



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

# PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **269 744 A3**

4(51) B 01 D 15/08

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

|      |                                                                                                                                                                                                           |      |          |      |          |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | WP B 01 D / 295 361 7                                                                                                                                                                                     | (22) | 17.10.86 | (45) | 12.07.89 |
| (71) | Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, Berlin, 1086, DD                                                                                                            |      |          |      |          |
| (72) | Ehwald, Rudolf, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Fuhr, Günter, Dr. sc. nat.; Olbrich, Matthias, Dipl.-Biol.; Göhring, Horst, Prof. Dr. sc. nat.; Knösche, Rüdiger, Dr. rer. nat.; Kleine, Rolf, Dr. sc. nat., DD |      |          |      |          |
| (54) | Verfahren zur Veränderung der Ausschlußgrenze bei der ausschlußchromatographischen Trennung und Reinigung von Kolloiden                                                                                   |      |          |      |          |

(55) Ausschlußchromatographie, Kolloide, vesikuläre Füllkörper, Ausschlußgrenze, irreversibel, reversibel, verändert  
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren, das zur ausschlußchromatographischen Reinigung von Kolloiden mit Hilfe bekannter, vesikulärer Füllkörper eingesetzt werden kann. Die kolloidalen Probebestandteile werden in eine permeationsfähige und eine ausgeschlossene Fraktion getrennt, wobei die Ausschlußgrenze der vesikulären Füllkörper durch Vorbehandlung und/oder die Wahl des chromatographischen Blutionsmittels irreversibel oder reversibel, in bestimmten Fällen auch selektiv, verändert werden kann.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Veränderung der Ausschlußgrenze bei der ausschlußchromatographischen Trennung und Reinigung von Kolloiden mit Hilfe von durch Enzymbehandlung und Extraktion aus pflanzlichen Gewebeteilchen hergestellten vesikulären Füllkörpern, **dadurch gekennzeichnet**, daß vor dem chromatographischen Lauf des zu fraktionierenden Stoffgemisches aus den vesikulären Füllkörpern zellwandgebundene Pektinstoffe durch kontrollierten basenkatalysierten Abbau der Polygalakturonsäureketten und durch ionenabhängige Pektinsolubilisierung mit an sich bekannten Methoden abgespalten und extrahiert werden und/oder daß beim chromatographischen Trennprozeß dem wäßrigen Elutionsmittel eine organische, mit Wasser mischbare Flüssigkeit mit geringerer Polarität als Wasser in einer Konzentration über 8 Vol.-% zugesetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die vesikulären Füllkörper vor dem chromatographischen Lauf mit einer basisch reagierenden Salzlösung behandelt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als organische Flüssigkeit Ethanol oder ein anderer einwertiger Alkohol, Aceton oder ein anderes Keton oder Acetonitril eingesetzt wird.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Veränderung der Ausschlußgrenze bei der Trennung und Reinigung kolloidaler Stoffe an vesikulären, aus pflanzlichen Gewebeteilchen hergestellten Füllkörpern. Es ist vor allem für die präparative Reinigung von polymeren Stoffen, z. B. Eiweißen, geeignet.

## Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Vesikuläre Füllkörper, ihre Herstellung durch Extraktion abgetöteter Pflanzenzellen und Zellaggregate und ihre Anwendbarkeit in der Ausschlußchromatographie sind bekannt (Ehwald, R. und Fuhr, G. DD 247 570). Sie sind im Unterschied zu den üblicherweise in der Ausschlußchromatographie eingesetzten Gelpartikeln aus Hohlkörpern mit dünner, poröser Wand aufgebaut. Extrahierte, durch Suspensionskultur aus Geweben höherer Pflanzen erzeugte Zellaggregate können als Füllkörper in der Säulenchromatographie eingesetzt werden und ermöglichen eine Gruppentrennung nach der größenabhängigen Permeationsfähigkeit gelöster Teilchen. Kennzeichnend hierfür ist das Fehlen des für die Gelchromatographie unvermeidlichen Fraktionierungsbereiches (vergl. Determann, G. Gelchromatographie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967) und eine ideale Gruppentrennung zwischen permeationsfähigen und ausgeschlossenen Probestandteilen (Ehwald, R.; Fuhr, G.; und Olbrich, M. Gruppentrennung durch chromatographische Dialyse an pflanzlichen Zellwänden. Chemische Technik 37, S. 400, 1985).

Ein Nachteil des bekannten Verfahrens zur ausschlußchromatographischen Kolloidtrennung mit Hilfe vesikulärer, aus Pflanzenzellen aufgebaute Chromatographie-Träger besteht darin, daß nur zwei Stoffgruppen (entsprechend der Ausschlußgrenze von etwa 5 nm, bezogen auf den Stokesschen Durchmesser) voneinander getrennt werden. Hierdurch werden die Vorteile des Verfahrens auf bestimmte Fälle beschränkt.

## Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines breit anwendbaren und ökonomischen Verfahrens zur präparativen Trennung und Reinigung von Kolloiden, das es ermöglicht, Stoffe mit geringen Unterschieden in der Teilchengröße ausschlußchromatographisch sicher und effektiv voneinander zu trennen.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe besteht in der Entwicklung eines Verfahrens zur Veränderung der Ausschlußgrenze von durch Enzymbehandlung und Extraktion aus pflanzlichen Gewebeteilchen hergestellten vesikulären Füllkörpern, mit dessen Hilfe präparative Kolloidtrennungen durch Ausschlußchromatographie mit diesen Füllkörpern für ein breites Spektrum kolloidaler Stoffe mit unterschiedlicher Teilchengröße und eine entsprechende Anpassung der Ausschlußgrenze an die Trennaufgabe ermöglicht werden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß aus den vesikulären Füllkörpern vor dem chromatographischen Lauf des zu fraktionierenden Stoffgemisches zellwandgebundene Pektinstoffe durch kontrollierten basenkatalysierten Abbau der Polygalakturonsäureketten und durch ionenabhängige Pektinsolubilisierung mit an sich bekannten Methoden abgespalten und extrahiert werden und/oder daß beim chromatographischen Trennprozeß dem wäßrigen Elutionsmittel eine organische mit Wasser mischbare Flüssigkeit mit geringerer Polarität als Wasser in einer Konzentration über 8 Vol.-% zugesetzt wird.

Hierzu werden in einer Variante der Erfindung die Gewebeteilchen vor der Präparation des Fließbettes vorübergehend in ein Medium gebracht, das die Ablösung von Pektinstoffen aus der primären Zellwand induziert. Bekanntlich wird die Abspaltung und Extraktion der Pektinstoffe aus der Zellwand durch die Ablösung der komplex sehr fest gebundenen mehrwertigen Kationen, vor allem Calcium-Ionen, bei höherer Temperatur durch die Anwendung verdünnter Säure (Hydrolyse) oder bereits bei Zimmertemperatur durch hohen pH-Wert und hohe Salzkonzentrationen ( $\beta$ -Eliminierung) erreicht. Aus der Literatur (z. B. Pilnick, V.; und Voragen, A. G. Polysaccharides and Food, Goordian 84/9 166-171, 1981) sind verschiedene Möglichkeiten für einen langsamen, kontrollierbaren Protopektinabbau ableitbar. Daher wird der Erfindungsanspruch nicht auf die in den Beispielen 1 und 2 dargestellten konkreten Verfahrensweisen begrenzt.

In einer zweiten Variante der Erfindung kann eine reversible Veränderung der Ausschlußgrenze an den aus pflanzlichen Gewebeteilchen hergestellten Füllkörpern chromatographisch genutzt werden. Methanol und Ethanol bewirken als Bestandteil des Elutionsmittels in ausreichender Konzentration ( $> 8\%$  bei Ethanol,  $> 12\%$  bei Methanol) eine deutliche reversible Vergrößerung der Ausschlußgrenze für Dextran (bezogen auf die Molmasse). Die in Beispiel 3 genannten einfachen Alkohole sind nicht die einzigen mit Wasser mischbaren organischen Flüssigkeiten, die vergrößernd auf die durch die kritische Molmasse bestimmte Ausschlußgrenze der Zellwand für Dextran wirken. Die Erfindung betrifft auch den in der Wirkung gleichen Einsatz anderer organischer Flüssigkeiten wie den wasserlöslichen Ketone, Nitrile, Äther, Amine oder organischer Säuren. Das hier dargestellte Verfahren, die Ausschlußgrenze vesikulärer Füllkörper durch Zumischung einer organischen Flüssigkeit zum Elutionsmittel reversibel zu vergrößern, kann zur Herstellung einheitlicher Polymerenfractionen effektiv ausgenutzt werden. Die Wirkung der organischen Flüssigkeiten auf die Hydrokolloide der Zellwand und der Probe ist nicht mit einem störenden Schrumpfen bzw. einer Verdichtung der vesikulär aufgebauten Füllkörper verbunden. Selbst reine organische Flüssigkeiten wie Ethanol oder Methanol können problemlos als Elutionsmittel verwendet werden. Ethanollösliche Stoffe werden an ethanolgesättigten Packungen in Form scharfer Banden eluiert. Trennstufenhöhen von etwa 1 mm können dabei leicht erreicht werden.

## Ausführungsbeispiele

### Beispiel 1

Zellkomplexe einer Suspensionskultur von *Chenopodium album* mit einem mittleren Durchmesser von ungefähr 250  $\mu\text{m}$  (vgl. Ehwald, R. und G. Fuhr, OS DE 3347512 A<sub>1</sub>, 1984) wurden mit 96% Ethanol entwässert, mit reiner Essigsäure und anschließend mit Aqua dest gewaschen. Danach wurden die Gewebeteilchen 2 Tage lang bei Zimmertemperatur in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7 mit einem Zusatz von 0,1% Trypsin zur Zellzucht (Firma Belger, Klein Machnow, DDR) und 0,1% Na<sub>3</sub> inkubiert. Dabei lösten sich die sichtbaren Protoplastreste in den Zellen auf. Anschließend wurden die Gewebeteilchen mit Aqua dest gewaschen, in Elutionspuffern (0,01–0,1 M Phosphatpuffer pH 5–7,5) suspendiert und in Chromatographiesäulen dicht gepackt. Es wurden Packungen mit Längen von 6–10 cm und Durchmesser von 0,5–3,8 cm verwendet. Eine gleichmäßige, dichte Packung wird erreicht, wenn das Elutionsmittel mit einer Lineargeschwindigkeit von etwa 3 mm min<sup>-1</sup> einige Zeit nach dem Sedimentieren der Füllkörper durch die Packung gedrückt oder gesaugt wird. Hierzu reichen Druckdifferenzen unter 0,05 MPa aus. Während der chromatographischen Trennung war die Packung mit Filterpapier abgedeckt, die Lineargeschwindigkeit der Elution, bezogen auf den gesamten Säulenquerschnitt betrug 0,5–2,5 mm min<sup>-1</sup>. Als Detektoren wurden 1. ein Perkin-Elmer-Polarimeter 141, 2. ein UV-Detektor Uvicord II (LKB) und 3. ein 78977 A RI-Detektor (Hewlett Packard) eingesetzt. Mit diesen Detektoren wurden keine signifikanten Veränderungen der Grundlinien bei Verwendung von Phosphatpuffern, Ethanol, Methanol oder Ethanol-Wasser-Gemischen festgestellt. An den genannten 6–10 cm langen Säulen ist eine vollständige ausschlußchromatographische Trennung ausgeschlossener größerer Kolloide (Dextrane, Polyethylenglykole, Proteine) von niedermolekularen Stoffen (Zuckern, Salzen, Farbstoffen) und auch kleineren Kolloiden (Inulin, Trypsin u. a. Proteine) möglich. Dextran 15 und Dextran 35 (kommerzielle Präparate mit einem gewissen Spektrum der Molmasse, Firma SERVA, Heidelberg, BRD) werden in 2 Hauptfraktionen gespalten. Das Elutionsprofil von Dextranen eignet sich zur Feststellung der Ausschlußgrenze. Aus der Rechromatographie der beiden durch die vesikulären Füllkörper voneinander getrennten Anteile des Dextrans 15 an einem geeichten Sephadexgel (G 75 superfine) läßt sich ableiten, daß die Ausschlußgrenze der vesikulären Füllkörper bei etwa 5 nm liegt, wenn reines Wasser oder Phosphatpuffer als Elutionsmittel eingesetzt wird. Eine Veränderung der Ausschlußgrenze durch die Behandlung mit dem pankreatischen Enzympräparat „Trypsin zur Zellzucht“ ist nicht nachzuweisen; die von Protoplastresten befreiten Füllkörper zeichnen sich jedoch durch eine verbesserte Trennschärfe und Packungsqualität aus. Für niedermolekulare Bestandteile der permeationsfähigen Fraktion lassen sich Trennstufenhöhen unter 0,5 mm erreichen.

Die mit Trypsin zur Zellzucht gereinigten Gewebeteilchen wurden bei Zimmertemperatur in einer alkalischen gepufferten Salzlösung (0,05 M Glycinpuffer pH 10/5 mM EDTA/ 0,5 M NaCl) für die Dauer unterschiedlicher Zeiträume geschüttelt, anschließend über ein Nylontuch abgefiltert, mit Aqua dest nachgewaschen und in eine gerührte 10 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben. Danach wurde die Veränderung der Ausschlußgrenze durch Chromatographie von Dextran 35 und Dextran 60 registriert. Dies wird in Fig. 1 verdeutlicht.

### Fig. 1:

Vergrößerung der Ausschlußgrenze der vesikulären Füllkörper mit zunehmender Dauer der Pektinextraktion, dargestellt an der chromatographischen Spaltung des Dextran 35 in die permeationsfähige Fraktion (Peak bei 90–100% des Packungsvolumens) und die ausgeschlossene Fraktion (Peak bei 40–50% des Packungsvolumens). Zeitangabe über den Chromatogrammen: Einwirkungsdauer des alkalischen EDTA-Puffers, Prozentangabe unter den Chromatogrammen: Elutionsvolumen in % des Packungsvolumens. Säulendurchmesser 2,5 cm, Packungshöhe 7–10 cm, Elutionsmittel: 0,1 M Phosphatpuffer pH 7, lineare Elutionsgeschwindigkeit etwa 2 mm min<sup>-1</sup> bezogen auf den gesamten Säulenquerschnitt, Detektor: Perkin-Elmer-Polarimeter 141 M.

Aus der in Fig. 1 dargestellten Verringerung des ausgeschlossenen Anteils am Dextran 35 nach Pektinextraktion ist die Vergrößerung der Ausschlußgrenze ableitbar.

Sie läßt sich in der geschilderten Weise durchführen, ohne daß die Einheitlichkeit der Vesikeln hinsichtlich ihrer Ausschlußgrenze verlorengeht. Der Charakter der für die Ausschlußchromatographie mit vesikulären Füllkörpern typischen idealen

Gruppentrennung mit sehr engem Fraktionierungsbereich bleibt erhalten. Daher können sehr selektive ausschlußchromatographische Proteintrennungen in verschiedenen Größenbereichen des Molekulargewichtes durchgeführt werden.

**Tabelle 1**

Zuordnung von Proteinen zur permeationsfähigen (+) oder zur ausgeschlossenen (–) Fraktion bei der Chromatographie mit vesikulären Füllkörpern, die für unterschiedliche Dauer mit der genannten alkalischen gepufferten Salzlösung behandelt wurden. +/–: permeationsfähig bei pH 5 und hoher Ionenstärke (0,3 M NaCl) und ausgeschlossen in 0,03 M Phosphatpuffer pH 7.

| 1<br>Protein                | 2<br>Molmasse | 3<br>Dauer der Einwirkung<br>der Extraktionslösung |     |         |
|-----------------------------|---------------|----------------------------------------------------|-----|---------|
|                             |               | 0                                                  | 90  | 300 min |
| Cytochrom C                 | 12 200        | +                                                  | +   | +       |
| Rindertrypsin               | 23 300        | +                                                  | +   | +       |
| Elastase I                  | 25 800        | +                                                  | +   | +       |
| alkal. Proteinase           | 28 000        | +                                                  | +   | +       |
| Malatdehydrogenase, Monomer | 33 500        | +                                                  | +   | +       |
| Thermolysin                 | 34 500        | +                                                  | +   | +       |
| Carboxypeptidase vom Rind   | 34 400        | +                                                  | +   | +       |
| Pepsin vom Schwein          | 35 500        | –                                                  | +/– | +       |
| Ovalbumin                   | 43 000        | –                                                  | +/– | +       |
| Rinderhämoglobin            | 64 400        | –                                                  | +   | +       |
| Humanserumalbumin           | 67 700        | –                                                  | –   | +       |
| Aldolase                    | 160 000       | –                                                  | –   | +       |
| Ferritin                    | 450 000       | –                                                  | –   | –       |

#### Beispiel 2

Wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden die Gewebeteilchen mit Trypsin behandelt. Dann wurden sie mit dem 3fachen ihres Volumens an 0,1 M EDTA-Lösung auf einem Nylontuch gewaschen und anschließend 48 h lang im etwa 5fachen ihres Volumens an 4% KOH bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach Abwaschen der Lauge durch Filtration auf Nylontuch wurden die Gewebeteilchen in eine 10 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gerührt mit Aqua dest nachgewaschen und wie in Beispiel 1 dargestellt, zur Chromatographie eingesetzt. Die Ausschlußgrenze der KOH behandelten Füllkörper (nach vollständiger Extraktion der Pektinstoffe) ist soweit vergrößert, daß nun Blue Dextran mit einer mittleren Molmasse von 2000 kD fraktioniert wird. An den in der beschriebenen Weise behandelten Füllkörpern wird Glykogen ausgeschlossen; Ferritin mit einem Molekulargewicht von etwa 450 kD wird dagegen in der permeationsfähigen Fraktion (über 90% des Packungsvolumens) eluiert.

#### Beispiel 3

Die Gewebeteilchen wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit Trypsin behandelt. Anschließend wurden sie zur Chromatographie eingesetzt (vgl. Beispiel 1), wobei zum Packen der Säule und auch als Elutionsmittel Gemische aus Phosphatpuffer und Alkoholen eingesetzt wurden, die zuvor durch das Vakuum einer Wasserstrahlpumpe gut entgast wurden. Die Ausschlußgrenze der Zellwandvesikeln für Dextranmoleküle wird durch Zumischung von Methanol und in noch stärkerem Maße durch Zumischung von Ethanol vergrößert. Dies zeigt sich daran, daß der Anteil der permeationsfähigen Moleküle des Dextran 35 bzw. des Dextran 60 im alkoholhaltigen Puffer wesentlich vergrößert wird. Der Einfluß der untersuchten organischen Flüssigkeiten ist vollkommen reversibel. Ethanol und Methanol können an den verwendeten Füllkörpern in jedem Mischungsverhältnis mit Wasser eingesetzt werden, wobei in allen Fällen eine gute Packungsqualität erreichbar ist. Bei Verringerung der Alkoholkonzentration ist ein erneutes Packen der Säulen nicht erforderlich.

#### Beispiel 4

Die Ausschlußgrenze der Zellwandvesikeln wurde, wie in Beispiel 1 erläutert, durch 90 min Einwirkung des EDTA-Puffers vergrößert. Wird als Elutionsmittel bei der anschließend durchgeführten Chromatographie 0,03 M Phosphatpuffer pH 7 verwendet, beträgt das Elutionsvolumen des Rinderhämoglobins (pK = 6,7, M = 64,4 kD) etwa 90 bis 95% des Packungsvolumens, dasjenige des Ovalbumin (pK = 5,5, M = 43 kD) bleibt dagegen bei 45 bis 55%. Unter den genannten Bedingungen wird Hämoglobin in der permeationsfähigen Fraktion, Ovalbumin dagegen in der ausgeschlossenen Fraktion eluiert, obwohl letzteres das geringere Molekulargewicht besitzt. Die Ursache für diese scheinbare Anomalie ist die stark negative Ladung des Ovalbumins, die sich hemmend auf seine Permeation durch das negativ geladene Protopektin der Zellwand auswirkt. Eluiert man das Ovalbumin am gleichen Material bei pH 5 in 0,3 M NaCl, wird sein Peak wie der des Hämoglobins bei 90 bis 95% des Packungsvolumens registriert (vgl. Tabelle 1, Beispiel 1).

