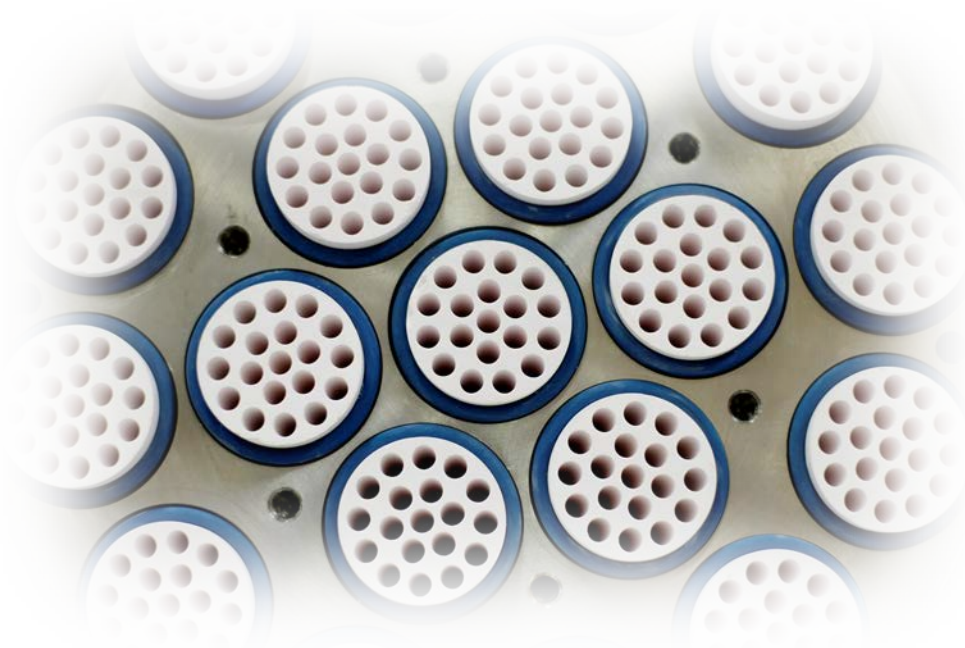


**Vielseitig nutzbare Schlüsseltechnologie:  
Gezielte Anreicherung spezifischer Proteinfractionen  
für den medizinischen und ernährungstherapeutischen Einsatz  
auf Basis eines neuen Mikrofiltrationsmembrankonzepts**



*Der Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) nominiert für ihre herausragenden Arbeiten auf dem Gebiet der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) folgende Wissenschaftler für den Otto-von-Guericke-Preis 2019:*

**Dipl.-Ing. Hans-Jürgen Heidebrecht  
Prof. Dr. Ulrich Kulozik**

Technische Universität München  
Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL)  
Abteilung Technologie  
Weihenstephaner Berg 1  
85354 Freising

Das IGF-Vorhaben 18818 N sowie die Vorläufer-Projekte 18553 N, AiF 16300 N und AiF 14740 N des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) wurden über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert. Allein 19 Unternehmen wirkten im Projektbegleitenden Ausschuss von AiF 18818 N mit; in allen vier Projekten waren insgesamt 47 Unternehmen vertreten. Der Milchindustrie-Verband e.V. und der VDMA-Fachverband Nahrungsmittel- und Verpackungsmaschinen e.V. unterstützten das Projekt AiF 18818 N als Industriegruppe.

## Zusammenfassung

Komplexe Lebensmittel wie Milch enthalten zahlreiche Einzelkomponenten, die in an- oder abgereicherter Form oder als Isolate für medizinische, ernährungstherapeutische oder technologische Zwecke genutzt werden können und damit die Wertschöpfung im Vergleich zum herkömmlichen Produkt signifikant steigern können. Ein maßgeblicher **branchenübergreifender Innovationstreiber** ist eine Anwendungsentwicklung, bei der durch eine Milchproteinfraktionierung spezifische Immunglobuline gewonnen werden, die für den Einsatz bei Antibiotika-Resistenzen genutzt werden können.

Die Milchproteinfraktionierung mittels Mikrofiltration effektiver und effizienter zu gestalten und damit neue Anwendungsfelder zu erschließen, stand im Fokus einer ganzen Reihe von erfolgreich abgeschlossenen IGF-Projekten zur Membrantrenntechnik auf Basis eines neuen Mikrofiltrationsmembrankonzepts – **mit dem finalen Projekt AiF 18818 N konnte schließlich das „Death Valley of Innovation“ überbrückt werden.** Im Ergebnis konnten über die Auswahl des Diafiltrationsmediums sowohl deutliche Verbesserungen in der Effizienz des gesamten Prozesses erreicht werden als auch Zielfractionen von hoher Funktionalität und Reinheit gewonnen werden.

Im Fokus der Milchindustrie steht die Suche nach wertschöpfenden Verarbeitungstechnologien und die **Erschließung neuer Anwendungsfelder** außerhalb der Lebensmittelverarbeitung. Insbesondere für kleine und mittelständische Unternehmen eröffnen sich hierdurch Möglichkeiten, neue Märkte zu erschließen. Mit den neuen Mikrofiltrationsmembranen ist es nun u.a. möglich, **spezifische Immunglobuline** aus der Milch abzutrennen und soweit anzureichern, dass sie für medizinische Zwecke und als Ersatz für Antibiotika eingesetzt werden können. Durch ein aktives Immunisieren der Kuh wird ihre Antikörperproduktion auf die Entwicklung der spezifischen Immunglobuline gerichtet, die wiederum für die orale passive Immunisierung von Menschen eingesetzt werden können.

Perspektivisch kann dieser **innovative Ansatz zur Entwicklung von Medikamenten auf Milchbasis** überall dort eingesetzt werden, wo es ein empfindliches Mikrobiom-Gleichgewicht gibt und dieses Gleichgewicht nicht mit unspezifischen Antibiotika zerstört werden soll. Der neue Ansatz ist erregerspezifisch und verändert daher nicht das natürliche Mikrobiom-Gleichgewicht. Weitere mögliche Anwendungen sind die Behandlung von anderen Magen-Darm-Erkrankungen, bakteriellen Hauterkrankungen oder von Karies.

Des Weiteren werden auf Grundlage der Projektergebnisse inzwischen Proteinisolate hergestellt, die in Säuglingsnahrung und medizinischen Applikationen bereits zum Einsatz kommen bzw. in Kürze kommen werden.

## 1. Chancen der Milchproteinfraktionierung

Komplexe Lebensmittel wie Milch enthalten zahlreiche Einzelkomponenten, die in an- oder abgereicherter Form oder als Isolate für medizinische, ernährungstherapeutische oder technologische Zwecke genutzt werden können und damit die Wertschöpfung im Vergleich zum herkömmlichen Produkt signifikant steigern können. Mit ganz verschiedenen Anwendungsentwicklungen erweist sich das Fraktionieren von Milch, Molke oder Eigelb und Eiklar in deren Bestandteile damit als ein maßgeblicher branchenübergreifender Innovationstreiber. Eine dieser Anwendungsentwicklungen bei der Milchproteinfraktionierung ist die Gewinnung von spezifischen Immunglobulinen, die für den Einsatz bei Antibiotika-Resistenzen genutzt werden können und auf die unter Punkt 4.2 und 4.3 näher eingegangen wird. Weitere Anwendungen sind das Abreichern von allergieauslösenden Proteinen ( $\beta$ -Lactoglobulin) in der Säuglingsnahrung, die Gewinnung von  $\alpha$ -Lactalbumin zur Therapie von Hauterkrankungen oder das Abtrennen von Caseinomakropeptid als Proteinquelle für die Ernährung von Patienten mit der Stoffwechselstörung Phenylketonurie.

## 2. Ausgangssituation und Ziele des Projekts

Die Milchproteinfraktionierung mittels Mikrofiltration effektiver und effizienter zu gestalten und damit neue

Anwendungsfelder zu erschließen, stand im Fokus einer ganzen Reihe von erfolgreich abgeschlossenen IGF-Projekten zur Membrantrenntechnik – mit dem finalen Projekt AiF 18818 N konnte schließlich das „Death Valley of Innovation“ überbrückt werden.

So war es ein großes Problem, dass es mit den konventionellen Membranen zu einer Deckschichtbildung auf der Membranoberfläche kommt. Diese Deckschicht verhindert den Durchgang der Zielfractionen durch die Membran – ein weder effektiver noch wirtschaftlich effizienter Gewinn der gewünschten Proteinfractionen war somit möglich. Auch bei Versuchen, durch Überströmung der Membran Reibungseffekte zu erzeugen, die einen Deckschichtabtrag bewirken sollen, ließ sich das Problem der Deckschichtbildung bislang nicht vermeiden. Ursache hierfür ist eine ungleichmäßige transmembrane Druckdifferenz und infolgedessen örtlich unterschiedlich intensive Deckschichtbildungen entlang der Membran. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Membrankonzepte entwickelt, mit denen festgestellt werden konnte, worin die Ursache für die unzureichende Membrantrennleistung liegt. Das Ergebnis war, dass die Deckschicht nur mit Membranen besser beherrscht werden kann, die eine übermäßig starke Deckschichtbildung in weiten Bereichen der Membran verhindert.

Zur vollständigen Trennung der Zielfractionen wird die Mikrofiltration im Diafiltration-Modus betrieben, mit dem Ziel, die Molkenproteine aus der Milch auszuwaschen und eine möglichst hohe Ausbeute zu erreichen. Zur Auswaschung wird hierbei häufig aufbereitetes Frischwasser als Diafiltrationsmedium verwendet. Ziel des



IGF-Projektes AiF 18818 N war es, unterschiedliche Effekte der Verwendung alternativer Diafiltrationsmedien auf den Filtrationsvorgang selbst, auf Prozesskosten und auf Funktionalität und Reinheit der Zielfractionen zu beleuchten und damit neue Proteinfractionen abtrennbar zu machen, die vorher durch die Membran zurückgehalten wurden.

*Abbildung 1: Mikrofiltrationsanlage im ZIEL-Technikum der TU München: Dipl.-Ing. Hans-Jürgen Heidebrecht, Doktorand in der Arbeitsgruppe Membrantrenntechnik von Prof. Dr. Ulrich Kulozik.*

### 3. Erkenntnisgewinn und technische Lösung

Um der beschriebenen Deckschichtbildung entgegenzuwirken, wurden Membrankonzepte auf Basis keramischer Membranen entwickelt, die zum Filtrationsbeginn ein Überschießen des Filtratstroms und die effizienz-mindernde Deckschichtbildung insbesondere in den vorderen Bereichen der Membran vermeiden – dort, wo die Transmembrandruckdifferenz noch sehr hoch ist. Aus den Untersuchungen ging hervor, dass für einen optimalen Fluss und Massentransport durch die Membran die initiale Filtrationsphase entscheidend ist. Das hängt damit zusammen, dass sofort nach dem Umschalten von Wasser auf Milch Proteinpartikel auf der Membranoberfläche abgelagert werden. Bei herkömmlichen Membranen wird zwar ein anfänglich hoher Filtratstrom erreicht, aber dadurch auch die Deckschichtbildung intensiviert, sodass es über den gesamten Produktionszyklus zu einem schlechteren Filtrationsergebnis kommt. Die entwickelten Membrantypen waren dagegen so gestaltet, dass sie höhere Membranwiderstände aufwiesen. Mit diesen Membranen lässt sich das Überschießen des Filtratstroms und der Deckschichtbildung unmittelbar nach dem Filtrationsbeginn verringern. Mit anderen Worten: Es lässt sich die Längenabhängigkeit der Deckschichtbildung vermeiden; der Filtratstrom wird gleichmäßig und auf das Maß begrenzt, das zur gezielten Abtrennung von Wertstoffen erforderlich ist.

Im Ergebnis des IGF-Projektes AiF 18818 N konnten über die Auswahl des Diafiltrationsmediums sowohl deutliche Verbesserungen in der Effizienz des gesamten Prozesses erreicht werden als auch Zielfractionen von hoher

Funktionalität und Reinheit gewonnen werden. In Abhängigkeit der – je nach gewünschter Anwendung – unterschiedlichen Zielkomponenten (z.B. Immunglobuline,  $\beta$ -Lactoglobulin) lässt sich nun durch Wahl des passenden Diafiltrationsmediums eine vollständige Abtrennung erreichen – bei deutlich gesteigerter Filtrationsgeschwindigkeit.

## 4. Umsetzung in die betriebliche Praxis und wirtschaftlicher Nutzen

### 4.1 Markteinführung der keramischen Mikrofiltrationsmembranen

Der Rückschluss war, keramische Membranen so herzustellen, dass sie einen höheren Membranwiderstand aufweisen, realisiert durch eine dickere Selektivschicht an deren Oberfläche. Dadurch wird die initiale Deckschichtbildung minimiert und das Filtrationsergebnis verbessert. Dieses neue Membrankonzept wurde im Anschluss an die IGF-Arbeiten in Zusammenarbeit mit dem mittelständischen Membranhersteller atech innovations GmbH bis zur Marktreife weiterentwickelt und ist inzwischen kommerziell verfügbar: Diese keramischen Mikrofiltrationsmembranen werden bereits von Unternehmen des Maschinen- und Anlagenbaus eingesetzt, die ihre Mikrofiltrationsanlagen an milchverarbeitende Unternehmen vertreiben. Im Jahr 2017 haben allein in Deutschland 204 Betriebe über 31 Mio. to Milch verarbeitet.

### 4.2 Innovativer Ansatz zur Behandlung von bakteriellen Infektionen durch multiresistente Keime

Im Fokus der Milchindustrie steht die Suche nach wertschöpfenden Verarbeitungstechnologien und die Erschließung neuer Anwendungsfelder außerhalb der Lebensmittelverarbeitung. Insbesondere für kleine und mittelständische Unternehmen eröffnen sich hierdurch Möglichkeiten, neue Märkte zu erschließen.

Durch die bessere Beherrschung der Deckschichtbildung und die Möglichkeit, Zielfractionen von hoher Funktionalität und Reinheit zu gewinnen, ist es mit den neuen Mikrofiltrationsmembranen nun möglich, spezifische Immunglobuline aus der Milch abzutrennen und soweit anzureichern, dass sie für medizinische Zwecke und als Ersatz für Antibiotika eingesetzt werden können. Dies war vorher nicht möglich, da diese im Verhältnis zu den anderen Molkenproteinen sehr viel größer sind und durch die Deckschicht zurückgehalten wurden. Die gewonnenen Immunglobuline bzw. Antikörper können zur Behandlung von bakteriellen Infektionen durch multiresistente Keime eingesetzt werden.

Als Pilotanwendung wurde dabei ein Produkt zur Behandlung von *Clostridium-difficile*-Infektionen (CDI) hergestellt und dessen Effektivität im Tiermodell verifiziert. *Clostridium difficile* ist einer der häufigsten sogenannten Krankenhauskeime. Weil Antibiotika im Gegensatz zu den Antikörpern unspezifisch sind, inaktivieren sie nicht nur *Clostridium difficile*, sondern führen auch zu einer Zerstörung des Darmmikrobioms, so dass die Antibiotikaresistenten Sporen nach Absetzen der Therapie erneut auskeimen und die Krankheit erneut auftritt und häufig tödlich endet. Eine orale Therapie mit spezifischen Immunglobulinen könnte zukünftig für viele Erkrankte die

einzigste Chance sein. Das grundlegende Prinzip bei der Herstellung des Therapeutikums besteht darin, Kühe mit inaktivierten humanen Pathogenen (in der Pilotanwendung *Clostridium difficile*) und inaktivierten Toxinen zu immunisieren. Dies schadet der Kuh nicht; sie bildet daraufhin Antikörper, die für diese Antigene spezifisch sind (Abb. 2) und gibt diese in die Milch ab. Dabei wird das natürliche Immunsystem des Tieres spezifisch funktionalisiert.

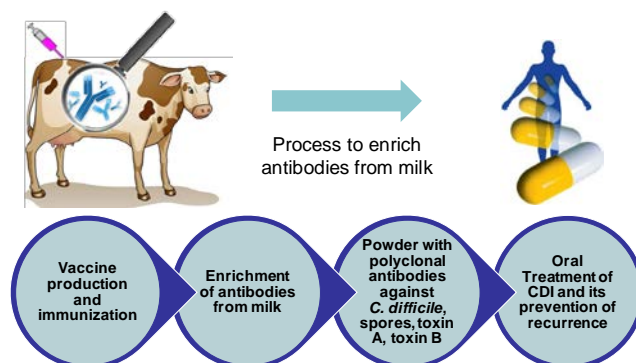


Abbildung 2: Alternativer Ansatz zur Behandlung von *Clostridium-difficile*-Infektionen.

Durch dieses aktive Immunisieren der Kuh wird ihre Antikörperproduktion auf die Entwicklung der spezifischen Immunglobuline gerichtet, die wiederum für die orale passive Immunisierung von Menschen eingesetzt werden können. In diesem Anwendungsfall ist das fertige Produkt ein getrocknetes Anti-CD-Molkenproteinisolat, das für den Menschen zusätzlich magen- und darmsaftresistent verkapselt wird. Im Anschluss an das IGF-Projekt wurde dieses Präparat im Pilotmaßstab hergestellt und erfolgreich *in vitro* und *in vivo* in Tierstudien eingesetzt.

Basierend auf den vielversprechenden präklinischen Daten wird aktuell eine großangelegte klinische Humanstudie vorbereitet, die im Sommer 2019 starten soll. Dafür wurden externe Partner gewonnen, mit denen es möglich ist, die Studie gemäß der regulatorischen Anforderungen einer guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practices (GMP)) von pharmazeutischen Wirkstoffen umzusetzen.

#### **4.3 Einschätzung des Bedarfs und des Marktpotentials für die Gewinnung von Immunglobulinen als Basis für das weltweit erste Medikament auf Milchbasis**

Nach Schätzungen werden die weltweiten Arzneimittelausgaben für CDI-Behandlungen von 752 Mio. US-Dollar im Jahr 2016 auf voraussichtlich 1,316 Mrd. US-Dollar bis Ende 2025 steigen. Noch beunruhigender ist die wachsende Anzahl der Todesfälle, die in den USA auf *Clostridium difficile* zurückzuführen sind, die sich in den letzten 10-15 Jahren auf ca. 30.000/Jahr verzehnfacht hat. Die Zahlen in Europa sind weniger gut dokumentiert, werden aber ähnlich hoch geschätzt. Hauptgrund für diesen Anstieg ist der zu hohe und zu häufige Einsatz von Antibiotika und damit verbunden die Zerstörung des Darmmikrobioms, insbesondere bei älteren Menschen. Paradoxe Weise wird eine CDI, die durch Antibiotika-Gabe aufgrund von Vorerkrankungen induziert wird, auch standardmäßig mit der Verabreichung von Antibiotika therapiert. Obwohl die unmittelbare Reaktion auf die Behandlung von CDI in der Regel gut ist, ist das Hauptproblem die fortgesetzte Zerstörung der bereits geschädigten gastrointestinalen Mikrobiota, wodurch die Patienten anfällig für eine Reinfektion werden. Folglich entwickeln bis zu 30 % der Patienten innerhalb von zwei Monaten nach Absetzen der Antibiotika-Behandlung erneut eine *Clostridium-difficile*-Infektion. Die Häufigkeit mehrfacher Rezidive (Wiedererkrankungen) mit Todesfolge steigt nach dem zweiten Rezidiv auf 50-65 % (Sartelli et al. 2015). Die hohe Rezidivrate stellt ein bisher ungelöstes Gesundheitsproblem dar. Es besteht daher ein dringender Bedarf für alternative Behandlungen ohne den Einsatz von Antibiotika, um sowohl die zunehmende Anzahl von CDI-Fällen als auch die zunehmende Schwere der Erkrankungen in den Griff zu bekommen.

Der hier beschriebene und im Rahmen der Industriellen Gemeinschaftsforschung entwickelte Forschungsansatz zur Gewinnung der spezifischen Immunglobuline – die Immunisierung der Kuh und die anschließende gezielte Anreicherung über einen Mikrofiltrationsprozess unter Einsatz neuartiger Membranen als Schlüsseltechnologie – ist ein Vorreiterprojekt, mit dem erfolgreich ein pathogenspezifisches Präparat entwickelt wurde, das gleichzeitig zur primären Behandlung von *Clostridium-difficile*-Infektionen als auch zur Prävention der Wiedererkrankungen eingesetzt werden kann. Bislang existiert weltweit noch kein Medikament zur nachhaltigen Behandlung von CDI-Infektionen.

Perspektivisch kann dieser innovative Ansatz zur Entwicklung von Medikamenten auf Milchbasis überall dort eingesetzt werden, wo es ein empfindliches Mikrobiom-Gleichgewicht gibt und dieses Gleichgewicht nicht mit unspezifischen Antibiotika zerstört werden soll. Der neue Ansatz ist erregerspezifisch und verändert daher nicht das natürliche Mikrobiom-Gleichgewicht. Weitere mögliche Anwendungen sind neben der oralen Behandlung von CDI die Behandlung von anderen Magen-Darm-Erkrankungen, bakteriellen Hauterkrankungen oder von Karies.

Als weiteres Beispiel stellt die Müller Service GmbH auf Grundlage der Projektergebnisse inzwischen Proteinisolate her, die in Säuglingsnahrung und medizinischen Applikationen teils bereits zum Einsatz kommen bzw. teils in Kürze kommen werden. Dies schließt die Fraktionierung von  $\beta$ -Lactoglobulin für humanmilchangenäherte Säuglingsnahrung, die Gewinnung von  $\alpha$ -Lactalbumin zur Therapie von Hauterkrankungen oder das Abtrennen von Caseinomakropeptid als Proteinquelle für die Ernährung von Patienten mit der Stoffwechselstörung Phenylketonurie ein.

## 5. Wirksame Maßnahmen zum Ergebnistransfer

Die Forschungsergebnisse und die Anwendungsfelder wurden in deutsch- und englischsprachigen **Fachzeitschriften, in Jahresberichten und auf den Websites** des FEI und der Forschungsstellen publiziert und branchenweit bekannt gemacht; eine Auswahl findet sich hier:

**Heidebrecht, H.-J., Toro-Sierra, J., Kulozik, U., (2018):** Concentration of Immunoglobulins in Microfiltration Permeates of Skim Milk. Impact of Transmembrane Pressure and Temperature on the IgG Transmission Using Different Ceramic Membrane Types and Pore Sizes. *Foods* 7 (7), online access

**Heidebrecht, H.-J., Kulozik U. (2018):** Fractionation of casein micelles and minor proteins by microfiltration in diafiltration mode Study of the transmission and yield of the immunoglobulins IgG, IgA and IgM. In: *International Dairy Journal*, Vol. 93 1-10

**Heidebrecht, H.; Weiss, William; Pulse, Mark; Lange, A.; Gisch, K.; Kliem, H. et al. (2019):** Treatment and prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection with functionalized bovine antibody-enriched whey in a hamster primary infection model. In: *Toxins (Basel)* 11 (2).

**Heidebrecht, H.-J., Kulozik, U.:** Milchproteinfraktionierung mittels Mikrofiltration: Möglichkeiten zur Verbesserung der Filtrationseffizienz mit keramischen Membranen - Teil 1, *molkerei-industrie* 2017, Vol. 2, 30-32

**Heidebrecht, H.-J., Reitmaier, M., Meyer, P., Kulozik, U.:** Milchproteinfraktionierung mittels Mikrofiltration: Verwendung von Prozessnebenströmen als Diafiltrationsmedium - Teil 2, *molkerei-industrie* 2017, Vol., 26-29

**Hartinger, M., Heidebrecht, H.-J., Arndt, F., Nirschl, H., Kulozik, U.:** Milchproteinfraktionierung mittels Mikrofiltration: Welche Aussagekraft hat die Porengröße bei der Filtration mit polymeren Mikrofiltrationsmembranen? - Teil 3, *molkerei-industrie* 2017, Vol. 4, 51-53

**Hartinger, M., Heidebrecht, H.-J., Arndt, F., Nirschl, H., Kulozik, U.:** Milchproteinfraktionierung mittels Mikrofiltration: Eine Methode zur besseren anwendungsbezogenen Charakterisierung von Membranen? - Teil 4, *molkerei-industrie* 2017, Vol. 5, 22-23

**Heidebrecht H.-J., Arndt, F., Schork, N., Schuhmann, S., Guthausen, G., Nirschl, H., Kulozik, U.:** Milchproteinfraktionierung mittels Mikrofiltration: In-situ-Untersuchung der Deckschichtbildung auf Hohlfaser und Mehrkanalrohrmembranen - Teil 5, *molkerei-industrie* 2017, Vol. 6, 41-43

**Reitmaier, M., Heidebrecht, H.-J., Kulozik, U.:** Milk protein fractionation by means of microfiltration: Influence of preconcentration and diafiltration medium - part 1. *International Dairy Magazine* 2017, Vol. 8, 16-19

Ebenso erfolgte eine Vorstellung der Ergebnisse auf **zahlreichen Tagungen, Fachkongressen und Seminaren**, darunter: Euromembrane (Aachen, 2015 und Valencia, 2018); 10th International Congress on Membrane and Membrane Processes (ICOM2014; Suzhou, China, 2014); 29th EFFoST International Conference (Athen, 2015 und 18th IUFOST World Congress of Food Science and Technology (Dublin, 2016).

Der Milchindustrie-Verband e.V. und der VDMA-Fachverband Nahrungsmittel- und Verpackungsmaschinen e.V. waren als projektbeteiligte Wirtschaftsverbände bereits während der Forschungsarbeiten als **Multiplikatoren für den breitenwirksamen Ergebnistransfer** tätig.