aisaka, R. Katsumata, M. Hasegawa; Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline; *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (1995) 1099-1106
- [191] P.E. Hammer, D.S. Hill, S.T. Lam, K.-H. van Pée, J.M. Lignon; Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin; *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 2147-2154
- [192] R.R. Kay; The biosynthesis of differentiation-inducing factor, a chlorinated signal molecule regulating *Dictyostelium* development; *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 2669-2775
- [193] M. Holzer, W. Burd, H.U. Reissig, K.-H. van Pée; Substrate specificity and regioselectivity of tryptophan 7-halogenase from *Pseudomonas fluorescens* BL915; *ADVANCED SYNTHESIS & CATALYSIS* 343/6-7 (2001) 591-595
- [194] R. Pukall; DSMZ Braunschweig; persönliche Mitteilung (2002)
- [195] K. Muffler; laufende Dissertation; Universität Hannover
- [196] Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe; Nachwachsende Rohstoffe - alter Hut auf neuen Köpfen; Online in Internet: <http://www.fnr.de/de/index.htm> [13.02.2002]
- [197] ISO 1404; Environmental management, Life cycle assessment – Principles of framework; *Genf* (1997)
- [198] Arbeitskreis Nachwachsende Rohstoffe; Biokonversion nachwachsender Rohstoffe; Landwirtschaftsverlag GmbH Münster (1999)
- [199] A. Steinbüchel; Perspektiven der biotechnologischen Produktion und Nutzung von Biopolymeren mit Hilfe von Mikroorganismen unter besonderer Berücksichtigung nachwachsender Rohstoffe; in: Biokonversion nachwachsender Rohstoffe; Landwirtschaftsverlag GmbH Münster (1999) 10-27
- [200] W. Babel, S. Steinbüchel (Eds.); Biopolyesters; in: T. Scheper (Ed.), *Advances in biochemical engineering biotechnology*, Vol. 71 Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (2001)
- [201] W.-D. Deckwer; Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol; *FEMS Microbiol. Rev.* 16 (1995) 143-149
- [202] R. Ulber, C. Protsch, D. Solle, B. Hitzmann, B. Willke, R. Faurie, T. Scheper; Optimierung der industriellen Tryptophanproduktion durch den Einsatz bioanalytischer Systeme; *Chem.-Ing. Tech.* 73 5 (2001) 524-526
- [203] F. Wagner, S. Lang, W.G. Bang, K.D. Vorlop, J. Klein; Production of L-tryptophan with immobilized cells; *Enzyme Eng.* 6 (1982) 251-297
- [204] R. Ulber, K. Plate, W. Demmer, H. Buchholz, T. Scheper; Downstream processing of bovine lactoferrin from sweet whey; *Acta Biotechnol.* 21 (2001) 27-34

- [205] T. Scheper, R. Ulber, T. Koop, D. Kosemund, U. Müller, S. Huebner, R. Tostmann, R. Faurie; Entwicklung innovativer Aminosäureproduktion unter Berücksichtigung des Umweltkostenmanagement; Sonderausgabe Biokatalyse, Spektrum Akademischer Verlag (2001) 69-72
- [206] M. Cheryan; Ultrafiltration and Microfiltration Handbook; Technomic Publishing Company, Basel (1998)
- [207] A.S. Grandison, M.J. Lewis; Separation processes in the food and biotechnology industries; Woodhead Publishing Limited, Cambridge (1996)
- [208] F.K. Mak; Removal of color impurities in raw sugar by ultrafiltration; Intern. Sugar J. 93 (1991) 263
- [209] K.A. Sims, M. Cheryan; Hydrolysis of liquified corn starch in a membrane reactor; Biotechnol. Bioeng. 39 (1992) 960-967
- [210] U. Kulozik, M. Kersten; Fraktionieren von Proteinen mittels Mikrofiltration; Chem.-Eng.-Tech. 12 (2002) 1622-1625
- [211] R. Ulber, O.-W. Reif, D. Melzner, T. Scheper; Membranes for Protein Purification; Marcel Decker, New York, im Druck
- [212] R.V. Datar, C.-G. Rosén; Cell and cell debris removal: Centrifugation and cross flow filtration. In: Biotechnology, 2<sup>nd</sup> Ed. (Rehm, H.-J.; Reed, G., eds.) VCH mbH, Weinheim (1993) 472-502
- [213] D. Kosemund; Aufarbeitung von Süßmolke mittels Crossflowfiltration zur Isolierung von Lactoferrin, Diplomarbeit Universität Hannover (1998)
- [214] G. Tanny; Dynamic membranes, in: Ultrafiltration and Reverse Osmosis, Separation and Purification Methods 7(2) (1978) 183-200
- [215] N.P. Wong; Fundamentals of Dairy Chemistry; Van Nostrand Reinhold, New York, 3<sup>rd</sup> edition (1988)
- [216] J.G. Zadow; Whey and Lactose Processing; Elsevier Applied Science, London-New York (1992)
- [217] Angaben der zentralen Markt- und Preisberichtsstelle der Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH, Bonn (1999)
- [218] J. Lelievre; Whey proteins in chesse – An Overview; Adv. Exp. Med. Biol., 367 (1995) 359
- [219] P.C. Lorenzen; Molkenprotein: Das andere Eiweiß aus der Milch, in: Milcheiweiß für Lebensmittel, Ed.: A. Nienhaus, E. Reimerdes, Behr's Verlag, Hamburg (1987) 221 - 236
- [220] T. Sienkiewicz, C.-L. Riedel; Whey and Whey Utilization; Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, 2. bearbeitete und erweiterte Auflage (1990)
- [221] J.F. Mostert, J.J. Roberts; Whey and whey powders, in: Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, Ed.: R. Macrae, R.K. Robinson, M.J. Sadler, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto 7 (1993) 4888 - 4908
- [222] C.-L. Riedel; Molke-Rohstoff für neue Produkte; Dt. Milchwirtsch. 45 (1994) 174 – 179
- [223] F. Jekat, E. Konfranyi; Zur Bestimmung der biologischen Wertigkeit von Nahrungsproteinen, XV. Milch und Milchprodukte; Hoppe-Seyler's Z.. Physiol. Chem. 351 (1970) 47
- [224] C.A. Barth, U. Behnke; Ernährungsphysiologische Bedeutung von Molke und Molkenbestandteilen; Nahrung, 41(1) (1997) 2
- [225] L. Hambræus; Importance of milk proteins in human nutrition: Physiological aspects; in: Milk Proteins, Proceedings of the International Congress on Milk Proteins, Luxembourg, 7 – 11 May 1984, Ed.: T.E. Galesloot, B.J. Tinbergen, Pudoc, Wageningen (1985) 63 – 79
- [226] W.N. Eigel; Identification of proteos-peptone component 5 as a plasmin-derived fragment of beta-casein; Int. J. Biochem. 13 (1981) 1081
- [227] E. Schlimme, W. Buchheim; Milch und ihre Inhaltsstoffe. Chemische und physikalische Grundlagen; Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, (1995)
- [228] M. Sorensen, M.P.L. Sorensen; The proteins in Whey; Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 23 (1939) 55-59
- [229] B. Johannson; Isolation of an Iron-Containing Red Protein from Human Milk; Acta Chem. Scand. 14 (1960) 510-512
- [230] M. Tomita; Biological functions of lactoferrin: Basic research and applications, Informationsblatt der Morinaga Milk Industry Co. Ltd (Japan) (1997)
- [231] P.L. Masson, J.F. Heremans; Lactoferrin in milk from different species; *Comp. Biochem. Physiol.* **39** (1971) 119
- [232] S.A. Moore et al.; Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution; *J. Molec. Biol.* 274 (1998) 222-236
- [233] E. N. Baker et al. ; Thre-dimensional structure of Lactoferrin ; in : G. Spik et al. (Eds.); Advances in Lactoferron Research; Plenum Press New York, London (1998) 1-14

- [234] B. Reiter, J.-P. Perraudin; The antibacterial Activity of Lactoferrin and Neonatal E. coli infections; in : G. Spik et al. (Eds.); *Advances in Lactoferron Research*; Plenum Press New York, London (1998) 175-188
- [235] E.D. Weinberg; Iron and Infection; *Microbiol. Reviews* 42 (1978) 45
- [236] P. Valenti et al.; Antiviral Activity of Lactoferrin; in : G. Spik et al. (Eds.); *Advances in Lactoferron Research*; Plenum Press New York, London (1998) 199-204
- [237] Y.-C. Yoo et al.; Bovine Lactoferrin and Lactoferricin inhibit tumor metastasis in Mice; in : G. Spik et al. (Eds.); *Advances in Lactoferron Research*; Plenum Press New York, London (1998) 285-292
- [238] J. Brock; Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein?; *Immun. Today* 16 (1995) 417
- [239] S. Penco et al. ; A study of Lactoferrin and Antibodies against Lactoferrin in Neurological Diseases ; in : G. Spik et al. (Eds.); *Advances in Lactoferron Research*; Plenum Press New York, London (1998) 301-304
- [240] H. Wakabayashi et al. ; Enhanced Anti-Candida Activity of Neutrophils and Azole Antifungal Agents in the Presence of Lactoferrin-Related Compounds; in : G. Spik et al. (Eds.); *Advances in Lactoferron Research*; Plenum Press New York, London (1998) 229-238
- [241] J.H. Brock, C. Guillén, C. Thompson; Anti-inflammatory and immunoregulatory properties of lactoferrin; in : K.-C. Shimazaki et al. (Eds.); *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*; Elsevier Amsterdam (2000) 119-128
- [242] R.R. Arnold, J.E. Russel, W.J. Champion, M. Brewer, J.J. Gauthier; Bactericidal Activity of Human Lactoferrin: Differentiation from the Stasis of Iron Deprivation; *Infect. Immun.* 35 (1982) 792
- [243] R.I. Lehrer, T. Ganz; Neutrophils and Host Defence; *Ann. Intern. Med.* 109 (1988) 127
- [244] R.R. Arnold, M. Brewer, J.J. Gauthier; Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms; *Infect. Immun.* 28 (1980) 893
- [245] R.T. Ellison, T.J. Giehl, F.A. LaForce; Damage of the Outer Membrane of Enteric Gram-Negative Bacteria by Lactoferrin and Transferrin; *Infect. Immun.* 56 (1988) 2774
- [246] W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, M. Tomita; Identification of the bactericidal domain of Lactoferrin; *Biochim. Biophys. Acta* 1121 (1992) 130-136
- [247] K. Shimazaki, T. Tazume, K. Uji, M. Tanaka, H. Kumura, K. Mikawa, T. Shimo-Oka; Properties of a Heparin-binding Peptide Derived from Bovine Lactoferrin; *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 2841-2849
- [248] H. Kuwata; The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice; *Biochem. J.* 334 (1998) 321-323
- [249] R. Pascoe; Herman the bull gets Dutch go ahead; *British Medical Journal* 309 (1994) 148-149
- [250] M. Matsuura, S. Nosaka, T. Yajimi, T. Kuwata; Expression of recombinant mouse lactoferrin in insect cells; in : K.-C. Shimazaki et al. (Eds.); *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*; Elsevier Amsterdam (2000) 257-264
- [251] H. Anzai, F. Takaiwa, K. Katsumata; Production of human lactoferrin in transgenic plants; in : K.-C. Shimazaki et al. (Eds.); *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*; Elsevier Amsterdam (2000) 265-272
- [252] S. Kim; Expression of Lactoferricin from Korean native cattle in yeast; in : K.-C. Shimazaki et al. (Eds.); *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*; Elsevier Amsterdam (2000) 273-278
- [253] S.J. Kim; Genomic human lactoferrin sequence induced high levels of protein expression in milk of transgenic mice; in : K.-C. Shimazaki et al. (Eds.); *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*; Elsevier Amsterdam (2000) 279-290
- [254] D.A. Dionysius, J.B. Herse, P.A. Gieve; Extraction of Lactoperoxidase and Lactoferrin from Whey using Batch Ion Exchange Techniques; *Aust. J. Dairy Technol.* 46 (1991) 72-75
- [255] N. Kothe, H. Dichtelmuller, W. Stephan, D. Eichentopf; Method of preparing a solution of lactic colostric immunoglobulins or both and use thereof; U.S. Patent 4,644,056 (1987)
- [256] S. Yoshida; Preparation of lactoferrin by hydrophobic interaction chromatography from milk acid whey; *J. Dairy Sci.* 72 (1989) 1446
- [257] B.A. Law, B. Reiter; The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey; *J. Dairy Res.* 44 (1977) 595
- [258] S. Yoshida, Ye-Xiuyun; Isolation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine milk rennet whey and acid whey by sulphopropyl cation-exchange chromatography; *Neth. Milk Dairy J.* 45 (1991) 273
- [259] A.A. Foley, G.W. Bates; The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction; *Anal. Biochem.* 162 (1987) 296
- [260] S.A. Al-Mashikhi, E. Li-Chan, S. Nakai; Separation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography; *J. Dairy Sci.* 71 (1988) 1747
- [261] S.A. Al-Mashikhi, S. Nakai; Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey proteins by gel filtration techniques; *J. Dairy Sci.* 70 (1987) 2486

- [262] L. Bläckberg, O. Hernell; Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step; FEBS Letters 109(2) (1980) 180
- [263] J.J. Pahud, H. Hilpert; Affinity Chromatography of Lactoferrin on Immobilized Ferritin; Protides Biol. Fluids 23 (1976) 571
- [264] W.R. Bezwoda, N. Mansoor; Isolation and characterization of lactoferrin from human whey by adsorption chromatography using Cibacron Blue F3G-A linked affinity adsorbent; Clin. Chim. Acta 157 (1986) 89
- [265] T.W. Hutchens, J.S. Magnuson, T.-T. Yip; Rapid purification of porcine colostral whey lactoferrin by affinity chromatography on single-stranded DNA-agarose. Characterization, amino acid composition and N-terminal amino acid sequence; Biochim. Biophys. Acta 999 (1989) 323
- [266] H. Kawakami, H. Shinmoto, S. Dosaka, Y. Sogo; One-step isolation of lactoferrin using immobilized monoclonal antibodies; J. Dairy Sci. 70 (1987) 752
- [267] C.K. Chiu, M.R. Etzel; Fractionation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane; J. of Food Sci. 62/5 (1997) 996-1000
- [268] R. Ulber, T. Weiß, D. Steuber, D. Kosemund, R. Faurie, P. Sosnitza, K. Plate, H. Buchholz, W. Demmer, L. Fischer, T. Scheper; Sinnvolle Verwandlung; BioTec 4 (1999) 44-46
- [269] K.H. Gebauer, J. Thömmes, M.-R. Kula; Plasma protein fractionation with advanced membrane adsorbents; Biotechnol. Bioeng.; 53 (1997) 181-189.
- [270] S. Brandt, R.A. Goffe, S.B. Kessler, J.L. O'Conner, S.E. Zale; Membrane-based affinity technology for commercial scale purifications; Bio/Technol. 6 (1988) 779-782
- [271] K.C. Hou, R.M. Mandaro; Bioseparation by ion exchange cartridge chromatography; Biotechniques 4 (1986) 358-367
- [272] J.H. Berglöf, S.E. Erikson; Plasma fractionation by chromatography of albumin and IgG; In: Biotechnology of plasma proteins (Stoltz, J. F. and Rivat, C., eds.); INSERM Paris (1989) 207-216
- [273] T. Burnouf; Chromatography in plasma fractionation: Benefits and future trends; J. Chromatogr. 664 (1995) 3-15
- [274] K. Plate, W. Demmer, H. Buchholz, R. Ulber, T. Scheper; Gewinnung von bovinem Lactoferrin aus Molke über Membranadsorber; Chem.-Ing. Tech. (73) 7 (2001) 898-901
- [275] T. Weiß; Neue Membrantechnologien zur Isolierung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke – Methodenentwicklung für den industriellen Einsatz; Promotion, Universität Hannover (1999)
- [276] K. Plate; laufende Dissertation; Universität Hannover
- [277] M. Walden; Aufbau einer Qualitätskontrolle für die isolierten Molkeproteine Lactoferrin und Lactoperoxidase; Diplomarbeit; Universität Hannover (1998)
- [278] P. Riechel, T. Weiß, R. Ulber, H. Buchholz, T. Scheper; Determination of the minor whey protein Bovine Lactoferrin in Cheese Whey Concentrates with Capillary Electrophoresis; J. Chromatogr. A 817 (1998) 187-193
- [279] P. Riechel, R. Ulber, T. Weiß, H. Buchholz, T. Scheper; Analysis of bovine lactoferrin in whey using capillary electrophoresis (CE) and micellar electrokinetic Chromatography (MEKC); in: Advances in Lactoferrin Research, Editor G. Spik et al., Plenum Press New York – London (1998)
- [280] K. Plate, W. Demmer, H. Buchholz, R. Ulber, T. Scheper; Recovery of bovine lactoferrin by ion exchange membrane adsorption; Proceedings of 3rd International Whey Conference München (2001), im Druck
- [281] J. Oppermann; Vom Rohstoff zum Wertstoff – Ökonomische Produkt- und Prozessanalyse zur Gewinnung von Lactoferrin aus Molke; Diplomarbeit, Universität Hannover (1997)
- [282] Römpp Chemie Lexikon: Lebensmittelchemie, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995)
- [283] T. Sienkiewicz, C.-L. Riedel; Molke und Molkeverwertung: Verwendungsmöglichkeiten in der Landwirtschaft und der Lebensmittelproduktion; 1. Auflage Fachbuchverlag, Leipzig (1986)
- [284] G.L. Dimotsis, F. McGarvey; A comparison of a selective resin with a conventional resin for nitrate removal; Off. Proc. - Int. Water Conf., 56<sup>th</sup> (1995) 12-17
- [285] B. Delchev, S. Boichev; Removal of ammonia and nitrates from natural waters by ion exchange; Water Supply 5(3-4) (1987) 8-10
- [286] J.M. Philipot, G. de Larminat; Nitrate removal by ion exchange: The ECODENIT process, an industrial scale facility at Binic (France); Water Supply 6 (1988)
- [287] G.A. Guter; Removal of nitrate from water supplies using a tributyl amine strong base anion exchange resin; Patent US 83-518172 (1983)
- [288] S.H. Lin, C.L. Wu; Nitrite and nitrate removal from aqueous solution by ion exchange; J. Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard. Subst. Control A32(5) (1997) 1575-1589
- [289] A. Pintar, J. Batista, J. Levec; Catalytic denitrification: direct and indirect removal of nitrates from potable water; Catalysis Today 66 (2001) 503-510

- [290] T. Kawasaki, M. Ohniwa, T. Kurimoto, K. Waizumi; Ion exchange apparatus for wastewater treatment; Patent JP 74-136026 (1974)
- [291] S. Cerjan-Stefanovic, M. Kastelan-Macan, T. Filipan; Ion exchange characterization of modified zeolite; *Water Sci. Technol.* 26(9-11) (1992) 2269-2272
- [292] R. Hellekes, G. van Opbergen, W. Kopp, R. Rautenbach; Nitrate elimination from groundwater by reverse osmosis and electro dialysis. Process development and optimization; *GWF, Gas- Wasserfach: Wasser/Abwasser* 130/12 (1987) 638-44
- [293] R.B. Mellor, J. Ronnenberg, W.H. Campbell, S. Diekmann; Reduction of nitrate and nitrite in water by immobilized enzymes; *Nature* 335 (1992) 717-719
- [294] P. Cyplik, T. Malyszka, W. Grajek, W. Burda, A. Aniol; Nitrate removal from drinking water in ion exchange – biological denitrification process; *Biotechnologia* 2 (199) 203-216
- [295] J. van Rijn, A. Nussinovitch, J. Tal; Bacterial immobilization in polymeric beads for nitrate removal from aquarium water; Patent PCT Int. Appl. WO 9737008 A1 ( 1997) 13 pp
- [296] A. Mohseni-Bandpi, D.J. Elliott; Nitrate removal from groundwater using an anoxic-aerobic rotating biological contactor; *Water Sci. Technol.* 34 (1996) 323-330
- [297] J.P. van der Hoek, A. Klapwijk; The use of a nitrate selective resin in the combined ion exchange/biological denitrification process for nitrate removal from ground water; *Water Supply* 6 (1988) 57-62
- [298] F. Gorner, V. Bizubova, A. Madaric; Reduction of nitrate to nitrite in milk whey; *Mlek. Listy* 10(2) (1975) 185.25-188.29, in: *Prum. Potravín* (35, 4) (1984)
- [299] T. Tuan, P. Pierre, H. Weymuth; Removal of anions from vegetable material; *Eur. Pat. Appl. EP* 166090 A2 (1986) 8 pp.
- [300] H. Eshima, Y. Muto, T. Moribe, T. Katsumata; Removal of nitrate ions from vegetable juice by anion-exchange resins; Patent JP 11290041 A2 (1999) 10 pp.
- [301] W. Hitze; Lowering the nitrate content of vegetable homogenates by anion-exchange chromatography; Patent DE 87-3728372 (1987)
- [302] H. Shinichiro; Method for removing Nitrate Nitrogen in crude feed, horticultural food or the like; Patent JP4207160 (1992)
- [303] Ch. Gernhards A. Rathjen, E. Mayer-Miebach, H. Schubert; Einschlußimmobilisierung von Mikroorganismen für den Nitratabbau in flüssigen Lebensmittel; *BIOforum* 6 (1993) 206 – 209
- [304] A. Rathjen, M. Kerner, E. Mayer-Miebach, H. Schubert; Verringerung des Nitratgehalts pflanzlicher Lebensmittel durch immobilisierte Mikroorganismen; in K.D. Jany, B. Tauscher (Eds.): *Biotechnologie im Ernährungsbereich*; Karlsruhe (1992). 64-70
- [305] M. Kerner, M. Wilk, H. Schubert; Biokatalytische Umwandlungsprozesse in Membranreaktoren – Anwendung auf den mikrobiellen Nitratabbau in Fluiden (Teil 1); *Int. Z. f. Lebensmitteltechnik* 44 (1993) EFS 10-15
- [306] M. Wilk, A. Rathjen, H. Schubert; Einsatz eines Membranreaktors und eines neuartigen Geleinschlußkonzeptes am Beispiel der mikrobiellen Denitrifikation; *BIOforum* 16 (1993) 163-166
- [307] Ch. Gernhards A. Rathjen, E. Mayer-Miebach, H. Schubert; Immobilization of Microorganisms for the Biological Reduction of Nitrate in Fluid Foods by Inclusion in Gels; in G. Kreysa, A.J. Driesel (Eds.): *DECHEMA Biotechnology Conferences, Vol. 5, Part B*; Weinheim (1992) 591-594
- [308] M. Kerner, H. Schubert; Mikrobieller Nitratabbau in einem Membranreaktor; *Chem.-Ing.-Tech.* 63 (1991) 361-368
- [309] M. Kerner; Untersuchungen zum mikrobiellen Nitratabbau in einem Membranreaktor; Dissertation, Universität Karlsruhe (1991)
- [310] J. P. van der Hoek, P. J. M. Latour and A. Klapwijk, Denitrification with methanol in the presence of high salt concentrations and at high pH levels; *Applied Microbiology and Biotechnology* 27 (1987) 199 – 205
- [311] A. R. Dincer, F. Kargi; Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline wastewater, *Environmental Technology* 20 (1999) 1147 – 1153
- [312] P. Y. Yang, S. Nitorisavut, J. S. Wu; Nitrate removal using a mixed-culture entrapped microbial cell immobilization process under high salt conditions; *Water Research* 29 (6) (1995) 1525 – 1532
- [313] U. Rohmann, H. Sontheimer (Ed.); *Nitrat in Grundwasser*; DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (1985)
- [314] H. Cypionka; *Grundlagen der Mikrobiologie*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1999)
- [315] CD Römpp Chemie Lexikon, 9. Auflage des Römpp Chemie Lexikons auf CD-ROM, Version 1.0 (1995)
- [316] R. J. M. van Spanning, A. P. N. de Boer, W. N. M. Reijnders, J.-W. L. de Gier, C. O. Delorme, A. H. Stouthamer H. V. Westerhoff, N Harms, J. von der Oost; Regulation of Oxidative Phosphorylation: The

- Flexible Respiratory Network of *Paracoccus denitrificans*; Journal of Bioenergetics and Biomembranes 27 (5) (1995) 499
- [317] R. S. Rutishauser Frei; The behaviour of the various cytochromes of *Paracoccus denitrificans* during transitions between oxic and anoxic growth conditions; Dissertation University of Zürich (1992)
- [318] B. Baumann, J. R. van der Meer, M. Snozzi, A. J. B. Zehnder; Inhibition of denitrification activity but not of mRNA induction in *Paracoccus denitrificans* by nitrite at a suboptimal pH; Antonie van Leeuwenhoek 72 (1997) 183 – 189
- [319] D. Schnitzmeier; laufende Dissertation; Universität Hannover
- [320] E. Fitzer, W. Fritz, G. Emig; Technische Chemie; 4. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg (1995)
- [321] H. W. van Verseveld, A. H. Stouthamer; The Genus *Paracoccus*, The Prokaryotes - A Handbook of the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications; Springer-Verlag New York (1991)
- [322] Y.-H. Cho; Entwicklung von Gel-in-Matrix (GIM)-Systemen zur Immobilisierung von *Paracoccus denitrifikans* DSM 65; Dissertation; Technische Universität Berlin (1994)
- [323] B. Baumann, M. Snozzi, A. J. B. Zehnder, J. R. van der Meer; Dynamics of Denitrification Activity of *Paracoccus denitrifikans* in Continuous Culture during Aerobic-Anaerobic Changes; Journal of Bacteriology 178 (15) (1996) 4376-4374
- [324] H. Weide, H. Aurich; Allgemeine Mikrobiologie; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1979)
- [325] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; DSMZ-List of Media; Online in Internet: <http://www.dsmz.de> [06.05.2002]
- [326] M. Fritsche; Denitrifikation von Molke; Diplomarbeit Universität Hannover (2000)
- [327] A. K. Banerjee, H. G. Schlegel; Zur Rolle des Hefeextraktes während des chemolithotrophen Wachstums von *Micrococcus denitrifikans*; Archiv für Mikrobiologie 53 (1966) 132-153
- [328] C.-C. Chang, S.-K. Tseng; The optimum condition for autotrophic denitrification by *Paracoccus denitrificans*; Journal of the Chinese Institute of Environmental Engineering 8 (3) (1998) 233-237
- [329] J. Schilling; Die Stickstofffresser; BioWorld 1 (2001) 2-3
- [330] J. Schwarz; laufende Diplomarbeit; Universität Hannover
- [331] A. M. Pots; Physico-chemical Properties and Thermal Aggregation of Patatin, the Major Potato Tuber Protein; Dissertation Landbouwniversiteit Wageningen (1999)
- [332] A.M. Pots, H. Gruppen, M. Helsing, M.A.J.S. van Boekel, A.G.J. Voragen; Isolation and Characterization of Patatin Isoforms; J. Agric. Food Chem. 4 (1999) 4587 – 4592
- [333] P. Pinsiroadom, K.L. Parkin; Selectivity of Celite-Immobilized Patatin (Lipid Acyl Hydrolase) from Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers in Esterification Reactions as Influenced by Water Activity and Glycerol Analogues as Alcohol Acceptors; J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 155 – 160
- [334] C.A. Ryan; Methods for the Isolation of Proteinase Inhibitor Proteins from Potato Tubers; PCT Patent Application WO 99/01474 (1999)
- [335] W. Bergthaller, W. Witt, H.-P. Goldau; Potato Starch technology; Starch / Stärke 51/7 (1999) 235 – 242
- [336] A.M. Pots, H.H.J. de Jongh, H. Gruppen, R.J. Hamer, A.G.J. Voragen; Heat-Induced Conformational Changes of Patatin, the Major Tuber Protein; Eur. J. Biochem. 252 (1998) 66 – 72
- [337] M. Friedman; Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. A Review; J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 1523 – 1540
- [338] S. W. Taylor, J.H. Waite; Marine Adhesives: From Molecular Dissection to Application; in: Protein-Based Materials; K. McGrath, D. Kaplan (Eds.); Birkhäuser Boston (1997)
- [339] H.A. Hansson; New Use of a Bioadhesive Composition Comprising A Polyphenolic Protein; PCT Patent Application WO 01/44401 A1 (2001)
- [340] C. Kemme-Kroonsberg, E.J.F. van Uffelen, J.C.J. Verhaart; Purified Heat-Coagulated Potato Protein for Use in Animal Feed; US-Patent US 6,042,872 (2000)
- [341] M. Friedmann, G.M. McDonald; Potato Glycoalkaloids: Chemistry, Analysis, Safety, and Plant Physiology; Critical Reviews in Plant Sciences 16/1 (1997) 55 – 132
- [342] M. Heyde; Membrantechnische Abtrennung von Proteinen aus Kartoffelfruchtwasser; Fortschrittsberichte VDI, Reihe 3 Verfahrenstechnik, Nr. 575, VDI Verlag GmbH Düsseldorf (1998)
- [343] M.-C. Ralet, J. Guéguen; Fractionation of Potato Proteins: Solubility, Thermal Coagulation and Emulsifying Properties; Lebensmittelwissenschaften und Technologie 33 (2000) 380 – 387
- [344] G.A. van Koningsveld, H. Gruppen, H.H.J. de Jongh, G. Wijngaards, M.A.J.S. van Boekel, P. Walstra, A.G.J. Voragen; The Solubility of Potato Proteins from Industrial Potato Fruit Juice as Influenced by pH and Various Additives; J. Sci. Food Agric. 82 (2001) 134 – 142
- [345] D.E. Matthews; Proteins and Amino Acids; in: M.E. Shils et al. (Eds.) Modern Nutrition in Health and Disease (1998) 11

- [346] K. Aida et al. (Eds.); Biotechnology of amino acid production; in: Progress in industrial microbiology; Kodansha Ltd. Tokyo (1986)
- [347] K. Akashi et al. (Eds.); Recent progress in microbial production of amino acids; Japanese technology reviews, Gordon and Breach science publishers (1989)
- [348] W. Leuchtenberger; Biotechnology; VCH (1996) 455
- [349] M. Fountoulakis, H.W. Lahm; Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins; J. Chromatogr. A 826 (1998) 109-134
- [350] G.C. Barrett et al.; Chemistry & Biochemistry of the Amino Acids; Chapman and Hall - New York (1985)
- [351] L. Nouri, J. Legrand, Y. Popinaeu, P. Belleville; Enzymatic hydrolysis of wheat proteins; Chemical Engineering Journal 65 (1997) 195-199
- [352] A. Margot, E. Flaschel, A. Renken; Empirical kinetics models for tryptic whey-protein hydrolysis; Process Biochemistry 32/3 (1997) 217-223
- [353] U. Behnke, E. Jurisova, E. Belajova, J. Haas, H. Blumhagen; Enzymatic hydrolysis of maize protein; Die Nahrung 33/4 (1989) 361-376
- [354] T. Heidrich; Proteingewinnung aus Kartoffelfruchtwasser; Diplomarbeit Fachhochschule Hannover (2002)
- [355] D.K. Salunkhe; Potatoe: Production, processing and products; CRC-Verlag (1991)
- [356] J.C. Partington, G. P. Bolwell; Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from potato tuber; Division of Biochemistry, School of Biological Sciences, Royal Holloway College, University of London (1996)
- [357] D. Kosemund; laufende Dissertation; Universität Hannover
- [358] P. Hespel et al. ; Creatine supplementation: Exploring the role of the creatine kinase/phosphocreatine system in human muscle; Canadian journal of applied physiology 26 (2001) 79-102
- [359] W. Schäfer-Treffenfeldt; Verfahren zur Trennung von Aminosäuren und Peptiden durch Adsorption an Zeolithpulver; DECHEMA-Tagung Verfahrenstechnische Grundlagen und Modellierung von Bioprozessen (1997)
- [360] T. Koop; laufende Dissertation; Universität Hannover
- [361] S. Hübner; laufende Dissertation; Universität Hannover
- [362] R. Tostmann; laufende Dissertation; Universität Hannover
- [363] R. Ulber, B. Hitzmann, K. Reardon, T. Scheper; Bioreactor Monitoring and Control; in: Encyclopedia of Microbiology 2<sup>nd</sup> Edition Vol. 1, Editor: Joshua Lederberg, Academic Press (2000) 567-578, San Diego, USA
- [364] R. Ulber, B. Hitzmann, T. Scheper; Innovative Bioprozessanalytik – Neue Wege zum besseren Verständnis biotechnologischer Prozesse; Chem.-Ing. Tech. 73 1+2 (2001) 19-26
- [365] B. Hitzmann, A. Ritzka, R. Ulber, T. Scheper, K. Schügerl; Computational neural networks for the evaluation of biosensor FIA measurements; Anal. Chim. Acta 348 (1997) 135-141
- [366] B. Hitzmann, A. Ritzka, R. Ulber, K. Schöngarth, O. Broxtermann; Neural networks as a modelling tool for the evaluation and analysis of FIA signals; Journal of Biotechnology 65 (1998) 15 – 22
- [367] A. Ritzka, R. Ulber, B. Hitzmann, T. Scheper; Regelung von Bioprozessen mit neuronalen Netzen; Chem.-Ing.Tech. 1-2 (2002) 149-151
- [368] J. Ruzicka, E.H. Hansen; Flow Injection Analysis; 2<sup>nd</sup> ed. Wiley New York (1989)
- [369] J. Ruzicka, G.D. Marshall; Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays; Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329
- [370] T. Kullick, R. Ulber; Enzyme modified field-effect-transistors (EnFET) for bioprocess monitoring, in Biosensors in Analytical Biotechnology; Editor R. Freitag, LANDES Bioscience Publisher (1995)
- [371] K. Schügerl, B. Hitzmann, H. Jürgens, T. Kullick, R. Ulber, B. Weigel; Challenges in integrating biosensors and FIA for on-line monitoring and control; TIBTECH Jan. (1996) 21-31
- [372] A. Ritzka, R. Ulber, T. Scheper; Fermentation monitoring and process control; Current Opinion in Biotechnology 8 (1997) 160-164
- [373] R. Ulber; Optimierung von Sensorsystemen für die Biotechnologie; Cuvillier-Verlag Göttingen (1997)
- [374] L. C. Clark, C. Lyons; Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery; Ann. N. Y. Acad. Sci.; 102 (1962) 29
- [375] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman; IUPAC Discussion Paper; Commission V.I.; 07 (1989)
- [376] T. M. Canh; Biosensors; Chapman & Hall (1993)
- [377] E. A. H. Hall; Biosensoren; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1995)
- [378] A. E. G. Cass; Biosensors - A Practical Approach; Oxford University Press (1990)
- [379] G. Wagner, G. G. Guilbault; Food Biosensor Analysis; Marcel Dekker, Inc. (1994)

- [380] R. Ulber, T. Scheper; Enzyme Biosensors based on ISFETs, in: Enzymes and Microbial Biosensors; A. Mulchandani, K. R. Rogers (Eds.); Humana Press Inc. (1998)
- [381] S. Marose, R. Ulber, T. Scheper; Optical sensors for bioprocess monitoring; Trends in Biotechnologie, Januar 1999 (Vol. 17) 30-34
- [382] R. Ulber, T. Scheper; Der Verbund Sensorik in der Biotechnologie; euro-biotech (2001) 66-69
- [383] R. Ulber, A. Ritzka, P. Sosnitzka, C. Lindemann, B. Hitzmann, T. Scheper; Innovative Methoden in der biotechnologischen Prozesskontrolle; BIOFORUM 5 (1997) 234-236
- [384] A. Ritzka, R. Ulber, B. Hitzmann, T. Scheper; Regelung von Bioprozessen mit neuronalen Netzen; Chem.-Ing.Tech. 1-2 (2002) 149-151
- [385] R. Köneke, C. Menzel, R. Ulber, M. Saleemuddin, T. Scheper; Reversible coupling of glucoenzymes on fluoride-sensitive FET-biosensors based on lectin-glycoprotein binding; Biosensors & Bioelectronics 12 (1996) 1229-1236
- [386] R. Ulber, P. Sosnitzka, R. Köneke, M. Saleemuddin; Biosensoren mit reversibel immobilisierten Glycoenzymen; BIOTEC 3 (1997) 18-21
- [387] M. Farooqi, M. Saleemuddin, R. Ulber, P. Sosnitzka, T. Scheper; Bioaffinity Layering: A novel Strategy for the Immobilization of Large Quantities of Glycoenzymes; Journal of Biotechnology, 55 (1997) 171-179
- [388] M. Farooqui, P. Sosnitzka, M. Saleemuddin, R. Ulber, T. Scheper; Immunoaffinity layering of enzymes: Stabilisation and use in flow injection analysis of glucose and hydrogen peroxide; Applied Microbiology and Biotechnology, 52 (1999) 373-379
- [389] P. Sosnitzka, M. Farooqui, M. Saleemuddin, R. Ulber, T. Scheper; Application of reversible immobilization techniques for biosensors; Anal. Chim. Acta 368 (1998) 197-203
- [390] R. Ulber, T. Scheper; Industrielle Bioanalytik - Der Verbund Sensorik in der Biotechnologie; Sonderausgabe Sensorik, Spektrum Akademischer Verlag (2001) 6-12
- [391] R. Ulber; Homepage des Verbundes Sensorik in der Biotechnologie; Online in Internet: <http://www.verbund-sensorik.de> [09.04.2002]
- [392] G.C. Chemnitius, H. Erdmann, R.D. Schmid; Solubilized Substrates for the On-line Measurement of Lipases by Flow Injection Analysis during Chromatographic Enzyme Purification; Anal. Biochem. 202 (1992) 16-24
- [393] W.W. Stamm, M.R. Kula; Monitoring of enzymes during chromatographic separations; J. Biotechnol. 14 (1990) 99-114
- [394] H. Schütte, W. Hummel, M.R. Kula; Improved enzyme screening by automated fast protein liquid chromatography; Analytical Biochemistry 151 (1985) 547-553
- [395] A. Recktenwald, K.H. Kroner, M.R. Kula; On-line monitoring of enzymes in downstream processing by flow injection analysis (FIA); Enzyme Microb. Technol. 7 (1985) 607-612
- [396] K.H. Kroner; On-line-Bestimmung von Enzymen in der Bioprozeßanalytik unter Berücksichtigung von Probenahme und Fließinjektionstechnik; Fresenius Z. Anal. Chem. 329 (1988) 718-725
- [397] A.C. Kenney; Automation in Protein Purification: The Use of Expert Systems for Control of Process Chromatography; In: Bioprocess Technology 9 (Sep. Processes Biotechnol.), J. Brown Eng. and Constr. Ltd, Portsmouth (1990) 603-616
- [398] I.J. Holwill, S.J. Chard, M.T. Flanagan, M. Hoare; A Kalman Filter Algorithm and Monitoring Apparatus for At-Line Control of Fractional Protein Precipitation; Biotechnology & Bioengineering 53 (1997) 58-70
- [399] K. Beyer, M. Reinecke, W. Noe, T. Scheper; Immunobased elution assay for process control; Analytica Chimica Acta 309 (1995) 301-305
- [400] S. Gough, A.P. McHale; Continuous Ethanol Production from Molasses at 45°C Using Alginate-immobilized Kluyveromyces marxianus IMB3 in a Continuous-Flow Bioreactor; Bioprocess Engineering 19 (1998) 33-36
- [401] H. Schiweck; Zusammensetzung von Zuckerrübermelassen; Zuckerindustrie 120/4 (1995) 272 – 282
- [402] H. Hongisto; Chromatographic separation of sugar solutions - the Finnsugar molasses desugarization process; I. Int. Sugar J. 79/940 (1977) 100-104
- [403] H.A. Paananen; Trends in the chromatographic separation of molasses; Zuckerind. 122 (1997) 28-33
- [404] P. Sosnitzka; Biosensoren für die Aufarbeitung in der Biotechnologie; Dissertation, Universität Hannover (1999)
- [405] F. Irtel; Neue Analytik für industrielle Aufarbeitungsprozesse; Dissertation; Universität Hannover (2001)
- [406] F. Irtel, P. Sosnitzka, M. Busse, R. Faurie, L. Fischer, R. Ulber, T. Scheper; Langzeiteinsatz von Biosensorsystemen zur Überwachung industrieller Chromatographieprozesse; Chem.-Ing. Tech 72 (2000) 502-505

- [407] P. Sosnitzer, F. Irtel, R. Ulber, M. Busse, R. Faurie, L. Fischer, T. Scheper; Flow Injection analysis system for supervision of industrial chromatographic down stream processing in biotechnology; *Biosensors & Bioelectronics* 13 (1998) 1251-1255
- [408] S. Kikuchi, M. Ishimoto; D-Serine-dehydratase from *Klebsiella pneumoniae*; *J. Biochem.* 84 (1978) 1133-1138
- [409] W. Jacobsen; Untersuchungen zum D-Serin Katabolismus ausgewählter Mikroorganismen; Diplomarbeit; Universität Braunschweig (1995)
- [410] F. Wagner, J. Klein; Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Tryptophan; DE 2 841 642 (1980)
- [411] R. Faurie, G. Fries; From sugar beet to Lyphan; in T. Simat (Ed.): *Basic Aspects and Practical Applications*; *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Plenum Press New York (1999)
- [412] D. Solle; laufende Dissertation; Universität Hannover
- [413] Angaben der Amino GmbH (2000)
- [414] W. Kochen, H. Steinhart (Eds.); *The Tryptophan Case: An Overview*, T. Simat, H. Steinhart, W. Kochen; in: *L-Tryptophan Current Prospects in Medicine and Drug Safety*; Walter de Gruyter, Berlin (1994) 3-15
- [415] R. Ulber, C. Protsch, D. Sölle, B. Hitzmann, B. Willke, R. Faurie, T. Scheper; Use of bioanalytical systems for the improvement of industrial tryptophan production; *Engineering in Life Sciences* 1 (1) (2001) 15-17
- [416] C. Protsch; laufende Dissertation; Universität Hannover
- [417] J. Pressacco, D.W. Hedley; ICI-D1694 and idoxuridine – a synergistic antitumor combination; *Cancer Research* 54/14 (1994) 3772-3778
- [418] D.M. Reese, M. Corry, E.J. Small; Infusional floxuridine-based therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma; *CANCER* 88/6 (2000) 1310-1316
- [419] J.B. Reome, D.S. Johnston, B.K. Helmich, T. M. Morgan, N. Dutton-Swain, R.W. Dutton; The effects of prolonged administration of 5-bromodeoxyuridine on cells of the immune system; *Journal of Immunology* 165/8 (2000) 4226-4230
- [420] T. Aparicio, M. Ducreux, S. Chaussade; 5-fluorouracil: metabolism and current indications in digestive cancer treatment ; *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 26/1 (2002) 38-47
- [421] G.P. Connolly, J.A. Duley; Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials; *Trends Pharmacol. Sci.* 20/5 (1999) 218-225
- [422] M. Graßl; Cytidin-5'-diphosphat, Guanosin-5'-diphosphat und Uridin-5'-diphosphat; *Methoden der enzymatischen Analyse*; in: U. Bergmeyer, Band II, 2. Auflage, Verlag Chemie Weinheim (1970) 2071-2074
- [423] D. Schomburg, M. Salzmann, D. Stephan (Eds.); *Enzyme Handbook*; Springer Verlag, Heidelberg (1995)
- [424] S. Timur, A. Telefoncu, R. Faurie, F. Irtel, R. Ulber, T. Scheper; A novel affinity-sensor based on a copper-chelating affinity matrix for the specific uridine detection; *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 191-196
- [425] M. C. Lim, R. B. Martin; Coordination of Uridine and Adenosine to Pd(II) and Pt(II) Complexes; *J. Inorg. Nucl. Chem.* 38 (1976), 1915-1918
- [426] E. E. Kriss, K. B. Yatsimirskii ; *J. Inorg. Nucl. Chem.* 13 (1968) 2370
- [427] G. Kotowycz; Nuclear magnetic-resonance studies of nucleoside-metal and nucleotide-metal interactions; *Can. J. Chem.* 52 (1974) 924-929
- [428] P. R. Reddy, V. B. M. Rao; Metal Complexes of Uridine in Solution; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 5 (1986) 2331-2334
- [429] P. Ghosh, K. T. Mukhopadhyay, A. R. Sarkar; Interaction of divalent metal-ions with uracil; *Transition Met. Chem.* 9 (1984), 46-48
- [430] S. Arnold, T. Becker, A. Delgado; *Der virtuelle Essigmeister*; Sonderausgabe *Sensorik, Spektrum Akademischer Verlag* (2001) 56-60
- [431] T. Becker, V. Schneider, A. Delgado; *Ethanol-Messsystem für Brauereien*; Sonderausgabe *Sensorik, Spektrum Akademischer Verlag* (2001) 26-31
- [432] S. Meier, G.-C. Chemnitz, O. Shulga, T. Borchers, K. Cammann; *Multianalysensoren zur Vor-Ort-Qualitätsüberwachung von Gärprozessen*; Sonderausgabe *Sensorik, Spektrum Akademischer Verlag* (2001) 31-36
- [433] A.M. Thyer; Biocatalysis; *Chemical & Engineering News*; 21 (2001) 27-34
- [434] M. McCoy; Making drugs with little bugs; *Chemical & Engineering News* 21 (2001) 37-43
- [435] J.F. Tremblay; Japan's unique perspective; *Chemical & Engineering News* 21 (2001) 45-49
- [436] M. Jekel, A. Buhr, T. Willke, K.-D. Vorlop; Neuartige Geleinschlusssysteme (LentiKats) in der Biotechnologie; *Chemie Ingenieur Technik* 70/4 (1998) 438 – 441

- [437] LentiKats; Tips & Tricks; geniaLab Biotechnologie Produkte und Dienstleistungen GmbH, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany (2000)
- [438] F. Irtel; Aufbau und Test von Analysensystemen zur Detektion von Minor Components in Melasse; Diplomarbeit, Universität Hannover (1997)
- [439] P. Gemeiner; Enzyme Engineering, Immobilized Systems; Ellis Horwood New York (1992)