

# Kontinuierliche enzymatische Produktionsverfahren mit Kapillarreaktorsystemen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation

von

Lorn Sebastian Messner, M. Sc.

2022

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 26.10.2022

*„Wir können den Wind nicht ändern, aber die Segel anders setzen“*

- Aristoteles

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich fachlich und persönlich durch die Promotion begleitet und mir diesen Weg ermöglicht haben.

Ganz besonderer Dank geht an Herrn **Prof. Dr. Sascha Beutel** für die Bereitstellung dieses vielschichtigen, spannenden Themas und der Betreuung und Hilfestellung in guten sowie schwierigen Zeiten. Auch für das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit der Gestaltung der Projektarbeiten möchte ich mich bedanken.

Ich danke außerdem Herrn **Prof. Dr. Thomas Scheper** für die Übernahme des Korreferats und Herrn **PD Dr. Ulrich Krings** für die Übernahme der Rolle des Vorsitzenden der Promotionskommission.

Den Projektpartnern der Advanced Ceramics Group der Universität Bremen Herrn **PD Dr. Michael Maas** und **Tongwei Guo** möchte ich für die konstruktive Zusammenarbeit danken.

Auch bei **Martina Weiß** möchte ich mich für all die Tipps und Hilfestellungen im Labor und die wertvolle Expertise im Bereich der Chromatographie bedanken.

Bei **Thorsten Stempel** und **Friedbert Gellermann** bedanke ich mich für die Zeit und die Geduld bei allen Werkstattarbeiten rund um das Reaktorsystem.

Herrn **Dr. Christian Ude**, dem ewigen Hüter des Technikums, danke ich für all die lehrreichen, wissenschaftlichen und tiefgründigen Gespräche, schnellen und kreativen Hilfestellungen bei Problemen jeglicher Art und den großartigen Zeiten, auch abseits der Arbeit.

Meinen Bachelor- und Masterstudenten **Sophia Machill** und **Franziska Walther** möchte ich für die motivierte wissenschaftliche Mitarbeit, auch im Zusammenhang mit dem Promotionsprojekt, danken.

Büro 002 – klein, aber fein: Ich möchte mich bei **Stefanie Thoms** und insbesondere **Carola Schmitz** für die vielen lustigen sowie erhellenden Momente, die aufmunternden Worte in Krisenzeiten und zahlreichen Tassen Kaffee bedanken. Auch allen anderen Kollegen am Institut für Technische Chemie möchte ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die vielen großartigen Zusammenkünfte und Partys danken.

## Danksagung

---

Zuletzt geht ein besonderer Dank an **meine Eltern**, die mich im Laufe meines Studiums immer bedingungslos unterstützt haben, **meine Partnerin**, die stets an meiner Seite stand und **meine Freunde** für all die wundervollen Momente außerhalb der Arbeit.

### Abstract

As an alternative to classical batch processes, enzyme-catalysed hydrolysis can also be carried out continuously. To facilitate this, a continuous ceramic capillary membrane reactor system (CCCMRS) was developed which can be operated with various hydrolytic enzymes immobilized on the porous ceramic capillary membranes. This system has several advantages over common batch processes regarding stability, reproducibility and controllability and can easily be adapted to optimal reaction conditions and individual preferences [1].

Four exemplary applications utilizing the CCCMRS were carried out and investigated concerning the long-term stability. In the first application the continuous enzymatic cleavage of human IgG into the antibody fragments Fab and Fc by immobilized papain was performed. A total volume of 22 mL of IgG-solution was enzymatically cleaved over a period of 33.3 h with a decrease of papain activity of only 7.63 %. The second application investigated the continuous digestion of pea and almond protein isolates by immobilized Alcalase resulting in the generation of a large variety of different peptides. This peptide fingerprint remains constant over a long period of time enabling fractionation and thus making the peptides accessible for further bioactivity studies in sufficient quantities. A constant peptide fingerprint could be shown for a total volume of 29.7 mL collected over a period of 45 h. In the further context of this application, the produced pea protein hydrolysate was purified into different peptide fractions and hereafter screened for selected bioactivities. Two of the peptide samples were able to reduce the cell viability of an *A549* lung cancer cell line by at least 30 %, thus indicating anticarcinogenic potential. Antihypertensive properties could be shown for three peptide samples which reduced the activity of the angiotensin-converting enzyme by around 50 %. The third application dealt with the recombinant production of the fusion protein GST-GFP and the following continuous cleavage of the GST fusion domain with immobilized TEV protease. The cleavage efficacy of this process was 90 % over the entire process time of 14 h. The fourth application examined the continuous cleavage of saccharose into glucose and fructose, which is used as invert sugar in the food industry. The continuous hydrolysis with immobilized invertase showed an excellent stability over time, even at higher flow rates and after storing invertase-immobilized capillary membranes for a period of one month.

**Keywords:** Proteolysis, immobilized enzymes, functionalized ceramics, flow biocatalysis

### Kurzzusammenfassung

Als Alternative zu konventionellen Batch-Prozessen können enzymatische Hydrolysen auch kontinuierlich durchgeführt werden. Um solche Prozesse durchführen zu können, wurde ein kontinuierliches Keramikkapillarmembran-Reaktorsystem entwickelt, das mit unterschiedlichsten hydrolytischen Enzymen betrieben werden kann. Letztere sind auf den Kapillarmembranen immobilisiert. Dieses System bietet zahlreiche Vorteile hinsichtlich Stabilität, Reproduzierbarkeit und Kontrollierbarkeit gegenüber Batch-Prozessen und kann einfach an die optimalen Reaktionsbedingungen angepasst werden [1].

Es wurden exemplarisch vier Anwendungen in dem entwickelten System durchgeführt und hinsichtlich ihrer Langzeit-Stabilität untersucht. In der ersten Anwendung wurde die kontinuierliche Spaltung von humanem IgG in Fab- und Fc-Fragmente mit Papain untersucht. Es konnte ein Volumen von 22 mL IgG-Lösung enzymatisch über einen Zeitraum von 33 h mit einem Aktivitätsverlust von lediglich 7,63% gespalten werden. In der zweiten Anwendung wurde ein kontinuierlicher Verdau von jeweils 29,7 mL Erbsen- und Mandelproteinisolat mit immobilisierter Alcalase über einen Zeitraum von 45 h durchgeführt, wodurch eine Vielzahl verschiedener Peptide unterschiedlicher Länge generiert werden konnte. Dieser Peptid-Fingerprint wurde konstant über einen langen Zeitraum erzeugt, was die Aufreinigung größerer Mengen Proteinhydrolysat ermöglichte. In den nachfolgenden Arbeiten wurden die aufgereinigten Fraktionen des Erbsenproteinhydrolysats dann auf ausgewählte, bioaktive Eigenschaften untersucht. Zwei Peptidfraktionen waren in der Lage, die Viabilität einer A549 Lungenkrebszelllinie um mindestens 30 % zu senken, was eine antikanzerogene Wirkung indiziert. Antihypertensive Eigenschaften konnten in drei der 15 untersuchten Peptidfraktionen nachgewiesen werden, welche die Aktivität des ACE um etwa 50 % reduzierten. In der dritten Anwendung wurde das Fusionsprotein GST-GFP rekombinant produziert, aufgereinigt und die GST-Fusionsdomäne anschließend kontinuierlich mithilfe der TEV-Protease abgespalten. Dabei lag die Spalteffizienz über den gesamten Zeitraum von 14 h bei etwa 90 %. Die vierte Anwendung widmete sich der enzymatischen Produktion von Invertzucker aus Saccharose. Die kontinuierliche Hydrolyse mit immobilisierter Invertase zeigte auch bei höheren Flussraten sowie nach einer einmonatigen Lagerung der immobilisierten Kapillarmembranen eine hervorragende Langzeit-Stabilität.

**Schlüsselwörter:** Proteolyse, Immobilisierte Enzyme, Funktionalisierte Keramiken, Biokatalyse

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zitat</b> .....	<b>III</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VI</b>
<b>Kurzzusammenfassung</b> .....	<b>VII</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Kooperationen und Förderungen</b> .....	<b>X</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>3</b>
<b>3 Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>4</b>
3.1 Aufbau und Funktion der Hydrolasen .....	4
3.2 Anwendung und Rolle der Hydrolasen.....	6
3.3 Enzymimmobilisierung .....	8
3.4 Immunglobuline .....	14
3.5 Bioaktive Peptide .....	16
3.6 Fusionsproteine.....	19
3.7 Invertzucker.....	20
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>22</b>
4.1 Kontinuierliches Keramik-Kapillarmembran Reaktorsystem.....	22
4.1.1 Herstellung und Charakterisierung der Kapillarmembranen .....	22
4.1.2 Aufbau des Reaktorsystems.....	25
4.1.3 Charakterisierung des Reaktorsystems.....	26
4.2 Anwendungen des Reaktorsystems.....	29
4.2.1 Produktion von Fc- und Fab-Fragmenten aus Immunglobulin G.....	29
4.2.2 Produktion von Mandel- und Erbsenproteinhydrolysat .....	33
4.2.2.1 Aufreinigung des Erbsenproteinhydrolysats .....	39
4.2.2.2 Bioaktivitätstests.....	40
4.2.2.2.1 Test auf antihypertensive Wirkung.....	40
4.2.2.2.2 Test auf antikanzerogene Wirkung.....	42
4.2.2.2.3 Test auf antimikrobielle Wirkung.....	44
4.2.3 Produktion und Spaltung des Fusionsproteins GST-GFP .....	45
4.2.4 Produktion von Invertzucker aus Saccharose .....	52

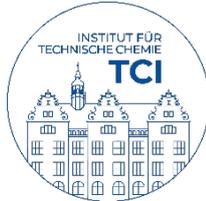
## Inhaltsverzeichnis

---

4.2.4.1	Flussratenabhängigkeit.....	53
4.2.4.2	Lagerstabilität.....	55
<b>5</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>57</b>
<b>A</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>63</b>
a	Ergänzendes Material .....	63
i	Kalibrationen .....	65
b	Material und Methoden.....	66
i	Geräteverzeichnis .....	66
ii	Chemikalienverzeichnis .....	70
iii	Methoden .....	74
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>101</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>102</b>
	<b>Betreute Abschlussarbeiten .....</b>	<b>103</b>

### Kooperationen und Förderungen

Dieses Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert und hat die Projektnummer BE3983/5-2 – „Proteolytische Keramikkapillarmembranen für die präparative Produktion bioaktiver Peptide“. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover in Kooperation mit der Universität Bremen/Advanced Ceramics durchgeführt.



## Abkürzungsverzeichnis

μL	Mikroliter
4-NP	4-Nitrophenol
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACN	Acetonitril
ACP	Antikanzerogene Peptide
AMP	Antimikrobielle Peptide
AMP	Almond major protein
APTES	(3-aminopropyl)triethoxysilan
AS	Aminosäure
AT <sub>1/2</sub>	Angiotensin-II-Rezeptor
AUC	Fläche unter der Kurve
BANA	N-α-Benzoyl-DL-arginin-β-naphthylamid-hydrochlorid
BAP	Bioaktives Peptid
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
BET	Brunauer-Emmett-Teller
Bo	Bodenstein-Zahl
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	Geladener Aerosoldetektor
CAZy	Carbohydrate Active Enzymes Database
CCCMRS	Kontinuierliches Keramikkapillarmembran-Reaktorsystem
CLEA	Quervernetzte Enzymaggregate
cm	Zentimeter
CNT	Kohlenstoffnanoröhren
CTB	CellTiter-Blue
CV	Säulenvolumen
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
diH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzym-Kommission
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EMR	Enzym-Membran-Reaktorsystem
ESI	Elektrospray-Ionisation
FBR	Festbettreaktor
FF	Fast Flow
FPLC	Niederdruck-Flüssigchromatographie
FT	Fourier-Transformation
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein

## Abkürzungsverzeichnis

---

GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GO	Graphenoxid
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hippursäure
HCl	Hydrochlorid
HHL	N-hippuryl-L-histidyl-L-leucin
HL	N-hippuryl-L-leucin
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IMER	Enzym-immobilisiertes Reaktorsystem
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LC	Flüssigchromatographie
M	Molar
mAb	Monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mAU	Milli-Absorptionseinheiten
MeOH	Methanol
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOF	Metallorganische Gerüstverbindung
MS	Massenspektrometrie
N/A	Nicht zutreffend
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaAc	Natriumacetat
NHS	N-hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanz
NP-HPLC	Normalphasen-Hochdruckflüssigchromatographie
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PES	Polyethersulfon
PFR	Pfropfenstromreaktor
POPSO	Piperazin-1,4-bis(2-hydroxy-3-propansulfonsäure
PTFE	Polytetrafluorethylen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SARS-CoV-2	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2
SEC	Größenausschlusschromatographie
Strep	Streptavidin

## Abkürzungsverzeichnis

---

SUMO	Small Ubiquitin-related modifier
T	Temperatur
TEV	Tabakätzvirus
TOF	Flugzeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
YSZ	Yttria-stabilisiertes Zirkonium
$\lambda$	Wellenlänge

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Selenocystein	Sec	U
Pyrrolysin	Pyl	O
Beliebige AS	Xaa	X

### 1 Einleitung

Die Verwendung immobilisierter Enzyme geht häufig mit der Verwendung kontinuierlicher Reaktorsysteme einher, die eine Katalyse im Durchfluss erlauben. Diese Systeme weisen eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber konventionellen Batch-Prozessen auf und sind dementsprechend von großem Interesse für Forschung und Industrie. Dies liegt nicht zuletzt an der einfachen Möglichkeit der Automatisierung, der globalen Aufmerksamkeit auf die Nachhaltigkeit von Prozessen, sowie zunehmend strikteren Vorgaben im Umgang mit potenziell gefährlichen Chemikalien. Aufgrund der großen Oberfläche, einem verbessertem Massentransfer durch optimale Durchmischung sowie hervorragender Kontrolle der Reaktionsführung weisen solche Systeme eine exzellente Effizienz bei gleichzeitig deutlich reduziertem Reagenzienverbrauch auf. Kontinuierliche Systeme wie der Festbettreaktor (FBR) können in diversen wissenschaftlichen Bereichen wie der Chemie, Biotechnologie, Biomedizin sowie der Photokatalyse sowohl im Labormaßstab als auch in industriellen Produktionsprozessen eingesetzt werden [2].

Eine Vielzahl aktueller Studien zu Enzym-immobilisierten, biokatalytischen Membranen fokussieren sich auf neuartige Nanomaterialien, die sich für die Immobilisierung verschiedenster Enzyme wie Proteasen, Peroxidasen, Carboanhydrasen, Lipasen,  $\beta$ -Galaktosidasen und Pektinasen eignen, die häufig in biokatalytischen Prozessen eingesetzt werden.

Die gängigsten Materialien für die Immobilisierung von Enzymen sind Keramiken, wobei deren Hauptbestandteil meist Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) ist [3]. Der Vorteil von Keramiken als Gerüst für die Immobilisierung von Enzymen liegt darin, dass die wichtigen Parameter wie Partikelgröße, Porengröße und -struktur, spezifische Oberfläche sowie das Verhältnis von Volumen zu Oberfläche einfach und präzise gesteuert werden können. Keramiken sind zudem günstig, weisen eine ausgezeichnete chemische sowie mechanische Stabilität auf und können mithilfe der hydrothermalen Hydroxylierung einfach aktiviert werden. Die Keramiken sind dann zugänglich für chemische oder physikalische Modifikationen, zu denen auch die Immobilisierung von Enzymen auf der Oberfläche gehört. Sie können anschließend als Nanopartikel, Membranen oder keramische Schäume in verschiedenen Reaktorsystemen eingesetzt werden [4].

Auch andere Materialien wie Kohlenstoffnanoröhren (CNTs), Graphenoxid (GO) und metallorganische Gerüstverbindungen (MOFs) ermöglichen eine stabile Immobilisierung bei

hoher Enzymdichte, ausgezeichnete Enzymaktivitäten und eine einfache Regeneration der immobilisierten Enzyme [5]. Lin et al. beobachteten eine hohe Stabilität und Regenerationsrate bei der Verwendung von Formiatdehydrogenase-immobilisierten, GO-basierten Nanomaterialien, was eine besonders nachhaltige und kostengünstige Prozessführung ermöglicht [6]. Ji et al. gelang die Immobilisierung von Laccase mittels elektrostatischer Wechselwirkungen auf der Polymermembranbeschichtung von CNTs. Die partiell inaktive Laccase konnte mithilfe von Tensiden von der alten Beschichtung abgelöst und anschließend auf einer neuen Beschichtung aufgebracht werden, wodurch ein Großteil der initialen Enzymaktivität wiederhergestellt werden konnte [7]. In einem Silica-basierten, Enzym-immobilisierten Reaktorsystem (IMER) wurden in der Gegenwart einer organischen mobilen Phase Modellproteine wie BSA, Myoglobin und Cytochrom c mit der Serinprotease Trypsin kontinuierlich verdaut. Dieser Ansatz kombiniert die Funktionsweise eines Festbettreaktors mit einer RP-Chromatographiesäule. Trotz einer hervorragenden Reproduzierbarkeit führte die Kompatibilität einiger Proteine mit einem organischen Lösungsmittel in diesem System zu Schwierigkeiten [8]. In einem anderen Ansatz wurden eine Vielzahl von Cellulosemembranen übereinandergeschichtet, die zuvor mit proteolytischen Enzymen immobilisiert wurden. Bei der Untersuchung dieses Enzym-Membran-Reaktorsystem (EMR) konnte eine hervorragende Langzeitstabilität bei der Proteolyse von Casein mit Pepsin über einen Zeitraum von vier Tagen beobachtet werden. Während des Prozesses bereiteten jedoch die Proteinaggregation innerhalb des Reaktorsystems sowie die Schaumbildung der Caseinlösung Probleme [9].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund der zahlreichen Vorteile von keramischen Gerüsten für die Immobilisierung von Enzymen und der wissenschaftlichen Relevanz von kontinuierlichen, enzym-immobilisierten Reaktorsystemen für eine Vielzahl verschiedener Anwendungen ein Keramik-Kapillarmembranreaktorsystem etabliert und charakterisiert. Dieses System wurde für vier kontinuierliche, enzymatische Hydrolyseprozesse verwendet und hinsichtlich der Langzeit-Stabilität untersucht. Auch die Lagerstabilität immobilisierter Keramikkapillarmembranen sowie die Flussratenabhängigkeit der kontinuierlichen Hydrolyse waren Bestandteil der Untersuchungen.

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Plattformtechnologie für verschiedene hydrolytische Prozesse in einem kontinuierlichen, keramischen Kapillarmembranreaktorsystem. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits die Flussratenabhängigkeit bei der Produktion von Proteinhydrolysaten aus Lebensmittelproteinisolaten mittels keramischer Kapillarmembranen [10] sowie verschiedene Funktionalisierungen der keramischen Kapillarmembranen bei der kontinuierlichen, proteolytischen Produktion von Peptiden untersucht [11]. Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen war der Aufbau und die Charakterisierung eines Reaktorsystems vorgesehen, das auf die Untersuchung der Langzeit-Stabilität verschiedener, hydrolytischer Prozesse ausgelegt ist. Dieses System erforderte die Entwicklung spezieller Keramikkapillarmembranen, die optimierte Eigenschaften hinsichtlich der Langzeit-Stabilität in kontinuierlichen Hydrolyseprozessen aufweisen. Die Applikationen des etablierten Reaktorsystems sollten hierbei über die kontinuierliche, proteolytische Spaltung von Peptiden und Proteinen hinaus erweitert werden. Insbesondere sollte die Langzeit-Stabilität der verschiedenen hydrolytischen Prozesse, aber auch die Lagerstabilität der Enzym-immobilisierten Kapillarmembranen sowie die Flussratenabhängigkeit der Langzeit-Stabilität untersucht werden. Darüber hinaus war es Ziel dieser Arbeit, die verschiedenen, hydrolytischen Applikationen im Reaktorsystem auch in ihrem gesamten, wissenschaftlichen Kontext zu betrachten. Hierzu gehört die Untersuchung der bioaktiven Eigenschaften des produzierten Erbsenproteinhydrolysats, die rekombinante Produktion des Fusionsproteins GST-GFP sowie die Untersuchung der Lagerstabilität von Invertase-immobilisierten Kapillarmembranen zur kontinuierlichen Herstellung von Invertzucker.

### 3 Theoretische Grundlagen

#### 3.1 Aufbau und Funktion der Hydrolasen

Die Hydrolasen bilden in der EC-Klassifizierung die dritte Hauptklasse der Enzyme. Diese Hauptklasse besteht aus 13 verschiedenen Unterklassen, denen eine Gruppe von Enzymen mit einer Affinität gegenüber identischen Zielbindungen zugeordnet wird (**Tabelle 1**). Hydrolasen katalysieren reversibel die Spaltung von kovalenten, chemischen Bindungen unter Beteiligung von Wassermolekülen.

**Tabelle 1:** EC-Klassifikation der Enzymgruppe der Hydrolasen [12].

EC-Nummer	Zielbindung
3.1	Esterbindungen
3.2	Glykosidische Bindungen
3.3	Etherbindungen
3.4	Peptidbindungen
3.5	Amidbindungen
3.6	Anhydridbindungen
3.7	C-C-Bindungen
3.8	Halogenbindungen
3.9	P-N-Bindungen
3.10	S-N-Bindungen
3.11	C-P-Bindungen
3.12	S-S-Bindungen
3.13	C-S-Bindungen

Die Enzymklasse der Proteasen (EC 3.4) und der Glykosidasen (EC 3.2) spielen eine zentrale Rolle im Rahmen dieser Arbeit, weshalb sie im Folgenden näher erläutert werden. Zu der Enzymklasse der Proteasen gehört eine Vielzahl von Enzymen, die Peptidbindungen innerhalb von Enzymen und Peptiden unter Beteiligung von Wasser spalten. Abhängig vom Ort der Spaltung innerhalb der Aminosäurekette (Endopeptidasen) sowie am Ende der Aminosäurekette (Exopeptidasen) werden die Proteasen in zwei Klassen eingeteilt. Weiter klassifiziert werden die Proteasen anhand der funktionellen Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms. Als funktionelle Aminosäure des aktiven Zentrums von Proteasen kommen Asparaginsäure, Glutaminsäure, Threonin, Serin und Cystein vor. Außerdem existiert die Gruppe der Metalloproteasen, bei denen ein Metallkomplex für die hauptkatalytische Aktivität sorgt. Zu den Aspartylproteasen gehört beispielsweise das Pepsin, das eine wichtige Rolle in der Verdauung eiweißhaltiger Nahrung im Magen spielt.

Zur Gruppe der Threonylproteasen gehört der multikatalytische Proteinkomplex Proteasom, der bei Eukaryoten in Zellkern sowie Zytoplasma sowie in Archaeen und einigen Bakterien vorkommt. Die am besten untersuchte Metalloprotease ist das thermostabile Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus*, bei der Zink als Zentralatom des katalytisch aktiven Metallkomplexes fungiert. Thermolysin wird industriell für die Synthese des Süßstoffes Aspartam mittels Kondensation von L-Aspartat und L-Phenylalanin verwendet, was als *reverse proteolysis* bezeichnet wird. Zu den Serinproteasen gehört, neben den spezifischen Verdauungsproteasen des Dünndarms  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin, die im Rahmen dieser Projektarbeiten verwendete Alcalase. Bei dieser unspezifischen Protease handelt es sich um eine von der Firma Novozymes modifizierte, besonders thermo- und pH-stabile Variante des Subtilisin A aus *Bacillus licheniformis*. Aufgrund ihrer Eigenschaften wird Alcalase industriell in der Waschmittelindustrie sowie in der Forschung zur proteolytischen Produktion potenziell bioaktiver Peptide verwendet [13]. Zu den Cysteinproteasen gehören die ebenfalls in diesem Projekt verwendeten Proteasen Papain, das in der Schale und den Kernen der Papaya als Abwehrstoff gegen Schädlinge vorkommt, sowie die hochspezifische Protease des Tabakätzvirus (TEV). Letztere wird aufgrund ihrer Spezifität im Labor für die präzise Abspaltung von Fusionsdomänen von Proteinen verwendet [14]. Bei Serinproteasen beruht die Aktivität auf der katalytischen Triade der Aminosäuren Asparagin, Histidin und Serin, deren Reste über Wasserstoffbrücken verbunden sind. Der Mechanismus der katalytischen Aktivität von Cysteinproteasen ist analog zu dem der Serinproteasen, wobei hier jedoch nicht Serin, sondern Cystein als nukleophile Aminosäure im aktiven Zentrum fungiert. Die katalytische Triade besteht hierbei aus Cystein-Histidin-Asparagin/Glutamin. Bei Cysteinproteasen kommt in wenigen Fällen auch eine katalytische Diade von Cystein und Histidin vor [15].

Die Enzymklasse der Glykosidasen ist ebenso vielfältig wie die der Proteasen, was bis heute zu einer wissenschaftlichen Uneinigkeit bei der Klassifizierung dieser Enzyme führt. Die *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) klassifiziert die Glykosidasen anhand ihrer Substratspezifität und deren molekularem Mechanismus [16]. Auch die EC-Klassifizierung wird kontrovers diskutiert, da lediglich Enzyme eingeordnet werden können, deren biochemischer Mechanismus vollständig aufgeklärt ist. Außerdem katalysieren einige Glykosidasen Reaktionen, die mehr als einer EC-Kategorie zugeordnet werden können. Die EC-Klassifizierung wird bei Glykosidasen auch deshalb kri-

tisch betrachtet, da sie weder strukturelle Gemeinsamkeiten noch evolutionäre Beziehungen der Enzyme berücksichtigt. Da gerade diese Aspekte bei der vielschichtigen Klasse der Glykosidasen eine zentrale Rolle spielen, wurde ein neues System zur Klassifizierung entwickelt, das auf der Ähnlichkeit der Aminosäuren innerhalb der Enzyme basiert. Diese sogenannte *Carbohydrate Active Enzymes Database (CAZy)* zeigt das direkte Verhältnis zwischen Aminosäuresequenz und Proteinfaltung bei insgesamt 130 verschiedenen Enzymfamilien [17].

Die enzymatische Hydrolyse einer glykosidischen Bindung erfolgt entweder unter Umkehrung (*inverting*) oder unter Beibehaltung (*retaining*) der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom. Während etwa 70 % aller charakterisierten Glykosidasen zur Klasse *retaining* und etwa 25 % zur Klasse *inverting* gehören, existieren einige wenige Glykosidasen, wie beispielsweise diejenigen der  $\beta$ -Xylosidasen, bei denen beide Reaktionsmechanismen vorkommen [18]. Vereinzelt kommen auch Kofaktor-abhängige Glykosidasen wie die 6-Phospho- $\alpha$ -Glucosidase aus *Bacillus subtilis* vor, die NADH-abhängig arbeiten und sich somit mechanistisch deutlich von den zwei Hauptklassen unterscheiden [19].

### 3.2 Anwendung und Rolle der Hydrolasen

In Industrie und Forschung existiert eine Vielzahl etablierter, technischer Verfahren bei der Anwendung von enzymatischen Hydrolysen. Letztere spielen aber auch eine wichtige Rolle im menschlichen Körper, da sie dort an lebenswichtigen Prozessen beteiligt sind. So sind sie maßgeblich für die Verdauung der aufgenommenen Nahrung im Mund sowie Magen-Darm-Trakt verantwortlich, wo sich eine Vielzahl verschiedener, hydrolytischer Enzyme befinden. Lipasen sind für die Fettverdauung verantwortlich, indem sie die hydrolytische Abspaltung freier Fettsäuren von Lipiden wie Glyceriden und Cholesterinestern katalysieren. Technisch werden Lipasen unter anderem für die Herstellung von Seifen, Ölen und Kosmetika, als Bestandteil von Waschmitteln sowie zur Aromabildung in Käse aus Rohmilch verwendet [20]. Proteasen spalten die langen Aminosäureketten proteinhaltiger Nahrungsmittel in Peptide und Aminosäuren und machen sie so für den menschlichen Stoffwechsel zugänglich. Im Magen befindet sich die saure Endopeptidase Pepsin, im Dünndarm befinden sich die Endopeptidasen Trypsin und Chymotrypsin. Die Enzymklasse der Proteasen kommt schon lange in einer Vielzahl technischer Prozesse zum Einsatz. In der Lebensmittelindustrie werden Proteasen beispielsweise zur Herstellung von

Proteinisolaten als Sportnahrung oder zur Beschleunigung von Backprozessen verwendet. Die Pharmaindustrie nutzt sie zur Entdeckung und Herstellung von Peptiden mit bioaktiven Eigenschaften sowie zur Produktion von therapeutischen Antikörperfragmenten. Die Waschmittelindustrie setzt Proteasen schon seit 1956 zur Beseitigung proteinhaltiger Verschmutzungen ein. In der Biotechnologie werden sie bei der rekombinanten Herstellung von Proteinen und Peptiden verwendet, um spezielle Affinitätstags in einem finalen Schritt der Proteinproduktion abzuspalten, die während des Herstellungs- und Aufreinigungsprozesses benötigt werden [21]. Für die Spaltung von Kohlenhydraten sind die Amylasen verantwortlich. Sie kommen im Körper sowohl im Speichel als auch im Magen-Darm-Trakt vor und spalten langkettige Kohlenhydrate wie Stärke an den glykosidischen Bindungen in Monosaccharide wie Glucose auf, die der Körper dann verwerten kann. Eine große Rolle spielen Amylasen auch bei Fermentationsprozesse, beispielsweise bei der Herstellung von Bier und Schnaps sowie bei der Brotherstellung mit Sauerteig [22]. Nucleasen sind in der Lage, Nukleinsäuren in einzelne Nukleotide zu zerlegen. Im menschlichen Körper kommen sie im Magen vor, um mit der Nahrung aufgenommene Nukleinsäuren zu verdauen. Endonucleasen werden häufig im Bereich der Molekularbiologie als sequenzspezifische Restriktionsenzyme bei der Genanalyse oder der Klonierung eingesetzt. Exonucleasen hingegen spalten Nukleotide Stück für Stück von den Enden der Nukleinsäurekette. Diesen selektiven Abbau macht man sich beispielsweise in einigen modernen Sequenzierverfahren zunutze. Auch die Technik der bekannten „Gen-Schere“ CRISPR/Cas9 beruht auf der Aktivität einer Nuklease. Die Cas9-Nuklease aus *Streptococcus pyogenes* kann zusammen mit einer sequenzspezifischen guide RNA an gezielten Orten innerhalb des Genoms mutieren, insertieren und deletieren [23, 24].

Neben der zentralen Rolle, die Hydrolasen im menschlichen Stoffwechsel spielen, haben die zahlreichen technischen Anwendungen dazu geführt, dass den Hydrolasen und ihrer katalytischen Funktion in der Industrie und in der Wissenschaft eine große Bedeutung beigemessen wird. In zahlreichen, wissenschaftlichen Veröffentlichungen wird ihre Produktion, Charakterisierung und technische Anwendung thematisiert. Die Produktion von Invertase erfolgt beispielsweise häufig durch Fermentation der Backhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Invertase wird bei Mangel an Monosacchariden als Kohlenstoffquelle gebildet, um Disaccharide wie Saccharose in die Monosaccharide Glucose und Fructose aufzuspalten, die dann verstoffwechselt werden können. Die Invertase wird sekretiert oder befindet sich als Mannoprotein an die Zellmembran gebunden und muss in letzterem Fall

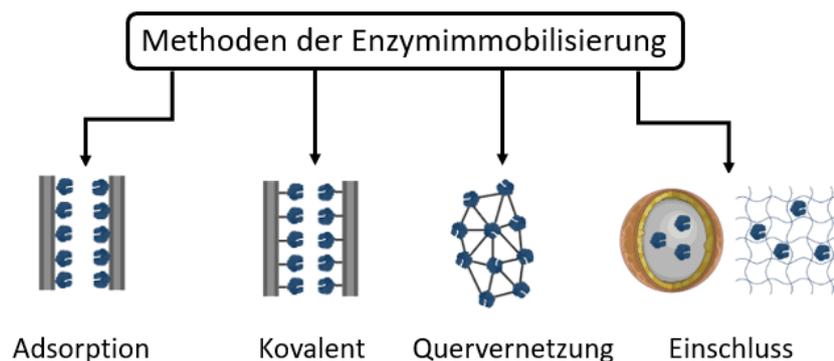
vor dem Aufreinigungsprozess durch enzymatische Verfahren abgetrennt oder durch Lyse der Zellmembran freigesetzt werden [25]. TEV-Protease wird zur präzisen Abspaltung von Fusionsdomänen von rekombinant hergestellten Proteinen verwendet und wird häufig selbst rekombinant hergestellt. Hierzu bieten sich bakterielle Expressionssysteme wie *E.coli* BL21 DE3 mit einem pDZ2087 Plasmid an. Nach einem Zellaufschluss kann die Protease dann mittels immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) mit hoher Reinheit aufgereinigt werden [26]. Proteasen, wie Subtilisin (Alcalase®) und Papain, wurden in der Literatur ausführlich hinsichtlich ihrer Struktur, Stabilität, Kinetik sowie des genauen Mechanismus in verschiedensten Anwendungen charakterisiert [27, 28].

Die technischen Anwendungen von hydrolytischen Enzymen sind vielfältig. Von der klassischen Anwendung der Enzyme in Lösung über ganzzellkatalytische Systeme bis hin zur Immobilisierung der Enzyme auf festen Trägermaterialien existieren zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten, die auch in der Literatur eingehend beschrieben werden. Bei Lebensmittelproteinen mit hohem, allergischem Potenzial kann der proteolytische Verdau dieser Proteine die IgE-vermittelte, allergische Reaktion deutlich reduzieren. Beispielsweise wurde eine um 65 % reduzierte IgE-Reaktivität nach der Behandlung von Erdnussproteinextrakt mit Flavourzym®-Lösung beobachtet [29]. Aufgrund seiner breiten Spezifität und Aktivität, hohen Stabilität und kostengünstigen Verfügbarkeit wird die Protease Alcalase bevorzugt für die Produktion potenziell bioaktiver Peptide verwendet. Hierzu wird Alcalase-Lösung zu einer Proteinisolat-Lösung gegeben und bei möglichst optimalen Bedingungen für die Alcalase-Aktivität inkubiert. Auf diese Weise konnten bereits zahlreiche Peptide mit bioaktiven Eigenschaften aus Lebensmittelproteinquellen wie beispielsweise Milch, Soja und Hanf, sowie aus marinen Proteinquellen wie in etwa Thunfischen, Makroalgen und Muscheln gewonnen werden [30]. In einer ganzzellkatalytischen Anwendung kann Ethanol direkt aus Stärkequellen wie Reis oder Cellulosequellen wie Holzspäne in *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen werden, wobei die membrangebundenen Hydrolasen  $\alpha$ -Amylase und Cellulase verwendet werden [31].

### 3.3 Enzymimmobilisierung

Während Enzyme in der Natur eine fundamentale Rolle spielen, ist auch die Anwendung von Enzymen als Biokatalysatoren in der Industrie und Forschung weit verbreitet und

meist alternativlos. Obwohl immer mehr biotechnologisch modifizierte Enzyme existieren, die eine verbesserte Aktivität, Selektivität und Stabilität gegenüber des Wildtyps aufweisen, bleibt ihre Anwendung in vielen Fällen kostspielig [32]. Um die Effizienz von enzymatischen Prozessen in der Industrie weiter zu verbessern ist die Immobilisierung von Enzymen von Vorteil. Im Vergleich zu Enzymen in Lösung sind immobilisierte Enzyme in größeren Temperatur- und pH-Bereichen sowie bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel deutlich stabiler. Die Möglichkeit einer kontinuierlichen Prozessführung und eines einfachen Abbruchs der biokatalytischen Reaktion ohne Denaturierung der Enzyme sorgen für eine hohe Flexibilität bei der Gestaltung des Bioreaktorsystems. Da die immobilisierten Enzyme entweder gar nicht erst in das Reaktionsprodukt gelangen oder mit einfachen Methoden wieder abgetrennt werden können, wird dadurch die Gewinnung des Produktes stark vereinfacht. Auch die Rückgewinnung und Wiederverwendung der immobilisierten Enzyme ist möglich [33]. Für die Immobilisierung von Enzymen gibt es vier wichtige Strategien, die in **Abbildung 1** schematisch dargestellt sind.

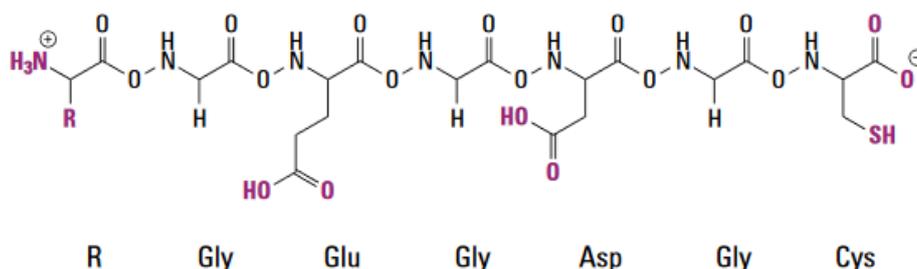


**Abbildung 1:** Übersicht über die gängigsten Methoden zur Immobilisierung von Enzymen [34].

Bei der Immobilisierung von Enzymen mittels Adsorption kommt es entweder zu einer passiven Adsorption des Enzyms an ein hydrophobes Trägermaterial oder zur Ausbildung einer elektrostatischen Interaktion des Enzyms mit der geladenen Oberfläche eines Trägermaterials. Der Vorteil dieser Art der Enzymimmobilisierung liegt darin, dass keine zusätzliche Kopplungsreagenzien notwendig sind und es nicht zu einer Modifikation des immobilisierten Enzyms kommt. Auch die Rückgewinnung von adsorptiv gebundenen Enzymen ist mit einfachen Mitteln zu bewerkstelligen. Dennoch basiert die adsorptive Immobilisierung auf schwachen Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräften, hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Faktoren wie eine hohe Ionenstärke der Substratlösung oder Flussrate eines kontinuierlichen Systems können

schnell zur Desorption des adsorptiv gebundenen Enzyms führen. In diesem Fall wird das Enzym vom Trägermaterial in das Produkt gewaschen, wobei es zusätzlich zu einem Aktivitätsverlust aufgrund der nachlassenden Enzymdichte auf dem Trägermaterial kommt. Es konnte zudem beobachtet werden, dass eine adsorptive Bindung von Enzymen an ein festes Trägermaterial zu einer Konformationsänderung und Denaturierung des Enzyms führen kann, was zu einer Reduktion der Aktivität führt. Da es zudem nicht möglich ist, die Packungsdichte der immobilisierten Enzyme zu kontrollieren, kann die Aktivität durch eine übermäßige Ansammlung von Enzymen auf engem Raum weiter reduziert werden [35].

Für eine kovalente Immobilisierung von Enzymen sind verschiedene Trägermaterialien geeignet. Als natürliche Polymere werden beispielsweise Cellulose, Sepharose und Dextran verwendet, als synthetische Polymere kommen Polyacrylamid und Polyamid zum Einsatz. Auch funktionalisierte, anorganische Trägermaterialien wie Glas, Kieselerde und Keramik spielen eine wichtige Rolle als Trägermaterial zur Immobilisierung von Enzymen [36]. Da die kovalente Bindung äußerst stabil ist, treten negative Effekte wie das Auswaschen der gebundenen Enzyme nicht auf. Durch die begrenzte Anzahl an Bindestellen lässt sich auch die Packungsdichte besser kontrollieren als bei der adsorptiven Bindung. Die Regeneration der immobilisierten Enzyme erfordert bei einer kovalenten Bindung aufgrund deren Stabilität jedoch meist schärfere Bedingungen. Auch durch die kovalente Bindung kann sich die Struktur des immobilisierten Enzyms ändern, was zu einer Senkung der Enzymaktivität führt. Um das Problem sterischer Hinderung zu umgehen, können zwischen Enzym und Trägermaterial längere Molekülketten, sogenannte *Spacer*, eingefügt werden. Dies ermöglicht dem immobilisierten Enzym eine höhere Beweglichkeit und bessere Substratzugänglichkeit. Bei der kovalenten Immobilisierung können verschiedene funktionelle Gruppen an der Bindungsreaktion beteiligt werden (**Abbildung 2**).



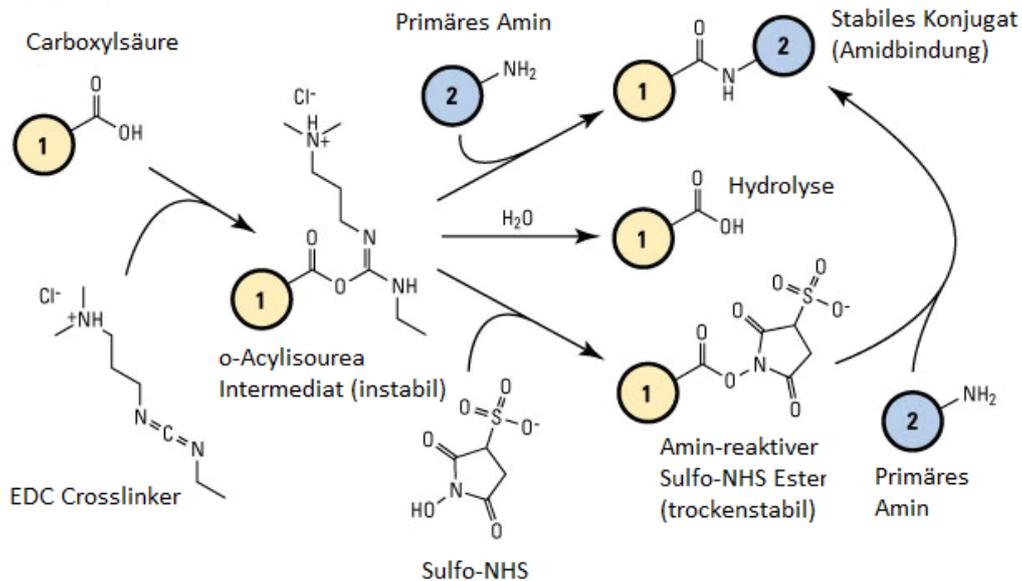
**Abbildung 2:** Verschiedene funktionelle Gruppen einer beispielhaften Enzymsequenz, die an der kovalenten Kopplungsreaktion beteiligt sein können [37].

Amin-reaktive Reagenzien reagieren mit primären Aminen (-NH<sub>2</sub>), die am N-Terminus eines jeden Proteins sowie in den Seitenketten der Aminosäure Lysin vorkommt. Bei physiologischem pH-Wert zeigen primäre Amine in der Tertiärstruktur von Proteinen aufgrund ihrer Ladung und Polarität in wässrigen Lösungsmitteln hauptsächlich nach außen. Das macht sie für eine Kopplungsreaktion zugänglich, ohne die Proteinstruktur zu beeinflussen. Häufig für die Immobilisierung von Enzymen verwendete, amin-reaktive Reagenzien sind Epoxide, N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS), Sulfonylchloride und Iso(thio)cyanate.

Thiol-reaktive Reagenzien reagieren mit Thiolen (-SH), die in der Seitenkette der Aminosäure Cystein vorkommt. Häufig sind die Thiolgruppen von Cystein im Rahmen der Tertiärstruktur von Proteinen zu Disulfidbrücken verbunden, was eine Reduktion notwendig macht, um sie für eine Kopplungsreaktion zugänglich zu machen. Dieser Prozess kann bei einigen Enzymen problematisch sein, da er für den Verlust der Tertiärstruktur und somit der Proteinaktivität sorgen kann. Da Proteine aber in der Regel nur über wenige Thiolgruppen an der Proteinoberfläche verfügen, ist mit dieser Methode häufig eine sehr ortsspezifische Proteinkopplung möglich. Typische thiol-reaktive Reagenzien sind Maleimide, Halbacetale und Pyridyldisulfide.

Carboxyl-reaktive Reagenzien reagieren mit Carbonsäuren (-COOH) am C-Terminus von Proteinen sowie in den Seitenketten der Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure. Wie auch primäre Amine findet man Carbonsäuregruppen bei physiologischen pH-Werten aufgrund ihrer Ladung und Polarität bevorzugt an der Oberfläche des Proteins. Häufig werden für diesen Zweck Carbodiimide wie 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) eingesetzt, die eine direkte Konjugation von Carboxylaten mit primären Aminen ermöglichen. Diese Methode ist bei Immobilisierungsprozessen weit verbreitet, da mit ihr besonders stabile, multikovalente Bindungen erzielt werden können. Da Proteine über zahlreiche Amino- und Carbonsäuregruppen verfügen, kann es allerdings auch zu einer unselektiven Quervernetzung der Proteine untereinander kommen. Aufgrund der ausgezeichneten Stabilität der kovalenten Bindung, der hohen Immobilisierungseffizienz sowie der zuverlässigen Ergebnisse in vorangegangenen Arbeiten wurde die EDC/NHS-Aminkupplung auch für die Immobilisierungsprozesse im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt [37].

Für die Immobilisierung der Hydrolasen auf den keramischen Kapillarmembranen muss die Zirconiumdioxid-Oberfläche der Kapillarmembranen zuerst durch die Behandlung mit einer starken Säure hydroxyliert werden. In einem weiteren Schritt findet die Silanierung mit (3-aminopropyl)triethoxysilan (APTES) statt, bei der das APTES-Linkermolekül durch Hydrolyse der Hydroxygruppen multikovalent an die Oberfläche der Kapillarmembran gebunden wird. Bei der eigentlichen NHS/EDC-Aminkupplung reagiert EDC mit Carboxylgruppen am C-Terminus des Proteins sowie in den Seitenketten der Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure. Hierbei entsteht ein aktiviertes O-Acylisourea-Intermediat, welches dann in einem nukleophilen Angriff der primären Amine des APTES-Linkermoleküls verdrängt wird. Hierbei bleibt ein Isourea-Nebenprodukt zurück, welches nicht am weiteren Reaktionsverlauf beteiligt ist. Auf diese Weise entsteht eine direkte, kovalente Bindung zwischen den Carboxylgruppen des Proteins und den Aminogruppen des APTES-Linkermoleküls. Findet keine unmittelbare Reaktion des instabilen O-Acylisourea-Intermediats mit einer Aminogruppe statt, kommt es zur Hydrolyse, was die Effizienz der Immobilisierung verringert. Um diesen Effekt zu reduzieren, ist Sulfo-NHS Bestandteil der Immobilisierungslösung. Es ist in der Lage einen stabilen, amin-reaktiven Sulfo-NHS-Ester mit dem instabilen O-Acylisourea-Intermediat auszubilden. Da in der finalen Bindung keine Rückstände der eingesetzten Reagenzien zwischen den konjugierten Molekülen zurückbleiben, spricht man auch von zero-length carboxyl-to-amine-crosslinking. Die Zugabe von NHS erhöht die Effizienz der Kupplungsreaktion bei physiologischen pH-Werten durch die Ausbildung von stabilen, amin-reaktiven Intermediaten (**Abbildung 3**) [38].



**Abbildung 3:** Mechanismus der Sulfo-NHS/EDC Kopplungsreaktion mit Enzym (1) und Amin-funktionalisierter Oberfläche (2) sowie Einfluss des Sulfo-NHS auf die Stabilität des entstehenden, amin-reaktiven Intermediats [38].

Eine weitere Technik zur Immobilisierung von Enzymen ist die Quervernetzung untereinander ohne festes Trägermaterial mit geeigneten Reagenzien, die möglichst vielfältige Bindungen zwischen den Proteinen erzeugen. Hierzu werden vorwiegend Glutaraldehyd und Malonsäure eingesetzt. Glutaraldehyd ist das effektivste Reagenz zur Quervernetzung von Proteinen und kann auf zahlreiche Weisen, wie beispielsweise Aldolkondensation und Michael-Addition, mit den verschiedenen Funktionalitäten innerhalb des Proteins reagieren. Da Glutaraldehyd in wässrigen Lösungen auch als Polymer vorliegt und je nach pH-Wert, Konzentration und Temperatur zahlreiche weitere Formen annehmen kann, ist die Untersuchung der reaktiven Spezies, die zur Quervernetzung der Proteine führt, komplex. Aufgrund dieser Tatsache und der zusätzlich individuellen Eigenschaften eines jeden Proteins beruhen Quervernetzungsprozesse mit Glutaraldehyd häufig auf empirischer Beobachtung [39]. Da bei dieser Form der Immobilisierung kein festes Trägermaterial verwendet wird, eignen sich auf diese Weise immobilisierte Enzyme nicht zur Anwendung in Festbettreaktoren. Eine physikalische Möglichkeit zur Quervernetzung bietet die Kristallisation von Enzymen zu Aggregaten (CLEAs). Hierbei kommt es nicht zur Ausbildung kovalenter Bindungen, wodurch die Proteinstruktur und -aktivität nicht beeinträchtigt wird. Die Porengröße der Aggregate kann zudem über den Kristallisationsprozess in einer Spanne von 1 bis 100  $\mu\text{m}$  gesteuert werden. Es handelt sich hierbei je-

doch um ein relativ kostspieliges Verfahren, da die Kristallisation von Enzymen einen aufwändigen Prozess darstellt und Enzyme von höchster Reinheit verwendet werden müssen [40]. Das Verfahren gewinnt dennoch zunehmend an Bedeutung und konnte bereits für die hocheffiziente, enzymatische Herstellung von Penicillin mithilfe von Penicillin-Acylase in einem Fließbettreaktor mit organischem Medium etabliert werden [41].

Die Immobilisierung von Enzymen durch Einschluss wird auch häufig als Verkapselung bezeichnet. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch komplexe, biokatalytische Reaktionen in einem abgetrennten Reaktionsraum ablaufen können, wobei die Freisetzung des Produkts kontrolliert stattfindet. Als Hülle wird häufig eine gelartige Matrix aus verschiedenen Polysacchariden wie Alginat, Pektinat und Chitosan oder anderen, polaren Polymeren wie Polylactid, Polyvinylalkohol und Polyurethanschaum verwendet. Wenn nicht ausschließlich Enzyme, sondern ebenfalls Zellen oder Zellorganellen eingeschlossen werden sollen, ist auf eine geringe Toxizität und hohe Biokompatibilität des verwendeten Polymers zu achten. Die Porengröße der Hülle kann über den Vernetzungsgrad des Polymers gesteuert werden. Dieser muss so gewählt werden, dass die Substrate und Produkte der enzymatischen Reaktion die Hülle ungehindert passieren können, während das eingeschlossene Enzym zurückgehalten wird. Dieses Verfahren eignet sich jedoch nicht für hochmolekulare Verbindungen die größer sind als das eingeschlossene Enzym. Auch der Einsatz eingeschlossener Enzyme in Festbettreaktoren unter Verwendung hoher Drücke ist mitunter problematisch, da die Partikel häufig nur eine geringe Formstabilität aufweisen [42]. Spezielle Einschlussverfahren wie die Liposomentechnik werden oft eingesetzt, um empfindliche Moleküle an den gewünschten Zielort innerhalb des menschlichen Körpers zu befördern. Bei der Liposomentechnik werden Enzyme, Antikörper oder RNA in einer Lipid-Doppelmembran eingeschlossen, damit sie nach der intravenösen Verabreichung am vorgesehenen Wirkort zeitversetzt freigesetzt werden [43]. Eine wichtige Rolle spielte die Liposomentechnik bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen SARS-CoV-2 im Rahmen der Covid-19 Pandemie [44].

### 3.4 Immunglobuline

Im Jahr 1890 hat der deutsche Immunologe Emil von Behring zusammen mit dem japanischen Arzt Kitasato Shibasaburō in menschlichem Blut eine Substanz entdeckt, die in der

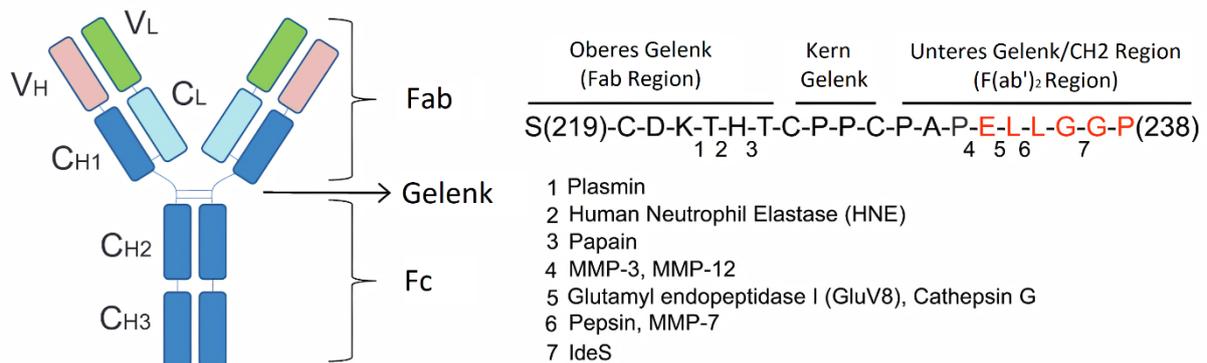
Lage war, das Diphtherietoxin zu neutralisieren. Es konnte in darauffolgenden Studien gezeigt werden, dass die entdeckte Substanz in der Lage war, spezifisch eines von zwei Substraten zu binden. In diesem Zusammenhang wurde erstmals der Begriff *Antikörper* erwähnt, der noch heute synonym zu Immunglobulin verwendet wird. Bei Immunglobulinen handelt es sich um Glykoproteine, die im Körper als essenzieller Teil des Immunsystems fungieren und von den weißen Blutkörperchen gebildet werden. Sie sind in der Lage, bestimmte Antigene von Viren und Bakterien hochspezifisch zu erkennen und zu binden, um so zu ihrer Zerstörung beizutragen. Aufgrund der Vielzahl verschiedener Klassen und Subklassen von Immunglobulinen, die sich hinsichtlich ihrer biologischen Merkmale, Spezifität, Struktur sowie Verteilung im Körper unterscheiden, ist die Untersuchung ihrer Funktion im Rahmen des menschlichen Immunsystems ein komplexes Unterfangen [45].

Neben der wichtigen Funktion bei der Immunabwehr spielen Antikörper auch in der Forschung, Diagnostik und als Therapeutikum eine zentrale Rolle. Bei vielen Labortechniken wie Western Blot, Durchflusszytometrie und Immunhistochemie werden Immunglobuline aufgrund ihrer herausragenden Spezifität dazu verwendet, gezielt einzelne Moleküle innerhalb eines komplexen Gemisches oder Stoffwechselweges nachzuweisen. Antikörper werden zudem in diagnostischen Assays als hochspezifische Nachweismethode für Biomarker im Rahmen von Infektionen und Allergien sowie zur Messung von Hormonspiegeln im Blut verwendet. Nachdem 1986 mit Muromonab-CD3 der erste therapeutische Antikörper zur Behandlung der akuten Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen durch das Paul-Ehrlich-Institut zugelassen wurde, folgten darauf viele weitere Zulassungen von therapeutischen Antikörpern für diverse Indikationen. Seit den späten 90er Jahren gehören die therapeutischen Antikörper zu der am schnellsten wachsenden Klasse auf dem Markt der biologischen Arzneimittel [46].

Die Glykoproteine bestehen aus zwei antigen-bindenden Fab-Fragmenten, welche über die sogenannte *hinge*-Region an das Fc-Fragment gebunden sind. Die Verwendung der einzelnen Fab-Fragmente des Antikörpers hat insbesondere in therapeutischen und wissenschaftlichen Anwendungen zahlreiche Vorteile gegenüber der Verwendung des intakten Antikörpers. Durch die geringere Größe ist die Membrangängigkeit der kleineren Fab-Fragmente im Vergleich zu dem intakten Antikörper deutlich verbessert. Die Verwendung eines weniger komplexen Systems wie Fab-Fragmenten erleichtert in Experimenten auch

die Strukturaufklärung mithilfe von NMR oder Röntgenkristallographie. Durch die geringere Immunogenität der Fab-Fragmente werden sie zudem bevorzugt für *in vivo* Experimente eingesetzt [47].

Immunglobuline können mithilfe von Proteasen in verschiedene Fragmente zerlegt werden. In **Abbildung 4** sind die Spaltspezifitäten unterschiedlicher Proteasen und die resultierenden Antikörperfragmente dargestellt.



**Abbildung 4:** Spaltspezifitäten verschiedener Proteasen in humanem Immunglobulin G (Aminosäuren im Einbuchstabencode) [48].

### 3.5 Bioaktive Peptide

Der Forschungsbereich der bioaktiven Peptide hat im letzten Jahrzehnt signifikant an Bedeutung gewonnen. Es existieren diverse Studien, die sich mit ihrer Produktion, Aufreinigung und Charakterisierung befassen [49, 50]. Aufgrund der Ähnlichkeit von bioaktiven Peptiden zu endogenen Signalpeptiden und Hormonen weisen sie häufig eine hervorragende Gewebeaffinität und Rezeptorspezifität bei gleichzeitig exzellentem Sicherheitsprofil auf [51]. Bioaktive Peptide könnten deshalb eine sinnvolle Ergänzung zu den häufig als Arzneimitteln eingesetzten, niedermolekularen Verbindungen und Biopharmazeutika wie Enzymen, Antikörpern und Hormonen bilden [52].

Für die Produktion von bioaktiven Peptiden können zahlreiche Methoden wie mikrobielle Fermentation, gastrointestinaler Verdau sowie enzymatische Hydrolyse eingesetzt werden. Wenn die Peptidsequenz bekannt ist, kommt auch die enzymatische oder chemische Synthese der Sequenz in Frage [51]. Die Ausgangsproteine für hydrolytische Prozesse stammen häufig aus tierischen oder pflanzlichen Lebensmitteln sowie marinen Quellen,

da sie günstig in großen Mengen verfügbar sind und eine Vielzahl verschiedener Proteine mit einfachen Methoden extrahiert werden kann [53].

Für die Charakterisierung von bioaktiven Peptiden kommt meist eine Variante der Massenspektrometrie (MS) gekoppelt mit der Flüssigchromatographie (LC) zum Einsatz. Insbesondere haben sich hier die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF), die Elektrospray-Ionisierung (ESI) sowie die Ionenfallen- und Fourier-Transformations-Massenspektrometrie (FT-MS) bewährt. Dieser Prozess ist nicht trivial, da er hohe Ansprüche an die vorangegangene Aufreinigung sowie die Sensitivität und Präzision der verwendeten Messmethode stellt. In den meisten Fällen handelt es sich bei der zu charakterisierenden Probe um ein Gemisch aus diversen Peptiden und nicht um Einzelpeptide. Die ermittelten Massen der Peptide werden anschließend mit einer Peptid-Datenbank abgeglichen und mit einer Wahrscheinlichkeit bekannten Aminosäureabfolgen zugeordnet [54].

Eine Übersicht charakterisierter, bioaktiver Peptide aus unterschiedlichen Quellen findet sich in **Tabelle 2**.

**Tabelle 2:** Beispiele verschiedener bioaktiver Peptide mit ihrer Quelle und Aminosäuresequenz im Einbuchstaben-Code.

Bioaktivität	Quelle	Sequenz	Referenz
Antioxidativ	Hühnereiweiß	DEDTQAMP	Nimalaratne et al. (2015) [55]
	Miesmuschel	FSVVSPK	Park et al. (2016) [56]
	Reis	VAGAEDAAK	Wattanasiritham et al. (2016) [57]
Antihypertensiv	Grüne Bohnen	KKSSG	Bitocchi et al. (2013) [58]
	Mais	LRP	Puchalska et al.(2013) [59]
	Soja	LIVTQ	Vallabha et al. (2014) [60]
Antidiabetisch	Milch (Casein)	MHQPPQPL	Zhang et al. (2015) [61]
	Makroalgen	MAGVDHI	Harnedy et al. (2015) [62]
	Thunfisch	PACCGPTISRPG	Huang et al. (2012) [63]
Antimikrobiell	Amaranth	GYCGKGPKYCG	Broekaert et al. (1992) [64]
	Milch (Whey)	KVGIN	Théolier et al. (2013) [65]
	Rindfleisch	GLSDGEWQ	Jang et al. (2008) [66]
Antikancerogen	Kichererbsen	ARQSHFANAQP	Xue et al. (2015) [67]
	Grüne Bohnen	MPACGSS	Luna-Vital et al. (2015) [68]
	Austern	LANAK	Umayaparvathi et al. (2014) [69]

Für die Aufreinigung von potenziell bioaktiven Peptiden aus Proteinhydrolysat werden neben den klassischen Aufreinigungstechniken wie Zentrifugation und Ultrafiltration auch präparative Chromatographie [70] und Kapillarelektrophorese [71] verwendet. Die

so entstandenen Peptidfraktionen und ggf. Einzelpeptide können dann in geeigneten Bioaktivitätstests auf unterschiedliche Bioaktivitäten untersucht werden. Häufig handelt es sich um eine Wirkung gegen schwerwiegende Erkrankungen mit einer hohen Prävalenz in der Bevölkerung. Hierzu gehören beispielsweise antihypertensive Peptide gegen Bluthochdruck, antikanzerogene Peptide gegen das Tumorwachstum bei verschiedenen Krebserkrankungen sowie antimikrobielle Peptide gegen bakterielle Infektionskrankheiten. Diese Bioaktivitäten wurden auch in dieser Arbeit untersucht. Weitere wichtige Klassen der bioaktiven Peptide sind antioxidative Peptide, die als Radikalfänger fungieren und so den oxidativen Stress der körpereigenen Zellen verringern, antidiabetische Peptide, die zu einer Absenkung des Blutglucosespiegels und einer Verbesserung der Insulinaufnahme führen und analgetische Peptide, die mit den Opioidrezeptoren oder den Cyclooxygenasen interferieren und auf diese Weise schmerzstillend und entzündungshemmend wirken [72].

Die antihypertensiven Peptide interagieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, welches eine Schlüsselrolle in der Regulation des Blutdrucks einnimmt. Die meisten antihypertensiven Peptide wirken durch die Inhibition des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) zu einem frühen Zeitpunkt innerhalb der enzymatischen Kaskade. Es wurden ebenfalls bioaktive Peptide beschrieben, die den Angiotensin-II-Rezeptor ( $AT_{1/2}$ ) inhibieren und somit erst zu einem späteren Zeitpunkt in die enzymatische Kaskade eingreifen. Diese sind nebenwirkungsärmer, da der Abbau von Bradykinin nicht beeinträchtigt wird. Eine Ansammlung von Bradykinin im Blut führt zu einer erhöhten Schleimbildung und Hustenreiz [73].

Die antimikrobiellen Peptide (AMPs) unterteilen sich in zwei grundlegende Wirkweisen: Immunmodulation und direkte Zelltötung. Der letztere Mechanismus kann hierbei nochmals in membrangerichtete und nicht-membrangerichtete Zelltötung unterteilt werden. AMPs, die zu der Klasse der membrangerichteten Zelltötung gehören, richten sich häufig gegen membrangebundene Rezeptoren oder induzieren die Zerstörung der Lipid-Doppelschicht selbst. Bei der nicht-membrangerichteten Zelltötung interferiert das AMP mit zellinternen Zielstrukturen oder bindet direkt an spezifische Rezeptoren. Hiervon unterscheidet sich die Klasse der immunmodulierenden Peptide, die nicht direkt mit Mikroorganismen interagieren, sondern spezifische Immunzellen wie Monozyten, Lymphozyten und Leukozyten aktivieren und so die körpereigene Bekämpfung der pathogenen Mikro-

organismen induzieren. Die meisten bekannten AMPs gehören zur Klasse der membranorientierten Zelltötung und tragen eine starke kationische Ladung. Sie gehen somit eine starke elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkung mit der negativ geladenen bakteriellen Zellwand ein [74].

Antikancerogene Peptide (ACPs) können ebenfalls eine kationische Ladung aufweisen, die zur Destabilisierung der Krebszellmembran führt und ähneln somit den AMPs in ihrer Struktur und Wirkweise. Da Säugetierzellen einen schwächeren anionischen Charakter besitzen als bakterielle Zellwände, ist die elektrostatische Interaktion dieser ACPs jedoch schwächer ausgeprägt als die der AMPs [75]. Die effektivsten ACPs wirken deshalb durch Zellzyklus-Arrest, Inhibierung der Angiogenese, Modulation der Genexpression sowie Induktion der Apoptose [76].

### 3.6 Fusionsproteine

Als Fusionsproteine werden Proteine bezeichnet, die aus mindestens zwei von verschiedenen Genen kodierten Domänen bestehen. Diese Gene werden miteinander verbunden, sodass das resultierende Protein als einzelne Einheit transkribiert und translatiert wird. Fusionsproteine können *in vivo* als Folge einer Chromosomentranslokation entstehen, können aber auch mittels rekombinanter DNA *in vitro* hergestellt werden [77].

Fusionsproteine werden in der Biotechnologie für die Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine verwendet. Durch die Fusion ausgewählter Affinitätstags an Proteine wird die chromatographische Aufreinigung vereinfacht, da das gewünschte Fusionsprotein hochspezifisch an Affinitätsmembranen bindet. Dies ermöglicht eine sehr hohe Reinheit des Zielproteins bei geringem Material- und Zeitaufwand. Einige Fusionsdomänen verbessern die Löslichkeit von Proteinen, die bei rekombinanter Expression sonst nur schlecht oder gar nicht löslich wären. Auch die *in vitro* Rückfaltung des Proteins kann so erleichtert werden. Häufig ist auch die Expression von Fusionsproteinen mit erhöhter Stabilität gegenüber proteolytischem Verdau wünschenswert [78]. **Tabelle 3** zeigt eine Übersicht über gängige Fusionstags und deren Eigenschaften und Verwendungszwecke.

## Theoretische Grundlagen

**Tabelle 3:** Charakteristika verschiedener Proteinaffinitäts-Tags.

Tag	Länge	Position	Elution	Verwendung	Referenz
T7	11 AS	N-terminal intern	mAb niedriger pH	Aufreinigung Erhöhte Expression	Makrides (1996) [79]
V5	14 AS	C-terminal	N/A	Detektion	McLean et al. (2001) [80]
FLAG	8 AS	N-terminal C-terminal	Niedriger pH EDTA	Aufreinigung Detektion	Terpe (2003) [81]
GST	211 AS	N-terminal C-terminal	Red. Glutathion	Aufreinigung Erhöhte Expression Erhöhte Löslichkeit	Smith (2000) [82]
His	2 – 10 AS	N-terminal C-terminal	Zweiwertige Metalle Imidazol	Aufreinigung Detektion	Bornhorst/Falke (2000) [83]
SUMO	100 AS	N-terminal	Ni-IMAC SUMO-Protease	Immobilisierung Erhöhte Löslichkeit Erhöhte Expression	Panavas et al. (2009) [84]
Strep	8 – 9 AS	N-terminal C-terminal	Strep-Tactin Biotin	Aufreinigung Detektion	Skerra/Schmidt (2000) [85]
GFP	220 AS	N-terminal C-terminal	N/A	Immobilisierung Detektion	Gerdes/Kaether (1996) [86]

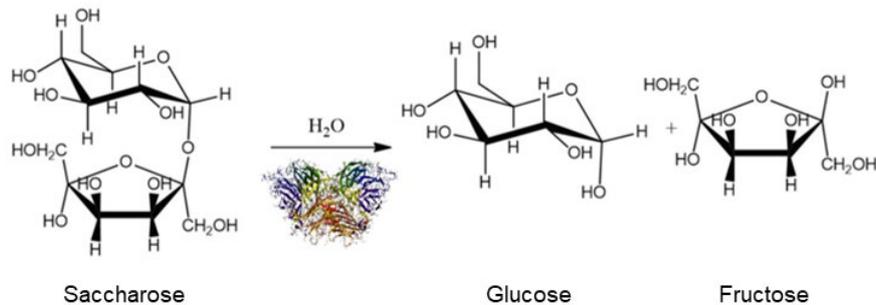
In allen Fällen, in denen das Fusionsprotein zu verbesserten Eigenschaften während der Expression oder Aufreinigung beiträgt, ist das Beibehalten der Fusionsdomäne am nativen Protein nach der Produktion und Aufreinigung häufig nicht mehr erwünscht, da die Aktivität des Proteins durch die Fusionsdomäne beeinträchtigt sein kann. Auch die Mobilität des Proteins ist durch die zusätzliche Größe der Fusionsdomäne eingeschränkt. Aus diesem Grund ist die proteolytische Abspaltung der Fusionsdomäne mit hochspezifischen Proteasen häufig der letzte Schritt in der rekombinanten Proteinproduktion. Hierzu werden häufig schon bei der Gestaltung des Vektors Sequenzen für Spaltstellen verschiedener, hochspezifischer Proteasen wie beispielsweise TEV-Protease und Thrombin unmittelbar vor der Fusionsdomäne eingefügt. Die entsprechenden Proteasen können dann nach dem Produktions- und Aufreinigungsprozess verwendet werden, um die Fusionsdomäne hochspezifisch vom nativen Protein abzuspalten [87].

### 3.7 Invertzucker

Invertzucker besteht aus einem Gemisch der zwei Monosaccharide Glucose (Traubenzucker) und Fructose (Fruchtzucker) und wird in der Lebensmittelindustrie häufig anstelle

des konventionellen Disaccharids Saccharose (Haushaltszucker) verwendet, da er in flüssiger Form vorliegt und auch nach längerer Zeit nicht auskristallisiert. Seine Süßkraft ist zudem etwas höher als die der Saccharose. Diese Eigenschaften vereinfachen die industrielle Verarbeitung des Invertzuckersirups gegenüber kristalliner Saccharose. Insbesondere in Lebensmitteln wie Eiscreme, Kuchen, Ketchup etc., deren Konsistenz auch bei längerer Lagerzeit cremig und geschmeidig bleiben soll, kommt deshalb bevorzugt Invertzuckersirup zum Einsatz. Auf der Zutatenliste wird der Invertzuckersirup auch als „Glucose-Fructose-Sirup“ und „Isoglucose“ gekennzeichnet [88].

Die Herstellung von Invertzuckersirup geschieht industriell hauptsächlich auf zwei verschiedenen Wegen: Zum einen mittels chemischer Hydrolyse mit Säure und zum anderen durch enzymatische Hydrolyse mit Invertase (**Abbildung 5**) [89].



**Abbildung 5:** Reaktionsschema der enzymatischen Hydrolyse des Disaccharids Saccharose in die zwei Monosaccharide Glucose und Fructose mithilfe von Invertase.

Die enzymatische Hydrolyse mit Invertase verdrängt die saure Hydrolyse jedoch zunehmend, da auf diese Weise lediglich etwa 50 % der vorgelegten Saccharose in die Monosaccharide Glucose und Fructose umgewandelt werden können und unerwünschte Nebenaromen und Verfärbungen auftreten können. Das Aufkochen der Invertase ist außerdem mit erheblichem, energetischen Aufwand verbunden und die Verwendung von Säure soll aus Sicherheitsgründen vermieden werden [90]. Insbesondere die enzymatische Hydrolyse mit immobilisierter Invertase im Durchfluss ist ein sehr effizienter Prozess, da kontinuierlich Invertzucker in gleichbleibender Qualität produziert werden kann, ohne dass Invertase im Produkt verbleibt [91]. Beispielsweise konnten durch den Einschluss von Invertase in Gelatinekügelchen mithilfe von Glutaraldehyd in einer analytischen Säule große Mengen Invertzuckersirup hergestellt werden. Hierbei war es möglich, die eingeschlossene Invertase ohne nennenswerten Aktivitätsverlust sogar bis zu sieben Mal zu verwenden, was eine kostengünstige Prozessführung ermöglicht [92].

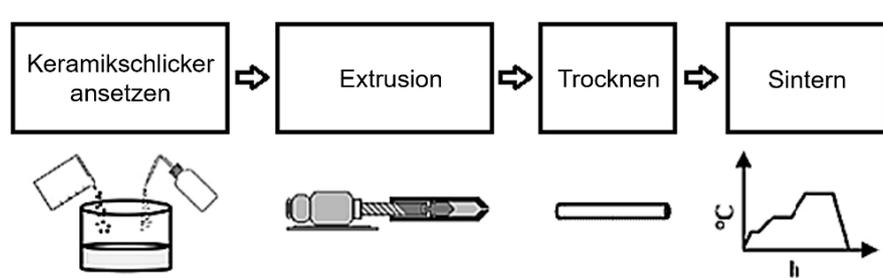
## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Kontinuierliches Keramik-Kapillarmembran Reaktorsystem

In diesem Kapitel wird der Entwicklungsprozess und die Herstellung der verwendeten, keramischen Kapillarmembranen beschrieben, bevor diese im Anschluss hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften charakterisiert werden. Nach der chemischen Aktivierung können diese keramischen Kapillarmembranen mit unterschiedlichen hydrolytischen Enzymen immobilisiert werden. Die Entwicklung eines passenden Reaktormantels erlaubt den Einsatz der keramischen Kapillarmembranen im kontinuierlichen Reaktorsystem, welches zur kontinuierlichen Hydrolyse verschiedener Substrate eingesetzt wird. Die Bestandteile und der Funktionsumfang dieses Systems werden detailliert beschrieben und die Verweilzeitverteilung bei verschiedenen Flussraten bestimmt.

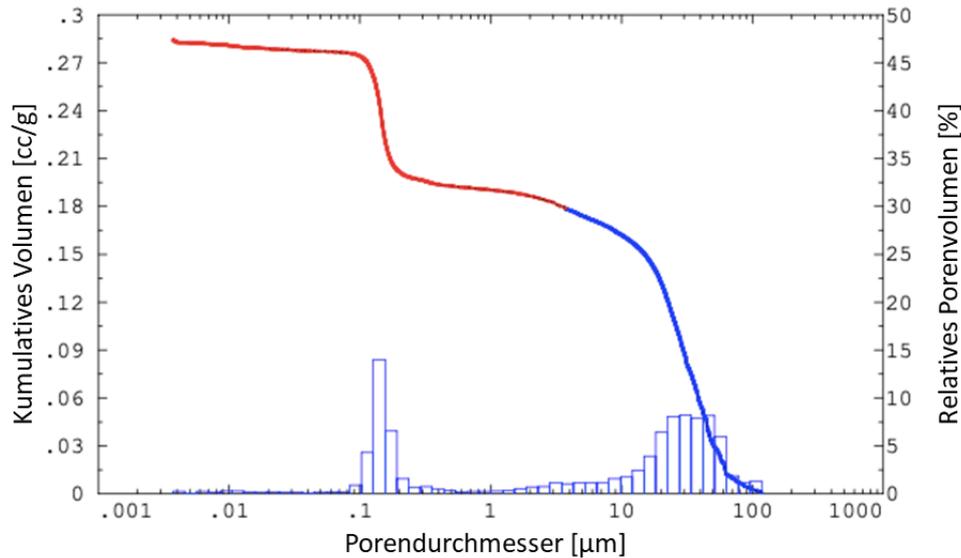
#### 4.1.1 Herstellung und Charakterisierung der Kapillarmembranen

Der Herstellungsprozess der keramischen Kapillarmembranen orientiert sich an Kroll et al. (2010) und hat sich bereits für die Produktion verschiedener, keramischer Kapillarmembranen bewährt, die in früheren Arbeiten verwendet wurden [93]. Der Prozess wird in **Abbildung 6** schematisch dargestellt. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die hydrothermale Hydroxylierung zu einer bestmöglichen Aktivierung der Oberfläche der keramischen Kapillarmembran führt [11]. Dieser Prozess wurde auch für die Aktivierung der Oberfläche der Kapillarmembranen verwendet, die im Rahmen dieser Arbeiten eingesetzt wurden (siehe Anhang, Abschnitt Methoden).



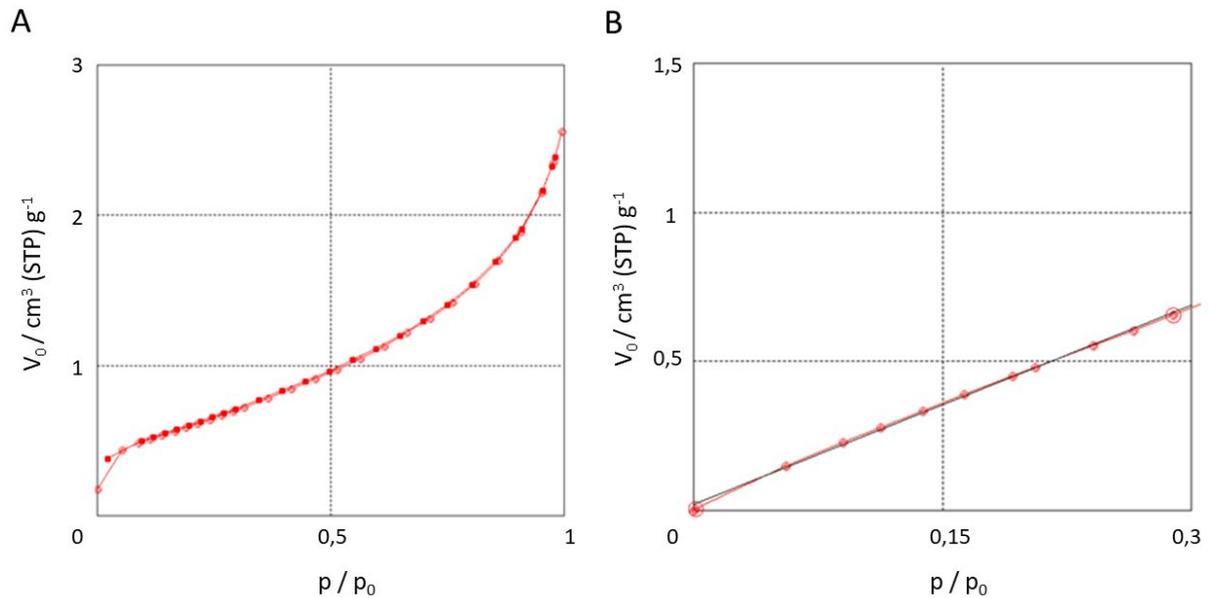
**Abbildung 6:** Ablauf des Herstellungsprozesses der im Projekt verwendeten keramischen Kapillarmembranen.

Die verwendeten Kapillarmembranen haben eine Länge von 100 mm und eine Masse von  $1,22 \pm 0,069$  g. Der äußere Durchmesser beträgt  $5,43 \pm 0,07$  mm, der innere  $1,18 \pm 0,09$  mm. Das Innenvolumen einer Kapillare liegt demnach bei  $109,36 \pm 17,32$   $\mu\text{L}$ . Die Kapillarmembranen verfügen nach dem Sintern über eine breite Porengrößenverteilung und eine durchschnittliche Porengröße von 90 nm. Diese wurde mittels Quecksilberintrusion bestimmt (**Abbildung 7**).



**Abbildung 7:** Bestimmung der Porengrößenverteilung der verwendeten keramischen Kapillarmembranen mittels Quecksilberporosimetrie.

Die spezifische Oberfläche und die Porosität der keramischen Kapillarmembranen wurde mithilfe der isothermen  $\text{N}_2$ -Adsorption/Desorption nach Brunauer-Emmett-Teller (BET) bestimmt (**Abbildung 8**). Aus diesen Messungen wurde eine spezifische Oberfläche von  $2,3 \pm 0,35$   $\text{m}^2/\text{g}$  und eine offene Porosität von  $63,68 \pm 1,13$  % ermittelt.



**Abbildung 8:** Brunauer-Emmett-Teller (BET) Oberflächenanalyse der spezifischen Oberfläche der keramischen Kapillarmembranen. Isotherme Adsorption/Desorption von Stickstoff an die Kapillarmembran-Oberfläche (A) und daraus errechneter BET-Plot (B).

Die im Rahmen der Anforderungen der Projektarbeiten entwickelten, neuartigen Kapillarmembranen gewährleisteten eine hohe Prozessstabilität über eine lange Betriebsdauer. Die vergrößerten Poren sorgen für eine deutlich reduzierte Verblockung der Kapillarmembranen durch Proteinaggregate, die durch das Erwärmen des Substrats im Reaktorsinneren entstehen. Um eine verbesserte Handhabung und eine möglichst große Oberfläche für immobilisierte Enzyme zu erreichen, wurde die äußere Wandstärke im Vergleich zu den Kapillarmembranen aus vorangegangenen Arbeiten von 0,6 mm auf 5,4 mm erhöht. Sowohl der Durchmesser des Innenkanals (1 mm) als auch die Gesamtlänge der Kapillarmembranen (100 mm) haben sich im Vergleich zu den Kapillarmembranen aus vorangegangenen Arbeiten nicht verändert. **Abbildung 9** zeigt die in vorangegangenen Arbeiten verwendeten, keramischen Kapillarmembranen mit dem zugehörigen Reaktormantel im Vergleich zu den in den aktuellen Arbeiten verwendeten.



**Abbildung 9:** Vergleich der keramischen Kapillarmembran mitsamt Reaktormantel aus vorangegangenen Projektarbeiten (A) mit der in aktuellen Projektarbeiten verwendeten (B).

Der Reaktormantel gewährleistet eine gleichmäßige Durchströmung der Kapillarmembranen bei vollständiger Kompatibilität mit den übrigen Bestandteilen des Reaktorsystems. Aufgrund seiner thermischen Eigenschaften und Korrosionsbeständigkeit besteht der Reaktormantel in beiden Fällen aus Edelstahl. Da der Durchmesser der neu entwickelten Kapillarmembranen vergrößert wurde, weist auch der Reaktormantel einen größeren Durchmesser sowie eine höhere Wandstärke auf. Während bei dem Reaktormantel aus vorangegangenen Arbeiten die Chromatographie-Schraubverbindungen aufgrund der kleinen Gewindegröße direkt auf den Reaktormantel aufgeschraubt werden konnten, war in Folge des gestiegenen Durchmessers bei dem neu entwickelten Reaktormantel ein Gewindeaufsatz mit Quetschdichtungen vonnöten.

### 4.1.2 Aufbau des Reaktorsystems

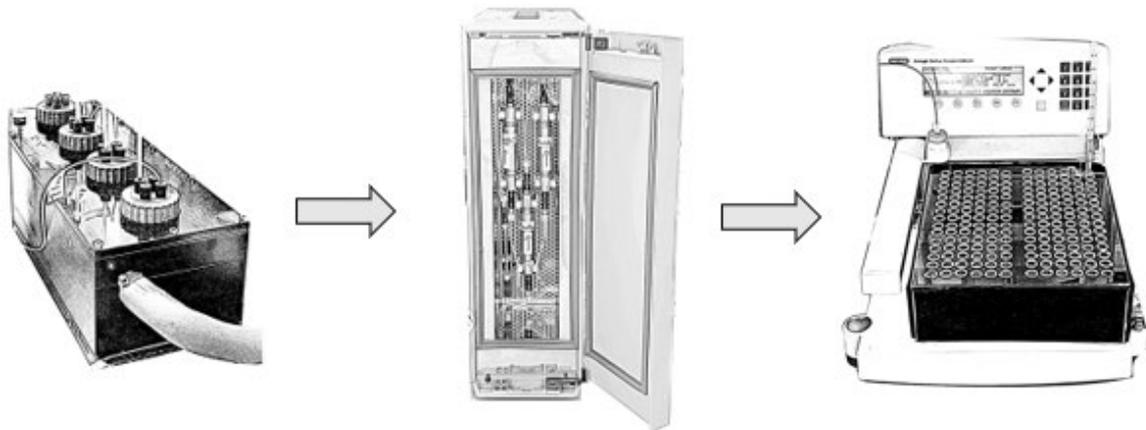
Das Reaktorsystem besteht aus vier Hauptkomponenten, die mittels Polytetrafluorethylen-Kapillarschläuchen (PTFE) mit 0,18 mm Durchmesser miteinander verbunden sind (**Abbildung 10**):

- 1) einem temperierbaren Substrat-Feed für bis zu 100 mL Substrat (4 – 80 °C), welcher zusätzlich in stufenlos regulierbaren Geschwindigkeiten gerührt werden kann (0 – 1000 rpm)
- 2) der Peristaltikpumpe, die einen konstanten Fluss durch das Reaktorsystem erzeugt (11 µL/min – 5000 µL/min)

3) dem Säulenofen zur Einstellung der Temperatur der Keramik-Kapillarmembranen im Edelstahl-Reaktormantel (10 – 100 °C)

4) dem gekühlten Fraktionssammler zum Auffangen aufeinanderfolgender Proben über die Dauer des Hydrolyseprozesses (bis -20 °C).

Dieser Aufbau ermöglicht die Hydrolyse verschiedener Substrate mit unterschiedlichen Proteasen unter den für den jeweiligen Prozess optimalen Bedingungen über einen langen Zeitraum.



**Abbildung 10:** Schematischer Aufbau des kontinuierlichen Keramik-Kapillarmembranreaktorsystems. Gekühlter Substrat-Feed (l.), Säulenofen mit Reaktoren (m.) und Fraktionssammler mit Kühleinheit zur Sammlung des Hydrolysats (r.)

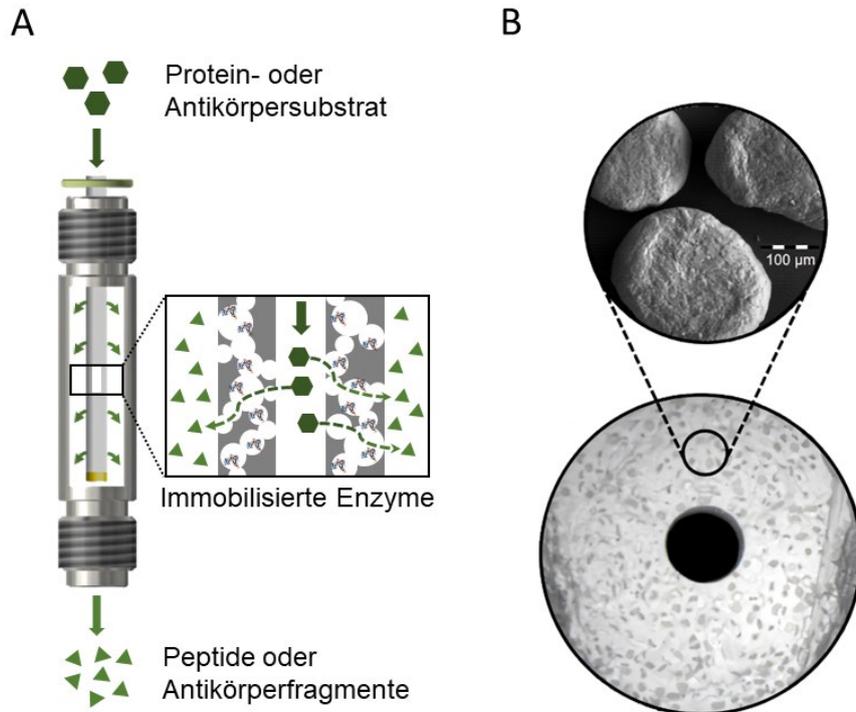
### 4.1.3 Charakterisierung des Reaktorsystems

Das kontinuierliche Keramikkapillarmembran-Reaktorsystem ist auf die stabile Hydrolyse verschiedener Substrate mit unterschiedlichen, immobilisierten Hydrolasen über einen langen Zeitraum ausgelegt. In diesem System kamen die in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Keramik-Kapillarmembranen zum Einsatz, die für eine hohe Prozessstabilität über einen langen Zeitraum in kontinuierlichen Hydrolyseprozessen optimiert sind.

Als Verfahren zur Enzymimmobilisierung wurde die in der Literatur beschriebene NHS/EDC-Aminkupplung verwendet, die sich bereits in vorangegangenen Arbeiten bewährt hatte und in Abschnitt 3.3 detailliert beschrieben wurde [93].

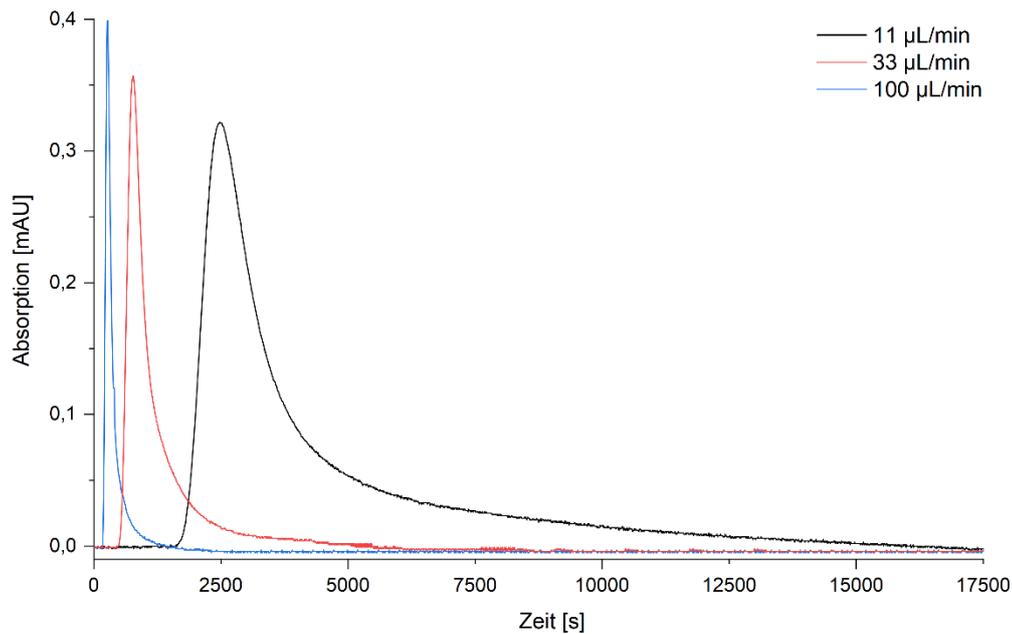
Die keramische Kapillarmembran wird an einem Ende mit 2-Komponenten-Epoxidklebstoff verklebt, um den Fluss des Substrates durch die Poren der Kapillarmembran und

somit maximalen Kontakt zur Enzym-immobilisierten Kapillarmembranoberfläche zu gewährleisten (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Das umgesetzte Substrat verlässt die Kapillarmembran in den Innenraum der Reaktorhülle und schließlich den Reaktionsraum (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11:** Reaktionsschema des Enzym-immobilisierten, keramischen Kapillarmembranreaktors (A) und Querschnitt der keramischen Kapillarmembran mit Visualisierung der Poren, aufgenommen mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) (B).

Um das Reaktorsystem bei unterschiedlichen Flussraten zu charakterisieren, wurden Verweilzeitexperimente durchgeführt. Hierzu wurde der Farbstoff 4-NP (4-Nitrophenol) mittels Dirac-Stoß bei unterschiedlichen Flussraten in das Reaktorsystem eingebracht und über einen Zeitraum von ungefähr 5 h spektroskopisch bei 405 nm Wellenlänge detektiert (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Die aufgenommenen Verzweilzeitverteilungen sind in **Abbildung 12** dargestellt.



**Abbildung 12:** Spektroskopische Bestimmung der Verweilzeitverteilung des Reaktorsystems bei unterschiedlichen Flussraten mit 4-Nitrophenol als Markersubstanz.

Bei sehr niedrigen Flussraten zeigt sich ein signifikanter tailing-Effekt, der bei steigender Flussrate abnimmt. Um diesen Effekt zu erklären, wurden Reynolds-Zahlen für das Reaktorsystem berechnet (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Die berechneten Reynolds-Zahlen ( $Re = 0,105$  für  $11 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $Re = 0,316$  für  $33 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $Re = 0,959$  für  $100 \mu\text{L}/\text{min}$ ) deuten klar auf laminaren Fluss bei niedrigen Flussraten hin, was für eine hohe Impulsdiffusion und eine niedrige Impulskonvektion spricht. Dieses Verhalten kann auch bei Pfropfenstromreaktoren (PFR) beobachtet werden, deren Funktionsweise dem hier beschriebenen System stark ähnelt. Während für einen idealen PFR eine exakt definierte Verweilzeit angenommen wird, weisen reale PFR eine Variation der Verweilzeit auf, die als Verweilzeitverteilung bezeichnet wird. Diese Verweilzeitverteilung ist abhängig von der Art der Strömung und dem Grad der Rückvermischung, der durch die Bodenstein-Zahl ( $Bo$ ) definiert wird. Während ein idealer PFR theoretisch eine unendlich hohe  $Bo$  aufweist, steht eine  $Bo$  von 0 für eine vollständige Rückvermischung innerhalb des Systems [94]. Der steigende Einfluss von Diffusionsprozessen bei niedrigen Flussraten erhöht den Grad der Rückvermischung im keramischen Kapillarmembranreaktorsystem, wobei die Retention in der hochporösen Kapillarmembran diesen Effekt zusätzlich verstärkt. Es zeigt sich in den aufgenommenen Verweilzeitverteilungen jedoch, dass der Grad der Rückvermischung mit zunehmenden Flussraten abnimmt, wodurch sich das System einem idealen PFR annähert.

## 4.2 Anwendungen des Reaktorsystems

Das keramische Kapillarmembran-Reaktorsystem wurde in vier ausgewählten Anwendungsbeispielen mit industrieller Relevanz hinsichtlich seiner Langzeit-Prozessstabilität untersucht. Hierfür wurden unterschiedliche Peptidasen (EC 3.4) sowie eine Glykosidase (EC 3.2) auf den keramischen Kapillarmembranen immobilisiert. Temperatur und pH-Wert wurden für jede Anwendung auf das Optimum des jeweiligen, immobilisierten Enzyms angepasst.

Eine Übersicht der in den Anwendungen eingesetzten Hydrolasen mitsamt ihrer optimalen Reaktionsbedingungen sowie präferierten Spaltstellen findet sich in **Tabelle 4**.

**Tabelle 4:** Übersicht über die pH- und Temperaturoptima sowie die Erkennungs- und Spaltsequenzen der im Projekt verwendeten Hydrolasen (Aminosäuren im Einbuchstabencode).

Protease	Klasse	Optimum pH	Optimum T	Präferierte Spaltstelle
Papain	Cysteinprotease	6 – 7	50 – 60 °C	H T
Alcalase	Serinprotease	6,5 – 8,5	55 – 70 °C	(Q/S) H, L (V/Y), Y T
TEV Protease	Cysteinprotease	6 - 9	30 °C	Q S(G/A)
Invertase	Glykosidase	4 - 5	40 – 60 °C	1,2-Glycosidische Bindung

### 4.2.1 Produktion von Fc- und Fab-Fragmenten aus Immunglobulin G

Als 1. Anwendungsbeispiel wurde die kontinuierliche, proteolytische Spaltung von humanem Immunglobulin G (IgG) mithilfe der Cysteinprotease Papain im kontinuierlichen Keramik-Kapillarmembranreaktorsystem untersucht. Die Spaltung des Antikörpers findet hierbei oberhalb der Disulfidbrücken der Gelenk-Region zwischen den Aminosäuren Histidin und Threonin statt und resultiert in der Entstehung von zwei Fab- und einem Fc-Fragment.

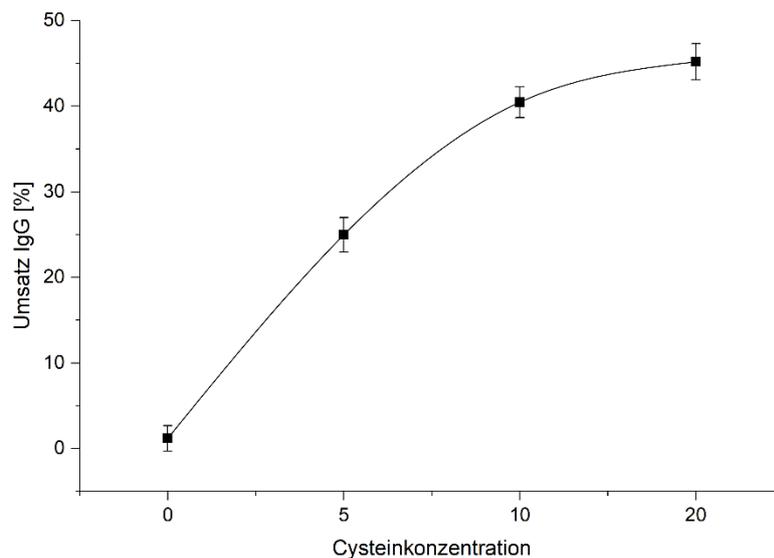
Als Spaltsubstrat für die folgenden Untersuchungen wurde eine IgG-Lösung mit der Konzentration 1 mg/mL angesetzt. Als Puffer kam hierbei ein POPSO-Puffer, pH 7,8 zum Einsatz, was den physiologischen Bedingungen des Antikörpers entspricht und ebenfalls im Bereich der maximalen Aktivität des Papains liegt.

In der Literatur wird beschrieben, dass der Zusatz von L-Cystein sowohl die Stabilität als auch die Aktivität von Papain erheblich steigert [95]. Die Aktivität von Papain setzt die Entstehung eines Thiolat-Imidazolium Ionenpaares von Cys-25 und His-159 im aktiven

## Ergebnisse und Diskussion

Zentrum des Enzyms voraus [96]. In kinetischen Studien konnte gezeigt werden, dass Thiole wie Cystein in der Lage sein könnten, die Zersetzungsrates des Enzym-Substrat-Komplexes zu erhöhen, wodurch es zur Aktivierung von Papain kommt. Dennoch ist der Aktivierungsmechanismus von Papain durch Cystein noch nicht vollständig aufgeklärt [97].

In einer Batch-Voruntersuchung wurden jeweils 950  $\mu\text{L}$  IgG-Substratlösung mit den L-Cystein-Konzentrationen 0, 5, 10 und 20 mM eingesetzt. Um die enzymatische Reaktion zu starten, wurden dann jeweils 25  $\mu\text{L}$  einer Papain-Lösung (1 mg/mL in POPSO-Puffer, pH 7,8) hinzugefügt. Nach 4 h wurde die Reaktion durch das Hinzufügen von 25  $\mu\text{L}$  einer Iodacetamid-Lösung (1 mg/mL) gestoppt und anschließend der Umsatz von nativem IgG in die Fab- und Fc-Fragmente in einer SEC-HPLC quantifiziert (Siehe Anhang, Abschnitt Methoden). In dem durchgeführten Batch-Prozess wurde nach einer Hydrolysedauer von 4 h ohne Zugabe von Cystein ein Umsatz von intaktem IgG von lediglich  $1,19 \pm 1,5 \%$  erzielt. Die Zugabe von 5 mM Cystein führte zu einem Umsatz von  $24,96 \pm 2 \%$ , von 10 mM Cystein zu einem Umsatz von  $40,45 \pm 1,8 \%$  und von 20 mM Cystein zu einem nur leicht höheren Umsatz von  $45,18 \pm 2,1 \%$  (**Abbildung 13**).



**Abbildung 13:** Umsatz des intakten IgG-Antikörpers in Abhängigkeit der L-Cysteinkonzentration.

Basierend auf den Ergebnissen der Voruntersuchung wurde bei allen Folgeanwendungen eine L-Cysteinkonzentration von 10 mM eingesetzt. Bei einer L-Cysteinkonzentration von 20 mM und mehr kam es zu Inkompatibilitäten mit der verwendeten SEC-HPLC Analyse, wodurch deutliche Doppelpeaks sichtbar wurden und ein ausgeprägtes Fronting auftrat. Höhere L-Cysteinkonzentrationen wurden deshalb nicht getestet. Den besten Umsatz bei

größtmöglicher Kompatibilität mit der verwendeten Analyseverfahren erzielt deshalb der Zusatz von 10 mM Cystein.

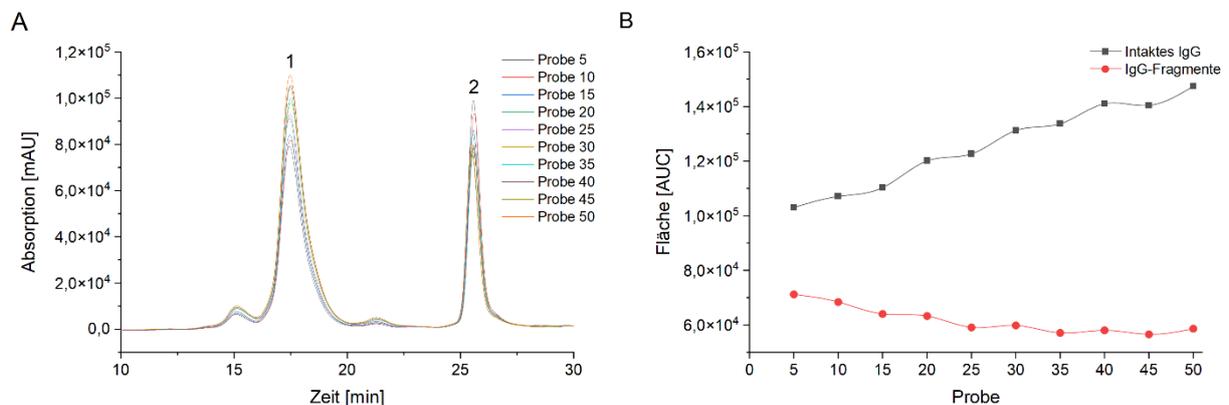
Für die Aktivitätsbestimmung und die Untersuchung der Langzeit-Stabilität wurde die Cysteinprotease Papain mithilfe der NHS/EDC-Aminkupplung auf den funktionalisierten Kapillarmembranen immobilisiert (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Insgesamt wurden bei diesem Immobilisierungsprozess 49,75 % der vorgelegten 2 mg Papain auf der Kapillarmembran immobilisiert, was einer Menge von 995 µg Papain und einer Enzymdichte von 0,53 µg/cm<sup>2</sup> auf der Kapillarmembran entspricht.

Die Aktivität des immobilisierten Papains wurde spektrometrisch mithilfe des Substrats N- $\alpha$ -Benzoyl-DL-arginin- $\beta$ -naphthylamid-hydrochlorid (BANA) bestimmt. Dieses Substrat wird durch Papain zu 2-Naphthylamin umgesetzt, welches bei einer Wellenlänge von 540 nm spektroskopisch detektiert werden kann. Um die Enzymaktivität des nativen Papains mit der des immobilisierten Papains vergleichen zu können, wurde die funktionalisierte Kapillare für die Bestimmung der Aktivität von immobilisiertem Papain im Mörser zerstoßen, immobilisiert und anschließend in DMSO dispergiert (Immobilisierungsgrad 54,88 %). Für die Bestimmung der Aktivität des nativen Papains wurde die zur Immobilisierung äquivalente Menge Protein in DMSO gelöst. Die spektrometrische Messung wurde anschließend in einer Durchflussküvette durchgeführt und unmittelbar nach Zugabe des Enzyms gestartet. Für natives Papain errechnete sich aus der Steigung der linearen Regression der Absorption über die Zeit eine Enzymaktivität von  $28,14 \pm 0,8$  U/mL und für immobilisiertes Papain eine Enzymaktivität von  $23,88 \pm 0,62$  U/mL (siehe Anhang, Abschnitt Methoden).

Für die Untersuchung der Langzeit-Stabilität wurde der Reaktor im Säulenofen auf 37 °C temperiert, was physiologischen Bedingungen entspricht und im Bereich einer hohen Enzymaktivität des immobilisierten Papains liegt. Eine Temperatur von 50 – 60 °C entspricht zwar dem Optimum der Aktivität von Papain, führt laut Literatur jedoch zu Strukturschäden am IgG-Antikörper und wurde deshalb nicht verwendet [98]. Um die thermische Belastung des IgG-Antikörpers über den Zeitraum der Proteolyse so gering wie möglich zu halten und den Oxidationsprozess des zugesetzten Cysteins zu verlangsamen, wurde der Substrat-Feed auf 4 °C gekühlt. Die peristaltische Pumpe wurde auf eine Flussrate von 11 µL/min eingestellt und der Fraktionssammler auf eine Sammelzeit von

40 min pro Fraktion, was einer Fraktionsgröße von 440  $\mu\text{L}$  entspricht. Über einen Zeitraum von 33,3 h wurden insgesamt 50 Fraktionen gesammelt, die nachfolgend als Proben bezeichnet werden. Dies entspricht einem Gesamtvolumen von 22 mL IgG-Lösung (1 mg/mL). Der Fraktionssammler wurde während des gesamten Zeitraums der Proteolyse auf  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt, um die bestmögliche Stabilität der gesammelten Proben bis zur Verwendung in der SEC-HPLC Analyse zu gewährleisten.

Die SEC-Analyse der gesammelten Proben 5 – 50 in der HPLC wird im Anhang (Abschnitt Methoden) beschrieben. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde lediglich das Chromatogramm jeder fünften Probe sowie die zugehörigen Flächen unter den Kurven zur Quantifizierung des IgG-Antikörpers sowie der IgG-Fab- und Fc-Fragmente grafisch dargestellt (**Abbildung 14**).



**Abbildung 14:** SEC-HPLC Chromatogramm der Proben 5 – 50 des kontinuierlich erzeugten IgG-Hydrolysats. Peak 1: Intakter IgG-Antikörper und Peak 2: IgG Fab- und Fc-Fragmente (A) und AUC von Peak 1 und Peak 2 der Proben 5 – 50 (B).

Es konnte über die gesamte Proteolysedauer von 33,3 h ein messbarer Umsatz von insgesamt 22 mL IgG-Lösung gezeigt werden. Die Quantifizierung zeigt die Tendenz zu sinkendem Umsatz mit zunehmender Proteolysedauer. Zu Beginn des kontinuierlichen Proteolyseprozesses in der Probe 5 lag der IgG-Umsatz bei 40,45 %, in einem vergleichbaren Batch-Prozess war der IgG-Umsatz mit 60,58 % höher. Betrachtet man jedoch das Ende des Proteolyseprozesses in der Probe 50, liegt der Umsatz des immobilisierten Papains auf der keramischen Kapillarmembran noch immer bei 32,82 %. In einem vergleichbaren Batch-Prozess konnte bei Papain in Lösung keinerlei Aktivität mehr festgestellt werden. Während also bei immobilisiertem Papain ein Aktivitätsverlust von 7,63 % über 33,3 h festgestellt wurde, hatte das Papain in Lösung, welches in den Batch-Prozessen verwendet wurde, bereits seine gesamte Aktivität verloren. Die Immobilisierung von Papain führt

auch laut Literatur zu einer Verbesserung der thermischen Stabilität und minimiert den Effekt der Autoproteolyse und des spontanen Entfaltens, kann diese Effekte jedoch nicht vollständig umgehen [99, 100]. Diese Beobachtung konnte auch im Rahmen der vorliegenden Applikation experimentell bestätigt werden.

### 4.2.2 Produktion von Mandel- und Erbsenproteinhydrolysat

Als 2. Anwendungsbeispiel wurden die Nahrungsmittelproteine aus Erbsen- und Mandelisolat mit der Serinprotease Alcalase im kontinuierlichen Keramik-Kapillarmembranreaktorsystem enzymatisch hydrolysiert. Bei Alcalase handelt es sich um eine unspezifische Protease, die in der Lage ist, Nahrungsmittelproteine in Peptidfragmente einer homogenen Längenverteilung von 2 bis 30 AS zu spalten. Der so entstandene Peptid-Fingerprint bleibt bei identisch gewählten Hydrolysebedingungen über einen langen Zeitraum konstant. In dieser Anwendung wurde aufgrund der hervorragenden Eignung für die Protein- und Peptidaufreinigung ein präparatives Niederdruck-Chromatographiesystem (FPLC) zur Aufreinigung der Peptidfraktionen verwendet.

Für die nachfolgenden Versuche wurde die Serinprotease Alcalase mit der NHS/EDC-Aminkupplung auf den funktionalisierten Kapillarmembranen immobilisiert (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Insgesamt sind bei diesem Immobilisierungsprozess 68,67 % der vorgelegten 2 mg Alcalase auf der Kapillarmembran immobilisiert worden, was einer Menge von 1.376 µg Alcalase und einer Enzymdichte von 0,76 µg/cm<sup>2</sup> auf der Kapillarmembran entspricht.

Analog zur Aktivitätsbestimmung des nativen und immobilisierten Papains wurden auch die Aktivitäten der nativen und immobilisierten Alcalase spektrometrisch bestimmt und miteinander verglichen. Hierzu wurde das Substrat Boc-l-alanin-4-nitrophenylester (Boc-Ala-ONP) verwendet, das durch Alcalase zu 4-Nitrophenol umgesetzt wird. Dieses Produkt kann bei einer Absorption von 405 nm Wellenlänge spektrometrisch detektiert werden. Anschließend wurde eine pulverisierte Kapillarmembran mit Alcalase immobilisiert (Immobilisierungsgrad 75,24 %) und in einer Messung im Durchfluss mit der äquivalenten Menge nativer Alcalase verglichen. Die aus der Regressionsgeraden der Absorption über die Zeit berechneten Aktivitäten betragen für immobilisiertes Papain  $23,88 \pm 0,62$  U/mL und für natives Papain 28,14 U/mL (siehe Anhang, Abschnitt Metho-

den). Aufgrund der größeren, für das Enzym zugänglichen Oberfläche, liegt der Immobilisierungsgrad der pulverisierten Kapillarmembranen höher als der von intakten Kapillarmembranen.

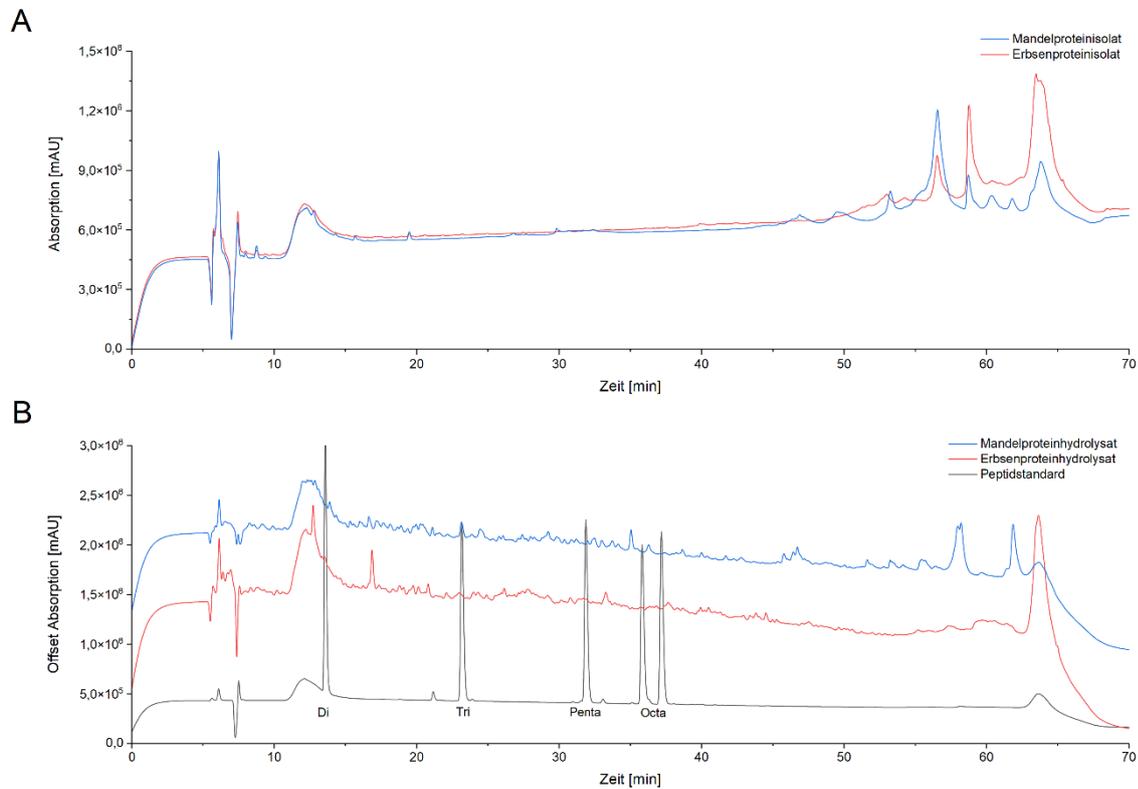
Die Herstellung der Mandel- und Erbsenproteinlösung aus pulverförmigem Proteinisolat erfolgte mittels alkalischer Extraktion (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Die finale Konzentration der Mandelproteinlösung lag bei 7,9 g/L, die der Erbsenproteinlösung bei 12,8 g/L. Damit der Proteolyseprozess unter schonenden, physiologischen Bedingungen und möglichst im Bereich der optimalen Enzymaktivität der Alcalase stattfindet, wurde ein pH-Wert von 7,8 und eine Reaktortemperatur von 40 °C gewählt. Da gezeigt werden konnte, dass die eingesetzten Proteinlösungen stark zu Aggregation neigen, wurde der Substrat-Feed auf 4 °C gekühlt und bei 150 rpm kontinuierlich gerührt. Die Flussrate der Peristaltikpumpe wurde auf 11 µL/min eingestellt, um eine möglichst große Verweilzeit im Reaktorsystem zu erreichen. Die Sammelzeit des Fraktionssammlers wurde auf 90 Minuten eingestellt, was einer Fraktionsgröße von 990 µL entspricht. Insgesamt wurden 30 Fraktionen (= Proben) über einen Zeitraum von 45 h gesammelt. Dies entspricht einem Gesamtvolumen von 29,7 mL Proteinlösung. Der Fraktionssammler wurde auf 4 °C gekühlt, um die Proteinaggregation in den gesammelten Fraktionen über die Dauer des Proteolyseprozesses zu verlangsamen.

Die Analyse der hergestellten Mandel- und Erbsenproteinlösungen sowie der Fraktionen 5 – 30 der im Reaktorsystem erzeugten Mandel- und Erbsenproteinhydrolysate wurde mittels RP-HPLC durchgeführt (siehe Anhang, Abschnitt Methoden).

Mandelproteinisolat besteht zu 65 – 70 % aus dem *Almond major protein* (AMP), welches auch als Amandin bezeichnet wird. Es handelt sich um ein Speicherprotein, das zur Gruppe der 14S Globuline gehört. Die Albuminfraktion macht bei Mandelproteinisolat 20 % des Gesamtanteils aus, den kleinsten Anteil stellt mit etwa 10 % die Gluteninfraktion dar [101]. Die Globulinfraktion des Erbsenproteinisolats umfasst 70 – 80 % des Gesamtproteingehalts und besteht aus den Proteinen Legumin, Vicilin und Convicilin. Die restlichen 20 – 30 % der Proteine gehören der Albuminfraktion an [102]. Diese nativen Proteine können den Peaks ab einer Retentionszeit von 50 min zugeordnet werden. Während der Proteolyse werden diese Proteine in Peptide eines homogenen Längenspektrums von 2 bis ca. 30 Aminosäuren umgewandelt, so dass ein sogenannter charakteristischer Pep-

## Ergebnisse und Diskussion

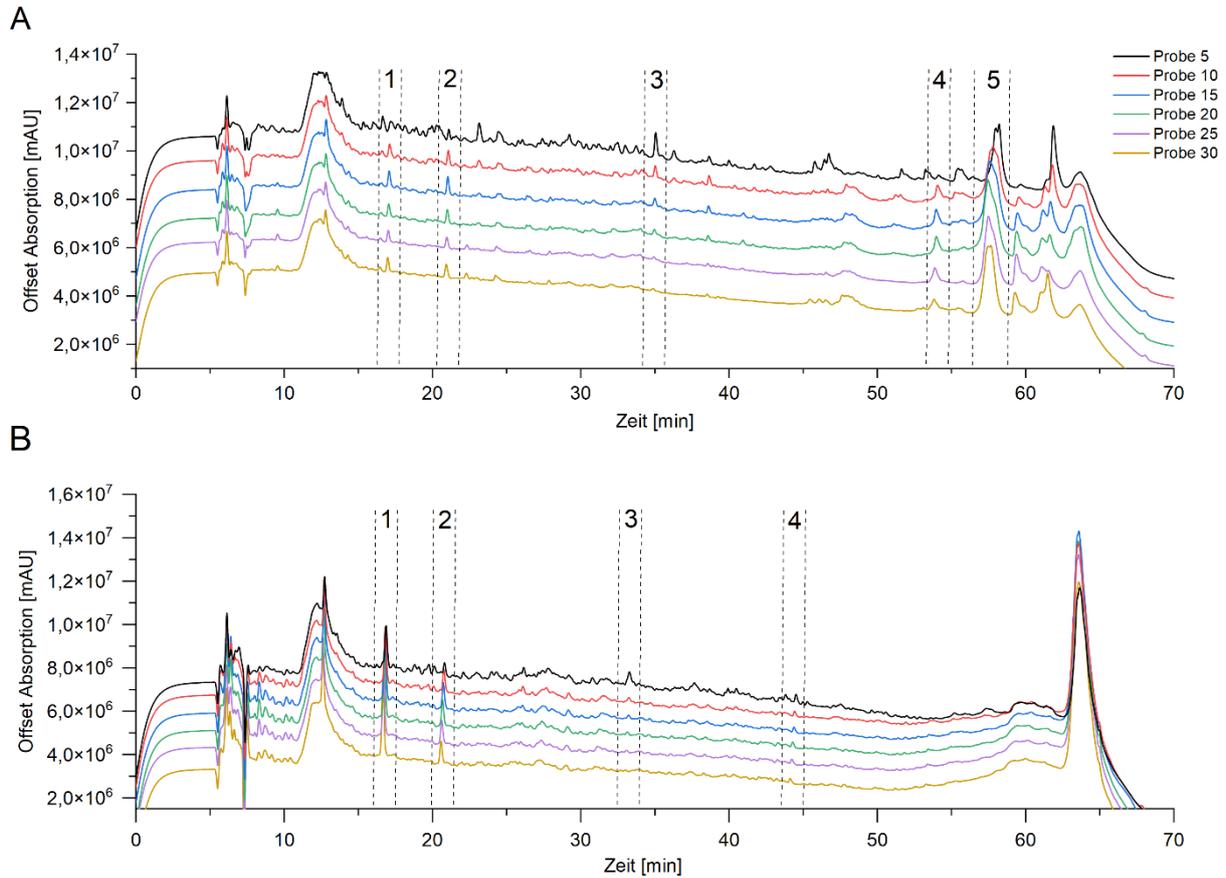
tid-Fingerprint entsteht. Insgesamt konnten im Rahmen des kontinuierlichen Proteolyseprozesses mit den immobilisierten keramischen Kapillarmembranen 82,58 % des Mandelproteinisolats und 76,28 % des Erbsenproteinisolats in die jeweiligen Peptide umgesetzt werden (**Abbildung 15**).



**Abbildung 15:** RP-HPLC Chromatogramm von Mandelprotein- und Erbsenproteinisolat (A) sowie Mandel- und Erbsenproteinhydrolysat mit Peptidstandard (B).

Im Rahmen der Untersuchungen der Langzeitstabilität des Prozesses wurden über einen Zeitraum von 45 h insgesamt 30 Fraktionen (= Proben) gesammelt und in der RP-HPLC untersucht. Hierbei zeigte sich ein konsistenter Peptid-Fingerprint mit markanten Peaks über die gesamte Proteolysezeit. Die immobilisierte Alcalase verzeichnete in diesem Zeitraum einen durchschnittlichen Aktivitätsverlust von 23,08 %, wobei letzterer bei gelöster Alcalase in vergleichbaren Batch-Prozessen mit 46,2 % ungefähr doppelt so hoch war. In den ersten fünf Proben sind etwas ausgeprägtere Peaks zu erkennen als in den darauffolgenden Proben, was vermutlich auf die Aggregation von Proteinen auf der Oberfläche der keramischen Kapillarmembranen zurückzuführen ist. Dieser Effekt ist bei Man-

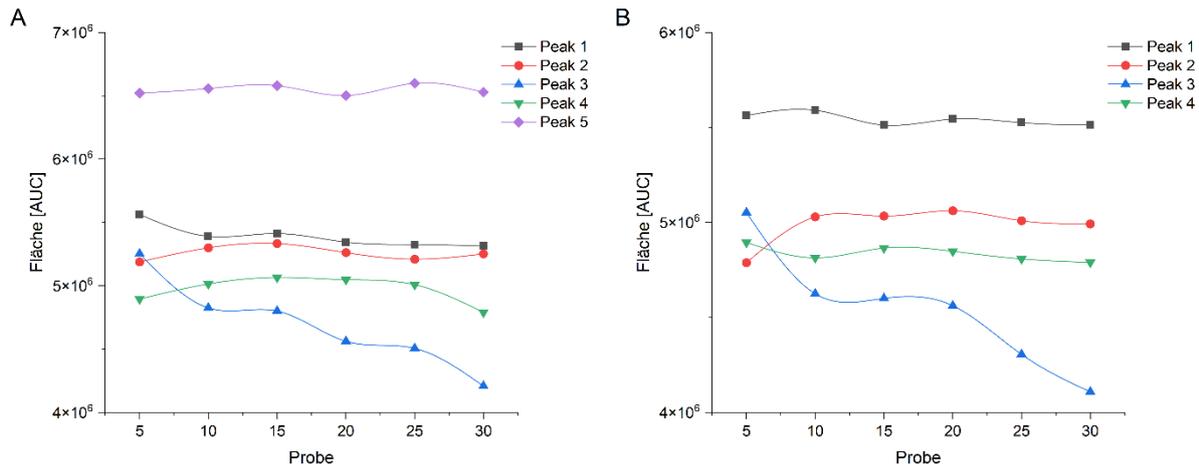
delproteinhydrolysat ausgeprägter als bei Erbsenproteinhydrolysat, was sich mit der beobachteten Proteinaggregation auf der Kapillarmembranoberfläche deckt (**Abbildung 16**).



**Abbildung 16:** RP-HPLC Chromatogramm der Proben 5 – 30 des Mandelproteinhydrolysats (A) und des Erbsenproteinhydrolysats (B) mit ausgewählten, markanten Peaks.

Die Fläche unter ausgewählten markanten Peaks in dem kontinuierlich erzeugten Mandel- und Erbsenproteinhydrolysat wurde mittels Integration ermittelt, um die Stabilität der Peaks über die Hydrolysedauer zu visualisieren. Für das Mandelproteinhydrolysat wurden die Peaks 1 – 5 und für das Erbsenproteinhydrolysat die Peaks 1 – 4 betrachtet (**Abbildung 16, Abbildung 17**).

## Ergebnisse und Diskussion



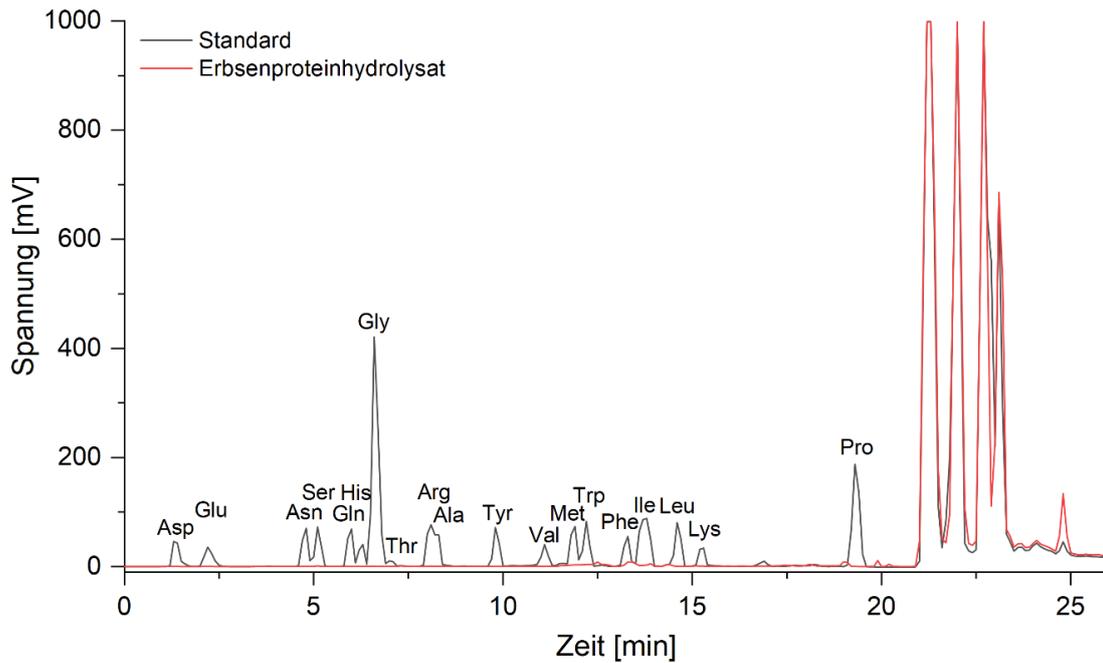
**Abbildung 17:** Integration der Peakflächen der ausgewählten, markanten Peaks 1 – 5 des Mandelproteinhydrolysats (A) und der Peakflächen der ausgewählten, markanten Peaks 1 – 4 des Erbsenproteinhydrolysats (B) der jeweiligen Proben 5 – 30.

Es ist zu erkennen, dass die Peaks 2 und 5 des Mandelproteinhydrolysats über die gesamte Hydrolysedauer stabil bleiben. Während bei Peak 4 lediglich in Probe 30 eine deutliche Abnahme der Fläche zu erkennen ist, nimmt die Peakfläche von Peak 3 bereits von Beginn des Prozesses an stark ab. Außerdem ist bei Peak 1 eine leichte, kontinuierliche Abnahme von Beginn des Prozesses an zu erkennen. Die Peaks 1, 2 und 4 des Erbsenproteinhydrolysats bleiben über die gesamte Hydrolysedauer stabil, wohingegen die Fläche von Peak 3 bereits von Beginn des Prozesses an abnimmt. Dieses Verhalten kann mit den unterschiedlichen Eigenschaften der erzeugten Peptide erklärt werden. Wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben wurde, kommt es bei der verwendeten Flussrate von  $11 \mu\text{L}/\text{min}$  zu einer starken Rückvermischung des Hydrolysats in der keramischen Kapillarmembran. Durch die verschiedene Größe und Oberflächenbeschaffenheit der erzeugten Peptide könnten sterische Effekte zu einem unterschiedlichen Retentionsverhalten von spezifischen Peptiden führen. Die Peptide in den Peaks 3 des Mandel- und Erbsenproteinhydrolysats, die bereits zu Beginn des Hydrolyseprozesses deutlich abnehmen, könnten sich aufgrund dessen besonders lange im Kapillarmembranreaktor aufgehalten haben und so durch Alcalase weiter hydrolytisch gespalten werden. Auch die Oberflächenladung der Peptide in ihrer Tertiärstruktur spielt eine wesentliche Rolle bei der Proteinaggregation. Es ist anzunehmen, dass einige Peptide, wie die in den Peaks 3 des Mandel- und Erbsenproteinhydrolysats, besonders stark zur Aggregation neigen, wodurch sich ihre Konzentration kontinuierlich verringert, da sie sich an der Kapillarmembran ablagern. Wie an der

nur leichten Abnahme der Peakfläche von Peak 1 des Mandelproteinhydrolysats zu erkennen ist, kann dieser Effekt unterschiedlich ausgeprägt sein. Während ein solcher Effekt sich hier unmittelbar auf die Konzentration der Peptide auswirkt, kann dieser auch verzögert auftreten, wie dies bei Peak 4 des Mandelproteinhydrolysats zu sehen ist.

Proteinaggregation ist ein kritischer Parameter bei der Hydrolyse von Lebensmittelproteinen. Aggregierte Proteine sind für einen proteolytischen Verdau deutlich schlechter zugänglich und bilden einen Film auf der Kapillarmembranoberfläche, welcher den Proteolyseprozess zusätzlich negativ beeinflusst [103]. Die Temperatur und die Dauer des Proteolyseprozesses haben den größten Einfluss auf die Proteinaggregation, die hauptsächlich im beheizten Kapillarmembranreaktor beobachtet werden konnte. Obwohl durch Kühlung und kontinuierliche Durchmischung des Substrat-Feeds alle möglichen Maßnahmen zur Reduzierung der Proteinaggregation getroffen wurden, konnte sie dennoch nicht gänzlich verhindert werden. Dies hängt auch mit der Notwendigkeit zusammen, den Kapillarmembranreaktor auf eine Temperatur zu erhitzen, bei der eine ausreichende Proteaseaktivität gewährleistet ist. Bei der kontinuierlichen Proteolyse von Lebensmittelproteinen muss also immer zwischen der Proteinaggregation und der Proteaseaktivität abgewogen werden [104].

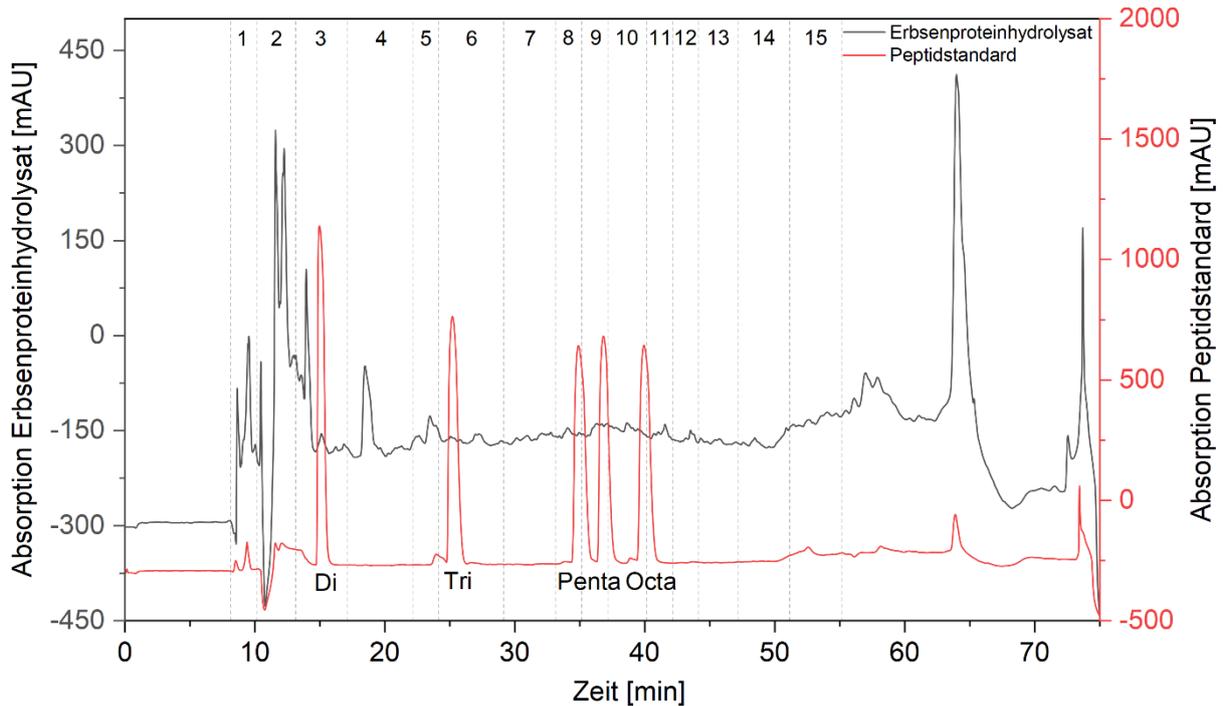
Da Alcalase zur Gruppe der Endopeptidasen gehört, ist die Abspaltung einzelner Aminosäuren auch bei sehr langen Verdauzeiten nicht zu erwarten. Die Entstehung einzelner Aminosäuren durch andere Einflussfaktoren während des Proteolyseprozesses sollte jedoch ausgeschlossen werden. Hierzu wurde eine OPA/Fmoc-Derivatisierung mit anschließender RP-HPLC durchgeführt (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Es konnte verifiziert werden, dass das erzeugte Erbsenproteinhydrolysat neben den Peptiden keine einzelnen Aminosäuren beinhaltet (**Abbildung 18**).



**Abbildung 18:** Analyse der im kontinuierlich produzierten Erbsenproteinhydrolysat enthaltenen Aminosäuren mittels OPA/Fmoc Derivatisierung und anschließender RP-HPLC.

### 4.2.2.1 Aufreinigung des Erbsenproteinhydrolysats

Das gesammelte Erbsenproteinhydrolysat wurde in einer präparativen RP-FPLC aufgereinigt, um die gesammelten Peptidfraktionen dann auf ausgewählte bioaktive Eigenschaften untersuchen zu können. Für die Aufreinigung wurden die Bedingungen der RP-HPLC auf das RP-FPLC System übertragen (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Der Peptid-Fingerprint in RP-FPLC und RP-HPLC ist nahezu identisch, was auf einen erfolgreichen Transfer der RP-HPLC auf die RP-FPLC Methode schließen lässt. Während des Laufs wurden minütlich Fraktionen gesammelt, die anschließend in 15 verschiedenen Proben sinnvoll vereinigt wurden, um möglichst markante Peaks vollständig in einer einzelnen Probenfraktion zu sammeln (**Abbildung 19**). Die gesammelten Proben 1 – 15 wurden anschließend gefriergetrocknet, um alle Lösungsmittelrückstände aus dem Chromatographieprozess vollständig zu entfernen (siehe Anhang, Abschnitt Methoden).



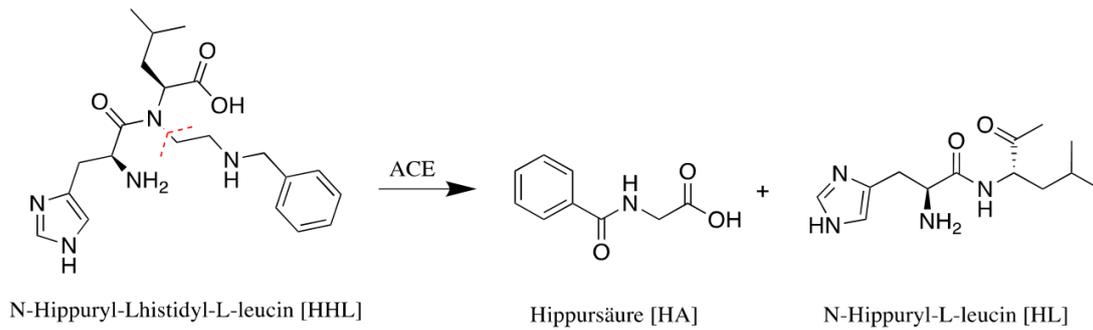
**Abbildung 19:** Präparative RP-FPLC des Erbsenproteinhydrolysats mit Fraktionierungsschema der gesammelten Peptidfraktionen und Peptidstandard.

### 4.2.2.2 Bioaktivitätstests

Die chromatographisch aufgereinigten Peptidfraktionen 1 – 15 wurden in drei ausgewählten Bioaktivitätsstudien auf potenziell antihypertensive, antikanzerogene und antimikrobielle Eigenschaften untersucht. Die gefriergetrockneten Peptidfraktionen wurden hierfür in 20 mM POPSO Puffer pH 7,8 resuspendiert und auf eine einheitliche Konzentration von 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  normiert. Alle Versuche und Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und anschließend das arithmetische Mittel gebildet.

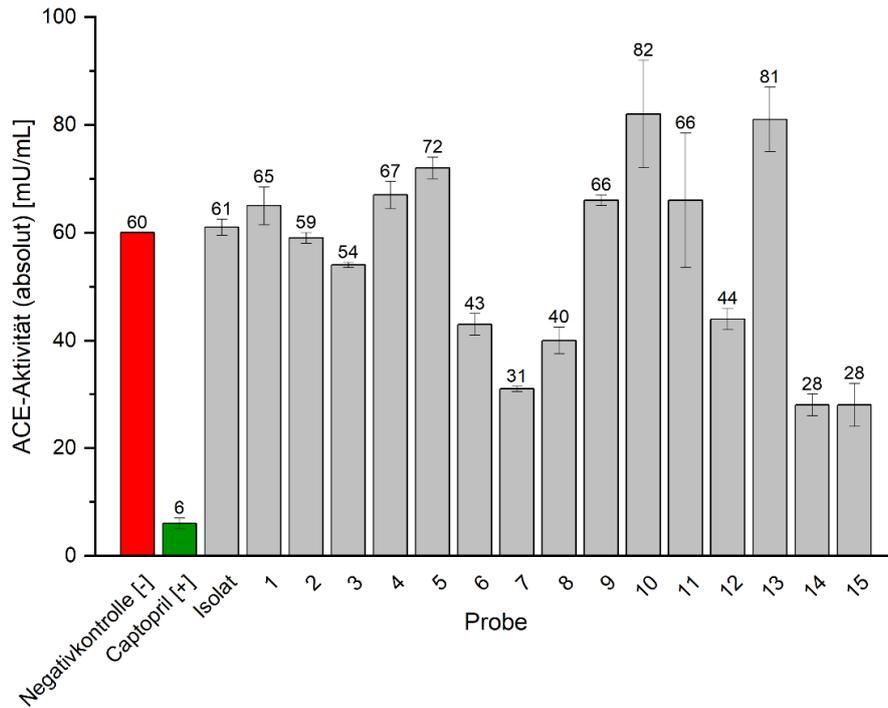
#### 4.2.2.2.1 Test auf antihypertensive Wirkung

Für die Untersuchung der antihypertensiven Eigenschaften der Peptidproben wurde ein ACE-Inhibierungsassay eingesetzt. Es handelt sich um einen enzymatischen Aktivitätsassay, in dem die inhibierende Wirkung der Peptidproben auf das ACE untersucht wurde. Das ACE-Substrat HHL wird hydrolytisch in die zwei Bestandteile HL sowie Hippursäure (HA) gespalten (**Abbildung 20**). Alle Komponenten dieser enzymatischen Reaktion konnten in einer RP-HPLC Analyse quantifiziert werden (siehe Anhang, Abschnitt Methoden).



**Abbildung 20:** Reaktionsschema der Hydrolyse des ACE-Substrates HHL in die zwei Bestandteile Hippursäure (HA) und HL.

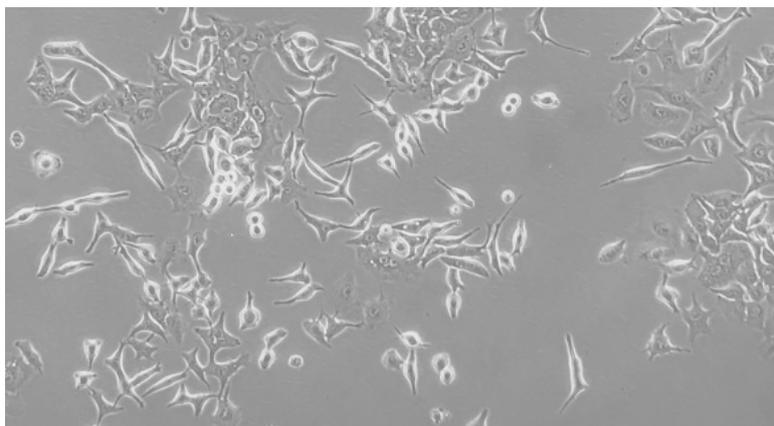
Als Positivkontrolle ist der kommerzielle ACE-Inhibitor Captopril eingesetzt worden und als Negativkontrolle und Referenz diente eine Probe mit einer ACE-Aktivität von 60 mU/mL, ohne Zugabe einer Probensubstanz. Während nicht-hydrolysiertes Erbsenproteinisolat keine Auswirkungen auf die ACE-Aktivität hatte, zeigte der kommerzielle ACE-Inhibitor Captopril eine stark ACE-inhibierende Wirkung und senkte die Aktivität von initial 60 mU/mL auf 6 mU/mL. Die hohe Aktivität und Standardabweichung in Probe 1 war vermutlich auf die versehentliche Zugabe einer doppelten Enzymmenge ACE zurückzuführen. Bei Halbierung der Aktivität ist keine signifikante Auswirkung auf die ACE-Aktivität zu erkennen. Basierend auf empirischen Daten aus der Literatur wurde eine Senkung der ACE-Aktivität um 50 % und mehr als signifikant erachtet [105]. Ein solcher Effekt war bei den Peptidproben 7 (31 mU/mL, Senkung um ca. 50 %), 14 (28 mU/mL, Senkung um ca. 53 %) und 15 (28 mU/mL, Senkung um ca. 53 %) zu beobachten. Die Proben 6 (43 mU/mL, Senkung um 28 %), 8 (40 mU/mL, Senkung um 33%) und 12 (44 mU/mL, Senkung um 27 %) könnten eine schwache ACE-inhibierende Wirkung aufweisen, wurden jedoch aufgrund der definierten Signifikanzschwelle als nicht-signifikant angesehen. Die Proben 5 (72 mU/mL, Erhöhung um 20 %), 10 (82 mU/mL, Erhöhung um 37 %) und 13 (81 mU/mL, Erhöhung um 35 %) schienen die ACE-Aktivität sogar zu erhöhen. In der Literatur sind ebenfalls Mechanismen und Peptide beschrieben, die in der Lage sind, die ACE-Aktivität zu erhöhen. Die Erhöhung der ACE-Aktivität nach Inkubation mit den Peptidproben könnte also auf vergleichbare Mechanismen zurückzuführen sein (**Abbildung 21**) [106, 107].



**Abbildung 21:** Absolute ACE Aktivität des Angiotensin-converting-enzyme in einem ACE-Aktivitätsassay der Peptidproben 1 – 15 und Erbsenproteinisolat als Kontrolle.

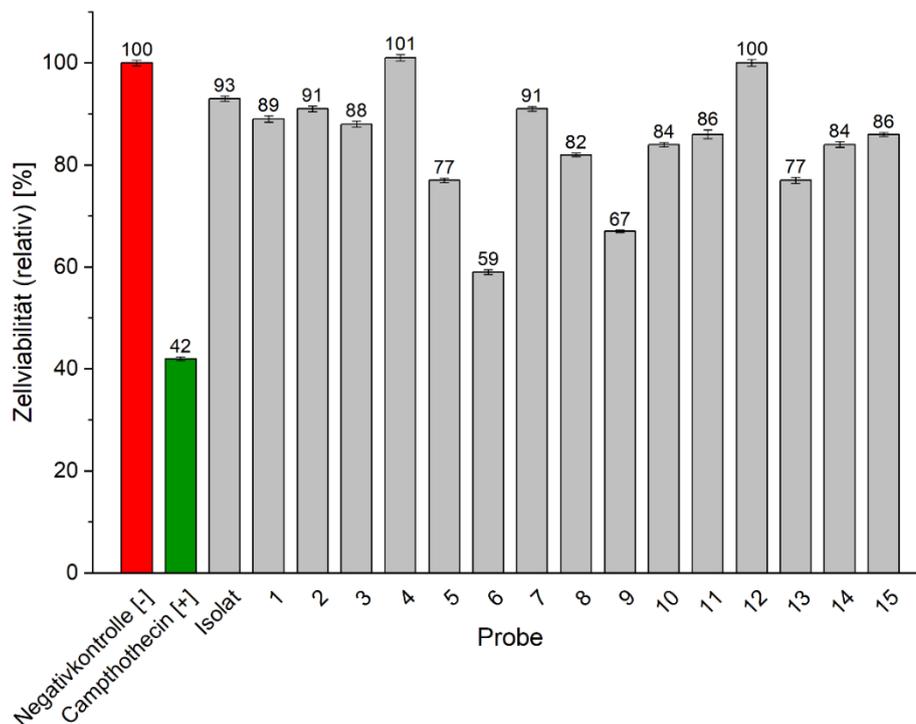
#### 4.2.2.2.2 Test auf antikanzerogene Wirkung

Für die Untersuchung der Peptidproben des kontinuierlich erzeugten Erbsenproteinhydrolysats auf eine potenziell zytostatische bzw. antikanzerogene Wirkung wurde die Lungenkrebszelllinie A549 kultiviert und anschließend mit den jeweiligen Peptidproben inkubiert (**Abbildung 22**).



**Abbildung 22:** Polarisationsmikroskopische Aufnahme der Kultur einer A549 Lungenkrebszelllinie.

Anschließend wurde ein Zellviabilitätsassay (CTB) durchgeführt, um die Viabilität der Lungenkrebszellen nach Inkubation mit den Peptidproben zu bestimmen (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Als Negativkontrolle und Referenz diente hierbei eine Zellkultur von A549, der keine Prüfsubstanz zugegeben wurde. Als Positivkontrolle kam das Zytostatikum Camptothecin zum Einsatz. Es handelt sich um ein natürlich vorkommendes Alkaloid des chinesischen Glücksbaumes, welches als Hemmstoff der Topoisomerase I wirkt [105]. Außerdem wurde untersucht, ob das nicht-hydrolysierte Erbsenproteinisolat einen Einfluss auf die Viabilität der Krebszelllinie hat, was aber nicht gezeigt werden konnte. Basierend auf empirischen Daten aus der Literatur in ähnlichen Untersuchungen wurde eine Reduktion der Zellviabilität um mindestens 30 % als signifikant erachtet [106]. Während die Positivkontrolle Camptothecin die Zellviabilität um 58 % senkte, konnte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität auch für die Peptidproben 6 (Reduktion um 41 %) und 9 (Reduktion um 33 %) beobachtet werden. Da Zellwachstum einer biologischen Variabilität unterliegt, wurde bei den restlichen Proben aufgrund eines sehr geringen messbaren Effekts nicht von einem Einfluss der Peptidproben auf die Zellviabilität ausgegangen. Es ist ebenfalls unwahrscheinlich, dass die Peptidprobe 4 einen zellproliferierenden Effekt auf die Lungenkrebszellen hat, da ein solcher Mechanismus nicht in der Literatur beschrieben ist (**Abbildung 23**).

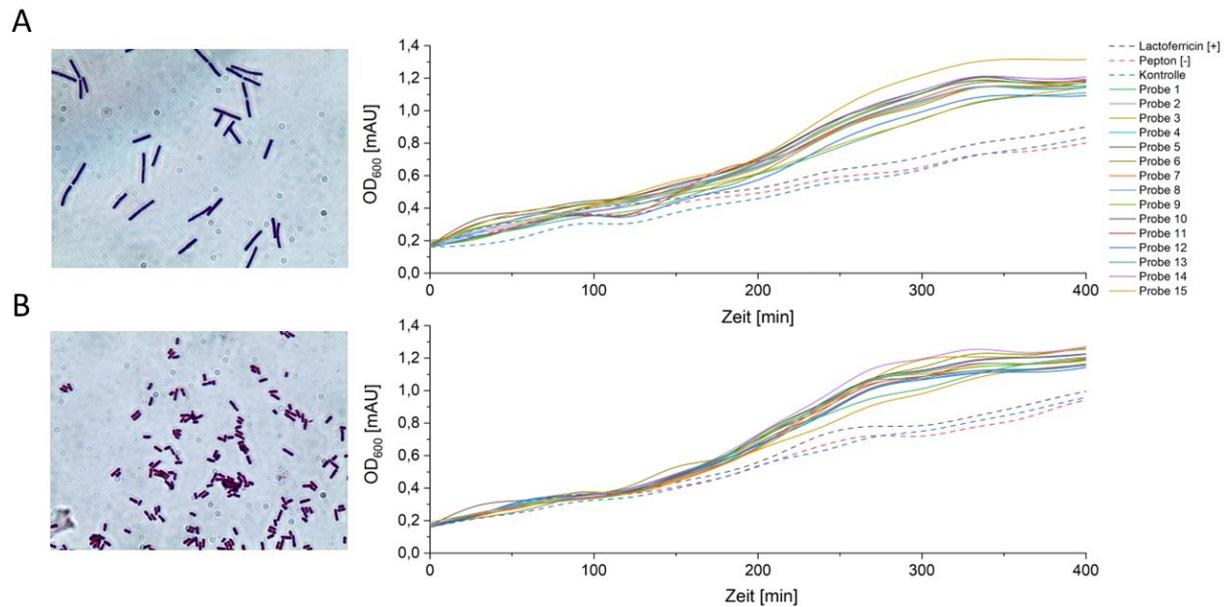


**Abbildung 23:** Relative Zellviabilität einer A549 Lungenkrebs-Zelllinie nach Inkubation mit den Peptidproben 1 – 15 und Erbsenproteinisolat als Kontrolle.

### 4.2.2.2.3 Test auf antimikrobielle Wirkung

Für die Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften der Peptidproben wurden zwei bakterielle Stämme in einem definierten, peptid- und aminosäurefreien Medium kultiviert und anschließend in einem Bouillon-Mikroverdünnungsassay eingesetzt. Um sowohl den Effekt der Peptidproben auf gram-positive als auch auf gram-negative Bakterien untersuchen zu können, kam als gram-positiver Modellorganismus *B.subtilis* wt und als gram-negativer Modellorganismus *E.coli* K1 zum Einsatz. Es wurde außerdem eine Gramfärbung durchgeführt, um Kreuzkontaminationen der beiden Stämme auszuschließen. Das bakterielle Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge ( $OD_{600}$ ) über einen Zeitraum von 400 Minuten beobachtet. Bei der Referenzprobe handelt es sich um eine Kultur der jeweiligen Stämme ohne Zugabe einer Proben-substanz. Als Positivkontrolle wurde das in der Literatur beschriebene, antimikrobielle Peptid Lactoferricin B und als Negativkontrolle das Peptidgemisch Pepton eingesetzt (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Anhand der erhaltenen Daten ist davon auszugehen, dass keine der untersuchten Peptidproben in dem durchgeführten Bouillon-Mikroverdünnungsassay über eine antimikrobielle Wirkung gegenüber *B.subtilis* wt und *E.coli* K1 verfügt. In den aufgenommenen Wachstumskurven ist zu erkennen, dass die Peptidproben das bakterielle Wachstum sogar um durchschnittlich 35 % erhöhen. Dieses Verhalten ist für Peptide zu erwarten, die nicht mit der Zellmembran oder anderen intrazellulären Zielstrukturen der Bakterien interagieren, da sie schließlich von den Bakterien metabolisiert werden. Das bakterielle Wachstum wird hierdurch begünstigt [108]. Dementsprechend kommt es vermutlich zu keiner Interaktion der Peptide in den Peptidproben mit der bakteriellen Zellwand oder anderen, intrazellulären Zielstrukturen. Es ist ebenfalls zu beobachten, dass die Affinität der Bakterien gegenüber der Peptidproben höher zu sein scheint als gegenüber dem Pepton, welches als Negativkontrolle verwendet wurde, da die Wachstumskurve deutlich niedriger liegt als die der Peptidproben. Auch die antimikrobielle Aktivität des Lactoferricin B gegenüber den eingesetzten Stämmen konnte in diesem Experiment nicht bestätigt werden. Die antimikrobielle Wirkung von Lactoferricin B gegen verschiedene Pathogene wie *S.aureus*, *S.pyogenes*, *L.monozytogenes* und *EHEC*, wurde in diversen Studien untersucht und bestätigt. Da sich jeder bakterielle Stamm anders verhält, kann sich das Lactoferricin B bei den in diesem Experiment untersuchten Stämmen

anders auswirken. Es ist zudem möglich, dass die eingesetzte Konzentration von Lactoferricin B nicht ausreichend war, um eine sichtbare Hemmung des bakteriellen Wachstums hervorzurufen (**Abbildung 24**).

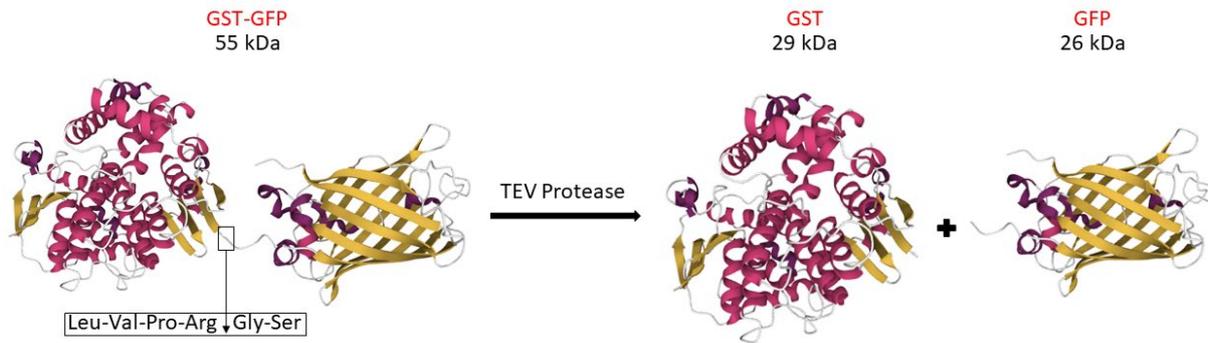


**Abbildung 24:** Bakterielle Wachstumskurven in Anwesenheit der Peptidproben 1 – 15 und Gram-Färbung mit anschließender polarisationsmikroskopischer Aufnahme und *B. subtilis* wt (A) und von *E. coli* K1 (B).

### 4.2.3 Produktion und Spaltung des Fusionsproteins GST-GFP

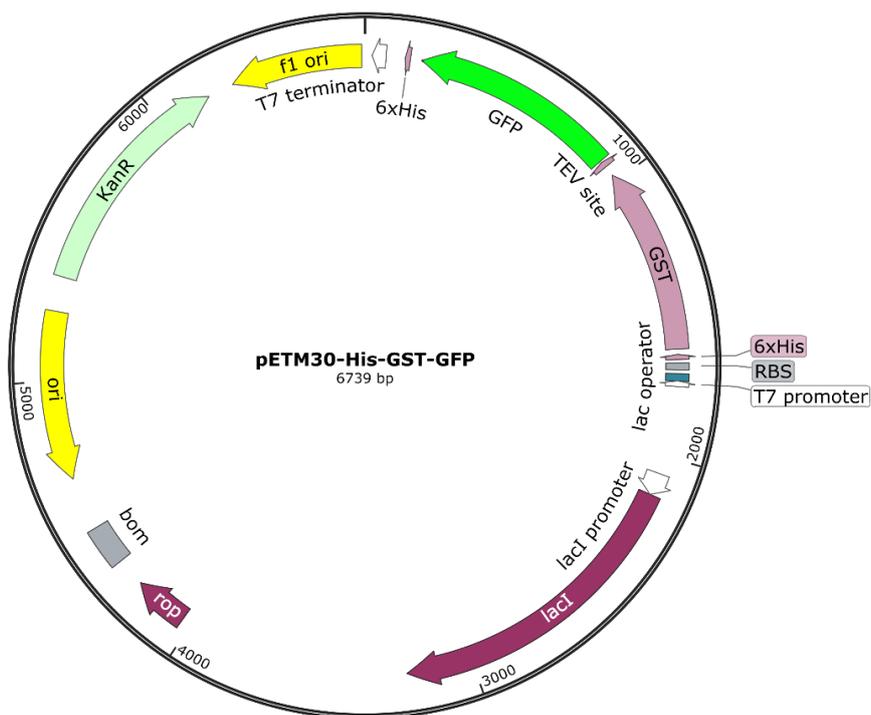
Als 3. Anwendungsbeispiel wurde die GST-Fusionsdomäne mithilfe der hochspezifischen TEV-Protease mit dem kontinuierlichen Keramik-Kapillarmembranreaktorsystem von einem GST-GFP-Fusionsprotein abgespalten. Die TEV-Protease spaltet innerhalb der in **Abbildung 25** gezeigten Erkennungssequenz im 55 kDa großen Fusionsprotein hochspezifisch die Bindung zwischen Arginin und Glycin und führt somit zur Trennung der 29 kDa großen GST-Fusionsdomäne von dem 26 kDa großen GFP.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 25:** Reaktionsschema der proteolytischen Spaltung des GST-GFP Fusionsproteins mit TEV Protease.

Für die Spaltversuche musste das Fusionsprotein GST-GFP zuerst rekombinant in *E.coli* BL21 DE3 mithilfe eines pETM30-Vektors produziert (**Abbildung 26**) und anschließend mit der Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie aufgereinigt werden.

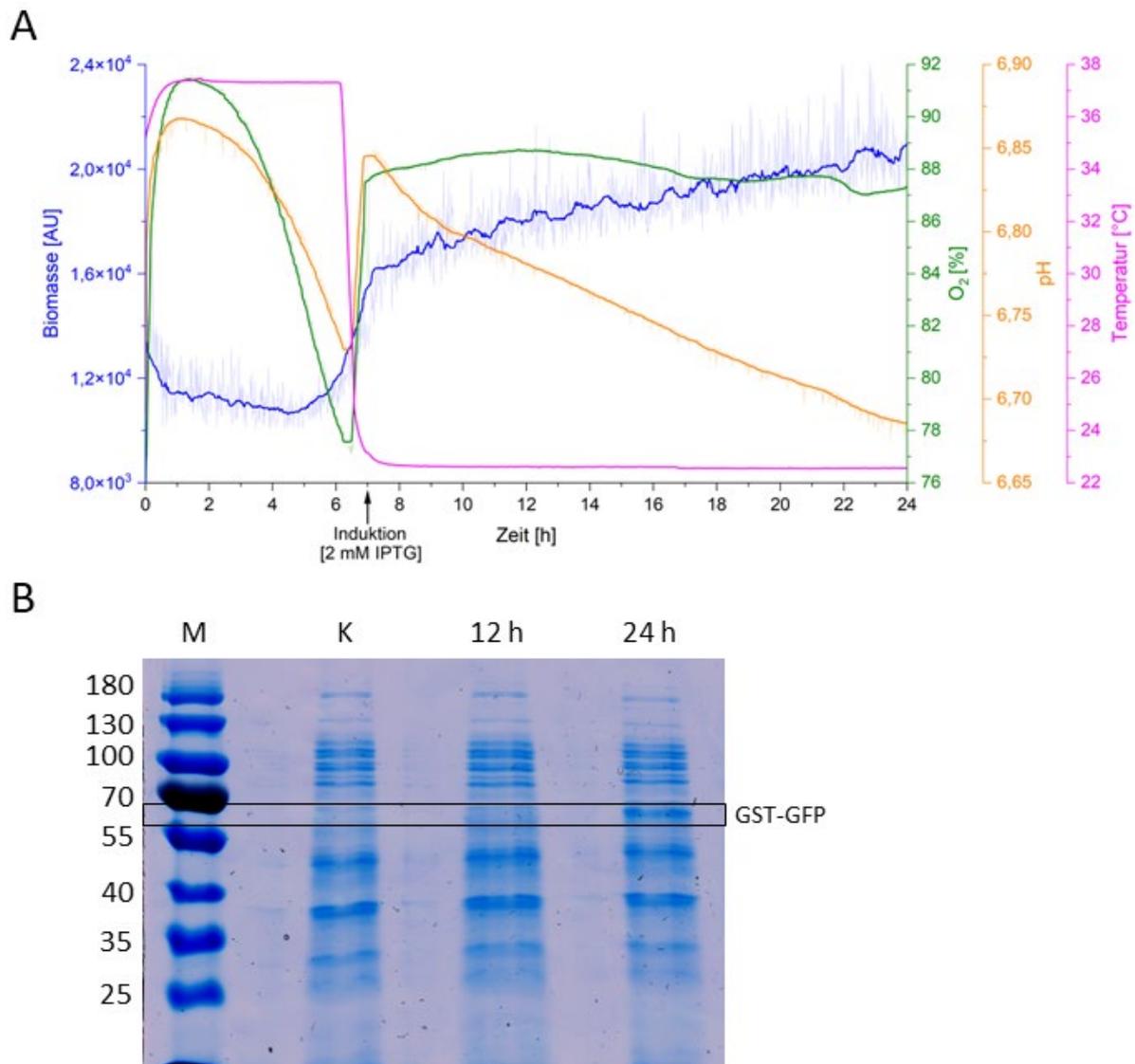


**Abbildung 26:** Vektorkarte des zur Produktion des GST-GFP Fusionsproteins in *E.coli* BL21 DE3 eingesetzten Vektors.

Die Produktion des Fusionsproteins GST-GFP erfolgte in einer 3 L Schüttelkolbenkultivierung (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Neben einem N-terminalen GST-Tag enthält das exprimierte Protein einen N-terminalen Polyhistidin-Tag, der sich dem GST-Tag an-

schließt. Das Fusionsprotein enthält außerdem einen weiteren, C-terminalen Polyhistidin-Tag. Dank einer TEV-Spaltsequenz kann die N-terminale GST-His-Domäne mithilfe der TEV-Protease abgespalten werden.

Die Kultivierung erfolgte im Zyp31 Hochzell dichtem Medium in Schüttelkolben mit Schikanten, um den Sauerstoffeintrag zu verbessern. Als Kohlenstoffquelle diente Glucose und als Antibiotikum zur Verhinderung von Plasmidverlust und Kontaminationen wurde gemäß der Resistenz Kanamycin eingesetzt. Die Kultivierung wurde bei 37 °C und 150 rpm im Inkubationsschüttler gestartet, bevor die Temperatur vor der Induktion in der exponentiellen Phase mit 2 mM IPTG auf 22 °C abgesenkt wurde. Niedrigere Temperaturen verlangsamten den Produktionsprozess, verringern jedoch erheblich den Anteil von fehlgefalteten Proteinen und Einschlusskörpern [109]. Die Kultivierungsparameter wurden über die gesamte Kultivierungsdauer mithilfe optischer Sensoren (SFRvario) überwacht. Wie zu erwarten, verlangsamte sich sowohl durch das Absenken der Temperatur als auch durch die Produktion des Zielproteins das bakterielle Wachstum, sodass das exponentielle Wachstum in ein lineares Wachstum überging. Hierdurch kam es während des Produktionsprozesses nicht zu einer Sauerstofflimitierung im Schüttelkolben. Der pH-Wert nahm im Laufe des Produktionsprozesses aufgrund der Expression bakterieller Proteine stetig ab. Um die Produktbildung zu verfolgen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung zusätzlich Proben genommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen (**Abbildung 27**).

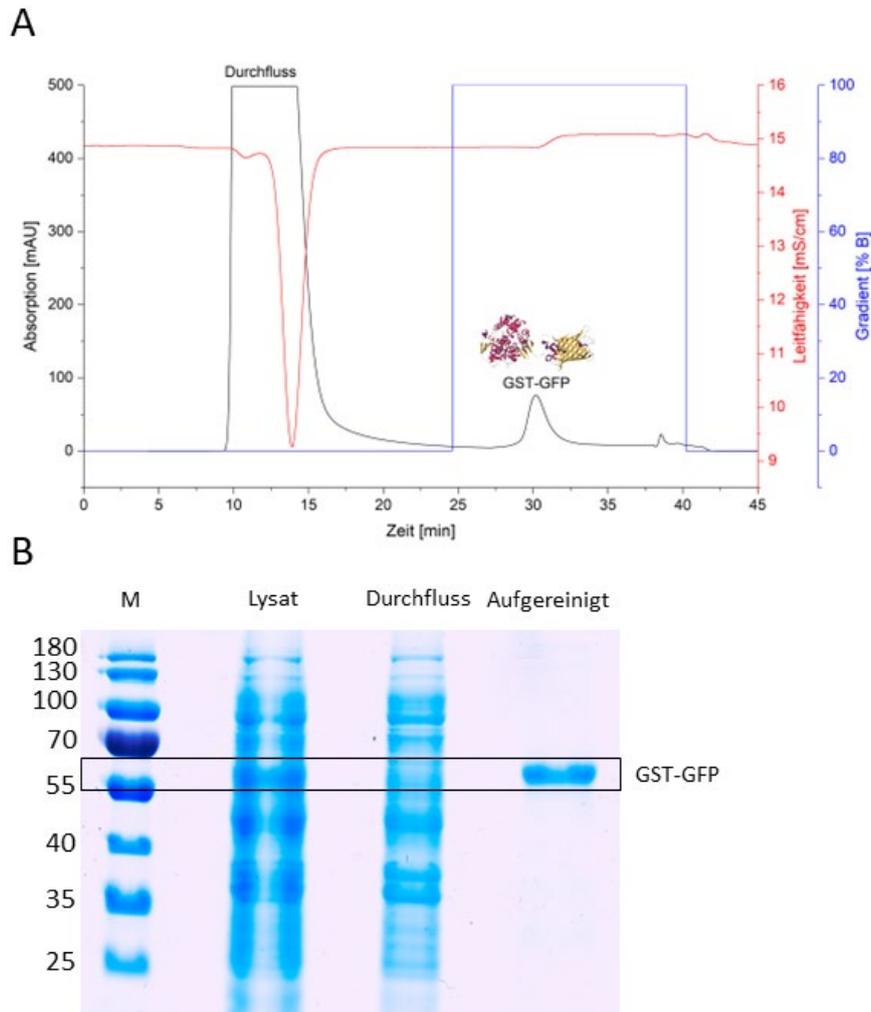


**Abbildung 27:** Überwachung von Biomasse, Sauerstoff, pH und Temperatur über die Dauer der Kultivierung von *E.coli* BL21 DE3 und der Produktion von GST-GFP mit dem SFRvario (A) und SDS-Gel mit Probenahme nach 12 h sowie 24 h des Produktionsprozesses und nicht-induzierten Zellen als Kontrolle (B).

Da das Zielprotein nicht in das Medium sekretiert wird, sondern im Cytoplasma vorliegt, wurde nach Beendigung des Produktionsprozesses ein Zellaufschluss notwendig. Nach der Homogenisierung der Zellsuspension mittels Ultraturrax wurde die Zellsuspension in einem Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Zelllysate wurde in einem präparativen FPLC-System mithilfe einer Glutathion Sepharose Affinitätssäule aufgereinigt. Hierbei bindet hochspezifisch lediglich das Zielprotein an die Säulenmatrix, da nur GST-GFP über einen Glutathion-S-Transferase-Tag verfügt. Alle unerwünschten Bestandteile des Zelllysats verlassen die Säule im Durchfluss. In der darauffolgenden, isokratischen Elution mit reduziertem Glutathion wurde das gebundene GST-GFP in einer Stufe mit 100 % Elutionspuffer von der Säule eluiert und mit einem Fraktionsammler

## Ergebnisse und Diskussion

aufgefangen. Dieser Aufreinigungsprozess zeigte im SDS-Gel eine sehr hohe Reinheit des Zielproteins (**Abbildung 28**). Insgesamt konnten in diesem Produktionsprozess aus 3 L Kulturbrühe 14,9 mg GST-GFP Fusionsprotein gewonnen werden, das in den nachfolgenden Arbeiten Verwendung fand (siehe Anhang, Abschnitt Methoden).



**Abbildung 28:** Aufreinigung des Zellysats aus dem GST-GFP Produktionsprozess mit *E.coli* BL21 DE3 mittels GST-Affinitätschromatographie (A) und SDS-Gel des Zellysats, des Durchflusses und des aufgereinigten GST-GFP Fusionsproteins (B).

Mit dem gewonnenen GST-GFP Fusionsprotein wurde eine Versuchsreihe zur Abspaltung der GST-Fusionsdomäne von GFP mit TEV-Protease durchgeführt. Um den Elutionspuffer aus dem Aufreinigungsprozess zu entfernen und mit einem geeigneten Spaltungspuffer für TEV-Protease zu ersetzen, wurde mithilfe einer Entsalzungssäule ein Pufferaustausch durchgeführt. Der optimale Spaltspuffer für die proteolytische Reaktion mit TEV-Protease besteht aus 50 mM TRIS-HCl pH 8 mit 1 mM DTT als Reduktionsmittel. Obwohl TEV-Protease ein Reduktionsmittel erfordert, um die volle Aktivität auszuschöpfen, führen zu

hohe DTT-Konzentrationen zu einer Spaltung der intramolekularen Disulfidbrücken der TEV-Protease. Hierdurch kommt es zu einem Verlust der Tertiärstruktur und somit der Enzymaktivität [110].

Es wurde ein Batch-Prozess und ein kontinuierlicher Prozess mit dem keramischen Kapillarmembranreaktorsystem durchgeführt und verglichen. Die Analytik wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt und mit der Software GelAnalyzer semiquantitativ ausgewertet (Siehe Anhang Abschnitt Methoden und Ergänzendes Material).

Für die Batch-Versuchsreihe wurde GST-GFP in Spaltpuffer vorgelegt und anschließend TEV-Protease hinzugefügt, um die enzymatische Reaktion zu starten. Die Reaktion wurde jeweils unmittelbar nach Zugabe der TEV-Protease (0 h) sowie nach 1, 2, 3 und 4 h durch die Zugabe von Iodacetamid gestoppt. Iodacetamid inhibiert die TEV-Protease irreversibel, indem eine kovalente Bindung mit Cystein im aktiven Zentrum des Enzyms gebildet wird [111].

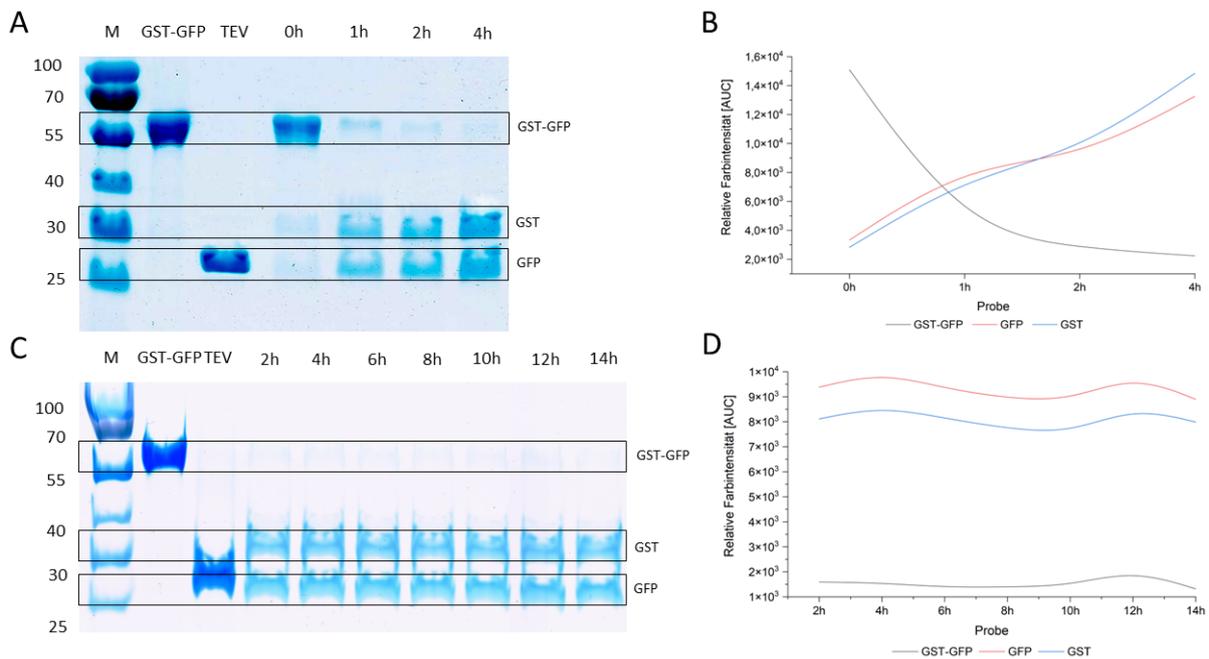
In dem kontinuierlichen Prozess sollte die Langzeit-Stabilität der proteolytischen Spaltreaktion von GST-GFP mit TEV-Protease im keramischen Kapillarmembranreaktorsystem untersucht werden. Hierzu wurde zuerst TEV-Protease mithilfe der NHS/EDC Kopplung auf den keramischen Kapillarmembranen immobilisiert (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). In einer Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay konnte ermittelt werden, dass die erworbene, gefriergetrocknete TEV-Protease ungefähr 40 % aktive TEV-Protease enthielt. Insgesamt wurden bei diesem Immobilisierungsprozess 50,78 % der vorgelegten 800 µg TEV-Protease (Aktivität > 10.000 U/mg) auf der keramischen Kapillarmembran immobilisiert, was einer Menge von 406 µg TEV-Protease und einer Enzymdichte von 0,69 µg/cm<sup>2</sup> auf der Kapillarmembran entspricht. In der Literatur wird beschrieben, dass die Immobilisierung von TEV-Protease eine geringe Effizienz aufweist, da die Protease zu unspezifischen Bindungen an Trägermaterialien neigt und die Ausbildung einer kovalenten Bindung erschwert ist. Die Immobilisierung von TEV-Protease bringt jedoch aufgrund der geringen Stabilität zahlreiche Vorteile hinsichtlich der Langzeitstabilität mit sich [112].

Für die kontinuierliche Proteolyse wurde 10 mL GST-GFP im Substrat-Feed des Reaktorsystems vorgelegt und auf 4 °C gekühlt, um bestmögliche Stabilität des Substrats auch über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten. Die peristaltische Pumpe wurde auf eine Flussrate von 11 µL/min eingestellt, um die Kontaktzeit zwischen dem Substrat und der

## Ergebnisse und Diskussion

immobilisierten TEV-Protease zu maximieren. Der Säulenofen war während der Proteolyse auf 37 °C temperiert, was dem Temperaturoptimum der TEV-Protease entspricht. Der ebenfalls auf 4 °C gekühlte Fraktionssammler sammelte insgesamt 14 Proben mit einer Probengröße von 660 µL über einen Zeitraum von 14 h.

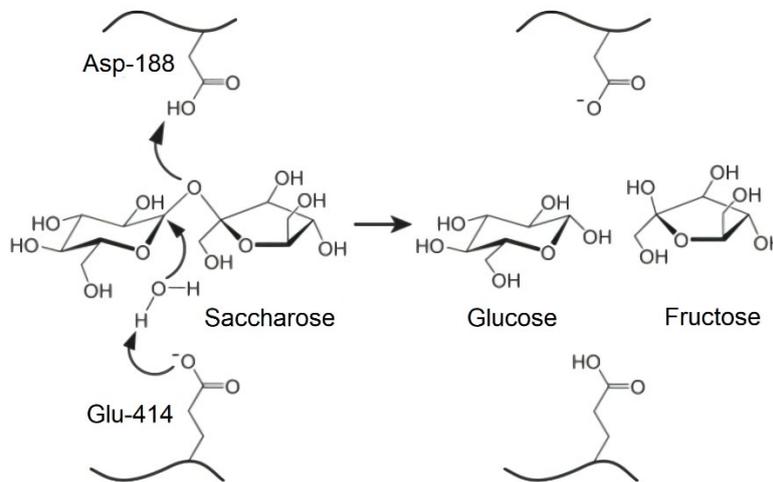
Es ist zu erkennen, dass die TEV-Protease im Batch bereits nach einer Stunde etwa 70 % des GST-GFP gespalten hat. Nach 2 Stunden sind über 80 % des GST-GFP gespalten, nach 4 Stunden sind schließlich nahezu 90 % des Fusionsproteins in seine Bestandteile gespalten worden. Die Verweilzeit im Reaktor beträgt bei einer Flussrate von 11 µL/min ungefähr 90 min, dennoch war in dem durchgeführten Experiment zur Langzeit-Stabilität ein kontinuierlicher Umsatz des GST-GFP Fusionsproteins in GST und GFP von etwa 90 % über den gesamten Proteolysezeitraum zu erkennen. In einem vergleichbaren Batch-Prozess wird für den Umsatz einer äquivalenten Menge Fusionsprotein eine Proteolysezeitdauer von mindestens 4 h benötigt. Es konnte also nicht nur demonstriert werden, dass der Prozess über einen Zeitraum von 14 h mit gleichbleibender Effizienz durchgeführt werden kann, sondern auch, dass der kontinuierliche Prozess deutlich weniger Zeit für einen vergleichbaren Umsatz benötigt als die Durchführung eines Batch-Prozesses (**Abbildung 29**).



**Abbildung 29:** SDS-Gel einer Batch-Spaltung des GST-GFP-Fusionsproteins mit TEV Protease (A) mit semiquantitativer Auswertung des Gels mittels GelAnalyzer Software (B) sowie SDS-Gel einer kontinuierlichen Spaltung im Keramik-Kapillarmembran-Reaktorsystem mit TEV Protease (C) mit semiquantitativer Auswertung des Gels mittels GelAnalyzer Software (D).

### 4.2.4 Produktion von Invertzucker aus Saccharose

Im 4. Anwendungsbeispiel sollte das Anwendungspotential des keramischen Kapillarmembran-Reaktorsystems über proteolytische Anwendungen hinaus untersucht werden. Durch die Immobilisierung der Hydrolase Invertase auf den keramischen Kapillarmembranen konnte das Disaccharid Saccharose in einem kontinuierlichen Prozess in die zwei Monosaccharide Glucose und Fructose gespalten werden. Die Invertase gehört zur Klasse der *retaining*-Glykosidasen, bei der Asp-188 als katalytische Säure und Glu-414 als katalytische Base fungiert. Das Wasser aus dem Lösemittel führt dann einen nucleophilen Angriff auf die glycosidische Bindung der Saccharose aus, was schließlich zu der Spaltung in die Monosaccharide Glucose und Fructose führt (**Abbildung 30**) [113].



**Abbildung 30:** Katalytischer Mechanismus der Invertase bei der Spaltung von Saccharose [113].

Im Rahmen dieser Applikation wurde sowohl die Flussratenabhängigkeit des Umsatzes untersucht als auch die Lagerstabilität der Invertase-immobilisierten, keramischen Kapillarmembranen.

Zuerst wurde die kommerziell erworbene Invertase (Sigma Aldrich, 1 mg/mL, Aktivität  $\geq 300$  U/mg) in einem BCA-Assay untersucht, um die tatsächliche Invertasekonzentration zu ermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass ungefähr 20 % der lyophilisierten Enzymzubereitung aus Invertase bestehen. Für die kovalente Immobilisierung von Invertase auf den keramischen Kapillarmembranen wurde das NHS/EDC Kopplungsverfahren eingesetzt (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Insgesamt wurden in der Versuchsreihe zur Untersuchung der Flussratenabhängigkeit vier verschiedene Flussraten (11, 33, 100 und

200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) verwendet, für die jeweils eine keramische Kapillarmembran immobilisiert wurde. Der durchschnittliche Immobilisierungsgrad der vorgelegten 400  $\mu\text{g}$  Invertase auf den keramischen Kapillarmembranen lag in dieser Versuchsreihe bei 87,81 %, was einer Menge von 350  $\mu\text{g}$  Invertase und einer Enzymdichte von 0,58  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  auf der Kapillarmembran entspricht. Der hohe Immobilisierungsgrad bei Invertase deckt sich mit den Beobachtungen in der Literatur [114].

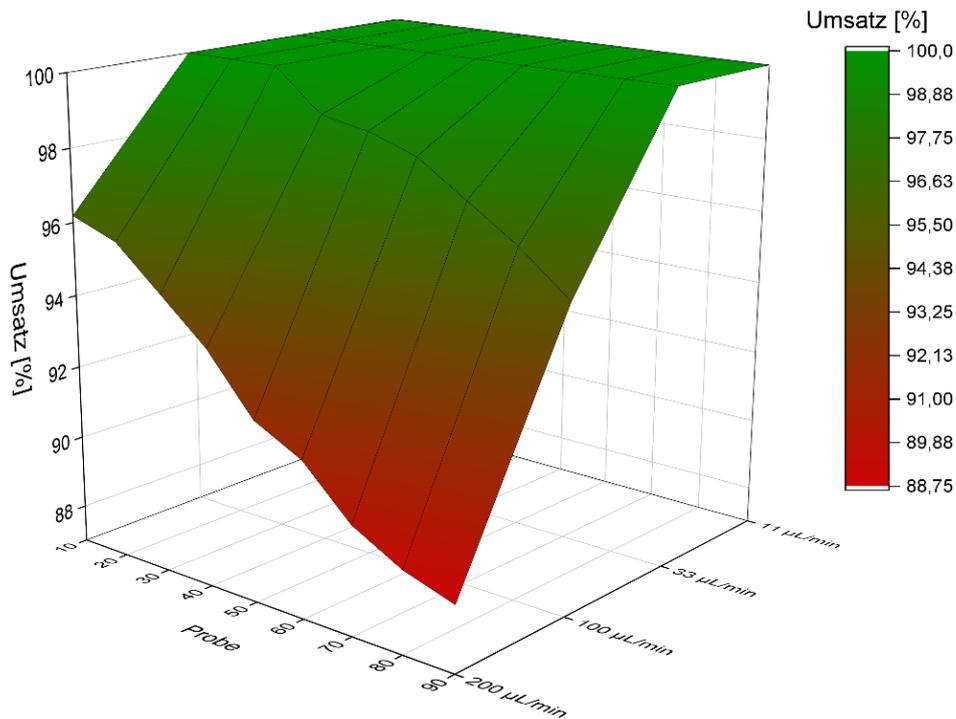
Insgesamt wurden für jede untersuchte Flussrate 100 mL Saccharose mit einer Konzentration von 100 mg/mL im Proben-Feed vorgelegt. Da eine spontane Hydrolyse von Saccharose in Glucose und Fructose in wässriger Lösung bevorzugt bei höheren Temperaturen und stark sauren pH-Werten erfolgt, wurde der Proben-Feed auf 4 °C gekühlt [115]. Es wurde ein NaAc-Puffersystem mit pH 4,5 verwendet, was im optimalen pH-Bereich für die Aktivität der Invertase, jedoch oberhalb des pH-Wertes liegt bei dem saure Hydrolyse auftritt [116]. Der geringfügige Effekt der spontanen Hydrolyse in dieser Versuchsreihe wurde mithilfe einer Kontrollprobe aus dem Umsatz der enzymatischen Reaktion herausgerechnet. Bei der Kontrollprobe handelt es sich um einen identischen, kontinuierlichen Prozess im Reaktorsystem, ohne die Kapillare vorher mit Invertase zu immobilisieren. Mit dem Fraktionssammler wurden jeweils 90 Fraktionen über insgesamt 6 Tage (11  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), 2 Tage (33  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), 15 h (100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) und 7,5 h (200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) gesammelt, was jeweils in etwa 90 mL Saccharoselösung entspricht. Der Fraktionssammler wurde während der gesamten Hydrolysedauer auf 4 °C gekühlt, um die maximale Produktstabilität bis zur Analytik in der NP-HPLC zu gewährleisten (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Für die Quantifizierung der Einzelkomponenten und die Berechnung des Umsatzes ist eine Kalibration erstellt worden (siehe Anhang, Abschnitt Kalibrationen).

### 4.2.4.1 Flussratenabhängigkeit

Der prozentuale Umsatz der vorgelegten Saccharose in den Proben 10 – 90 wurde für jede untersuchte Flussrate berechnet und grafisch dargestellt. In **Abbildung 31** ist zu erkennen, dass die vorgelegte Saccharose bei den Flussraten 11  $\mu\text{L}/\text{min}$  und 33  $\mu\text{L}/\text{min}$  über die gesamte Hydrolysedauer vollständig umgesetzt werden konnte. Bei einer Flussrate von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  kam es ab Probe 30 nach etwa 5 h zu einer kontinuierlichen, leichten Abnahme des Umsatzes. Obwohl der Umsatz der Saccharose bei dieser Flussrate nach einiger Zeit leicht abnahm, lag er am Ende des Hydrolyseprozesses noch immer bei über

95 %. Dieser Effekt könnte mit der thermischen Stabilität der Invertase zu erklären sein. Obwohl die thermische Stabilität von Invertase durch Immobilisierung signifikant erhöht wird, kann es nach einer langen Betriebsdauer des Reaktors zu einem Aktivitätsverlust des immobilisierten Enzyms durch thermische Denaturierung kommen [117, 118]. Es lässt sich ebenfalls beobachten, dass sich die leichte Abnahme des Umsatzes im keramischen Kapillarmembran-Reaktorsystem über die Zeit mit zunehmender Flussrate verstärkt, was auch auf einen Auswascheffekt der immobilisierten Invertase bei hohen Flussraten zurückzuführen sein könnte. Für einen vollständigen Umsatz der vorgelegten Saccharoselösung spielt auch die Verweilzeit im Reaktor eine maßgebliche Rolle. Bei einer Flussrate von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  beträgt die Verweilzeit im Reaktor lediglich 10 Minuten, was auch zu Beginn des Hydrolyseprozesses nicht für einen vollständigen Umsatz ausreichte. Mit über 96 % ist der Umsatz jedoch noch immer als ausgezeichnet einzustufen. Aufgrund von thermischer Denaturierung und Auswascheffekten nahm der Umsatz im Laufe des Hydrolyseprozesses weiter ab, bis er schließlich bei etwa 89 % lag. Die zugrundeliegenden Berechnungen finden sich im Anhang (Abschnitt Ergänzendes Material).

Bei allen untersuchten Flussraten konnten über die gesamte Hydrolysedauer insgesamt etwa 90 mL Saccharoselösung bei einer Konzentration von 100 mg/mL mit einer hohen Umsatzrate von mindestens 89 % umgesetzt werden. In dieser Untersuchung konnte der Zusammenhang zwischen Umsatz, Flussrate und Verweilzeit im Reaktor sowie die Einflüsse verschiedener Effekte auf die Stabilität der immobilisierten Invertase gezeigt werden.



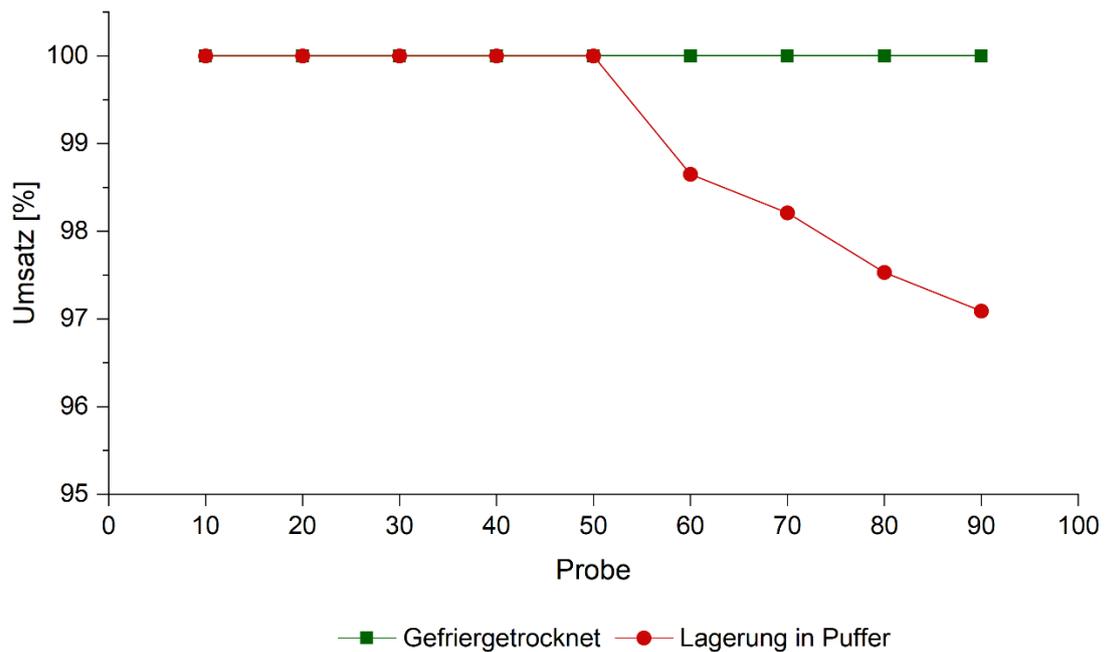
**Abbildung 31:** Flussratenabhängigkeit des Umsatzes der kontinuierlichen Saccharosespaltung mit Invertase im kontinuierlichen Keramik-Kapillarmembran-Reaktorsystem bei den Proben 10 – 90.

#### 4.2.4.2 Lagerstabilität

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Lagerstabilität der immobilisierten Kapillaren über einen Zeitraum von einem Monat untersucht. Hierzu wurden zwei keramische Kapillarmembranen mithilfe des NHS/EDC Kopplungsverfahrens kovalent mit Invertase immobilisiert (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Beide Kapillarmembranen wurden anschließend mit dem NaAc-Arbeitspuffer pH 4,5 gespült. Eine der Kapillarmembranen wurde für einen Zeitraum von einem Monat bei 4 °C in Arbeitspuffer gelagert, wohingegen die andere Kapillarmembran gefriergetrocknet und anschließend bei 4 °C in getrocknetem Zustand für einen Monat gelagert wurde (siehe Anhang, Abschnitt Methoden). Ziel war es hierbei, den Aktivitätsverlust der immobilisierten Invertase über die Dauer der flüssigen und trockenen Lagerungsbedingungen miteinander zu vergleichen. Der Hydrolyseprozess wurde mit identischen Parametern durchgeführt, wie in der vorangegangenen Versuchsreihe zur Flussratenabhängigkeit des Umsatzes. Es wurde eine Flussrate von 33 µL/min gewählt, da bei dieser Flussrate über den gesamten Hydrolyseprozess ein Umsatz von 100 % erzielt werden kann. Die Quantifizierung des Umsatzes wurde ebenfalls mithilfe der NP-HPLC Methode durchgeführt (siehe Anhang, Abschnitt Methoden).

Die Untersuchung ergab, dass die Lagerung der gefriergetrockneten Kapillarmembran über einen Zeitraum von einem Monat bei einer Flussrate von 33  $\mu\text{L}/\text{min}$  nicht zu Umsatzeinbußen führte. Es ist also davon auszugehen, dass kein nennenswerter Aktivitätsverlust der immobilisierten Invertase aufgetreten ist. Bei dem Hydrolyseprozess mit der in Arbeitspuffer gelagerten Kapillarmembran kam es ab Probe 50 zu einem sinkenden Umsatz, der aus einem Aktivitätsverlust der immobilisierten Invertase resultierte. Der Umsatz am Ende des Prozesses lag dennoch bei etwa 97 %, was für eine hohe Lagerstabilität spricht (**Abbildung 32**). Die zugrundeliegenden Berechnungen finden sich im Anhang (Abschnitt Ergänzendes Material).

Eine hohe Lagerstabilität von immobilisierter Invertase in Lösung wird auch in der Literatur beschrieben [114]. Dennoch zeigte sich in den durchgeführten Untersuchungen, dass die Gefriertrocknung der immobilisierten Kapillarmembranen zu einer weiteren Verbesserung der Lagerstabilität führt.



**Abbildung 32:** Umsatz der Saccharosespaltung mit Invertase im kontinuierlichen Keramik-Kapillarmembran-Reaktorsystem nach Lagerung der immobilisierten Keramik-Kapillarmembranen für einen Zeitraum von einem Monat (In NaAc pH 4,5 und gefriergetrocknet).

### 5 Fazit

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten konnten die bisherigen Erkenntnisse zu kontinuierlichen, hydrolytischen Prozessen mit keramischen Kapillarmembranen grundlegend ausgebaut und um neue Aspekte ergänzt und erweitert werden. Basierend auf den für diesen Zweck entwickelten, keramischen Kapillarmembranen wurde ein Reaktorsystem entwickelt, mit dem die Langzeit-Stabilität verschiedenster hydrolytischer Prozesse untersucht werden konnte. Im Vordergrund stand hierbei die Etablierung einer Plattformtechnologie für kontinuierliche Hydrolyseprozesse mithilfe Enzym-immobilisierter, keramischer Kapillarmembranen.

Die Verweilzeitverteilung und die Strömungseigenschaften des Reaktorsystems sowie die Abmessungen, Porengrößenverteilung, offene Porosität und spezifische Oberfläche der verwendeten, keramischen Kapillarmembranen wurden bestimmt. Es wurden außerdem REM-Aufnahmen der keramischen Kapillarmembranen angefertigt.

Insgesamt wurde die Langzeit-Stabilität von vier verschiedenen, hydrolytischen Anwendungen untersucht. Neben diesen Untersuchungen wurden weitere Versuche im Kontext dieser Anwendungen durchgeführt.

Die erste Anwendung befasste sich mit der kontinuierlichen Spaltung von humanem IgG-Antikörper in die zwei Fragmente IgG-Fab und IgG-Fc mit der Cysteinprotease Papain. Der Prozess konnte mit dem kontinuierlichen Reaktorsystem über eine Dauer von insgesamt 33,3 h stabil durchgeführt werden, was einem Umsatz von 22 mL IgG-Lösung entspricht. Da Papain in Lösung eine geringe Stabilität aufweist, konnten die Effekte der thermischen Denaturierung und der Autoproteolyse mithilfe der Immobilisierung deutlich verringert werden. Der Aktivitätsverlust des immobilisierten Papains über die gesamte Prozessdauer betrug lediglich 7,63 %. Das in einem vergleichbaren Batch-Prozess eingesetzte Papain in Lösung hatte in diesem Zeitraum bereits seine vollständige Aktivität eingebüßt. Es konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung von Papain zwar mit einer Aktivitätsminderung einhergeht, die jedoch durch eine lange Prozessstabilität deutlich aufgewogen wird.

In einer weiteren Anwendung wurde die kontinuierliche Proteolyse von Lebensmittelprotein-Isolaten mit der Serinprotease Alcalase untersucht. Hierbei sollte in der RP-HPLC

Analyse ein charakteristischer Peptid-Fingerprint sichtbar sein. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Peptid-Fingerprint für Erbsen- und Mandelproteinisolat kontinuierlich über einen Zeitraum von 45 h mit gleichbleibender Qualität erzeugt werden kann. Insgesamt konnten auf diese Weise etwa 30 mL der jeweiligen Isolate mit einer homogenen Peptidlängenverteilung zwischen 2 und 30 Aminosäuren gewonnen werden. Der Aktivitätsverlust der immobilisierten Alcalase betrug über die gesamte Prozessdauer 23,08 %. Bei einem vergleichbaren Batch-Prozess hatte die Alcalase in demselben Zeitraum mit 46,2 % mehr als doppelt so viel der initialen Aktivität verloren. Auch in diesem proteolytischen Prozess verringerte die Immobilisierung von Alcalase zwar die Enzymaktivität, profitierte jedoch von einem erheblich geringeren Aktivitätsverlust der immobilisierten Alcalase über die Zeit. Das auf diese Weise gewonnene Erbsenproteinhydrolysat wurde in einer präparativen RP-FPLC in 15 verschiedene Peptidfraktionen aufgereinigt, die dann auf ausgewählte bioaktive Eigenschaften untersucht wurden.

In einer Bioaktivitätsstudie zur Inhibierung des ACE konnten drei Peptidproben identifiziert werden, die mit einer Inhibition von 50 % und mehr der initialen ACE-Aktivität eine signifikante, antihypertensive Wirkung hervorriefen. In einem Zellviabilitätsassay konnten ebenfalls zwei Peptidproben identifiziert werden, die in der Lage waren, die Zellviabilität einer A549 Lungenkrebszelllinie um mindestens 30 % zu senken. Diese Proben haben also einen zytotoxischen Effekt auf die verwendete Zelllinie. Um einen selektiv antikanzerogenen Effekt der Peptidproben auf die verwendete Zelllinie zu untersuchen, müsste zusätzlich eine gesunde Lungenzelllinie in die Bioaktivitätsstudie einbezogen werden. In dem durchgeführten Bouillon-Mikroverdünnungsassay zeigte keine der Peptidproben einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum des gram-positiven Modellorganismus *B.subtilis* wt und des gram-negativen Modellorganismus *E.coli* K1.

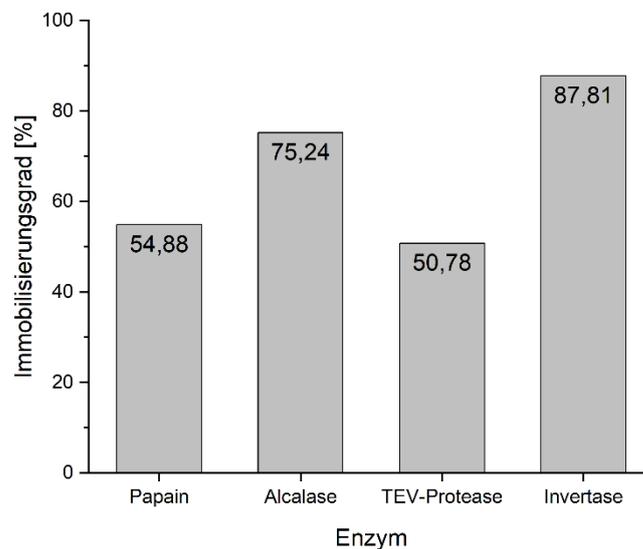
Die rekombinante Produktion des GST-GFP Fusionsprotein in einem definierten Medium konnte unter den gewählten Bedingungen mit hoher Produktausbeute durchgeführt werden. Die Aufreinigung mittels GST-Affinitätschromatographie führte zu einer hohen Produktreinheit, sodass das Fusionsprotein für die Spaltversuche mit TEV-Protease eingesetzt werden konnte. In einem Batch-Vorversuch konnte gezeigt werden, dass der Umsatz von über 90 % Fusionsprotein etwa 4 h benötigt. Bereits nach einer Stunde wurden im Batch-Prozess 70 % des Fusionsproteins umgesetzt. Da TEV-Protease in Lösung aufgrund der Neigung zu Autoproteolyse und thermischer Denaturierung nur eine geringe Stabilität aufweist, bietet die Immobilisierung bei längeren Proteolyseprozessen einen großen

Vorteil. Obwohl lediglich die Hälfte der vorgelegten TEV-Protease auf der keramischen Kapillarmembran immobilisiert werden konnte, wurde im Reaktorsystem über einen Zeitraum von 14 h ein kontinuierlicher Umsatz des Fusionsproteins von etwa 90 % mit einer Verweilzeit im Reaktorsystem von etwa 90 min erzielt. In einem Batch-Prozess würde ein vergleichbarer Umsatz erst nach einer Verweilzeit von 4 h und unter Einsatz deutlich größerer Enzymmengen erzielt werden. Ein kontinuierlicher Prozess mit immobilisierter TEV-Protease bietet also nicht nur eine herausragende Prozessstabilität über die Zeit, sondern benötigt für den Umsatz auch deutlich weniger Zeit.

Bei der Spaltung des Disaccharids Saccharose in die beiden Monosaccharide Glucose und Fructose mit der Glycosidase Invertase wurde im Gegensatz zu den anderen untersuchten Anwendungen keine Protease immobilisiert. Es sollte gezeigt werden, ob das keramische Kapillarmembran-Reaktorsystem auch über proteolytische Anwendungen hinaus erfolgreich angewendet werden kann. Hierzu wurde eine enzymatische Reaktion aus dem Bereich der Lebensmittelchemie untersucht. In einer Versuchsreihe wurde die Langzeit-Stabilität des hydrolytischen Prozesses in Abhängigkeit von der Flussrate untersucht. Der durchschnittliche Immobilisierungsgrad von Invertase war mit 87,81 % der höchste der in diesem Projekt untersuchten Enzyme. Es konnte bei den Flussraten 11  $\mu\text{L}/\text{min}$  sowie 33  $\mu\text{L}/\text{min}$  ein Umsatz von 100 % der vorgelegten 90 mL Saccharose erzielt werden. Erst ab einer Flussrate von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  konnte eine leichte Abnahme des Umsatzes von etwa 5 % über die Dauer des Hydrolyseprozesses beobachtet werden. Bei einer Flussrate von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  war die Abnahme des Umsatzes mit insgesamt 11 % etwas stärker ausgeprägt. Dennoch zeigte sich selbst bei höheren Flussraten eine exzellente Stabilität des Prozesses über die Zeit. Bei der Versuchsreihe zur Lagerstabilität der Invertase-immobilisierten Kapillarmembranen zeigt sich ein Vorteil der Gefriertrocknung gegenüber der Lagerung in Puffer. Bei einer Flussrate von 33  $\mu\text{L}/\text{min}$  war bei unmittelbar für die Hydrolyse verwendeten, immobilisierten Kapillarmembranen ein Umsatz von 100 % über die gesamte Prozessdauer zu erkennen. Die gefriergetrockneten Kapillarmembranen waren auch nach einer Lagerungsdauer von einem Monat in der Lage, die vorgelegten 90 mL Saccharoselösung bei einer Flussrate von 33  $\mu\text{L}/\text{min}$  vollständig umzusetzen. Bei Lagerung der Kapillarmembranen in wässrigem Milieu war nach etwa der Hälfte der Prozessdauer eine Abnahme des Umsatzes um etwa 3 % zu erkennen. Insgesamt ist die Lagerstabilität von Invertase-immobilisierten Kapillarmembranen als exzellent zu bezeichnen,

wobei die trockene Lagerung nach einer schonenden Gefriertrocknung gegenüber der Lagerung in Flüssigkeit im Vorteil zu sein scheint.

In allen vier untersuchten Anwendungen konnte gezeigt werden, dass eine Immobilisierung der verwendeten Enzyme mit einem Aktivitätsverlust einherging. Je nach Stabilität des Enzyms in Lösung führte die Immobilisierung jedoch zu einer teils erheblich verbesserten Prozessstabilität über die Zeit. Diese Beobachtungen decken sich mit anderen Studien zu immobilisierten Enzymen [119, 120]. Es zeigte sich auch, dass der Immobilisierungsgrad, der mit dem verwendeten EDC/NHS Kopplungsmechanismus erzielt werden konnte, stark von dem immobilisierten Enzym abhängt. Während fast 88 % der vorgelegten Invertase auf den keramischen Kapillarmembranen immobilisiert werden konnten lag der Immobilisierungsgrad bei TEV-Protease bei lediglich etwa 51 % (**Abbildung 33**).



**Abbildung 33:** Immobilisierungsgrad der verwendeten, hydrolytischen Enzyme.

Anhand der Quantifizierung des Umsatzes konnte außerdem gezeigt werden, dass der Einsatz des in dieser Arbeit beschriebenen, kontinuierlichen Systems insbesondere bei der Anwendung proteolytischer Enzyme einen deutlichen Vorteil gegenüber Batch-Systemen aufweist. Proteolytische Enzyme neigen in Lösung zu ausgeprägter Autoproteolyse, weshalb die Immobilisierung dieser Enzyme auf einer festen Trägermatrix die Stabilität signifikant verbessern kann [121].

Obwohl die Immobilisierung von Enzymen häufig mit einer leicht verringerten Aktivität einhergeht, überwiegt meist der Vorteil eines langfristig stabilen und zuverlässigen Prozesses [122]. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Verwendung von Proteinlösungen als Substrat für den proteolytischen Verdau, da eine ausreichende Proteinstabilität gewährleistet und die Bildung von Proteinaggregaten in der Lösung minimiert werden muss. Denaturierte Proteine sowie Proteinaggregate reduzieren die Produktqualität erheblich, da ihre Verdaubarkeit durch proteolytische Enzyme signifikant verringert wird. Dies führt zu einer eingeschränkten Performance des kontinuierlichen, Enzym-immobilisierten Systems [123]. In entsprechenden Langzeitstudien konnte gezeigt werden, dass die Lagertemperatur sowie der konvektive Transport der Proteinlösung entscheidend für die Stabilität und Aggregation der enthaltenen Proteine sind [124]. Durch die Kombination des kontinuierlichen Rührvorganges mit der Kühlung der Proteinlösung im kontinuierlichen Reaktorsystem in dieser Arbeit, konnte die Proteinaggregation signifikant verringert und die Stabilität deutlich erhöht werden.

Zusammenfassend ist es gelungen, eine Plattformtechnologie für enzymatische Hydrolyseprozesse mit immobilisierten, keramischen Kapillarmembranen aufzubauen. Hierbei reichen die untersuchten Anwendungen von der Pharmazie über die Biotechnologie bis hin zur Lebensmittelchemie, was die vielseitige Anwendbarkeit des Reaktorsystems für hydrolytische Prozesse zeigt. Das System lässt sich flexibel an die optimalen Bedingungen des jeweiligen hydrolytischen Prozesses anpassen, sodass eine ausgezeichnete Prozessstabilität über lange Zeiträume gewährleistet werden kann. In einer der untersuchten Anwendungen konnte ebenfalls eine exzellente Lagerstabilität der immobilisierten Kapillarmembranen gezeigt werden. Inwiefern sich diese Erkenntnisse auch auf die anderen proteolytischen Anwendungen übertragen lassen, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

Über die Untersuchung von Einzelkapillarmodulen hinaus kann die Produktionsrate des Reaktorsystems durch die Anwendung von Mehrkapillarmodulen weiter hochskaliert werden, um die Effizienz in industriellen Prozessen zu erhöhen. In diesen Mehrkapillarmodulen werden mehrere einzelne Kapillarmembranen in einem speziell entwickelten Reaktormantel gleichzeitig angeströmt. Auch eine modulare Anwendung des Reaktorsystems ist denkbar. Hierzu könnten Einzelkapillarmodule in Reihe geschaltet werden, die mit verschiedenen, hydrolytischen Enzymen immobilisiert sind. Durch die Reihenschaltung von Chymotrypsin- und Trypsin-immobilisierten Kapillarmembranen ließe sich so

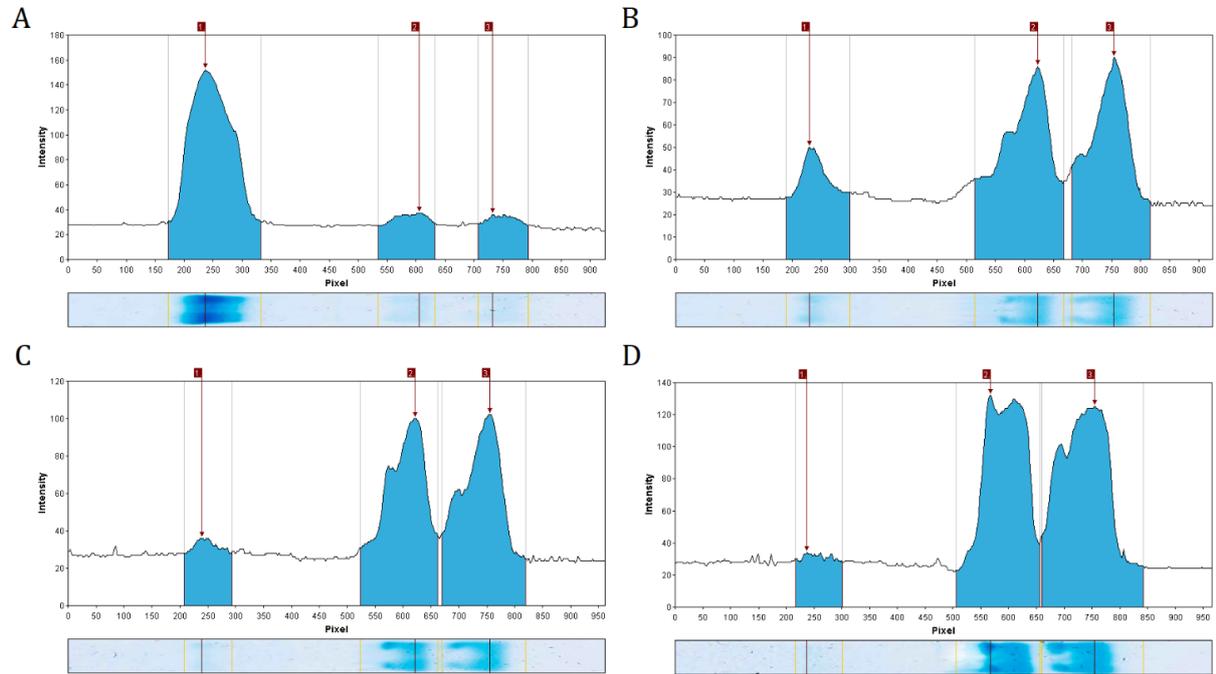
## Fazit

---

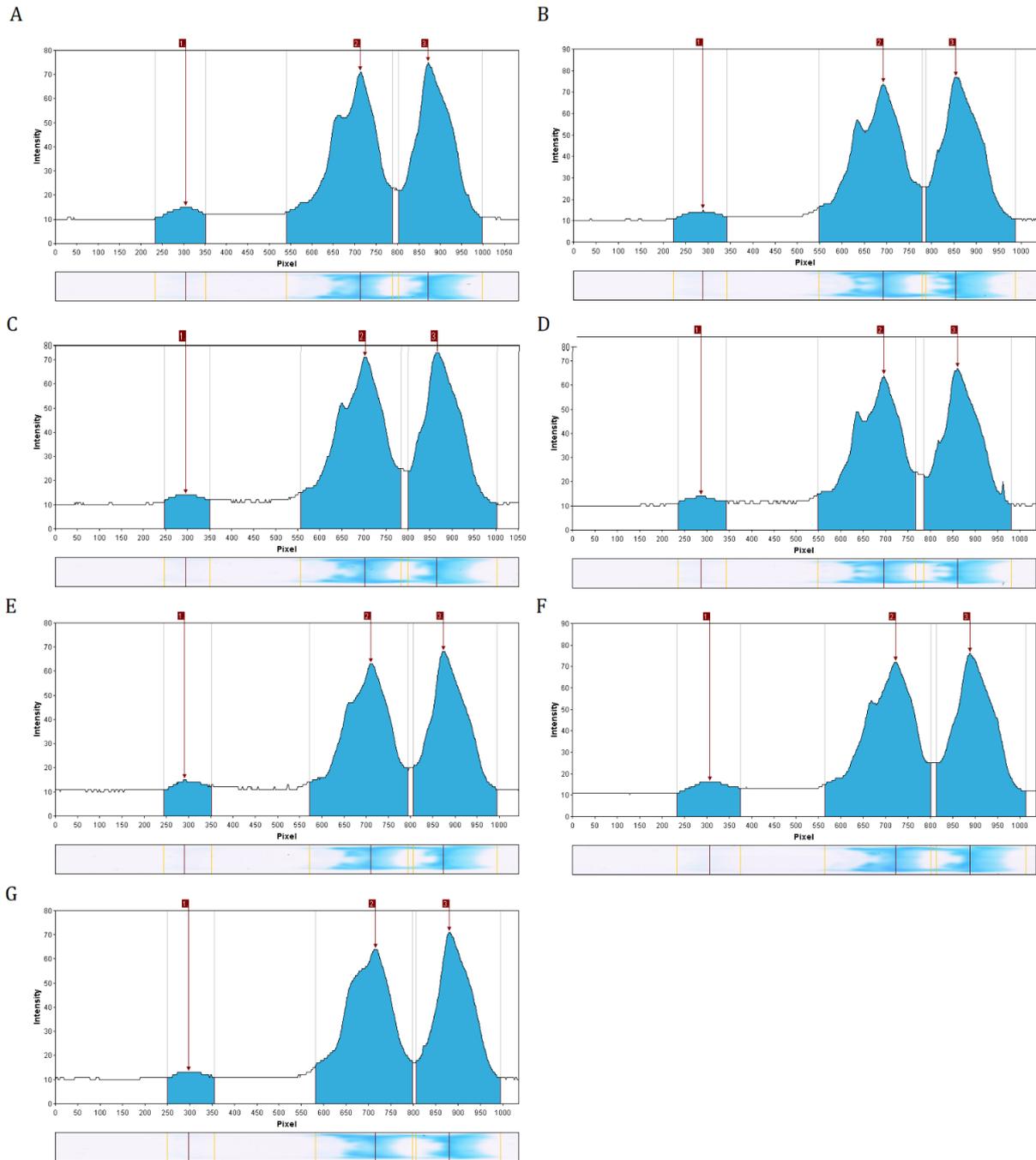
beispielsweise der menschliche Verdauungsprozess im Dünndarm simulieren. Diese Kapillarmodule könnten nach Bedarf einfach ausgetauscht werden und würden die Kombination verschiedener proteolytischer Enzyme ermöglichen, die sich in einer Enzymlösung mit nativen Enzymen durch Autoproteolyse selbst deaktivieren würden.

## A Anhang

### a Ergänzendes Material



**Abbildung 34:** Bestimmung der AUC der Peaks für die Farbintensität der Banden der SDS-Gele der Batch-Spaltung des GST-GFP-Fusionsproteins mit TEV Protease mithilfe der Software GelAnalyzer nach 0 h (A), 1 h (B), 2 h (C) und 4 h (D).



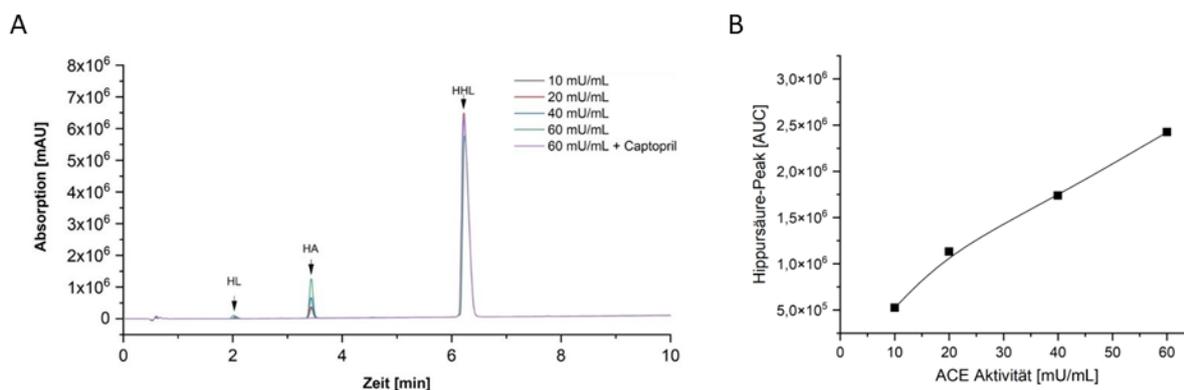
**Abbildung 35:** Bestimmung der AUC der Peaks für die Farbintensität der Banden der SDS-Gele der kontinuierlichen Spaltung des GST-GFP-Fusionsproteins mit TEV Protease mithilfe der Software GelAnalyzer nach 2 h (A), 4 h (B), 6 h (C), 8 h (D), 10 h (E), 12 h (F) und 14 h (G).

## Anhang

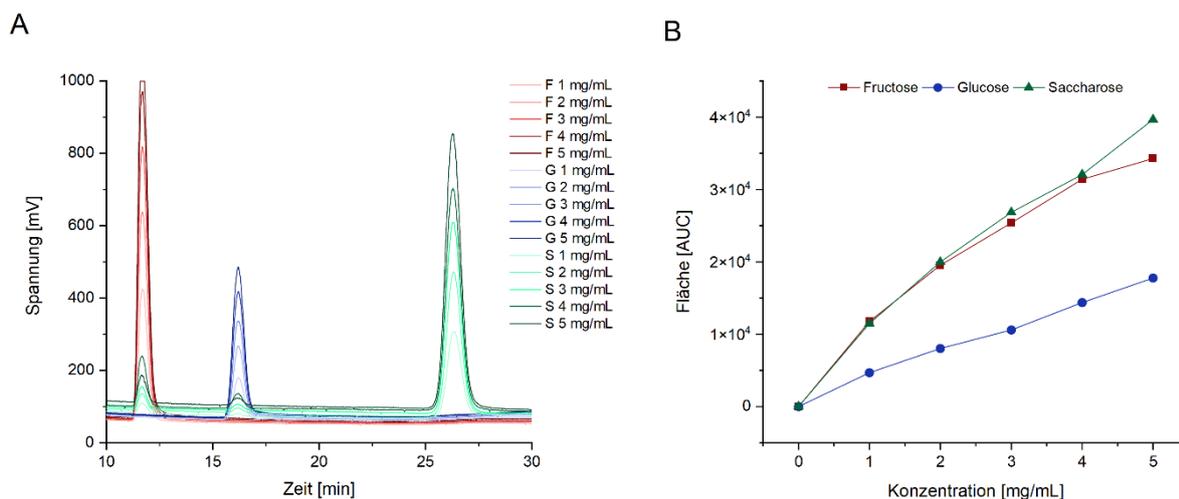
**Tabelle 5:** Berechnungen zur Flussratenabhängigkeit der enzymatischen Saccharosespaltung mit Invertase sowie zur Lagerstabilität der Invertase-immobilisierten Kapillarmembranen.

11 µL/min	Kontrolle	S 10	S 20	S 30	S 40	S 50	S 60	S 70	S 80	S 90
Fläche [AUC]	446	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Konzentration [mg/mL]	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saccharosemenge [%]	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Umsatz [%]	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
33 µL/min										
Fläche [AUC]	446	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Konzentration [mg/mL]	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saccharosemenge [%]	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Umsatz [%]	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
100 µL/min										
Fläche [AUC]	446	0	0	0	5	6	8	12	16	21
Konzentration [mg/mL]	100	0	0	0	1,12	1,35	1,79	2,69	3,59	4,71
Saccharosemenge [%]	100	0	0	0	1,12	1,35	1,79	2,69	3,59	4,71
Umsatz [%]	0	100	100	100	98,88	98,65	98,21	97,31	96,41	95,29
200 µL/min										
Fläche [AUC]	446	17	19	24	29	36	39	46	48	50
Konzentration [mg/mL]	100	3,81	4,26	5,38	6,51	8,07	8,74	10,31	10,77	11,21
Saccharosemenge [%]	100	3,81	4,26	5,38	6,51	8,07	8,74	10,31	10,77	11,21
Umsatz [%]	0	96,19	95,74	94,62	93,49	91,93	91,26	89,96	89,23	88,79
L [IL] 1 M 33 µL/min										
Fläche [AUC]	446	0	0	0	0	0	6	8	11	13
Konzentration [mg/mL]	100	0	0	0	0	0	1,35	1,79	2,47	2,91
Saccharosemenge [%]	100	0	0	0	0	0	1,35	1,79	2,47	2,91
Umsatz [%]	0	100	100	100	100	100	98,65	98,21	97,53	97,09
L [GT] 1 M 33 µL/min										
Fläche [AUC]	446	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Konzentration [mg/mL]	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saccharosemenge [%]	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Umsatz [%]	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100

### i Kalibrationen



**Abbildung 36:** RP-HPLC Analyse des enzymatischen Umsatzes des ACE-Substrates HHL bei verschiedenen ACE-Konzentrationen und mit Negativkontrolle Captopril (A) und Hippursäure-Kalibrierreihe zur Bestimmung der absoluten ACE-Aktivität der Peptidproben (B).



**Abbildung 37:** NP-HPLC Kalibrationsreihe der verwendeten Zuckeranalytik mit der Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 x 250 mm, 5 µm) (A) sowie dazugehörige Kalibrierreihe zur Quantifizierung (B).

## b Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die im Rahmen der durchgeführten Experimente verwendeten Geräte, Enzyme, Chemikalien, Stämme, Zelllinien und Plasmide detailliert beschrieben. Außerdem werden die im Labor durchgeführten Methoden und Techniken erläutert, die zu den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen geführt haben. Mit Ausnahme der Analysen mittels Chromatographie wurden alle Messungen in Dreifachbestimmung durchgeführt und anschließend das arithmetische Mittel gebildet.

### i Geräteverzeichnis

#### Anlage zur kontinuierlichen Hydrolyse:

Rührwerk:	IKA RT 5 5-position magnetic hotplate stirrer
Pumpe:	Ismatec IPC High Precision Multichannel Dispenser
Säulenofen:	Techlab Jetstream II K-1
	Techlab Graphic Gradient Controller
Spektrophotometer:	Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS
Ventile:	Knauer Smartline Azura V 2.1S 6
Fraktionssammler:	BioRad BioFrac
Kryostaten:	Julabo F10

## Anhang

---

ThermoHaake K10

Amersham Biosciences MultiTemp III

### **Gasanalysator:**

BEL Japan Inc. BELSORP® -mini X

### **Fast Protein Liquid Chromatography:**

FPLC: GE Healthcare ÄKTA™start

GE Healthcare ÄKTA™pure

Fraktionssammler: GE Healthcare F9-C

GE Healthcare Frac30

Detektor: Merck Hitachi UV-Detector L-7400

Säulen: Phenomenex Aeris Peptide 5 µm XB-C18 LC RP

GE Healthcare GStrap FF 5 mL Glutathione Sepharose FF

### **High Pressure Liquid Chromatography:**

Pumpe: Hitachi Chromaster 5160

Säulenöfen: Hitachi Chromaster 5310

Autosampler: Hitachi Chromaster 5260

Detektoren: Hitachi Chromaster 5430 Dioden-Array-Detektor

Shimadzu RF-10AxL Fluoreszenzdetektor

ESA Biosciences Corona charged aerosol detector

Säulen: YMC SEC mAB (3 µm) 300 × 4,6 mm

Phenomenex Aeris Peptide XB-C18 (3,6 µm) 150 x 3,0 mm

Agilent Zorbax SB-C8 (3,5 µm) 4,6 x 50 mm

Shodex Asahipak NH2P-50 4E (5 µm) 4,6 x 250 mm

### **Spektrophotometer:**

Fluoreszenz: F-7000, Hitachi, Japan

F-7100, Hitachi, Japan

## Anhang

---

UV-VIS:	Biochrom libra Küvetten-Spektrophotometer Multiskan™ Go Mikrotiterplatten-Spektrophotometer
Durchflussküvette:	Hellma Analytics ultra-low volume

### **SDS-Gelelektrophorese:**

Kammer:	Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell
Netzteil:	Bio-Rad PowerPac HC
Scanner:	Epson Perfection V800

### **Zentrifugen:**

Standzentrifuge:	Thermo Scientific Heraeus™ Multifuge™ X3
Tischzentrifuge:	Thermo Scientific Heraeus Pico 21

### **Gefriertrocknung:**

Lyophilie:	CHRIST Alpha 2-4 LSCplus
Vakuumpumpe:	vacuubrand Chemistry Hybrid Pump RC6

### **Waagen:**

Analysewaage:	Sartorius MC1 Analytic AC 2105
Digitalwaage:	Sartorius CP8201

### **Ultraschallbad:**

BANDELIN Sonorex Super RK 510H

### **Ultrafiltrationsanlage:**

Sartorius arium Pro

### **Mischer:**

Thermomixer:	Eppendorf Thermomixer comfort
Rollenmischer:	Phoenix Instrument RS-TR05
Rotationsmischer:	BIOSAN Multi Bio RS-24
Kreisschüttler:	GFL 3019

### **Inkubatoren:**

Memmert BE200

**Inkubationsschüttler:**

New Brunswick Scientific innova 44 Incubator Shaker Series

Sartorius stedim Biotech Certomat BS-1

**Homogenisierung:**

IKA-Werke ULTRA-TURRAX T 25 basic

**Zellaufschluss:**

Mircofluidics 110L Microfluidizer

**Sicherheitswerkbank:**

Thermo Scientific HeraSafe

**Durchlichtmikroskop:**

Olympus CX40

ii Chemikalienverzeichnis

Proteine

Mandelprotein - VEGJi plant based nutrition

Erbsenprotein - VEGJi plant based nutrition

Enzyme

Enzym	E.C. Nummer	Aktivität laut Hersteller	Hersteller
Papain	3.4.22.2	> 46.000 nfu/mg	Carl Roth, Deutschland
Alcalase	3.4.21.4	> 12,5 AU-A/g	Novozymes, Dänemark
TEV-Protease His6	3.4.22.44	10.000 U/mL	Protean, Tschechien
Invertase	3.2.1.26	≥ 300 U/mg	Sigma Aldrich, USA
ACE (from Rabbit Lung)	3.4.15.1	≥ 2 U/mg	Sigma Aldrich, USA
Benzonase®	3.1.30.2	≥ 250 U/μL	Merck Millipore, USA
Lysozym	3.2.1.17	≥ 20.000 U/mg	Carl Roth, Deutschland

Chemikalien:

(3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) 99 % – Sigma Aldrich®

4-Nitrophenol (4-NP), ReagentPlus® ≥ 99 % – Sigma Aldrich®

9-Fluorenylmethylchloroformat (Fmoc reagent 2,5 mg/mL) – Agilent® Technologies

Accutase® cell detachment solution – Merck Millipore®

Acetonitrile HPLC gradient grade – VWR Chemicals

Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> · 18H<sub>2</sub>O ≥ 97 % – Sigma Aldrich®

Ammoniumperoxodisulfat ≥ 98 % – Carl Roth®

Bienenwachs M-Clarity™ – Sigma Aldrich®

Boc-L-alanine 4-nitrophenylester – Sigma Aldrich®

Borsäure ≥ 99,8 % – Carl Roth®

c0mplete™ Proteasehemmer-Cocktail (Tabletten) – Roche

CaCl<sub>2</sub> – Carl Roth®

Camptothecin – Merck Millipore® (Calbiochem)

Captopril, meets USP testing specifications – Sigma Aldrich®

CellTiter-Blue® Reagenz – Promega

Coomassie® Blau R 250 – Carl Roth®

D-(-)-Fructose  $\geq 99\%$  – Sigma Aldrich®

D-(+)-Glucose  $\geq 99,5\%$  – Sigma Aldrich®

Dithiothreitol (DTT) crystalline powder 97 % – Roche

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) high glucose – Sigma Aldrich® (gibco)

Essigsäure 100 % – Carl Roth®

Ethanol absolute EMPLURA®  $\geq 99,5\%$  – Sigma Aldrich®

Ethanol EMSURE® 96 % – Merck Millipore®

Fluoraldehyde™ O-phthaldialdehyd Reagenzlösung (OPA) – Thermo Scientific®

Fötale Kälberserum (FKS) for cell culture – Sigma Aldrich®

Gentamicinsulfat for cell culture – Sigma Aldrich®

Grams Safranin-Lösung, für Mikroskopie – Sigma Aldrich®

GST-GFP (recombinant),  $>95\%$  by SDS PAGE – Protean

Hefeextrakt mikro-granuliert für die Bakteriologie – Carl Roth®

Hefe-Stickstoff-Basis mit Aminosäuren – Sigma Aldrich®

Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren – Sigma Aldrich®

Hexan anhydrous, 95 % – Sigma Aldrich®

Hippursäure, 98 % – Sigma Life Science®

HPLC Peptid Standardmischung (analytical standard) – Merck®

HPLC peptide standard mixture, analytical standard – Sigma Aldrich®

Immunglobulin G (IgG) aus Humanserum  $\geq 95\%$  – Sigma Life Science

Iodacetamid (Proteomics Grade) – VWR Life Science

Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) – VWR Life Science

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wasserfrei  $\geq 98\%$  – Carl Roth®

Kanamycinsulfat aus *Streptomyces kanamyceticus* for cell culture – Sigma Aldrich®

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  $\geq 99\%$  – Carl Roth®

Kristallviolett  $\geq 90\%$  anhydrous basis – Sigma Aldrich®

Lactoferricin B (bovine) trifluoracetate salt – Bachem®

## Anhang

---

L-Glutathion (reduzierte Form), ≥ 98 % hochrein – VWR

Lugolsche Lösung, für Mikroskopie – Sigma Aldrich®

MES anhydrous, min. 99,5 % – AppliChem (ITW reagents)

Methanol for HPLC SUPELCO® ≥ 99,9 % – Sigma Aldrich®

Methanol ROTISOLV® HPLC Gradient Grade - Carl Roth®

Mikrokristalline Cellulose VIVAPUR CS100S – JRS Pharma, Deutschland

N-3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC) – Fluka® Analytical

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O – Riedel de Haën

NaCl technisch – VWR

Natriumazid ReagentPlus® ≥ 99,5 % – Sigma Aldrich®

Natriumhydroxid in Plätzchen ≥ 98 % – Carl Roth®

Natriumlaurylsulfat (SDS) M-Clarity™ – Merck Millipore®

n-Dekan ≥ 95 % – Sigma Aldrich®

NH<sub>4</sub>Cl – Fluka

N-Hippuryl-His-Leu-hydrate – Sigma® Life Science

N-Hydroxysuccinamid (NHS) – Sigma® Chemistry

N-α-Benzoyl-DL-arginin-2-naphthylamid-hydrochlorid (BANA), ≥ 97 % – Sigma Aldrich®

ortho-Phosphorsäure ≥ 85 % – VWR

PBS Tabletten – Merck Millipore® (Calbiochem)

Pefabloc® SC, analytical standard – Sigma® Life Science

Pierce™ Amino Acid Standard H – Thermo Scientific®

Pierce™ Prestained Marker 26619 – Thermo Scientific®

POPSO PUFFERAN® ≥ 99 % – Carl Roth®

Pre-diluted Protein assay standards (Bovine serum albumin) – Thermo Scientific®

Saccharose ≥ 99,5% – Sigma Aldrich®

Salzsäure rauchend 37 % EMPROVE® ESSENTIAL – Merck Millipore®

Stearinsäure ≥ 98 % – Carl Roth®

TEGO® Antifoam KS 911 – Evonik Industries

Tetramethylethyldiamin (TEMED) für die Elektrophorese  $\geq 99\%$  – Carl Roth®

Trifluoressigsäure (TFA)  $\geq 99,9\%$  zur Peptidsynthese – Carl Roth®

TRIS PUFFERAN®  $\geq 99,9\%$  – Carl Roth®

Tris-Glycin-SDS Elektrophoresepuffer (10x) – Bio-Rad

Trypanblau – Thermo Scientific®

Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut, für die Mikrobiologie – Carl Roth®

Yttrium-stabilisiertes Zirkonimpulver TZ-3YS-E – Tosoh Bioscience, Japan

### Kits:

Pierce™ BCA Protein Assay Kit – Thermo Scientific®

Pierce™ Quantitative Fluorescent Peptide Assay – Thermo Scientific®

### Stämme, Zelllinien und Plasmide:

*Bacillus subtilis* wt

*Escherichia coli* K1

*Escherichia coli* BL21 DE3 mit pETM30-His-GST-GFP

A549 Adenokarzinom-Zelllinie

### iii Methoden

#### Herstellung der keramischen Kapillarmembranen

Im ersten Schritt der Herstellung wird der Keramikschlicker vorbereitet. Er beinhaltet neben Yttrium-stabilisiertem Zirkonumpulver (TZ-3YS-E, Tosoh Bioscience, Japan) Bienenwachs und Stearinsäure als Bindemittel. Als Lösungsmittel wird ein Gemisch aus Dekan und Hexan eingesetzt. Nach der Zugabe der mikrokristallinen Cellulose (VIVAPUR CS100S, JRS Pharma, Deutschland) wird der Schlicker intensiv gerührt, bevor er im Ultraschallbad desagglomert wird. Anschließend wird mit dem Magnetrührer weiter gerührt, bis die für den Extrusionsprozess erforderliche Viskosität erreicht ist. Während der Extrusion ( $T = 40\text{ °C}$ ,  $30\text{ cm/min}$ ) in einer eigens für diese Anwendung entwickelten Extrusionsvorrichtung werden die Kapillarmembranen auf eine Länge von  $10\text{ cm}$  zugeschnitten und anschließend für  $7\text{ Tage}$  bei RT getrocknet. Es folgt der Sinterprozess, welcher in **Tabelle 6** beschrieben ist.

**Tabelle 6:** Ablauf des Sinterprozesses zur Herstellung der im Projekt verwendeten keramischen Kapillarmembranen.

Temperatur	Heizintervall [ $0,5\text{ °C/min}$ ]	Verweilzeit [h]
RT – $200\text{ °C}$	0,5	1
$200\text{ °C}$ – $290\text{ °C}$	0,5	4
$290\text{ °C}$ – $630\text{ °C}$	0,5	2
$630\text{ °C}$ – $1200\text{ °C}$	2	2
$1200\text{ °C}$ – RT	5	-

Für die Aktivierung der Oberfläche der keramischen Kapillarmembranen wurde die hydrothermale Hydroxylierung eingesetzt. Hierfür werden die gesinterten Kapillaren nach dem Trocknungsprozess für  $20\text{ min}$  bei  $121\text{ °C}$  und  $2\text{ bar}$  Druck in der Dampfphase eines Autoklaven platziert und anschließend für  $24\text{ h}$  bei  $70\text{ °C}$  getrocknet. Für die Silanisierung wurden die oxidativ aktivierten Kapillarmembranen anschließend für  $24\text{ h}$  bei  $65\text{ °C}$  und  $150\text{ rpm}$  in  $0,2\text{ M}$  APTES-Lösung inkubiert und anschließend erneut getrocknet ( $70\text{ °C}$ ,  $24\text{ h}$ ) [125].

#### Brunauer-Emmett-Teller (BET) Oberflächenanalyse der spezifischen Oberfläche

Für die Bestimmung der spezifischen Oberfläche wurde die Kapillarmembran zerstoßen und insgesamt  $1\text{ g}$  des Materials in die Glas-Messzelle des Gasanalysators eingefüllt. Nach einer Vorbehandlung zur Entfernung von Feuchtigkeit und Verunreinigungen wird die

Probe vermessen. Hierbei wird als Adsorptiv Stickstoff verwendet, die Adsorptionstemperatur beträgt -196,15 °C. Alle anderen Einstellungen wurden nach Protokoll vorgenommen.

### Verschließen der keramischen Kapillarmembranen mit 2-Komponenten Epoxidklebstoff

Vor dem Aufbringen des Klebstoffs auf die keramischen Kapillarmembranen wurden diese für mindestens 30 min bei 80 °C vollständig getrocknet. Der Klebstoff (Pattex Kraft-Mix Extrem Fest) wurde nach Herstelleranweisung durch die Vereinigung von Binder und Härter angesetzt und unmittelbar verarbeitet. Die Öffnung der Kapillarmembran wurde auf einer Seite mit einer möglichst dünnen Klebstoffschicht bestrichen, um diese zu verschließen. Der Aushärtvorgang fand für eine Dauer von 12 h bei 80 °C statt, bis die Endfestigkeit des Klebstoffs erreicht war.

### Immobilisierung der Enzyme auf den keramischen Kapillarmembranen

Die kovalente, NHS/EDC-vermittelte Aminkupplung wurde nach dem *Crosslinking Technical Handbook* von Thermo Fisher Scientific durchgeführt [37]. Für die Immobilisierung wurden pro Kapillarmembran 4,6 mg NHS und 12,4 mg EDC in jeweils 1 mL Immobilisierungspuffer (0,1 M MES, 0,5 M NaCl, 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, pH 6) gelöst und anschließend in einer Spritze vereinigt. Diesen Lösungen wurden nach 10 min Reaktionszeit 2 mL Proteaselösung (1 mg/mL in Immobilisierungspuffer) hinzugefügt. Um die Kupplungsreaktion zu initiieren, wurde die hergestellte Immobilisierungslösung aus der Spritze durch die keramische Kapillarmembran gedrückt, um einen möglichst großflächigen Kontakt der Lösung mit der Oberfläche der Kapillarmembran zu erzielen. Die Kapillarmembran wird anschließend auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C über Nacht für einen Zeitraum von 16 h inkubiert. Für die Bestimmung des Immobilisierungsgrades wird der Proteingehalt der verwendeten Immobilisierungslösung vor Beginn der Inkubation und unmittelbar nach der Inkubationszeit mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits quantifiziert. Aus dem Quotienten dieser Werte wird der Immobilisierungsgrad in % berechnet. Vor der Verwendung im Reaktorsystem wurde die Kapillarmembran mithilfe einer Spritze mit 20 mL Arbeitspuffer (20 mM POPSO, pH 7,8) gründlich gespült, um überschüssige Immobilisierungslösung zu entfernen. Vor Beginn des Hydrolyseprozesses wurde die Kapillarmembran im Reaktorsystem bei einer Flussrate von 2.000 µL/min für 30 min mit dem jeweiligen, für den Hydrolyseprozess verwendeten Hydrolysepuffer gespült.

### Bestimmung der Verweilzeiten bei verschiedenen Flussraten

Die Verweilzeit im Reaktorsystem wurde mithilfe nicht-immobilisierter Kapillarmembranen bestimmt, die in die Reaktorhülle eingebaut wurden. Als Markersubstanz wurde 4-Nitrophenol eingesetzt, das bei einer Wellenlänge von 405 nm spektroskopisch detektiert werden kann. Für den Versuchsaufbau wurde ein Ventil mit einer Probenschleife ( $V = 100 \mu\text{L}$ ) unmittelbar vor dem Reaktoreingang und ein Spektrophotometer ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) an den Reaktorausgang angeschlossen. Der Substratfeed wurde mit 20 mL Arbeitspuffer (20 mM POPSO, pH 7,8) gefüllt und die entsprechende Flussrate an der peristaltischen Pumpe eingestellt. Die Probenschleife wurde anschließend mit 100  $\mu\text{L}$  4-NP-Lösung (100 mM in Arbeitspuffer) beladen. Unmittelbar nach Beginn der spektroskopischen Messung wurde das Ventil umgeschaltet und auf diese Weise die 4-NP Lösung in das System injiziert (Dirac-Stoß). Die spektroskopische Messung wurde so lange fortgesetzt, bis die Absorption den Anfangswert von 0 mAU erreicht hatte.

### Berechnung der Reynoldszahlen

Die Reynoldszahlen wurden für verschiedene Flussraten mithilfe der **Formel 1** berechnet. Hierbei wurde eine Rohrströmung mit  $Re_{\text{krit}} = 2320$  angenommen [126]. Reynoldszahlen unterhalb des kritischen Werts wurden basierend darauf als laminare Strömungen, Werte oberhalb des kritischen Werts als turbulente Strömungen angenommen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass  $Re_{\text{krit}}$  maßgeblich von der Geometrie des Rohres abhängig ist und einen breiten Übergangsbereich zwischen turbulenter und laminarer Strömung darstellt und keinen exakten Übergang.

**Formel 1:** 
$$Re = \frac{v_m * d}{\eta}$$

$v_m$  = Mittelwert der Strömungsgeschwindigkeit

$d$  = Innendurchmesser

$\eta$  = Dynamische Viskosität

Da ausschließlich wässrige Substrate verwendet wurden, wurde für die dynamische Viskosität  $\eta$  ein Wert von 1 angenommen, was der dynamischen Viskosität von Wasser entspricht.

### Proteinkonzentrationsbestimmung

Alle Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit des Herstellers Thermo Scientific® nach Herstellerprotokoll in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 3x 25 µL eines Blanks (diH<sub>2</sub>O), eines vorverdünnten BSA-Standards (125, 250, 500, 750, 1000, 2000 µg/mL) sowie der Proben unbekannter Konzentration in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Standard und Probe sind jeweils identisch verdünnt worden, sodass die gemessenen Absorptionswerte einen Wert von 0,8 nicht überschritten. So kann sichergestellt werden, dass die Absorption nur im linearen Messbereich des Spektrophotometers aufgenommen wird. Anschließend wurden jeweils 200 µL des BCA-Reagenzes mit einer Mehrkanalpipette zu jeder Probe gegeben und durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT. Die Messung im Mikrotiterplatten-Spektrophotometer erfolgte anschließend nach 10 s Schütteln auf der Intensitätseinstellung „Mittel“ bei einer Wellenlänge von 562 nm. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte eine lineare Regression der BSA-Standardreihe.

### Konzentrationsbestimmung der Peptidfraktionen

Die Bestimmung der Konzentration der Peptidfraktionen wurde mithilfe des Pierce™ Quantitative Fluorescent Peptide Assay nach Herstellerprotokoll in 96-well Fluorocan-Mikrotiterplatten durchgeführt. Der Peptidstandard (1 mg/mL) wurde mit dem mitgelieferten Testpuffer so verdünnt, dass folgende finale Konzentrationen vorlagen: 1, 750, 500, 250, 125 und 62,5 µg/mL. Es wurden dann jeweils 3x 10 µL der verdünnten Standards sowie der zu vermessenden Peptidfraktionsproben in eine schwarze Fluorocan-Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden alle Standards und Proben mithilfe einer Mehrkanalpipette mit 70 µL Testpuffer verdünnt, bevor die Fluoreszenzmarkierung durch Zugabe von 20 µL Testreagenz gestartet wurde. Nach der 5-minütigen Inkubationsphase bei RT erfolgte die Messung der Fluoreszenz im Mikrotiterplatten-Fluoreszenzspektrometer mit Ex 390 nm/Em 475 nm.

### Bestimmung der Enzymaktivität der nativen und immobilisierten Enzyme

Die Bestimmung der Enzymaktivität der nativen und immobilisierten Proteasen erfolgte jeweils mithilfe von Substraten, die nach ihrem enzymatischen Umsatz spektroskopisch detektierbare Produkte freisetzen. Für die Bestimmung der Aktivität der immobilisierten

Proteasen wurde eine APTES-funktionalisierte Kapillarmembran mittels Mörser und Pistill zerstoßen und anschließend mithilfe der NHS/EDC-vermittelten Aminkupplung mit der jeweiligen Protease immobilisiert. Der Immobilisierungsgrad und die Menge immobilisierter Protease wurden mithilfe der Proteinkonzentrationsbestimmung ermittelt und für die Bestimmung der Aktivität der nativen Proteasen äquivalent in 30 mL Arbeitspuffer (20 mM POPSO, pH 7,8) vorgelegt, bevor 300 µL des entsprechenden Spaltsubstrates hinzugefügt wurden. Die pulverisierte, immobilisierte Kapillarmembran wurde dann unter kontinuierlichem Rühren in 30 mL Arbeitspuffer dispergiert, bevor ebenfalls 300 µL des entsprechenden Spaltsubstrates hinzugefügt wurden. Die Lösungen wurden anschließend in einer Umlaufapparatur (Flussrate 1 mL/min) im Kreis gepumpt, wobei sie eine 0,45 µm PES Filtermembran und eine Durchflussküvette passierten. Durch die Filtermembran sollte sichergestellt werden, dass keine Partikel der Dispersion in die Durchflussküvette gelangen. Die spektroskopische Messung wurde unmittelbar gestartet und die Absorption für eine Dauer von 15 min aufgenommen. Die Volumenaktivität in U/mL wurde schließlich mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes aus der Steigung der linearen Regression der Absorption berechnet (**Formel 2**).

$$\text{Formel 2: } \frac{U}{\text{mL}} = \frac{\frac{\Delta A}{\text{min}} * V_{\text{Gesamt}}}{\varepsilon * d * V_{\text{Substrat}}}$$

$\frac{\Delta A}{\text{min}}$  = Änderung der Absorption pro Minute

$V_{\text{Gesamt}}$  = Gesamtvolumen der verwendeten Küvette

$\varepsilon$  = molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient

$d$  = Schichtdicke der verwendeten Küvette

$V_{\text{Substrat}}$  = Volumen des zugesetzten Spaltsubstrates

Die Aktivität des Papains wurde mithilfe des Substrates N- $\alpha$ -Benzoyl-DL-arginin-2-naphthylamid-hydrochlorid (BANA) spektroskopisch bestimmt. BANA wird durch Papain enzymatisch zu 2-Naphtylamin umgesetzt, welches bei einer Wellenlänge von 540 nm spektroskopisch detektiert werden kann. Es wurde eine Stammlösung (15 mM BANA in DMSO) angesetzt und dann entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen verfahren. Die Aktivität der Alcalase wurde unter Einsatz des Substrates Boc-L-alanin-4-nitrophenylester spektroskopisch bestimmt. Boc-L-Ala-4-NP wird durch Alcalase zu 4-Nitrophenol umgesetzt, das dann bei einer Wellenlänge von 405 nm spektroskopisch detektiert werden kann. Es wurde eine Stammlösung (15 mM Boc-L-Ala-4-NP in 80 % ACN /

20 % diH<sub>2</sub>O) angesetzt und dann entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen verfahren.

### Herstellung der Mandel- und Erbsenproteinlösung

Die Herstellung der Mandel- und Erbsenproteinlösung aus pulverförmigem Proteinisolat (VEGji plant based nutrition) erfolgte mithilfe der alkalischen Extraktion. Für diesen Prozess wurden jeweils 5 g des entsprechenden, pulverförmigen Erbsen- und Mandelproteinisolats abgewogen und in 250 mL alkalischem Arbeitspuffer (20 mM POPSO, pH 12) dispergiert. Die Suspension wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Rollschüttler bei mittlerer Geschwindigkeit rotiert und anschließend für 1 h bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mithilfe einer Kanüle entfernt und das Pellet verworfen. Der pH-Wert des gesammelten Überstandes wurde mithilfe von 3 M HCl auf 7,8 eingestellt, bevor dieser erneut bei mittlerer Geschwindigkeit rotiert wurde. Der Zentrifugationsprozess wurde wiederholt und der Überstand dann zunächst durch eine 0,8 µm Cellulose-Filtermembran und anschließend durch eine 0,22 µm PES-Filtermembran filtriert. Die finale Proteinkonzentration der auf diese Weise hergestellten Lösungen wurde mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits quantifiziert.

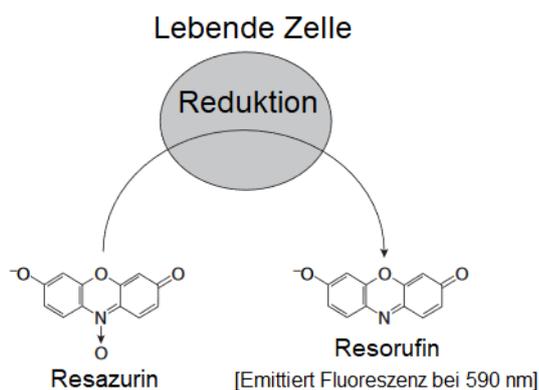
### ACE-Inhibierungsassay

Für den ACE-Inhibierungsassay werden 90 µL einer HHL-Lösung (5 mM) in HPLC-Gefäßen vorgelegt und anschließend 10 µL der Peptidproben 1 – 15, Erbsenproteinisolat sowie Captopril als Negativkontrolle in die jeweiligen Gefäße gegeben. Die Konzentration aller Proben wurde zuvor auf 500 µg/mL normiert. Um die enzymatische Reaktion zu starten, wurden anschließend 30 µL einer ACE-Lösung (60 mU/mL) zu jeder Probe hinzugefügt. Zusätzlich erfolgte eine Kalibrationsreihe der Hippursäure-Freisetzung mit einem Blank (20 mM POPSO, pH 7,8) sowie den ACE-Konzentrationen 10, 20, 30, 40 und 60 mU/mL. Die Gefäße wurden bei 37 °C inkubiert, bis die enzymatische Reaktion nach einer Stunde durch die Zugabe von 10 µL HCl (6 M) gestoppt wurde, was zur irreversiblen Denaturierung des ACE führt. Alle Proben wurden dann in einem HPLC System vermessen, wobei die Agilent Zorbax SB-C8 (3,5 µm) 4,6 x 50 mm RP-Säule zum Einsatz kam. Der Gradient zur Elution wurde wie folgt eingestellt: 0 – 100 %B (0 – 13 min), 0 %B (13 – 17 min). Eluent A setzte sich aus diH<sub>2</sub>O/ACN (95:5) und Eluent B aus diH<sub>2</sub>O/ACN (20:80) zusammen. Der Säulenofen wurde auf 40 °C temperiert und die Flussrate auf 1,5 mL/min eingestellt. Alle Proben wurden vor der Analyse durch eine 0,45 µm PES-

Membran filtriert, um absolute Partikelfreiheit zu gewährleisten. Es wurde ein Volumen von jeweils 8 µL pro Probe in das System injiziert und mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 228 nm detektiert. Die Fläche unter der Kurve (AUC) des Hippursäure-Peaks der Proben sowie der Kalibrationsreihe wurde mittels Integration ermittelt. Die Berechnung der absoluten ACE Aktivität erfolgte dann aus der linearen Regression der Kalibrationsreihe (siehe Abschnitt **Kalibrationen**).

### In vitro Zellproliferationsassay

Die humane Adenokarzinom-Zelllinie A549 wurde in 50 mL DMEM medium (high glucose) mit 10 % FKS und 1 % Gentamicin in T75 Zellkulturflaschen bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS Puffer (pH 7,4) gewaschen. Die Zellen wurden vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, indem sie mit 3 mL Accutase-Lösung versetzt und für 5 min bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Die Zellen wurden nach der Zugabe von 4 mL Medium für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 8 mL frischem Medium resuspendiert. Um die Zellzahl bestimmen zu können, wurden 20 µL Zellsuspension mit 20 µL Trypanblau-Lösung versetzt und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellen wurden so verdünnt, dass sie mit einer Zellzahl von 5.000 Zellen pro Well in einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät werden konnten. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> wurden jeweils 25 µL sterilfiltrierte (0,22 µm PES-Membran) Peptidproben, Erbsenproteinisolat sowie die Positivkontrolle Camptothecin mit einer Konzentration von 500 µg/mL in die jeweiligen Wells gegeben. Die Zellen wurden daraufhin erneut für 24 h bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert und nach Entfernung des Mediums und der Proben mit PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Für die Durchführung des Zellviabilitätsassays wurden 100 µL CTB-Lösung (10 % CTB in 90 % DMEM Medium) in die jeweiligen Wells gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> wurde die Fluoreszenz im Mikrotiterplatten-Fluoreszenzspektrometer bei Ex 560 nm / Em 590 nm gemessen (**Abbildung 38**). Um die relative Zellviabilität in Prozent zu berechnen wurde der Quotient des Signals der Fluoreszenz jeder Probe mit dem Signal der Referenzprobe, die lediglich Arbeitspuffer (20 mM POPSO pH 7,8) enthielt, gebildet.



**Abbildung 38:** Reaktionsschema des CellTiter-Blue® Zellviabilitätsassays.

### Bouillon-Mikroverdünnungsassay

Der gram-negative Stamm *E.coli* K1 und der gram-positive Stamm *B.subtilis* wt wurden in dem chemisch definierten Kulturmedium Zyp31 kultiviert, welches keine Aminosäuren beinhaltet. Ein Liter Kulturmedium wurde wie folgt angesetzt: 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 17,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 3,3 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 g Glucose und 2,5 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren wurden in 800 mL  $\text{diH}_2\text{O}$  aufgelöst und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt. Die Lösung wurde dann mit  $\text{diH}_2\text{O}$  auf 1 L Gesamtvolumen aufgefüllt, bevor 200  $\mu\text{L}$  TEGO® Antischaummittel KS 911 hinzugegeben wurden. Das Kulturmedium wurde daraufhin durch eine 0,22  $\mu\text{m}$  PES-Membran sterilfiltriert. Für die Vorkultur wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  eines *E.coli* K1 und 200  $\mu\text{L}$  eines *B.subtilis* wt Glycerol-Stocks zu 100 mL Zyp31-Kulturmedium in 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen gegeben. Die Bakterien wurden nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase nach 10 h bei 37 °C und 150 rpm orbitaler Schüttelgeschwindigkeit (Orbit-Durchmesser: 5,1 cm) für den Bouillon-Mikroverdünnungsassay verwendet. Für die verschiedenen Stämme wurden jeweils unterschiedliche 96-Well-Mikrotiterplatten verwendet, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Die 15 Peptidproben, die Positivkontrolle Lactoferricin B und die Negativkontrolle Pepton wurden durch eine 0,22  $\mu\text{m}$  PES-Membran sterilfiltriert und jeweils 15  $\mu\text{L}$  mit einer Konzentration von 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in die jeweiligen Wells der Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{L}$  Zyp31-Kulturmedium sowie 5  $\mu\text{L}$  der Vorkultur von *E.coli* K1 und *B.subtilis* wt. Die Kultivierung in Anwesenheit der Proben wurde direkt in der 96-Well-Mikrotiterplatte in einem Mikrotiterplatten-Spektrometer bei einer Temperatur von 37 °C und mittlerer Schüttelgeschwindigkeit (11 Hz, Amplitude 3 mm) durchgeführt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm (Optische Dichte,  $\text{OD}_{600}$ ) wurde

über einen Zeitraum von insgesamt 400 min in Intervallen von 1 min gemessen. Um die jeweiligen Wachstumskurven der bakteriellen Stämme zu erhalten, wurde die OD<sub>600</sub> gegen die Zeit aufgetragen.

### Gram-Färbung

Für die Gram-Färbung wurden jeweils 50 µL einer Kultivierung von *E.coli* K1 und *B.subtilis* wt unter der Sicherheitswerkbank mittels Hitze-fixierung auf einem gläsernen Objektträger fixiert. Die Objektträger mitsamt den fixierten Bakterien wurden mit einer Kristallviolett-Lösung (0,5 % in diH<sub>2</sub>O) überschichtet und anschließend mit diH<sub>2</sub>O gewaschen. Das Kristallviolett lagert sich dabei zwischen den Zellmembranen von gram-negativen sowie von gram-positiven Bakterien ein, wodurch sie violett eingefärbt werden. Für die Bildung größerer Farbstoffkomplexe wurden die Objektträger im nächsten Schritt mit einer Iod/Kaliumiodid-Lösung (Lugol'sche Lösung) überschichtet, bevor sie anschließend mit einer 96-prozentigen Ethanollösung entfärbt wurden. Dieser Schritt wird als Differenzierung bezeichnet, da der gebildete Farbstoffkomplex so aus den gram-negativen Bakterien ausgewaschen wird, wohingegen die dicke Mureinschicht der gram-positiven Bakterien eingefärbt bleibt. Um in einem letzten Schritt die gram-negativen Bakterien mit einem weiteren Farbstoff rot einzufärben, wurde der Objektträger schließlich mit Safranin-Lösung überschichtet und anschließend gründlich mit diH<sub>2</sub>O gewaschen. Das Deckglaschen wurde dann unter dem Auflichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung betrachtet, wobei zusätzlich Bilder mit einer Farbkamera aufgenommen wurden.

### Gefriertrocknung

Vor dem Prozess der eigentlichen Gefriertrocknung wurde die zu gefriertrocknende Probe für mindestens 1 h in 15 bzw. 50 mL Zentrifugenröhrchen entsprechenden Metallständern bei -80 °C eingefroren. Der Deckel der Gefäße wurde vor dem Einstellen in die Gefriertrocknungsanlage mit einem Loch versehen, um ein Entweichen der Dämpfe während des Gefriertrocknungsvorgangs zu ermöglichen. Etwa eine Stunde vor der Verwendung wird die Gefriertrocknungsanlage eingeschaltet, um die erforderlichen Temperaturen zu erreichen (Warm-up Modus). Die Metallständer mit den gefrorenen Proben werden dann in die Gefriertrocknungsanlage eingestellt und das in **Tabelle 7** beschriebene Programm gestartet.

**Tabelle 7:** Druck- und Temperaturprogramm der Gefriertrocknungsanlage

Abschnitt	Zeit [h:mm]	Stellfläche [°C]	Vakuum [mbar]
01	0:01	-20	4,00
02	0:30	-20	3,20
03	0:30	-20	2,50
04	0:30	-20	1,00
05	4:30	-20	0,120
06	4:00	-20	0,120
07	4:00	-20	0,120
08	4:00	-20	0,120
09	0:01	-20	0,0010
10	12:00	-20	0,0010

### SDS-Gelelektrophorese

Für die Analytik mittels SDS-Gelelektrophorese wurden Trenngel (12 %) und Sammelgel (4 %) nach Protokoll hergestellt (**Tabelle 8**). Das jeweilige Gemisch wurde vor dem Eingießen des Gels in die Vorrichtung im Ultraschallbad entgast, um die Bildung von Luftblasen während des Aushärtevorgangs zu verhindern.

**Tabelle 8:** Angepasstes Pipettierschema für 2 SDS-Gele (12 %) nach Bio-Rad - Handcasting Polyacrylamide Gels

Reagenz	Trenngel (12 %)	Sammelgel (4 %)
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	6 mL	1,98 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	3,78 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,75 mL	-
10 % SDS	150 µL	150 µL
diH <sub>2</sub> O	9 mL	5,03 mL
TEMED	25 µL	25 µL
10 % APS	50 µL	50 µL

Nach dem Aushärten und Befüllen mit jeweils 20 µL Probe (10 µL Pierce™ Prestained Marker 26619) wurden die SDS-Gele in die Elektrophoresevorrichtung eingespannt und anschließend in die mit TGS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Elektrophorese wurde dann für 15 min bei einer Spannung von 100 V und anschließend für 30 – 45 min bei einer Spannung von 200 V durchgeführt. Die Gele wurden mithilfe einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung über Nacht gefärbt. Die Färbelösung bestand dabei aus 0,02 % Coomassie Blau R 250, 5 % Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 10 % Ethanol und 2 % Essigsäure.

Die Entfärbung am nächsten Tag erfolgte mit diH<sub>2</sub>O und je nach Bedarf mit einer Entfärbelösung (10 % Ethanol, 2 % Essigsäure). Die Gelbilder wurden mithilfe eines Scanners aufgenommen und mit der Software SilverFast 6.4 bearbeitet.

### Produktion des Fusionsproteins GST-GFP

Die Kultivierung des *E.coli* BL21 DE3 Stammes erfolgte in 3 L Schüttelkolben in einem definierten Zyp31-Medium. Ein Liter Kulturmedium wurde wie folgt angesetzt: 6,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 3,3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 g Glucose und 2,5 g Hefe-Stickstoff-Basis mit Aminosäuren wurden in 800 mL diH<sub>2</sub>O aufgelöst und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt. Die Lösung wurde dann mit diH<sub>2</sub>O auf 1 L Gesamtvolumen aufgefüllt, bevor 200 µL TEGO® Antischaummittel KS 911 hinzugegeben wurden, um eine übermäßige Schaumbildung während der Kultivierung zu verhindern. Das Kulturmedium wurde anschließend durch eine 0,22 µm PES-Membran sterilfiltriert.

### Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde das abzentrifugierte, trockene Zellpellet direkt im 50 mL Zentrifugenröhrchen gewogen und in dem fünffachen Volumen des Gewichts in PBS Puffer pH 7,4 resuspendiert. Dem Lysepuffer wurde dann zunächst Benzonase® (10 U/mL), sowie ein c0mplete™ Proteasehemmer-Cocktail in Tablettenform pro 5 mL Volumen des Lysepuffers und im Anschluss daran Lysozym (1 mg/mL) hinzugegeben. Die Homogenisierung erfolgte mittels ULTRA-TURRAX® bei einer Schergeschwindigkeit von 9.500 1/min. Der anschließende Zellaufschluss wurde in einem Microfluidizer bei einem Kammerdruck von 12.000 bar durchgeführt. Hierzu wurde die zellhaltige Dispersion fünfmal durch die Aufschlusskammer geleitet. Während des gesamten Prozesses wurde die zellhaltige Dispersion auf Eis gelagert, um eine Schädigung des Zielproteins durch Erwärmung zu verhindern. Anschließend wurden die Zelltrümmer in der Zentrifuge bei 12.500 x g abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Die resultierende Lösung wurde dann durch eine 0,22 µm PES-Filtermembran filtriert.

### Analyse und Quantifizierung von IgG sowie Fab- und Fc-Fragmenten

Die SEC-HPLC Analyse wurde nach *YMC Biochromatography Columns Catalogue* durchgeführt, wobei als Säule die YMC-SEC mAB (3 µm) 300 x 4,6 mm zum Einsatz kam [127]. Der verwendete Eluent bestand aus 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit 0,2 M NaCl (pH 7). Die Flussrate wurde auf 0,165 mL/min eingestellt und der Säulenofen war während des gesamten

Laufs auf 25 °C temperiert. Alle Proben wurden vor der Analyse durch eine 0,45 µm PES-Filtermembran filtriert, um absolute Partikelfreiheit zu gewährleisten. Es wurde ein Injektionsvolumen von 4 µL Probe gewählt, die Detektion fand mithilfe eines UV-Detektors ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) statt. Die isokratische Elution dauerte jeweils 45 min pro Probe.

### Analyse der Proteinisolate und -hydrolysate

Die RP-HPLC Analyse wurde mit der RP-HPLC Säule Phenomenex Aeris Peptide XB-C18 (3,6 µm) 150 x 3,0 mm durchgeführt. Eluent A bestand aus diH<sub>2</sub>O/ACN/TFA (95:5:0,1), Eluent B aus diH<sub>2</sub>O/ACN/TFA (20:80:0,1). Die Flussrate betrug 0,4 mL/min und der Säulenofen war auf 50 °C temperiert. Der Elutionsgradient war wie folgt eingestellt: 0 – 10 %B (0 – 3 min), 10 – 50 %B (3 – 55 min), 50 – 100 %B (55 – 65 min), 0 %B (65 – 75 min). Alle Proben wurden vor der Analyse durch eine 0,45 µm PES-Filtermembran filtriert, um absolute Partikelfreiheit zu gewährleisten. Es wurden jeweils 10 µL Probe auf die Säule injiziert und mithilfe eines UV-Detektors ( $\lambda = 214 \text{ nm}$ ) analysiert.

### Aminosäureanalytik

Die Bestimmung des Aminosäuregehalts erfolgt mittels OPA/Fmoc-Derivatisierung in einem RP-HPLC-System, in dem die Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (3,5µm) 150 x 4,6 mm RP-Säule zum Einsatz kommt. Eluent A bestand aus einem 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – NaH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Puffersystem mit 5 mM Natriumazid (pH 7,8) und Eluent B aus ACN/MeOH/diH<sub>2</sub>O (45:45:10). Die Flussrate betrug 1,5 mL/min und der Säulenofen war während des gesamten Laufes auf 40 °C temperiert. Der Elutionsgradient wurde wie folgt eingestellt: 4 – 57 %B (0 – 20 min), 57 – 100 %B (20 – 23,5 min), 100 – 4 %B (23,5 – 28 min). Alle Proben wurden vor der Analyse in der HPLC mittels Methanolfällung behandelt. Hierzu wurden jeweils 100 µL Probe mit 400 µL eiskaltem Methanol versetzt und anschließend für mindestens 12 h bei – 20 °C gelagert. Alle Proben wurden vor dem Einstellen in den Autosampler im Verhältnis 1:1 mit einem 0,4 M Natriumborat-Puffer (pH 10) verdünnt und anschließend durch eine 0,45 µm PES-Filtermembran filtriert, um absolute Partikelfreiheit zu gewährleisten. Ein weiterer Verdünnungsschritt mit 100 µL Eluent A, versetzt mit 0,4 mL Phosphorsäure (konz.), erfolgte direkt im Autosampler, wo anschließend unmittelbar vor der Injektion auch die Derivatisierung mit 40 µL OPA-Reagenz sowie 40 µL Fmoc Reagenz stattfand. Die Probeninjektion erfolgte mit jeweils 50 µL Probenvolumen, wobei auch ein Aminosäurestandard

vermessen wurde. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor mit folgenden Exzitations- und Emissionswellenlängen: Ex 330 nm / Em 420 nm und Ex 266 nm / Em 305 nm.

### Aufreinigung der Peptidfraktionen

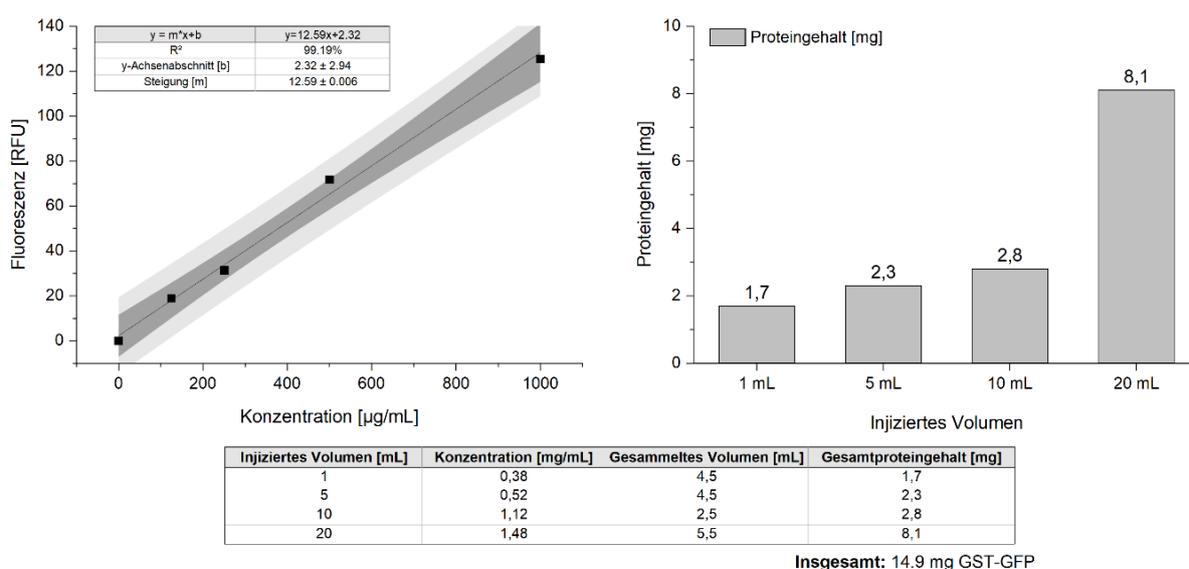
Die Aufreinigung des kontinuierlich erzeugten Erbsenproteinhydrolysats erfolgte in einem präparativen FPLC-System mit der Aeris Peptide XB-C18 (5  $\mu$ m) 150 x 21,2 mm RP-Säule. Die Chromatographiebedingungen basieren auf der analytischen RP-HPLC Methode, die bestmöglich auf die RP-FPLC Methode transferiert wurde, um den präparativen Aufreinigungsprozess mit so wenigen Abweichungen wie möglich von der analytischen Methode durchführen zu können. Die Flussrate betrug während des gesamten Laufes mit Ausnahme der Probeninjektion (1 mL/min) 6 mL/min und der Säulenofen war auf 50 °C temperiert. Eluent A bestand aus diH<sub>2</sub>O/ACN/TFA (95:5:0,1), Eluent B aus diH<sub>2</sub>O/ACN/TFA (20:80:0,1). Der Elutionsgradient war wie folgt eingestellt: 0 – 10 %B (0 – 3 min), 10 – 50 %B (3 – 55 min), 50 – 100 %B (55 – 65 min), 0 %B (65 – 75 min). Das Erbsenproteinhydrolysat wurde vor der Beladung des Superloops durch eine 0,45  $\mu$ m PES-Filtermembran filtriert, um absolute Partikelfreiheit zu gewährleisten. Insgesamt sind 8 mL Erbsenproteinhydrolysat mittels Superloop in 1 mL Schritten auf die Säule gegeben worden. Es wurde außerdem ein Peptid-Größenstandard vermessen. Die Detektion erfolgte mithilfe eines UV-Detektors ( $\lambda = 214$  nm). Die Fraktionierung fand minütlich in fixen Fraktionen (V = 6 mL) in einem Fraktionssammler statt. Die gesammelten Fraktionen wurden in insgesamt 15 Probenfraktionen mit einer Größe von 3 – 4 Fraktionen vereint, um charakteristische Peaks möglichst in einer einzelnen Fraktion zu sammeln. Diese Proben 1 – 15 wurden dann gefrieretrocknet, um das Lösungsmittel aus dem Chromatographieprozess zu entfernen und anschließend in 200  $\mu$ L Arbeitspuffer (20 mM POPSO, pH 7,8) resuspendiert. Die Peptidkonzentration der einzelnen Probenfraktionen wurde mithilfe des Pierce™ Quantitative Fluorescent Peptide Assay bestimmt und anschließend durch Verdünnung mit Arbeitspuffer auf eine einheitliche Konzentration von 500  $\mu$ g/mL normiert.

### Aufreinigung von GST-GFP

Die Aufreinigung des rekombinant produzierten GST-GFP erfolgte nach dem Zellausschluss mittels Affinitätschromatographie in einem ÄKTA™start Niederdruck-Chromato-

graphiesystem. Hierbei kam die GSTrap™ Fast Flow 5 mL des Herstellers Cytiva zum Einsatz. Diese Säulen besitzen eine Glutathion-funktionalisierte Sepharosematrix, mit der GST-markierte Proteine in einem Schritt mit hoher Reinheit aufgereinigt werden können. Als Bindepuffer wurde ein 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffersystem mit 150 mM NaCl (pH 7,5) und als Elutionspuffer ein 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffersystem mit 150 mM NaCl und zusätzlich 10 mM reduziertem Glutathion (pH 7,5) verwendet. Nach dem Equilibrieren der Säule mit 5 CV Bindepuffer bei einer Flussrate von 5 mL/min wurde die Säule mittels Probenpumpe bei einer Flussrate von 1 mL/min mit unterschiedlichen Volumina des Zelllysats (1, 5, 10 und 20 mL) beladen, um verschiedene Säulenbelastungen zu testen. Es folgte das Auswaschen aller nicht-gebundenen Bestandteile mit 3 CV Bindepuffer bei einer Flussrate von 3 mL/min. Die Elution der gebundenen Bestandteile erfolgte mit 2 CV Elutionspuffer bei einer Flussrate von 5 mL/min. Der Fraktionswechsler sammelte während der 10-minütigen Elutionsphase minütlich fixe Fraktionsgrößen mit einem Volumen von 1 mL.

Die Proteinkonzentrationen der jeweiligen, aufgereinigten Fraktionen des GST-GFP Fusionsproteins wurden mithilfe einer GST-GFP-Standardreihe (Blank, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) in einem Mikroplatten-Fluoreszenzspektrometer bei Ex 395 nm / Em 509 nm bestimmt. Hierzu wurden jeweils 50 µL Standard und Probe in eine 96-well Fluoroscans-Mikrotiterplatte gegeben und dann bei den oben eingestellten Parametern gemessen. Insgesamt konnten 14,9 mg GST-GFP hergestellt werden (**Abbildung 40**)



**Abbildung 39:** Quantifizierung des durch GSTrap-Affinitätschromatographie aufgereinigten GST-GFP Fusionsproteins.

Nach der Aufreinigung erfolgte ein Pufferaustausch mit der HiTrap™ Desalting Säule (5 mL) des Herstellers Cytiva im ÄKTA™start System. Diese Säulen bestehen aus einem Sephadex™ G-25 Superfine Harz, welches eine Entsalzung mittels Größenausschluss ermöglicht. Hierdurch konnte der Elutionspuffer aus der vorangegangenen Aufreinigung gegen einen Spaltpuffer (50 mM TRIS-HCl, 1 mM DTT, pH 8) für die folgende, enzymatische Abspaltung der GST-Fusionsdomäne mit TEV-Protease ausgetauscht werden. Die Probe (GST-GFP in Elutionspuffer) wurde in Mengen von jeweils 5 mL auf die Säule gegeben und anschließend in fixen Fraktionen ( $V = 5$  mL) mit einem Fraktionssammler aufgefangen. Die Proteinkonzentration dieser Fraktionen wurde mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit bestimmt und anschließend auf 1 mg/mL normiert.

### Analyse von Saccharose, Glucose und Fructose

Die Zuckeranalytik erfolgte mittels NP-Chromatographie, bei der die Shodex Asahipak NH2P-50 4E (5  $\mu$ m) 4,6 x 250 mm NP-Säule zum Einsatz kam. Die Elution erfolgte über eine Dauer von 30 min isokratisch mit 80 % ACN / 20 % diH<sub>2</sub>O, bei einer Flussrate von 0,8 mL/min und einer Säulenofentemperatur von 40 °C. Das Probeninjektionsvolumen betrug 2  $\mu$ L und alle Proben wurden vor der Analyse im Verhältnis 1:20 verdünnt, um eine Messung innerhalb des Messbereichs des CAD Detektors sicherzustellen, da es sich hierbei um eine sehr sensitive Messmethode handelt und mit hochkonzentrierten Zuckerlösungen gearbeitet wurde. Zur Konzentrationsbestimmung der einzelnen Zucker wurde eine Kalibriergerade angefertigt (siehe Abschnitt Kalibrationen).

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Übersicht über die gängigsten Methoden zur Immobilisierung von Enzymen [34].	9
<b>Abbildung 2:</b> Verschiedene funktionelle Gruppen einer beispielhaften Enzymsequenz, die an der kovalenten Kopplungsreaktion beteiligt sein können [37].	10
<b>Abbildung 3:</b> Mechanismus der Sulfo-NHS/EDC Kopplungsreaktion mit Enzym (1) und Amin-funktionalisierter Oberfläche (2) sowie Einfluss des Sulfo-NHS auf die Stabilität des entstehenden, amin-reaktiven Intermediats [38].	13
<b>Abbildung 4:</b> Spaltspezifitäten verschiedener Proteasen in humanem Immunglobulin G (Aminosäuren im Einbuchstabencode) [48].	16
<b>Abbildung 5:</b> Reaktionsschema der enzymatischen Hydrolyse des Disaccharids Saccharose in die zwei Monosaccharide Glucose und Fructose mithilfe von Invertase.	21
<b>Abbildung 6:</b> Ablauf des Herstellungsprozesses der im Projekt verwendeten keramischen Kapillarmembranen.	22
<b>Abbildung 7:</b> Bestimmung der Porengrößenverteilung der verwendeten keramischen Kapillarmembranen mittels Quecksilberporosimetrie.	23
<b>Abbildung 8:</b> Brunauer-Emmett-Teller (BET) Oberflächenanalyse der spezifischen Oberfläche der keramischen Kapillarmembranen. Isotherme Adsorption/Desorption von Stickstoff an die Kapillarmembran-Oberfläche (A) und daraus errechneter BET-Plot (B).	24
<b>Abbildung 9:</b> Vergleich der keramischen Kapillarmembran mitsamt Reaktormantel aus vorangegangenen Projektarbeiten (A) mit der in aktuellen Projektarbeiten verwendeten (B).	25
<b>Abbildung 10:</b> Schematischer Aufbau des kontinuierlichen Keramik-Kapillarmembranreaktorsystems. Gekühlter Substrat-Feed (l.), Säulenofen mit Reaktoren (m.) und Fraktionssammler mit Kühleinheit zur Sammlung des Hydrolysats (r.)	26
<b>Abbildung 11:</b> Reaktionsschema des Enzym-immobilisierten, keramischen Kapillarmembranreaktors (A) und Querschnitt der keramischen Kapillarmembran mit Visualisierung der Poren, aufgenommen mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) (B).	27
<b>Abbildung 12:</b> Spektroskopische Bestimmung der Verweilzeitverteilung des Reaktorsystems bei unterschiedlichen Flussraten mit 4-Nitrophenol als Markersubstanz.	28
<b>Abbildung 13:</b> Umsatz des intakten IgG-Antikörpers in Abhängigkeit der L-Cysteinkonzentration.	30

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 14:</b> SEC-HPLC Chromatogramm der Proben 5 – 50 des kontinuierlich erzeugten IgG-Hydrolysats. Peak 1: Intakter IgG-Antikörper und Peak 2: IgG Fab- und Fc-Fragmente (A) und AUC von Peak 1 und Peak 2 der Proben 5 – 50 (B).....	32
<b>Abbildung 15:</b> RP-HPLC Chromatogramm von Mandelprotein- und Erbsenproteinisolat (A) sowie Mandel- und Erbsenproteinhydrolysat mit Peptidstandard (B).....	35
<b>Abbildung 16:</b> RP-HPLC Chromatogramm der Proben 5 – 30 des Mandelproteinhydrolysats (A) und des Erbsenproteinhydrolysats (B) mit ausgewählten, markanten Peaks.....	36
<b>Abbildung 17:</b> Integration der Peakflächen der ausgewählten, markanten Peaks 1 – 5 des Mandelproteinhydrolysats (A) und der Peakflächen der ausgewählten, markanten Peaks 1 – 4 des Erbsenproteinhydrolysats (B) der jeweiligen Proben 5 – 30.....	37
<b>Abbildung 18:</b> Analyse der im kontinuierlich produzierten Erbsenproteinhydrolysat enthaltenen Aminosäuren mittels OPA/Fmoc Derivatisierung und anschließender RP-HPLC.....	39
<b>Abbildung 19:</b> Präparative RP-FPLC des Erbsenproteinhydrolysats mit Fraktionierungsschema der gesammelten Peptidfraktionen und Peptidstandard. ....	40
<b>Abbildung 20:</b> Reaktionsschema der Hydrolyse des ACE-Substrates HHL in die zwei Bestandteile Hippursäure (HA) und HL. ....	41
<b>Abbildung 21:</b> Absolute ACE Aktivität des Angiotensin-converting-enzyme in einem ACE-Aktivitätsassay der Peptidproben 1 – 15 und Erbsenproteinisolat als Kontrolle. ....	42
<b>Abbildung 22:</b> Polarisationsmikroskopische Aufnahme der Kultur einer A549 Lungenkrebszelllinie. ....	42
<b>Abbildung 23:</b> Relative Zellviabilität einer A549 Lungenkrebs-Zelllinie nach Inkubation mit den Peptidproben 1 – 15 und Erbsenproteinisolat als Kontrolle.....	43
<b>Abbildung 24:</b> Bakterielle Wachstumskurven in Anwesenheit der Peptidproben 1 – 15 und Gram-Färbung mit anschließender polarisationsmikroskopischer Aufnahme und <i>B.subtilis</i> wt (A) und von <i>E.coli</i> K1 (B). ....	45
<b>Abbildung 25:</b> Reaktionsschema der proteolytischen Spaltung des GST-GFP Fusionsproteins mit TEV Protease.....	46
<b>Abbildung 26:</b> Vektorkarte des zur Produktion des GST-GFP Fusionsproteins in <i>E.coli</i> BL21 DE3 eingesetzten Vektors.....	46
<b>Abbildung 27:</b> Überwachung von Biomasse, Sauerstoff, pH und Temperatur über die Dauer der Kultivierung von <i>E.coli</i> BL21 DE3 und der Produktion von GST-GFP mit dem SFRvario (A) und SDS-Gel mit Probenahme nach 12 h sowie 24 h des Produktionsprozesses und nicht-induzierten Zellen als Kontrolle (B). ....	48

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 28:</b> Aufreinigung des Zellysats aus dem GST-GFP Produktionsprozess mit <i>E.coli</i> BL21 DE3 mittels GST-Affinitätschromatographie (A) und SDS-Gel des Zellysats, des Durchflusses und des aufgereinigten GST-GFP Fusionsproteins (B).....	49
<b>Abbildung 29:</b> SDS-Gel einer Batch-Spaltung des GST-GFP-Fusionsproteins mit TEV Protease (A) mit semiquantitativer Auswertung des Gels mittels GelAnalyzer Software (B) sowie SDS-Gel einer kontinuierlichen Spaltung im Keramik-Kapillarmembran-Reaktorsystem mit TEV Protease (C) mit semiquantitativer Auswertung des Gels mittels GelAnalyzer Software (D). ....	51
<b>Abbildung 30:</b> Katalytischer Mechanismus der Invertase bei der Spaltung von Saccharose [113].....	52
<b>Abbildung 31:</b> Flussratenabhängigkeit des Umsatzes der kontinuierlichen Saccharosespaltung mit Invertase im kontinuierlichen Keramik-Kapillarmembran-Reaktorsystem bei den Proben 10 – 90.....	55
<b>Abbildung 32:</b> Umsatz der Saccharosespaltung mit Invertase im kontinuierlichen Keramik-Kapillarmembran-Reaktorsystem nach Lagerung der immobilisierten Keramik-Kapillarmembranen für einen Zeitraum von einem Monat (In NaAc pH 4,5 und gefriergetrocknet). ....	56
<b>Abbildung 33:</b> Immobilisierungsgrad der verwendeten, hydrolytischen Enzyme. ....	60
<b>Abbildung 34:</b> Bestimmung der AUC der Peaks für die Farbintensität der Banden der SDS-Gele der Batch-Spaltung des GST-GFP-Fusionsproteins mit TEV Protease mithilfe der Software GelAnalyzer nach 0 h (A), 1 h (B), 2 h (C) und 4 h (D).....	63
<b>Abbildung 35:</b> Bestimmung der AUC der Peaks für die Farbintensität der Banden der SDS-Gele der kontinuierlichen Spaltung des GST-GFP-Fusionsproteins mit TEV Protease mithilfe der Software GelAnalyzer nach 2 h (A), 4 h (B), 6 h (C), 8 h (D), 10 h (E), 12 h (F) und 14 h (G). ....	64
<b>Abbildung 36:</b> RP-HPLC Analyse des enzymatischen Umsatzes des ACE-Substrates HHL bei verschiedenen ACE-Konzentrationen und mit Negativkontrolle Captopril (A) und Hippursäure-Kalibrierreihe zur Bestimmung der absoluten ACE-Aktivität der Peptidproben (B).....	65
<b>Abbildung 37:</b> NP-HPLC Kalibrationsreihe der verwendeten Zuckeranalytik mit der Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 x 250 mm, 5 µm) (A) sowie dazugehörige Kalibrierreihe zur Quantifizierung (B). ....	66
<b>Abbildung 38:</b> Reaktionsschema des CellTiter-Blue® Zellviabilitätsassays. ....	81
<b>Abbildung 39:</b> Quantifizierung des durch GSTrap-Affinitätschromatographie aufgereinigten GST-GFP Fusionsproteins. ....	87

### Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	EC-Klassifikation der Enzymgruppe der Hydrolasen [12]. .....	4
<b>Tabelle 2:</b>	Beispiele verschiedener bioaktiver Peptide mit ihrer Quelle und Aminosäuresequenz im Einbuchstaben-Code. ....	17
<b>Tabelle 3:</b>	Charakteristika verschiedener Proteinaffinitäts-Tags. ....	20
<b>Tabelle 4:</b>	Übersicht über die pH- und Temperaturoptima sowie die Erkennungs- und Spaltsequenzen der im Projekt verwendeten Hydrolasen (Aminosäuren im Einbuchstabencode). ....	29
<b>Tabelle 5:</b>	Berechnungen zur Flussratenabhängigkeit der enzymatischen Saccharosespaltung mit Invertase sowie zur Lagerstabilität der Invertase-immobilisierten Kapillarmembranen. ....	65
<b>Tabelle 6:</b>	Ablauf des Sinterprozesses zur Herstellung der im Projekt verwendeten keramischen Kapillarmembranen. ....	74
<b>Tabelle 7:</b>	Druck- und Temperaturprogramm der Gefriertrocknungsanlage .....	83
<b>Tabelle 8:</b>	Angepasstes Pipettierschema für 2 SDS-Gele (12 %) nach Bio-Rad - Handcasting Polyacrylamide Gels .....	83

## Literaturverzeichnis

- [1] Messner, L., Antink, M. H., Guo, T., Maas, M. et al., A versatile ceramic capillary membrane reactor system for continuous enzyme-catalyzed hydrolysis. *Engineering in life sciences* 2021, 21, 527–538.
- [2] Benítez-Mateos, A. I., Contente, M. L., Roura Padrosa, D., Paradisi, F., Flow biocatalysis 101: design, development and applications. *React. Chem. Eng.* 2021, 6, 599–611.
- [3] Sigurdardóttir, S. B., Lehmann, J., Ovtar, S., Grivel, J.-C. et al., Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials. *Adv. Synth. Catal.* 2018, 360, 2578–2607.
- [4] Kujawa, J., Głodek, M., Li, G., Al-Gharabli, S. et al., Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes. *The Science of the total environment* 2021, 801, 149647.
- [5] Luo, J., Song, S., Zhang, H., Zhang, H. et al., Biocatalytic membrane: Go far beyond enzyme immobilization. *Engineering in life sciences* 2020, 20, 441–450.
- [6] Lin, P., Zhang, Y., Yao, G., Huo, H. et al., Immobilization of formate dehydrogenase on polyethylenimine-grafted graphene oxide with kinetics and stability study. *Engineering in life sciences* 2020, 20, 104–111.
- [7] Ji, C., Hou, J., Chen, V., Cross-linked carbon nanotubes-based biocatalytic membranes for micro-pollutants degradation: Performance, stability, and regeneration. *Journal of Membrane Science* 2016, 520, 869–880.
- [8] Moore, S., Hess, S., Jorgenson, J., Characterization of an immobilized enzyme reactor for on-line protein digestion. *Journal of chromatography. A* 2016, 1476, 1–8.
- [9] Ewert, J., Horstmann, G., Glück, C., Claaßen, W. et al., Development and application of a biocatalyst-filter reactor for the continuous production of caseinate hydrolysate surfactants. *Process Biochemistry* 2018, 72, 13–22.
- [10] Sewczyk, T., Hoog Antink, M., Maas, M., Kroll, S. et al., Flow rate dependent continuous hydrolysis of protein isolates. *AMB Express* 2018, 8, 18.
- [11] Hoog Antink, M. M., Sewczyk, T., Kroll, S., Árki, P. et al., Proteolytic ceramic capillary membranes for the production of peptides under flow. *Biochemical Engineering Journal* 2019, 147, 89–99.
- [12] International Union of Biochemistry and Molecular Biology, EC 3. Hydrolase Nomenclature, School of Physical and Chemical Sciences, London 2022.
- [13] Jaouadi, B., Abdelmalek, B., Zarai, N., Bejar, S., The Bioengineering and Industrial Applications of Bacterial Alkaline Proteases: the Case of SAPB and KERAB, in: Carpi, A. (Ed.), *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*, InTech, s.l. 2011.
- [14] Voet, D., Voet, J. G. (Eds.), *Biochemie*, 1st Ed., VCH, Weinheim 1994.
- [15] Dodson, G., Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biochemical Sciences* 1998, 23, 347–352.
- [16] International Union of Biochemistry and Molecular Biology, *Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of*

- Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*, Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press, San Diego 1992.
- [17] Henrissat, B., Davies, G., Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 1997, 7, 637–644.
- [18] Armstrong, F., Que, L., Current opinion in chemical biology. *Current opinion in chemical biology* 2012, 16, 1–2.
- [19] Yip, V. L. Y., Thompson, J., Withers, S. G., Mechanism of GlvA from *Bacillus subtilis*: a detailed kinetic analysis of a 6-phospho- $\alpha$ -glucosidase from glycoside hydrolase family 4. *Biochemistry* 2007, 46, 9840–9852.
- [20] Patel, N., Rai, D., Shivam, Shahane, S. et al., Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications. *Recent patents on biotechnology* 2019, 13, 45–56.
- [21] Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q. et al., Microbial Proteases Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2019, 7, 110.
- [22] Souza, P. M. de, Oliveira Magalhães, P. de, Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - A review. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 2010, 41, 850–861.
- [23] Guha, T. K., Edgell, D. R., Applications of Alternative Nucleases in the Age of CRISPR/Cas9. *International journal of molecular sciences* 2017, 18.
- [24] Sensoy, I., A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Current research in food science* 2021, 4, 308–319.
- [25] Ward, W., The Isolation of Invertase from Baker's Yeast – An Introduction to Protein Purification Strategies, in: Ahmad, R. (Ed.), *Protein Purification*, IntechOpen, London 2012.
- [26] Brungardt, J., Govind, R., Trick, H. N., A simplified method for producing laboratory grade recombinant TEV protease from *E. coli*. *Protein Expression and Purification* 2020, 174, 105662.
- [27] Graycar, T. P., Bott, R. R., Power, S. D., Estell, D. A., Subtilisins, in: Rawlings, N. D., Salvesen, G. (Eds.), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd Ed., Academic Press, London, Boston 2013, pp. 3148–3155.
- [28] Storer, A. C., Ménard, R., Papain, in: Rawlings, N. D., Salvesen, G. (Eds.), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd Ed., Academic Press, London, Boston 2013, pp. 1858–1861.
- [29] Cabanillas, B., Pedrosa, M. M., Rodríguez, J., Muzquiz, M. et al., Influence of enzymatic hydrolysis on the allergenicity of roasted peanut protein extract. *International archives of allergy and immunology* 2012, 157, 41–50.
- [30] Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E.-H., Tavano, O. et al., Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International journal of biological macromolecules* 2020, 165, 2143–2196.
- [31] Inokuma, K., Hasunuma, T., Kondo, A., Whole Cell Biocatalysts Using Enzymes Displayed on Yeast Cell Surface, in: Chang, H. (Ed.), *Emerging areas in bioengineering. Advanced biotechnology*, 1st Ed., Wiley-VCH, Weinheim 2017, pp. 81–92.
- [32] Zhang, Y., Geary, T., Simpson, B. K., Genetically modified food enzymes: a review. *Current Opinion in Food Science* 2019, 25, 14–18.

- [33] Basso, A., Serban, S., Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis* 2019, *479*, 110607.
- [34] Sheldon, R. A., Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* 2007, *349*, 1289–1307.
- [35] Jesionowski, T., Zdarta, J., Krajewska, B., Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption* 2014, *20*, 801–821.
- [36] Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Non-Fouling Surfaces, in: Ratner, B. D. (Ed.), *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*, 3rd Ed., Elsevier, Amsterdam, Heidelberg 2013, pp. 241–247.
- [37] Thermo Fisher Scientific, *Crosslinking Technical Handbook*, Waltham, Massachusetts 2012.
- [38] Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 3rd Ed., Elsevier, Amsterdam 2013.
- [39] Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., Waldron, K. C., Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* 2018, *37*, 790-6, 798-802.
- [40] Sheldon, R. A., Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society transactions* 2007, *35*, 1583–1587.
- [41] Illanes, A., Wilson, L., Caballero, E., Fernández-Lafuente, R. et al., Crosslinked Penicillin Acylase Aggregates for Synthesis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Organic Medium. *ABAB* 2006, *133*, 189–202.
- [42] Liu, S. (Ed.), *Bioprocess engineering: Kinetics, sustainability, and reactor design*, Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg 2017.
- [43] Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y. et al., Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in pharmacology* 2015, *6*, 286.
- [44] Gregoriadis, G., Liposomes and mRNA: Two technologies together create a COVID-19 vaccine. *Medicine in Drug Discovery* 2021, *12*, 100104.
- [45] Schroeder, H. W., Cavacini, L., Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010, *125*, S41-52.
- [46] Packer, D., The history of the antibody as a tool. *Acta histochemica* 2021, *123*, 151710.
- [47] Nelson, A. L., Antibody fragments: hope and hype. *mAbs* 2010, *2*, 77–83.
- [48] Brezski, R. J., Jordan, R. E., Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity? *mAbs* 2010, *2*, 212–220.
- [49] Wang, X., Yu, H., Xing, R., Li, P., Characterization, Preparation, and Purification of Marine Bioactive Peptides. *BioMed research international* 2017, *2017*, 9746720.
- [50] Samtiya, M., Acharya, S., Pandey, K. K., Aluko, R. E. et al., Production, Purification, and Potential Health Applications of Edible Seeds' Bioactive Peptides: A Concise Review. *Foods (Basel, Switzerland)* 2021, *10*.
- [51] Mada, S. B., Ugwu, C. P., Abarshi, M. M., Health Promoting Effects of Food-Derived Bioactive Peptides: A Review. *Int J Pept Res Ther* 2020, *26*, 831–848.
- [52] Martínez-Villaluenga, C., Hernández-Ledesma, B., Peptides for Health Benefits 2019. *International journal of molecular sciences* 2020, *21*.

- [53] Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., Uversky, V. N., Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International journal of molecular sciences* 2022, 23.
- [54] Tamvakopoulos, C., Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids. *Mass spectrometry reviews* 2007, 26, 389–402.
- [55] Nimalaratne, C., Bandara, N., Wu, J., Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food chemistry* 2015, 188, 467–472.
- [56] Park, S. Y., Kim, Y.-S., Ahn, C.-B., Je, J.-Y., Partial purification and identification of three antioxidant peptides with hepatoprotective effects from blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate by peptic hydrolysis. *Journal of Functional Foods* 2016, 20, 88–95.
- [57] Wattanasiritham, L., Theerakulkait, C., Wickramasekara, S., Maier, C. S. et al., Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food chemistry* 2016, 192, 156–162.
- [58] Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D. et al., Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *The New phytologist* 2013, 197, 300–313.
- [59] Puchalska, P., Luisa Marina, M., Concepción García, M., Development of a high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry methodology for the determination of three highly antihypertensive peptides in maize crops. *Journal of chromatography. A* 2013, 1285, 69–77.
- [60] S Vallabha, V., Tikku, P. K., Antihypertensive Peptides Derived from Soy Protein by Fermentation. *Int J Pept Res Ther* 2014, 20, 161–168.
- [61] Zhang, Y., Chen, R., Ma, H., Chen, S., Isolation and Identification of Dipeptidyl Peptidase IV-Inhibitory Peptides from Trypsin/Chymotrypsin-Treated Goat Milk Casein Hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry* 2015, 63, 8819–8828.
- [62] Harnedy, P. A., O'Keeffe, M. B., FitzGerald, R. J., Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga *Palmaria palmata*. *Food chemistry* 2015, 172, 400–406.
- [63] Huang, S.-L., Jao, C.-L., Ho, K.-P., Hsu, K.-C., Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides* 2012, 35, 114–121.
- [64] Broekaert, W. F., Mariën, W., Terras, F. R., Bolle, M. F. de et al., Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry* 1992, 31, 4308–4314.
- [65] Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I. et al., Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods* 2013, 5, 706–714.
- [66] Jang, A., Jo, C., Kang, K.-S., Lee, M., Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food chemistry* 2008, 107, 327–336.

- [67] Xue, Z., Wen, H., Zhai, L., Yu, Y. et al., Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International* 2015, 77, 75–81.
- [68] Luna-Vital, D. A., González de Mejía, E., Mendoza, S., Loarca-Piña, G., Peptides present in the non-digestible fraction of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inhibit the angiotensin-I converting enzyme by interacting with its catalytic cavity independent of their antioxidant capacity. *Food & function* 2015, 6, 1470–1479.
- [69] Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M. et al., Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2014, 4, 343–353.
- [70] Fields, G. B. (Ed.), *Peptide characterization and application protocols: HPLC Analysis and Purification of Peptides. Methods in molecular biology*, Vol. 386, Humana Press, Totowa, NJ 2007.
- [71] Chetwynd, A. J., Guggenheim, E. J., Briffa, S. M., Thorn, J. A. et al., Current Application of Capillary Electrophoresis in Nanomaterial Characterisation and Its Potential to Characterise the Protein and Small Molecule Corona. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 2018, 8.
- [72] Chatterjee, C., Gleddie, S., Xiao, C.-W., Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. *Nutrients* 2018, 10.
- [73] Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L. et al., The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides* 2008, 29, 1062–1071.
- [74] Ulm, H., Wilmes, M., Shai, Y., Sahl, H.-G., Antimicrobial host defensins - specific antibiotic activities and innate defense modulation. *Frontiers in Immunology* 2012, 3, 249.
- [75] Hoskin, D. W., Ramamoorthy, A., Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* 2008, 1778, 357–375.
- [76] Mejia, E. G. de, Dia, V. P., The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer metastasis reviews* 2010, 29, 511–528.
- [77] *Brenner's encyclopedia of genetics*, 2nd Ed., Elsevier, London 2013.
- [78] Uhlén, M., Forsberg, G., Moks, T., Hartmanis, M. et al., Fusion proteins in biotechnology. *Current opinion in biotechnology* 1992, 3, 363–369.
- [79] Makrides, S. C., Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* 1996, 60, 512–538.
- [80] McLean, P., Kawamata, H., Hyman, B.,  $\alpha$ -Synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons. *Neuroscience* 2001, 104, 901–912.
- [81] Terpe, K., Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* 2003, 60, 523–533.
- [82] Smith, D. B., [17] Generating fusions to glutathione S-transferase for protein studies, in: Thorner, J. W., Emr, S., Abelson, J. (Eds.), *Applications of chimeric genes and hybrid proteins. Methods in Enzymology*, Vol. 326, Academic Pr, San Diego 2000, pp. 254–270.

- [83] Bornhorst, J. A., Falke, J. J., [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags, in: Thorner, J. W., Emr, S., Abelson, J. (Eds.), *Applications of chimeric genes and hybrid proteins. Methods in Enzymology*, Vol. 326, Academic Pr, San Diego 2000, pp. 245–254.
- [84] Panavas, T., Sanders, C., Butt, T. R., SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2009, 497, 303–317.
- [85] Skerra, A., Schmidt, T. G., [18] Use of the Strep- tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins, in: Thorner, J. W., Emr, S., Abelson, J. (Eds.), *Applications of chimeric genes and hybrid proteins. Methods in Enzymology*, Vol. 326, Academic Pr, San Diego 2000, pp. 271–304.
- [86] Gerdes, H.-H., Kaether, C., Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Letters* 1996, 389, 44–47.
- [87] Waugh, D. S., An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expression and Purification* 2011, 80, 283–293.
- [88] Marcus, J. B. (Ed.), *Culinary nutrition: The science and practice of healthy cooking*, Elsevier/Academic Press, Waltham, MA 2013.
- [89] Ternes, W., Täufel, A., Tunger, L., Zobel, M. (Eds.), *Lebensmittel-Lexikon*, 4th Ed., Behr, Hamburg 2005.
- [90] Kuddus, M. (Ed.), *Microbial Extremozymes: Novel Sources and Industrial Applications*, Elsevier Science & Technology, San Diego 2022.
- [91] Kuddus, M. (Ed.), *Enzymes in food biotechnology: Production, applications, and future prospects*, Academic Press an imprint of Elsevier, London, San Diego, Cambridge, MA, Oxford 2019.
- [92] Upadhyay, L. S. B., Verma, N., Highly efficient production of inverted syrup in an analytical column with immobilized invertase. *Journal of food science and technology* 2014, 51, 4120–4125.
- [93] Kroll, S., Treccani, L., Rezwan, K., Grathwohl, G., Development and characterisation of functionalised ceramic microtubes for bacteria filtration. *Journal of Membrane Science* 2010, 365, 447–455.
- [94] Bogatykh, I., Osterland, T., Characterization of Residence Time Distribution in a Plug Flow Reactor. *Chemie Ingenieur Technik* 2019, 91, 668–672.
- [95] Homaei, A. A., Sajedi, R. H., Sariri, R., Seyfzadeh, S. et al., Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino acids* 2010, 38, 937–942.
- [96] Harrison, M. J., Burton, N. A., Hillier, I. H., Catalytic Mechanism of the Enzyme Papain: Predictions with a Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Potential. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 12285–12291.
- [97] Verma, S., Dixit, R., Pandey, K. C., Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in pharmacology* 2016, 7, 107.
- [98] Akazawa-Ogawa, Y., Nagai, H., Hagihara, Y., Heat denaturation of the antibody, a multi-domain protein. *Biophysical reviews* 2018, 10, 255–258.
- [99] Wang, H., Shao, D., Study on immobilization of papain with magnetic porous alginate microspheres. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2018, 397, 12031.

- [100] Rajalakshmi, N., Sundaram, P. V., Stability of native and covalently modified papain. *Protein engineering* 1995, 8, 1039–1047.
- [101] Li, S., Chu, S., Lu, J., Wang, P. et al., Molecular and structural properties of three major protein components from almond kernel. *J Food Process Preserv* 2018, 42, e13536.
- [102] Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., Nickerson, M. T., Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International* 2018, 34, 126–147.
- [103] Moritz Lassé, *Does the Protein Aggregation State Affect the Digestibility and Safety of Foods?* Dissertation, Christchurch 2013.
- [104] Bondos, S. E., Bicknell, A., Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical Biochemistry* 2003, 316, 223–231.
- [105] Saleh, A. S. M., Zhang, Q., Shen, Q., Recent Research in Antihypertensive Activity of Food Protein-derived Hydrolyzates and Peptides. *Critical reviews in food science and nutrition* 2016, 56, 760–787.
- [106] Martínez-Sánchez, S. M., Gabaldón-Hernández, J. A., Montoro-García, S., Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health. *Journal of Functional Foods* 2020, 64, 103645.
- [107] Wu, J., A Novel Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) Activating Peptide: A Reflection of 10 Years of Research on a Small Peptide Ile-Arg-Trp (IRW). *Journal of agricultural and food chemistry* 2020, 68, 14402–14408.
- [108] Benfield, A. H., Henriques, S. T., Mode-of-Action of Antimicrobial Peptides: Membrane Disruption vs. Intracellular Mechanisms. *Front. Med. Technol.* 2020, 2.
- [109] Li, Z., Kessler, W., van den Heuvel, J., Rinas, U., Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems. *Applied microbiology and biotechnology* 2011, 91, 1203–1213.
- [110] Sequeira, A. F., Turchetto, J., Saez, N. J., Peysson, F. et al., Gene design, fusion technology and TEV cleavage conditions influence the purification of oxidized disulphide-rich venom peptides in Escherichia coli. *Microbial cell factories* 2017, 16, 4.
- [111] Mohanty, A. K., Simmons, C. R., Wiener, M. C., Inhibition of tobacco etch virus protease activity by detergents. *Protein Expression and Purification* 2003, 27, 109–114.
- [112] Miladi, B., El Marjou, A., Boeuf, G., Bouallagui, H. et al., Oriented immobilization of the tobacco etch virus protease for the cleavage of fusion proteins. *Journal of biotechnology* 2012, 158, 97–103.
- [113] Xie, J., Cai, K., Hu, H.-X., Jiang, Y.-L. et al., Structural Analysis of the Catalytic Mechanism and Substrate Specificity of Anabaena Alkaline Invertase InvA Reveals a Novel Glucosidase. *The Journal of biological chemistry* 2016, 291, 25667–25677.
- [114] Kotwal, S. M., Shankar, V., Immobilized invertase. *Biotechnology advances* 2009, 27, 311–322.
- [115] Clarke, M. A., Edye, L. A., Eggleston, G., Sucrose Decomposition in Aqueous Solution, and Losses in Sugar Manufacture and Refining, in: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 52, Academic Press, New York 1997, pp. 441–470.
- [116] Dawber, J. G., Brown, D. R., Reed, R. A., Acid-catalyzed hydrolysis of sucrose: A student study of a reaction mechanism. *J. Chem. Educ.* 1966, 43, 34.

- [117] Abdellah, H. A., Baker, T. M., Shekib, L. A., El-Iraqi, S. M., Characteristics of invertase immobilized on three different types of supports. *Food chemistry* 1992, 43, 369–375.
- [118] Bassetti, F. J., Bergamasco, R., Moraes, F. F., Zanin, G. M., Thermal stability and deactivation energy of free and immobilized invertase. *Braz. J. Chem. Eng.* 2000, 17, 867–872.
- [119] Weltz, J. S., Kienle, D. F., Schwartz, D. K., Kaar, J. L., Reduced Enzyme Dynamics upon Multipoint Covalent Immobilization Leads to Stability-Activity Trade-off. *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 3463–3471.
- [120] Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., Stevanato, R., Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology* 2013, 6, 185–205.
- [121] Bickerstaff GF, Z. H., Protease activity and autodigestion (autolysis) assays using Coomassie blue dye binding. *Anal. Biochem* 1993.
- [122] Kumari, A., Kaur, B., Srivastava, R., Sangwan, R. S., Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties. *Biochemistry and biophysics reports* 2015, 2, 108–114.
- [123] Singh, T. K., Øiseth, S. K., Lundin, L., Day, L., Influence of heat and shear induced protein aggregation on the in vitro digestion rate of whey proteins. *Food & function* 2014, 5, 2686–2698.
- [124] Roberts, C. J., Protein aggregation and its impact on product quality. *Current opinion in biotechnology* 2014, 30, 211–217.
- [125] Bartels, J., Souza, M. N., Schaper, A., Árki, P. et al., Amino-Functionalized Ceramic Capillary Membranes for Controlled Virus Retention. *Environmental science & technology* 2016, 50, 1973–1981.
- [126] Rotta, J., Experimenteller Beitrag zur Entstehung turbulenter Strömung im Rohr. *Ing. arch* 1956, 24, 258–281.
- [127] YMC Europe GmbH, *Biochromatography Columns Catalogue*, Dinslaken, Germany 2018.

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Lorn Messner

Geburtsdatum: 02.05.1992

Geburtsort: Aachen

Nationalität: Deutsch/Britisch

### Ausbildung

- Ab 2019                    **Promotionsstudium** Chemie  
                                  Institut für Technische Chemie  
                                  Leibniz Universität Hannover
- 2016 – 2019             **Masterstudium** Life Sciences  
                                  Leibniz Universität Hannover  
                                  Abschluss 06.12.2019 (M. Sc.)
- 2015 – 2016             **Masterstudium** Wirk- und Naturstoffchemie  
                                  Leibniz Universität Hannover
- 2011 – 2015             **Bachelorstudium** Pharmazeutische Chemie  
                                  Technische Hochschule Köln  
                                  Abschluss 11.05.2015 (B. Sc.)
- 2004 – 2011             **Allgemeine Hochschulreife**  
                                  Gymnasium Mellendorf  
                                  Abschluss 22.06.2011 (Allgemeine Hochschulreife)

### Publikationen

#### Fachartikel

**Messner L [90%], Hoog Antink M., Guo T., Maas M., Beutel S.** A versatile ceramic capillary membrane reactor system for continuous enzyme-catalyzed hydrolysis. Eng. Life Sci. 2021, DOI: 10.1002/elsc.202100027.

#### Konferenzbeiträge

**Messner L., Guo T., Maas M., Beutel S.** Bioactive peptides in continuously produced pea protein hydrolysate. 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European Congress of Applied Biotechnology. 20. – 23. September 2021, Virtual Event (Vortrag).

**Messner L., Hoog Antink M., Guo T., Maas M., Beutel S.** Enzymatische Hydrolyseprozesse im kontinuierlich betriebenen Keramikkapillarreaktor. 10. ProcessNet-Jahrestagung und 34. DE-CHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen. 21. – 24. September 2020, Aachen (Poster).

## Betreute Abschlussarbeiten

### Bachelorarbeit Sophia Machill

**Titel:** Kontinuierliche Hydrolyse von Erbsenprotein und Bioaktivitätstestung von Peptiden

**Bearbeitungszeitraum:** 09.03.2020 – 13.08.2020

### Masterarbeit Franziska Walther

**Titel:** Untersuchung des Aufreinigungsprozesses für Invertase aus Brauereihefe

**Bearbeitungszeitraum:** 01.09.2021 – 09.03.2022