

Downstream-Processing

1 Einleitung	2
1.1 Isolierung	2
1.2 Reinigung	2
2 Prozessketten	3
2.1 Zentrifugation	3
2.2 Filtration	3
2.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion	3
2.4 Proteinfällung	4
2.5 Aussalzen	4
2.6 Temperatur	4
2.7 pH-Änderung	5
2.8 Organische Lösungsmittel	5
2.9 Polymere, Polyelektrolyte	5
3 Die besondere Rolle der Membrantechnik	5

1 Einleitung

Downstream Processing umfasst alle nach der Bioproduktion durchgeführten Verfahrensschritte wie Zellabtrennung, Aufreinigung und Konzentrierung. Der deutsche Fachbegriff für Downstream Processing ist Aufreinigung.

Ziel der Aufreinigung ist die Trennung des gewünschten Produkts (Zielmolekül) von unerwünschten Verunreinigungen.

In biotechnologischen Verfahren beginnt die Aufreinigung unmittelbar nach der Fermentation. Sie umfasst alle physikalischen, chemischen und verfahrenstechnischen Prozesse zur Gewinnung des Zielmoleküls.

Das Zielmolekül wird dabei aus einer komplexen Fermentationsbrühe isoliert. Die Aufreinigung lässt sich grundsätzlich in die beiden Abschnitte Isolierung und Reinigung unterteilen.

1.1 Isolierung

Die Isolierung folgt direkt auf die Ernte des Rohmaterials, den sogenannten Harvest. Als Rohmaterial dient die Fermentationsbrühe, welche Zellen, Zelltrümmer und gelöste Stoffe enthält. In einem ersten Schritt wird diese Brühe klarfiltriert. Dabei entsteht ein Permeat, das frei von Zellen, Zellpartikeln und Kolloiden ist. Das Zielmolekül befindet sich in der Regel im Permeat.

1.2 Reinigung

In der anschliessenden Reinigungsstufe wird das Zielmolekül weiter isoliert, gereinigt und konzentriert. Ziel ist es, mit möglichst wenigen Prozessschritten eine hohe Reinheit zu erreichen.

Jede Fermentationsbrühe weist dabei individuelle Eigenschaften auf. Dazu gehören ihre molekulare Zusammensetzung sowie biochemische und physikalische Merkmale. Zusätzlich beeinflusst die Dynamik der mikrobiellen Population den Downstream-Prozess. Im Downstream Processing können einzelne Parameter wie pH-Wert, Temperatur oder Viskosität analytisch erfasst werden.

Das komplexe Zusammenspiel dieser Faktoren kann jedoch nicht direkt durch einzelne Messinstrumente beschrieben werden. Viele Downstream-Prozesse wie Chromatographie, Filtration oder Kristallisation werden gleichzeitig von mehreren Parametern beeinflusst. Daher ist es unzureichend, isolierte Messwerte separat zu betrachten.

Stattdessen werden mathematische Modelle, maschinelles Lernen oder gezielte Experimente eingesetzt. Diese Ansätze helfen, Wechselwirkungen zwischen den Prozessgrössen zu verstehen. Ein gut durchdachtes Modell ermöglicht zudem die Vorhersage des Prozessverhaltens im grossen Massstab.

Bei der Isolierung wird häufig die Filtration zur Entfernung von Partikeln eingesetzt. Neben der Filtration kann auch die Trennung über Dichteunterschiede angewendet werden.

Partikel mit höherer Dichte sedimentieren aufgrund der Schwerkraft, während leichtere Partikel aufschwimmen. Der Sedimentation wirken dabei Auftriebskräfte, Reibung und Diffusion entgegen. Die Schwerkrafttrennung ist für grosse Partikel effizient, jedoch für kleine Partikel langsam und ineffizient.

Eine verbesserte Schwerkrafttrennung kann mit einem Teller-Separator realisiert werden, der durch geneigte Platten eine grössere Absetzfläche bietet.

2 Prozessketten

Im Downstream-Processing bezeichnet man die Abfolge der einzelnen Aufarbeitungsschritte als Prozesskette (*processing chains, processing trains* oder *purification sequences*).

Es gibt **Methoden und Regeln** zur Auslegung von Prozessketten, die auf ingenieurwissenschaftlichen Prinzipien basieren. Die Prozessschritte werden so angeordnet, dass die Wirtschaftlichkeit, Sicherheit und Effizienz des gesamten Produktionssystems optimiert ist. So werden beispielsweise kostengünstige Verfahren möglichst früh (in der Reihenfolge) eingesetzt, wo die Volumina am grössten sind.

Nachgeschaltete, kostspielige Trennverfahren wie die Chromatographie arbeiten anschliessend mit konzentrierten Lösungen und reduziertem Volumen.

Die **Optimierung** einzelner Schritte kann zwar deren Leistung verbessern, jedoch die Gesamteffizienz der Produktion beeinträchtigen, weil die Auswirkungen auf nachgelagerte Einheiten nicht berücksichtigt wurden. Es muss immer die ganze Produktionskette berücksichtigt werden.

2.1 Zentrifugation

Die Zentrifugation ist ein mechanischer Prozess, bei dem eine Zentrifugalkraft anstelle der Schwerkraft genutzt wird, um die Komponenten einer Mischung nach Dichte und / oder Partikelgrösse zu trennen. Es handelt sich um eine weit verbreitete Einheitsoperation.

Die Zentrifugation im Labor ist ein einfacher, sicherer Trennschritt, allerdings im Chargenbetrieb. Bei grosstechnischen Verfahren in der Regel Durchlaufzentrifugen eingesetzt, bei denen das Aufgabegut kontinuierlich einem sich drehenden Rotor zugeführt und der Überstand kontinuierlich abgeführt werden.

2.2 Filtration

Die Filtration wird in vielen verschiedenen Phasen der Verarbeitung sowohl während der Isolierung als auch der Reinigung angewendet. Die Membranfiltration wird häufig in biotechnologischen Herstellungsprozessen eingesetzt, da sie bei relativ niedrigen Temperaturen und Drücken arbeitet und keine Phasenänderungen oder chemische Zusätze erfordert. Filtrationsprozesse verursachen nur eine minimale Denaturierung, Deaktivierung oder Degradation labiler Proteine.

2.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Bei der Extraktion werden eine oder mehrere Komponenten einer Mischung von einer Phase in eine andere überführt, während bei der Fällung eine oder mehrere Komponenten aus einer Lösung entfernt werden, um eine feste Phase (den Niederschlag) zu bilden.

Dies sind einige der einfachsten und kostengünstigsten Fraktionierungsmethoden, da sie durch Zugabe oder Entfernung von Salz, organischen Lösungsmitteln oder durch Änderungen der Temperatur und des pH-Werts erreicht werden können.

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion unter Verwendung organischer und wässriger Extraktionsmedien ist ein traditionelles Trennverfahren, das zur Reinigung von Biopharmazeutika eingesetzt werden kann. Bei der Dreiphasentrennung können Proteine direkt aus Zellhomogenaten durch Trennung zwischen einer Butanolschicht und einer starken wässrigen Salzlösung gereinigt werden. Unter diesen Bedingungen neigen Zelltrümmer dazu, sich in die organische Phase zu trennen und Nukleinsäuren fallen an der Grenzfläche aus, während Proteine in Lösung bleiben.

2.4 Proteinfällung

Die Proteinfällung ist ein etablierter Prozess. Unter milden Bedingungen ist die Proteinfällung reversibel und die anschließende erneute Auflösung stellt die Gesamtaktivität wieder her. Die Proteinfällung kann entweder ein Produktisolierungsschritt oder ein Reinigungsschritt sein. Im ersten Fall wird durch den Niederschlag und die anschließende erneute Auflösung in einer kleineren Wassermenge nicht nur das Verarbeitungsvolumen reduziert, sondern die entstehende Lösung enthält auch hauptsächlich gelöstes Protein, das frei von anderen löslichen Verunreinigungen ist.

Im letzteren Fall kann die unterschiedliche Löslichkeit von Proteinen zur Fraktionierung genutzt werden. Proteine können durch Änderung des pH-Werts oder der Temperatur oder durch Zugabe eines milden organischen Lösungsmittels, eines Salzes, eines mehrwertigen Metallions oder eines nichtionischen Polymers ausgefällt werden.

Die gewählte Fällungsmethode hängt davon ab, ob das gebildete Proteinpräzipitat ohne Aktivitätsverlust wieder aufgelöst werden kann, von den Kosten des Fällungsmittels und seiner Rückgewinnung sowie von den Auswirkungen von Verunreinigungen des Fällungsmittels im Präzipitat.

2.5 Aussalzen

Eine hohe Salzkonzentration fördert die Proteinaggregation und -ausfällung. Es wird angenommen, dass das Salz das Wasser der Lösung aus dem Protein entfernt und dadurch die Proteinlöslichkeit verringert. Die Hofmeister-Reihe steht für abnehmende Anioneneffektivität: Citrat > Phosphat > Sulfat > Acetat > Chlorid > Nitrat > Thiocyanat.

Die Salze am unteren Ende dieser Reihe verursachen strukturelle Schäden an Proteinen. Die hohe Löslichkeit von Ammoniumsulfat in Wasser und die Position von Sulfat in der Hofmeister-Reihe machen es zur beliebtesten Wahl für das Aussalzen von Proteinen.

2.6 Temperatur

Proteine fallen bei Temperaturerhöhung unterschiedlich schnell aus und denaturieren unterschiedlich schnell. Einige robuste Proteine sind jedoch gegen Hitzedenaturierung resistent. Daher kann durch das Aussetzen einer unreinen Mischung einer erhöhten Temperatur über einen angemessenen Zeitraum ein Protein in Lösung gereinigt werden, und zwar aufgrund der irreversiblen Denaturierung und Ausfällung der Verunreinigungen.

2.7 pH-Änderung

Proteine sind in Wasser löslich, da ihre geladenen Gruppen mit ionisierten Wassermolekülen interagieren. Durch die Anpassung des pH-Werts an den pI wird die Löslichkeit minimiert, da die Nettoladung des Proteins eliminiert wird. Die meisten Proteine haben einen $pI < 7$, und die relativ niedrigen Kosten von Säuren machen die pH-Anpassung mit Säure zu einer beliebten Methode zur Proteinfällung. Zu viel Säure oder Base kann jedoch zu einer irreversiblen Denaturierung führen.

2.8 Organische Lösungsmittel

Durch die Zugabe eines milden organischen Lösungsmittels zu einer wässrigen Proteinlösung wird die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels verringert, wodurch eine Proteinfällung induziert wird. Das Lösungsmittel muss vollständig mit Wasser mischbar sein (z. B. Ethanol und Aceton). Die Lösungsmittelfällung wird in der Regel bei niedrigen Temperaturen ($< 10\text{ °C}$) durchgeführt, da die Konformationssteifigkeit dann eine irreversible Denaturierung verhindert.

2.9 Polymere, Polyelektrolyte

Nichtionische, wasserlösliche Polymere induzieren eine Proteinfällung, indem sie Wasser aus der Solvatisierungsstruktur eines Proteins ausschliessen. PEG (Polyethylenglykol) ist das am häufigsten untersuchte und verwendete Polymer. Polyethylenglykol (PEG) ist ein synthetisches, wasserlösliches Polymer, das durch die Polymerisation von Ethylenglykol hergestellt wird. Aber auch Dextrane werden für diesen Zweck eingesetzt. Die Wirkung von Polymeren als Fällungsmittel ähnelt der Verteilung in wässrigen Zweiphasen- Polymersystemen. Hohe PEG-Konzentrationen sind erforderlich, um Proteine mit niedrigem Molekulargewicht auszufällen, während niedrige Konzentrationen für Proteine mit hohem Molekulargewicht erforderlich sind. Polyelektrolyte wie Caprylsäure, Polyacrylsäure, Carboxymethylcellulose und Polyethylenimine fällen Proteine bei einer viel geringeren Konzentration (normalerweise <0, 1 %) aus als nicht-ionische Polymere. Sie wirken eher wie Flockungsmittel und adsorbieren an das Protein. Daher fällen Polyelektrolyte im Gegensatz zu PEG zusammen mit dem Protein aus und können eine irreversible Denaturierung verursachen.

3 Die besondere Rolle der Membrantechnik

Die genannten Prozessschritte stellen lediglich eine vereinfachte Auswahl typischer Einheitsoperationen dar. In realen Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren werden diese Schritte in unterschiedlichen Kombinationen zu komplexen Prozessketten verknüpft. Bemerkenswert ist dabei, dass vor, innerhalb und nach nahezu jedem dieser Prozessschritte membranbasierte Trennverfahren eingesetzt werden können.

Die Membrantechnik ist somit nicht nur eine von vielen Prozessklassen, sondern eine Querschnittstechnologie, die sich in andere Prozessklassen integrieren lässt. Dieser systemische Charakter und das damit verbundene Potenzial werden in der Praxis häufig unterschätzt.

In allen Fällen zeigt sich, dass Membrantechnik nicht als isolierter Trennschritt wirkt, sondern als prozessintegrierendes Element, das klassische physikalisch-chemische Operationen funktional erweitert.

Besonders → [Affinitätsmembranen](#) erweitern die klassische Rolle der Membrantechnik, da sie neben der physikalischen Trennung zusätzlich gezielte Bindungsmechanismen nutzen. Dadurch lassen sich selektive Trenn- und Aufreinigungsschritte direkt in bestehende Prozessketten integrieren, ohne dass separate chromatographische Einheitsoperationen erforderlich sind.

Literatur

- [1] Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P.: *Lebensmittelchemie*. 7. Auflage. Berlin: Springer Spektrum, 2015. ISBN 978-3-642-12862-6.
- [2] Buchner, J.; Becker, G. W.; Meyer, A.: *Lebensmittelchemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2018. ISBN 978-3-13-147321-6.
- [3] Chmiel, H.: *Bioprozesstechnik*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. ISBN 978-3-642-12450-5.
- [4] Jaeger, K.-E.: *Einführung in die Enzymtechnologie*. Heidelberg: Springer Spektrum, 2014. ISBN 978-3-642-41785-0.
- [5] Kuriyan, J.; Konforti, B.; Wemmer, D.: *The Molecules of Life: Physical and Chemical Principles*. New York, Abingdon: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2013. ISBN 978-0-8153-4188-8.

- [6] Takors, R.: *Kommentierte Formelsammlung Bioverfahrenstechnik*. Wiesbaden: Springer Vieweg, 2014. ISBN 978-3-658-03669-7.