

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 156577 B



(21) Patentansøgning nr.: 3891/76

(51) Int.Cl.⁴ C 07 K 3/22

(22) Indleveringsdag: 27 aug 1976

(41) Alm. tilgængelig: 01 mar 1977

(44) Fremlagt: 11 sep 1989

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 28 aug 1975 FR 7526530 28 jul 1976 FR 7622985

(71) Ansøger: *RHONE-POULENC-INDUSTRIES; 22; Avenue Montaigne; Paris 8, FR

(72) Opfinder: Francois *Meiller; FR, Bernard *Mirabel; FR

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til separering af proteiner ved ionbytning

(56) Fremdragne publikationer

DK 156577 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til separering af proteiner ved ionbytning.

Det er kendt at separere proteiner ved ionbytning ved at anvende cellulose eller dextran, hvorpå er fixeret enten tertiære aminer eller kvaternære ammoniumforbindelser, eller syregrupper. Imidlertid har disse ionbyttere ikke mekanisk styrke, og som følge deraf kan de ikke anvendes i en kolonne, endvidere sker der ændringer i voluminet afhængigt af det anvendte mediums ionstyrke og pH. Iøvrigt er disse ionbyttere bionedbrydelige og kan ikke steriliseres.

De ionbytterharpikser, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, har ikke de ovenfor beskrevne ulemper, men har gode mekaniske egenskaber, er ikke følsomme over for det anvendte mediums ionstyrke og pH og er endvidere ikke biologisk nedbrydelige og kan steriliseres. Desuden gør disse ionbyttere det muligt at fremstille meget rene proteiner.

Ved den omhandlede fremgangsmåde til separering af proteiner bringes en proteinopløsning i kontakt med en ionbytterharpiks og denne ionbytterharpiks er ejendommelig derved, at den består af en porøs mineralsk bærer, der har en partikelstørrelsesfordeling mellem 4 μm og 5 mm, en specifik overflade på 5-150 m^2/g , en porediameter på 50-250 nm, et porevolumen på 0,4-2 ml/g, idet den porøse mineralske bærer er overtrukket med højst 15 mg/m^2 af en film af en tværbundet polymer, som indeholder eller bærer enten anionbyttergrupper repræsenteret ved tertiære aminer eller kvaternære ammoniumsalte, eller kationbytter-grupper repræsenteret ved syregrupper, og som har en ionbytterkapacitet på mindre en 2 mækv./g.

Som porøs mineralsk bærer kan anvendes metaloxider, såsom titanoxid, aluminiumoxider og især siliciumoxider. Disse bærere har middelporediametre på 50-250 nm og fortrinsvis 60-150 nm, en specifik overflade på 5-150 m²/g, fortrinsvis 20-50 m²/g og en partikelstørrelsesfordeling fra 4 µm til 5 mm. De valgte karakteristika afhænger af anvendelsesområdet. Således anvendes de fineste partikler til analytiske formål og de groveste partikler til præparative formål.

De funktionelle grupper, nemlig de tertiære aminer eller kvarternære ammoniumsalte repræsenteret ved de almene formler $\text{-CH}_2\text{-}\underset{\text{R}}{\text{N}}\text{-CH}_2\text{-}$ eller $\text{-CH}_2\text{-N}^{(+)}\text{-(R)}_3 \text{X}^{(-)}$, hvori R

er ens eller forskellige og betegner en alkyl- eller hydroxyalkylgruppe med 1-4 carbonatomer og X er en mineralsk eller organisk anion, som f.eks. chlorid, sulfat, nitrat, fosfat eller citrat.

De funktionelle syregrupper, såsom carboxylsyre, sulfonsyre eller fosfonsyre svarer til de almene formler -COOH , $\text{-SO}_3\text{H}$ og -PO(OH)_2 .

Disse funktionelle grupper udgør en del af kæden i den tværbundne polymer eller fikseret til den tværbundne polymer, der dækker hele bærerens overflade.

De tværbundne polymere, der dækker den mineralske bærers overflade, er i sig selv kendte produkter, der opnås ved kendte polymerisationsmetoder. De kan fremstilles ud fra monomere, der kan tværbindes i sig selv eller med en anden monomer eventuelt i nærværelse af en katalysator. Blandt disse monomere kan nævnes: epoxyforbindelser, der tværbindes med polyaminer som katalysatorer, monomere, der tværbindes ved polykondensation med formaldehyd uden

katalysator såsom urinstof, melamin, polyaminer og phenoler. Endvidere vinylmonomere, som f.eks. vinylpyridin, styren og derivater deraf, acrylsyrer, methacrylsyrer og vinylbenzoesyre, der tværbinder med polyfunktionelle monomere, såsom diacrylat eller dimethacrylat af mono- eller polyalkylenglycol, divinylbenzen, vinyltrialkoxysilan, vinyltrihalogensilan eller bis-methylenacryl-amid, i nærværelse af en initiator, der frigiver frie radikaler, såsom organiske peroxider og azonitriler, eller i nærværelse af ultraviolette stråler.

Når den mineralske bærer skal overtrækkes med den tværbundne polymer, imprægneres bæreren med en opløsning af en eller flere monomere og eventuelt katalysator i et opløsningsmiddel, der giver en god fordeling af monomere over hele den mineralske bærers overflade, hvorefter opløsningsmidlet afdampes og monomeren tværbindes på kendt måde. Som opløsningsmiddel kan anvendes alle produkter, der opløser monomere og katalysatoren, og hvis kogepunkt fortrinsvis er så lavt som muligt for at lette den påfølgende afdampning.

Disse opløsningsmidler er f.eks. methylenchlorid, ethylether, benzen, acetone, ethylacetat.

En fremgangsmåde, der særlig er egnet til fremstilling af en anionisk ionbytter, hvor bærerne overtrækkes med epoxyforbindelser er beskrevet i FR-A-2283101 (dansk ansøgning nr. 3870/75).

Når den tværbundne polymer på overfladen af den mineralske bærer ikke i kæden har funktionelle grupper som defineret ovenfor, er det nødvendigt at modificere den. Dette er nødvendigt, når der anvendes tværbundne polymere på basis af styren og derivater deraf, polymere

mellem formaldehyd og urinstof, melamin, polyaminer eller phenoler. Denne modifikation består, når det drejer sig om polymere af styren eller phenol-formaldehyd i på polymeren at fikse carboxylsyregrupper, sulfonsyregrupper, phosphonsyregrupper på i og for sig kendt måde, eller chlormethylgrupper, som herefter omsættes med en sekundær amin eller tertiær amin, og denne reaktion udføres også på i og for sig kendt måde.

For at fikse chlormethylgrupper til polymeren er det fordelagtigt, når det drejer sig om styrenpolymere, at dispergere den mineralske bærer, der er overtrukket med polymer, i chlormethylether. Dette skal foregå varmt og i nærværelse af en Lewis-syre. I modsætning hertil kan man, når det drejer sig om en phenolformaldehydharpiks, dispergere den mineralske bærer overtrukket med polymeren i epichlorhydrin og lade reaktionen foregå varmt.

Når det drejer sig om polymere af formaldehyd og polyaminer, urinstof eller melamin, består denne modifikation i at omdanne de primære aminer i kæden til tertiære aminer eller kvaternære ammoniumsalte på kendt måde f.eks. ved at omsætte med et sulfat eller et alkylhalogenid.

Ved påføring af overtrukket på den mineralske bærer skal den mængde monomer (s), der bringes i anvendelse, være sådan, at den mængde tværbundet polymer, der indeholder funktionelle grupper og som er fordelt over den mineralske bærers overflade, er mindre en 15 og fortrinsvis mellem 1 og 8 mg/m².

De således fremstillede mineralske bærere overtrukket med tværbundne polymere, der indeholder funktionelle grupper, har en ionbytterkapacitet mindre en 2 mækv./g

og fortrinsvis 0,3-1,2 mækv./g.

Den omhandlede fremgangsmåde er egnet til separering af alle proteiner, der er opløselige i vandigt medium uanset deres isoelektriske punkt.

Blandt disse proteiner, som også omfatter polypeptider og enzymer, kan f.eks. nævnes: albumin, lactalbuminer, ovalbumin, serumalbumin, hæmoglobin, α -, β - og γ -globuliner, lactoglobuliner, fibrinogen, urease, trypsin, lysozym, pepsin, protease og cytochrom.

Den omhandlede fremgangsmåde gør det muligt særdeles let at adskille proteiner fra de opløsninger, hvori de findes, såsom valle, øl, blod, organekstrakter og alle industrielle spildevand, slagteriaffaldsvand, spildevand fra levnedsmiddelindustrien og fra stivelsesfabrikker, og fremgangsmåden er således en metode til at rense disse spildevand og er derfor et middel til bekæmpelse af forureningen.

Separeringen udføres ved en temperatur, en ionstyrke og en pH der er forligelig med proteinet eller proteinerne, og opnås ved at bringe opløsningen, der skal behandles, i kontakt med ionbytterharpiksen, der vælges som funktion af separeringsbetingelserne. Der opnås således en fiksering på ionbytterharpiksen, enten af det søgte protein eller af andre proteiner i opløsningen eller af hele opløsningens proteinmængde.

Separeringen kan ligeledes opnås ved under de samme betingelser at bringe opløsningen i kontakt successivt med en eller flere anionbytterharpikser og/eller kationbytterharpikser. Der opnås således en selektiv fiksering af proteinerne fra opløsningen på hver harpiks.

I det tilfælde hvor et ønsket protein stammende fra en proteinopløsning eller en ikke-proteinholdig opløsning, fikseres på en harpiks, frasepareres den derefter ved eluering med en opløsning, der har et pH og/eller en ionstyrke, der er forskellig fra udgangsopløsningens, men som stadig er forligelig med proteinet. Der opnås således ikke blot en separering af proteinet fra opløsningen, men også en oprensning og koncentrering deraf. På denne måde kan man f.eks. separere og koncentrere albumin, pepsin, proteiner fra valle med en kationbytterharpiks og lysosym med en anionbytterharpiks.

I det tilfælde, hvor det ønskede protein forbliver i opløsning ved den omhandlede fremgangsmåde, og hvor de andre proteiner fikseres på ionbytteren, opnås der en separering af den ønskede protein fra de andre og således en oprensning. Eluering af de fikserede proteiner fører til en selektiv eller ikke selektiv adskillelse af nævnte proteiner og til en opkoncentrering af disse. Dette er f.eks. tilfældet når det drejer sig om γ -globulin under anvendelse af en anionisk harpiks.

Når flere forskellige ønskede proteiner fikseres samtidigt på en harpiks, medfører en eluering ved forskellige pH-værdier og/eller ionstyrker en separering af opløsningens proteiner og herved en opkoncentrering. Eluering med opløsninger med stigende pH og/eller ionstyrke giver foruden en selektiv separering en oprensning og koncentrering. Dette er især tilfældet ved humant serum.

I det tilfælde, hvor proteinerne skal fjernes fra en opløsning deraf, fikseres de til en harpiks. Der opnås

således opløsninger renses for protein. Eluering af de fikserede proteiner gør det muligt at genanvende harpiksen. Det er især tilfældet ved klaring af øl og ved behandling af opløsninger indeholdende hæmoglobin med kationbytterharpikser.

Separeringen kan udføres med identiske resultater både diskontinuerligt og kontinuerligt.

Ved kontinuerlig drift er de omhandlede ionbytterharpikser nemme at fylde i kolonnen, de har stor kapacitet og er lette at eluere.

De opnåede resultater er praktisk taget uafhængige af den behandlede opløsnings koncentration, men er afhængige af ionbytterharpiksens grupper, af pH, af ionstyrken og af kapaciteten samt af mængden af de opløsninger, der skal behandles og af elueringsopløsningen.

Den omhandlede fremgangsmåde kan anvendes inden for levnedsmiddelindustrien, især diætindustrien, den farmaceutiske og veterinærindustrien.

Følgende eksempler illustrerer nærmere opfindelsen:

EKSEMPEL 1

Fremstilling af ionbytterharpiks

100 g siliciumoxid med en kornstørrelsesfordeling på 100-200 μm , en specifik overflade på 24 m^2/g , en middelporediameter på 140 nm og et porevolumen på 1 ml/g tørres ved 150°C under reduceret tryk i 5 timer.

Det tørrede siliciumoxid sættes til en opløsning af 250

ml methylenchlorid, 60 ml destilleret styren, 20 ml vinyltriethoxysilan og 0,5 g azo-bis-isobutyronitril.

Methylenchloridet afdampedes ved stuetemperatur, hvorefter den imprægnerede siliciumoxid opvarmedes til 120°C i 6 timer under et tryk på 3 bar til opnåelse af tværbinding.

Den imprægnerede siliciumoxid suspenderes herefter i 300 ml xylen og opvarmedes til kogning i 2 timer. Efter filtrering vaskes siliciumoxidet med acetone og tørres herefter.

En analyse viser et kulstofindhold på 4 vægt-% i forhold til det overtrukne siliciumoxid.

50 g af det fremstillede siliciumoxid suspenderes i 180 g chlormethylether, indeholdende 6 g stannichlorid, hvorefter blandingen opvarmes til kogning under tilbagesvaling i 4 timer i et vandfrit medium.

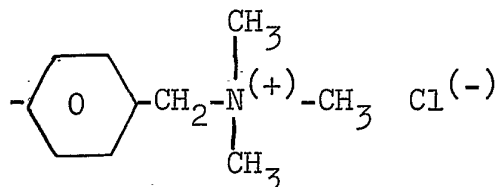
Efter afkøling tørres siliciumoxidet, vaskes med 200 ml af en blanding af dioxan og vand (50:50) indeholdende 10 ml saltsyre, hvorefter der vaskes med vand indtil neutral reaktion og endelig tørres produktet.

Kulstofindholdet er nu 4,1% og chlorindholdet er 1,90%.

Det opnåede produkt suspenderes i 150 ml af vandig 30% trimethylaminopløsning og henstår 8 dage ved stuetemperatur.

Efter tørring og vask, opnås en ionbytterharpiks med den

funktionelle gruppe



der har følgende analyse:

- carbon	4,8%
- chlor	2,0%
- nitrogen	0,9%
- mængde fikseret polymer	3,3 mg/m ²
- ionbytterkapacitet	0,5 mækv./g.

Behandling af en albuminopløsning

10 g af den fremstillede ionbytterharpiks anbringes i en kolonne med en diameter på 1 cm og harpiksen sammenpresses og indstilles til pH 6,5 med en 0,01 M phosphatpuffer.

En albuminopløsning på 1% i den samme puffer peroleres igennem kolonnen i en mængde på 180 ml/h indtil mætning af kolonnen, hvilket svarer til ca. 200 ml opløsning. Harpiksen vaskes herefter med 100 ml af nævnte puffer.

Den fikserede albumin elueres herefter ved udludning med en 1 M natriumchloridopløsning i samme puffer, hvor mængden er 180 ml/h. 45 ml af denne opløsning gør det muligt at udvinde albumin i en 3,3% opløsning.

Der konkluderes heraf, at ionbytteren har en albumin-kapacitet på 150 mg/g og at det er muligt at koncentrere en opløsning af albumin.

Den samme operation gentages 30 gange og der observeres ingen opkvældning eller slid på ionbytteren.

EKSEMPEL 2

Eksempel 1 gentages med en 0,2% albuminopløsning i stedet for en 1% løsning.

De samme resultater opnås, d.v.s. der opnås den samme albuminkoncentration, uanset hvilken udgangskoncentration, der anvendes.

EKSEMPEL 3

Eksempel 1 gentages idet proteinelueringen dog udføres med en 0,05 M citratpuffer ved pH 6,5. Der opnås 59 ml af en 2,5 vægt-% albuminopløsning. Dette forsøg viser indflydelsen af elueringspufferens art på koncentrationen af den opnåede opløsning.

EKSEMPEL 4

En albuminopløsning behandles på samme måde som i eksempel 1 idet der dog anvendes 41 g ionbytterharpiks i kolonnen og der anvendes en elueringshastighed på 80 ml/h i stedet for 180 ml/h.

Den opnåede albuminkoncentration var 7 vægt-%. Dette viser, at man ved at øge kolonnens højde og formindske elueringshastigheden kan øge den opnåede koncentration.

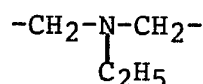
EKSEMPEL 5

Fremstilling af harpiks

I 150 ml methylenchlorid indeholdende 6,5 g N,N-bis-

(epoxy-2,3-propyl) ethylamin i opløsning og 3 g triethyltetramin, tilsættes 50 g siliciumoxid med en partikelstørrelse på 40-100 μm , en specifik overflade på 37 m^2/g , en porediameter på 110 nm og et porevolumen på 1,05 ml/g.

Methylenchloridet afdampes ved stuetemperatur. Silicium-oxidet imprægneres og opvarmes til 60°C i 60 timer til tværbinding af polymeren, hvorefter der vaskes med kogende vand og herefter med acetone. Den fremstillede ionbytterharpiks udgøres af siliciumoxid overtrukket med en tværbunden polymer, der har den funktionelle gruppe:



og har endvidere følgende sammensætning:

- carbon	8,8%
- nitrogen	2,4%
- fikseret polymermængde	3,3 mg/m^2
- ionbytterkapacitet	1 $\text{mækv.}/\text{g}$.

Separering af γ -globulin

10 g ionbytterharpiks anbringes i en kolonne som ovenfor og komprimeres. Harpiksen stabiliseres med 0,1 N salt-syre og herefter med 0,02 M fosfatpuffer med pH 6,5.

Der tilledes 20 ml af en affedt opløsning af humant serum lyofiliseret til 1 vægt-% i samme fosfatpuffer. Hastigheden var 100 ml/h. Harpiksen vaskes herefter med 50 ml af samme fosfatpuffer.

Opløsningen, der kom ud af kolonnen, indeholder i elektroforetisk ren tilstand γ -globulin fra udgangs-

opløsningen.

De andre proteiner: α -globuliner, β -globuliner, og albumin, der ligeledes var i udgangsopløsningen, er fikseret til harpiksen. De udvindes ved eluering med en 3M natriumchloridopløsning i samme phosphatpuffer.

Hvis elueringen udføres med puffer med varierende ionstyrke ved at øge natriumchloridkoncentrationen opnås opløsninger, beriget på α -globuliner, β -globuliner og albumin.

EKSEMPEL 6

Fremstilling af harpiks

Der gås frem som i eks. 5, idet dog siliciumoxidet har en kornstørrelsesfordeling på 100 - 200 μm , og der anvendes 6,5 g N,N-bis-(epoxy-2,3-propyl)butylamin i stedet for 6,5 g N,N-bis-(epoxy-2,3-propyl)ethylamin.

Den fremstillede ionbytterharpiks består af siliciumoxid overtrukket med en tværbundet polymer, der har den funktionelle gruppe $-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2-$ og med følgende sammensætning:

- carbon	9,2%
- nitrogen	2,5%
- fikseret polymermængde	3,2 mg/m^2
- ionbytterkapacitet	1,1 $\text{mækv.}/\text{g}$.

Extraktion af proteiner

10 g af den fremstillede ionbytterharpiks anbringes i førnævnte kolonne og komprimeres. Harpiksen indstilles successivt med 0,1 N saltsyre, hvorefter der indstilles

med 0,1 N phosphatpuffer med pH 7,5.

Herefter tilledes i en mængde på 80 ml/h, ialt 30 ml af en 1 vægt-% opløsning i samme phosphatpuffer af pulverformig ultrafiltreret mælkeserum, indeholdende 75 vægt-% protein. Harpiksen vaskes herefter med 100 ml af samme phosphatpuffer.

De udtagne opløsninger fra kolonnen indeholder fedtstoffet og lactosen, der var til stede i udgangsopløsningen.

Proteinerne, lactalbuminer, lactoglobuliner, serumalbumin og en ringe del immunoglobuliner, der var til stede i udgangsopløsningen, fikseres på harpiksen. Ved eluering med en 0,05 M Mac Ilvaine puffer med pH 4 opnås en udvinding af de separerede og oprensede proteiner.

EKSEMPEL 7

Extraktion af proteiner

20 g ionbytterharpiks som i eks. 1, men med en partikelstørrelsesfordeling på 200-500 μ m, anbringes i en kolonne med en diameter på 2,5 cm og komprimeres.

Harpiksen indstilles successivt med 0,1 N saltsyre og 0,01 M tris-HCl-puffer med pH 7.

Der gennemhældes med en hastighed på 300 ml/h en mængde på 600 ml af en opløsning dannet ud fra 300 ml af samme puffer og 300 ml affedt mælkeserum med 0,5 vægt-% opløselige proteiner. Harpiksen vaskes herefter med 100 ml af samme puffer.

Opløsningerne, der kommer ud fra kolonnen, indeholder lactose fra udgangsopløsningen.

Proteinerne, nemlig lactalbumin, lactoglobuliner, serumalbumin og en mindre del af immunglobuliner, der findes i udgangsopløsningen, er fikseret på harpiksen. De elueres ved at lede en natriumcitratpuffer på 0,1 M og pH 7 igennem kolonnen. Den opnåede opløsning indeholder den totale mængde fixeret protein i en koncentration på 4 vægt-%.

Fremgangsmåden gør det muligt at fremstille en blanding af rene proteiner fri for lactose og i en opløsning langt mere koncentreret end udgangsopløsningen.

Efter 30 successive forsøg kunne ældning af harpiksen ikke konstateres.

EKSEMPEL 8

Behandling af en pepsinopløsning

3 g harpiks som i eks. 1 anbragtes i en kolonne med en diameter på 1 cm.

Harpiksen vaskedes med 100 ml destilleret vand, hvorefter der gennemhældtes 150 ml af en rå pepsinopløsning med 20 pepsinenheder pr. ml i en mængde på 100 ml/h. Harpiksen vaskedes herefter med 20 ml destilleret vand.

Opløsningen, der kommer fra kolonnen, og vaskevandet indeholder ingen aktivitet. Al pepsinen er fikseret på harpiksen. Urenhederne forbliver i opløsningen, hvilket en måling af det tørre ekstrakt viser.

Den fikserede pepsin elueres herefter ved gennemledning af en 1 M natriumchloridopløsning i en mængde på 100 ml/h.

16 ml opløsning er nok til at udvinde pepsinen i en opløsning med 170 enheder pepsin pr. ml. Der kan således opnås en væsentlig koncentration af opløsningen. Harpiksen anvendes igen efter vask med 50 ml destilleret vand. Efter 10 successive forsøg kan ældning af harpiksen ikke konstateres.

EKSEMPEL 9

Fremstilling af ionbytterharpiks

100 g siliciumoxid med en partikelstørrelsesfordeling på 100-200 μm , og en specifik overflade på 25 m^2/g , en middelporediameter på 140 nm og et porevolumen på 1,1 ml/g imprægneres med en opløsning af 200 ml methylenchlorid, 24 g acrylsyre, 6 g diethylenglycoldimethacrylat og 0,4 benzoylperoxid.

Methylenchloridet afdampes ved stuetemperatur og atmosfæretryk indtil konstant vægt. Herefter opvarmes den imprægnerede siliciumoxid til 80°C i 6 timer til opnåelse af polymerisation.

Den fremstillede siliciumoxid suspenderes herefter i 300 ml vand og opvarmes til kogning i 6 timer. Efter filtrering vaskes produktet med acetone og tørres i vacuum ved 80°C.

Der opnås en ionbytterharpiks med funktionelle grupper af typen -COOH, med følgende sammensætning:

- carbonindhold	10,55 %
-----------------	---------

- fikseret polymermængde	7,2 mg/m ²
- ionbytterkapacitet	1,05 mækv./g

Behandling af en lysozymopløsning

10 g af den fremstillede ionbytterharpiks anbringes i en kolonne med en diameter på 1 cm og holdes komprimeret, hvorefter harpiksen bringes på NH₄-form ved gennemledning af 2 liter vandig 0,5 M ammoniumacetatopløsning indstillet med puffer til pH 8,2.

Herefter indstilles harpiksen til pH 6,5 med 100 ml 0,02 M tris-maleinsyre-puffer.

Der ledes en opløsning af 1 vægt-% lysozym i samme puffer igennem kolonnen i en mængde på 180 ml/h, indtil mætning af kolonnen. Dette svarer til ca. 200 ml opløsning. Harpiksen vaskes herefter med 100 ml af en tris-maleinsyre-puffer med pH 8,2.

Den fikserede lysozym elueres herefter ved gennemledning af en 1 M natriumchloridopløsning i samme puffer, i en mængde på 180 ml/h. 50 ml af opløsningen er nok til at udvinde lysozymet i en opløsning med en koncentration på 2,5 vægt-%.

Det kan konkluderes, at ionbytteren har en kapacitet med hensyn til lysozym på 125 mg/g, og at det er muligt at koncentrere en lysozymopløsning.

EKSEMPEL 10

Fremstilling af ionbytterharpiks

100 g siliciumoxid med en partikelstørrelsesfordeling på 100-200 µm, en specifik overflade på 37 m²/g, en

middelporediameter på 120 nm og et porevolumen på 0,95 ml/g imprægneres med en opløsning af 150 ml methylenchlorid, 60 ml destilleret styren, 20 ml vinyltriethoxysilan og 0,5 g azo-bis-isobutyronitril.

Methylenchloridet afdampes ved stuetemperatur og atmosfæretryk indtil konstant vægt, hvorefter det imprægnerede siliciumoxid opvarmes til 120°C i 6 timer til udvirkning af tværbindingen.

Produktet suspenderes herefter i 300 ml xylen og opvarmes til kogning i 6 timer. Efter tørring vaskes produktet i acetone og tørres ved 80°C.

50 g af det fremstillede modificerede siliciumoxid suspenderes i 500 ml chloroform, og der tilsættes dråbe for dråbe 50 g HSO₃Cl opløst i 50 ml chloroform. Der frigives saltsyredampe. Efter at tilsætningen er tilendebragt, omrøres blandingen og opvarmes til 50°C i 4 timer.

Efter tørring, vask med vand indtil neutral reaktion, herefter med acetone og tørring under vacuum ved 80°C opnås en ionbytterharpiks med en funktionel gruppe: -SO₃H, der har følgende sammensætning:

- carbonindhold	4 %
- svovlindhold	1,4 %
- fikseret polymermængde	2,8 mg/m ²
- ionbytterkapacitet	0,43 mækv./g

Extraktion af hæmoglobin

10 g af denne ionbytterharpiks anbringes i en kolonne med en diameter på 1 cm, hvorefter harpiksen indstilles til pH 6,5 med en 0,02 M fosfatpuffer. Der tilledes

500 ml af en 0,2 vægt-% hæmoglobinopløsning i samme puffer, i en mængde på 100 ml/h. Hæmoglobinen adsorberes på ionbytteren. Opløsningen udtaget fra kolonnen indeholder ikke hæmoglobin og er således renset.

Den adsorberede hæmoglobin elueres ved gennemledning af en 0,5 M ammoniumcarbonatopløsning, hvorefter kolonnen vaskes successivt med 300 ml 0,1 N natriumhydroxid og 50 ml 1 N saltsyre før anvendelse igen.

EKSEMPEL 11

Behandling af valle

20 g af en ionbytterharpiks analog med den i eks. 1, anbringes i en kolonne med en diameter på 2,5 cm (kolonne nr. 1).

10 g af en harpiks som i eks. 9. anbringes i en kolonne med en diameter på 2,5 cm (kolonne 2).

De to kolonner anbringes i serie, og harpiksindeholdene vaskes med 500 ml vand.

500 ml valle indstillet til pH 7,5 ved tilsætning af 0,1 N natriumhydroxid filtreres for at fjerne uopløselige bestanddele, og ledes herefter igennem kolonne nr. 1 og kolonne nr. 2 i en mængde på 300 ml/h.

En prøve på udfældning af proteiner med trichloreddikesyre viser, at valle, der kommer fra kolonne nr. 2, ikke mere indeholder protein. Harpiksindeholdene i de to kolonner vaskes ved gennemledning af 100 ml vand.

Proteinerne: Lactalbumin, lactoglobuliner, serumalbumin og en meget ringe del immunglobuliner, der findes i

udgangsopløsningen, er fikseret på harpiksen i kolonne nr. 1. De elueres som beskrevet i eks. 7.

Proteinerne fikseret på harpiksen i kolonne nr. 2 er især immunoglobuliner, der ikke er fikseret på harpiksen i kolonne nr. 1. De elueres ved gennemledning af en 1 M ammoniumcarbonatopløsning. Den opnåede opløsning indeholder immunoglobuliner i en koncentration på ca. 3 vægt-%. Immunoglobulinerne udgør ca. 16 vægt-% af hele udgangsopløsningens proteinmængde.

Kolonnerne vaskes herefter ved gennemledning af 500 ml vand før de anvendes igen.

Efter 10 successive forsøg kunne ældning af harpiksindholdene ikke konstateres.

EKSEMPEL 12

Extraktion af proteiner fra øl

60 g af en ionbytterharpiks som i eks. 9 anbringes i en kolonne med en diameter på 2,5 cm, hvorefter der vaskes med 250 ml vand.

3 liter øl, der ikke er klaret, hældes i en mængde på 100 ml/h igennem kolonnen. Øllet, der kommer ud af kolonnen, viser ikke noget bundfald ved tilsætning af picrinsyre, og har samme karakteristika som klaret øl.

Produkterne fikseret på harpiksen er især proteiner. De elueres ved gennemledning af 400 ml 0,1 N saltsyre.

Harpiksen vaskes ved gennemledning af 250 ml vand før anvendelse igen.

P a t e n t k r a v

=====

1. Fremgangsmåde til separering af proteiner, hvorved en proteinopløsning bringes i kontakt med en ionbytterharpiks, k e n d e t e g n e t ved, at ionbytterharpiksen består af en porøs mineralsk bærer med en partikelstørrelsesfordeling mellem 4 μm og 5 mm, en specifik overflade på 5-150 m^2/g , en porediameter på 50-250 nm, et porevolumen på 0,4-2 ml/g, hvilken bærer er overtrukket med højst 15 mg/m^2 af en film af tværbundet polymer, som indeholder eller bærer enten anionbyttergrupper, repræsenteret ved tertiære aminer eller kvaternære ammoniumsalte, eller kationbyttergrupper repræsenteret ved syregrupper, og som har en ionbytterkapacitet på mindre end 2 mækv./g.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den mineralske bærer er et metaloxid fortrinsvis titanoxid, aluminumoxider eller siliciumoxider.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at anionbyttergrupperne er repræsenteret ved formlerne $-\text{CH}_2-\underset{\text{R}}{\underset{|}{\text{N}}}-\text{CH}_2-$ eller $-\text{CH}_2-\text{N}^{(+)}-(\text{R})_3\text{X}^{(-)}$ hvor R , der kan være ens eller forskellige, betegner en alkyl eller hydroxyalkylgruppe med 1-4 carbonatomer, og X er en mineralsk eller organisk anion.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at kationbyttergrupperne er carboxylsyre-, sulfonsyre- eller phosphonsyregrupper.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den tværbundne polymer er fremkommet ved polymerisation af epoxyforbindelser i nærværelse af

polyaminer; ved polymerisation af blandinger af formaldehyd og urinstof, melamin, polyaminer eller phenoler; ved polymerisation af blandinger af vinylmonomere, såsom vinylpyridin, styren og derivater deraf, acrylsyre, methacrylsyre eller vinylbenzoesyre med polyfunktionelle monomere, såsom diacrylat eller dimethacrylat af mono- eller polyalkylenglycol, divinylbenzen, vinyltrialkoxysilan, vinyltrihalogensilan og bis-methylenacrylamid.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt og tegnet ved, at proteinerne, også omfattende polypeptider og enzymer, er repræsenteret ved albumin, lactalbuminer, ovalbumin, serumalbumin, hæmoglobin, α , β , γ -globuliner, lactoglobuliner, fibrinogen, urease, trypsin, lysozym, pepsin, proteaser og cytochrom.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt og tegnet ved, at proteinopløsningerne, der behandles, er repræsenteret ved mælkeserum, øl, blod, organextrakter og al slags industrispildevand.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt og tegnet ved, at et eller flere ønskede proteiner fikseres på ionbytterharpiksen, og herefter elueres.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt og tegnet ved, at det ønskede protein forbliver i opløsning, og at de andre proteiner fra opløsningen fikseres på ionbytterharpiksen.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt og tegnet ved, at alle proteinerne fikseres, og at opløsningen renses.