



HAW Hamburg-Fakultät Life Sciences

Biotechnologie

Bachelorarbeit

**Anwendbarkeit der Displacement-Chromatographie bei der Trennung von  
 $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin aus der Molke**

vorgelegt von:

Alexandra Pahl

Matrikelnummer: XXXXXXXXXX

Email: [Alexandra.Pahl@haw-hamburg.de](mailto:Alexandra.Pahl@haw-hamburg.de)

1. Gutachter:

Herr Prof. Dr. Birger Anspach

2. Gutachter:

Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen

Zeitraum: 13.01.2020 – 23.03.2020

## Abstract

Es wurden die reinen Proteine  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin mittels des Anionenaustauschermaterials Fractogel<sup>®</sup> EMD TMAE Hicap (M) untersucht. Dieses Material wurde in eine selbstgebaute Minisäule, welche ein Säulenvolumen von 0,12 ml besitzt, gefüllt. Die Minisäule wurde als Anionenaustauscher für alle Versuche verwendet. Die Untersuchung wurde mit der Methodik der Frontalchromatographie durchgeführt, wobei ein Probenvolumen zwischen 30 und 40 ml kontinuierlich über die Säule gegeben wurde. Anschließend erfolgten weitere Untersuchungen mit einem Proteingemisch der zwei reinen Proteine. Diese Vorversuche dienten dem Hauptversuch, in dem  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin durch eine Displacement-Chromatographie, bei der die Proteine durch einen Verdränger auf der Säule voreinander geschoben und eluiert werden sollen, aus der Molke getrennt wurden. Dazu wurde die aufbereitete Molke zunächst über einen Kationenaustauscher (HiTrap<sup>™</sup> SP XL) geleitet, um positiv geladene Molkeproteine abzutrennen. In der Displacement-Chromatographie wurden die gebundenen Proteine über einen Stufengradienten, welcher 1 M NaCl oder 1 M Citrat enthielt, eluiert. Dabei konnte durch die SEC Untersuchung ein Verdrängungseffekt von  $\alpha$ -Lactalbumin durch  $\beta$ -Lactoglobulin im Phosphatpuffer nachgewiesen werden.

# Inhalt

Abstract .....	ii
Abkürzungsverzeichnis .....	v
Abbildungsverzeichnis .....	vi
Tabellenverzeichnis.....	viii
1. Einleitung .....	1
2. Theoretischer Hintergrund .....	3
2.1 Ionenaustauschchromatographie .....	3
2.1.1 Grundlagen der Ionenaustauschchromatographie.....	3
2.1.2 Ionenaustauschchromatographie in der Praxis.....	4
2.2 Zonen- und Frontalchromatographie .....	5
2.3 Displacement-Chromatographie .....	7
2.4 Größenausschlusschromatographie .....	7
2.5 SDS-PAGE .....	7
2.6 Ultrafiltration .....	8
2.7 Proteine .....	9
2.7.1 $\beta$ -Lactoglobulin.....	9
2.7.2 $\alpha$ -Lactalbumin .....	9
2.8 Puffer .....	9
2.8.1 Phosphat .....	9
2.8.2 Imidazol.....	10
2.8.3 MOPS .....	10
2.8.4 Citrat.....	10
3. Materialien .....	11
3.1 Chemikalien.....	11
3.2 Proteine .....	11
3.3 Molke.....	11

3.4 Säulen .....	12
3.4.1 HiTrap™ DEAE FF 1 ml.....	12
3.4.2 HitTrap™ SP XL 1 ml.....	12
3.4.3 Fractogel® EMD TMAE Hicap (M) (selbsthergestellte Säule) .....	13
3.4.4 Superdex 75 HR 10/30.....	13
3.5 Geräte.....	14
3.5.1 ÄKTApurifier .....	14
4. Methoden.....	16
4.1 Allgemeingültige Methoden .....	16
4.1.1 Equilibrierung .....	16
4.1.2 Probenauftrag .....	16
4.1.3 Elution.....	16
4.1.4 Lagerung und Reinigung der Säule.....	16
4.2 Spezifische Methoden.....	17
4.2.1 Aufbereitung der Molke.....	17
4.2.2 Molke über SP XL-Säule .....	17
4.2.3 Herstellung der Säule .....	17
4.2.4 Molke über selbstgebaute Säule.....	19
4.2.5 Analyse über SEC .....	19
4.2.6 Analyse über SDS-PAGE .....	19
5. Ergebnisse/Diskussion .....	21
6. Zusammenfassung .....	58
7. Literaturverzeichnis.....	59
7.1 Literaturquellen .....	59
7.2 Bildquellen.....	61
8. Eidesstattliche Erklärung.....	62

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	– Bovines Serumalbumin
CV	– Column Volume
DEAE	– Diethylaminoethyl
DTT	– Dithiothreitol
EDTA	– Ethylendiamin-tetraessigsäure
MHD	– Mindesthaltbarkeitsdatum
MOPS	– 3 - (N- Morpholino) propansulfonsäure
SEC	– size exclusion chromatography
SDS-PAGE	– Sodium-dodecyl-sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ideale Durchbruchskurve [verändert nach [1]] .....	5
Abbildung 2: Fractogel® EMD TMAE Hicap (M) [2] .....	13
Abbildung 3: LOAD Ventilpositionen der ÄKTApurifier [3] .....	15
Abbildung 4: INJECT Ventilpositionen der ÄKTApurifier [4] .....	15
Abbildung 5: Herstellung der selbstgepackten Säule .....	18
Abbildung 6: Schema des Säulenaufbaus .....	18
Abbildung 7: Chromatogramm von DEAE FF HiTrap Säule mit Imidazolpuffer .....	22
Abbildung 8: Chromatogramm von DEAE FF HiTrap Säule mit Phosphatpuffer .....	22
Abbildung 9: Chromatogramm von DEAE FF HiTrap Säule mit MOPS-Puffer .....	23
Abbildung 10: Chromatogramm von selbstgepackter Säule (Säulenmaterial: Fractogel® EMD TMAE Hicap (M)) mit Phosphatpuffer .....	24
Abbildung 11: Frontalchromatographien von $\beta$ -Lactoglobulin in verschiedenen Puffern .....	25
Abbildung 12: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom $\beta$ -Lactoglobulin .....	26
Abbildung 13: Frontalchromatographien von $\alpha$ -Lactalbumin in verschiedenen Puffern .....	27
Abbildung 14: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom $\alpha$ -Lactalbumin .....	28
Abbildung 15: Frontalchromatographien vom Proteingemisch in verschiedenen Puffern .....	29
Abbildung 16: SEC Ergebnis vom Proteingemisch in Phosphatpuffer .....	30
Abbildung 17: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom Proteingemisch in Imidazolpuffer .....	30
Abbildung 18: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom Proteingemisch im Imidazolpuffer .....	31
Abbildung 19: SEC von BSA .....	32
Abbildung 20: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom Proteingemisch im MOPS Puffer .....	33
Abbildung 21: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom Proteingemisch im Phosphatpuffer .....	34
Abbildung 22: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung .....	35
Abbildung 23: Kalibriergeraden für den Phosphatpuffer .....	36
Abbildung 24: Kalibriergeraden für den MOPS Puffer .....	36
Abbildung 25: Kalibriergeraden für den Imidazolpuffer .....	37
Abbildung 26: Kalibriergerade für den Citratpuffer .....	37
Abbildung 27: Durchbruchskurven von $\beta$ -Lactoglobulin .....	38
Abbildung 28: Durchbruchskurven von $\alpha$ -Lactalbumin .....	40

Abbildung 29: Durchbruchskurven von dem Proteingemisch .....	41
Abbildung 30: Frontalchromatographie vom Molkenüberstand über SP XL Säule .....	45
Abbildung 31: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung .....	46
Abbildung 32: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung .....	47
Abbildung 33: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung .....	48
Abbildung 34: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung .....	49
Abbildung 35: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung .....	50
Abbildung 36: Frontalchromatographien von Molke über eigene Säule (Säulenmaterial: Fractogel® EMD TMAE Hicap (M)) .....	51
Abbildung 37: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie von Molke (MHD: 26.02.2020) im Phosphatpuffer .....	52
Abbildung 38: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie von Molke (MHD: 26.02.2020) im Phosphatpuffer 2. Durchlauf .....	53
Abbildung 39: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie von Molke (MHD: 26.02.2020) im MOPS Puffer .....	54
Abbildung 40: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie von Molke (MHD: 26.02.2020) im MOPS Puffer 2. Durchlauf .....	54
Abbildung 41: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie von Molke (MHD: 25.03.2020) im Phosphatpuffer .....	55
Abbildung 42: SDS-PAGE mit Silberfärbung .....	56
Abbildung 43: SDS-PAGE mit Silberfärbung .....	57

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien .....	11
Tabelle 2: Verwendete reine Proteine .....	11
Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien .....	14
Tabelle 4: Retentionsvolumina von $\beta$ -Lactoglobulin und $\alpha$ -Lactalbumin in verschiedenen Puffern .....	23
Tabelle 5: Dynamische Kapazitäten von $\beta$ -Lactoglobulin in verschiedenen Puffern .....	39
Tabelle 6: Statische Kapazitäten von $\beta$ -Lactoglobulin in verschiedenen Puffern .....	39
Tabelle 7: Dynamische Kapazitäten von $\alpha$ -Lactalbumin in verschiedenen Puffern .....	41
Tabelle 8: Dynamische Kapazitäten vom Proteingemisch in verschiedenen Puffern .....	42
Tabelle 9: Statische Kapazitäten vom Proteingemisch in verschiedenen Puffern .....	42
Tabelle 10: Pipettierschema Bradford-Assay .....	43
Tabelle 11: Standardreihe für das Bradford-Assay .....	44
Tabelle 12: Messergebnisse des Bradford-Assay .....	44
Tabelle 13: Berechnete Konzentrationen .....	45

# 1. Einleitung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Untersuchung der Anwendbarkeit der Displacement-Chromatographie bei der präparativen Trennung von Proteinen. Als Proteinquelle dient dabei die Molke, spezieller die Molkeproteine. Den größten prozentualen Anteil an Molkeproteinen stellen  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin dar, daher beschäftigt sich diese Arbeit mit der Trennung dieser beiden Proteine. Die Aufreinigung der Molkeproteine aus der Molke erweist sich aufgrund der nachgesagten Eigenschaften dieser Proteine als industriell interessant. So sollen diese Proteine beispielhaft bei der Wiederherstellung der Muskelfunktion helfen. [8] Neben dieser Eigenschaft, welche für zum Beispiel Sportler von Bedeutung ist, konnten Molkeproteine in der Krebstherapie ihren Einsatz finden. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich das Körpergewicht von unterernährten Krebspatienten durch Zugabe von Molkeproteinen schneller erhöht. [9] Durch diese vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten ist die Aufreinigung der Molkeproteine für die Industrie interessant geworden. Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit der präparativen Chromatographie von den Molkeproteinen. Das Ziel dieser Anwendung besteht darin, Biomoleküle wie Proteine aus einem Ausgangsstoff wie der Molke zu isolieren und somit aufzureinigen. Die verschiedenen Molkeproteine weisen unterschiedliche pI-Werte auf, wodurch ihre Ladungen durch die äußere Umgebung beeinflusst werden. Aus diesem Grund hat sich die Ionenaustauschchromatographie als Aufreinigungsmethode dieser Proteine etabliert. In der vorliegenden Arbeit wird diese Methode ebenfalls verwendet. Dabei wird sowohl ein Kationenaustauscher als auch ein Anionenaustauscher genutzt, um die Proteine  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin möglichst effektiv aus der Molke aufzureinigen. Der Unterschied zu bereits vorhandenen Arbeiten liegt in dem verwendeten Säulenvolumen. Dieses ist durch eine selbsthergestellte Säule mit 0,12 ml kleiner, als bei kommerziell zu erwerbenden Säulen mit 1 ml Volumen. Trotz dieses kleinen Säulenvolumens kann im Zuge einer Frontalchromatographie ein Vielfaches an Probenvolumen auf die Säule aufgetragen werden, wodurch es zu einer optimalen Auslastung der Säulenkapazität kommen soll. Dabei soll diese Minisäule für einen möglichst geringen Produktverlust sorgen, welcher sich in der sogenannten dynamischen Kapazität widerspiegelt. Eine zusätzliche Schwierigkeit besteht in der Trennung von den beiden betrachteten Proteinen, da sie einen ähnlichen pI-Wert besitzen, wodurch wiederum ihre Ladung bei gleichem äußerem Milieu ähnlich ist.  $\beta$ -Lactoglobulin hat einen pI-Wert von 5,2, bei  $\alpha$ -Lactalbumin liegt der pI-Wert zwischen 4,7-5,1. [10] Dieser Umstand wird versucht durch die Anwendung der Displacement-Chromatographie zu lösen. Die Displacement-Chromatographie ist eine spezielle Methode der bereits erwähnten

Frontalchromatographie. Dabei zeichnet sich die klassische Displacement-Chromatographie durch einen sogenannten Displacer aus, der eine höhere Bindung als alle Analyten zur Säule aufweist. Durch diesen sollen die Analyten im Optimalfall voreinander auf der Säule in Banden konzentriert und eluiert werden. Bei dieser Arbeit soll das an der Säule stärker bindende Protein das weniger stark bindende Protein vor sich verdrängen, sodass während der Probenaufgabe kein Verdrängungsstoff hinzugegeben wird. Dahingegen werden zur Elution die Verdrängungsstoffe NaCl oder Citrat verwendet und miteinander in ihrer Wirkung verglichen. Die Wirkung der Displacement-Chromatographie wird in der vorliegenden Arbeit mit dem Säulenmaterial Fractogel EMD TMAE Hicap (M) in unterschiedlichen Puffersystemen untersucht. Aufgrund der pI-Werte der zu untersuchenden Proteine wird dabei in einem pH-Bereich zwischen 6,8 und 6,9 gearbeitet. Zusammenfassend zeigen sich daraus zwei konkrete Ziele, die in dieser Arbeit verfolgt werden. Das erste Ziel besteht darin, die beschriebene Minisäule herzustellen und bei den erläuterten Versuchen zu verwenden. Dabei wurde eine Minisäule ausgesucht, da der mögliche Proteinverbrauch bei einer größeren Säule deutlich höher ausfallen würde. Dadurch wiederum soll die Effizienz einer Minisäule gezeigt werden. Das zweite Ziel ist somit die Anwendung der Frontal- und Displacement-Chromatographie mit der Minisäule, wobei zum einen die reinen Proteine bzw. das reine Proteingemisch von  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin mittels der Methodiken untersucht werden. Die Erkenntnisse aus diesen Vorversuchen sollen daraufhin genutzt werden, die Proteine aus der Molke aufzureinigen. [4][10]

## 2. Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Ionenaustauschchromatographie

#### 2.1.1 Grundlagen der Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine der drei Chromatographietechniken der Ionenchromatographie. Die anderen beiden Techniken sind die Ionenausschlusschromatographie und die Ionenpaarchromatographie. Alle drei Arten werden der Flüssigkeitschromatographie zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit hat nur die Ionenaustauschchromatographie Anwendung gefunden, wodurch im Folgenden nur deren Mechanismus weiter erläutert wird.

Das Material des Ionenaustauschers, welches in einer Säule gepackt ist, besteht grundlegend aus der Säulenmatrix und einer geladenen funktionellen Gruppe. Die Säulenmatrix ist mit der funktionellen Gruppe kovalent über einen Spacer verbunden. Zusammen bilden sie die stationäre Phase der Ionenaustauschchromatographie. An die geladene funktionelle Gruppe kann ein Gegenion, beispielhaft ein Protein, binden. Dieses befindet sich gelöst in der mobilen Phase des Chromatographiesystems. Die stationäre Phase kann auf zwei verschiedene Weisen von der mobilen Phase, welche als Puffer vorliegt, durchströmt werden. Zum einen kann sie zwischen den einzelnen Partikeln der stationären Phase verlaufen, dort ist der Widerstand geringer und der Fluss erfolgt größtenteils durch Konvektion. Zum anderen kann die mobile Phase in das Porensystem der stationären Phase gelangen, dieses besitzt aber meistens aufgrund ihrer Größe einen höheren Widerstand. Deshalb fließt die mobile Phase dort nur über Diffusion. Die Bindung des Gegenion an die stationäre Phase beruht auf den unterschiedlichen Ladungen, wodurch die Gegenionen von anderen Gegenionen ausgetauscht werden können. Dabei verdrängt ein Gegenion ein anderes Gegenion, sobald es eine stärkere Wechselwirkung gegenüber der funktionellen Gruppe aufweist. Es ist aber auch möglich, dass unterschiedliche Gegenionen zeitgleich an die stationäre Phase binden. Ein Unterschied wird dahingegen getroffen, ob die funktionelle Gruppe anionisch oder kationisch ist. Beim sogenannten Anionenaustauscher ist die funktionelle Gruppe positiv geladen, beispielhaft dafür ist eine quartäre Ammoniumbase. Somit können negativ geladene Gegenionen sich an die funktionelle Gruppe binden. Der Kationenaustauscher verhält sich genau andersherum, besitzt demnach negativ geladenen funktionelle Gruppen und kann positiv geladene Gegenionen binden. Eine Sulfonatgruppe ist dabei ein Beispiel einer funktionellen Gruppe bei einem Kationenaustauscher. Zusätzlich wird zwischen schwachen und starken Ionenaustauschern unterschieden. Es hängt davon ab, ob die funktionelle Gruppe eine starke oder schwache Säure

bzw. Base ist. Schwache Bestandteile liegen bei bestimmten pH-Werten nicht dissoziiert vor. Dadurch ist der pH-Wert Bereich, bei dem mit schwachen Ionenaustauschern gearbeitet werden kann, kleiner. Starke Ionenaustauscher werden nicht ausschlaggebend von dem pH-Wert beeinflusst. Von Anionenaustauschern lässt sich sagen, dass der pH-Wert eine Einheit unterhalb des  $pK_S$ -Wertes der funktionellen Gruppe liegen sollte. Damit wird eine positive Ladung der funktionellen Gruppe gewährleistet. Für den Kationenaustauscher wird eine negative Ladung erreicht, indem der pH-Wert oberhalb des  $pK_S$ -Wertes liegt. Neben der funktionellen Gruppe kann der pH-Wert auch die Ladung des Gegenions beeinflussen. Ein Gegenion stellt in der vorliegenden Arbeit ein Protein dar. Die Ladung des Proteins wird durch die eigenen verschiedenen funktionellen Gruppen beeinflusst. Dabei entscheidet der jeweilige  $pK_S$ -Wert der funktionellen Gruppe, wann sie protoniert oder deprotoniert ist. Demnach kann das gleiche Protein bei unterschiedlichen pH-Werten eine andere Ladung besitzen. Eine Faustregel besagt, dass der pH-Wert mindestens eine pH-Einheit von dem pI-Wert des Proteins entfernt liegen sollte. Wenn eine ausreichend negative Ladung des Proteins das Ziel sein soll, sollte der pH-Wert über dem pI-Wert sein. Für eine positive Ladung dementsprechend eine Einheit unterhalb des pI-Wertes. Neben den bisher betrachteten Parametern muss noch die Pufferkonzentration in Betracht gezogen werden. Es wird üblicherweise eine Konzentration zwischen 10 mM und 50 mM gewählt. Wenn die Konzentration höher angesetzt werden würde, würden die Salzionen möglicherweise die Proteine von der Säule verdrängen, auch Salting-out-Effekt genannt. Eine noch geringere Pufferkonzentration könnte zu Schwankungen im pH-Bereich führen. Außerdem besteht die Möglichkeit der Aggregation des Analyten, da die Löslichkeit mit zu geringer Salzkonzentration sinkt. Dieser Mechanismus wird auch als Salting-in-Effekt bezeichnet. [2][3][5][6]

### 2.1.2 Ionenaustauschchromatographie in der Praxis

Die Durchführung der Ionenaustauschchromatographie startet mit der Equilibrierung der Säule. Dabei wird Puffer als mobile Phase über die Säule gepumpt. Der Puffer hat nach bereits erläuterten Kriterien einen bestimmten pH-Wert und eine gewisse Salzkonzentration. Durch die Equilibrierung entsteht ein Gleichgewicht zwischen der mobilen und stationären Phase. Nachdem dieses Gleichgewicht erreicht ist, kann der Probenauftrag erfolgen. Die Probe wurde dazu vorher in der verwendeten mobilen Phase gelöst. Mit dem Probenauftrag werden alle Bestandteile der Probe an die Säule binden, die eine entgegengesetzte Ladung zu der stationären Phase aufweisen. Dieser Prozess wird durch die Bindungskapazität der Säule limitiert. Als letzter Hauptschritt erfolgt die Elution der gebundenen Anteile. Diese kann auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt werden. Zum einen kann der pH-Wert verändert werden,

wodurch sich die Ladung der gebundenen Substanzen verändert und diese von der stationären Phase abgestoßen werden. Mit dieser Art können jedoch unterschiedlich gebundene Substanzen schwer getrennt voneinander eluieren, da der pH-Wert sich schnell verändert. Die andere Art der Elution ist die Zugabe einer erhöhten Salzkonzentration zu dem Elutionspuffer. Die Salzionen verdrängen die zuvor gebundenen Substanzen nach der Stärke ihrer Wechselwirkung von der stationären Phase. Dabei kann das Salz als linearer Gradient oder als Stufengradient zur Elution führen. Bei dem linearen Gradienten besteht die Möglichkeit, dass die unterschiedlich gebundenen Bestandteile weiter voneinander getrennt eluiert werden. Der Stufengradient erhöht dahingegen die Salzkonzentration sprunghaft, wodurch auch unterschiedliche Substanzen von der Säule auf einmal eluiert werden. [2][3][5][6]

## 2.2 Zonen- und Frontalchromatographie

Die beiden Techniken der Zonen- und der Frontalchromatographie unterscheiden sich in Bezug auf den Probenauftrag. Bei der Zonenchromatographie werden verhältnismäßig kleine Probenvolumina auf die Säule gegeben. Dabei wird im isokratischen Betrieb gearbeitet. Der Name dieser Technik rührt daher, dass die zu trennenden Substanzen sich als Zonen durch die Säule aufteilen. Die Frontalchromatographie arbeitet dahingegen mit großen Probenvolumina. Diese sind oft so groß, dass sie das eigentliche Säulenvolumen übersteigen. Zu Beginn des Probenauftrages sind noch viele Bindungsstellen der stationären Phase frei und werden erst mit dem höheren Probenvolumen immer mehr besetzt. Diese Steigerung der freien Stellen läuft solange, bis keine freien Stellen mehr zu Verfügung stehen und die Probenkonzentration am Anfang der Säule der am Ende gleicht. Dieser Verlauf lässt sich auch mittels einer Durchbruchskurve aufzeigen, welche sich aus einer Frontalchromatographie entwickelt. [5][6]

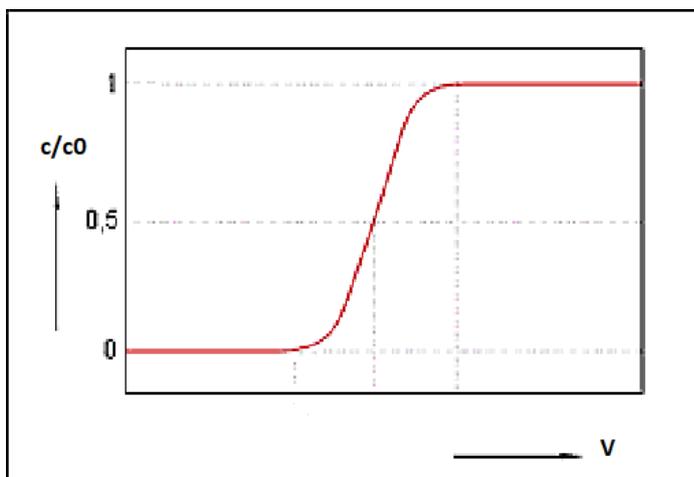


Abbildung 1: Ideale Durchbruchskurve [verändert nach [1]]

In Abbildung 1 ist eine ideale Durchbruchskurve zu erkennen. Daraus lassen sich zwei Parameter bestimmen, die eine Aussage über Eignung der Säule bei den verwendeten Bedingungen treffen kann. Zum einen ist das die statische Kapazität. Diese gibt die Bindungskapazität während eines Gleichgewichts an. Sie kann mit der folgenden Formel berechnet werden.

$$q = V_e \left( \frac{c}{c_0} = 0,5 \right) \cdot c_0 \quad (2.1)$$

Wenn die obere Formel 2.1 für die Berechnung der statischen Kapazität genutzt werden will, muss die Durchbruchskurve jedoch eine Punktsymmetrie zum Punkt  $\frac{c}{c_0} = 0,5$  besitzen. Sobald diese Voraussetzung nicht gegeben ist, muss eine numerische Betrachtung der Durchbruchskurve mithilfe der Trapezformel erfolgen, wie in der folgenden Formel 2.2 dargestellt.

$$\text{statische Kapazität} = c_0 \cdot \sum \frac{(y_0 - y_1) \cdot (x_1 - x_0)}{2} \quad (2.2)$$

Die oberhalb liegende Fläche der Durchbruchskurve ist dann mit der gebundenen Produktmasse gleich zu setzen. Das Integral der Durchbruchskurve stellt dahingegen den Produktverlust dar. Der zweite Parameter ist die dynamische Kapazität. Für die Bestimmung muss zunächst eine sogenannte Grenzkonzentration bestimmt werden. Diese Grenzkonzentration bedeutet Produktverlust, daher sind übliche Werte für diese Konzentration bei 1 - 5 %. Diesem entspricht wiederum einen Wert von  $\frac{c}{c_0}$  zwischen 0,01 und 0,05. Bei der gewählten Grenzkonzentration wird ein Lot am Schnittpunkt mit der Durchbruchskurve auf der x-Achse gesetzt. Das daraus resultierende Volumen wird anschließend mit der Probenkonzentration multipliziert. Dieses Ergebnis entspricht dann der Produktmasse, die auf die Säule aufgetragen werden kann und bei der man einen gewissen Verlust bestimmt hat. Es zeigt sich ein Einfluss von verschiedenen Parametern auf die dynamische Bindungskapazität, wenn die statische Bindungskapazität als gleich betrachtet wird. So sind beispielhaft die Partikelgröße oder auch der Porendurchmesser für verschieden steile Durchbruchskurven und somit unterschiedliche dynamische Bindungskapazitäten verantwortlich. Kleinere Partikel haben einen besseren Zugang zum Porensystem, wodurch sie wiederum geringere Diffusionswege aufweisen. Dies äußert sich dann in einer steileren Durchbruchskurve. Die gleiche Bedeutung zeigt auch der Porendurchmesser. Ein größerer Porendurchmesser verbessert die Bindungsfähigkeit des Analyten zur funktionellen Gruppe, was sich somit ebenfalls in einer steileren Durchbruchskurve widerspiegelt. [5][6]

### 2.3 Displacement-Chromatographie

Die Displacement-Chromatographie ist ähnlich zu der bereits erwähnten Frontalchromatographie. Zunächst wird auch bei dieser Technik die Probe in einem Zuführungsstrom auf die Säule gegeben. Der Unterschied zur Frontalchromatographie liegt darin, dass dieser Zuführungsstrom unterbrochen wird und dafür die mobile Phase, welche einen sogenannten Displacer enthält, über die Säule gepumpt wird. Dieser Displacer hat eine größere Bindungsstärke als jeder Analyt, wodurch diese von der Säule verdrängt werden. Dabei erfolgt die Verdrängung nach der Bindungsstärke der Analyten. Der Analyt mit der geringeren Bindungsstärke wird somit zuerst aus der Säule gedrängt. [1] In der vorliegenden Arbeit wird der Displacer dem Elutionspuffer zugegeben, wodurch dieser alle zuvor gebundenen Proteine von der Säule verdrängt. Ein Vorteil dieser Chromatographietechnik besteht in möglichen scharfen Banden in der Elution. Der Displacer soll dafür sorgen, dass sich die Analyten in Banden voreinander verdrängen und so auch eluiert werden. Durch den Einsatz des Stufengradienten zur Elution der gebundenen Proteine kann mittels des Displacers auch eine hohe Proteinkonzentration erhalten werden. Durch den Stufengradienten ergibt sich jedoch auch ein Nachteil. Denn durch die Zugabe des Displacers auf sofort 100% erfolgt schwer eine Basislinientrennung der Elutionspeaks. Jedoch ist dies, je nach Problemstellung, nicht unbedingt notwendig. Desweiteren ist die Entscheidung über die Wahl des Displacers entscheidend. Dieser muss stärker als jeder Analyt an die Säule binden können. Daher liegt eine weitere Problematik bei dem Entfernen des Displacers. Dadurch können sich auch mögliche Verunreinigungen entwickeln. [6]

### 2.4 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie, auch kurz SEC, werden Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe getrennt. Dabei hängt die Trennung von dem Zugang zum Porensystem der stationären Phase ab. Große Moleküle haben keinen Zugang zu diesem System und werden somit mit der mobilen Phase als erstes von der Säule eluiert. Je kleiner das Molekül, umso besser gelangen sie in das Porensystem und werden dort zurückgehalten. Dieses Zurückhalten äußert sich in einer späteren Elution von der Säule. In dem Chromatogramm ist dies wiederum an einem späteren Peak zu erkennen. [6]

### 2.5 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist eine Methodik, bei der Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dazu wird ein Trenngel aus Polyacrylamid verwendet. Kleinere Proteine können durch

dieses Gel weiter wandern, als größere. Damit die Proteine überhaupt durch das Gel wandern, wird ihnen SDS zugesetzt. Diese Substanz sorgt dafür, dass die Eigenladung der Proteine mit negativer Ladung überdeckt wird. Dazu wird die zu untersuchende Probe mit Probenpuffer, welcher SDS enthält, versetzt und bei 95°C erhitzt. Durch die Hitze werden die Proteine denaturiert und das SDS kann sich an sie anlagern. Durch den Anschluss des Gels an ein elektrisches Feld wandern die negativ geladenen Proteine nach ihrer Größe zum Pluspol. Es gibt noch die Möglichkeit der reduzierenden SDS-Page, dabei wird neben dem SDS eine reduzierende Thiolverbindung, zum Beispiel DTT, hinzugegeben. Dadurch werden Disulfidbrücken der Proteine aufgetrennt und es lassen sich weitere Proteinstrukturen erkennen. Die hinterlassenen Banden der Proteine können durch verschiedene Färbemethoden wie Coomassie-Färbung oder Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Zur Identifizierung der verschiedenen Proteine dient ein Gemisch aus bekannten Proteinen, auch Markerproteine genannt. Von diesen Markerproteinen ist das Molekulargewicht bekannt, wodurch die unbekannt Proteine ermittelt werden können. [3]

## 2.6 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration wird zur Aufkonzentration von Proteinen mit einem Durchmesser zwischen 5 und 500 nm genutzt. Die Proteinlösung wird dazu tangential zu einer Membran, auch als Cross-Flow bezeichnet, gepumpt. Dabei werden einige Bestandteile der Lösung zurückgehalten, dieser Teil wird auch als Retentat bezeichnet. Der Anteil, der durch die Membran gelangt und den Kreislauf verlässt, heißt Permeat. Durch den Verlust des Permeats, oft Wasser, Salzionen oder Puffer, wird das Retentat aufkonzentriert. Der NMWCO-Wert (Nominal Molecular Weight Cut-Off) gibt dabei an, welche Bestandteile durch die Membran gelangen und welche zurückgehalten werden. Bei einem solchen Wert, welcher als molare Masse angegeben wird, wird davon ausgegangen, dass 90 % der Substanzen über diesem Wert zurückgehalten werden. Zur Umpufferung der aufkonzentrierten Molke wurde als Membranverfahren die Diafiltration verwendet. Dazu wird kontinuierlich der gewünschte Puffer der Filtrationsanlage hinzugefügt. Mit dem Bradford-Assay kann die Gesamtproteinkonzentration gemessen werden, wodurch dieser Assay als Analyse einer Ultrafiltration dienen kann. Als erfolgreich kann die Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration angesehen werden, wenn die Proteinkonzentration im Retentat höher als im Permeat ist. [3][5]

## 2.7 Proteine

### 2.7.1 $\beta$ -Lactoglobulin

$\beta$ -Lactoglobulin ist, wie bereits in der Einleitung erwähnt, das prozentual am meisten enthaltene Molkeprotein. Es besteht aus 162 Aminosäuren und hat eine Größe von 18,4 kDa. In der Milch hat  $\beta$ -Lactoglobulin eine Konzentration von 2-4 g/l. [11] Der pI-Wert von  $\beta$ -Lactoglobulin liegt bei 5,2. [10] Der Radius dieses Proteins liegt bei über 2 nm. Die Struktur weist außerdem zwei Disulfidbrücken und eine freie Thiolgruppe auf. Zudem gibt es zwei verschiedene Genvarianten von  $\beta$ -Lactoglobulin, die Variante A und B. [12]

### 2.7.2 $\alpha$ -Lactalbumin

$\alpha$ -Lactalbumin ist das am zweithäufigsten vorkommende Molkeprotein, mit einer Konzentration von 0,6-1,7 g/l in der Milch. Es hat mit 123 Aminosäuren eine Größe von 14,2 kDa. [11] Der pI-Wert von  $\alpha$ -Lactalbumin liegt zwischen 4,7 und 5,1. [10]  $\alpha$ -Lactalbumin besitzt vier Disulfidbrücken, jedoch keine freie Thiolgruppe. [12]

## 2.8 Puffer

Puffer sind zur Stabilisierung des pH-Wertes zuständig. Dabei soll der pH-Wert bei Veränderung der Umgebungsbedingungen wie zum Beispiel der Temperatur möglichst gleich gehalten werden. [13] Bei der Ionenaustauschchromatographie wird eine Pufferkonzentration zwischen 10 mM und 50 mM empfohlen. [5] In den Experimenten dieser Arbeit wurden alle verwendeten Puffer mit einer Konzentration von 20 mM hergestellt. Aufgrund der Auswahl der Puffer und der betrachtenden Proteine wurden die Puffer auf einen pH-Bereich zwischen 6,8 und 6,9 eingestellt.

### 2.8.1 Phosphat

Für die Erstellung des Phosphatpuffers wurde Natriumdihydrogenphosphat – Dihydrat von Roth verwendet. Das Molekulargewicht liegt bei  $156,01 \frac{g}{mol}$ . Die Phosphorsäure hat drei verschiedene Dissoziationsstufen, wodurch sie auch drei  $pK_S$ -Werte besitzt. Diese liegen bei den Werten 2,0, 7,2 und 12,3. Der Pufferbereich dieses Puffers liegt zwischen den pH-Werten 6,2 und 8,2. Daraus zeigt sich, dass der Phosphatpuffer geeignet ist, neutrale pH-Bereiche zu puffern. [14][15]

### 2.8.2 Imidazol

Das Molekulargewicht von dem verwendeten Imidazol liegt bei  $68,08 \frac{g}{mol}$ . Bei 6,95 (bei 25°C) ist der  $pK_s$ -Wert dieses Puffers und der Pufferbereich reicht zwischen den pH-Werten 6,2 und 7,8. [13][16][17]

### 2.8.3 MOPS

In dem MOPS-Puffer befindet sich das Pufferreagenz 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure. Das verwendete Puffersalz hat ein Molekulargewicht von  $209,27 \frac{g}{mol}$ . Der  $pK_s$ -Wert dieses Reagenzes liegt bei 7,14 (bei 25°C). Somit ergibt sich ein Pufferbereich von 6,5 bis 7,9. [13][18]

### 2.8.4 Citrat

Als Puffersalz wurde tri-Natriumcitrat Dihydrat mit einem Molekulargewicht von  $294,1 \frac{g}{mol}$  verwendet. [19] Der Citratpuffer hat so wie der Phosphatpuffer drei Dissoziationsstufen, dadurch ergeben sich die drei  $pK_s$ -Werte 3,14, 4,76 und 6,39. [20]

### 3. Materialien

#### 3.1 Chemikalien

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien**

Chemikalien	Hersteller	Reinheit in %
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth	≥99,0
Imidazol		≥99,0
MOPS		≥99,0
Citronensäure		≥99,5
Natriumchlorid		≥99,5
Tri-Natriumcitrat Dihydrat		≥99,0
EDTA Dinatriumsalz		≥99,0
Essigsäure		≥99,8
Natriumacetat		≥99,0
Silbernitrat		≥99,9
Natriumcarbonat		≥99,5
Ethanol	Merck	≥99,5
Natriumthiosulfat Pentahydrat	VWR Chemicals	≥99,0
Aceton	Merck	

#### 3.2 Proteine

**Tabelle 2: Verwendete reine Proteine**

Protein	Hersteller	Reinheit
β-Lactoglobulin	Sigma-Aldrich	≥90%
α-Lactalbumin	Sigma-Aldrich	≥85%

#### 3.3 Molke

Während der Käseproduktion entsteht ein lösliches Nebenprodukt, die sogenannte Molke. Pro Kilogramm Käse entstehen im Durchschnitt 9 kg Dünnmolke. [4] Dabei ist unter Dünnmolke die Molke zu verstehen, die tatsächlich bei der Käseherstellung anfällt. Jedoch wird diese Dünnmolke oft aufkonzentriert, wobei dann von einem Molkekonzentrat zu sprechen ist. Zusätzlich kann Molke auch auf Grundlage des Herstellungsprozesses des Käses unterschieden

werden. Wenn Lab für die Käseherstellung verwendet wird, wird von der Süßmolke gesprochen. Das Gegenteil dazu ist die Sauermolke, welche durch den Einsatz von Milchsäurebakterien entsteht. [7] Der industriell interessante Anteil in der Dünnmolke sind die Molkeproteine. Diese sind mit einem Anteil von ca. 0,5 % in der käuflich zu erwerbender Molke enthalten. Dabei wird zwischen den 7 verschiedenen Proteinen  $\beta$ -Lactoglobulin,  $\alpha$ -Lactalbumin, Immunoglobulin-G, Serumalbumin, Transferrin, Lactoferrin und Lactoperoxidase unterschieden. Dieser Reihenfolge entsprechend steigt das Vorkommen der Proteine. B-Lactoglobulin kommt mit über 45% am häufigsten vor. Die Lactoperoxidase ist dahingegen lediglich mit einem Prozentanteil von ca. 0,45 % vertreten. Das  $\alpha$ -Lactalbumin macht mit über 20 % den zweitgrößten Anteil aus. [4]

Als Ausgangsprodukt für die Hauptversuche wurde „Reine Molke“ von der Marke Fruttis (Mindesthaltbarkeitsdatum 26.02.2020 bzw. 25.03.2020) verwendet. Dabei handelt es sich um eine wärmebehandelte Sauermolke, welche es in 500 g Packungen zu erwerben gibt. Laut der Verpackung enthält dieses Produkt 0,5 g Eiweiß pro 100 g. Es wurden pro Hauptversuch jeweils 1 l Molke verwendet.

### 3.4 Säulen

#### 3.4.1 HiTrap™ DEAE FF 1 ml

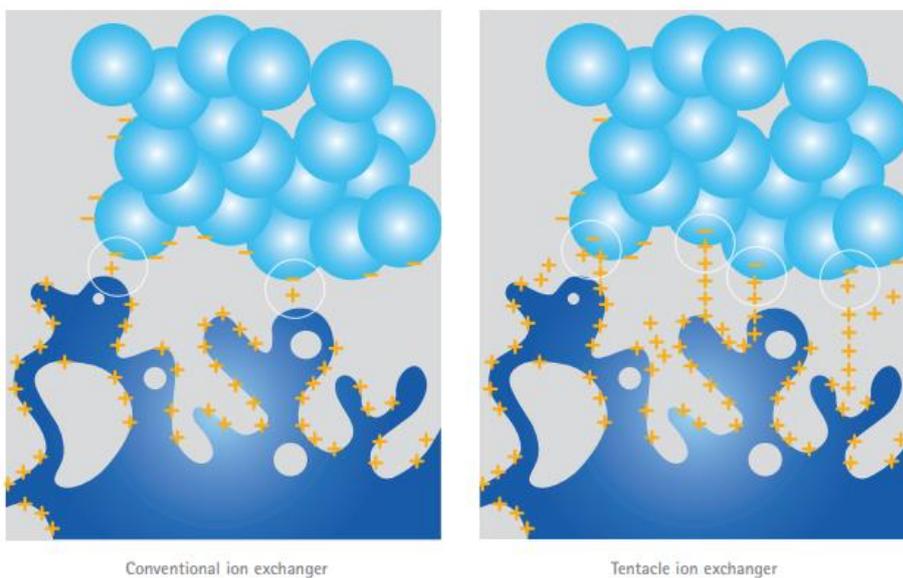
Bei der DEAE Säule handelt es sich um einen schwachen Anionenaustauscher. Das FF in der Bezeichnung steht für Fast-Flow. Nach Herstellerangaben ist eine Flussrate <4 ml/min möglich. Wie der Name ebenfalls verrät, beträgt das Säulenvolumen 1 ml. Laut dem Hersteller verträgt die Säule einen Druck bis 0,5 MPa. Außerdem kann diese bis zu 110 mg HSA/ml Medium binden. [21] Diese Säule wurde nur zu Beginn der Vorversuche genutzt, um die Bindungsmöglichkeit der Proteine in dem gewählten pH-Bereich zu bestätigen. Dabei wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem eingestellten Maximaldruck von 0,3 MPa gearbeitet.

#### 3.4.2 HitTrap™ SP XL 1 ml

Die SP Säule ist ein starker Kationenaustauscher. Das Material dieser Säule besteht aus Sepharose, der Zusatz XL weist auf eine besonders hohe Bindungskapazität hin. Diese liegt bei > 160 mg Lysozym/ml Medium. Die Angaben des Herstellers zur Flussrate und zum Druck entsprechen der DEAE Säule. [22]

### 3.4.3 Fractogel® EMD TMAE Hicap (M) (selbsthergestellte Säule)

Die Vorgehensweise der Herstellung der Säule wird in den Methoden genauer erläutert. Das gewählte Füllungsmaterial fungiert als starker Anionenaustauscher. Die Partikelgröße liegt zwischen 40-90 µm bei dem verwendeten M-Typ. Mit einem pH-Bereich von 2-12 ist mit diesem Material ein großer möglicher Arbeitsbereich gegeben. Der maximale Druck beträgt 0,8 MPa. Laut dem Hersteller kann dieses Material besonders große Proteinmengen binden, da an der Matrix sogenannte Tentakel hinzugefügt wurden. Diese sollen einer sterischen Hinderung der Proteine entgegenwirken. [23] Anhand der noch folgenden Abbildung 2 der Herstellungsfirma Merck verdeutlicht sich die gewünschte Wirkung. Mit diesem Material wurde eine Säule mit einem Volumen von ca. 0,12 ml befüllt.



**Abbildung 2: Fractogel® EMD TMAE Hicap (M) [2]**

Auf der linken Seite ist eine gewöhnliche Matrix zum Ionenaustausch dargestellt. Die Firma Merck hat, wie auf der rechten Seite zu sehen, Tentakeln an ihre Säulenmatrix gebunden. Dadurch soll eine größere Proteinmenge Zugang zur Matrix haben.

### 3.4.4 Superdex 75 HR 10/30

Die Superdex wurde für die Größenausschlusschromatographie genutzt. Sie hat ein Säulenvolumen von 24 ml und eine durchschnittliche Partikelgröße von 13 µm. Es lassen sich mit der Superdex Proteine in dem Größenbereich zwischen 3 und 70 kDa nach ihrer Größe trennen. Die Flussrate kann zwischen 0,5 und 1 ml/min und der maximale Druck bei 1,8 MPa liegen. [24]

### 3.5 Geräte

**Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien**

Gerät	Bezeichnung/Hersteller
ÄktaStart	ÄKTApurifier GE Healthcare
SuperLoop	Pharmacia
Ultrafiltrationsanlage	Jabsco
Ultrazentrifuge	Thermo Scientific
pH-Meter	Knick
Vakuumpumpe	-
Waage	Sartorius
Assay Messung	Thermo
Photometer	Biochrom
Sterilfilter	Cellulose Acetate Filter 0,45/0,22 Sartorius
Wärmeschrank	Binder
Wärmeschüttler	Eppendorf
Kippschüttler	VWR
Glaskugeln	B.Braun Melsungen AG

#### 3.5.1 ÄKTApurifier

Die ÄKTApurifier wurde für alle Frontalchromatographien und Größenausschlusschromatographien verwendet. Es wurden zwei unterschiedliche Geräte, die jedoch den gleichen Aufbau hatten, genutzt. Der einzige Unterschied lag in den Wegstrecken der UV Detektoren. Der eine hatte eine Wegstrecke von 2 mm, der zweite eine von 5 mm. Bei dem Vergleich der Messergebnisse musste dieser Umstand berücksichtigt werden. Dazu wurden die gemessenen UV Messdaten über den Faktor 2,5 umgerechnet. Es wurden nur einige Messergebnisse umgerechnet, sodass die Ergebnisse vergleichbar worden.

Ein entscheidendes Bauteil dieser Anlage ist das Probenventil. Dieses Ventil kann sich in drei verschiedenen Positionen verdrehen. Im Folgenden werden jedoch nur zwei Positionen bildlich dargestellt. Die erste ist die LOAD Position. Bei dieser wird die Probe über die Probenspritze auf die Probenschleife gegeben. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass etwas mehr Probe durch die Spritze aufgezogen wird, damit tatsächlich die gesamte Probenschleife beladen ist. In

dieser Ventilstellung wird die Säule auch equilibriert, da die Pumpe direkt mit dem Eingang der Säule verbunden ist.

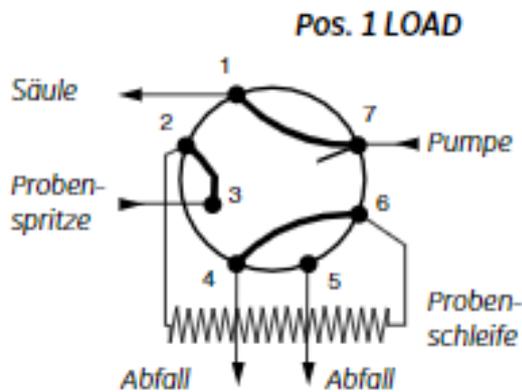


Abbildung 3: LOAD Ventilpositionen der ÄKTApurifier [3]

Bei der zweiten Position INJECT wird die Pumpe mit der Probenschleife verbunden. Außerdem verknüpft sich die Ventilposition 2 mit dem Säuleneingang, wodurch die Probe aus der Probenschleife auf die Säule gepumpt werden kann.

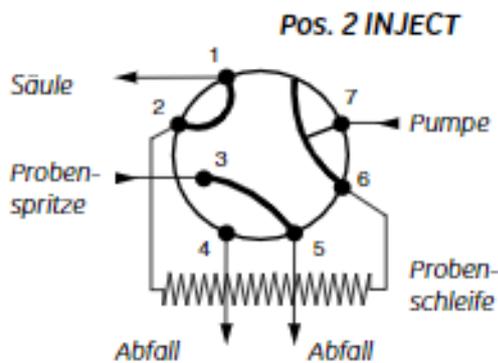


Abbildung 4: INJECT Ventilpositionen der ÄKTApurifier [4]

Die dritte Position heißt WASTE. Durch diese wird alles, was sich in der Systempumpe befindet, in den Abfall gepumpt. In dieser Position kann keine neue Probe in die Probenschleife gespritzt werden, da die Position 3 geschlossen ist.

## 4. Methoden

### 4.1 Allgemeingültige Methoden

Die folgenden Methoden gelten für jeden Umgang mit den Chromatographienanlagen. Wenn es Unterschiede zwischen den Versuchen gab, wird dies gesondert angegeben.

#### 4.1.1 Equilibrierung

Die Equilibrierung der Säule erfolgte mit den unterschiedlichen Puffersystemen. Sie wurde manuell gestartet und ebenfalls beendet. Dabei war darauf zu achten, dass sich alle Messlinien jeweils auf eine Basislinie orientieren. Zusätzlich wurde in den verschiedenen geschriebenen Methoden ein geringes Equilibrierungsvolumen hinzugefügt, damit mit Sicherheit die Basislinien erreicht werden konnten. Bei den 1 ml Säulen und der selbstgebauten 0,12 ml Säule betrug dies 5 CV, bei der Größenausschluss säule 0,1 CV.

#### 4.1.2 Probenauftrag

In den Vorversuchen erfolgte der Probenauftrag über verschieden große Probenschleifen, immer manuell über eine Probenspritze. Bei der Frontalchromatographie wurde der Probenauftrag über einen sogenannten Super Loop durchgeführt. Mit diesem Probenloop konnte ein Probenvolumen von bis zu 50 ml auf die Säule gegeben werden. Auch hier erfolgte der Probenauftrag manuell in den Super Loop. Die Probe wurde dann aufgrund des eingestellten Flusses und des Drucks kontinuierlich durch einen Kolben auf die Säule gepumpt. Das tatsächlich aufgetragene Probenvolumen variierte hierbei zwischen 30 ml und 40 ml.

#### 4.1.3 Elution

Innerhalb der Vorversuche wurde die Elution zunächst jeweils mit einem Zusatz von 1 M Natriumchlorid in dem Elutionspuffer erreicht. Bei der Anwendung der Displacement-Chromatographie wurde sowohl mit 1 M Natriumchlorid als auch mit 0,5 M Citrat im Elutionspuffer gearbeitet.

#### 4.1.4 Lagerung und Reinigung der Säule

Alle verwendeten Säulen werden in 20% Ethanol gelagert. Dies soll dafür sorgen, dass keine Kontaminationen mit Bakterien erfolgen. Die Reinigung von Säulen ist immer abhängig vom Säulenmaterial. Es wurde lediglich die selbstgepackte Säule einmal gereinigt. Wie vom Hersteller empfohlen wurde dabei auf eine 0,2 M NaOH-Lösung zurückgegriffen (Herstellerangabe 0,1-0,5 M).

## 4.2 Spezifische Methoden

Bevor die Molke als Ausgangsprodukt der Hauptversuche verwendet wurde, erfolgten eine Reihe von Vorversuchen. Dazu wurden bereits aufgereinigte Chargen der Proteine  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin verwendet. Diese Vorversuche sollten dazu dienen, das Verhalten der Proteine unter verschiedenen Versuchsbedingungen sehen zu können und somit passende Bedingungen für die Hauptversuche auszuwählen. Daher werden lediglich die Ergebnisse dieser Vorversuche im Folgenden dieser Arbeit gezeigt und nicht weiter auf deren Methodik eingegangen.

### 4.2.1 Aufbereitung der Molke

Die gekaufte Molke (Proteinanteil = 0,5 g/100 g) wurde zu Beginn mit einer Ultrafiltrationsanlage um einen Faktor zwischen 3 und 4 aufkonzentriert. Dabei wurde jeweils 1 l Molke aufkonzentriert und mit 5x250 ml des jeweiligen Puffersystems diafiltriert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 50.000 g für 25 Minuten bei 4°C zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen wie zum Beispiel Fetten. Bei so einer Ultrazentrifuge ist darauf zu achten, dass die gegenüberliegenden Zentrifugenröhrchen einen maximalen Gewichtsunterschied von 0,5 g haben.

### 4.2.2 Molke über SP XL-Säule

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand aus den Zentrifugenröhrchen abgenommen und damit weitergearbeitet. Ca. 40 ml dieses Überstandes wurde für eine Frontalchromatographie mittels des SuperLoops über die SP XL Säule gegeben. Diese Säule wurde verwendet, um die positiv geladenen Proteine aus der Molke vorher abtrennen zu können und somit eine erfolgreichere Trennung der betrachteten Proteine zu gewährleisten. [11] Die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem Druck von 0,3 MPa betrieben.

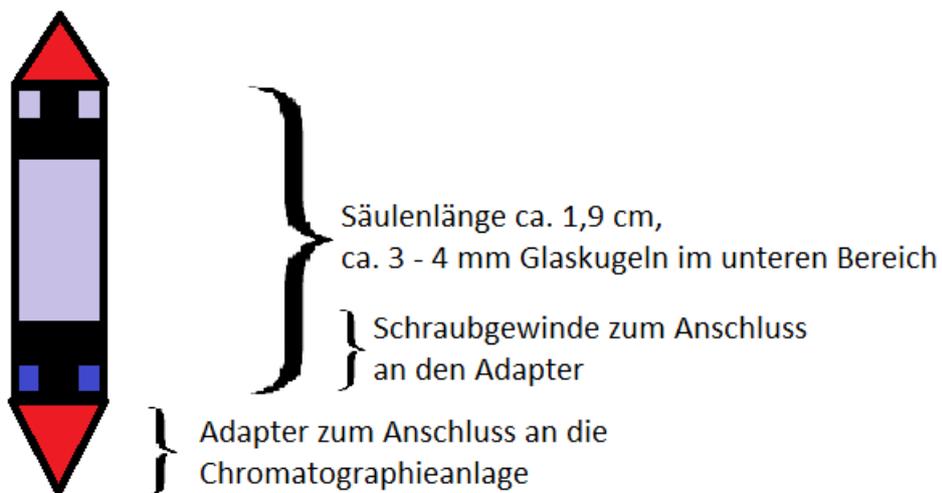
### 4.2.3 Herstellung der Säule

Die Säule für die Displacement-Chromatographie wurde selbst hergestellt. Dazu wurde ein Plastikschlauch verwendet. Bei diesem wurde mithilfe eines Lötkolbens eine Abkantung für die Dichtung der Verschraubung gebildet. Zur besseren Befüllung wurde das Säulenmaterial zunächst 1:5 mit Wasser verdünnt. Mittels einer Spritze, welche am unteren Ende befestigt wurde, konnte das flüssige Säulenmaterial in den vorbereiteten Schlauch gezogen werden. Die vorherige Verdünnung des Materials konnte durch Heraussaugen des Wassers in die Spritze somit ebenfalls rückgängig gemacht werden. Folgende Abbildung 5 verdeutlicht die Herstellung der selbstgepackten Säule.



**Abbildung 5: Herstellung der selbstgepackten Säule**

Damit das Säulenmaterial zurückgehalten wird und somit in dem Säulenschlauch bleibt wurden kleine Glaskugeln in einer Höhe von ca. 3 – 4 mm in dem unteren Bereich der Säule gepackt. Die schwarzen Schraubgewinde, welche durch eine Gummidichtung an der Säule befestigt waren, wurden mit den hier roten Adaptern verbunden. Mithilfe dieser roten Adapter konnte die Säule an die Chromatographieanlage geschraubt werden. Zwischen dem Schraubgewinde und den Adaptern war kein weiteres Bauteil wie beispielsweise ein Filter eingebaut. Zur Verdeutlichung des inneren Aufbaus dient die folgende Abbildung 6.



**Abbildung 6: Schema des Säulenaufbaus**

Die hellblaue Farbe soll für das Säulenmaterial Fractogel® EMD TMAE Hicap (M) stehen, die dunkelblaue Farbe stellt die Glaskugeln dar.

#### 4.2.4 Molke über selbstgebaute Säule

Die Durchbruchfraktionen aus der vorangehenden Frontalchromatographie mit der SP XL Säule wurden miteinander gepoolt. So konnte die Probe erhalten werden, die über den selbstgebauten Anionenaustauscher geleitet werden sollte. Damit eine ähnliche Proteinkonzentration wie in den Vorversuchen verwendet werden konnte, musste zunächst die Konzentration des Pools bestimmt werden. Dazu wurden die UV Absorptionen gemessen und mittels einer erstellten Standardgeraden die Konzentration bestimmt. Daraus folgend wurde eine 1:15 bzw. 1:20 Verdünnung des Probenpools erstellt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils zwischen 30 und 34 ml über den Super Loop über die Säule gegeben. Durch das kleine Volumen von ca. 0,12 ml mussten die Parameter Flussrate und Druck angepasst werden. Es wurde sich dabei an fertigen Säulen und deren Volumina gerichtet. So wurde eine Flussrate von 0,1 ml/min und ein maximaler Druck von 0,3 MPa festgelegt. Da die pI-Werte der relevanten Proteine unter 6 liegen und bei einem pH-Wert zwischen 6,8 und 6,9 gearbeitet wurde, lagen die zu untersuchenden Proteine somit negativ vor und konnten an den Anionenaustauscher binden.

#### 4.2.5 Analyse über SEC

Für die Größenausschlusschromatographien wurde die Superdex 75 HR 10/30 verwendet. Die aufgetragenen Probenvolumina variierten und werden daher nur in den speziellen Ergebnissen aufgeführt. Die SEC wurde mit einem 20 mM Phosphatpuffer durchgeführt, welcher mit 150 mM NaCl versetzt war. Während der Durchläufe war eine Flussrate von 0,5 ml/min und ein Maximaldruck von 1,3 MPa eingestellt.

#### 4.2.6 Analyse über SDS-PAGE

Als zweite Analysemethode diente die SDS-PAGE. Dabei wurde jeweils 10 µl der Probe mit 10 µl des Probenpuffers vermischt. Nach dem Erhitzen dieses Gemisch wurden davon 10 µl in die vorbereiteten Probentaschen des Gels pipettiert. Als Marker wurden 10/5 µl des Roti<sup>®</sup>-Mark Standards in eine Tasche gegeben. Dieser Standard besteht aus folgenden Proteinen: Lysozym (14 kDa), Trypsin Inhibitor (20 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Serumalbumin (66 kDa), β-Galactosidase (118 kDa) und Myosin (212Da). Einige Proben hatten eine sehr geringe Proteinkonzentration, welches an den Frontalchromatographien zu erkennen war. Diese Proben wurden durch eine Acetonfällung aufkonzentriert. Dazu wurde das vierfache Volumen an Aceton zur Probe gegeben. Das Gemisch wurde für mehrere Stunden oder über Nacht bei -20°C gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 g. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in möglich wenig Puffer resuspendiert. [25] Die

Gele wurden entweder über Nacht mit Coomassie-Färbung oder per Silberfärbung gefärbt. Die Silberfärbung ist sensitiver, da sie bereits 0,1-1,0 ng eines Polypeptids sichtbar machen kann. Die Coomassie Färbung hat dahingegen eine Nachweisgrenze zwischen 0,3 und 2 µg. [26][27]

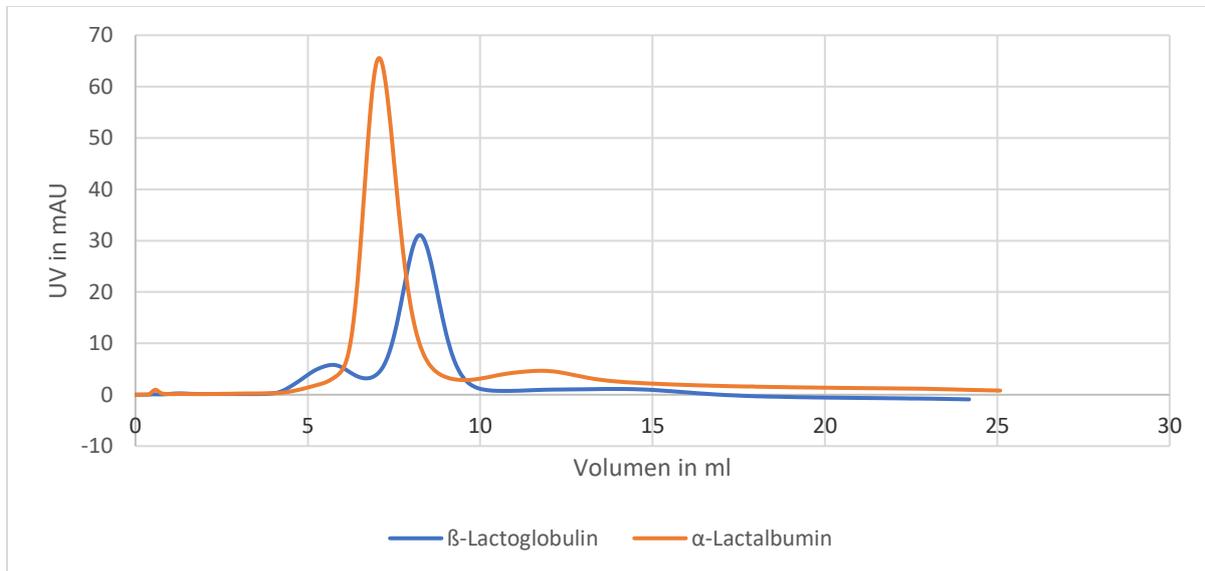
## 5. Ergebnisse/Diskussion

Zunächst soll über den Erfolg der Herstellung der Minisäule diskutiert werden. Am Anfang gab es Probleme, das Säulenmaterial in dem Schlauch zu behalten und die Säulenverschraubungen dicht zu bekommen. Als erste Möglichkeit wurde ein kleiner Rundfilter vor das untere Ende der Säule gepackt. Dieser zeigte jedoch nicht das gewünschte Ergebnis, denn es lief immer noch viel Equilibrierungspuffer an den Verbindungen heraus. Danach wurden die Glaskugeln als Dichtungsmaterial ausprobiert. Mit diesen konnten die Dichtungsprobleme auf ein Minimum reduziert werden. Im weiteren Umgang der Säule war dabei nur wichtig, dass die Durchströmungsrichtung nicht verändert wird. Ansonsten hätten die Glaskugeln als Dichtung ihre Wirkung verloren. Neben dieser ersten Problematik bestand ebenfalls eine Schwierigkeit in der dichten Packung des Säulenmaterials. Nach einigen Probedurchläufen musste festgestellt werden, dass das Säulenmaterial sich etwas abgesetzt hat. Dieses Problem wurde mit immer wieder erneutem Auffüllen des Säulenmaterials gelöst. Zwischen dem Auffüllen wurde ständig Puffer mit der Flussrate von 0,1 ml/min über die Säule gepumpt. Diese Vorgehensweise wurde solange wiederholt, bis kein Absetzen des Säulenmaterials mehr zu erkennen war. Im Hinblick auf die folgenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Minisäule erfolgreich hergestellt und auch genutzt werden konnte. Nach längerer Zeit, in der die Minisäule nicht genutzt wurde, zeigten sich jedoch immer etwas andere unerwartete Messergebnisse. Durch ein längeres Equilibrieren der Säule, meist mehrere Stunden oder über Nacht, wurde dieses Problem aber gelöst. Außerdem musste während der ersten Durchläufe der Hauptversuche erneut Säulenmaterial in die Säule gegeben werden, da es sich wieder abgesetzt hatte. Diese Veränderung der Säule konnte somit auch Einfluss auf die Messergebnisse nehmen. Aufgrund dessen ist die Nutzung der selbstgebastelten Minisäule über einen viel längeren Zeitraum nicht empfehlenswert.

Für die folgenden Auswertungen sind die Ladungen der Proteine bei dem verwendeten pH-Wert von entscheidender Bedeutung. Daher wurden diese mittels des Putnam Protein Calculator und der RCSB Protein Data Bank ermittelt. Dazu wurde mit der Datenbank die Sequenz des Proteins gefunden und mit dem Calculator konnte die Ladung bei dem bestimmten pH-Wert angezeigt werden. [28][29][30]

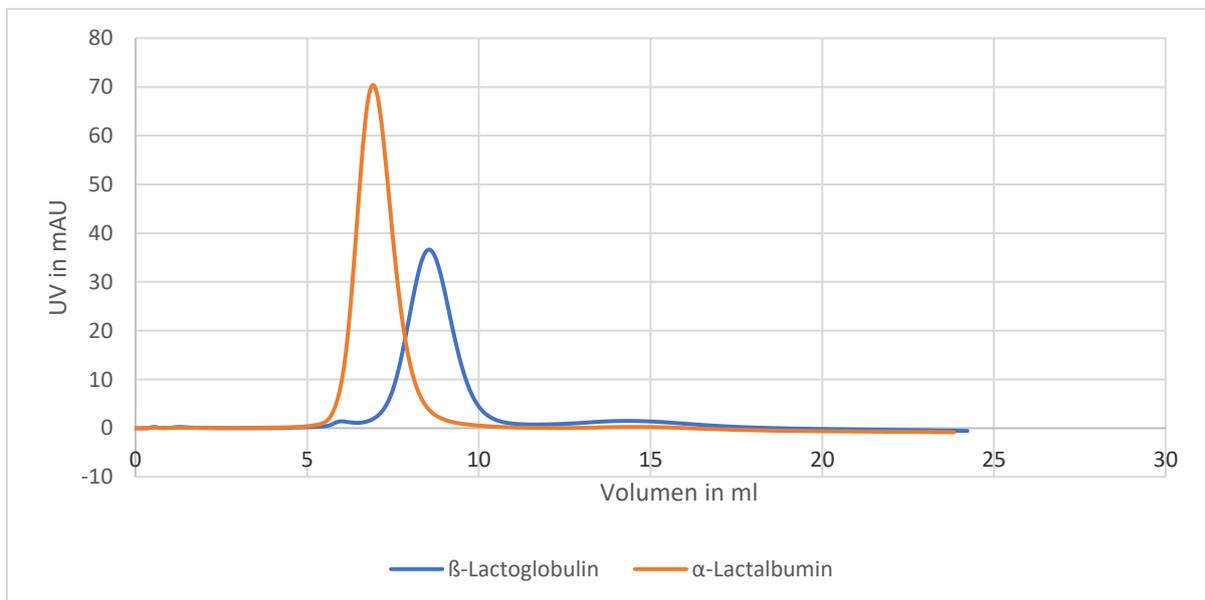
Daraus ergaben sich bei einem pH-Wert zwischen 6,8 und 6,9 für das  $\beta$ -Lactoglobulin eine Nettoladung zwischen -8,5 und -8,6. Die Ladung des  $\alpha$ -Lactalbumin liegt in dem Bereich zwischen -6,5 und -6,6. Diese negativen Nettoladungen zeigen, dass bei diesen Parametern ein Anionenaustauscher geeignet ist.

Zu Beginn wurde eine fertige Anionenaustauschersäule, die DEAE FF HiTrap, verwendet, um das Verhalten von den beiden zu betrachtenden Proteinen in verschiedenen Puffersystemen beobachten zu können.



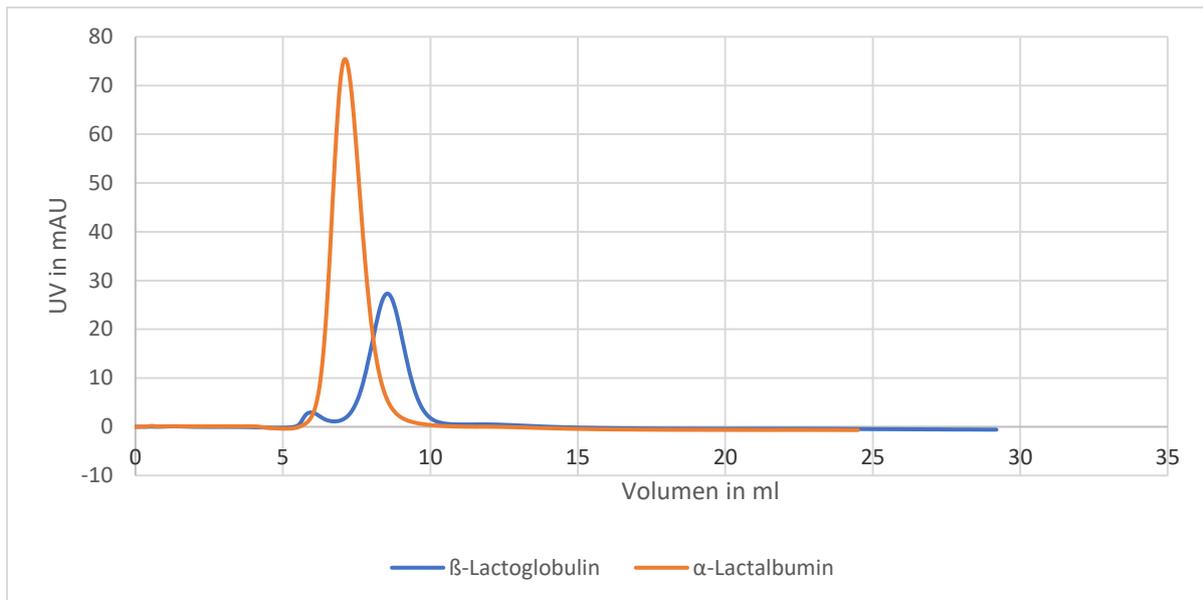
**Abbildung 7: Chromatogramm von DEAE FF HiTrap Säule mit Imidazolpuffer**

Es wurden jeweils 300  $\mu$ l der Proteinlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml Protein auf die DEAE FF HiTrap (Volumen: 1 ml) aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Als Puffersystem wurde ein 20 mM Imidazolpuffer genutzt. Mit einem linearen Gradienten (Steigung 20), welcher 1 M NaCl enthielt, wurden die gebundenen Proteine eluiert.



**Abbildung 8: Chromatogramm von DEAE FF HiTrap Säule mit Phosphatpuffer**

Es wurden jeweils 300  $\mu$ l der Proteinlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml Protein auf die DEAE FF HiTrap (Volumen: 1 ml) aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Als Puffersystem wurde ein 20 mM Phosphatpuffer genutzt. Mit einem linearen Gradienten (Steigung 20), welcher 1 M NaCl enthielt, wurden die gebundenen Proteine eluiert.



**Abbildung 9: Chromatogramm von DEAE FF HiTrap Säule mit MOPS-Puffer**

Es wurden jeweils 300  $\mu$ l der Proteinlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml Protein auf die DEAE FF HiTrap (Volumen: 1 ml) aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Als Puffersystem wurde ein 20 mM MOPS-Puffer genutzt. Mit einem linearen Gradienten (Steigung 20), welcher 1 M NaCl enthielt, wurden die gebundenen Proteine eluiert.

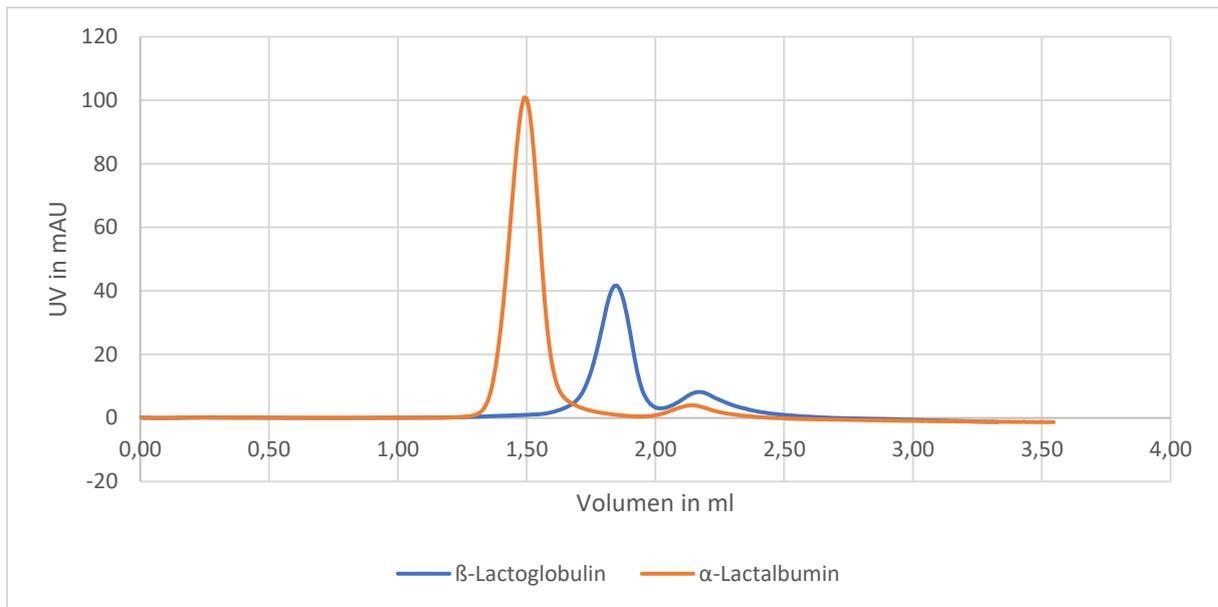
Anhand der letzten drei Abbildungen 7 - 9 ist zu erkennen, dass das  $\alpha$ -Lactalbumin bei allen verwendeten Puffern ein geringeres Retentionsvolumen als das  $\beta$ -Lactoglobulin hat. Außerdem ist zu sehen, dass  $\alpha$ -Lactalbumin eine deutlich höhere UV-Absorption bei der verwendeten DEAE Säule aufweist. In der nachfolgenden Tabelle sind alle Retentionsvolumina anhand der gemessenen Daten zusammengefasst.

**Tabelle 4: Retentionsvolumina von  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin in verschiedenen Puffern**

	Retentionsvolumen in ml - Imidazol	Retentionsvolumen in ml - Phosphat	Retentionsvolumen in ml - MOPS
$\beta$ -Lactoglobulin	8,26	8,55	8,55
$\alpha$ -Lactalbumin	7,06	6,93	7,11

Bei  $\beta$ -Lactoglobulin ist beim Phosphatpuffer und beim MOPS Puffer ein höheres Retentionsvolumen zu erkennen. Der MOPS Puffer weist beim  $\alpha$ -Lactalbumin ebenfalls das höchste Retentionsvolumen auf, wohingegen es beim Phosphatpuffer das geringste hat.

Als nächster Schritt wurde die selbstgepackte Säule, wie in dem Methodenteil beschrieben, hergestellt. Diese wurde zu Beginn mit den beiden Proteinen von Interesse im Phosphatpuffer untersucht.

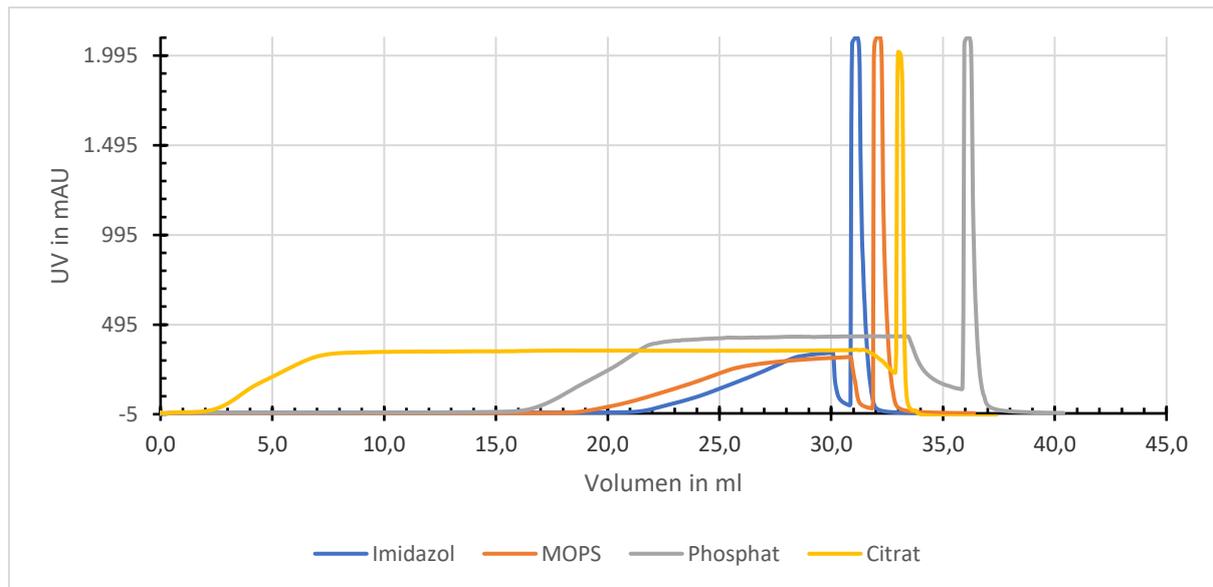


**Abbildung 10: Chromatogramm von selbstgepackter Säule (Säulenmaterial: Fractogel® EMD TMAE Hicap (M)) mit Phosphatpuffer**

200  $\mu$ l der Proteinlösungen (Proteinkonzentration 1 mg/ml) wurden jeweils mit einer Flussrate von 0,1 ml/min über die Säule (Volumen: 0,12 ml) gegeben. Dabei wurde ein 20 mM Phosphatpuffer verwendet und mittels eines linearen Gradienten (Steigung 20, 1 M NaCl enthaltend) die Proteine von der Säule eluiert.

In der oberen Abbildung 10 zeigt sich ebenfalls, wie bei der DEAE Säule, dass das  $\alpha$ -Lactalbumin ein geringeres Retentionsvolumen mit 1,49 ml besitzt. Das  $\beta$ -Lactoglobulin zeigt dahingegen ein Retentionsvolumen von 1,85 ml. Eine zweite Gemeinsamkeit zur DEAE Säule ist darin zu erkennen, dass das  $\alpha$ -Lactalbumin eine höhere UV-Absorption zeigt. Die Auftrennung der beiden Peaks zeigt sich bei der selbstgepackten Säule deutlicher, als bei der DEAE Säule. Dieser Unterschied kann an der unterschiedlichen Oberflächenchemie der Säulenmaterialien liegen. Denn die DEAE Säule besteht aus einer 6 % Agarose Matrix [21], wohingegen das Fractogel eine Basismatrix mit Methacrylat besitzt [32]. Ein weiterer Grund könnten verschieden große Partikelgrößen sein. Das Fractogel hat eine Partikelgrößenverteilung zwischen 40 und 90  $\mu$ m [32]. Die DEAE Säule besitzt im Vergleich dazu Partikel mit einer Größe von 90  $\mu$ m [33].

Das Ziel der Arbeit ist es, die Anwendbarkeit der Displacement-Chromatographie zu untersuchen. Daher wurde im Folgenden von der bisher angewandten Zonenchromatographie zur Frontalchromatographie gewechselt. Es wurden sowohl  $\beta$ -Lactoglobulin als auch  $\alpha$ -Lactalbumin in verschiedenen Puffern dahingehend untersucht. Zusätzlich wurde ein selbsthergestelltes Proteingemisch dieser beiden Proteine über die selbstgepackte Säule gegeben.

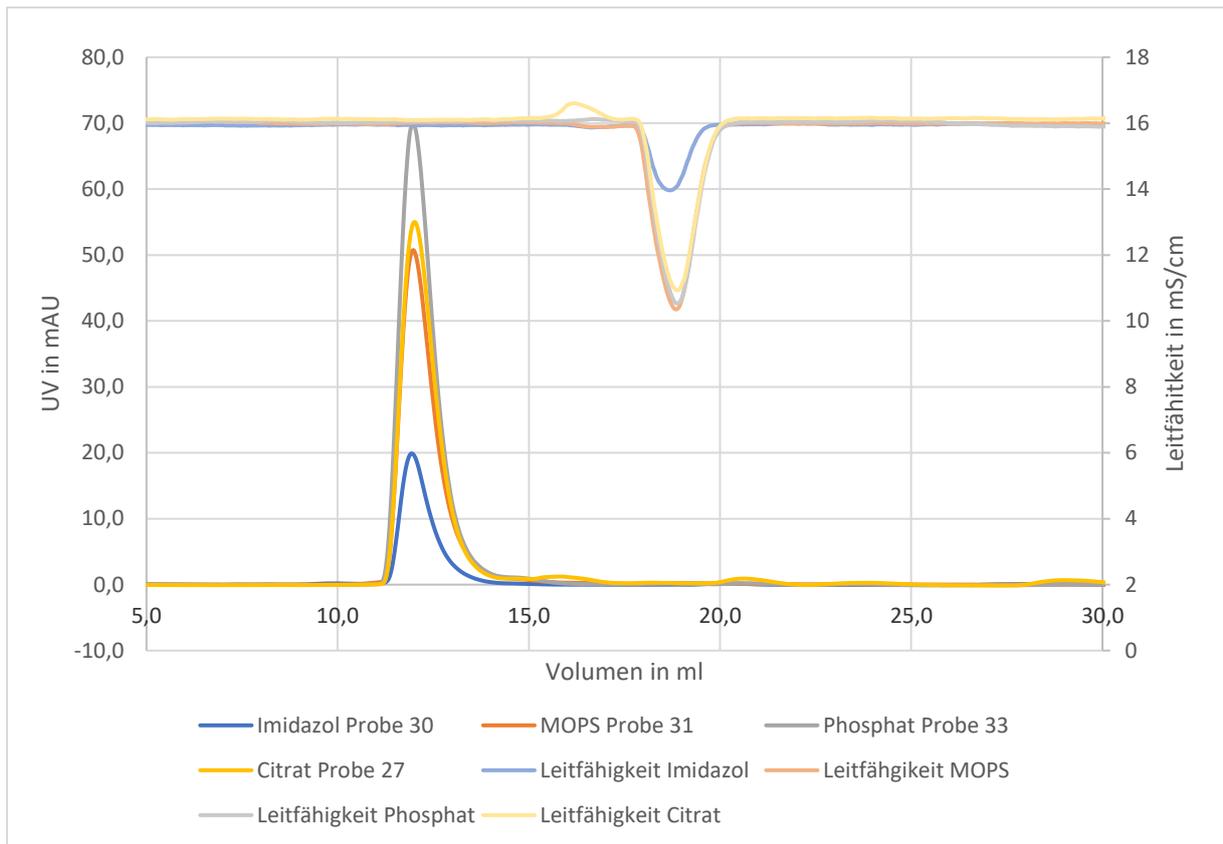


### Abbildung 11: Frontalchromatographien von $\beta$ -Lactoglobulin in verschiedenen Puffern

Hier wurde die selbstgebaute Säule mit dem Fractogel als Material verwendet. Die Proteinlösungen hatten alle eine Konzentration von 1 mg/ml, die Flussrate betrug 1 ml/min. Es wurden verschiedene große Probenvolumina aufgetragen, jeweils an dem Sinken der Durchbruchskurve vor dem Elutionspeak zu erkennen. Die farblich markierten unterschiedlichen Puffer hatten ebenfalls alle eine Konzentration von 20 mM. Die gebundenen Proteine wurden mit einem Stufengradienten, welcher 1 M NaCl enthielt, von der Säule eluiert.

Der grundsätzliche Verlauf der dargestellten Durchbruchskurven ist erwartungsgemäß. Die verschiedenen Höhen des Plateaus sind zunächst unerwartet. Jedoch weist diese Beobachtung auf den unterschiedlichen Zugang zur stationären Phase des Proteins in den jeweiligen Puffern hin. Die Elutionspeaks der Frontalchromatographie haben eine deutlich höhere UV-Absorption als die der Zonenchromatographie. Dieser Umstand zeigt, dass mit dem kontinuierlichen Probenauftrag bei der Frontalchromatographie deutlich mehr Protein an die Säule gebunden werden kann, als bei der Zonenchromatographie. Außerdem sind die Elutionspeaks der Frontalchromatographie etwas schmaler, was wiederum durch den Einsatz des Stufengradienten zu begründen ist. Beim Vergleich der verschiedenen Puffer zeigt sich, dass der Durchbruch im Citratpuffer deutlich früher begonnen hat. Danach startet der Durchbruch beim Phosphatpuffer. Im MOPS Puffer ist der Durchbruch etwas früher, als beim Imidazol zu erkennen. Diese Verläufe lassen sich ebenfalls damit erklären, dass das Protein bei den verschiedenen Puffern unterschiedlich gut an die stationäre Phase binden kann.

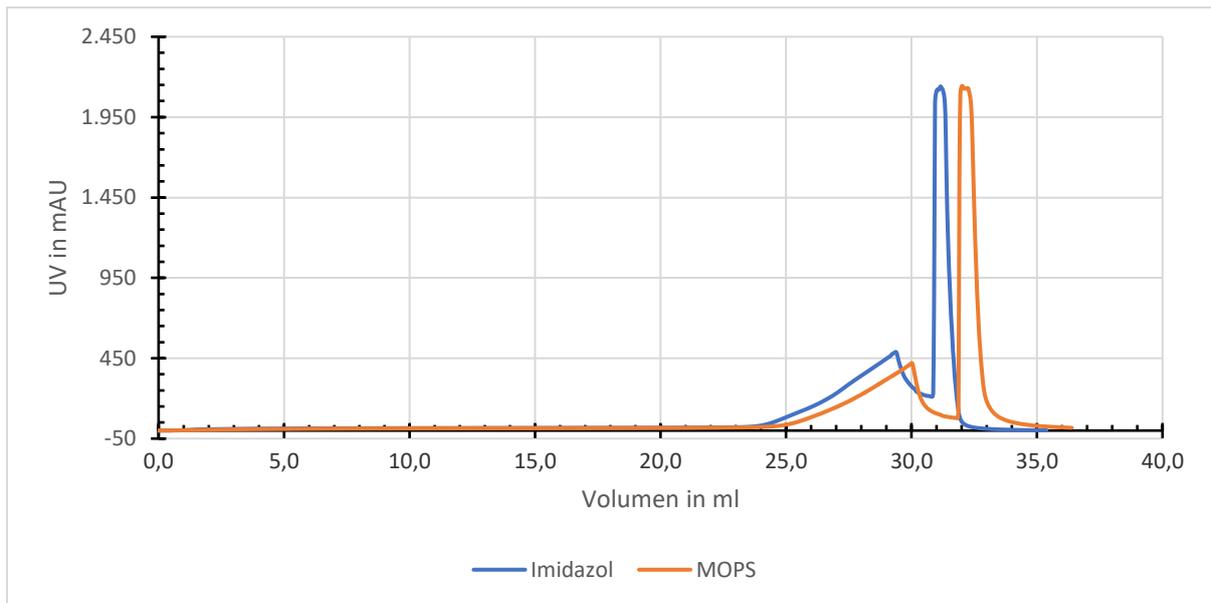
Für die Analysen der Frontalchromatographien wurde die Größenausschluss säule Superdex 75 HR 10/30 verwendet. Für einen besseren Bezug werden im Folgenden die SEC Ergebnisse nach den Frontalchromatographien erfolgen.



**Abbildung 12: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom  $\beta$ -Lactoglobulin**

Es wurden verschiedene Proben von der Frontalchromatographie über die Fractogel Säule bei den Puffern genommen, wie an der Legende sichtbar ist. Bei Imidazol und MOPS wurden 250  $\mu$ l Probe injiziert. Beim Phosphat- und Citratpuffer jeweils 500  $\mu$ l. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug jeweils 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

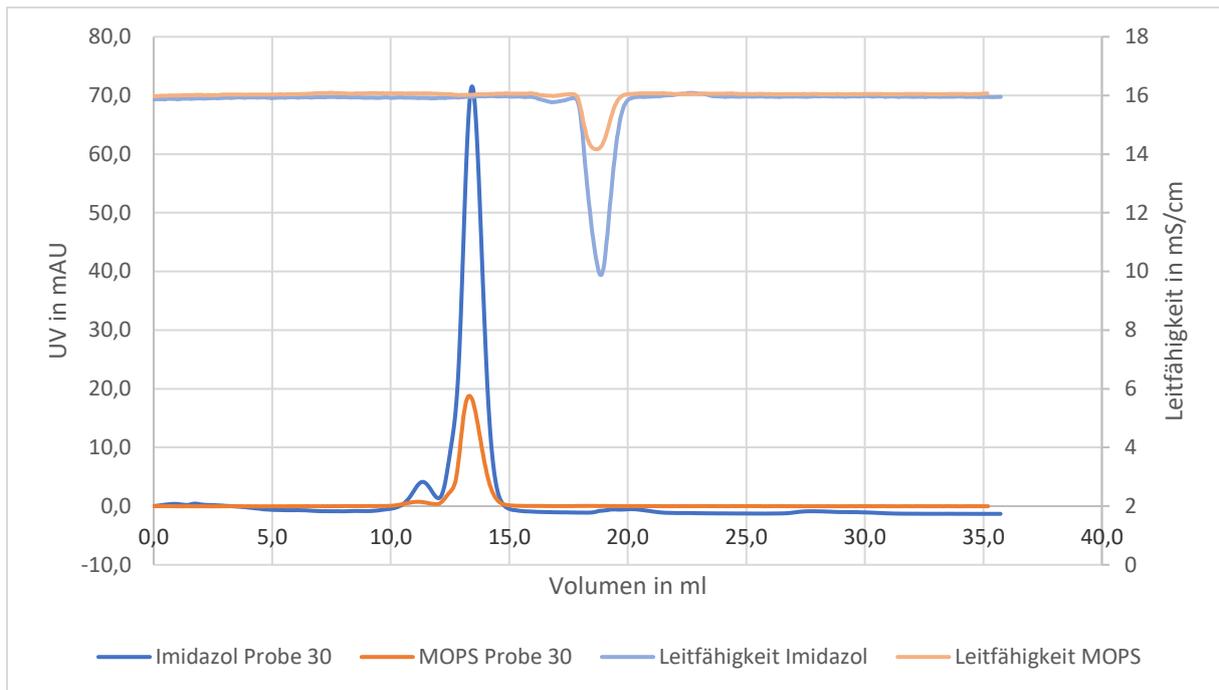
Für die Erstellung der oberen Abbildung 12 wurden Proben aus dem hinteren Durchbruchbereich, wo das Plateau erreicht war, der dazugehörigen Frontalchromatographien genutzt. Da unterschiedliche Probenvolumina auf die SEC Säule aufgetragen wurden, können nicht alle Verläufe miteinander verglichen werden. Beim Vergleich vom Imidazol- und MOPS Puffer zeigt sich, dass der MOPS Puffer mehr als die doppelte UV-Absorption aufweist. Außerdem ist zu erkennen, dass der Phosphatpuffer im Gegensatz zum Citratpuffer eine höhere UV-Absorption hat. Die Retentionsvolumina variieren dabei zwischen 11,93 ml bei Imidazol, 11,98 ml bei MOPS und Phosphat und bei 12,03 ml für den Citratpuffer.



**Abbildung 13: Frontalchromatographien von  $\alpha$ -Lactalbumin in verschiedenen Puffern**

Hier wurde die selbstgebaute Säule mit dem Fractogel als Material verwendet. Die Proteinlösungen hatten alle eine Konzentration von 1 mg/ml, die Flussrate betrug 1 ml/min. Es wurden verschieden große Probenvolumina aufgetragen, beim Imidazolpuffer ca. 29 ml und beim MOPS-Puffer ca. 30 ml. Die farblich markierten unterschiedlichen Puffer hatten ebenfalls alle eine Konzentration von 20 mM. Die gebundenen Proteine wurden mit einem Stufengradienten, welche 1 M NaCl enthielt, von der Säule eluiert.

Der Durchbruch von  $\alpha$ -Lactalbumin ist im Imidazolpuffer etwas früher, als beim MOPS Puffer. In beiden Puffern zeigt sich jedoch kein Plateau, somit keine Sättigung. Dieses wurde aber absichtlich so gestaltet, da die Probenaufgabe beendet war, bevor sich ein Plateau bilden konnte. Die UV-Absorption ist bei beiden Puffern im Elutionsbereich ähnlich, im Durchbruch ist die UV-Absorption beim MOPS Puffer etwas niedriger. Jedoch kann keine Aussage über den weiteren Verlauf getroffen werden, da die Probenaufgabe schon beendet war.



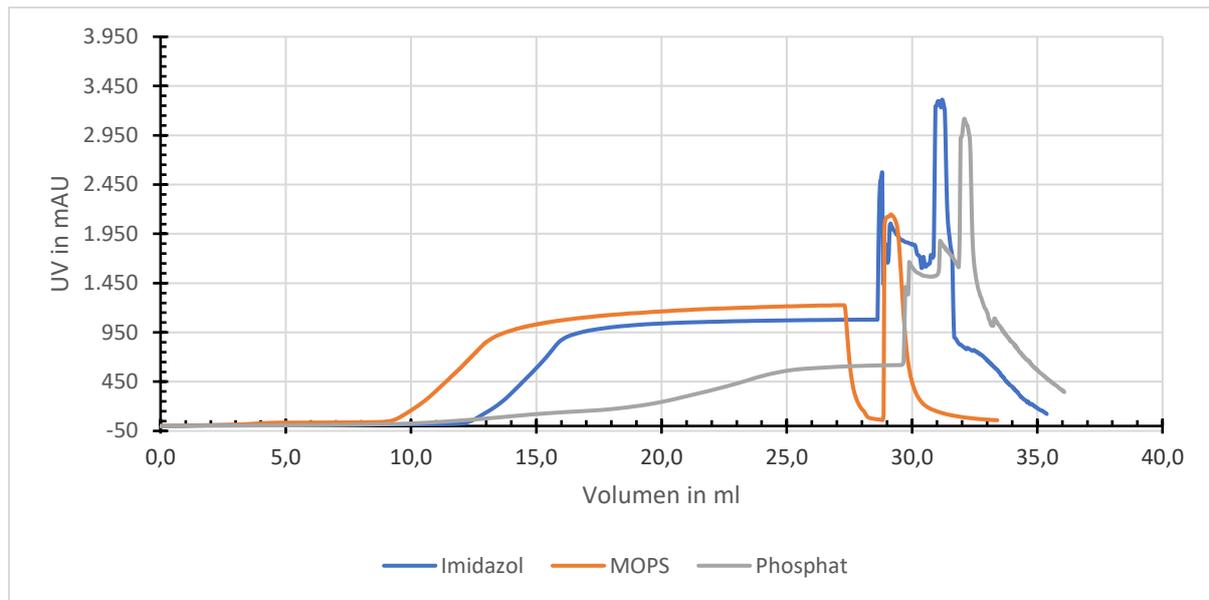
**Abbildung 14: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom  $\alpha$ -Lactalbumin**

Es wurde jeweils die Probe 30 von der Frontalchromatographie über die Fractogel Säule bei den Puffern genommen, wie an der Legende sichtbar ist. Beim Imidazolpuffer wurde 500  $\mu$ l Probe, bei MOPS wurden 250  $\mu$ l Probe gegeben. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug jeweils 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Bei diesen SEC Ergebnissen zeigt sich ein ähnliches Retentionsvolumen von  $\alpha$ -Lactalbumin. Für den Imidazolpuffer ist es 13,43 ml, beim MOPS Puffer dahingegen 13,32 ml. Außerdem zeigt sich ein Unterschied in der UV-Absorption, beim MOPS Puffer ist diese sehr viel kleiner, als beim Imidazolpuffer. Diese große Abweichung lässt sich zum Teil durch das unterschiedliche Probenvolumen bei der SEC, welches bei Imidazol 500  $\mu$ l und bei MOPS 250  $\mu$ l betrug, erklären. Außerdem kann bei beiden Puffern ein Vorpeak erkannt werden. Es kann jeweils das Verhältnis zwischen diesem Vorpeak und dem Hauptpeak betrachtet werden. Dabei fällt auf, dass die Verhältnisse bei den unterschiedlichen Puffern mit 5,76 % (Imidazol) und 3,94 % (MOPS) ähnlich ausfallen. Daher handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die gleiche Störsubstanz. Aufgrund des ähnlichen Retentionsvolumens könnte es sich dabei um  $\beta$ -Lactoglobulin handeln.

Bei den SEC Durchgängen, sowohl beim  $\beta$ -Lactoglobulin als auch beim  $\alpha$ -Lactalbumin, sind die Ergebnisse erwartungsgemäß aufgetreten. Da das  $\beta$ -Lactoglobulin mit 18,4 kDa etwas größer ist, als das  $\alpha$ -Lactalbumin mit 14,2 kDa eluiert es etwas früher von der SEC Säule.

Zuletzt wurde aus den reinen Proteinen ein Proteingemisch selbst zusammengemischt und das auf die gleiche Art und Weise wie die einzelnen Proteine untersucht.

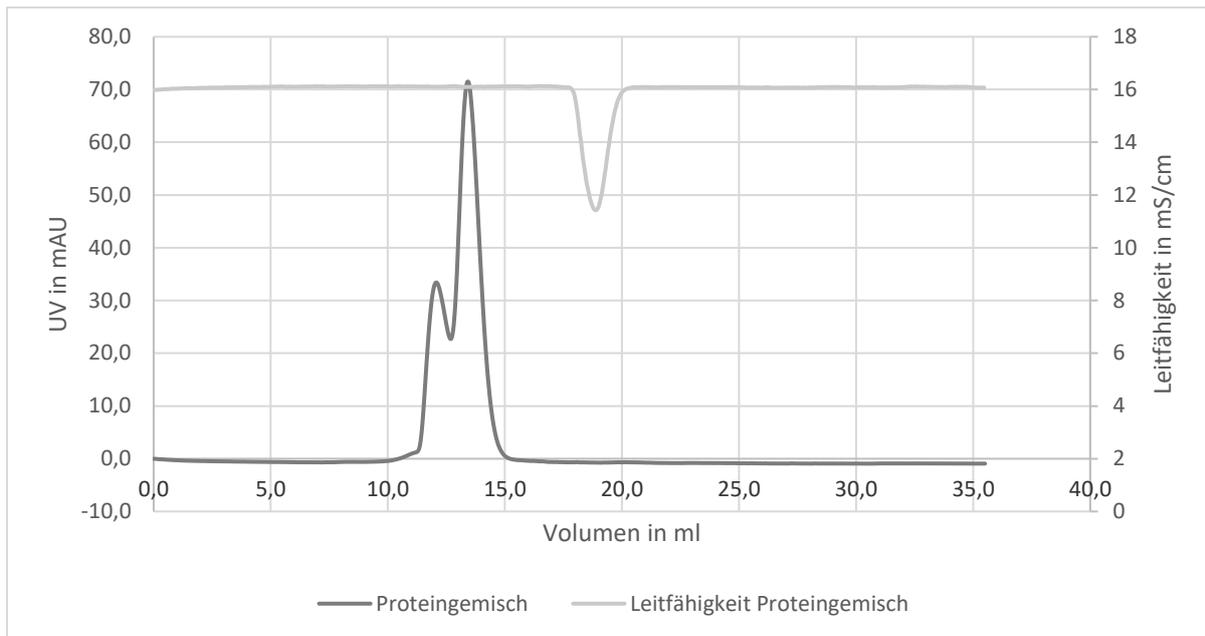


**Abbildung 15: Frontalchromatographien vom Proteingemisch in verschiedenen Puffern**

Hier wurde die selbstgebaute Säule mit dem Fractogel als Material verwendet. Die Lösungen der Proteingemische im Imidazol und im MOPS Puffer hatten eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml. Im Phosphatpuffer lag dahingegen weiterhin eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml vor. Es wurde ebenfalls mit einer Flussrate von 1 ml/min gearbeitet. Es wurden verschieden große Probenvolumina aufgetragen, beim Imidazolpuffer ca. 29 ml, beim MOPS-Puffer ca. 27 ml und beim Phosphatpuffer ca. 30 ml. Die farblich markierten unterschiedlichen Puffer hatten ebenfalls alle eine Konzentration von 20 mM. Die gebundenen Proteine wurden mit einem Stufengradienten, welcher 1 M NaCl enthielt, von der Säule eluiert.

Aufgrund der höheren Proteinkonzentration ist in Abbildung 15 zu sehen, dass der Durchbruch im Imidazol und im MOPS Puffer früher gestartet hat. Außerdem ist bei diesen beiden Puffern auch eine deutlich höhere UV-Absorption in dem Durchbruchsbereich als beim Phosphatpuffer festzustellen, was sich ebenfalls durch die höhere Proteinkonzentration erklären lässt. Beim Imidazol und Phosphatpuffer sind Schwankungen der UV-Absorption nach dem Probenauftrag zu erkennen. Diese Schwankungen beeinflussen jedoch nicht die folgende Auswertung und können daher vernachlässigt werden.

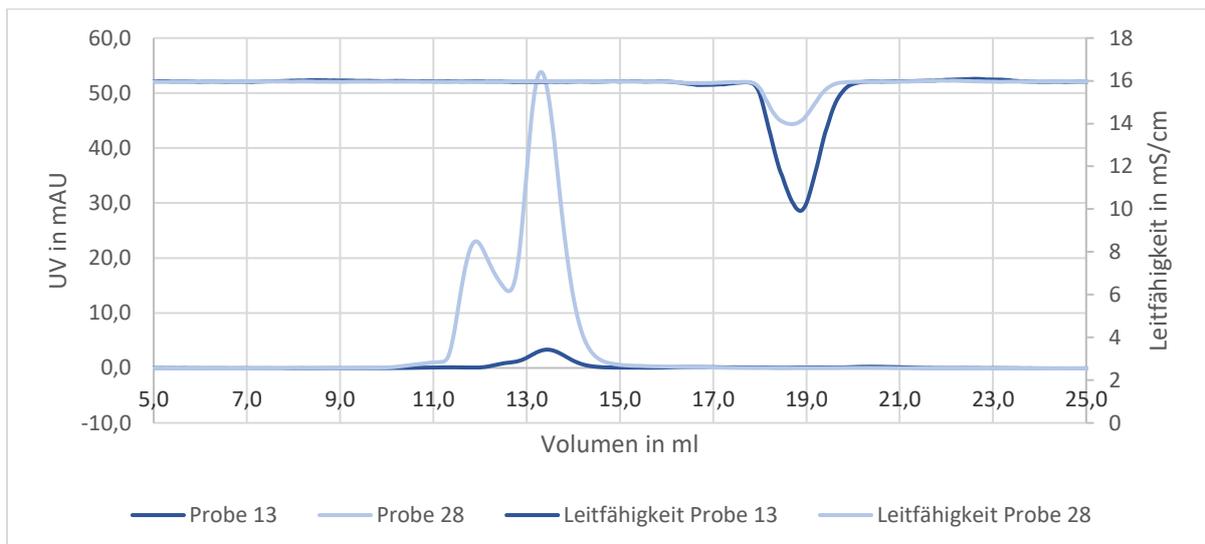
Bevor die Auswertungen der Frontalchromatographien erfolgten, wurde ein Proteingemisch mit der Konzentration von 1 mg/ml über die SEC Säule gegeben. Dieser Schritt sollte einer besseren Interpretation der späteren Ergebnisse dienen.



**Abbildung 16: SEC Ergebnis vom Proteingemisch in Phosphatpuffer**

Es wurden 500 µl eines 1 mg/ml konzentrierten Proteingemisches über die SEC Säule gepumpt. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug jeweils 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

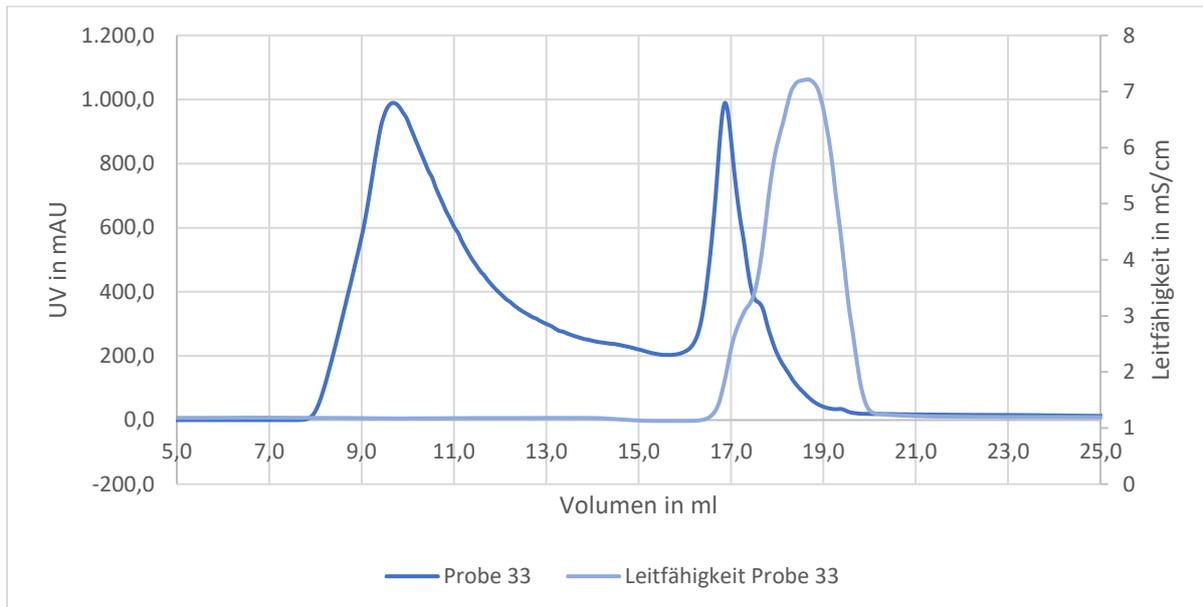
In der oberen Abbildung 16 zeigen sich zwei deutlich unterschiedliche Peaks, die nicht basisliniengetrennt sind. Aufgrund der vorherigen SEC Ergebnisse der einzelnen reinen Proteine lässt sich somit interpretieren, dass es sich beim linken Peak um das  $\beta$ -Lactoglobulin und bei dem rechten Peak um das  $\alpha$ -Lactalbumin handelt. Zudem ist anhand dieses Chromatogramms zu erkennen, dass das  $\alpha$ -Lactalbumin eine doppelt so hohe Absorption wie das  $\beta$ -Lactoglobulin aufweist.



**Abbildung 17: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom Proteingemisch in Imidazolpuffer**

Es wurden die Proben 13 und 28 von der Frontalchromatographie über die Fractogel Säule beim Imidazolpuffer untersucht. Für die Probe 13 wurden 500 µl Probe injiziert, bei der Probe 28 hingegen 250 µl. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug jeweils 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

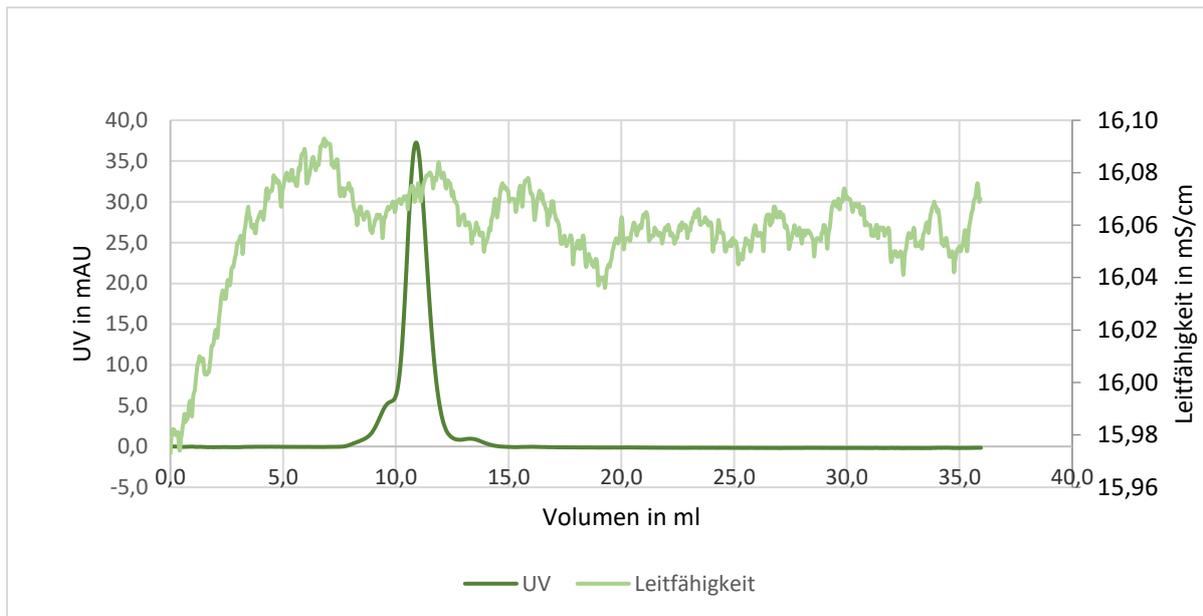
In der Probe 13 aus der Abbildung 17 zeigt sich nur ein sehr kleiner Peak mit geringer UV-Absorption. Jedoch ist auch dort eine Schulter auf der linken Seite zu erkennen. Der Verlauf von der Probe 28 zeigt eine Ähnlichkeit zur vorherigen Durchführung der SEC, die in Abbildung 16 dokumentiert worden ist. Daher zeigt sich, dass beide Proteine im Gemisch während der Frontalchromatographie an die Säule binden konnten.



**Abbildung 18: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom Proteingemisch im Imidazolpuffer**

Es wurde die Probe 33 von der Frontalchromatographie über die Fractogel Säule beim Imidazolpuffer untersucht. Für die Probe 33 wurden 250  $\mu$ l injiziert. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug jeweils 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Die Probe 33 wurde in einem gesonderten Diagramm dargestellt, da die UV-Absorptionen der untersuchten Proben sehr unterschiedlich sind. In diesem SEC Chromatogramm zeigen sich nicht die erwarteten Peaks. Es sind scheinbar noch größere Proteine in dieser Probe enthalten gewesen. Daher wurde ein SEC Durchlauf von dem nächst größeren Molkeprotein BSA gestartet.

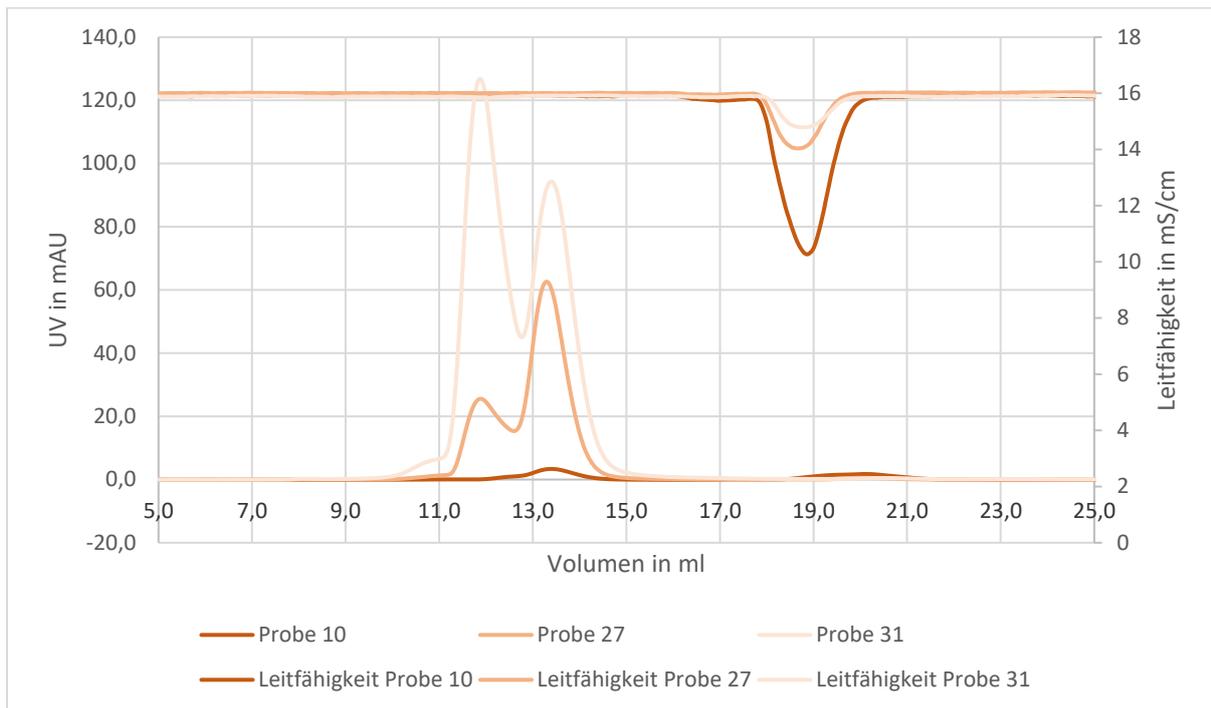


### Abbildung 19: SEC von BSA

Es wurden 500  $\mu$ l einer 1 mg/ml BSA Lösung auf die Säule gegeben. Das BSA war in 20 mM Phosphatpuffer gelöst. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Das Retentionsvolumen von BSA liegt laut der Abbildung 19 bei 10,90 ml. Somit kann gesagt werden, dass der Vorpeak aus Abbildung 18 zu einem Protein in einer ähnlichen Größenordnung wie das BSA gehören müsste. Da bei diesen Versuchen mit reinen Proteinen gearbeitet wurde, kann jedoch nicht mit einer Verunreinigung von BSA in der Probe 33 ausgegangen werden. Außerdem ist in der Abbildung 18 bei der Probe 33 ebenfalls zu sehen, dass die beiden Peaks nicht basisliniengetrennt sind. Daher kann vermutet werden, dass sich in der Breite des Peaks noch andere Peaks von  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin befinden. Für den hinteren Peak aus Probe 33 konnte keine plausible Erklärung gefunden werden, da das  $\alpha$ -Lactalbumin das kleinste Molkeprotein ist. Das Protein, welches zum hinteren Peak aus Abbildung 18 gehört, müsste aufgrund seines höheren Retentionsvolumen kleiner als das  $\alpha$ -Lactalbumin sein. Somit besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den Messergebnissen aus Abbildung 18 um Fehlmessungen handelt.

Es folgen die Auswertungen des MOPS Puffers.

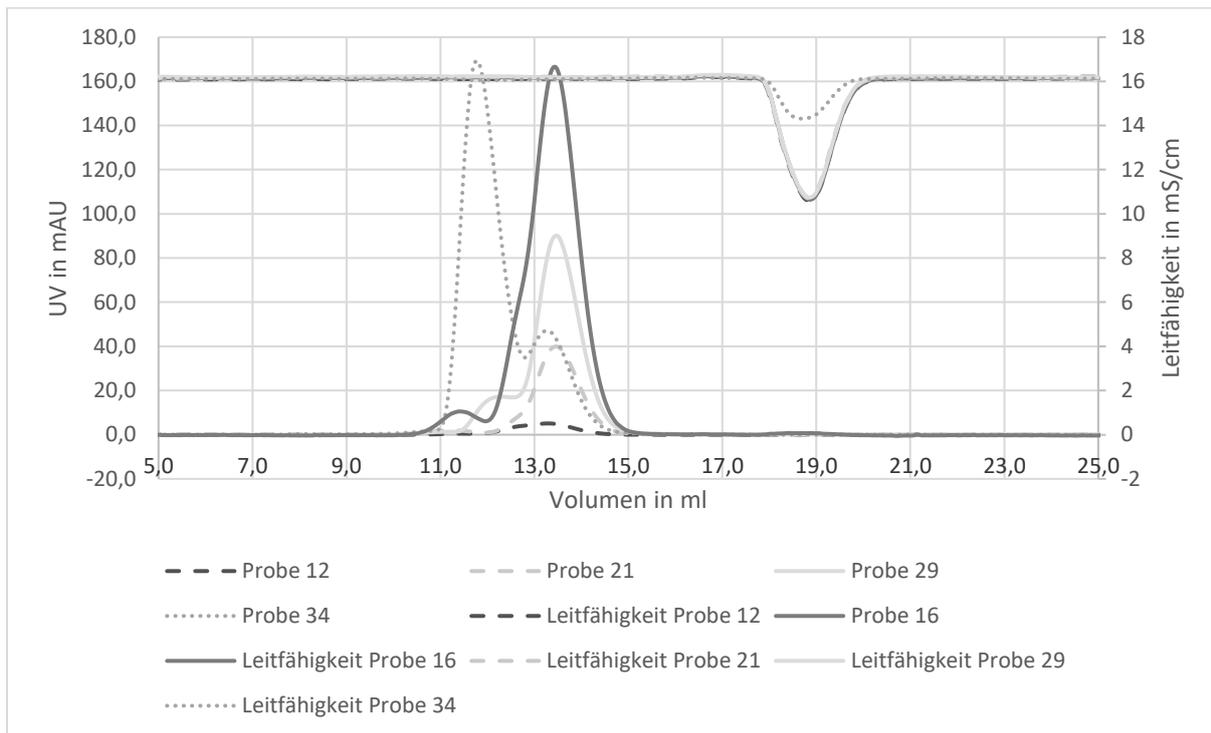


**Abbildung 20: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom Proteingemisch im MOPS Puffer**

Es wurden die Proben 10,27 und 31 von der Frontalchromatographie über die Fractogel Säule beim MOPS-Puffer untersucht. Von Probe 10 wurden 500  $\mu$ l genutzt, bei Probe 27 waren es 250  $\mu$ l und bei Probe 31 220  $\mu$ l. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug jeweils 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Die obere Abbildung 20 zeigt, dass in der Probe 10 ein sehr geringer Anteil an Proteinkonzentration enthalten ist. Bei den Proben 27 und 31 zeigt sich ein entgegengesetzter Verlauf. Die Verläufe zeigen den vorher erkannten typischen Doppelpack von  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin. Der entgegengesetzte Verlauf deutet darauf hin, dass sich das Konzentrationsverhältnis zwischen  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin an der Säule verändert hat. Im Durchbruchbereich ist die Konzentration von  $\alpha$ -Lactalbumin höher als vom  $\beta$ -Lactoglobulin, im Elutionsbereich ist dieses Verhältnis genau umgekehrt. Dadurch zeigt sich ebenfalls, dass das  $\beta$ -Lactoglobulin das  $\alpha$ -Lactalbumin vor sich her verdrängt.

Zum Schluss erfolgte noch die Auswertung des Phosphatpuffers.

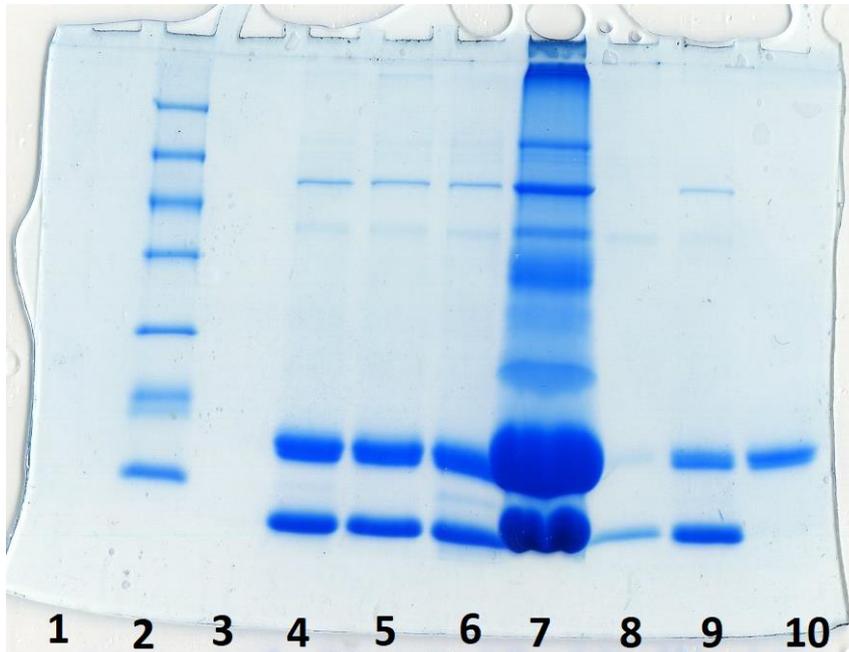


**Abbildung 21: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie vom Proteingemisch im Phosphatpuffer**

Es wurden die Proben 12,16, 21, 29 und 34 von der Frontalchromatographie über die Fractogel Säule beim Phosphatpuffer untersucht. Es wurden jeweils 500  $\mu$ l Probe von den Proben 12,16,21 und 29 über die Säule gegeben. Bei der Probe 34 waren es 250  $\mu$ l. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug jeweils 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

In der Probe 12 aus der Abbildung 21 war ebenfalls nur eine geringe Proteinkonzentration zu finden. Die Proben 16, 21 und 29 aus der oberen Abbildung 21 weisen jeweils eine linke Schulter bzw. einen kleinen Peak auf der linken Seite auf. Im Elutionspeak (Probe 34, Abbildung 21) ist diese Verteilung genau andersherum. Dort hat der rechte Teil des Peaks eine geringere UV-Absorption als der linke Teil. Somit zeigt sich auch in diesem Puffer der zuvor erklärte Sachverhalt wie beim MOPS Puffer, welcher in Abbildung 20 zu sehen ist.

Zur Analyse des Proteingemisches wurde zusätzlich eine SDS-Page von ausgewählten Proben durchgeführt.

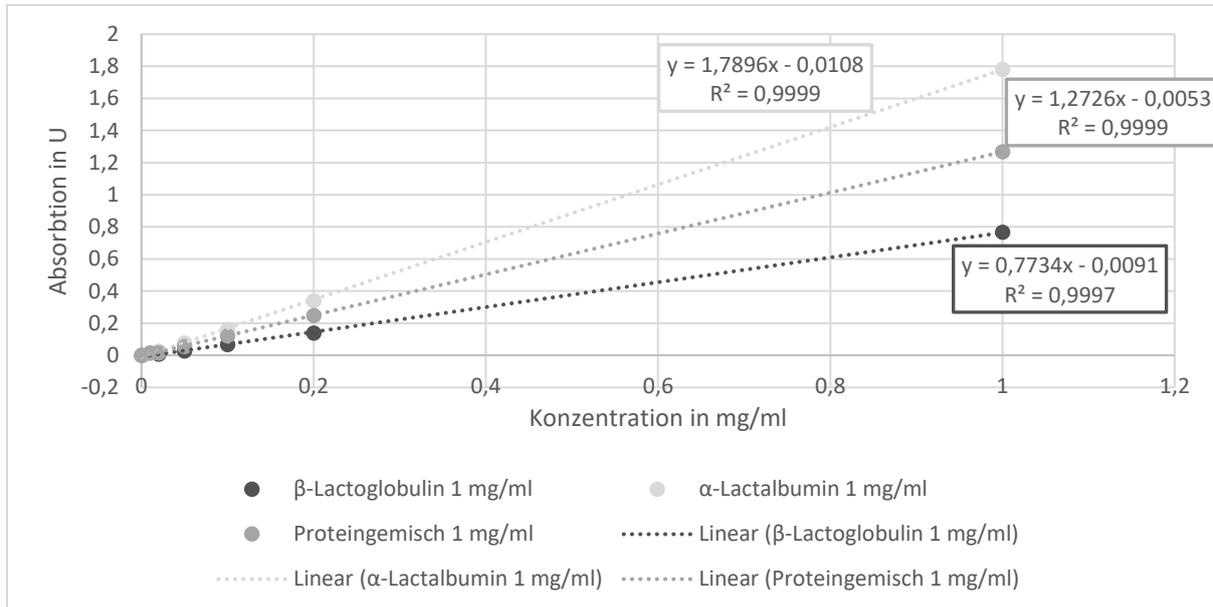


**Abbildung 22: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung**

1: -, 2: Marker, 3: -, 4: Proteingemisch Imidazol Probe 28, 5: Proteingemisch Imidazol Probe 29, 6: Proteingemisch MOPS Probe 27, 7: Proteingemisch MOPS Probe 32, 8: Proteingemisch Phosphat Probe 16, 9: Proteingemisch Phosphat Probe 29, 10:  $\beta$ -Lactoglobulin Imidazol Probe 32

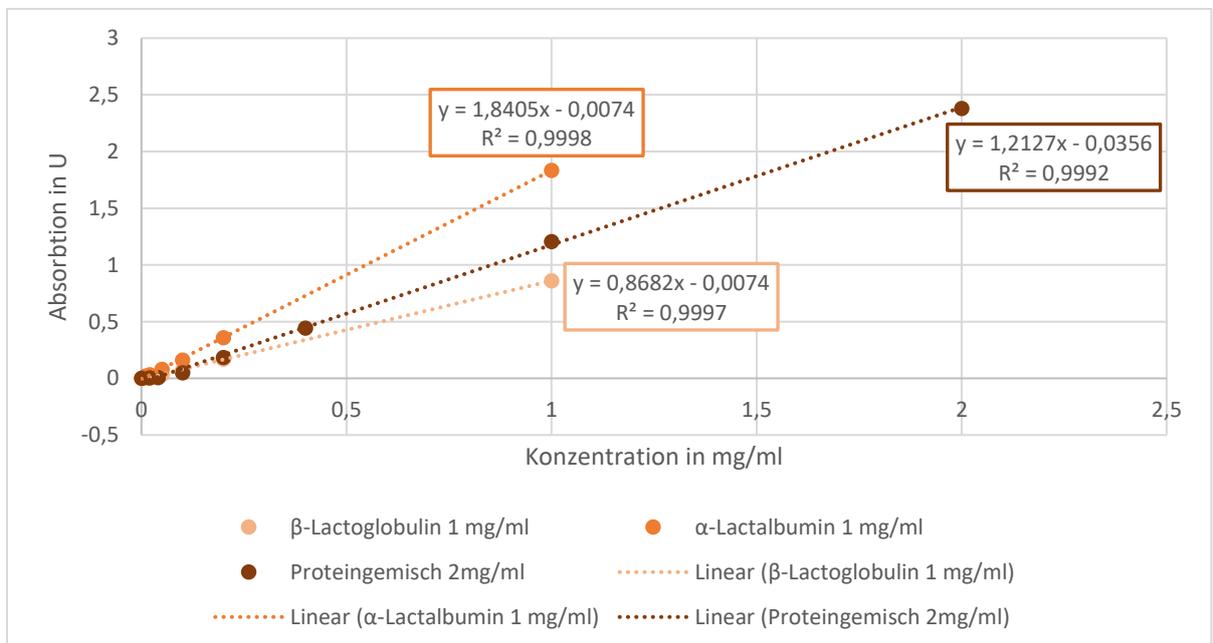
In den Taschen 4,5,6 und 9 zeigen sich auf der Abbildung 22 zwei deutliche Banden, die aufgrund des Markers dem  $\beta$ -Lactoglobulin (obere Bande) und dem  $\alpha$ -Lactalbumin (untere Bande) zugeordnet werden können. Außerdem kann anhand der Probe 32 gezeigt werden, dass es sich bei der oberen Bande um  $\beta$ -Lactoglobulin handelt, da in der Tasche 10 nur reines  $\beta$ -Lactoglobulin aufgetragen wurde. Neben diesen deutlichen Banden ist jeweils eine Bande im oberen Bereich des Gels bei diesen Proben zu sehen. Laut dem Marker müsste es ein Protein sein, welches zwischen 66 kDa (BSA) und 118 kDa ( $\beta$ -Galaktosidase) groß ist. Die Bande 7 zeigt neben schon angesprochenen Banden noch einige weitere. Bei der obersten Bande müsste es sich um ein Protein handeln, das eine Größe zwischen 118 kDa und 212 kDa (Myosin) hat. Jedoch dürften sich diese vielen Banden nicht in dieser Probe wiederfinden, da es sich um ein Proteingemisch aus den reinen Proteinen handelt. Es könnte sich bei einigen Banden um Unreinheiten handeln, die in kleinen Peaks auch in der SEC zu sehen sind. Aber dürften diese nicht so deutlich in der SDS-PAGE zu erkennen sein, daher sollte das Ergebnis aus der Bande 7 kritisch betrachtet werden. Alle kleineren Banden finden ebenfalls keine plausible Erklärung, da zwischen  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin keine weiteren Molkeproteine zu finden sein sollten. In der Bande 8 sind ebenfalls die schon besprochenen Proteinbanden zu sehen.

Um die Durchbruchkurven der bisher durchgeführten Frontalchromatographien erstellen zu können, wurden zunächst Kalibriergeraden der verschiedenen Versuchsbedingungen erstellt.



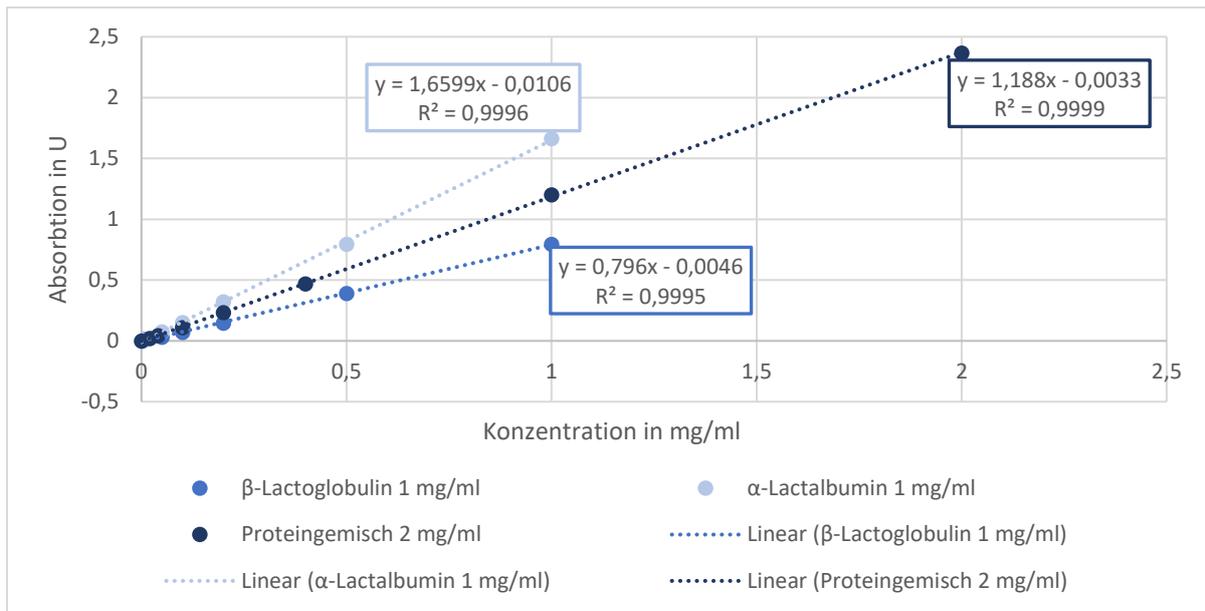
**Abbildung 23: Kalibriergeraden für den Phosphatpuffer**

Es wurden verschiedene Verdünnungen einer 1 mg/ml Stammlösung des jeweiligen Proteins bzw. Proteingemisches für die Erstellung der Kalibriergeraden hergestellt. Als Nullprobe und Verdünnungslösung diente ein 20 mM Phosphatpuffer.



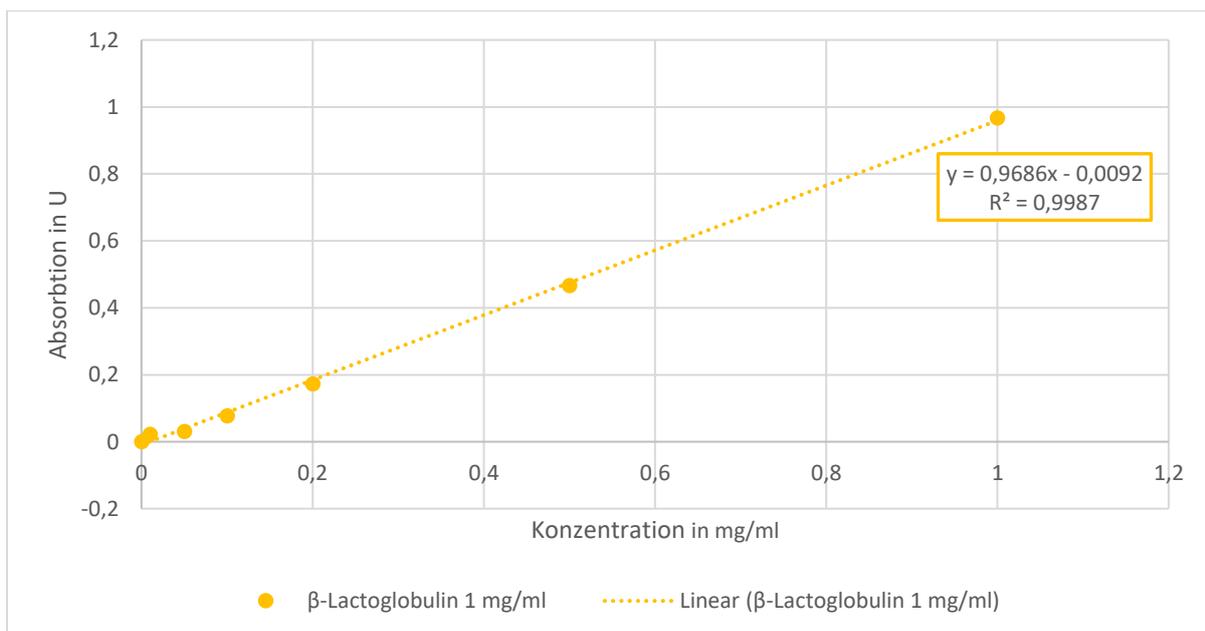
**Abbildung 24: Kalibriergeraden für den MOPS Puffer**

Es wurden verschiedene Verdünnungen einer 1 oder 2 mg/ml Stammlösung des jeweiligen Proteins bzw. Proteingemisches für die Erstellung der Kalibriergeraden hergestellt. Als Nullprobe und Verdünnungslösung diente ein 20 mM MOPS-Puffer.



**Abbildung 25: Kalibriergeraden für den Imidazolpuffer**

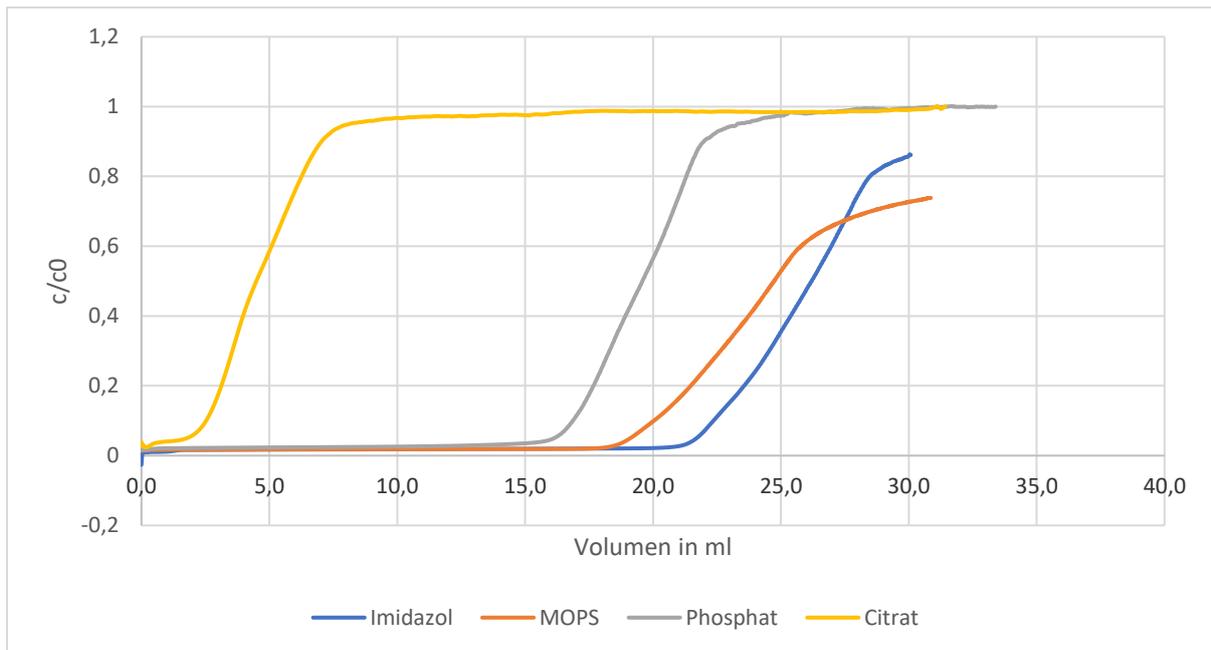
Es wurden verschiedene Verdünnungen einer 1 oder 2 mg/ml Stammlösung des jeweiligen Proteins bzw. Proteingemisches für die Erstellung der Kalibriergeraden hergestellt. Als Nullprobe und Verdünnungslösung diente ein 20 mM Imidazolpuffer.



**Abbildung 26: Kalibriergerade für den Citratpuffer**

Es wurden verschiedene Verdünnungen einer 1 mg/ml Stammlösung von  $\beta$ -Lactoglobulin für die Erstellung der Kalibriergeraden hergestellt. Als Nullprobe und Verdünnungslösung diente ein 20 mM Citratpuffer.

Alle erstellten Kalibriergeraden aus den Abbildungen 23 – 26 haben mindestens eine Richtigkeit von 0,99. Daher konnten sie folgend für die Erstellung der Durchbruchkurven verwendet werden.



### Abbildung 27: Durchbruchskurven von $\beta$ -Lactoglobulin

Den Durchbruchskurven liegen die Frontalchromatographien aus Abbildung 11 zugrunde. Dabei wurde  $\beta$ -Lactoglobulin mit einer Konzentration von 1 mg/ml über die Fractogel Säule gegeben. Die unterschiedlichen Puffer hatten alle eine Konzentration von 20 mM. Bei dem Phosphat- und Citratpuffer wurde das ausgebildete Plateau von der Frontalchromatographie für die Erstellung der Durchbruchskurve genutzt.

Die Frontalchromatographien vom Phosphat- und Citratpuffer bildeten ein Plateau im Durchbruchsbereich. Dieser Umstand konnte genutzt werden, sodass das Plateau für  $\frac{c}{c_0} = 1$  definiert wurde. Sowohl beim MOPS als auch beim Imidazolpuffer konnte kein Plateau erkannt werden. Anhand von Abbildung 29 zeigen sich beim Citrat- und beim Phosphatpuffer steilere Durchbruchskurven, als bei den anderen beiden Puffern. Der Citratpuffer kann durch diesen sehr frühen Durchbruch als ungeeignet angesehen werden. Diese Einschätzung konnte auch schon mithilfe der Frontalchromatographie gemacht werden und wird sich in der folgenden Auswertung noch weiter bestätigen. Die Steilheit der Durchbruchskurven vom MOPS-Puffer und vom Imidazolpuffer hat mit der späteren Elution abgenommen. Dieser Effekt kann mit der Peakverbreiterung während der isokratischen Elution verglichen werden. Der Grund für diesen Effekt kann beispielhaft an einer Behinderung des Massentransportes liegen. [6]

Aus den erstellten Durchbruchskurven ergeben sich folgende dynamische Kapazitäten. Diese wurden zum Vergleich für verschiedene Grenzkonzentrationen abgelesen.

**Tabelle 5: Dynamische Kapazitäten von  $\beta$ -Lactoglobulin in verschiedenen Puffern**

	dynamische Kapazität in mg - Imidazol	dynamische Kapazität in mg - MOPS	dynamische Kapazität in mg - Phosphat	dynamische Kapazität in mg - Citrat
Grenzkonzentration 0,03	21,20	18,58	13,22	0,40
Grenzkonzentration 0,05	21,72	19,14	16,17	1,80

Die Tabelle 5 zeigt, dass die dynamischen Kapazitäten zwischen den verschiedenen Puffern variieren. Dabei zeigt Imidazol die größten Kapazitäten und der Citratpuffer die geringsten. Das Ergebnis von dem Citratpuffer ist damit zu erklären, dass das Citrat die Bindung des  $\beta$ -Lactoglobulin an die Säule verhindert, da es selbst stärker bindet. Diese Beobachtung konnte auch schon von Herrn Erdal im Rahmen eines Studienprojektes gemacht werden. [31] Daher erwies sich der Citratpuffer für den Equilibrierungspuffer als nicht geeignet. Die dynamische Kapazität des Imidazolpuffers ist zwar am größten, jedoch zeigt ihre Durchbruchskurve in Abbildung 27 eine eher flachere Steilheit und die späteste Elution. Dadurch zeigt sich dieser Puffer auch als ungeeigneter, als der Phosphat- und der MOPS-Puffer.

Außerdem wurden die statischen Bindungskapazitäten bestimmt. Dazu wurde die Formel 2.2 genommen, welche im Kapitel 2.2 beschrieben wurde. Dazu musste zum einen die Gesamtfläche und zum anderen die Fläche unter der Durchbruchskurve berechnet werden. Für die Berechnung des Integrals wurde die Trapezformel angewandt.

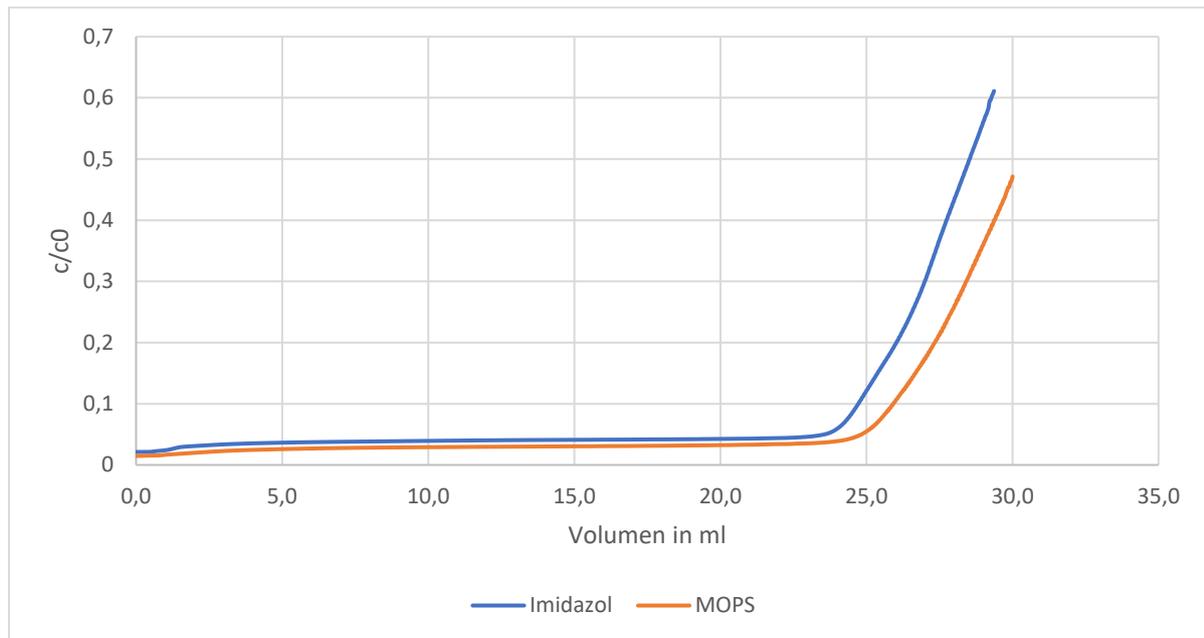
**Tabelle 6: Statische Kapazitäten von  $\beta$ -Lactoglobulin in verschiedenen Puffern**

	Imidazol	MOPS	Phosphat	Citrat
Statische Kapazität in mg/ml	26,24	24,74	19,19	5,15

Die statische Bindungskapazität ist beim Phosphatpuffer höher als beim Citratpuffer, wo sie am geringsten ist. Auch hierdurch zeigt sich der Citratpuffer als ungeeignet. Beim Imidazol- und

MOPS Puffer sind keine klaren Endwerte in der Durchbruchskurve zu erkennen, daher wurde jeweils nur die Hälfte der Absorption des erwarteten Plateaus herangezogen und zur Berechnung davon ausgegangen, dass es sich um einen sigmoidalen Verlauf handelt. Aufgrund dessen kann nicht von der Richtigkeit dieser berechneten Werte ausgegangen werden.

Als nächstes wurden auch für das  $\alpha$ -Lactalbumin die Durchbruchskurven erstellt.



**Abbildung 28: Durchbruchskurven von  $\alpha$ -Lactalbumin**

Den Durchbruchskurven liegen die Frontalchromatographien aus Abbildung 13 zugrunde. Dabei wurde  $\alpha$ -Lactalbumin mit einer Konzentration von 1 mg/ml über die Fractogel Säule gegeben. Die unterschiedlichen Puffer hatten alle eine Konzentration von 20 mM.

Abbildung 28 zeigt die Durchbruchskurven von  $\alpha$ -Lactalbumin, wobei der Durchbruch vom Imidazolpuffer etwas früher startet, als beim MOPS-Puffer. Anhand beider Durchbruchskurven ist ein steiler Verlauf zu erkennen. Dies bedeutet, dass das  $\alpha$ -Lactalbumin einen guten Zugang zum Porensystem erhalten hat und keiner starken Behinderung bezüglich des Massentransportes ausgesetzt war. Die Durchbruchskurven zeigen, dass kein Plateau in der Frontalchromatographie entstanden ist. Dieser Umstand bedeutet wiederum, dass noch Bindungsmöglichkeit an der Säule gegeben war. Jedoch war der Probenauftrag vorher beendet.

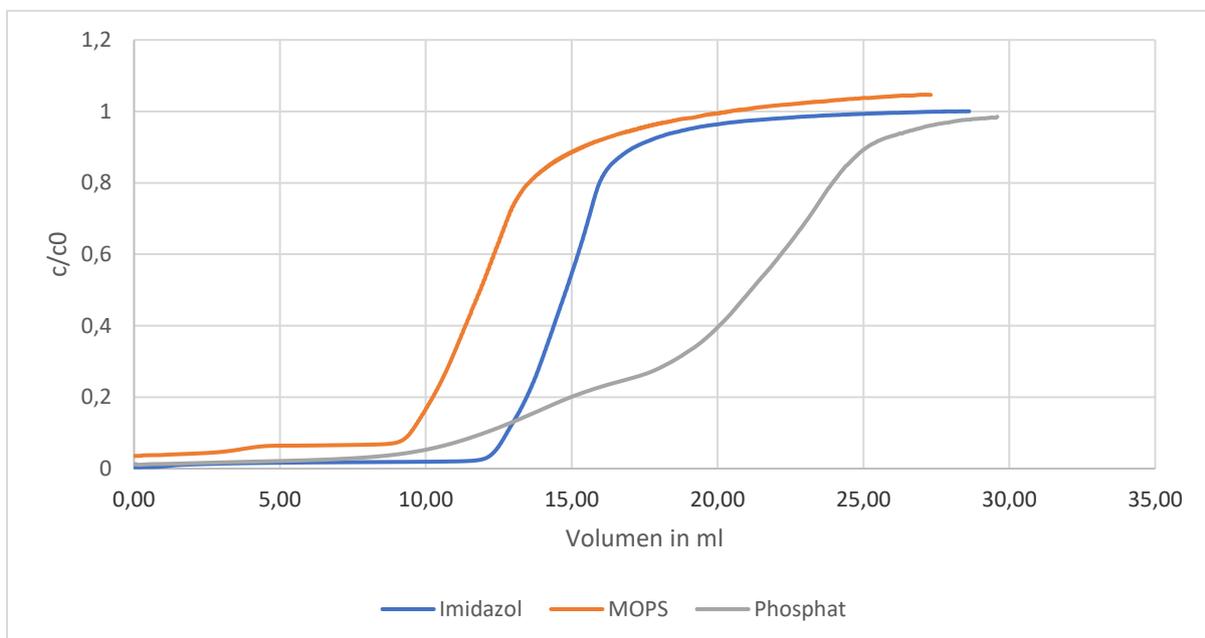
Auch für diese Durchbruchskurven können die dynamischen Kapazitäten für verschiedene Grenzkonzentrationen abgelesen werden.

**Tabelle 7: Dynamische Kapazitäten von  $\alpha$ -Lactalbumin in verschiedenen Puffern**

	dynamische Kapazität in mg - Imidazol	dynamische Kapazität in mg - MOPS
Grenzkonzentration 0,03	1,72	13,17
Grenzkonzentration 0,05	23,59	24,85

Bei  $\alpha$ -Lactalbumin sind die dynamischen Kapazitäten bei einer Grenzkonzentration von 0,05 bei den unterschiedlichen Puffern sehr ähnlich. Mit der geringeren Grenzkonzentration weisen beide Puffer einen deutlich geringeren, aber unterschiedlichen Wert auf. Beide Durchbruchskurven von  $\alpha$ -Lactalbumin weisen auf keinen Endwert hin. Da somit der typische sigmoidale Verlauf der Durchbruchskurve nicht gegeben ist, wurde auf eine Berechnung der statischen Kapazität in diesem Fall verzichtet.

Zum Schluss folgen die Durchbruchskurven des Proteingemisches.



**Abbildung 29: Durchbruchskurven von dem Proteingemisch**

Den Durchbruchskurven liegen die Frontalchromatographien aus Abbildung 15 zugrunde. Dabei wurde das Proteingemisch mit einer Konzentration von 1 mg/ml (Phosphat) bzw. von 2 mg/ml (Imidazol und MOPS) über die Fractogel Säule gegeben. Die unterschiedlichen Puffer hatten alle eine Konzentration von 20 mM.

Die Durchbruchskurven vom Proteingemisch verlaufen alle gegen den Wert  $\frac{c}{c_0} = 1$ . Dieser Verlauf konnte anhand von Abbildung 15 bereits erkannt werden. Der Durchbruch beim MOPS-Puffer startet hier zuerst, danach erfolgt er beim Imidazolpuffer und zuletzt beim Phosphatpuffer. Außerdem ist die flachste Durchbruchskurve beim Phosphatpuffer zu sehen. Bei dem Imidazolpuffer konnte in Abbildung 15 ein Plateau erkannt werden, daher erfolgte dort die Angleichung wie auch schon beim Phosphat- und Citratpuffer bei dem  $\beta$ -Lactoglobulin in Abbildung 27. In Abbildung 15 konnte für den MOPS- und den Phosphatpuffer kein klares Plateau erkannt werden, daher erfolgte dort keine Angleichung.

In der folgenden Tabelle 8 sind die abgelesenen dynamischen Kapazitäten zu sehen.

**Tabelle 8: Dynamische Kapazitäten vom Proteingemisch in verschiedenen Puffern**

	dynamische Kapazität in mg - Imidazol	dynamische Kapazität in mg - MOPS	dynamische Kapazität in mg - Phosphat
Grenzkonzentration 0,03	12,09	-	7,72
Grenzkonzentration 0,05	12,39	3,33	9,85

Anhand der Tabelle 8 zeigt sich, dass Imidazol höhere dynamische Kapazitäten als Phosphat und MOPS besitzt. Die dynamische Kapazität beim MOPS Puffer und einer Grenzkonzentration von 0,03 wurde nicht abgelesen, da diese Grenzkonzentration schon bei 0 mg Probe erreicht gewesen wäre. Im Vergleich zu den einzelnen Proteinen zeigt das Proteingemisch kleinere dynamische Kapazitäten, was wiederum darauf hinweist, dass beide Proteine an der Säule binden können und daher nicht so viel Probe auf die Säule aufgetragen werden kann.

Zusätzlich zur dynamischen Kapazität wurden auch hier die statischen Kapazitäten berechnet. Dabei wurde ebenfalls, wie in dem Kapitel 2.2 beschrieben, vorgegangen.

**Tabelle 9: Statische Kapazitäten vom Proteingemisch in verschiedenen Puffern**

	Imidazol	MOPS	Phosphat
Statische Kapazität in mg/ml	39,36	25,74	19,45

Die berechneten statischen Kapazitäten können nicht alle miteinander verglichen werden, da eine unterschiedliche Proteinkonzentration bei den verschiedenen Puffen eingesetzt wurde. Zwischen dem Imidazol- und dem MOPS Puffer zeigt sich eine höhere statische Kapazität als beim Imidazolpuffer, somit eine höhere Bindungskapazität beim Imidazolpuffer. Die statische Kapazität des Phosphatpuffers hat keinen Vergleichswert.

Nachdem die Vorversuche beendet worden sind, wurde als Hauptversuch mit der Molke als Ausgangsprodukt begonnen. Wie in dem Methodenteil beschrieben, wurde die Molke aufkonzentriert und in den gewünschten Puffer diafiltriert. Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurde entschieden, dass in den Hauptversuchen nur noch mit dem Phosphat- und dem MOPS Puffer weitergearbeitet wird. Dabei wurden die Ergebnisse der SEC Untersuchungen als ausschlaggebend definiert. Denn anhand von den Abbildungen 20 und 21 konnte der gewünschte Verdrängungseffekt von  $\alpha$ -Lactalbumin durch  $\beta$ -Lactoglobulin nachgewiesen werden. Nach dem Schritt der Aufkonzentrierung erfolgte eine Zentrifugation. Diese diente der Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen der Molke wie zum Beispiel Fetten. Mit dem Überstand dieser wurde weitergearbeitet. Zur Abtrennung der positiv geladenen Molkenproteine wurde dieser Überstand über eine SP XL Säule, welche als Kationenaustauscher diente, geleitet. [11] Zur Kontrolle, ob die Aufkonzentrierung erfolgreich war, wurde zunächst ein Bradford-Assay gemacht. Folgend sind die Ergebnisse des Assays zu sehen.

**Tabelle 10: Pipettierschema Bradford-Assay**

Std steht hier für Standard. Retentat1 ist der Überstand der aufkonzentrierten und zentrifugierten Molke. Dagegen ist das Retentat2 der Pool, der bereits über die SP XL Säule gelaufen ist. Es wurden verschiedene Verdünnungen der Proben hergestellt, wie in der Tabelle zu erkennen ist.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8	Std 7
B	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8	Std 7
C									
D	Molke 1:50	Molke 1:80	Permeat 1:50	Permeat 1:80	Retentat1 1:100	Retentat1 1:200	Retentat2 1:100	Retentat2 1:200	
E	Molke 1:50	Molke 1:80	Permeat 1:50	Permeat 1:80	Retentat1 1:100	Retentat1 1:200	Retentat2 1:100	Retentat2 1:200	
F	Molke 1:50	Molke 1:80	Permeat 1:50	Permeat 1:80	Retentat1 1:100	Retentat1 1:200	Retentat2 1:100	Retentat2 1:200	

Der Standard 7 wurde doppelt aufgetragen, da sich bei der ersten Auftragung zu viele Luftblasen, welche die Messung stören, gebildet haben. Zur späteren Auswertung wurden nur die Messwerte aus der Spalte 9 verwendet. Der verwendete Standard wurde mit BSA hergestellt und hatte folgende Konzentrationen.

**Tabelle 11: Standardreihe für das Bradford-Assay**

Standard Nummer	BSA in $\mu\text{g/ml}$
1	0
2	20
3	30
4	40
5	50
6	60
7	80
8	100

Aus der UV-Messung ergaben sich folgende Messwerte.

**Tabelle 12: Messergebnisse des Bradford-Assay**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,628	0,742	0,777	0,815	0,841	0,872	1,642	1,028	0,877
B	0,642	0,765	0,717	0,803	0,802	0,818	1,013	0,977	0,901
C									
D	0,739	0,712	0,666	0,643	0,857	0,755	0,84	0,756	
E	0,735	0,708	0,668	0,68	0,868	0,754	0,802	0,756	
F	0,721	0,718	0,686	0,677	0,874	0,772	0,849	0,77	

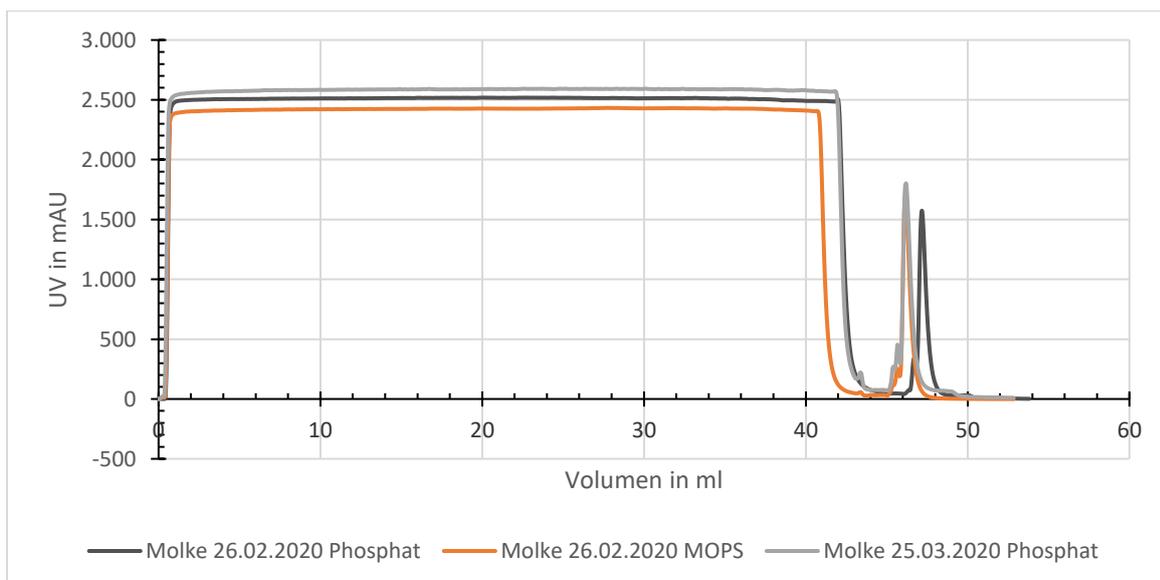
Es wurde jeweils der Mittelwert der Messergebnisse berechnet. Anschließend konnten über die Standardreihe die Konzentrationen berechnet werden, welche in der nächsten Tabelle 13 zu finden sind.

**Tabelle 13: Berechnete Konzentrationen**

	Konzentration in mg/ml
Molke 1:50	10,73
Molke 1:80	16,72
Permeat 1:50	9,87
Permeat 1:80	15,63
Retentat1 1:100	25,42
Retentat1 1:200	44,60
Retentat2 1:100	24,36
Retentat2 1:200	44,62

In der Tabelle 13 ist zu erkennen, dass die Molke erfolgreich aufkonzentriert wurde. Die Proteinkonzentration ist im Retentat deutlich höher, als im Permeat. Zudem ist die Konzentration der Ausgangsmolke gestiegen. Der Unterschied zwischen dem Retentat1 und dem Retentat2 in der 1:100 Verdünnung zeigt sich auch als wünschenswertes Ergebnis. Zwischen diesen beiden Proben sollten die positiv geladenen Proteine aus der Molke abgetrennt werden. Diese Proteine haben aber den geringeren prozentualen Anteil in der Molke, daher ist die geringe Senkung der Proteingesamtkonzentration zu erklären.

Wie schon bereits erwähnt, wurde die Molke nach der Zentrifugation mittels einer Frontalchromatographie über eine SP XL Säule gegeben.

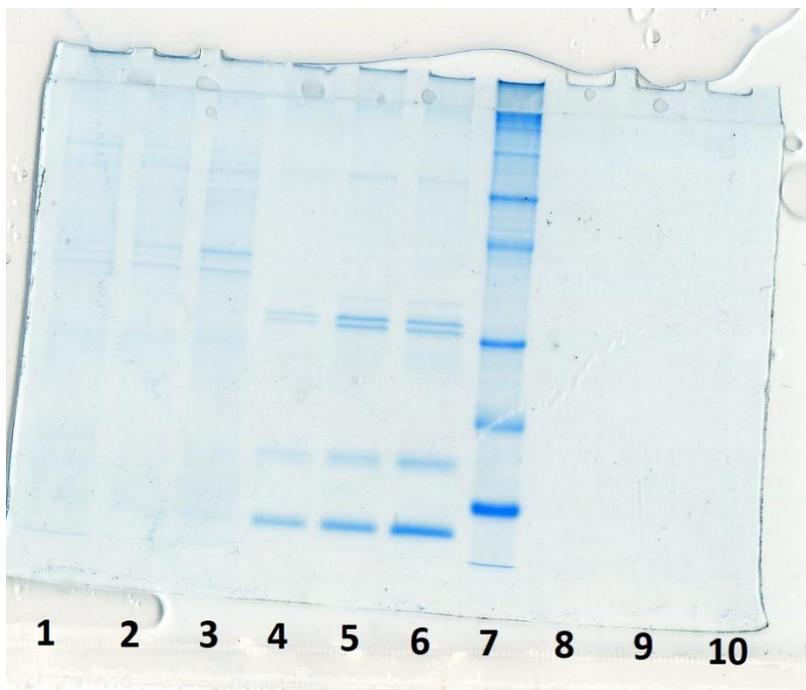
**Abbildung 30: Frontalchromatographie vom Molkenüberstand über SP XL Säule**

Es wurden jeweils zwischen 40 und 41 ml an zentrifugierten Molkenüberstand über die SP XL Säule gegeben. Dabei war eine Flussrate von 1 ml/min eingestellt. Die Puffer hatten alle eine Konzentration von 20 mM. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem Stufengradienten, welcher 1 M NaCl enthält.

In der Abbildung 30 ist zu erkennen, dass ein Großteil der Proteine gleich zu Beginn durch die Säule bricht. Dieser Verlauf wurde auch erwartet. Dabei handelt es sich um die negativ geladenen Proteine, die nicht vom Kationenaustauscher zurückgehalten werden. Anhand des Elutionspeaks ist demnach aber auch zu sehen, dass positiv geladene Proteine in der Molke enthalten waren, die an der Säule binden konnten und später durch die NaCl Zugabe eluiert wurden. Im Durchbruchbereich wurden Fraktionen von jeweils 1 ml genommen. Diese durchgebrochenen Fraktionen wurden alle miteinander gepoolt. Dieser Pool wurde mittels einer Frontalchromatographie über die selbstgepackte Säule befördert. Zuvor wurde mit Hilfe einer Standardgeraden die Konzentration des Pools bestimmt. Dieser Schritt war notwendig, damit mit einer ähnlichen Proteinkonzentration wie in den Vorversuchen gearbeitet werden konnte.

Bei der Konzentrationsbestimmung wurde eine Konzentration des Pools zwischen 15 und 17 mg/ml bestimmt. Daher wurden 1:15 bzw. 1:20 Verdünnungen des Pools hergestellt. Dabei diente der jeweilige Puffer als Verdünnungslösung.

Außerdem wurden SDS-PAGEs durchgeführt, hier wurden das Ausgangsprodukt Molke, das Retentat, das Permeat und die Fraktionen des Elutionspeaks von der SP XL Säule untersucht.

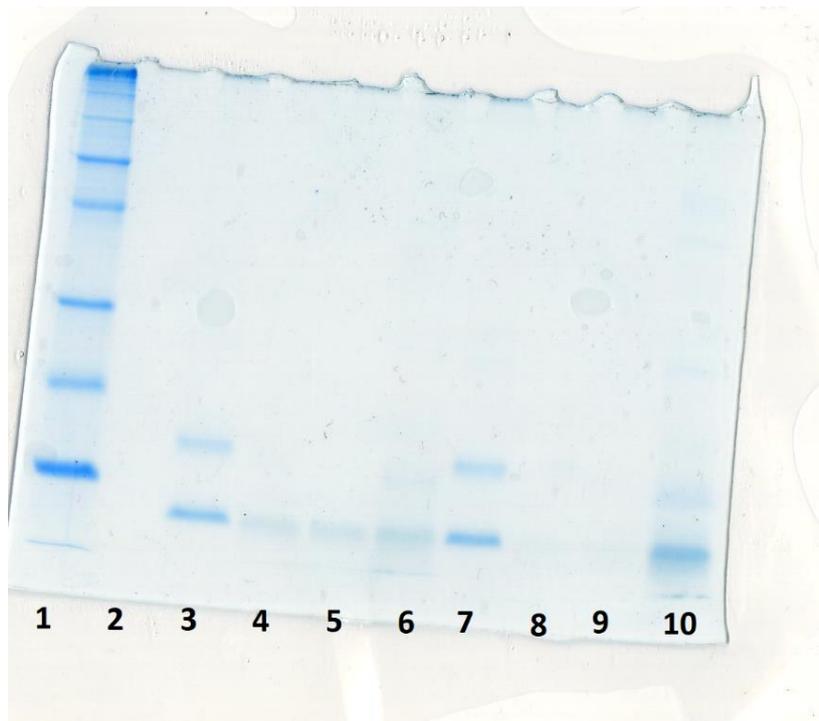


**Abbildung 31: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung**

1: SP XL Probe 48 (Phosphat 26.02.2020), 2: SP XL Probe 46 (MOPS 26.02.2020), 3: SP XL Probe 47 (MOPS 26.02.2020), 4: Molke 1:20, 5: Molke 1:10, 6: Molke 1:5, 7: Marker, 8: Permeat 1:20, 9: Permeat 1:10, 10: Permeat 1:5

Die Banden 4 – 6 in der Abbildung 31 zeigen das Ausgangsprodukt Molke in verschiedenen Verdünnungen. Dabei sind Banden für  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin anhand des Markers

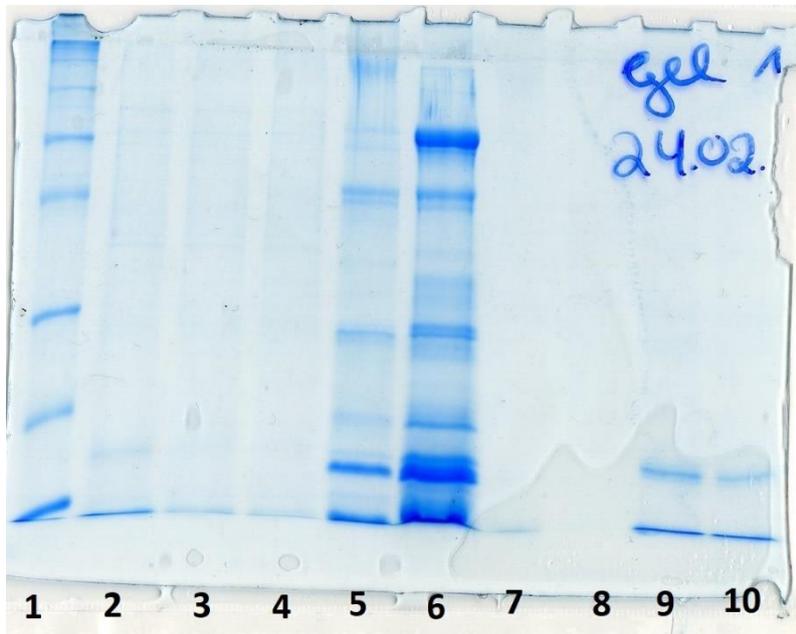
in Tasche 7 zu identifizieren. Außerdem sind noch drei weitere Proteinbanden zu sehen. Zwei davon liegen kurz über der Markerbande von Carboanhydrase (29 kDa). Jedoch passt keines der bekannten Molkenproteine zu dieser Molekülmasse. Denkbar wäre jedoch hierbei, dass es sich um Dimere eines Proteins handelt. Als dritte Bande ist ein Protein mit einer Größe zwischen 66 kDa und 118 kDa im Gel zu erkennen. Wie auch schon im vorherigen besprochenen Gel könnte diese Bande für Transferrin, Lactoferrin oder Lactoperoxidase stehen. In den Banden 1 – 3 wurden verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks der SP XL Säule aufgetragen. Diese zeigen ebenfalls eine Bande zwischen 66 kDa und 118 kDa und lassen sich demnach gleich interpretieren. Zudem sind noch zwei Banden etwas unter der Ovalbumin Markerbande (43 kDa) zu sehen. Diese können ebenfalls keinem bestimmten Protein zugeordnet werden, aber auch hier besteht die Möglichkeit, dass es sich um ein Dimer handelt. Die Banden 8 – 10 zeigen keine erkennbaren Proteinbanden. Diese Erkenntnis ist wünschenswert, da dort das Permeat aufgetragen wurde und somit davon ausgegangen werden kann, dass keine größere Menge an Proteinen durch die Ultrafiltration verloren gegangen ist.



**Abbildung 32: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung**

1: Marker, 2: -, 3: Pool Phosphat 1:20 (26.02.2020), 4: SP XL Probe 47 (Phosphat 26.02.2020), 5: SP XL Probe 48 (Phosphat 26.02.2020), 6: SP XL Probe 49 1:10 (Phosphat 26.02.2020), 7: Pool MOPS 1:20 (26.02.2020), 8: SP XL Probe 46 (MOPS 26.02.2020), 9: SP XL Probe 47 (MOPS 26.02.2020), 10: SP XL Probe 48 1:5 (MOPS 26.02.2020)

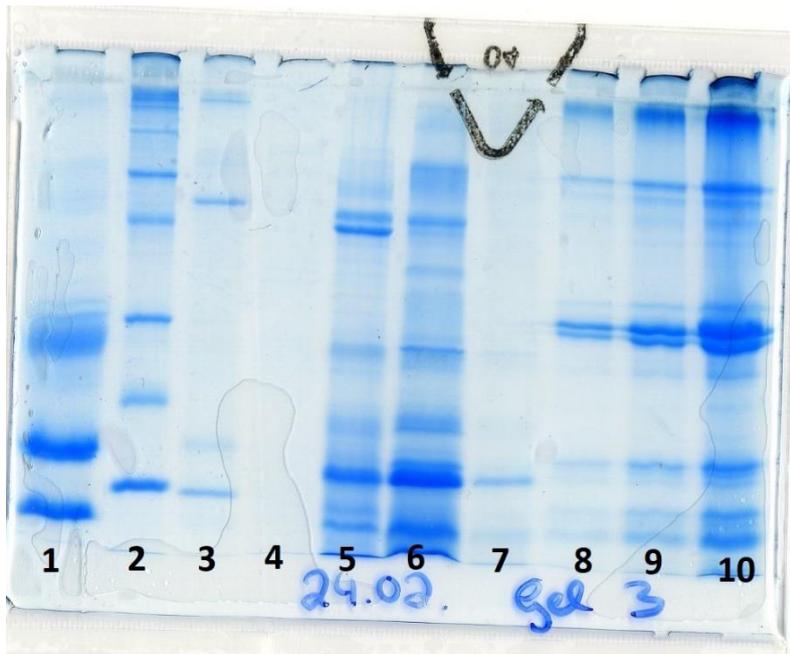
Anhand des oberen Gels zeigt sich an den Banden 3 und 7, dass in dem Durchbruch der SP XL die beiden betrachteten Proteine enthalten waren. Die restlichen Banden deuten aber auch darauf hin, dass etwas  $\alpha$ -Lactalbumin an der SP XL Säule gebunden hat und dadurch in den Fraktionen des Elutionspeaks zu finden ist.



**Abbildung 33: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung**

1: Marker, 2: SP XL Probe 46 (A, 25.03.2020), 3: SP XL Probe 47 (A, 25.03.2020), 4: SP XL Probe 48 (A, 25.03.2020), 5: SP XL Probe 49 (A, 25.03.2020), 6: SP XL Probe 50 (A, 25.03.2020), 7: SP XL Probe 51 (A, 25.03.2020), 8: SP XL Probe 48 (25.03.2020), 9: Pool 1:10 (25.03.2020), 10: Pool 1:15 (25.03.2020), das A steht für eine Aufkonzentrierung durch eine Acetonfällung

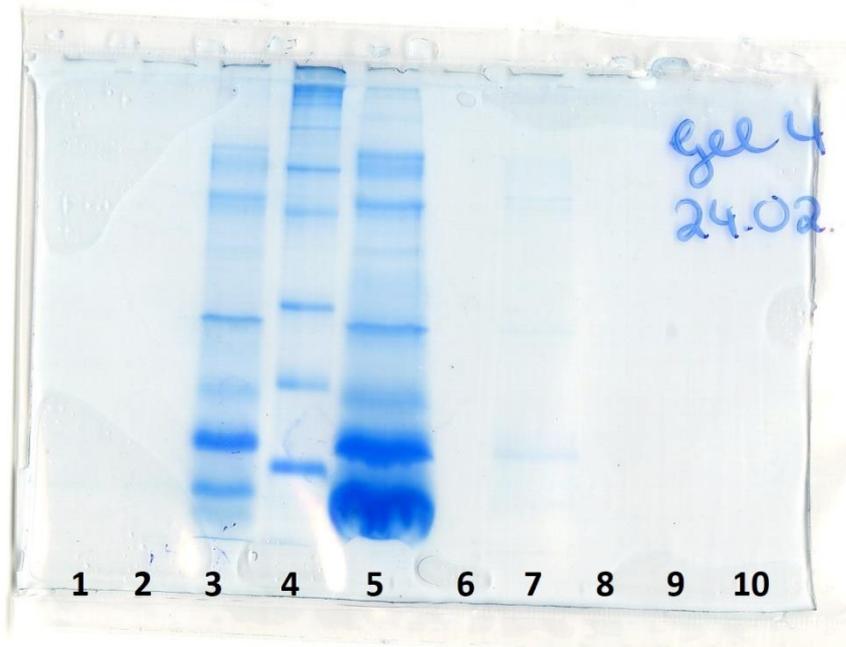
Die oben durchgeführte SDS-PAGE lässt erkennen, dass im Elutionspeak der SP XL Säule einige Proteine enthalten waren. Dazu gehören auch unter anderem  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin. Außerdem kann die oberste dicke Bande aus Tasche 6 mittels des Markers BSA zugeordnet werden. Die Proteinproben in den Taschen 2 – 4 und 7 – 8 zeigen keine eindeutigen Banden. Diese Proben, außer Probe 51, wurden später nochmal mit der sensitiveren Färbemethode der Silberfärbung untersucht. Die Banden 9 und 10 bestätigen nochmals, dass sich im Probenpool die gewünschten Proteine enthalten waren.



**Abbildung 34: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung**

1: Probe 33 (25.03.2020), 2: Marker, 3: SP XL Probe 47 (Phosphat 26.02.2020), 4: SP XL Probe 48 (Phosphat 26.02.2020), 5: SP XL Probe 49 (Phosphat 26.02.2020), 6: SP XL Probe 50 (Phosphat 26.02.2020), 7: SP XL Probe 52 (Phosphat 26.02.2020), 8: Pellet 1:50, 9: Pellet 1:20, 10: Pellet 1:5

Auch diese SDS-PAGE weist darauf hin, dass viele Proteine an der SP XL Säule gebunden waren und sich somit im Elutionspeak wiedergefunden haben. Neben diesen Proben wurde das bei der Zentrifugation der aufkonzentrierten Molke entstandene Pellet auf das Gel aufgetragen. Das Pellet (ca. 100 µl) wurde zuvor in 100 µl Puffer resuspendiert und in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf das Gel aufgetragen. An den Banden ist zu sehen, dass sich dort ebenfalls viele Proteine befanden. Somit zeigt sich, dass viele Proteine in den gegebenen Versuchsbedingungen zur Präzipitation neigen. Ein möglicher Grund für die Präzipitation von  $\beta$ -Lactoglobulin konnte in einer geringen Salzkonzentration herausgefunden werden. [12] Neben den fokussierten Proteinen sind die anderen Banden entweder in Bezug auf den Elutionspeak oder im Ausgangsprodukt der Molke bereits diskutiert worden. Die Bande 1 zeigt die Fraktion des Elutionspeaks der noch folgenden Frontalchromatographie. Anhand dieser Bande zeigt sich, dass die Proteine von Interesse dennoch enthalten waren und an der selbstgebastelten Säule gebunden haben.

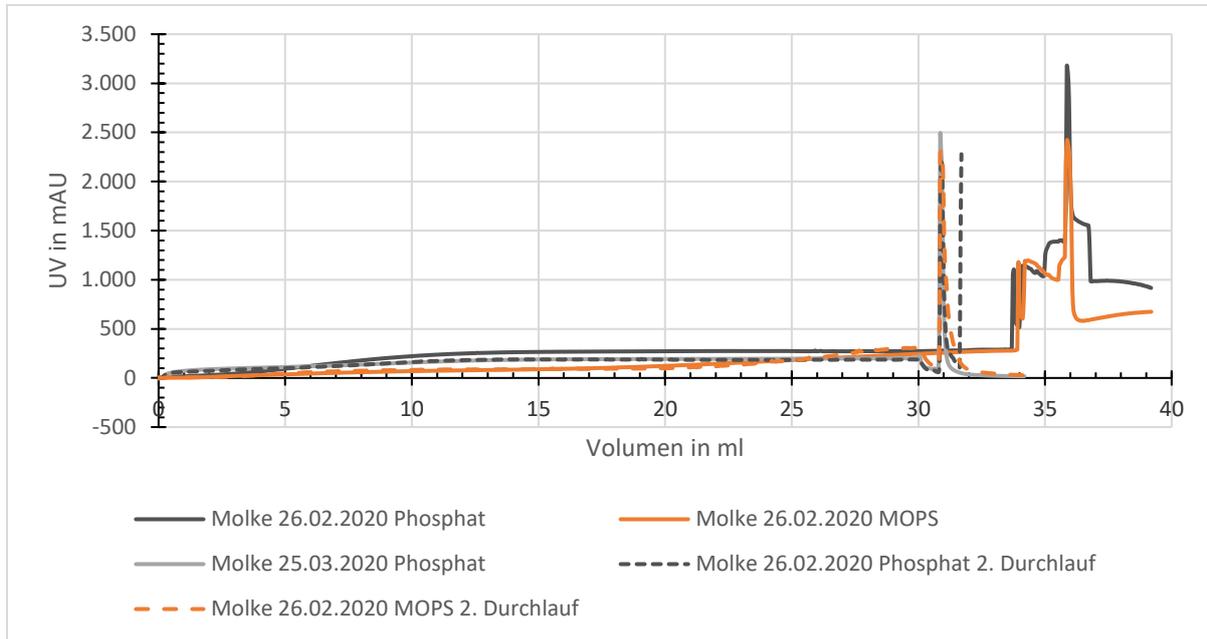


**Abbildung 35: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung**

1: SP XL Probe 46 (MOPS 26.02.2020), 2: SP XL Probe 47 (MOPS 26.02.2020), 3: SP XL Probe 48 (MOPS 26.02.2020), 4: Marker, 5: SP XL Probe 49 (MOPS 26.02.2020), 6: -, 7: SP XL Probe 51 (MOPS 26.02.2020), 8: -, 9: -, 10: -

Die bereits erschlossenen Erkenntnisse werden von der oben durchgeführten SDS-PAGE ebenfalls unterstützt. Somit zeigen sich in den Elutionsproben der SP XL Säule mehrere Proteine, auch das  $\beta$ -Lactoglobulin und das  $\alpha$ -Lactalbumin.

Nach der SP XL Säule wurde der verdünnte Probenpool über den selbstgebauten Anionenaustauscher mit dem Fractogel als Säulenmaterial gegeben.



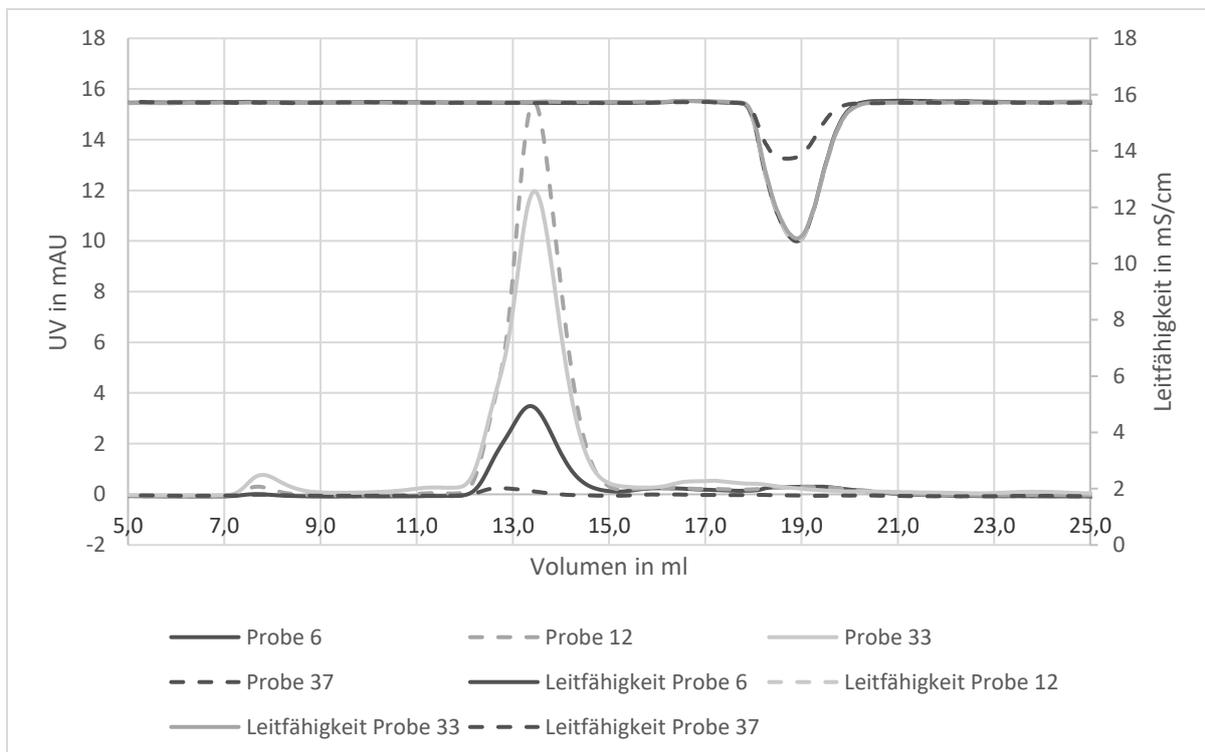
**Abbildung 36: Frontalchromatographien von Molke über eigene Säule (Säulenmaterial: Fractogel® EMD TMAE Hicap (M))**

Die Proteinlösungen hatten nach Verdünnung mit dem jeweiligen Puffer eine Konzentration von ca. 1 mg/ml. Die Molke (MHD: 26.02.2020) im Phosphatpuffer wurde 1:15 verdünnt, eine 1:20 Verdünnung wurde dahingegen bei allen anderen Läufen auf die Säule aufgetragen. Als Säulenmaterial wurde da Fractogel® EMD TMAE Hicap (M) verwendet, bei einer Flussrate von 0,1 ml/min. Die verwendeten Puffer hatten alle eine Konzentration von 20 mM. Die ersten Läufe (MHD: 26.02.2020) und der spätere Lauf (MHD: 25.03.2020) hatten Citrat als Displacer enthalten. Die zweiten Durchläufe (MHD: 26.02.2020) hatten NaCl als Verdränger im Elutionspuffer. Es wurde dabei immer mit einem Stufengradienten zur Elution gearbeitet.

Der Verlauf des MOPS Puffers zeigt die geringste Steigung der UV-Absorptionen. Die Verschiebung auf der x-Achse zeigt unterschiedliche Probenvolumina. Außerdem ist zu erkennen, dass die UV-Absorption beim Phosphatpuffer, bei dem die Probe nur 1:15 verdünnt wurde, im Elutionspeak am höchsten gestiegen ist. Dies ist zum einen aufgrund der geringeren Verdünnung zu erklären, zum anderen könnte auch das Citrat für die höhere Proteinkonzentration sorgen. Bei den anderen Durchläufen, bei denen ebenfalls Citrat im Elutionspuffer war, konnte jedoch keine höhere Proteinkonzentration nachgewiesen werden. Bei den ersten Läufen mit der Molke (MHD: 26.02.2020) sind ebenfalls Schwankungen der UV-Absorption nach der Probenaufgabe zu erkennen. Diese Schwankungen konnten dahingegen minimiert werden, dass mehr Probe in den Super Loop manuell gespritzt wurde, als auf die Säule gepumpt werden sollte. Dadurch konnte verhindert werden, dass eventuelle Luftblasen in dem Super Loop in das Chromatographie System gelangen und die Messung stören konnten.

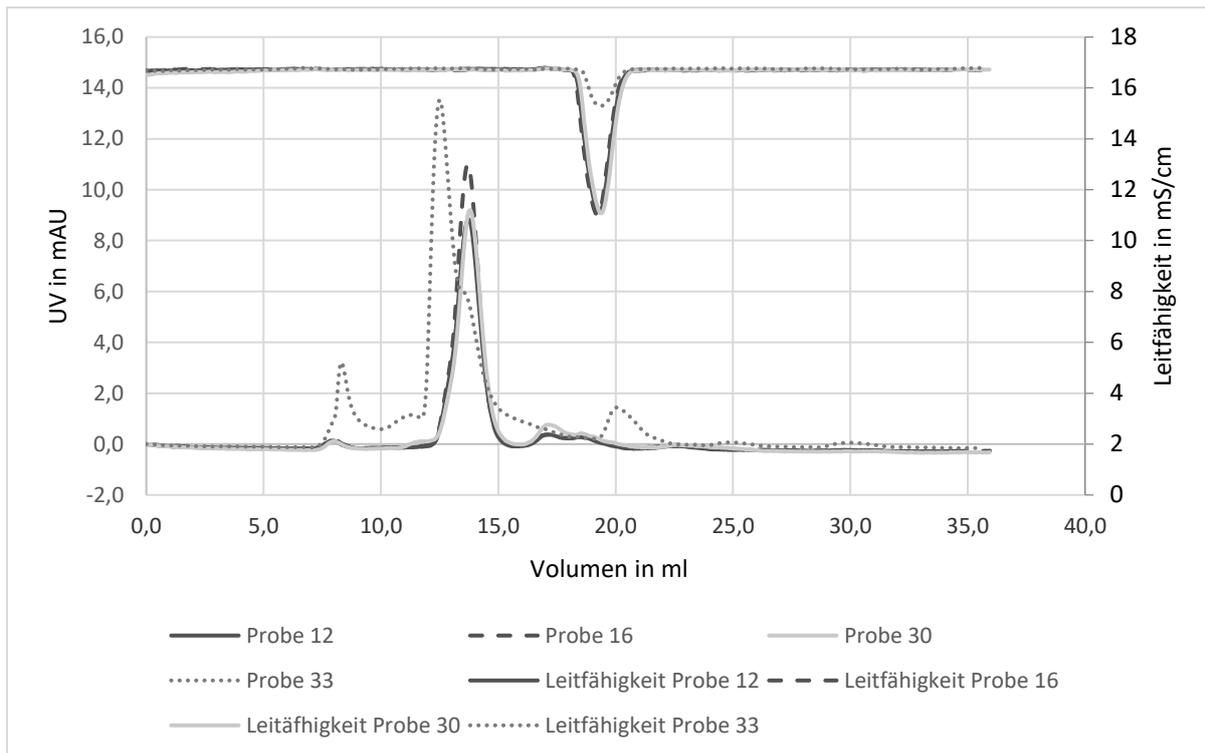
Die selbstgepackte Säule schien nach einem der letzten Durchläufe (2.Durchlauf MHD: 26.02.2020) blockiert. Daher wurde sie mit 0,2 M Natronlauge gereinigt. Um zu untersuchen, ob diese Verblockung gelöst werden konnte oder ob der verwendete Puffer eventuell Einfluss gehabt haben könnte, wurde der Hauptversuch erneut mit neuer Molke (MHD: 25.03.2020) im Phosphatpuffer durchgeführt. Diese Durchführung konnte als erfolgreich erkannt werden, wodurch der Phosphatpuffer keinen entscheidenden Einfluss auf die Verblockung haben konnte. Ein anderer möglicher Grund für die Verblockung könnte somit in der zeitlichen Anwendung der Säule liegen. Somit könnte über die Zeit hinweg immer etwas Protein auch nach der Elution an der Säule hängen geblieben sein, was letztendlich zur Verblockung führte.

Von den Frontalchromatographien aus der Abbildung 36 wurden mehrere Proben untersucht, zum Teil über die SEC, aber auch über die SDS-PAGE. Während der Frontalchromatographien wurden im Durchbruchbereich 1 ml Proben genommen, in dem Elutionsbereich waren es 500 µl Fraktionen. In den folgenden Abbildungen von den SEC Ergebnissen kann die Zugehörigkeit zu der Frontalchromatographie hergestellt werden.



**Abbildung 37: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie von Molke (MHD: 26.02.2020) im Phosphatpuffer**

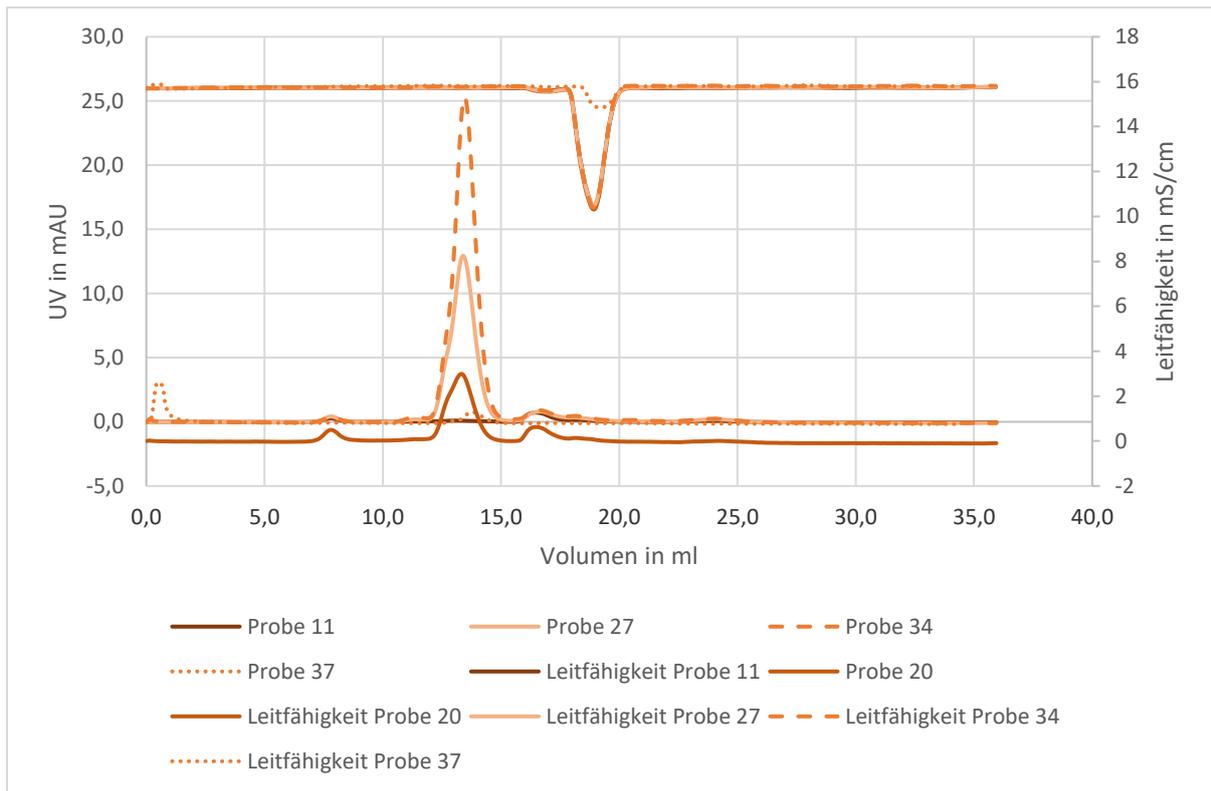
Es wurden die Proben 6,12 und 33 von der Frontalchromatographie der Molke über die Fractogel Säule beim Phosphatpuffer untersucht. Von den Proben 6, 12 und 33 wurden 500 µl genommen, bei Probe 37 hingegen nur 200 µl. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.



**Abbildung 38: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie von Molke (MHD: 26.02.2020) im Phosphatpuffer 2. Durchlauf**

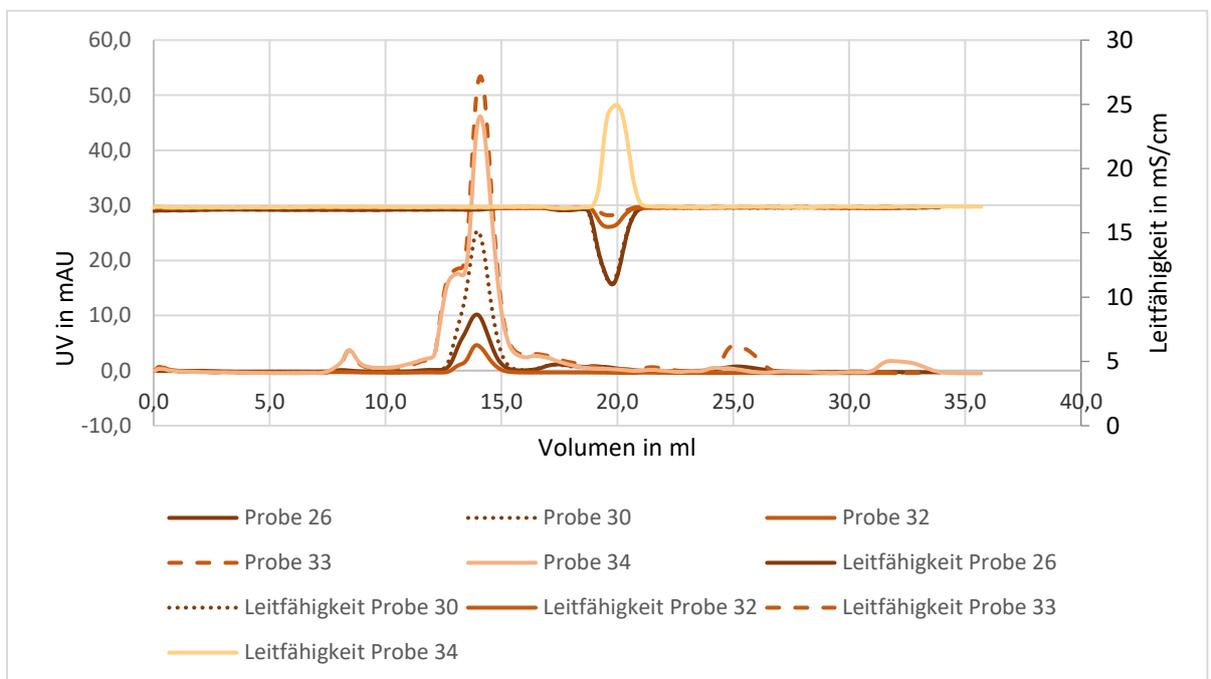
Es wurden die Proben 12,16,30 und 33 von der Frontalchromatographie der Molke vom 2.Durchlauf über die Fractogel Säule beim Phosphatpuffer untersucht. Von den Proben 12, 16 und 30 wurden 500  $\mu$ l verwendet, von der Probe 33 200  $\mu$ l. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

In den Ergebnissen des Phosphatpuffers zeigt sich in den Durchbruchfraktionen hauptsächlich ein Peak, welcher sich aufgrund des Retentionsvolumens dem  $\alpha$ -Lactalbumin zuordnen lässt. Der Elutionspeak vom ersten Durchlauf (Abbildung 37, Probe 37) zeigt eine sehr geringe UV-Absorption. Der Elutionspeak vom 2.Durchlauf (Abbildung 38, Probe 33) zeigt wieder ein Ergebnis wie schon in den Vorversuchen. Denn bei dieser Probe ist ein Peak mit einer rechten Schulter zu sehen. Dieser Verlauf des Peaks lässt darauf schließen, dass es sich bei der linken Seite um  $\beta$ -Lactoglobulin und bei der rechten Seite um  $\alpha$ -Lactalbumin handelt. Die UV-Absorptionen sind hier jedoch sehr viel geringer, als in den Vorversuchen. Dieser Umstand lässt sich mit in bereits erwähnten Ergebnissen der SDS-Page erklären. An diesen konnte gezeigt werden, dass einiges an Protein durch die SP XL Säule verloren gegangen ist. Zudem zeigen sich noch einige kleinere Peaks in der Elutionsfraktion (Abbildung 38, Probe 33). Wie schon in der SDS-PAGE erkannt wurde, könnte es sich dabei um andere Molkeproteine und oder deren Dimere handeln.



**Abbildung 39: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie von Molke (MHD: 26.02.2020) im MOPS Puffer**

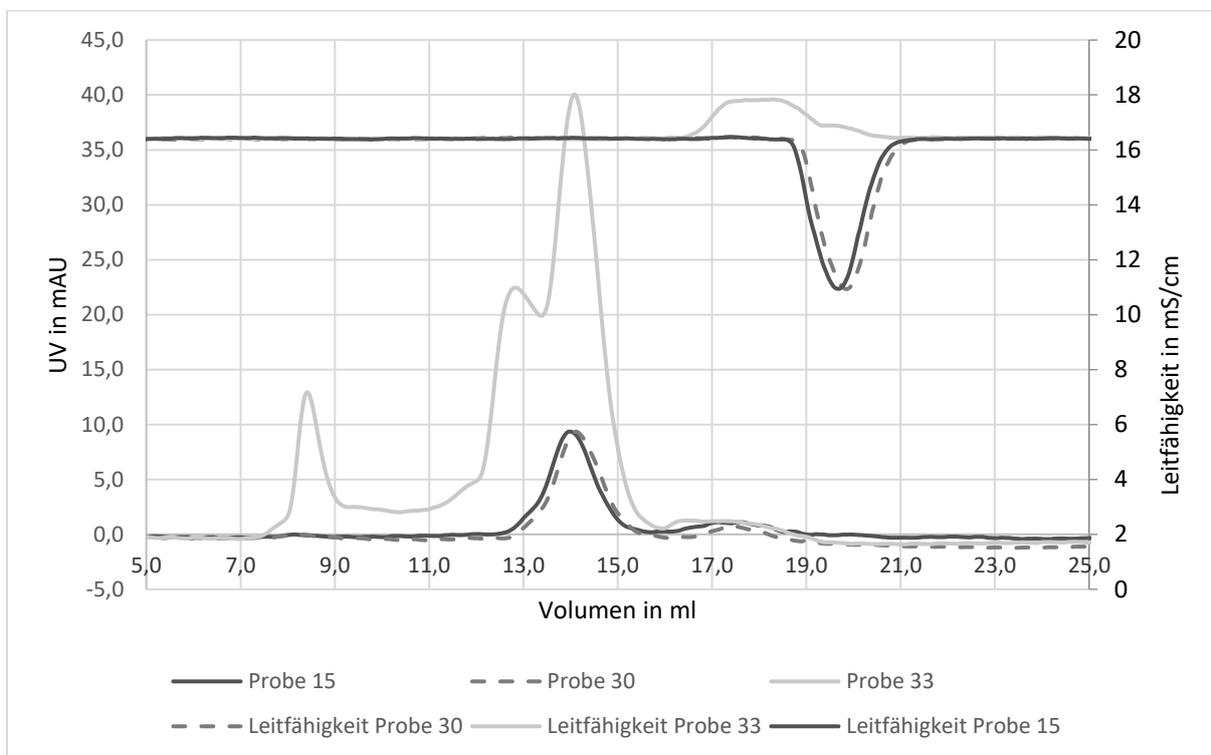
Es wurden die Proben 11,20,27,34 und 37 von der Frontalchromatographie der Molke über die Fractogel Säule beim MOPS-Puffer untersucht. 500 µl wurden von den Proben 11, 20, 27, 34 verwendet. 200 µl von der Probe 37. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.



**Abbildung 40: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie von Molke (MHD: 26.02.2020) im MOPS Puffer 2. Durchlauf**

Es wurden die Proben 26,30,32,33 und 34 von der Frontalchromatographie der Molke vom 2.Durchlauf über die Fractogel Säule beim MOPS-Puffer untersucht. 500 µl wurden von den Proben 26 und 30 verwendet. 250 µl von der Proben 32, 33 und 34. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Die Ergebnisse des MOPS Puffers in den Abbildungen 39 und 40 sind ähnlich zu den vom Phosphatpuffer in den Abbildungen 37 und 38, die bereits erwähnt wurden. Die Durchbruchfraktionen zeigen hauptsächlich einen Peak von  $\alpha$ -Lactalbumin, wohingegen beim Elutionspeak vom 2.Durchlauf (Abbildung 40) auch ein Doppelpack zu erkennen ist. Jedoch ist in der Abbildung 40 ein Doppelpack zu sehen, bei dem das Konzentrationsverhältnis zwischen  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin umgekehrt zu den Ergebnissen der Vorversuche ist. Zudem zeigen sowohl diese Ergebnisse als auch die Ergebnisse des Phosphatpuffers, dass die Retentionsvolumina jeweils einen etwas höheren Wert haben, als in den Vorversuchen zu erkennen war. Das lässt sich durch ein längeres Zurückhalten durch die stationäre Phase erklären. Ein möglicher Grund dafür wäre die geringere Proteinkonzentration.



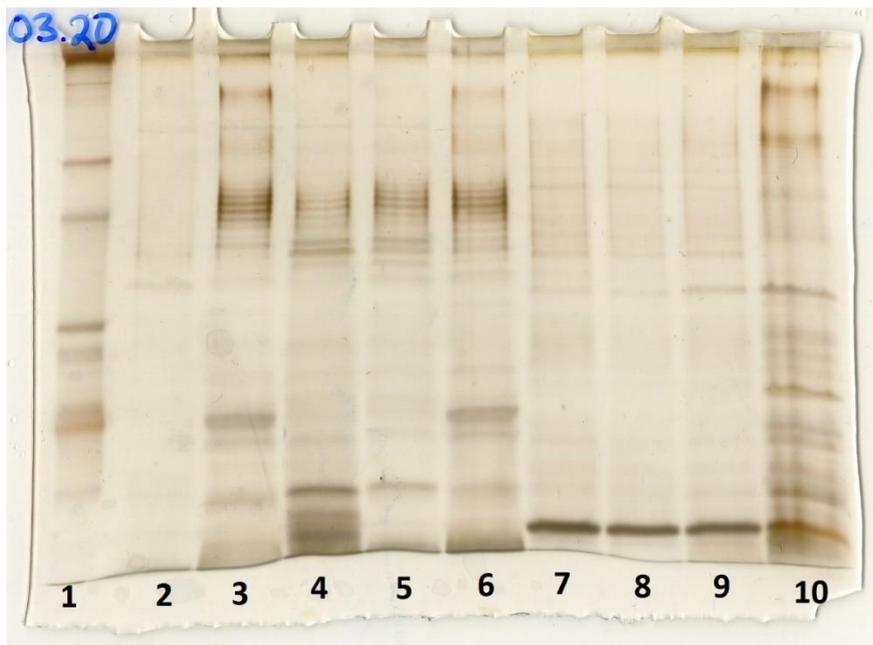
**Abbildung 41: SEC Ergebnisse von Frontalchromatographie von Molke (MHD: 25.03.2020) im Phosphatpuffer**

Es wurden die Proben 15,30 und 33 von der Frontalchromatographie der Molke (MHD: 25.03.2020) über die Fractogel Säule beim Phosphatpuffer untersucht. 500  $\mu$ l wurden von den Proben 15 und 30 verwendet. 250  $\mu$ l von der Probe 33. Die Pufferkonzentration des Phosphat Equilibrierungspuffers betrug 20 mM und enthielt 150 mM NaCl. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Der Durchlauf nach der Reinigung der Säule (Abbildung 41) zeigt ähnliche Ergebnisse zu dem 2.Durchlauf mit der Molke (Abbildung 38, MHD: 26.02.2020). Wobei das Konzentrationsverhältnis des Elutionspeaks anders herum ist. Der linke Bereich des Doppelpacks in der Abbildung 41 weist eine geringere Absorption als der rechte Bereich auf. Die Peaks der Durchbruchfraktionen in Abbildung 41 weisen ebenfalls eine geringe linke Schulter auf. Ebenfalls ist in der Abbildung 41 ein deutlicher Störpeak mit einem

Retentionsvolumen zwischen 8 und 9 ml zu sehen. Dieser weist auf ein größeres Protein in der Molke hin.

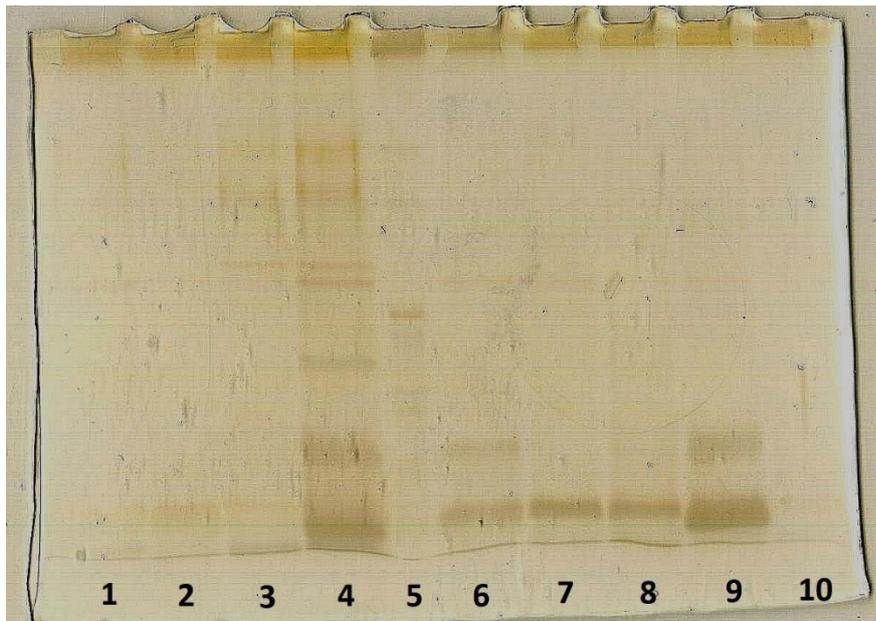
Neben der SEC wurde auch die SDS-PAGE als Analysemethodik verwendet. Die ausgewählten Proben wurden alle, außer besonders markierte Proben, zuvor mittels einer Acetonfällung aufkonzentriert. Dieser Schritt wurde gemacht, da die Proteinkonzentration in den Proben sehr gering war. Zusätzlich dazu wurde als Färbemethode des Gels eine Silberfärbung gewählt, da dort Proteinmengen schon ab 0,1 ng zu detektieren sind. [27]



**Abbildung 42: SDS-PAGE mit Silberfärbung**

1: Marker, 2: Probe 3 (MOPS 26.02.2020), 3: 2. Durchlauf Probe 12 (MOPS 26.02.2020), 4: 2. Durchlauf Probe 4 (MOPS 26.02.2020), 5: 2. Durchlauf Probe 7 (MOPS 26.02.2020), 6: 2. Durchlauf Probe 19 (MOPS 26.02.2020), 7: Probe 46\* (Molke über SP XL Säule 25.03.2020), 8: Probe 47\* (Molke über SP XL Säule 25.03.2020), 9: Probe 48\* (Molke über SP XL Säule 25.03.2020), 10: Probe 49\* (Molke über SP XL Säule 25.03.2020), mit dem \* markierte Proben wurden nicht aufkonzentriert

In der oberen SDS-PAGE können die bisherigen Ergebnisse teilweise bestätigt werden. So konnte in den Durchbruchbereichen anhand der Banden 3 - 6 der Frontalchromatographien neben dem  $\beta$ -Lactoglobulin und dem  $\alpha$ -Lactalbumin auch noch größere Proteine nachgewiesen werden, was auch hier in den Banden zu sehen ist. Diese größeren Proteine zeigten sich im vorderen Bereich der SEC Chromatogramme. Entgegen der vorherigen Ergebnisse ist hier in den Banden 7 – 10 zu erkennen, dass hauptsächlich  $\alpha$ -Lactalbumin und größere Proteine im Elutionspeak der SP XL Säule zu finden sind.



**Abbildung 43: SDS-PAGE mit Silberfärbung**

1: 2. Durchlauf Probe 1 (Phosphat 26.02.2020), 2: 2. Durchlauf Probe 3 (Phosphat 26.02.2020), 3: 2. Durchlauf Probe 6 (Phosphat 26.02.2020), 4: 2. Durchlauf Probe 9 (Phosphat 26.02.2020), 5: Marker, 6: Probe 1 (25.03.2020), 7: Probe 2 (25.03.2020), 8: Probe 6 (25.03.2020), 9: Probe 12 (25.03.2020), 10: Probe 3 (Phosphat 26.02.2020)

Auch mit dieser SDS-PAGE zeigen sich die bereits angesprochenen Ergebnisse. Zudem sind an den Banden 6 – 10 zu sehen, dass sich im Durchbruchsbereich der unterschiedlichen Frontalchromatographien eine stärkere Bande von dem  $\alpha$ -Lactalbumin als vom  $\beta$ -Lactoglobulin zu erkennen ist. Diese Erkenntnis deckt sich mit allen SEC Durchläufen. Die Färbung dieses Gels war insgesamt sehr schwach ausgebildet, da die Silberfärbung etwas zu früh abgebrochen worden ist. Daher wurde ein Farbfilter über das Originalbild gelegt. Außerdem besteht durch das vorzeitige Abbrechen der Färbung die Möglichkeit, dass einige Banden noch nicht zu erkennen sind.

## 6. Zusammenfassung

Anhand dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die Herstellung einer selbstgebauten Minisäule möglich ist und dass diese auch einsatzfähig ist. Die durchgeführten Vorversuche dienten dazu, das Verhalten der beiden Proteine  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin zum einen in einer gekauften Säule und zum anderen in der selbstgebauten Säule zu untersuchen. Dabei wurden maximal vier verschiedene Puffersysteme zum Vergleich herangezogen. Bei der fertigen DEAE Säule zeigten sich minimale Unterschiede in Bezug auf das Retentionsvolumen bei den verschiedenen Puffern. Für das  $\beta$ -Lactoglobulin wurden etwas größere Retentionsvolumina im Phosphat- und MOPS Puffer im Vergleich zum Imidazolpuffer gefunden. Dies deutet darauf hin, dass der Zugang zum Porensystem in den zwei Puffern für das  $\beta$ -Lactoglobulin erleichtert wird. Beim  $\alpha$ -Lactalbumin konnte ein größeres Retentionsvolumen im Imidazol- und MOPS Puffer erkannt werden, sodass für dieses Protein dort die Adsorption an der Säule leichter erscheint. Die selbstgebaute Säule hat im Phosphatpuffer deutlich kleinere Retentionsvolumina für beide Proteine gezeigt. Dieses Erkenntnis lässt zunächst vermuten, dass der Zugang für die Proteine nicht so gut gewährleistet war. Jedoch wurde die Säule mit neuem Säulenmaterial aufgefüllt und konnte in den folgenden Frontalchromatographien erfolgreiche Ergebnisse liefern. Bei den Frontalchromatographien des Proteingemisches konnte mithilfe der SEC im Phosphat- und MOPS Puffer nachgewiesen werden, dass eine Verdrängung von  $\alpha$ -Lactalbumin durch  $\beta$ -Lactoglobulin über die Säule erfolgte. Daher wurden diese beiden Puffer für den anstehenden Hauptversuch ausgewählt. Die Hauptversuche zeigten, dass ein Teil der positiv geladenen Proteine durch die SP XL Säule aus der Molke abgetrennt werden konnte. Jedoch sind dabei auch ein gewisser Anteil von  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin verloren gegangen. Darüber hinaus konnte ein weiterer Verlust dieser beiden Proteine durch die Untersuchung des Pellets aus der Zentrifugation erkannt werden. Aufgrund dessen konnte nur bei dem 2. Durchlauf der Frontalchromatographie im Phosphatpuffer der gewünschte Verdrängungsprozess, wie er in den Vorversuchen zu sehen war, beobachtet werden. Damit eine noch genauere Aussage getroffen werden könnte, müssten diese Versuche häufiger durchgeführt werden. Dabei würden zusätzlich Modifikationen im pH-Wert oder auch in der Ionenstärke des Equilibrierungspuffers interessant sein. Aufgrund dieser Parameter könnte sich die Adsorption der Proteine an die Säule verbessern, wodurch wiederum der Verdrängungsprozess erfolgreicher ablaufen könnte. Außerdem könnte die erkannte Präzipitation der Proteine verringert werden, sodass weniger Produktverlust erreicht werden kann.

## 7. Literaturverzeichnis

### 7.1 Literaturquellen

- [1] – Protein Chromatography, WILEY-VCH Seiten 63 - 67, Giorgio Carta und Alois Jungbauer, 2010
- [2] – Ionenchromatographie 2.Auflage, VCH Seiten 2 f., 25 ff., Joachim Weiß, 1991
- [3] – Instrumentelle Analytik und Bioanalytik 3.Auflage, Springer Spektrum Seiten 101 f., 147 ff., 161 ff., Manfred H. Gey, 2015
- [4] – Reaktionssysteme zur Aufarbeitung und Umsetzung nachwachsender Rohstoffe – Einsatz chromatographischer Verfahren sowie Membran- und Festbettreaktoren zur Verarbeitung von Molke, Stärke und Cellulose, Logos Seiten 6 ff., Nils Tippkötter, 2010
- [5] – Skript zur Vorlesung Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren, Prof. Dr. Birger Anspach, 01/2018
- [6] – Deutsches Skript zur Vorlesung Protein Purification / Preparative Chromatography, Prof. Dr. Birger Anspach, 11/2017
- [7] – Dissertation „Biologische Denitrifikation von Molkekonzentrat mit nativen und immobilisierten Zellen von *Parococcus denitrificans*“, Dipl.-LMChem. Wipa Roikaew, 2017 unter [https://kluedo.ub.uni-kl.de/frontdoor/deliver/index/docId/5076/file/\\_Dissertation\\_Wipa+Roikaew.pdf](https://kluedo.ub.uni-kl.de/frontdoor/deliver/index/docId/5076/file/_Dissertation_Wipa+Roikaew.pdf)
- [8] – “Whey protein hydrolysate supplementation accelerates recovery from exercise-induced muscle damage in females”, Brown MA et al., 2018 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29106812>
- [9] – “Whey protein isolate supplementation improves body composition, muscle strength, and treatment tolerance in malnourished advanced cancer patients undergoing chemotherapy”, Emanuele Cereda et al., 2019 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6853834/>
- [10] – „Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography“, R.Hahn et al., 1996 unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528103>
- [11] – „Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin,  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin B and  $\beta$ -Lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography“, Xiuyun Ye et al., 2000 unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1357272500000637>
- [12] – “ $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications”, Taco Nicolai et al., 2010 unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11000415>
- [13] – „Technische Info Biologische Puffer“, Roth, 2016 unter <https://www.carlroth.com/medias/Infobroschuere-BiologischePuffer-DE.pdf?context=bWFzdGVyfHRIY2huaWNhbERvY3VtZW50c3w5ODc1ODJ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHRIY2huaWNhbERvY3VtZW50cy9oZjkvaGIwLzg5NzcyNzA4MDA0MTQucGRmfDQ3ZWQ4MTkzYzM1MDJmODc3Mjk1NzU1N2UyMmIwNjhlMTE0NDNjNzAzN2Y5YmViY2Y1NTFjZjgyYjBiMjMyNzc>



[28] – „RCSB Protein Data Bank“ unter <https://www.rcsb.org>

[29] – „Putnam Protein Calculator“ unter <http://protcalc.sourceforge.net/cgi-bin/protcalc>

[30] – Bachelor Thesis “Effect of Different Buffer Systems on the Breakthrough Curves of Bovine Serum Albumin and Ovotransferrin on Fractogel EMD DEAE (M) and Fractogel EMD TMAE Hicap (M)”, Joseph Ho Pin Yi, 2019

[31] – Studienprojekt “Einfluss von Puffersalzen auf das Adsorptionsverhalten von Ovalbumin am Anionenaustausch“, Salim Erdal, 2018

[32] - Merck Fractogel EMD TMAE Hicap (M) “Biochromatography Portfolio Guide (MM)“ unter [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Fractogel-EMD-TMAE-Hicap-M,MDA\\_CHEM-110316](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Fractogel-EMD-TMAE-Hicap-M,MDA_CHEM-110316)

[33] – vwr “Anion Exchange Chromatography Columns, HiTrap™ DEAE FF, GE Healthcare” unter <https://de.vwr.com/store/product/10616221/hitraptm-deae-ff-saulen>

## 7.2 Bildquellen

[1] - [http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/7/tc/adsorption/praktikum/einfuehrung/bilder/durchbr\\_kurve.gif](http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/7/tc/adsorption/praktikum/einfuehrung/bilder/durchbr_kurve.gif)

[2] - Merck “Fractogel EMD TMAE Hicap (M), Fractogel Chromatography Resin – Capture your Target with Speed and Efficiency” unter [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Fractogel-EMD-TMAE-Hicap-M,MDA\\_CHEM-110316#anchor\\_BRO](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Fractogel-EMD-TMAE-Hicap-M,MDA_CHEM-110316#anchor_BRO)

[3] – GE Healthcare Life Sciences “ÄKTA™ Laboratory-scale Chromatography Systems - Instrument Management Handbook” unter <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=16189>

## 8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht. Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Hamburg

\_\_\_\_\_

Ort, Datum, Unterschrift