

Fraktionierung von Proteinen aus Molke mit adsorptiven Membranen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Technologie, Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Ulrich Kulozik/Dipl.-Ing. Linda Voswinkel
Industriegruppe:	Vereinigung zur Förderung der Milchwissenschaftlichen Forschung an der Technischen Universität München e.V., Freising Projektkoordinator: Dr. Hans Besner Unternehmensgruppe Theo Müller GmbH & Co. KG, Freising
Laufzeit:	2010 – 2012
Zuwendungssumme:	€ 327.600,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Die Fraktionierung und Isolierung biologisch aktiver Proteine und Peptide aus komplexen Rohstoffen wie Milch oder Molke ist eine wesentliche Voraussetzung für deren innovativen Einsatz, entweder aus Sicht der Biofunktionalität oder zur Gestaltung neuartiger Strukturen. Auf Grund der unterschiedlichen Ladungen einzelner Proteine und Peptide, bedingt durch deren unterschiedliche Zusammensetzung an Aminosäuren, kommt besonders die Ionenaustauschchromatographie (IEC) für deren Aufreinigung in Frage. Chromatographische Prozesse sind kostenintensiv, werden auf Grund höherer Wertschöpfung in der Pharmaindustrie aber dennoch als unit-operation eingesetzt. Die hohen Kosten resultieren daraus, dass herkömmliche Chromatographieprozesse langsamen intrapartikulären Diffusionsvorgängen der Moleküle in die Gelkugeln der Chromatographiesäulen unterliegen. Die hocheffizienten und sehr spezifisch wirkenden, aber dichten Gelpackungen erzeugen erhebliche Gegendrücke, welche hohe Ansprüche an die Anlagen stellen. Ein Einsatz dieser Chromatographieverfahren in der Lebensmittelindustrie ergibt neben ökonomischen Problemen deshalb oft zu geringe Durchsätze und zu langsame Prozessgeschwindigkeiten.

Bei dem Mitte der 90er Jahre entwickelten Verfahren der Membran-Adsorptions-Chromatogra-

phie (MAC) werden die Bindungsstellen der IEC an Stelle der Gelkugeln auf Membranen bzw. in die Membranporen von Mikrofiltrationsmembranen gekoppelt. Diese Hochdurchsatz-Chromatographie-Methode bietet eine Reihe von entscheidenden Vorteilen gegenüber konventionellen Chromatographiesäulen, insbesondere wesentlich höhere Flussraten und geringere Gegendrücke, was einen ökonomischen Einsatz in der Aufreinigung relevanter Biomoleküle aus Lebensmitteln ermöglichen könnte. Dennoch war diese Technologie in der Lebensmittelbranche noch kaum beachtet.

Eine Reihe von Inhaltsstoffen aus Molke (Laktoferrin, Immunglobulin (IgG), α -Laktalbumin (α -La), β -Laktoglobulin (β -Lg) oder Caseinomakropeptid (CMP) stellen aufgrund ihrer biofunktionellen Eigenschaften interessante Ziele zur Aufreinigung dar. Die Wertigkeit hochreiner Einzelfractionen liegt über der von Standardmolkenproteinprodukten. Molke wird zurzeit überwiegend zu flüssigem WPC, WPI und Molkenpulver weiterverarbeitet. Die Herstellung einzelner Proteinfractionen erfolgt häufig über aufwändige Prozesskaskaden (Membrantrenntechnik, Fällungsreaktionen, thermisches Koagulieren oder Zentrifugation). Oft kann kein natives Endprodukt hergestellt werden, so dass die angestrebte biologische Aktivität nicht mehr gegeben ist.

Ziel des Forschungsvorhabens war daher die Entwicklung und Optimierung eines neuen schonenden Verfahrens zur membranbasierten chromatographischen Fraktionierung relevanter Proteinfraktionen aus Sauer- und Süßmolke vom Labormaßstab bis hin zum technischen Maßstab.

Forschungsergebnis:

Um grundlegendes Wissen über die Fraktionierbarkeit aller wirtschaftlich interessanten Molkenproteine mit MAC zu erhalten, wurden als Zielproteine CMP, welches nur in Süßmolke enthalten ist, sowie α -La, β -Lg, Bovines Serumalbumin (BSA), IgG, Lf und Lactoperoxidase (LPO) untersucht. Letztere sind in Sauer- und Süßmolke enthalten.

Die Untersuchungen im Labormaßstab zur Fraktionierung von Proteinen aus Molke wurden mit einem Membranwickelmodul durchgeführt, dessen Bauart sich von dem im Pilotmaßstab unterscheidet. Während die Membrancharakteristika identisch sind, liegt der wesentliche Unterschied im Strömungsprofil des Moduls. Im Sartobind® nano-Modul, welches im Labormaßstab eingesetzt wurde, wird die Flüssigkeit in Folge einer Druckapplikation radial durch die Membranporen gezwungen. Es entsteht ein konvektiver Strom durch die poröse Membran. Dadurch kann es zwar zu Fouling und zur Porenverblockung kommen, der Vorteil dieser Bauweise ist aber, dass auch die funktionellen Gruppen innerhalb der Membranporen konvektiv angeströmt werden. Der Transport der Zielmoleküle zu den Liganden ist an der gesamten Oberfläche homogen und deshalb effektiv. Als Substrat wurde in allen Experimenten mikrofiltrierte Molke ($0,45 \mu\text{m}$) verwendet.

Eine Fraktionierung aller relevanten Proteine mit Anionen- und Kationentauschern wurde erfolgreich umgesetzt. Dabei haben die Adsorbermodule über die gesamte Zeit der Prozessentwicklung reproduzierbare Ergebnisse geliefert. Die dynamische Bindungskapazität (DBC) blieb selbst bei unregelmäßiger Säure-Lauge-Reinigung erhalten. Schließlich wurde ein Prozess für Sauermolke sowie ein ergänzender Schritt zur Gewinnung von CMP aus Süßmolke entwickelt. Bei Verwendung von Sauermolke wurde im ersten Schritt mittels Anionentauscher bei pH 7 β -Lg und BSA adsorbiert. Die austretende Molke, die kein β -Lg und BSA mehr enthielt, wurde auf pH 4,8 eingestellt. Im zweiten Schritt wurde sie

auf einen Kationentauscher gegeben. Hier wurden LPO, Lf und IgG gebunden, während α -La im Molken Serum verblieb. Durch schrittweise Steigerung der NaCl-Konzentration konnten die Proteine getrennt voneinander eluiert werden. Sollte CMP aus Süßmolke isoliert werden, musste die Leitfähigkeit der Molke auf $3 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ (mittels entmineralisiertem Wasser) reduziert und pH 4,9 eingestellt werden. Sowohl glyko- als auch aglyko-CMP adsorbierten in einem vorgeschalteten Anionentauscher-Schritt. Die Elution kann so erfolgen, dass das gesamte CMP in einer Fraktion vorliegt. Alternativ können mit zwei Schritten unterschiedlicher Ionenstärke eine reine gCMP-Fraktion und eine Mischphase gewonnen werden. Anschließend kann die Molke, die kein CMP mehr, sondern nur das Proteinspektrum der Sauermolke enthält, entsprechend dem vorher beschriebenen zweistufigen Prozess verarbeitet werden.

Da es aus logistischen Gründen meist vorteilhaft ist, mit Molkentrockenerzeugnissen zu arbeiten, wurde auch der Einsatz von Molkenproteinkonzentrat (WPC) und Molkenproteinisolat (WPI) untersucht. Bei Verwendung von Molkenkonzentraten kam es innerhalb kürzester Zeit zu einem irreversiblen Fouling, so dass das Labormodul nicht mehr einsatzfähig war. Diese Beobachtung wurde auf den nicht-nativen Zustand von Proteinen durch die thermische Belastung bei der Verarbeitung zu Pulvern zurückgeführt. Dieses Ergebnis wird durch Erkenntnisse aus dem im Jahr 2012 abgeschlossenen IGF-Vorhaben AiF 16300 N unterstützt. Dort wurde ebenfalls die erhöhte Reaktivität von denaturiertem Protein mit Membranfouling in Verbindung gebracht. Demzufolge ist es nicht empfehlenswert, mit teildenaturierten Molkenpulvern zu arbeiten. Es gibt weitere Gründe, die für flüssige Molke sprechen. Bei MAC handelt es sich um ein Hochdurchsatzverfahren, d.h. bei einem Bettvolumen von 1 L beträgt die Flussrate $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, wobei das Upscale linear ist. Eine Reduzierung des Volumens zugunsten einer kürzeren Prozesszeit ist also nicht notwendig. Außerdem soll MAC speziell für sensitive Stoffe eingesetzt werden, insofern sollte auch der Rohstoff die größtmögliche Nativität aufweisen. Nicht zuletzt ist die Verwendung von Pulvern auch aus ökonomischer Sicht fragwürdig, da für eine Fraktionierung das Pulver, welches vorher unter großem Energieaufwand getrocknet wurde, dieses wieder resuspendiert werden muss. Nach erfolgreicher Isolierung der einzelnen Proteine im Labormaßstab wurde dieser Prozess auf den technischen Maßstab (80-fach vergrößert) übertra-

gen. Dabei wurde untersucht, inwiefern sich ein solches MAC-Verfahren als Unit-Operation in der Milchverarbeitenden Industrie eignet. Bei der Bauweise des Pilot-MAC strömt die Molke axial durch die Spalten zwischen der gewickelten Membran, d.h. tangential entlang beider Seiten der Membran. Die Spaltbreite beträgt aufgrund eines Spacernetzes konstant 250 μm . Die Fraktionierungsergebnisse zeigten, dass es problemlos möglich ist, unbehandelte Molke zu verwenden. Die Bindungskapazität nahm über fünf Zyklen zwar minimal ab, konnte sodann nach einer Reinigung mit Säure und Lauge wiederhergestellt werden. Der Verlust an Bindungskapazität bei un behandelter Molke ist so gering, dass eine zusätzliche Prozessierung der Molke mittels Membranfiltration oder Zentrifugation aufgrund der zusätzlichen Prozesszeit und Ausstattung keinen Vorteil generiert.

Die Trenneffizienz und Bindungskapazität der hier verwendeten Sartobind®-direct capture-Membranadsorber war im Vergleich zu den Sartobind®-nano-Modulen schlechter aufgrund der unterschiedlichen Strömungsverhältnisse. Bei der tangential überströmten Membran trägt die innere Porenoberfläche nicht zur DBC bei. Des Weiteren kommt es aufgrund der Spaltbreite zu Vermischungsvorgängen, welche die Trennschärfe herabsetzen. Die direct capture-MA sind geeignet für Bind & Elute-Verfahren. Das bedeutet, dass ein einziges Zielprotein gebunden und eluiert wird. Eine Fraktionierung von mehreren Proteinfractionen durch schrittweise Elution führt bei der Adsorberbauweise mit tangentialer Überströmung zu unreineren Fraktionen als die radial durchströmten Adsorbermodule. Als mögliche Anwendung kann die Gewinnung von minoreren Komponenten, wie Lactoferrin, in Betracht gezogen werden. An einem 5 L-Modul können ca. 35 g Lf binden, wobei 1 t Molke ca. 100 g Lf enthält. In drei Bind & Elute-Schritten, die jeweils eine halbe Stunde dauern, kann somit in 90 min eine Tonne Molke verarbeitet werden. Eine weitere Einsatzmöglichkeit von direct capture ist die Reduktion des β -Lg-Gehalts in Molke, um die Wertigkeit als Babynahrung oder für allergenfreie Molke zu steigern. Aus 1 t Molke müssten 3,3 kg β -Lg entfernt werden. Dazu wären bei gegebener Bindungskapazität eines 5 L-Moduls 100 Bind & Elute-Schritte notwendig.

Grundsätzlich ergibt sich bei IEC-Prozessen die Frage, wie der Pufferbedarf reduziert werden kann. Die salzhaltigen Lösungen verursachen sowohl Kosten im Salzbedarf als auch in der Abwasserentsorgung. Dazu wurden Experimente

durchgeführt, das Elutionsmittel ohne Reinigungsschritt mehrfach zu verwenden. Das bietet sowohl den Vorteil, eine höhere Proteinkonzentration im Eluat zu erreichen als auch den Pufferbedarf zu minimieren. Das Konzept hat sich als anwendbar erwiesen, die Effizienz des Puffers nahm jedoch als Funktion der Rezirkulationszyklen ab. Das bedeutet, dass die Menge eluierten Proteins sank. In jedem Fall steigert das Pufferrecycling die Prozesseffizienz, da die eingesetzte NaCl-Menge ein Vielfaches der gewonnenen Proteinmenge darstellt.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Das Projekt liefert grundlegende, systematische Erkenntnisse zum Fraktionieren proteinhaltiger Lösungen am Beispiel Molke mit Hilfe einer neuartigen Technologie, welche ihre Ursprünge in der pharmazeutischen Industrie hat. Das Vorhaben leistet einen Beitrag zur technologisch-verfahrenstechnischen Realisierung eines in der Lebensmittelindustrie bisher nicht eingesetzten Verfahrens und stellt insbesondere weniger forschungsintensiven kleineren Unternehmen die notwendigen Kenntnisse zur Umsetzung des neuen Verfahrenskonzepte bereit.

Die deutsche Milchindustrie erwirtschaftet mit ca. 240 Unternehmen und 40.000 Mitarbeitern einen Gesamtjahresumsatz von 21,1 Mrd. €. Bezogen auf den Umsatz übertreffen nur 45 Unternehmen ein Volumen von 125 Mio. €/Jahr, 200 Unternehmen der Branche sind als kmU einzustufen.

Firmen des Anlagenbaus können auf der Basis der Ergebnisse und des erzielten Wissens zur präparativen gekoppelten Chromatographie bzw. Membranadsorbertechnologie neue Anlagen konzipieren bzw. auslegen. Zusätzlich sind die erhaltenen Ergebnisse auch in der Biotechnologie und der pharmazeutischen Industrie von Nutzen, in denen chromatographische Prozesse bereits als unit-operation eingesetzt werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2013.
2. Voswinkel, L. und Kulozik, U.: Fractionation of all major and minor whey proteins with radial flow membrane adsorption chromatography at lab and pilot scale. Intern. Dairy J. 39, 209-214 (2014).

3. Voswinkel, L. und Kulozik, U.: Membranbasierte Chromatographie zur Wertsteigerung von Süßmolke. Dt. Milchwirtschaft 7 (4), 225-227 (2013).
4. Voswinkel, L. und Kulozik, U.: Membrane based chromatography creates added value in sweet whey. Eur. Dair. Mag. 2 (25), 4-6 (2013).
5. Voswinkel, L. und Kulozik, U.: Molkenproteinfractionierung mittels Membranadsorptionschromatographie im Labormaßstab. Jahresbericht Milchwissen. Forsch. ZIEL Weihenstephan 2010, 118-121, ISBN 978-3-939182-34-4 (2011).
6. Voswinkel, L. und Kulozik, U.: Fractionation of whey proteins by means of membrane adsorption chromatography. Proc. 11th Intern. Congr. Engin. Food (ICEF), Vol. I, 381-382, ISBN 978-960-89789-3-5 (2011).
7. Voswinkel, L. und Kulozik, U.: Fractionation of whey proteins by means of membrane adsorption chromatography. Proc. 11th Intern. Congr. Engin. Food (ICEF), Proc. Food Sci.1, 900-907 (2011).
8. Voswinkel, L. und Kulozik, U.: Abreicherung von β -Lactoglobulin aus Molkenproteinisolat und -konzentrat mit Membranwickelmodulen zur Ionenaustauschchromatographie. Jahresbericht Milchwissen. Forsch. ZIEL Weihenstephan 2011, 110-112, ISBN 978-3-939182-43-6 (2010).

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
 Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
 Tel.: +49 228 3079699-0
 Fax: +49 228 3079699-9
 E-Mail: fei@fei-bonn.de

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
 Zentralinstitut für Ernährungs- und
 Lebensmittelforschung, Abt. Technologie
 Weihenstephaner Berg 1
 85350 Freising-Weihenstephan
 Tel.: +49 8161 71-4205
 Fax: +49 8161 71-4384
 E-Mail: ulrich.kulozik@wzw.tum.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

