

Magnetseparation im Dienste der Biotechnologie

M. Franzreb, ITC

Einleitung

Mit dem Verfahren der Magnetseparation sind in der Regel Assoziationen wie Erzaufbereitung, Mineralgewinnung oder Abfallrecycling verbunden. Dieser Artikel soll veranschaulichen, dass moderne Magnetseparationsverfahren auch in der Biotechnologie das Potential für vielfältige Anwendungsbereiche besitzen und sogar gegenüber bisher üblichen Verfahren Vorteile bieten. Mit seinen Erfahrungen zum Einsatz der Magnettechnologie in der Wasserreinigung, zum Ionenaustausch, zur Synthese und Charakterisierung magnetischer Nanomineralien sowie zur Mikrobiologie bearbeitet der Bereich Wasser- und Geotechnologie des Instituts für Technische Chemie seit ca. vier Jahren dieses bisher wenig untersuchte aber zukunftsweisende Forschungsfeld.

Erste Arbeiten zum Einsatz magnetischer Materialien und Handhabungstechniken in der Biotechnologie finden sich in den 1970er [1, 2]. Darin wird die Herstellung magnetischer Enzymträger sowie magnetischer Sorbenspartikel beschrieben, die in der Lage sind bestimmte Biomoleküle mit hoher Selektivität aufzunehmen. Gegen Ende der 1970er folgen mit Magnogel, Dynabeads und Estapor M auch die ersten kommerziell erhältlichen magnetischen Mikrosorbentien. Deren Anwendungsgebiete sind bisher jedoch ausschließlich im Bereich der Bioanalytik, der medizinischen Diagnostik sowie der Zellseparation zu finden. Zusammen mit Arbeitsgruppen der Universität Stuttgart, der

Dänischen Technischen Universität in Lyngby bei Kopenhagen sowie den Firmen chemagen Biopolymer-Technologie AG und Steinert Elektromagnetbau ist es das Ziel der Arbeitsgruppe „Magnettechnologie“ am ITC-WGT neben einer Weiterentwicklung magnetischer Sorbentien deren Anwendung auf die technische Biokatalyse und Bioproduktaufreinigung auszudehnen. Im Folgenden werden neben magnetischen Trägermaterialien und Sorbentien Beispiele zur DNA-Separation, Biokatalyse und Bioproduktaufbereitung dargestellt.

Magnetische Trägermaterialien und Sorbentien

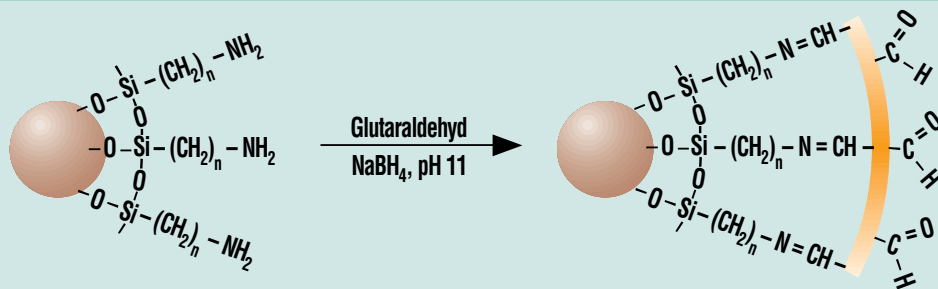
Da fast alle biologischen Substanzen diamagnetische Eigenschaften besitzen, sie also von einem Magneten nur sehr schwach abgestoßen werden, ist eine direkte Nutzung von Magnetfeldern zu ihrer Handhabung praktisch ausgeschlossen. Um magnetische Verfahren in der Biotechnologie anzuwenden, ist es daher notwendig biologische Objekte wie Enzyme, Proteine, Viren oder Zellen an magnetische Sorbenspartikel zu binden [3]. Diese Bindung kann z.B. bei der Immobilisierung von Enzymen irreversibel erfolgen. In der Regel wird aber eine reversible Bindung angestrebt, die zum einen stark genug ist, um eine ausreichende Selektivität für die Zielsubstanz zu erreichen, und zum anderen durch eine Änderung der Milieubedingungen wieder vollständig gelöst werden kann. Den magnetischen Sorbenspartikeln kommt damit eine Schlüsselrolle zu und am An-

fang der Entwicklung jedes auf Magnettechnologie basierenden Verfahrens in der Biotechnologie steht die Suche nach geeigneten Partikeln. Im Erläuterungskasten findet sich ein Beispiel für eine von ITC-WGT und seinen Kooperationspartnern adaptierte und optimierte Herstellungsmethode für hochselektive magnetische Mikrosorbentien.

Im Prinzip sind magnetische Mikrosorbentien mit einer hohen Vielfalt an funktionellen Oberflächengruppen und streng definierten mechanischen und magnetischen Eigenschaften bereits kommerziell erhältlich. Unter Bezeichnungen wie Dynabeads, MACS Microbeads oder BioMag werden magnetische Sorbenspartikel im Größenbereich von ca. 100 nm bis hin zu wenigen Mikrometern von Firmen wie Dynal, Miltenyi oder Perseptive Biosystems angeboten. Die Palette erhältlicher funktioneller Oberflächengruppen umfasst u.a. Amin-, Carboxyl- oder auch chelatbildende Gruppen. Der technische Einsatz dieser Partikel für eine Umwandlung oder Separation biologischer Produkte scheidet derzeit aber an ihrem extrem hohen Preis von oftmals 100 – 300 Euro pro Gramm. Dieser Preis resultiert jedoch nicht aus den benötigten Grundsubstanzen oder Fertigungstechniken, sondern aus einer rein manuellen Produktion im Maßstab weniger Gramm und zum Teil aus den sehr hohen Qualitätsanforderungen für medizinisch genutzte Produkte. Beispiele aus der Pigment- oder Kosmetikindustrie zeigen, dass beschichtete magnetische Mikropartikel zu einem

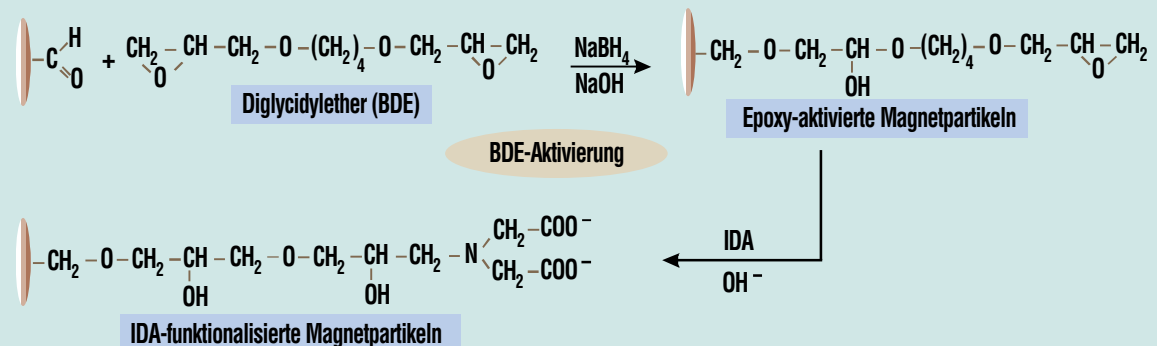
Herstellung magnetischer Sorbentien mit Chelatliganden

Als Ausgangssubstanz für die Herstellung dienen mit einem Aminosilanpolymer gecoatete Ferritkristalle von ca. 1 µm Durchmesser. Zur weiteren Erhöhung der Stabilität dieser Partikel und zur Verbesserung der Korrosionsbeständigkeit werden die Partikel mit einer zweiten Polymerschicht aus Polyglutaraldehyd gecoatet.



Als Ergebnis liegen stabile magnetische Trägerpartikel mit endständigen Aldehydgruppen bereit, die für die Immobilisierung gängiger Affinitätsliganden verwendet werden können.

Ein Beispiel ist die Einführung chelatbildender Iminodiacetatgruppen (IDA) über ein bifunktionelles Oxiran (1,4-Butandiol-Diglycidylether).



Bruchteil dieses Preises erzeugt und vertrieben werden können.

Einsatz moderner Magnettechnologie zur Automatisierung bioanalytischer Tests

Der Einsatz magnetischer Mikrosorbentien in Kombination mit Magnettrenntechnologie stellt im Labormaßstab eine bekannte Technik im Rahmen bioanalytischer Tests dar [4, 5]. Abb. 1 zeigt schematisch die Arbeitsschritte der Abtrennung biologischer Substanzen mit Hilfe magneti-

scher Sorbentien im Millilitermaßstab.

Die Anwendungen im Labormaßstab umfassen unter anderem die Isolierung von Proteinen und Nucleinsäuren, Verfahren zur Zellsortierung und Zelltypisierung sowie Immunoassays. Die Abtrennung der magnetischen Partikel erfolgt dabei mit einfachen Permanentmagnetanordnungen, sogenannten magnetischen Racks. Im Hinblick auf eine Automatisierung und Parallelisierung der Verfahren tritt hierbei jedoch das Problem auf, dass nach der

ersten Abtrennung die für die folgenden Wasch- und Elutionschritte benötigte Resuspendierung der am Gefäßrand gebildeten Pellets nur schwer und oft unvollständig möglich ist. In Zusammenarbeit mit der Firma chemagen Biopolymer-Technologie AG wurde daher am ITC-WGT ein Konzept entwickelt, das nicht nur eine parallele Abtrennung magnetischer Mikropartikel aus bis zu 96 Proben erlaubt, sondern auch eine sehr rasche und effiziente Resuspendierung. Das Volumen der zu behandelnden Pro-

ben kann dabei zwischen 10 µL bis 50 mL variieren [6].

Die Abtrennung der Magnetpartikel wird nicht durch Permanentmagneten erreicht, sondern durch Metallspitzen, die in die Probengefäße eintauchen und durch einen äußeren Elektromagneten aufmagnetisiert werden (siehe Abb. 2). Anschließend werden die Magnetpartikel mit Hilfe der Spitzen in ein neues Gefäß mit Wasch- oder Elutionslösung überführt und durch eine schnelle Rotation der Spitzen (ca. 2000 U/min) schnell und intensiv eingemischt. Damit ist z. B. eine DNA-Abtrennung aus 96 Proben in weniger als 20 Minuten möglich, wobei die gewonnene DNA anschließend weiterverarbeitet werden kann. Mit mehr als 4000 Probenaufbereitungen pro Tag stellt das Gerät ein Hochdurchsatzmodul für umfangreiche Screening- oder Qualitätskontrollaufgaben dar.

Einsatz in der Biokatalyse

Biokatalytische Verfahren spielen in der Biotechnologie eine herausragende Rolle. Der Einsatz der Biokatalysatoren, der Enzyme, erfolgt dabei entweder in gelöster Form oder als immobilisierte, d.h. auf einem Träger fixierte, Verbindung. Die Vorteile immobilisierter Enzyme sind (i) eine leichte Rückgewinnbarkeit aus durchmischten Systemen, (ii) die Möglichkeit einer kontinuierlichen Betriebsführung im Festbett und (iii) eine meist verbesserte Langzeitstabilität [7]. Als Trägermaterial werden heute meist makroporöse Partikel mit hoher in-

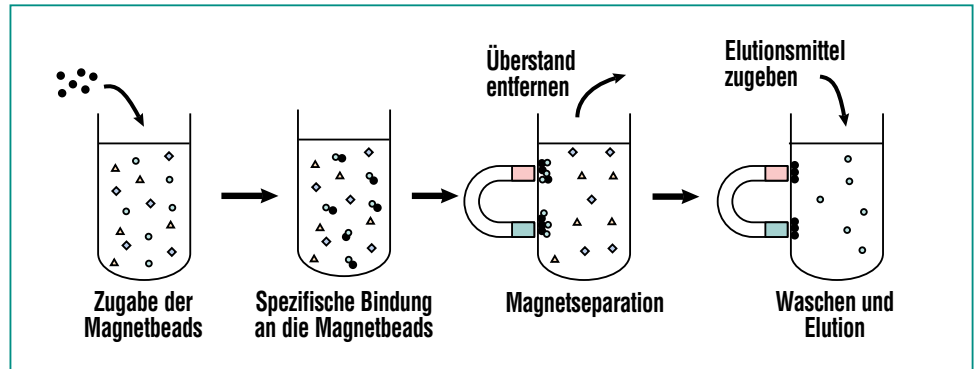


Abb. 1: Prinzip der Magnettrenntechnologie für biologische Substanzen im Milliliter-Maßstab.



Abb. 2: In Zusammenarbeit mit ITC-WGT entwickelter Hochdurchsatz DNA-Separator der Firma chemagen Biopolymer-Technologie AG.

tere Oberfläche von ca. 1 mm Durchmesser eingesetzt. Zahlreiche industriell relevante Ausgangsprodukte für biokatalytische Umsetzungen, besitzen jedoch eine schlechte Wasserlöslichkeit und werden daher oft in Form feinpartikulärer Suspensionen eingesetzt. Beispiele für der-

artige Substrate sind synthetische Aminosäuren als Seitenketten semisynthetischer Penicilline, chirale Bausteine für Pharmazeutika oder verschiedene Herbizide. Aufgrund der Gefahr einer allmählichen Verstopfung der Poren von Trägermaterialien werden biokatalytische Verfahren für die-

se Substanzen in der Regel mit freien Enzymen durchgeführt, wodurch die Prozesse jedoch oft wenig nachhaltig und unwirtschaftlich sind.

Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems ist die Verwendung kompakter magnetischer Mikropartikel, so dass eine Immobilisierung der Enzyme nur an der äußeren Partikeloberfläche stattfindet. Um nach dieser Methode jedoch eine ausreichende Menge Enzym pro Gramm Trägermaterial zu binden sind sehr geringe Partikelgrößen von nur ca. einem Mikrometer notwendig (siehe Abb. 3).

Die nach Abschluß der biokatalytischen Reaktion notwendige Abtrennung und Rückgewinnung der magnetischen Trägerpartikel incl. der immobilisierten Enzyme erfolgt mit Hilfe sogenannter Hochgradienten-Magnetseparatoren kurz HGMS (siehe auch Nachrichten 1/2001). In Abb. 4 wird das Vorgehen kurz skizziert. Zunächst wird das Substrat in einen Biokatalysereaktor gepumpt. Hierbei durchströmt die Substratlösung einen inaktiven Magnetseparator, in dem mit Enzymen

beladene Magnetpartikel vorliegen, so dass diese Magnetbeads mit der Substratlösung in den Batchreaktor gespült werden und im Verlauf des anschließenden Batchbetriebs eine Bioreaktion hervorrufen. Hat die Reaktion ihr Optimum erreicht, wird die Produktlösung samt der suspendierten Magnetbeads durch den nun aktivierten Magnetseparator aus dem Bioreaktor gepumpt. Dadurch werden die Magnetpartikel einschließlich der immobilisierten Enzyme vollständig im Separator zurückgehalten. Andere Feststoffe, wie z.B. Fasern oder unlösliches Substrat bzw. Produkt passieren aufgrund ihrer unmagnetischen Eigenschaften den Separator dagegen weitestgehend ungehindert.

Einsatz in der Bioproduktaufbereitung

Die oftmals geringen Ausbeuten und hohen Kosten heutiger biotechnologischer Produktionsprozesse rühren u. a. daher, dass die Herstellung und Aufreinigung der Produkte über viele diskrete Ver-

fahrensschritte erfolgt, die jeder nur eine oder wenige Funktionen, wie z.B. Filtration, Aufkonzentrierung, Sorption u.s.w., erfüllen. Die Zunahme biotechnologisch erzeugter Produkte, wie z.B. Pharmazeutika aus gentechnologisch modifizierten Zellstämmen, verlangt nach neuen Wegen zu einer schnelleren und kostengünstigeren Produktion. Dazu kann man mehrere diskrete Aufreinigungsschritte zu neuen innovativen Prozessen zusammenzufassen. Einer dieser Ansätze führt den Prozess mit magnetischen Sorbentien in Kombination mit Magnettechnologie durch [8,9]. Die Bioproduktaufreinigung erfolgt dabei im Prinzip nach dem in Abb. 1 vorgestellten Schema, jedoch in einem automatisierten, wesentlich größeren Maßstab.

Abb. 5 zeigt das Schaltbild sowie ein Foto eines Prototyps eines solchen Aufreinigungssystems für Bioprodukte, dessen Kernstück ein schaltbarer Permanentmagnet (siehe dazu [10]) bildet. Man erkennt dessen gelbes Eisenjoch und im Luftspalt die Filterkammer, in der sich die Ab-

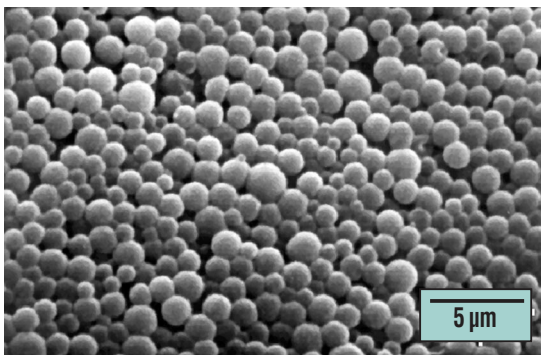


Abb. 3: Magnetische Polyvinylalkohol Mikropartikel der Firma chemagen Biopolymer-Technologie AG.

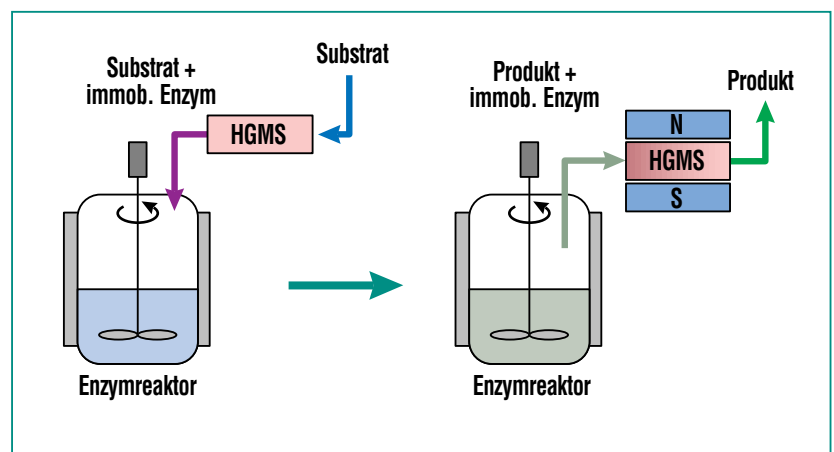


Abb. 4: Prinzip der Biokatalyse mit auf magnetischen Mikropartikeln immobilisierten Enzymen und Magnetseparatoren (HGMS).

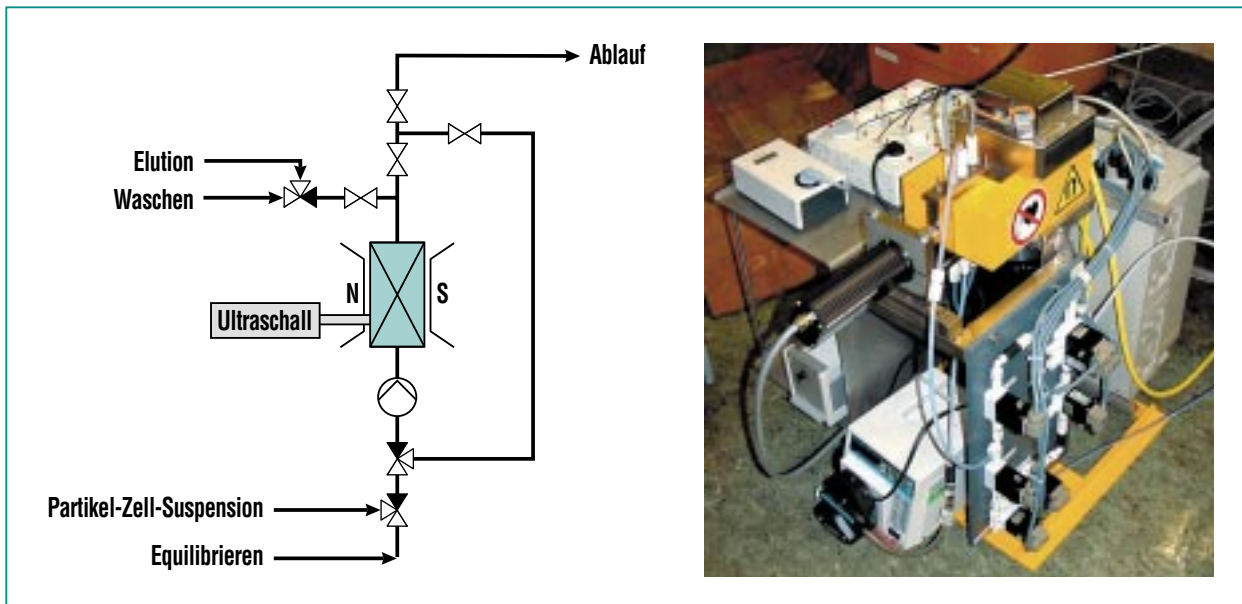


Abb. 5: Prototyp eines auf Magnettechnologie basierenden Aufreinigungssystems für Bioprodukte.

scheidematrix befindet. Die Filterkammer ist noch mit einem Ultraschall-Processor versehen, der die Wiedergewinnung der separierten Partikeln in der Rückspülphase verbessert.

Zur Demonstration der Leistungsfähigkeit des Verfahrens wurde im Rahmen eines von der

Deutschen Bundesstiftung Umwelt geförderten Projekts [11] in Zusammenarbeit mit dem Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart die primäre Aufreinigung eines Green Fluorescence Proteins (GFP) aus rohem *E.Coli* Homogenisat durchgeführt. Die Ergebnisse der Aufreinigung zeigt Tab. 1, das Elektro-

phoresegel Abb. 6. Das ungeklärte Homogenisat enthielt 11,2 g/L Gesamtprotein und hiervon ca. 5% bzw. 600 mg/L GFP. Mit 30 g/L Magnetbeads gelang eine Sorption des GFP zu nahezu 99%, d.h. nur ca. 1% des GFP verblieben im Überstand. Anschließend ging ein weiteres Prozent des GFP durch die beiden

Aufreinigungsstufe	Gesamtprot.konz. (g/L)	GFP-Konz. (mg/L)	GFP Ausbeute (%)	Aufreinigungsfaktor	Konzentrationsfaktor
Ungeklärtes Homogenisat	11.2	592	(100)	(1)	(1)
Sorptionsüberstand	7.13	7.2	1.2	0.02	0.01
Waschüberstand 1	2.14	5.6	1.0	0.05	0.01
Waschüberstand 2	0.24	0.0	0.0	0.00	0.00
Elution 1	5.17	1894	64.0	6.9	3.20
Elution 2	3.82	682	23.0	3.4	1.15
Elution 3	3.12	200	6.7	1.2	0.34
Gesamtbilanz (%)	106%	-	95.9%	-	-
Ausbeute im Eluat 1-3 (%)	22%	925	93.8%	3.8	1.6

Tab. 1: Ergebnisse der primären Aufreinigung von GFP aus rohem *E.coli* Homogenisat mittels magnetischer PVA-Mikrosorbentien.

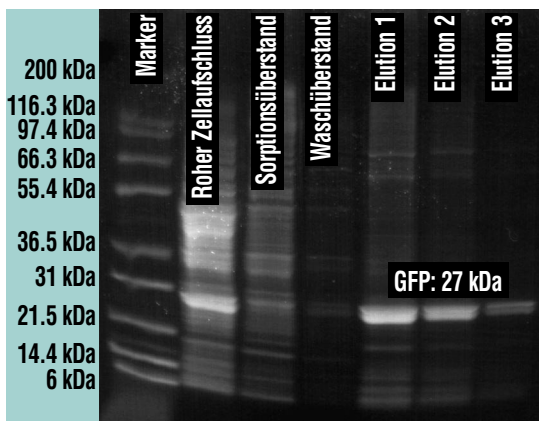


Abb. 6: Elektrophoresegel der Fraktionen eines Aufreinigungsversuchs: unterschiedliche Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht (in kiloDalton notiert) aufgetrennt. Bahn 1: Standardisiertes Gemisch aus bekannten Proteinen zur Normierung, Bahn 2: Ausgangsmedium mit dem Zielprotein „Green Fluorescence Protein“ (GFP), Bahn 3: Überstand im Rührgefäß nach Zugabe der Sorbenspartikel, Bahn 4: Waschlösung nach Abtrennung der Sorbenspartikel im Separator, Bahn 5-7: Die Lösungen der drei Elutionsschritte sind weitgehend von Fremdproteinen befreit (vergleiche Bahn 2) und feststofffrei.

Waschschritte verloren. Die drei Elutionsschritte erbrachten schließlich eine Ausbeute von ca. 94% des ursprünglichen GFP in feststofffreier und aufgereinigter Form. Durch den Einsatz der Magnetbeads war es also möglich die GFP-Lösung von Feststoffen zu befreien und gleichzeitig eine deutliche Steigerung der Reinheit und der Konzentration zu erreichen.

Zusammenfassung

Die Beispiele haben gezeigt, dass für einen erfolgreichen Einsatz magnetischer Verfahren in der Biotechnologie zum einen magnetische Partikel für den jeweiligen Anwendungsfall optimiert und zum anderen effiziente Magnettechnologien entwickelt werden müssen. Dazu sind Kenntnisse aus Biologie, Chemie, Mineralogie und Ingenieurwissenschaften gefragt. Besonders bei den in der Biokatalyse und Biopro-

duktaufbereitung angestrebten Umsetzungen im technischen Maßstab spielen die von ITC-WGT im klassischen, wasser-technologischen Bereich gesammelten Erfahrungen eine wichtige Rolle. Magnetische Verfahren in der Biotechnologie bieten die Möglichkeit einer direkten biokatalytischen Reaktion oder der direkten Produktabtrennung innerhalb stark feststoffhaltiger Medien wie z.B. ungeklärter Pflanzenextrakte oder Fermentationsbrühen. Die hiermit verbundene Reduktion der Prozessschritte spart Prozesszeiten und benötigte Ressourcen und erhöht die Produktausbeute.

Literatur

- [1] P.J. Halling, P. Dunnill, (1980) *Enzyme Microb. Technol.* 2, 2-10.
- [2] B.L. Hirschbein, D.W. Brown, G.M. Whitesides, (1982) *Chemtech*, 12(3), 172-179.
- [3] B.R. Pieters, R.A. Williams, C. Webb, (1991) *Colloid and Surface Engineering: Applications in the Process Industries*. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, pp. 248-286.
- [4] A.S. Dynal, (1998) *Biomagnetic Techniques in Molecular Biology – Technical Handbook* (Dynal A.S., Oslo, Norway, Hrsg.).
- [5] U. Häfeli, W. Schütt, J. Teller, M. Zborowski (Eds.), (1997) *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Plenum Press, New York.
- [6] www.chemagen.de (Stand 25.04.03)
- [7] K. Buchholz, V. Kasche, (1997) *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*, Wiley-VCH, Weinheim.
- [8] G.M. Whitesides, R.J. Kazlauskas, L. Josephson, (1983) *Trends in Biotechnol.* 1, 144-148.
- [9] G. Moffat, R.A. Williams, C. Webb, R. Stirling, (1994) *Minerals Eng.* 7, 1039-1056.
- [10] C. Hoffmann, M. Franzreb, W.H. Höll, (2002) *IEEE Trans. Appl. Supercond.* 12(1): 963-966
- [11] www.icbio.de (Stand 25.04.03)