



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 251 080 A5

4(51) B 01 D 13/04

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP B 01 D / 284 926 4
 (31) 4069/84
 85/1706
 3247/85

(22) 20.12.85
 (32) 21.12.84
 06.03.85
 08.11.85

(44) 04.11.87
 (33) AT
 ZA
 AT

(71) siehe (72)

(72) Sleytr, Uwe B., Prof. Dr., 10 Parhamerplatz, A 1170 Wien; Sara, Margit, Dr., AT

(73) siehe (72)

(54) Verfahren zum Herstellen einer Struktur mit Membranen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Ändern der wirksamen Porenweite einer Struktur, insbesondere einer Ultrafiltrationsmembrane, die angewandt werden kann beispielsweise zur Gasseparation oder für Ionenaustauschverfahren. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens, das eine breitere Verwendungsmöglichkeit einer bestimmten Struktur zuläßt. Erfindungsgemäß wird die Porenweite an als Ultrafiltrationsmembranen geeigneten Strukturen mit an einem Träger fixierten Membranen aus kristallin angeordneten und intra- und intermolekular vernetzten Proteinmolekülen oder proteinhaltigen Molekülen, zwischen denen durchgehende Poren frei bleiben, wobei diese Moleküle insbesondere von Zell-Hüllen von Prokaryonten gewonnen werden, durch Änderung der Milieubedingungen, wie des pH-Wertes, der Ionenstärke oder der Ionenzusammensetzung geändert. Die Maßnahmen dienen insbesondere auch zum Einschließen bzw. Freigeben von Wertsustanzen in die bzw. aus den Strukturen. Die Wertsustanzen können gleichzeitig mit der Ausbildung der Struktur in diese eingeschlossen werden. Bei der Herstellung solcher Strukturen können auch Zellwandfragmente oder Zellhüllen eingesetzt werden, die – neben den Proteinschichten – die darunterliegenden Zell-Stüttschichten umfassen können.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zum Herstellen einer Struktur mit Membranen, die durchgehende Poren aufweisen, **gekennzeichnet dadurch**, daß Zellen von Mikroorganismen, insbesondere Zellen von Prokaryonten, die zumindest eine Zellwandschicht aufweisen, in der Proteinmoleküle oder proteinhaltige Moleküle aneinanderliegend miteinander verbunden und dabei längs einem Kristallgitter angeordnet sind, wobei in dieser Zellwandschicht zwischen den Molekülen gemäß einem Gitter angeordnete Poren frei bleiben, gegebenenfalls aufgebrochen und die Zell-Hüllen in Fragmente unterteilt werden, daß die — nach Entfernen des Zellinhalts sowie gegebenenfalls von anderen Zellwand- oder Membranlipidschichten verbleibenden Zell-Hüllen oder Zellwandfragmente, welche aus der oder den aus Proteinmolekülen oder proteinhaltigen Molekülen bestehenden Schicht(en) und gegebenenfalls aus den an diese angrenzenden Zellwandschichten bestehen, gegebenenfalls an oder in einem Träger an- bzw. eingebracht werden und daß — gegebenenfalls durch Behandlung mit mono- und/oder bifunktionellen Fremdmolekülen — die Moleküle dieser verbleibenden Zell-Hüllen oder Zellwandfragmente an reaktiven Gruppen substituiert und/oder über diese reaktiven Gruppen intramolekular und/oder miteinander und/oder mit dem Träger gegebenenfalls kovalent vernetzt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß von Zell-Hüllen von Mikroorganismen ausgegangen wird, welche als Zellwandschichten zwei aus Proteinmolekülen oder proteinhaltigen Molekülen aufgebaute Schichten und zwischen diesen, gegebenenfalls aus Peptidoglycan, Pseudomurein oder Zellulose bestehende Schichten aufweisen, daß diese Zellwandschichten in Form von Zellwandfragmenten an oder in dem Träger an- bzw. eingebracht werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß von Zell-Hüllen von Mikroorganismen ausgegangen wird, in welchen die die Schichten formenden proteinhaltigen Moleküle Glycoproteine sind.
4. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Mikroorganismenzellen osmotisch und/oder mechanisch, gegebenenfalls mit einer Zelmühle oder Ultraschall, und/oder durch Druckentspannung und/oder chemisch, gegebenenfalls mit einer French-Pressen bzw. enzymatisch, aufgebrochen werden.
5. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Träger eine poröse Schicht, gegebenenfalls ein Mikrofilter eingesetzt wird.
6. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Träger eine Hilfsschicht eingesetzt wird, welche gegebenenfalls vor Verwendung der Membran entfernt wird.
7. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Träger Körper aus ionotropen Gelen verwendet werden, die von den aufzubringenden Zellwandfragmenten allseitig umschlossen werden.
8. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Zellwandfragmente durch Aufsprühen und/oder Anschwemmen auf den Träger aufgebracht werden.
9. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Aufbringen der Zellwandfragmente auf den Träger unter Druck- und/oder Sogwirkung erfolgt.
10. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Zellwandfragmente auf den Träger mechanisch aufgepreßt werden.
11. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß die auf den Träger aufgetragenen Zellwandfragmente von einem weiteren Träger überlagert werden.
12. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß bei Verwendung von aus Polymeren bestehenden Trägern die Zellwandfragmente während des Polymerisations- und/oder Erstarrungsvorganges des Trägers in das sich porös ausbildende Trägermaterial eingebettet werden.
13. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 12, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Verbindung zwischen den Zellwandfragmenten und dem Träger durch eine gegebenenfalls oberflächige Hitzebehandlung verstärkt wird.

14. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Behandlung mit mono- und/oder bifunktionellen Fremdmolekülen durch Aufbringen von gasförmigen und/oder flüssigen Vernetzungsmitteln erfolgt.
 15. Verfahren nach Punkt 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Behandlung mit den gasförmigen oder flüssigen Vernetzungsmitteln zeitlich nacheinander erfolgt.
 16. Verfahren nach Punkt 14 oder 15, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Träger und/oder die Zellwandfragmente vor Aufbringen der letzteren auf den Träger mit den Vernetzungsmitteln behandelt und diese erst nach dem Aufbringen der Zellwandfragmente auf dem Träger aktiviert werden.
 17. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 16, **gekennzeichnet dadurch**, daß vor dem Aufbringen der Zellwandfragmente auf den Träger für eine kovalente Vernetzung und/oder nebenvalente Bindung bestimmte reaktive Gruppen des Trägers und/oder der Moleküle der Zellwandfragmente freigelegt und/oder eingeführt werden.
 18. Verfahren nach einem der Punkte 14 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß das kovalente Vernetzen der Zellwandfragmente mit dem Träger gleichzeitig mit dem kovalenten Vernetzen der Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Moleküle der aufgebrachten Zellwandfragmente erfolgt.
 19. Verfahren nach einem der Punkte 14 bis 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß vor dem Aufbringen des bzw. der Vernetzungsmittel(s) die auf den Träger aufgebrachten Zellwandfragmente mittels einer porösen Schutzschicht abgedeckt werden, welche gegebenenfalls nach Beendigung des Vernetzungsvorganges entfernt wird.
 20. Verfahren nach einem der Punkte 1, 14 und 15, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Zell-Hüllen nicht aufgebrochen, sondern die für den Aufbau der Struktur nicht benötigten Komponenten der Zellen, wie Cytoplasmamembran, Cytoplasma oder dgl. durch die Poren in den Zellhüllen herausgelöst werden.
 21. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 20, **gekennzeichnet dadurch**, daß durch Änderung der Milieubedingungen eine Änderung der die Porenform und Porengröße bestimmenden Konformation der Moleküle der Membranen und/oder eine Änderung der Ladungen an den Molekülen im Porenbereich der Membranen und damit eine Änderung der wirksamen Durchgangsweite der Membranen-Poren bewirkt wird.
 22. Verfahren nach Punkt 21, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Konformations- und/oder Ladungsänderung durch Änderung des pH-Wertes des die Struktur umgebenden Milieus bewirkt wird.
 23. Verfahren nach Punkt 21, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Konformations- und/oder Ladungsänderung durch Änderung der Ionenstärke und/oder der Ionenzusammensetzung des die Struktur umgebenden Milieus bewirkt wird.
 24. Verfahren nach Punkt 21, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Konformations- und/oder Ladungsänderung durch Änderung der Temperatur des die Struktur umgebenden Milieus bewirkt wird.
 25. Verfahren nach Punkt 21, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Konformations- und/oder Ladungsänderung durch Wechsel der Art der flüssigen Phase bewirkt wird.
 26. Verwendung einer gemäß einem Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 25 hergestellten Struktur, **gekennzeichnet dadurch**, daß sie verwendet wird als Ultrafilter oder als Trennorgan für eine Gasseparation oder als Trennorgan für ein Ionenaustauschverfahren, oder aber verwendet wird als Träger für andere semipermeable Membranen, die sich über Poren und/oder Zellwandfragmente der Struktur spannen, wobei gegebenenfalls diese anderen semipermeablen Membranen mit Proteinmolekülen oder proteinhaltigen Molekülen der Zellwandfragmente der Struktur über Carboxylgruppen und/oder Aminogruppen und/oder Sulfhydrylgruppen und/oder Hydroxylgruppen direkt oder über bifunktionelle Fremdmoleküle vernetzt sind, oder weiter verwendet wird als Trennmaterial für eine Durchdringungschromatographie, oder schließlich dazu verwendet wird, Wertsubstanzen, wie Enzyme, pharmazeutische Wirkstoffe, Pestizide oder dgl. ausbringbar einzuschließen.
 27. Verwendung nach Punkt 26, **gekennzeichnet dadurch**, daß diese anderen semipermeablen Membranen Hyperfiltrationsmembranen, gegebenenfalls Tensid- oder tensidartige Lipoid-Hyperfiltrationsmembranen, sind.
-

28. Verwendung nach Punkt 26, **gekennzeichnet dadurch**, daß diese anderen semipermeablen Membranen Trennorgane für eine Gasseparation sind.
29. Verwendung nach Punkt 26, **gekennzeichnet dadurch**, daß diese anderen semipermeablen Membranen Trennorgane für ein Ionenaustauschverfahren sind.
30. Verwendung nach Punkt 26, **gekennzeichnet dadurch**, daß diese anderen semipermeablen Membranen Trennorgane für ein Pervaporationsverfahren sind.
31. Verwendung nach Punkt 26, **gekennzeichnet dadurch**, daß diese anderen semipermeablen Membranen Lösungsdiffusionsmembranen sind.
32. Verwendung nach Punkt 26, **gekennzeichnet dadurch**, daß eine Struktur eingesetzt wird, die eine die Wertsubstanzen einschließende Hülle bildet, deren Oberfläche zum Teil durch Membranen der Struktur belegt und zum Teil mit einer undurchlässigen Schicht versehen ist.
33. Verwendung nach Punkt 26 oder 32, **gekennzeichnet dadurch**, daß eine Struktur eingesetzt wird, welche Membranen in Vesikelform aufweist.
34. Verwendung nach Punkt 33, **gekennzeichnet dadurch**, daß zum Einbringen der Wertsubstanzen in die Struktur die Poren der vesikulären Membranen durch eine Milieuänderung erweitert werden, die Wertsubstanzen anschließend durch die erweiterten Poren in das Innere der Vesikel eingebracht und danach diese Poren durch eine weitere Milieuänderung wieder verkleinert werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Ändern der wirksamen Durchgangsweite der Poren an einer insbesondere als Ultrafiltrationsmembrane geeigneten Struktur, die zumindest eine Membrane mit durchgehenden Poren umfaßt oder aus zumindest einer solchen Membrane gebildet ist, wobei sich die Membrane oder die Membranen, die sich längs ebenen, gekrümmten, zylindrischen oder vesikulären Flächen erstrecken, jeweils aus zumindest einer Schicht von aneinanderliegend miteinander verbundenen und dabei längs einem Kristallgitter angeordneten Molekülen, nämlich Proteinmolekülen oder proteinhaltigen Molekülen aufgebaut sind, wobei in diesen Schichten zwischen den Molekülen gemäß einem Gitter angeordnete durchgehende Poren frei bleiben, wobei gegebenenfalls diese Membranen an oder in einem gegebenenfalls porösen Träger gebunden bzw. eingebunden sind oder wobei gegebenenfalls sie zu einer selbsttragenden Folie vereinigt sind und wobei die Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Moleküle der Membranen — gegebenenfalls durch Fremdmoleküle — intra- und/oder intermolekular und/oder mit dem Träger vernetzt sind. Die Erfindung betrifft ferner eine vorteilhafte Verwendung dieses Verfahrens, Verfahren geeignet zum Herstellen einer solchen Struktur, sowie vorteilhafte Verwendungen der so hergestellten Struktur.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Eine Struktur der vorgenannten Art ist aus der EP-A2-0154620 bekannt. Die zum Aufbau dieser Struktur verwendeten Membranen werden dabei vorteilhaft aus Proteinmolekülen oder proteinhaltigen Molekülen, welche insbesondere von Zell-Hüllen von Prokaryonten abgetrennt wurden, durch einen als Selbstorganisation bezeichneten Rekristallisationsprozeß gebildet, danach z. B. auf oder in einem porösen Träger an- bzw. eingeschwemmt und schließlich einer chemischen Vernetzung unterworfen. Die wirksame Porenweite an den Membranen dieser Struktur liegt dabei insbesondere im Durchmesserbereich von 1 bis 200 nm (nanometer), vorteilhaft aber im Bereich von 1 bis 8 nm.

Bei Verwendung dieser Struktur als Ultrafiltrationsmembrane können scharfe Trennungen zwischen Molekülen mit geringem unterschiedlichen Molekulargewicht sowie höhere Durchflußraten erreicht werden als bei vorher bekannten Ultrafiltrationsmembranen. Der gewünschte Porendurchmesser wird dabei im wesentlichen durch die Auswahl des für die Membranherstellung verwendeten Mikroorganismus erreicht, deren Zell-Hüllen äußere Schichten, sogenannte S-Schichten (S-layers-surface layers) mit Poren mit in etwa dem angestrebten Porendurchmesser aufweisen. Dieser Porendurchmesser kann dabei noch durch Anlagerung von Fremdmolekülen an den Proteinmolekülen oder proteinhaltigen Molekülen, die in den Porenbereich hineinreichen, variiert werden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Ändern der wirksamen Porenweite der Membranen der obengenannten Struktur anzugeben, welches dann eine breitere Verwendungsmöglichkeit einer bestimmten Struktur zuläßt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahrensschritte und Reaktionsbedingungen für eine Änderung der wirksamen Porenweite aufzufinden.

Die Aufgabe wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Ändern der wirksamen Porenweite der Membranen der eingangs genannten Struktur gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, daß durch Ändern der Milieubedingungen eine Änderung der die Porenform und Porengröße bestimmenden Konformation der Moleküle der Membranen und/oder eine Änderung der Ladungen an den Molekülen im Porenbereich der Membranen und damit eine Änderung der wirksamen Durchgangsweite der Membranporen bewirkt wird. Dabei kann die Konformations- und/oder Ladungsänderung vorteilhaft durch Änderung des pH-Wertes, der Ionenstärke und/oder Zusammensetzung oder der Temperatur des die Struktur umgebenden Milieus und/oder vorteilhaft auch durch Wechsel der Art der flüssigen Phase bewirkt werden.

Die Erfindung betrifft ferner eine vorteilhafte Verwendung dieses erfindungsgemäßen Verfahrens zum Ändern der wirksamen Durchgangsweite der Poren einer insbesondere als Ultrafiltrationsmembrane geeigneten Struktur, die dadurch gekennzeichnet ist, daß es dazu verwendet wird, Wertsustanzen, wie Enzyme, pharmazeutische Wirkstoffe, Pestizide oder dgl. in der Struktur einzuschließen und/oder diese Wertsustanzen aus dieser Struktur auszubringen.

Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung dieser erfindungsgemäßen Verwendung wird eine Struktur eingesetzt, die eine die Wertsustanzen einschließende Hülle bildet, deren Oberfläche zum Teil durch Membranen der Struktur belegt und zum Teil mit einer undurchlässigen Schicht versehen ist.

Nach einer anderen vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verwendung wird eine Struktur eingesetzt, welche Membranen in Vesikelform aufweist.

Eine letzte vorteilhafte Ausgestaltung dieser erfindungsgemäßen Verwendung ist schließlich dadurch gekennzeichnet, daß zum Einbringen der Wertsustanzen in die Struktur die Poren der vesikulären Membranen durch eine Milieuänderung erweitert werden, die Wertsustanzen anschließend durch die erweiterten Poren in das Innere der Vesikel eingebracht und danach diese Poren durch eine weitere Milieuänderung wieder verkleinert werden.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zum Herstellen einer Struktur mit Membranen, die durchgehende Poren aufweisen, wobei Proteinmoleküle oder proteinhaltige Moleküle oder Fragmente von Schichten aus solchen Molekülen, die in diesen Schichten jeweils aneinanderliegend miteinander verbunden und dabei längs einem Kristallgitter angeordnete Poren frei bleiben, in Lösung bzw. Suspension gebracht werden, wonach durch Änderung der Milieubedingungen in der Lösung bzw. Suspension Bedingungen geschaffen werden, bei denen diese Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Moleküle und/oder die Schichtfragmente sich durch Selbstorganisation zu Membranen verbinden. Ein Verfahren dieser Art ist aus der EP-A2-0154620 bekannt. Dieses erfindungsgemäße Verfahren soll nun die Aufgabe lösen, bereits beim Herstellen der Struktur Wertsustanzen in der Struktur einzuschließen, die gegebenenfalls durch Vergrößerung der Porenweite an der Struktur kontrolliert freigegeben werden können.

Dieses erfindungsgemäße Verfahren ist nun dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung bzw. Suspension der Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Moleküle oder Fragmente von Schichten aus solchen Molekülen in Kontakt mit einer Wertsustanz gebracht wird, daß die Selbstorganisation der Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Moleküle längs der Oberfläche der Wertsustanz erfolgt und daß — gegebenenfalls durch Behandlung mit mono- und/oder bifunktionellen Fremdmolekülen — die Moleküle dieser Membrane an reaktiven Gruppen substituiert und/oder über diese reaktiven Gruppen intramolekular und/oder miteinander kovalent vernetzt werden. Dabei kann auch vorteilhaft eine Wertsustanz eingesetzt werden, die an oder in eine Trägersustanz oder einen Trägerkörper gebunden bzw. eingebunden ist.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zum Herstellen einer Struktur mit Membranen, die durchgehende Poren aufweisen der Art, wie sie in der EP-A2-0154620 beschrieben ist, wobei das erfindungsgemäße Verfahren weniger aufwendig sein soll als dieses beschriebene Verfahren.

Dieses Verfahren ist nun dadurch gekennzeichnet, daß Zellen von Mikroorganismen, insbesondere Zellen von Prokaryonten, die zumindest eine Zellwandschicht aufweisen, in der Proteinmoleküle oder proteinhaltige Moleküle aneinanderliegend miteinander verbunden und dabei längs einem Kristallgitter angeordnet sind, wobei in dieser Zellwandschicht zwischen den Molekülen gemäß einem Gitter angeordnete Poren frei bleiben, gegebenenfalls aufgebrochen und die Zell-Hüllen in Fragmente unterteilt werden, daß die — nach Entfernen des Zellinhalts sowie gegebenenfalls von anderen Zellwand- oder Membranlipidschichten — verbleibenden Zell-Hüllen oder Zellwandfragmente, welche aus der oder den aus Proteinmolekülen oder proteinhaltigen Molekülen bestehenden Schicht(en) und gegebenenfalls aus den an diese angrenzenden Zellwandschichten bestehen, gegebenenfalls an oder in einem Träger an- bzw. eingebracht werden und daß — gegebenenfalls durch Behandlung mit mono- und/oder bifunktionellen Fremdmolekülen — die Moleküle dieser verbleibenden Zell-Hüllen oder Zellwandfragmente an reaktiven Gruppen substituiert und/oder über diese reaktiven Gruppen intramolekular und/oder miteinander und/oder mit dem Träger gegebenenfalls kovalent vernetzt werden. Dabei kann vorteilhaft auch von Zell-Hüllen von Mikroorganismen ausgegangen werden, welche als Zellwandschichten zwei aus Proteinmolekülen oder proteinhaltigen Molekülen aufgebaute Schichten und zwischen diesen, gegebenenfalls aus Peptidoglycan, Pseudomurein oder Zellulose bestehende Schichten aufweisen, wobei diese Zellwandschichten in Form von Zellwandfragmenten an oder in dem Träger an- bzw. eingebracht werden.

Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird von Zell-Hüllen von Mikroorganismen ausgegangen, in welchen die die Schichten formenden proteinhaltigen Moleküle Glycoproteine sind.

Nach einer anderen vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Mikroorganismenzellen osmotisch und/oder mechanisch, gegebenenfalls mit einer Zelmühle oder Ultraschall, und/oder durch Druckentspannung und/oder chemisch, gegebenenfalls mit einer French-Presse bzw. enzymatisch, aufgebrochen.

In weiteren vorteilhaften Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens können als Träger

- eine poröse Schicht gegebenenfalls ein Mikrofilter eingesetzt werden und/oder
- eine Hilfsschicht eingesetzt werden, welche gegebenenfalls vor Verwendung der Membrane entfernt wird, oder
- Körper aus inotropen Gelen verwendet werden, die von den aufzubringenden Zellwandfragmenten allseitig umschlossen werden.

Gemäß noch anderen vorteilhaften Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens

- werden die Zellwandfragmente durch Aufsprühen und/oder Anschwemmen auf den Träger aufgebracht, und/oder es
- erfolgt das Aufbringen der Zellwandfragmente auf den Träger unter Druck- und/oder Sogwirkung, oder es
- werden die Zellwandfragmente auf den Träger mechanisch aufgepreßt.

Nach einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden bei Verwendung von aus Polymeren bestehenden Trägern die Zellwandfragmente während des Polymerisations- oder Erstarrungsvorganges des Trägers in das sich porös ausbildende Trägermaterial eingebettet.

Gemäß noch einer anderen vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Verbindung zwischen den Zellwandfragmenten und dem Träger durch eine, gegebenenfalls oberflächige Hitzebehandlung verstärkt.

Nach einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung ist das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung mit mono- und/oder bifunktionellen Fremdmolekülen durch Aufbringen von gasförmigen und/oder flüssigen Vernetzungsmitteln erfolgt. Dabei kann die Behandlung mit den gasförmigen oder flüssigen Vernetzungsmitteln vorteilhaft zeitlich nacheinander erfolgen.

In einer anderen vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden der Träger und/oder die Zellwandfragmente vor Aufbringen der letzteren auf den Träger mit den Vernetzungsmitteln behandelt und diese erst nach dem Aufbringen der Zellwandfragmente auf dem Träger aktiviert.

Gemäß einer noch anderen vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden vor dem Aufbringen der Zellwandfragmente auf den Träger für eine kovalente Vernetzung und/oder nebenvaleante Bindung bestimmte reaktive Gruppen des Trägers und/oder der Moleküle der Zellwandfragmente freigelegt und/oder eingeführt.

Nach einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt das kovalente Vernetzen der Zellwandfragmente gleichzeitig mit dem kovalenten Vernetzen der Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Moleküle der aufgetragenen Zellwandfragmente.

In einer anderen vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden vor dem Aufbringen des bzw. der Vernetzungsmittel(s) die auf den Träger aufgetragenen Zellwandfragmente mittels einer porösen Schutzschicht abgedeckt, welche gegebenenfalls nach Beendigung des Vernetzungsvorganges entfernt wird.

Gemäß einer letzten vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens schließlich werden die Zell-Hüllen nicht aufgebrochen, sondern die für den Aufbau der Struktur nicht benötigten Komponenten der Zellen, wie Cytoplasma, Cytoplasma oder dgl. durch die Poren in den Zell-Hüllen herausgelöst.

Die Erfindung umfaßt schließlich folgende erfindungsgemäßen Verwendungen der nach dem vorstehenden erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Struktur, nämlich

- die Verwendung der Struktur als Ultrafilter, oder als Trennorgan für eine Gasseparation oder als Trennorgan für ein Ionenaustauschverfahren;
- die Verwendung der Struktur als Träger für andere semipermeablen Membranen, die sich über Poren der Membranen der Struktur spannen, wobei gegebenenfalls diese anderen semipermeablen Membranen mit Proteinmolekülen oder proteinhaltigen Molekülen der Membranen der Struktur über Carboxylgruppen und/oder Aminogruppen und/oder Sulfhydrylgruppen und/oder Hydroxylgruppen direkt oder über bifunktionelle Fremdmoleküle vernetzt sind. Dabei können diese anderen semipermeablen Membranen vorteilhaft sein: Hyperfiltrationsmembranen, gegebenenfalls Tensid- oder tensidartige Lipoid-Hyperfiltrationsmembranen, oder Trennorgane für eine Gasseparation oder Trennorgane für ein Ionenaustauschverfahren oder Trennorgane für ein Pervaporationsverfahren oder Lösungsdiffusionsmembranen,
- die Verwendung als Trennmateriale für eine Durchdringungsschichtchromatographie, wobei die erzeugte Struktur aus nicht aufgebrochenen Zell-Hüllen besteht, aus der die nicht benötigten Komponenten herausgelöst und die verbleibenden Zell-Hüllen anschließend vernetzt wurden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen näher erläutert. Beschreibung einiger vorteilhafter Wege zur Ausführung der Erfindung.

Nachstehend wird zunächst gezeigt, wie anhand einer als Ultrafiltrationsmembrane einsetzbaren Struktur, deren Herstellung im Beispiel 2 der EP-A2-0154620 beschrieben ist, durch Änderung der Milieubedingungen eine Änderung der wirksamen Porenweite erzielt werden kann.

Diese Ultrafiltrationsmembrane enthält Membranen, die aus aneinanderliegenden Glycoproteinmolekülen aufgebaut sind, wobei jede der Membranporen von vier angrenzenden Glycoproteinmolekülen begrenzt ist. Es wird nun vermutet, daß, analog wie bei in Lösung befindlichen Proteinmolekülen, welche nur in zwei Zuständen, nämlich ganz entfaltet und ganz gefaltet bestehen, und sich durch eine Milieuänderung nur die Anzahl der sich in dem einen bzw. dem anderen Zustand befindlichen Moleküle ändert, die durch eine Milieuänderung bewirkte Änderung der Durchgangswerte der Membranporen auf einen ähnlichen Effekt beruht. Für die Konformation der Glycoproteine im Porenbereich und/oder die dort gebundenen Ladungen, besteht jeweils eine relativ kleine Zahl diskreter Zustände, deren Häufigkeiten von den Milieubedingungen, nämlich z. B. vom pH-Wert bzw. von der Ionenstärke abhängen. Dies könnte sich dann so auswirken, daß bei einer bestimmten Milieubedingung der größte Teil der Poren die kleinstmögliche Porenweite und bei einer anderen Milieubedingung der größte Teil der Poren die größtmögliche Porenweite aufweist. Für Filtrationen, zu deren Ergebnis nur die Poren der größten Porenweite wirksam sind, würde sich dann die wirksame Porendichte dieser größten Poren kontinuierlich mit den der Änderung der Milieubedingungen ändern.

Die nachstehend beschriebenen Filtrationsversuche bestätigen im Ergebnis diese Vorstellungen. Diese Versuche wurden jeweils in Aqua dest. sowie in verschiedenen Pufferlösungen, nämlich PBS (einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung), mit Sörensenpuffer (ein genau genormter Phosphatpuffer), mit 0,9% NaCl und mit 0,1 M CaCl_2 durchgeführt. Zur Erreichung eines Gleichgewichtszustandes mit der betreffenden Pufferlösung wurde die Ultrafiltrationsmembrane zunächst in dieser während 2 Stunden inkubiert. Die so vorbehandelten Ultrafiltrationsmembranen wurden dann für Filtrationsversuche in einer Ultrafiltrationseinrichtung, wie sie z. B. in Beispiel 1 anhand von Fig. 5 der obengenannten EP-A2-0154620 beschrieben ist, eingesetzt, und dabei — jeweils in derselben Pufferlösung wie für die Inkubation verwendet — das Rückhaltevermögen (%R) des Filters gegenüber Ovalbumin und Rinderserumalbumin (in der Folge BSA genannt) bestimmt. Außerdem wurden mit denselben Substanzen Vergleichsversuche in Aqua dest. durchgeführt. Alle Versuche erfolgten mit einem Filtermembran-Überdruck von $2 \cdot 10^5$ Pa und einer Proteinkonzentration von 0,8 mg Protein pro ml einer 80%igen Einengung des Retentats sowie jeweils unter denselben Rührbedingungen (300 Umdr./min). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt.

Rückhaltevermögen in R (%)					
Millieu	Aqua dest.	PBS	Sörensenp.	0,9% NaCl	0,1 M CaCl_2
pH	5,5	7,2	6,8	5,5	5,5
Ovalbumin (43 kD)	83–87	25–30	27	27	27
BSA (66 kD)	95–97	52–56	57	53	57

Wie die Tabelle zeigt, gehen gegenüber den Verhältnissen bei Aqua dest. die Werte des Rückhaltevermögens bei den verwendeten Pufferlösungen stark zurück und zwar weitgehend unabhängig von dem eingesetzten Puffer. Dabei fällt auf, daß — wie der Vergleich der Werte der ersten Kolonne mit denen der zwei letzten Kolonnen zeigt — der Einfluß des pH-Wertes hier offenbar wesentlich geringer ist als der der Ionenstärke.

Ähnliche Versuche, die mit einer Ultrafiltrationsmembrane, die auf Basis der *Bacillus stearothermophilus* 3c/NRs 1536 hergestellt wurde (siehe dazu Beispiel 1 der EP-A2-0154620), ergaben beim Austausch von Aqua dest. durch einen Puffer wie PBS und Sörensenpuffer wesentlich geringere Änderungen der Rückhaltevermögen. Sie betrugen hier nur etwa 7 bis 10%. Die Auswahl der Mikroorganismen, deren S-Schichten bzw. die durch Rekristallisation der Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Moleküle dieser S-Schichten erzeugten Membranen (die in der Folge so wie in der EP-A2-0154620 als P-Membrane bezeichnet werden) bei einer Änderung der Milieubedingungen für den Anwendungszweck optimale Änderung der wirksamen Porenweite zeigen, erfolgt zweckmäßigerweise durch Überprüfung der Eigenschaften einer größeren Anzahl von Mikroorganismen. In den nachstehenden Beispielen 1 und 2 werden nun vorteilhafte Verwendungen des vorstehend im Prinzip erläuterten Verfahrens zur Änderung der Porenweite beschrieben.

Beispiel 1

Bei diesem Beispiel kommt eine Ultrafiltrationsmembrane zur Anwendung, die auf Basis des *Bacillus stearothermophilus* PV72 wie in Beispiel 2 der EP-A2-0154620 beschrieben hergestellt ist. Es sollen nun die Proteine Carboanhydratase (30 kD), Ovalbumin (43 kD) und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (140 kD) durch Filtrationsvorgänge getrennt werden:

Diese Proteine liegen zunächst in Aqua dest. gelöst vor. In einem ersten Filtrationsschritt wird zunächst die Carbohydratase im Konzentrationsbetrieb abgetrennt, wobei die Carbohydratase in das Permeat gelangt, wogegen Ovalbumin nahezu vollständig und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase zur Gänze im Retentat bleibt. Das Retentat wird danach von Aqua dest. in PBS umgepuffert. In der so umgepufferten Lösung, in der das Rückhaltevermögen der Ultrafiltrationsmembrane gegenüber Ovalbumin von etwa 90% etwa 25% herabgesetzt ist, wird das Ovalbumin dann in einem weiteren Diafiltrationsschritt ausgewaschen, wobei Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase weiter im Retentat verbleibt und aus diesem dann gewonnen werden kann.

Beispiel 2

In diesem Beispiel wird die Herstellung von vesikulären durchgehenden Poren aufweisende Membranen beschrieben sowie das Einbringen von Wertsubstanzen in diese Vesikel.

Man geht dabei von Zahlen des Mikroorganismus *Bacillus stearothermophilus* (Stamm PV72) aus, oder von *Clostridium thermohydrosulfuricum* (Stamm L 111-69), dessen S-Schicht aus Glycoproteinen besteht und ein hexagonale Gitterstruktur (p6-Symmetrie) mit einer Periodizität von 14 nm und einer Porenweite in Aqua dest. von etwa 4 nm aufweist. 1 g Zellwandpräparationen werden mit 5 ml einer 5 M Guanidinhydrochloridlösung (in 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,2) 2 Stunden bei 25°C gerührt. „TRIS“ steht hier und in der Folge als Abkürzung für Tris(hydroxymethyl)aminomethan. Dabei lösen sich von der Oberfläche der Zellwände Glycoproteinmoleküle der sogenannten S-Schichten. Die so extrahierten Zellwände werden durch Zentrifugation (1 Stunde bei 20 000 g) sedimentiert, wobei die Glycoproteinmoleküle in Überstand verbleiben. Das Guanidinhydrochlorid wird nun aus dem die Glycoproteinmoleküle enthaltenden Extrakt durch Dialyse gegen Aqua dest. (pH 5,5) oder 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,2) entfernt, wobei es durch Selbstorganisation der Glycoproteine zur Ausbildung von vesikulären Membranen kommt. Diese in Aqua dest. suspendierten Membranvesikel werden dann mit 2%igem Glutaraldehyd als Vernetzungsmittel (in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2) bei 20°C während 2 Stunden behandelt. Dabei kommt es zu einer intra- bzw. intermolekularen Vernetzung der Glycoproteine.

Nach dem Auswaschen des Vernetzungsmittels sind die Membranvesikel für eine Beladung mit Wertsubstanzen verwendbar. Dazu werden die Membranvesikel in einer Lösung einer Wertsubstanz, z. B. in einer Lösung von 10 mg/ml eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 65 bis 70 kD in 0,9%iger Lösung von NaCl (pH 5,5) suspendiert. Unter diesen Milieubedingungen dringt die Wertsubstanz durch die nun erweiterten Poren der Membranvesikel in diese ein, bis sich ein Konzentrationsausgleich einstellt. Nach Abzentrifugieren der Vesikel (z. B. 1 Stunde bei 15000 g) werden diese in Aqua dest. (pH 5,5) resuspendiert. Durch diese gezielte Milieuveränderung von der NaCl-Lösung zu Aqua dest. kommt es zu einer Verkleinerung der wirksamen Porenweite an Membranvesikeln derart, daß die Wertsubstanz nicht mehr wieder aus den Poren austreten kann und so in den Membranvesikeln festgehalten wird. Für das Freisetzen der Wertsubstanz aus den Membranvesikeln werden diese wieder in ein Milieu verbracht, dessen Ionenstärke etwa denselben Wert aufweist, der die Beladung der Membranvesikeln mit der Wertsubstanz ermöglicht hat.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Ändern der wirksamen Porenweite einer Struktur, die Membranen mit durchgehenden Poren aufweist, kann auch vorteilhaft bei einer Struktur angewendet werden, die nach einem Verfahren hergestellt wurde, bei dem die Wertsubstanzen gleichzeitig mit dem Ausbilden dieser Struktur in- oder an diese ein- bzw. angebracht wurde. Das nachfolgende Beispiel 3 illustriert einen vorteilhaften Ausführungsweg dieses Verfahrens.

Beispiel 3

Zum Fixieren eines die Wertsubstanz bildenden Enzymproteins an einem Träger, wird als Träger ein Polyacrylamidgel, das an seiner Porenoberfläche freie Carboxylgruppen aufweist, eingesetzt. Dieser Träger wird zunächst durch Dicyclohexylcarbodiimid und N-Hydroxysuccinimid in einem wasserfreien Lösungsmittel wie Dioxan behandelt, wobei die Carboxylgruppen des Trägers aktiviert werden. Das Lösungsmittel samt den überschüssigen Reagentien wird dann ausgewaschen und der Träger in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,8) übergeführt. Danach werden pro 1 g Träger 10 mg des Enzymproteins zugegeben und 5 Stunden bei 20°C inkubiert, wobei das Enzymprotein über die aktivierte Carboxylgruppe des Trägers kovalent an diesem gebunden wird.

Aus einer Zellwandpräparation des Mikroorganismus *Clostridium thermohydrosulfuricum* (Stamm L 111-69) werden nach dem Ablösen der Glycoproteinmoleküle der S-Schicht dieses Mikroorganismus mit 5 M Guanidinhydrochlorid und Dialyse gegen *t*-qua dest. P-Membranen hergestellt. 10 mg dieser P-Membranen werden dann durch Zugabe von 10 ml 0,01 M HCl in ihre Glycoproteinmoleküle zerlegt und diese extrahiert. 10 ml dieses Extraktes werden mit 10 g des Trägers, an dem das Enzymprotein kovalent gebunden ist, vermischt und die Mischung bei 37°C gegen 10 mM CaCl_2 -Lösung dialysiert. Durch die dadurch erzeugte pH-Wertänderung bilden sich durch Selbstorganisation der Glycoproteine an der äußeren Oberfläche des Gelkörpers Membranen aus, die den Gelkörper und das an ihm fixierte Enzym umhüllen. Die so gebildeten Membranen werden dann, analog wie in Beispiel 2 beschrieben, intra- bzw. intermolekular vernetzt.

In dem nun folgenden Beispiel 4 seien nun vorteilhafte Ausführungswege eines neuen Verfahrens zum Herstellen von Strukturen beschrieben, die Membranen mit durchgehenden Poren aufweisen, nämlich Strukturen der Art, wie sie in der EP-A2-0154620 beschrieben sind, wobei bei diesen neuen Verfahren der Selbstorganisationsvorgang der Proteinmoleküle bzw. der proteinhaltigen Moleküle und der aus diesen Molekülen aufgebauten Schichtfragmente zur Bildung größerer Membranen (in der EP-A2-0154620 als P-Membranen bezeichnet) vermieden wird.

Beispiel 4

Intakte Zellen von *Bacillus stearothermophilus* PV72 mit einem Naßgewicht von 10 g werden in 40 ml TRIS-HCL-Puffer (50 mM, pH 7,2) suspendiert, und durch Einwirkung von Ultraschall aufgebrochen. Die Suspension wurde dabei zur Vermeidung autolytischer Prozesse in einem Eisbad gekühlt. Die Zellwandfragmente dieser Suspension wurden durch Zentrifugieren bei 20000 g pelletiert und der untere Teil des Pellets, der aus noch intakten Zellen besteht, resuspendiert und nochmals einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die in Suspension vorliegenden Zellwandfragmente werden dann durch Zentrifugieren bei 20000 g sedimentiert, resuspendiert und von ihnen die Cytoplasmamembran (eine Lipiddoppelschicht) mit 0,5% TRITON X-100 (in 50 mM TRIS-HCL-Puffer, pH 7,2) während 20 min bei 20°C desintegriert („TRITON X-100“ steht hier und in der Folge für Octylphenol-polyethylen-glycolether, einem milden Detergens), wonach die Zellwandfragmente mehrmals gewaschen werden. Die so gereinigten Zellwandfragmente bestehen nun aus der aus Glycoproteinmolekülen aufgebauten S-Schicht und der darunterliegenden Stützsicht aus Peptidoglycan. Die Größe der Flächenabmessungen dieser Zellwandfragmente wird elektronenmikroskopisch kontrolliert, sie sollen im Durchschnitt 500 nm betragen.

Mit Hilfe dieser Zellwandfragmente wird nun eine Ultrafiltrationsmembrane hergestellt, die im wesentlichen dieselben Eigenschaften besitzt wie die im Beispiel 2 der EP-A2-0154620 beschriebenen Ultrafiltrationsmembrane.

Als Trägermembrane für die herzustellende Ultrafiltrationsmembrane dient eine Nylonmikrofiltrationsmembrane Typ Ultrapor N₆₆, mit einem mittleren Porendurchmesser von 100 nm. Das Trägermaterial besitzt freie Amino- und Carboxylgruppen im Verhältnis 1:1. Um zusätzliche reaktionsfähige Amino- und Carboxylgruppen freizusetzen, wird die einzusetzende Mikrofiltrationsmembrane bei 50°C während 60 min einer Behandlung mit Salzsäure (3,6 N) unterzogen, mit Aqua dest. gewaschen und in eine Ultrafiltrationseinrichtung — ähnlich der wie in Beispiel 1 und anhand von Fig. 5 der EP-A2-0154620 beschrieben — eingelegt.

Das Aufbringen der Zellwandfragmente auf den Träger und in die Matrix des Trägers erfolgt — analog wie gemäß den Beispielen 1 und 2 der EP-A2-0154620 — durch einen Anschwemmvorgang. Dazu werden, um eine möglichst gleichmäßige Anschwemmung der Zellwandfragmente zu erzielen, 5 ml der Ausgangssuspension mit 50 ml Aqua dest. versetzt und in die Ultrafiltrationseinrichtung eingefüllt, wobei sich diese Suspension zunächst als Schicht über der eingelegten Mikrofiltrationsmembrane befindet. Über der Suspension wird nun durch Einleiten von Stickstoff ein Überdruck von $2 \cdot 10^5$ Pa aufgebracht, wodurch die flüssige Phase durch den Mikrofilter gepreßt und die Zellwandfragmente an oder in die Mikrofiltrationsmembrane mit einer Belegung entsprechend einer Proteinmenge von $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ an- bzw. eingeschwemmt werden.

Danach wird über einer im Oberteil der Ultrafiltrationseinrichtung angebrachten Düse mittels Preßluft von $3 \cdot 10^5$ Pa Überdruck als Vernetzungsmittel Glutardialdehyd (0,5 % in 0,1 M Natrium-Cacodylat-Puffer, pH 7,0) fein verteilt auf die auf den Träger deponierten Zellwandfragmente aufgesprüht. Da das Vernetzungsmittel nach dem Aufsprühen auf die Zellwandfragmente durch den aufgetragenen Überdruck kontinuierlich durch die Zellwandfragmente und die Mikrofiltrationsmembrane gepreßt wird, bildet sich über den Zellwandfragmenten kein stärkerer Flüssigkeitsfilm aus. Ein Vorteil dieser Art der Vernetzungsmittel-Aufbringung besteht darin, daß es in dem höchstens sehr dünnen Flüssigkeitsfilm kaum zu einer Wirbelbildung kommen kann, welche die auf dem Träger deponierten Zellwandfragmente bewegen und dabei ihre endgültige Fixierung stören könnte. Nach einer Sprüh- bzw. Vernetzungsdauer von 10 min wird die so hergestellte Ultrafiltrationsmembrane dreimal mit Aqua dest. gewaschen und die Trennkurve und die Durchflußrate — so wie in Beispiel 1 der EP-A2-0154620 beschrieben — bestimmt. Dabei zeigt sich, daß die Tatsache des Vorhandenseins der Peptidoglycan-Stützsicht auf das Trennverhalten der Ultrafiltrationsmembrane keinen Einfluß hat.

Gemäß einer vorteilhaften Variante dieses Beispiels werden als Ausgangsmaterial zur Herstellung einer Ultrafiltrationsmembrane intakte Zellen des Mikroorganismus *Clostridium thermohydrosulfuricum* (Stamm L 111-69) verwendet. Intakte Zellen dieses Mikroorganismus werden zunächst in 50 mM TRIC-HCL-Puffer (pH 7,2) übergeführt und in einer French-Press (French Pressure Cell Press) aufgebrochen. Dabei werden die in der Pufferlösung suspendierten Zellen unter hohem Druck komprimiert und erfahren dann beim Durchtritt durch eine Düse infolge der dabei eintretenden Druckentlastung eine plötzliche Expansion, die ein Zerreißen der Zellen zur Folge hat. Die so erhaltenen Zellwandfragmente werden durch dreimaliges Waschen mit der Pufferlösung von Zellinhaltsstoffen befreit und die Cytoplasmamembran durch Behandlung mit 1%igen TRITON X-100 in Aqua dest. während 30 min bei 37°C desintegriert. Die Zellwandfragmente werden dann von den Lipiden und anderen Verunreinigungen durch Zentrifugation getrennt und dann, analog wie in der ersten Variante dieses Beispiels beschrieben, weiterverarbeitet.

In der Folge werden einige vorteilhafte Varianten und Beispiele für einzelne Verfahrensschritte des erfindungsgemäßen Verfahrens angegeben.

Für die Auswahl und Vorbereitung der Träger:

Die Verwendung von Nylonmikrofiltrationsmembranen, bei denen die hydrolytische Schaltung der Peptidbindung von Nylon durch Behandlung mit HCl oder mit N,N-Dimethylpropandiamin erfolgt um eine Erhöhung der Anzahl der freien Amino- und/oder Carboxylgruppen an Nylon zu erzielen. Beispiele für solche Nylonmikrofiltrationsmembranen sind z. B. folgende Typen

- Pall Biodyne mit freien Amino- und Carboxylgruppen im Verhältnis 1:1;
- Pall Aminodyne mit freien Aminogruppen;
- Pall Carboxydyne mit freien Carboxylgruppen.

Für das Aufbringen der Zellwandfragmente auf eine Trägermembrane:

Eine Suspension der Zellwandfragmente in CH_3OH wird bei einer Temperatur von 50°C auf einem glatten Träger z. B. einer Glasplatte, aufgewalzt, wobei durch Verdampfen von CH_3OH eine Eindickung der Suspension auftritt, bis schließlich eine feuchte Schicht mit einer Dicke von maximal 200 nm auf den Träger zurückbleibt. Der so beschichtete Träger wird in eine mit Formaldehyd gesättigten Atmosphäre gebracht und etwa 30 min inkubiert, wobei eine intra- und intermolekulare Vernetzung der Zellwandfragmente eintritt. Der durch die Vernetzung der Zellwandfragmente entstandene zusammenhängende dünne Film löst sich durch vorsichtiges Aufsprühen von destilliertem Wasser (4°C) von dem Träger und kann dann in einer feuchten Kammer auf einen stabilen, grobporigen Träger, z. B. ein Mikrofilter übertragen werden.

Für die mechanische Fixierung der Zellwandfragmente an oder in dem Träger:

Auf die aktive, das heißt mit Zellwandfragmenten belegte Seite einer Ultrafiltrationsmembrane — hergestellt wie in Beispiel 1 — wird ein Agar (2 % in Aqua dest.) in flüssiger Form bei einer Temperatur von 40°C in einer Schichtdicke von 0,5 bis 2 mm aufgegossen. Durch Abkühlen auf 20°C tritt eine Erstarrung des Agars in Form einer Gelschicht ein. Diese Gelschicht bildet nun eine Schutzschicht für die Ultrafiltrationsmembrane und dient gegebenenfalls als Vorfilter für größere Verunreinigungen. Sie kann jederzeit z. B. nach Abnutzung oder einer Verschmutzung der Gelporen wieder abgezogen und erneuert werden.

Gemäß einer anderen Variante werden zum Herstellen einer Ultrafiltrationsmembrane intra- und intermolekular vernetzte Zellwandfragmente mit einer Mischung aus Acrylamid, Bisacrylamid, Starter und Beschleuniger suspendiert, und die Mischung in Form einer Schicht bei 20°C polymerisieren und gelieren lassen. Es bildet sich dabei ein poröser Träger aus, in dem die Zellwandfragmente eingebettet sind und der als Ultrafiltrationsmembrane verwendet werden kann.

Für die Bindung der Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Moleküle der Zellwandfragmente an den Träger:

Die freien Aminogruppen einer Trägermembrane werden mit Glutardialdehyd (5 % in 0,1 M Na-Boratpuffer, pH 8,0) als Vernetzungsmittel aktiviert. Nach den Anschwemmen der sich in Suspension befindlichen Zellwandfragmente an die Trägermembrane, z. B. durch die Sogwirkung eines (z. B. mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe erzeugten) Vakuums von 5 bis $6 \cdot 10^4$ Pa an der Unterdruckseite der Ultrafiltrationseinrichtung, tritt eine Bindung der Zellwandfragmente an die mit Glutardialdehyd aktivierten Aminogruppen der Trägermembrane ein. Die kovalente intra- und intermolekulare Vernetzung der Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Moleküle der Zellwandfragmente wird mit Hilfe von 2 % Dimethylsuberimidat in 0,1 M Triethanolamin, pH 8,7 durchgeführt.

Gemäß einer anderen Variante werden die freien Carboxylgruppen der Trägermembrane mit EDC abgekürzt für 1-Ethyl-3-(Dimethylaminopropyl)Carbodiimid (0,1 M, pH 4,75) aktiviert. Nach dem Entfernen des überschüssigen Agens und Stoppen der Reaktion mit 0,01 M Na-Acetatpuffer, pH 4,75, wird mit Aqua dest. gewaschen. Die im Aqua dest. suspendierten Zellwandfragmente werden nach Zugabe von Hexamethyldiamin und 0,1 M EDC durch Anlegen eines Vakuums von $5 \cdot 10^4$ Pa an der Unterdruckseite der Ultrafiltrationseinrichtung an die Trägermembrane angeschwemmt. Die Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Moleküle der Zellwandfragmente werden über die durch das EDC aktivierten Carboxylgruppen über Hexamethyldiamin als Brückenbildner intra- und intermolekular vernetzt und kovalent an die Trägermembrane gebunden. Durch eine solche kovalente Bindung der Zellwandfragmente mit der Trägermembrane wird die Stabilität der Ultrafiltrationsmembrane wesentlich erhöht; eine Abtragung der für die Ultrafiltration wesentlichen Zellwandfragmente durch mechanische Kräfte, wie sie z. B. in Cross-flow-Betrieb mit Anströmgeschwindigkeiten bis zu $7 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ auftreten, wird damit unterbunden.

Für die Vernetzung:

Bei der Verwendung von Vernetzungsmitteln in flüssiger Phase muß für den Vernetzungsvorgang das Vernetzungsmittel durch die Poren der Zellwandfragmente gepreßt werden, wobei die Gefahr besteht, daß die erzeugte Strömung die auf oder in dem Träger auf- oder eingebrachten Zellwandfragmente bewegt, wodurch ihre endgültige Fixierung auf dem Träger erschwert wird. Um dies zu vermeiden, kann eine Vernetzung bzw. Vorvernetzung vorteilhaft auch durch ein gasförmiges Vernetzungsmittel vorgesehen werden. Dazu wird als Träger eine Nylinmikrofiltrationsmembrane mit einer Porenweite von 100 nm in eine Ultrafiltrationseinrichtung eingesetzt. Die Zellwandfragmente werden durch Anlegen eines Vakuums von $5 \cdot 10^4$ Pa an der Unterdruckseite der Ultrafiltrationseinrichtung an oder in die Trägermembrane an- bzw. eingeschwemmt. In der Ultrafiltrationseinrichtung ist über der Trägermembrane ein Behälter mit Formaldehyd installiert. Für den Vernetzungsvorgang wird die Druckkammer der Ultrafiltrationseinrichtung zusammen mit dem Formaldehyd auf 80°C erwärmt. Der dabei verdampfende Formaldehyd, welcher bei dieser Temperatur neben seiner monomeren Form auch in oligomerer Form vorliegt, kommt nun mit den auf der Trägermembrane deponierten Zellwandfragmenten in Kontakt, wobei es insbesondere durch die oligomeren Formen des Formaldehyds, die wegen ihren größeren Kettenlängen größere Bereiche an den Oberflächen der Zellwandfragmente überspannen, zu einer intra- oder intermolekularen Vernetzung der Proteinmoleküle oder proteinhaltigen Molekülen der Zellwandfragmente sowie zu deren Bindung an die Trägermembrane kommt. Die Anwendung eines gas- oder dampfförmigen Vernetzungsmittels hat den Vorteil, daß es hier zu keiner Wirbelbildung kommt, die gegebenenfalls eine Bewegung der deponierten Zellwandfragmente hervorrufen und so ihre endgültige Fixierung auf der Trägermembrane stören könnte. Nach einer Vernetzungszeit von 2 Stunden wird der restliche Formaldehyd mit Aqua dest. 1. Std. ausgewaschen. Gemäß einer vorteilhaften Variante dieses Verfahrensschrittes kann zusätzlich und nach einer solchen Vernetzung mit Hilfe eines gas- oder dampfförmigen Vernetzungsmittels eine weitere Vernetzung mit flüssigen Vernetzungsmitteln stattfinden. Dazu werden diese flüssigen Vernetzungsmittel vorteilhaft auf die vorvernetzten Zellwandfragmente aufgetropft und durch deren Poren bzw. durch die poröse Trägermembrane hindurch ein an der Rückseite der Trägermembrane erzeugtes Vakuum abgesaugt. Dabei kommt es zu keiner mechanischen Beeinträchtigung der Zellwandfragmente. Als flüssige Vernetzungsmittel, die vorteilhaft nach einer Vorvernetzung durch Formaldehyd eingesetzt werden, kommen z. B. Dimethylsuberimidat (Angriff auf die $-NH_2$ -Gruppen im Protein) oder EDC (zur Vernetzung über $-COOH$ -Gruppen im Protein) in Frage.

In dem nachstehenden Beispiel 5 wird eine Struktur mit vesikulären Membranen beschrieben, die aus Zell-Hüllen von Mikroorganismen hergestellt werden, ohne daß es zu einem Aufbrechen der Zell-Hüllen kommt.

Beispiel 5

Intakte Zellen des Mikroorganismus *Bacillus stearothermophilus* NRS 1536 (10 g Naßgewicht) werden in 50 ml 1 % TRITON X-100 in 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7,2) suspendiert und die Suspension 30 min bei 37°C gerührt. TRITON X-100, ein mildes nicht ionisches Detergens, dringt infolge des Konzentrationsausgleiches durch die Poren der S-Schicht und der darunterliegenden zelleigenen, aus Peptidoglycan bestehenden Stützsicht in die Zelle ein und zerstört dort die an die Peptidoglycanschicht anschließende Cytoplasmamembran. Da die Cytoplasmamembran die hauptsächliche Diffusionsbarriere der Zell-Hülle darstellt, können nun nach deren Zerstörung die Inhaltsstoffe der Zelle nach außen diffundieren. Die Zellen werden nach der Behandlung mit TRITON X-100 bei 20000 g zentrifugiert, zur Zerstörung von noch vorhandenen Cytoplasmamembranresten während 10 min bei 60°C einer weiteren Extraktion mit TRITON X-100 unterzogen, und neuerlich bei 20000 g zentrifugiert. Die so präparierten Zellwandhüllen werden dann vier aufeinanderfolgenden Waschschritten unterzogen, die jeweils durch Rühren der Zellwandhüllen in Aqua dest. während 10 min und einer anschließenden Zentrifugation bei 20000 bestehen. Zum Abbau von noch vorhandenen Zellinhaltsstoffen wie Ribosomen und Nucleinsäuren werden einer Suspension der gewaschenen Zellwandhüllen in 40 ml Aqua dest. 2 mg Rubonuclease und 2 mg Desoxyribonuclease zugefügt, und 20 min bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Suspension wird dann bei 20000 g zentrifugiert und die Zellen dann einigen Waschschritten mit Aqua dest. unterworfen.

Die so erhaltenen Zellwandhüllen werden nach Zentrifugation bei 20000 g in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,5) resuspendiert, wonach — unter Rühren — zu 10 ml dieser Suspension 100 mg eines Vernetzungsmittels, z. B. Dunethylsuberimidat, zugeführt wird. Nach einer Reaktionsdauer von 60 min bei 20°C werden die vernetzten Zellwandhüllen durch Zentrifugation bei 20000 g gewonnen, mit Aqua dest. gewaschen und können, ähnlich wie in Beispiel 2 erläutert, mit Enzymproteinen als Wertsustanzen beladen werden.

Vorteilhafte Verwendungen der erfindungsgemäßen Verfahren und der durch ein erfindungsgemäßes Verfahren hergestellten Struktur, die gewerblich bedeutsam sind.

Einige vorteilhafte Verwendungen der erfindungsgemäßen Verfahren und der durch die erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Strukturen sind in den vorstehend beschriebenen Beispielen erwähnt. Diese Strukturen, insbesondere solche, deren Herstellung anhand von Beispiel 4 samt dessen Varianten und von Beispiel 5 erläutert ist, können vorteilhaft in derselben Weise verwendet werden, wie es schon in der EP-A2-0154620 eingehend beschrieben wurde.