

Entwicklung eines industriell einsetzbaren  
chromatographischen Trennverfahrens zur Gewinnung von  
Raffinose aus Melasse

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Ingrid Langwost

geboren am 02.02.1968 in Bielefeld

Hannover, im Mai 2002

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl

Tag der Promotion: 10.06.2002

Ich versichere an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, 02. Mai 2002

---

Ingrid Langwost

## **Meinen Eltern**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 1997 bis August 2001 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper durchgeführt. Ihm danke ich für die interessante Themenstellung, die freundliche Unterstützung sowie die mir gebotenen guten Arbeitsmöglichkeiten.

Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Dem Industriepartner Amino GmbH, Frellstedt, danke ich auf diesem Wege für die Zusammenarbeit und die geleisteten Vorarbeiten.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Roland Ulber für die Projektkoordination im BioRegion-Projekt "Vom Rohstoff zum Wertstoff".

Vielen lieben Menschen möchte ich auf diesem Wege meinen besonderen Dank aussprechen:

- Den "Mitstreitern" Andrea, Sigune und Nils, die zusammen mit mir in der Stunde Null angefangen, und die mir dann bei passender Gelegenheit den notwendigen Ansporn gegeben haben.
- Den "Spielern" Hetti, Gunnar, HC und Jutta, die mir beigebracht haben, daß Einfallswinkel nicht immer gleich Ausfallswinkel ist und daß es immer von Vorteil ist, wenn man den "Papst" in der Tasche hat.
- Den "Privaten" Jessica, Michael, Kirsten, Rudolf, Bine-HH und Bine-HB, die immer wieder beweisen, daß gute Freunde das Wichtigste im Leben sind.
- Der alten "IS-Labor-Besatzung", vor allem Katja, Klaus und Carsten, die mich nicht nur in der Anfangsphase unterstützt haben und für die der Begriff "Kontakt halten" keine graue Theorie ist.
- Den beiden "Molke-Mastern", Torsten, der immer wußte, was mir gerade fehlt, und Kerstin (Made), die ein Lichtblick im MCM-Labor wurde.

Diese Arbeit wäre mir viel schwerer gefallen, wenn Martina Weiß nicht am TCI wäre. Ihr gilt mein ganz herzlicher Dank dafür, daß ich immer zu ihr kommen konnte, wenn es um die "Standardanalytik HPLC", um die Betreuung des Strömungsmessungs-Versuches oder um Anwenderfragen von CorelDraw ging.

Bedanken möchte ich mich auch noch einmal bei meinem Korrekturleserinnen-Trio Birgit, Katja und Kerstin, die jede auf ihre Art und Weise der Arbeit den letzten Schliff gegeben haben.

Dank sagen möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern, die mich lange Zeit finanziell unterstützt haben und meinen Geschwistern, die für mich gerade in schweren Zeiten da waren.

---

## Kurzfassung

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit besteht darin, mittels chromatographischer Verfahren einen neuen Weg zur Isolierung von Raffinose aus einer Fraktion der Melasse-Aufarbeitung zu entwickeln. Bei der im industriellen Maßstab durchgeführten Melasseentzuckerung der Firma Amino GmbH, Frellstedt, ist eine Isolierung des Kohlenhydrates Raffinose zur Zeit nicht möglich. Das wesentliche Ziel dieser Arbeit liegt in der Lösung des Trennproblems Saccharose – Raffinose. Anwendung fanden zum einen die immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie, zum anderen unterschiedliche Trägermaterialien für die Gel-Chromatographie.

Zur Auswertung der Trennversuche wurde eine geeignete Analytik entwickelt. Die Bestimmung beider Zucker erfolgte mit einer HPLC-Analysenmethode mit einer Aminosäule und einem Acetonitril-Wasser-Gemisch als Eluent. Die Methode war auch bei sehr unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen beider Analyten und bis in hohe Konzentrationsbereiche gut geeignet. Jedoch wurde die Trennleistung bereits von geringen Salzkonzentrationen stark beeinflusst. Die verwendete HPLC-Methode war daher nur für die Untersuchung von salzarmen Proben geeignet.

Die durchgeführten Versuche zeigten, daß die Metall-Affinitäts-Chromatographie nicht zur Separation dieser beiden Zucker geeignet ist.

Mit dem Prinzip der Gel-Chromatographie wurden Dextran- und Polyacrylamid-Materialien in Bezug auf ihre Eignung für eine Saccharose/Raffinose-Trennung untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß sich auch kleine Saccharide gut mit Hilfe der Gel-Chromatographie trennen lassen. Die untersuchten Sephadex-Materialien zeigen jedoch nur eine ungenügende Trennleistung.

Deutlich bessere Ergebnisse konnten mit synthetischen Trennmaterialien (Bio-Gel P-2 sowie Toyopearl-HW 40-S) erzielt werden. Das sehr weiche Bio-Gel-Material zeigte bei sehr geringen Flußraten eine chromatographische Auflösung um 0,5; jedoch sind die Elutionszeiten mit fast vier Stunden für eine industrielle Anwendung zu lang. Der Vorteil dieses Materials liegt in einer teilweisen Decolorierung der Zuckerfraktionen.

Das Toyopearl-Material eignet sich gut für eine Trennung von Saccharose und Raffinose. Die erreichte chromatographische Auflösung von 0,7 ist auch bei hohen, industriell nutzbaren Flußraten reproduzierbar. Das Erhöhen der Versuchstemperatur auf 70 °C führte zu deutlich verbesserten Werten bei der Auflösung (bis  $R = 0,83$ ). Ein technischer Einsatz dieses entwickelten Verfahrens ist daher möglich.

Schlagworte: Raffinose, Melasse, Chromatographie

## **Abstract**

The objective of this thesis was to develop a chromatographic method to separate raffinose from a fraction obtained during the recycling of molasses. Currently, the isolation of the carbohydrate raffinose during this separation process is not possible. The project was done in close collaboration with Amino GmbH, Frellstedt. To solve the main problem, the separation problem of sucrose and raffinose, immobilized metal affinity chromatography and gel chromatography using different matrices was tested.

A suitable analytical method was developed to assess the suitability of the investigated methods. The detection of both sugars was performed by HPLC with an amino-column and an acetonitrile-water mixture as eluant. The method was found to be suitable for different concentration ratios of the analytes as well as a large concentration range. This HPLC method is only suitable for samples with low salt content as salt in the samples strongly affected the separation.

The metal affinity chromatography was found not to be suitable for the separation of these saccharides.

Dextran and polyacrylamide were the gel chromatography materials tested for their ability to separate sucrose and raffinose. The results show that saccharides with low molecular weight can be separated well by gel chromatography. Sephadex as the third tested material showed only poor separation.

Better results were obtained using synthetic separation matrixes (Bio-Gel P-2 and Toyopearl-HW 40-S). At very low flow rates, the soft Bio-Gel material showed a resolution factor of 0,5 and lead to a partial decoloration of the sugar fractions. However, the elution time of nearly four hours made it not suitable for an industrial application. The Toyopearl material showed very good results for the separation of sucrose and raffinose. The resolution factor of 0,7 does not decrease significantly with increasing flow rates. At higher temperatures of 70 °C even better results could be obtained ( $R = 0,83$ ). The two saccharides are well separated at a flow rate of one bed volume per hour, which is the required minimum value for an industrial application of this method.

Key words: raffinose, molasses, chromatography

---

## Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung .....	I
Abstract .....	II
Inhaltsverzeichnis .....	III
1    Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1  Einleitung .....	1
1.2  Chromatographie zur Trennung von Kohlenhydraten.....	2
1.3  Zielsetzung .....	6
2    Theoretischer Teil.....	8
2.1  Chromatographische Kenngrößen.....	8
2.2  Mathematische Grundlagen zur Berechnung chromatographischer Kenngrößen.....	12
2.3  Gel-Chromatographie.....	14
2.3.1  Theoretische Grundlagen der Gel-Chromatographie .....	15
2.3.1.1  Geometrisches Modell (Porenmodell) der Gel-Chromatographie .....	16
2.3.1.2  Thermodynamisches Modell (Knäuelmodell) der Gel-Chromatographie.....	18
2.3.2  Säulenmaterialien .....	19
2.4  Immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie .....	21
2.5  Metallkomplexe mit Zuckern .....	23
3    Experimenteller Teil.....	26
3.1  Entwicklung einer geeigneten Prozeß-Analytik.....	26
3.1.1  Linearer Bereich der verwendeten HPLC-Methode.....	28
3.1.2  Charakterisierung der HPLC-Methode .....	29
3.1.2.1  Genauigkeit der Methode in Abhängigkeit von der Probenzusammensetzung .....	29
3.1.2.2  Spezifität der HPLC-Methode.....	30
3.1.2.3  Einfluß von Salzen .....	32
3.1.3  Zusammenfassung.....	34



---

3.2	Trennung von Saccharose und Raffinose mittels der immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie .....	34
3.2.1	Einführung.....	34
3.2.2	Ergebnisse .....	35
3.2.3	Zusammenfassung.....	37
3.3	Trennung von Saccharose und Raffinose mit Hilfe der Gel-Chromatographie .....	38
3.3.1	Sephadex G-15 und Sephadex G-25 .....	39
3.3.1.1	Ergebnisse für Sephadex G-15 .....	39
3.3.1.2	Ergebnisse für Sephadex G-25 .....	41
3.3.1.3	Zusammenfassung für Sephadex-Materialien.....	43
3.3.2	Bio-Gel P-2.....	43
3.3.2.1	Versuche mit Standardlösungen.....	44
3.3.2.2	Versuche mit verdünnter S1b-Fraktion .....	48
3.3.2.3	Zusammenfassung für Bio-Gel P-2.....	50
3.3.3	Toyopearl HW-40 S .....	50
3.3.3.1	Versuche mit Standardlösungen.....	50
3.3.3.2	Versuche mit verdünnter S1b-Fraktion .....	54
3.3.3.3	Zusammenfassung für Toyopearl HW-40 S.....	63
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	64
5	Anhang .....	67
5.1	Material und Methoden .....	67
5.1.1	Analytik .....	67
5.1.2	Immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie .....	67
5.1.3	Gel-Chromatographie.....	68
5.2	Verwendete Abkürzungen.....	70
6	Literaturverzeichnis.....	72

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Einleitung

Seit vielen Jahren ist das Gebiet der nachwachsenden Rohstoffe in Deutschland ein viel-diskutiertes Thema. Diese bieten sowohl ökonomische wie auch ökologische Vorteile: Landwirte können neue Absatzmärkte erschließen und fossile Rohstoffquellen werden geschont [1]. 1995 deckte die chemische Industrie in der Bundesrepublik 10 % ihres Rohstoffbedarfs mit nachwachsenden Rohstoffen.

Kohlenhydrate nehmen in der Gruppe der nachwachsenden Rohstoffe eine wichtige Rolle ein. Die verbreitetste Anwendung finden dabei Stärke und Cellulose. Stärke und ihre Derivate kommen in der Industrie als Kleb- und Füllstoffe, als Verdickungsmittel in der Lebensmittelchemie und als bioabbaubare Folien zum Einsatz. Cellulose wird meist modifiziert in der Textil- und Papierherstellung verwendet.

Saccharose stellt die am besten verfügbare, nachwachsende niedermolekulare organische Verbindung dar. Sie wird nicht nur im Lebensmittelbereich eingesetzt, sondern findet auch Verwendung in der chemisch-pharmazeutischen Industrie, z. B. bei der Herstellung von Antibiotika. In jüngster Zeit erschließen sich durch biotechnologische Anwendungen weitere Nutzungsmöglichkeiten im Nicht-Nahrungsbereich, so zum Beispiel bei der Herstellung von Polyol-Harzen, Tensiden oder organischen Säuren [2]. In Deutschland wird Saccharose fast ausschließlich aus Zuckerrüben gewonnen; im Gegensatz zur weltweiten Förderung, wo nur etwa 40 % der Gesamtzuckergewinnung aus Zuckerrüben erfolgt [2]. Aus 100 kg Zuckerrüben können etwa 12-15 kg Saccharose, 3,5 kg Melasse und 4,5 kg Trockenschnitzel gewonnen werden. In einem Agrarland wie Niedersachsen fallen daher bei der Zuckergewinnung aus Zuckerrüben große Mengen Melasse an.

Das große Potential von Melasse als wertvollen Ausgangsstoff für die chemische Industrie wurde viele Jahre lang nicht erkannt. Der Rohstoff wurde hauptsächlich als Futtermittel in der Schweine- und Rindermast verwendet oder zurück auf die Felder ausgebracht, da die Zuckerrübe große Mengen an Kalium speichert, das dem Boden entzogen wird. Erst in den letzten Jahren wurde Melasse auch als Nährstoff in Fermentationsmedien eingesetzt, z. B. bei der Herstellung von Ethanol [3].

Die charakteristische tiefbraune Färbung der Melasse entsteht beim Eindampfen des Dünnsaftes durch Karamelisierungsvorgänge und die Bildung von Maillard-Produkten [4].

---

Die Melasse besitzt einen Trockensubstanzgehalt von mindestens 76,3 % bei einem Gesamtzuckergehalt von mindestens 47 % [5]. Die Nicht-Zuckerstoffe, die zu etwa 30 % in der Melasse enthalten sind, bestehen aus über 90 Substanzen in wechselnden Konzentrationen. Der größte Anteil der Nicht-Zuckerstoffe besteht mit 40 % aus organischen Stickstoffverbindungen. Durch gezielte chromatographische Aufarbeitungsprozesse ist es möglich, verschiedene Wertstoffe aus der Melasse zu gewinnen.

## 1.2 Chromatographie zur Trennung von Kohlenhydraten

Neben klassischen Trennverfahren wie Extraktion, Filtration, Verdampfung und Kristallisation kommt in der Kohlenhydratchemie auch die großtechnische Flüssigchromatographie zum Einsatz. Bei der Amino GmbH, Frellstedt, wird seit 1983 das von Hongisto [6; 7] sowie Heikkilä [8] beschriebene "Finnsugar"-Trennverfahren eingesetzt, um die Melasse zu entzuckern und weitere Wertstoffe zu gewinnen. Dadurch werden etwa 60.000 t Melasse pro Jahr verarbeitet. Die gewonnene Saccharose wird als Flüssigzucker an die Lebensmittelindustrie im Getränke- und Backwarenmarkt verkauft. Durch die große Menge an verarbeiteter Melasse ist die zusätzliche Gewinnung weiterer Wertstoffe während des Aufarbeitungsprozesses sinnvoll. Umgesetzt ist dieses schon für Betain und verschiedene Aminosäuren, wie z. B. Serin, die in der Herstellung von Pharmazeutika und Kosmetikprodukten eingesetzt werden.

Bei der Aufarbeitung wird die Melasse zunächst mit Carbonat enthärtet, um Calcium-Ionen zu entfernen, die eine hohe Affinität zum verwendeten Ionenaustauscherharz besitzen [7], und es erfolgt die Einstellung des pH-Wertes. Der Trockensubstanzgehalt wird durch Verdünnen der Melasse mit einer Rückführfraktion auf die nötigen Prozeßgrößen eingestellt. Das "Finnsugar"-Trennverfahren basiert auf Verteilungs- und Ionenausschluß-Chromatographie und trennt die Melasse in verschiedene Fraktionen auf. In einem Vergleich zu Chromatographieprozessen, die nach dem moderneren Simulated-Moving-Bed-Verfahren (SMB-Verfahren) [9] betrieben werden, führt die Melasseentzuckerung der Amino GmbH zu vergleichbar guten Ergebnissen [10]. Bei einem geringeren Bedarf an Prozeßwasser als die modernsten SMB-Anlagen weist der Melasseaufarbeitungsprozeß in Frellstedt zusätzlich noch eine wesentlich höhere Flexibilität auf. Dadurch kann die Abtrennung von mehr als drei Komponenten innerhalb eines Chromatographiezyklus` realisiert werden.

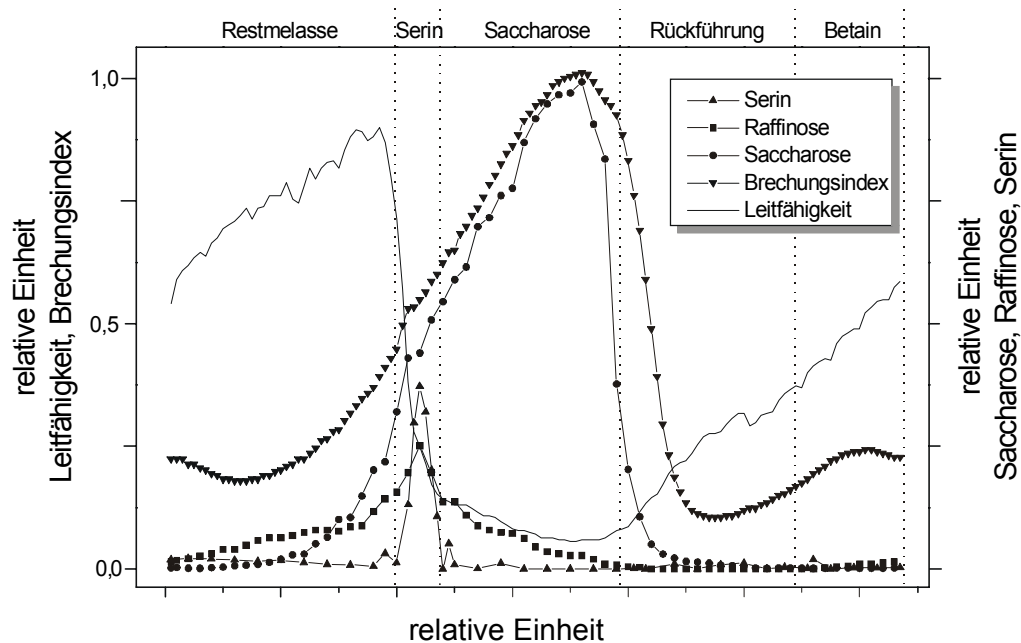
---

Der Aufarbeitungsprozeß erfolgt in sechs 60 m<sup>3</sup>-Chromatographiesäulen. Als Trennmaterial werden Ionenaustauscherharze in der Kalium-Form verwendet [8]. Die hohe Langzeitstabilität der Harze ermöglicht einen kontinuierlichen Einsatz seit fast 20 Jahren. Während des Chromatographieprozesses kann es zum Bruch des Polymerharzes kommen, wodurch geringe Mengen des Trennmaterials aus den Säulen ausgetragen werden. Dieser Verlust wird in unregelmäßigen Abständen durch Nachfüllen mit neuem Säulenmaterial ausgeglichen.

Als Elutionsmittel dient heißes Wasser. Die hohen Temperaturen während der chromatographischen Melasseentzuckerung begünstigen zum einen die Diffusion verschiedener Inhaltsstoffe in die Poren des Harzes, zum anderen wird unerwünschten Foulingeffekten vorgebeugt.

Ein vollständiger Chromatographiezyklus von der Aufgabe der Melasse bis zur Elution der letzten Substanz benötigt einen Zeitraum von etwa sechs Stunden. Aufgrund der Säulenhöhe von 12 Metern und dem sich daraus ergebenden Elutionsprofil ist es möglich, schon nach zwei Stunden die nächste Melasseprobe auf die Säule aufzutragen. Durch diese Prozeßführung können gleichzeitig insgesamt drei Trennläufe auf einer Säule durchgeführt werden. Neben einer besseren zeitlichen Nutzung des gesamten Säulenvolumens kann die Dauer für einen Chromatographiezyklus auf etwa zwei Stunden reduziert werden. Die genaue Länge des Trennzyklus und das Elutionsprofil hängen von dem unterschiedlichen Verhalten der einzelnen Trennsäulen und den Schwankungen in der Melassezusammensetzung ab [11].

In Abbildung 1.1 ist das Elutionsprofil einer Trennsäule in vereinfachter Form dargestellt.



**Abb. 1.1:** Elutionsprofil einer Trennsäule der chromatographischen Melasseaufreinigung, Amino GmbH, Frelstedt, mit Schnittführung einzelner Fraktionen (Restmelasse, Serin, Saccharose, Rückführung, Betain), vereinfachte Darstellung [12].

Abbildung 1.1 zeigt die verschiedenen Fraktionen der chromatographischen Melasseentzuckerung der Amino GmbH, Frelstedt, mit den zugehörigen Schnittgrenzen. Die Fraktionen werden in einem vollautomatischen Prozeß der anschließenden Aufarbeitung zugeführt. Durch die Prozeßsteuerung wird der erste Schnitt nach etwa 40 Minuten vorgenommen. Diese als Restmelasse bezeichnete Fraktion besteht überwiegend aus den Salzen organischer Säuren (sog. Asche) und Farbstoffen. Der hohe Saccharoseanteil dieser Fraktion führt dazu, daß nach einer Aufkonzentrierung diese Fraktion als teilentzuckerte Melasse wieder in den Handel gelangt.

Die folgende Fraktion wird als "Serinschnitt" bezeichnet, da hier die Aminosäure Serin gewonnen wird. Auch der größte Teil des Trisaccharids Raffinose wird in der Serinfraktion eluiert. Im Gegensatz zu Serin wird Raffinose in der chromatographischen Melassetrennung jedoch nicht in einem scharfen Peak eluiert, sondern über einen weiten Bereich.

Anschließend wird der Großteil der Saccharose in der sogenannten Produktlösung eluiert. Der Zucker kann in dieser Fraktion bereits mit hoher Reinheit (25 %) gewonnen werden. Anschließend wird eine Rückführfraktion eluiert, die als Teil der nächsten Probe (Verdünnung der Melasse) erneut chromatographisch getrennt wird. Bevor der nächste Chromatographiezyklus beginnt, wird abschließend eine Fraktion mit hohem Betain-Gehalt eluiert.

In Abhängigkeit von der Melassezusammensetzung kann dieser chromatographische Aufarbeitungszyklus zwei Wochen kontinuierlich betrieben werden. Dann macht die nachlassende Trennleistung der Austauschharze eine Reinigung des Säulenmaterials erforderlich. Dieses geschieht durch sogenanntes "Backwashing", dem Eintrag von Wasser im Gegenstrom.

Raffinose liegt in Melasse in einer durchschnittlichen Konzentration von 2,4 % vor [12] und stellt damit nach der Saccharose den größten Anteil an Kohlenhydraten dar [5]. Raffinose ( $\alpha$ -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-D- $\alpha$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranosid) ist ein Trisaccharid und setzt sich aus den Monosacchariden Galactose, Glucose und Fructose zusammen, die über eine  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ - glycosidische Bindung miteinander verbunden sind (s. Graphik 2.13 in Kapitel 2.5).

Für Raffinose bieten sich vielfache Nutzungsmöglichkeiten: Das Trisaccharid wird als Zusatz von Bakteriennährböden [13] und als Stabilisator für gefrorene Rinder-Spermien verwendet, sowie Konservierungslösungen von menschlichen Organtransplantaten zugesetzt [14]. Beim Gefriertrocknen von Proteinen wird Raffinose zum Erhalt der Hydrathülle eingesetzt [15]. In industrialisierten Ländern könnte die Raffinose zudem als Nahrungsergänzungsmittel einen expandierenden Markt erschließen da herausgefunden wurde, daß Raffinose sich positiv auf die Vermehrung von *Bifido-Bakterien* im Darm auswirkt [14] und dem Zucker damit eine probiotische Wirkung zugeschrieben wird. Der gesundheitsfördernde Einfluß von Oligosacchariden wird in den letzten Jahren vermehrt untersucht [16].

In Japan wird in vielen Patenten der Zusatz von Raffinose zu Kosmetikprodukten wie Cremes, Lippenstiften und Deodorants erwähnt [17]. Ein neues Einsatzgebiet wird derzeit in Canada entwickelt: Die Firma Hemosol untersucht den Einsatz eines Blutersatzmittels (Hemolink<sup>®</sup>), das aus menschlichem Haemoglobin besteht, welches mit Periodat-oxidiertes ringgeöffneter Raffinose polymerisiert wurde. Die klinischen Untersuchungen befinden sich im Moment in der Phase II [18].

### 1.3 Zielsetzung

Ziel der durchgeführten Untersuchungen ist, aus der Melasse in einem Aufarbeitungsschritt, der nicht in das bestehende Verfahren eingreift, Raffinose zu gewinnen. Das Raffinose-Maximum liegt in der Serin-Fraktion (vgl. Abbildung 1.1). Die Gewinnung von Raffinose aus dieser Fraktion kann nicht realisiert werden, da aus diesem Schnitt in einem etablierten Verfahren die Aminosäure Serin isoliert wird. Das Ziel ist daher, Raffinose aus der ansteigenden Peakflanke der Restmelassefraktion zwischen der 30. und 40. Minute (der sogenannten S1b-Fraktion) zu isolieren. Aus dieser Fraktion der chromatographischen Melasseentzuckerung wird kein weiterer Inhaltsstoff durch eine nachfolgende Aufarbeitung gewonnen. Deshalb wäre ein vergleichsweise kleiner Eingriff in den etablierten Aufarbeitungsprozeß notwendig. Das relativ günstige Saccharose-Raffinose-Verhältnis der Fraktion (9,81:1) ist ein weiteres Kriterium für die Raffinosegewinnung aus dieser Fraktion, da die Trennung von Saccharose und Raffinose schwierig ist [19]. Dem gegenüber steht die hohe Salz- und Aschekonzentration dieses Schnitts, die eine Aufarbeitung erschwert. Aus diesem Grund wurde diese Fraktion für die vorliegende Arbeit bei der Amino GmbH, Frellstedt, im Vorfeld entsalzt [20]. Die zu untersuchende entsalzte S1b-Fraktion (vom 20.04.1998) besitzt folgende Zusammensetzung.

**Tab. 1.1: Auszug der Zusammensetzung der entsalzten S1b-Fraktion [12] <sup>1</sup>**

Trockensubstanz (TS)	61,6 °Bx
Roh-Asche (550 °C)	5,14 %
Sulfat-Asche (800 °C)	5,78 %
Leitfähigkeit	3,30 mS/cm
pH-Wert	8,33
Farbe	60.200 ICUMSA-Einheiten
Raffinose	4,20 %
Saccharose	41,2 %

<sup>1</sup> Zur Erläuterung: 1 °Bx  $\hat{=}$  1 % TS; 1 ICUMSA-Einheit  $\hat{=}$  das Tausendfache der auf die Trockensubstanzkonzentration bezogenen Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 420$  nm

---

Da die in der chromatographischen Melasseentzuckerung genutzten Ionenaustauscherharze keine ausreichende Trennung bewirken, sollen in der hier vorliegenden Arbeit andere chromatographische Trennmethode auf ihre Verwendbarkeit in der Kohlenhydratseparation hin untersucht werden. Die Auswahl der Trennmaterialien erfolgt aufgrund erfolgreicher Trennversuche, die in der Literatur beschrieben sind.

Shimizu [21] benutzt z. B. in seinem Laboratorium folgende chromatographische Methoden, um Mono- und Oligosaccharide zu trennen: Sephadex G-10, Sephadex G-15, Polymer-basierte Gele, wie z. B. Bio-Gel P-2, Ca-beladene Gele (z. B. Supelcogel Ca), starke Kationenaustauscher (-SO<sub>3</sub>H)-Harze und schwache Anionenaustauscher-Harze. Für die hier vorgestellte Arbeit fanden zum einen im Bereich der Affinitäts-Chromatographie die immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie sowie unterschiedliche Trägermaterialien für die Gel-Chromatographie Anwendung. Nachfolgend soll eine Übertragung der Laborversuche auf industrielle Anlagen erfolgen. Deshalb sollten chromatographische Auflösungen von über 0,8 bei einer Fließgeschwindigkeit von einem Bettvolumen pro Stunde erreicht werden.



## 2 Theoretischer Teil

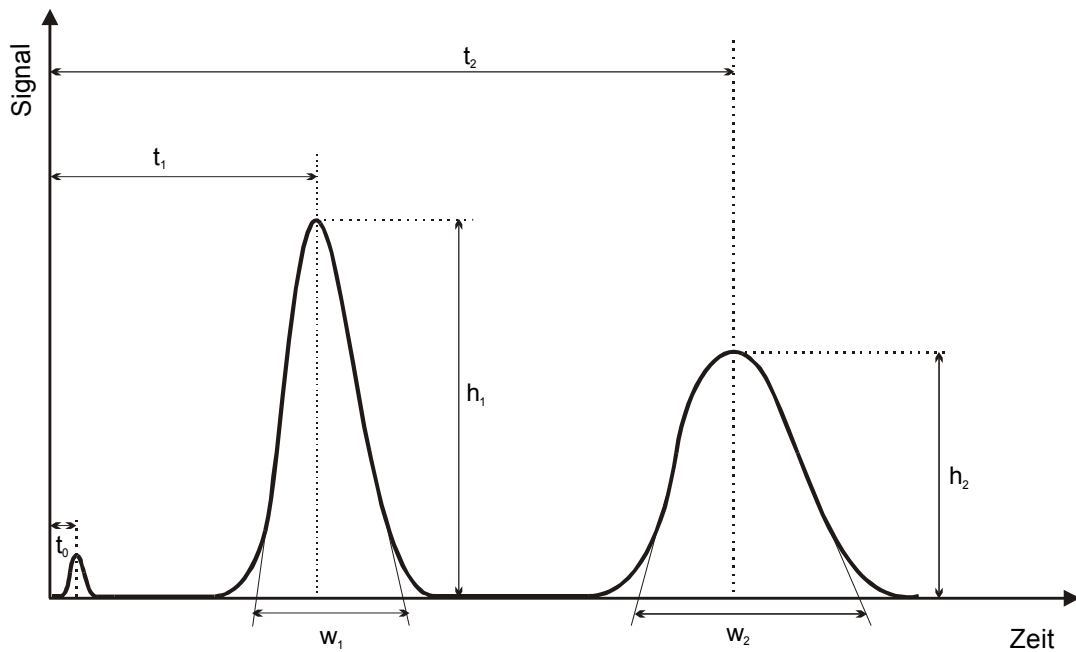
Der russische Botaniker Michael Tswett entwickelte 1903 das Prinzip der Chromatographie, als er Pflanzenextrakte mit Hilfe von einer mit Calciumcarbonat gefüllten Glassäule auf-trennte[22]. Die Suche nach geeigneten Trägermaterialien war anfangs schwierig, Erfolge brachten schließlich Agarose, Dextrane und Cellulose. Daraus entwickelten sich die verschie-denen chromatographischen Techniken wie z. B. Gaschromatographie (GC), Dünnschicht-Chromatographie (DC), Ionenaustausch-Chromatographie, Ausschluß-Chromatographie (Gel-Chromatographie), Reversed Phase Chromatographie und Affinitäts-Chromatographie.

In der hier vorliegenden Arbeit sollen die Anwendung der immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) und der Gel-Chromatographie mit verschiedenen Trägermaterialien bei der Trennung von Zuckergemischen untersucht werden. Im folgenden werden zunächst wichtige chromatographische Kenngrößen und deren Berechnung vorgestellt. Anschließend erfolgt eine Einführung in theoretische Aspekte der verwendeten chromatographischen Trennmethoden sowie eine wissenschaftliche Einführung in Metallkomplexe mit Zuckern, welche die Grundlage für den Einsatz der IMAC darstellen. Zum Abschluß wird kurz die verwendete Analysenmethode vorgestellt.

### 2.1 Chromatographische Kenngrößen

Nach Auftragen einer Probe wandern die einzelnen Komponenten als Banden mit unter-schiedlicher Geschwindigkeit durch das Chromatographiematerial der Säule und werden so getrennt [22]. Durch die Auftragung der Komponentenkonzentrationen, die für jeden Bestand-teil der Probe nach dem Säulendurchgang als Gauß-Verteilung erscheinen, gegen die Zeit erhält man ein Chromatogramm. Daraus kann man einerseits bereits visuell die Trennkapa-zität der verwendeten Säule beurteilen, andererseits jedoch auch mathematisch die Auftren-nung berechnen.

Die folgende Abbildung 2.1 stellt die wichtigsten Kenngrößen eines Chromatogramms dar.

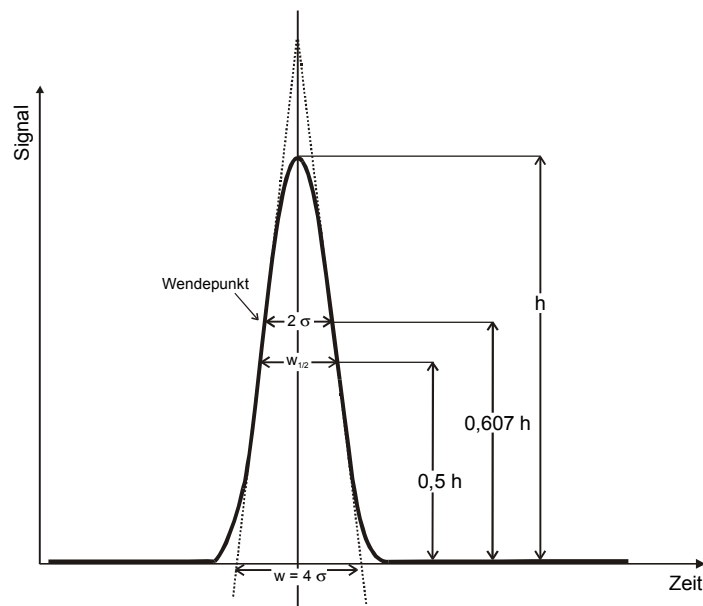


**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung eines Chromatogramms mit den wichtigsten Kenngrößen.

Die Abkürzungen bedeuten:

$t_0$	Totzeit	benötigte Zeit von der Injektion bis zur Detektion für eine nicht retardierte Substanz
$t_1 / t_2$	Retentionszeit für Substanz 1 bzw. 2	Zeit bis zur Detektion einer retardierten Substanz
$h_1 / h_2$	Peakhöhe für Substanz 1 bzw. 2	Abstand vom Peak-Maximum bis zur Basislinie
$w_1 / w_2$	Peakbreite für Substanz 1 bzw. 2	an der Basislinie gemessen

Außer diesen Kenngrößen sind auch die Varianz  $\sigma^2$  und die Halbwertsbreiten  $w_{1/2}$  (s. Abbildung 2.2) von großer Aussagekraft.



**Abb. 2.2:** Bestimmung weiterer Kenngrößen aus einem Chromatogramm [nach 23].

Mit Hilfe der chromatographischen Auflösung  $R$  kann die Trennqualität der Säule für die untersuchten Substanzen bestimmt werden. Dabei gilt:

$$R = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

mit:  $t_1$ : Retentionszeit Substanz 1       $w_1$ : Peakbreite Substanz 1

$t_2$ : Retentionszeit Substanz 2       $w_2$ : Peakbreite Substanz 2

Mit Hilfe der chromatographischen Auflösung  $R$  wird die Qualität einer Trennung zweier Substanzen angegeben. Sie berücksichtigt nicht nur die jeweilige Peakform, sondern setzt ebenso das Verhältnis der beiden Retentionszeiten zueinander in Beziehung. Bei  $R = 1,5$  liegen die beiden Komponenten zu 99,7 % getrennt vor, bei einer chromatographischen Auflösung  $R = 1$  immerhin noch zu 98 %. Die Auflösung ist von der Bodenzahl  $n$  einer Säule abhängig.

Die Größe der Bodenzahl  $n$  ist ein Maß für die Trennqualität einer Säule und wird aus der Elution eines spezifischen Analyten berechnet [24]:

$$n = 16 \left( \frac{t}{w} \right)^2 \quad (\text{Gl. 2.2})$$

mit:  $t$ : Retentionszeit

$w$ : Peakbreite

Die Bodenzahl  $n$  ist eine spezifische Größe einer Säule und hängt vor allem von der Teilchengröße des Trägermaterials und der Qualität der Säulenpackung ab.

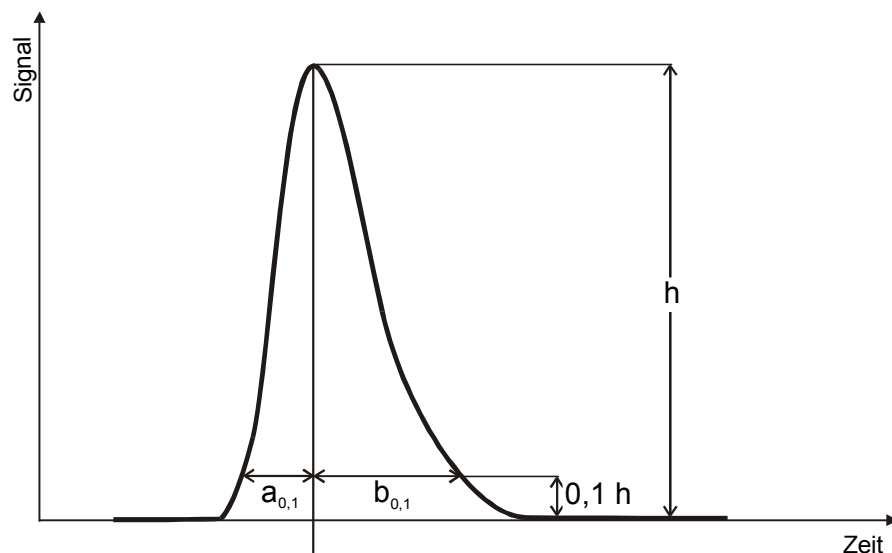
Schwierigkeiten in der Berechnung der chromatographischen Kenngrößen ergeben sich, wenn ein Peak asymmetrisch ist, das heißt ein Fronting oder Tailing aufweist. Die Peak-Asymmetrie  $T$  wird bei 10 % der Peakhöhe berechnet zu [25]:

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

mit:  $b_{0,1}$ : Distanz zwischen Peak-Maximum und Peak-Ende, gemessen auf 0,1 h

$a_{0,1}$ : Distanz zwischen Peak-Front und Peak-Maximum, gemessen auf 0,1 h

Die folgende Abbildung 2.3 verdeutlicht diesen Zusammenhang.



**Abb. 2.3:** Asymmetrischer Peak [nach 25].

Dabei sollte  $T$  nicht größer als 2,5 sein, da sonst eine quantitative Auswertung mit zu großen Fehlern behaftet ist. In der Praxis wird eine Trennsäule als gut bezeichnet, wenn der Asymmetrie-Faktor zwischen 0,9 und 1,2 liegt.

## 2.2 Mathematische Grundlagen zur Berechnung chromatographischer Kenngrößen

Bei der Trennung der beiden Kohlenhydrate können durch Messung der Raffinose- und Saccharose-Konzentrationen in den off-line Proben wichtige chromatographische Kenngrößen durch Anpassung an eine theoretische Kurve bestimmt werden. Die theoretischen Grundlagen für dieses Vorgehen werden in diesem Kapitel kurz vorgestellt.

Als ideale Verteilung von Meßwerten bei chromatographischen Prozessen wird die Normalverteilung nach Gauß angenommen. Die Gleichung für die Gaußsche Glockenkurve lautet [26]:

$$f(t) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \frac{(t-\mu)^2}{\sigma^2} \right] \quad (\text{Gl. 2.4})$$

mit:  $\mu$ : Mittelwert  
 $\sigma$ : Standardabweichung

An der Stelle des Mittelwertes befindet sich das Kurvenmaximum, die Wendepunkte liegen jeweils eine Standardabweichung vom Mittelwert entfernt. Je größer die Standardabweichung, desto flacher ist die Kurve.

Durch den Mittelwert der normalverteilten Meßwerte ist die Lage der Verteilung im Verhältnis zur x-Achse bestimmt. Dieser entspricht für die Trennung der Saccharide der Retentionszeit. Da im vorliegenden Fall nicht die Verteilungen der Meßwerte, sondern der Konzentrationsverlauf der Zucker zu den entsprechenden Elutionszeitpunkten angepaßt werden sollen, muß hier nicht die Kurve selbst, sondern die integrierte Fläche betrachtet werden.

$$\int_{-\infty}^{\infty} f(t) dt = \int_{-\infty}^{\infty} N \cdot \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \frac{(t-\mu)^2}{\sigma^2} \right] dt = N \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Da beide Eluenten nebeneinander bestimmt werden und das Konzentrationsverhältnis bekannt ist ( $N_2 = a \cdot N_1$ ; mit  $a$ : Konzentrationsverhältnis der Saccharide), kann diese Größe als Annahme mit berücksichtigt werden. Dadurch ergeben sich für die theoretischen Kurven beider Saccharide folgende Gleichungen:

Für die Raffinose-Konzentration  $c_{R, \text{theo}} = N_1 \cdot \frac{1}{\sigma_R \sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(t-t_R)^2}{\sigma_R^2}\right]$  (Gl. 2.6)

Für die Saccharose-Konzentration  $c_{S, \text{theo}} = N_2 \cdot \frac{1}{\sigma_S \sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(t-t_S)^2}{\sigma_S^2}\right]$  (Gl. 2.7)

mit:  $\sigma_R$ : Standardabweichung Raffinose-Verteilung  
 $\sigma_S$ : Standardabweichung Saccharose-Verteilung  
 $t_R$ : Retentionszeit Raffinose  
 $t_S$ : Retentionszeit Saccharose

Zu jedem Zeitpunkt  $t_i$ , für den Meßwerte vorliegen, wird die quadratische Abweichung zwischen Meßwert und theoretischem Wert berechnet. Durch Minimierung der Summe dieser Fehlerquadrate mit Hilfe des Newton-Verfahrens können zudem die Parameter für die Standardabweichungen und die Retentionszeiten für beide Kohlenhydrate bestimmt werden. Anhand dieser Werte läßt sich nach Gleichung 2.1 (s. Kapitel 2.1) die chromatographische Auflösung  $R$  berechnen.

Zum besseren Verständnis ist das verwendete Verfahren noch einmal in Abbildung 2.4 graphisch dargestellt.

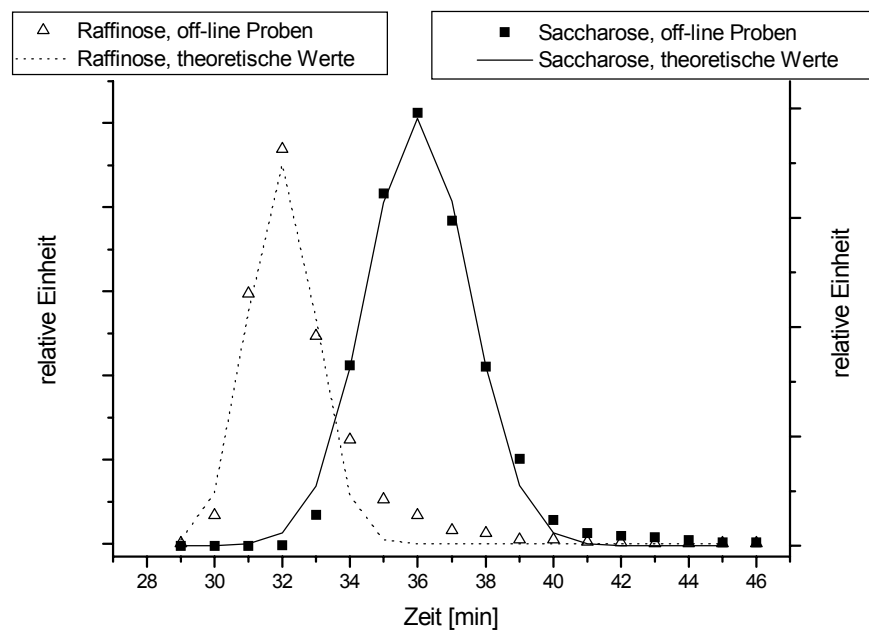


Abb. 2.4: Bestimmung chromatographischer Kenngrößen mit Hilfe theoretischer Kurven.

Für die chromatographischen Kenngrößen ergeben sich für das hier gezeigte Beispiel folgende Werte:

$t$  (Raffinose) = 31,99 min,  $\sigma$  (Raffinose) = 0,99 min

$t$  (Saccharose) = 36,01 min,  $\sigma$  (Saccharose) = 1,51 min

und mit  $w = 4\sigma$  (vgl. Abbildung 2.2) ergibt sich eine chromatographische Auflösung von  $R = 0,80$ .

### 2.3 Gel-Chromatographie

Die Anwendungen der Gel-Chromatographie lassen sich in fünf große Bereiche aufteilen [24]:

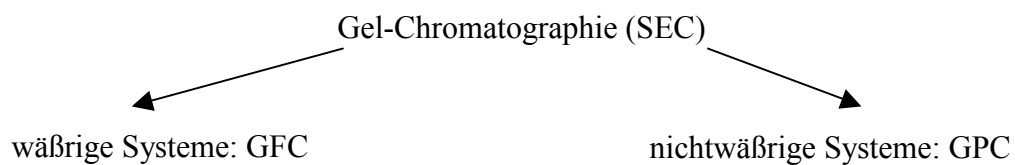
- Reinigung
- Aufkonzentrierung
- Entsalzung
- Relative molekulare Massenbestimmung
- Protein-Bindungs-Untersuchungen.

Dabei spielt die Reinigung von Substanzgemischen die größte Rolle. Am häufigsten ist Gel-Chromatographie in der Protein-Chemie verbreitet. Hier finden meist mehrere Anwendungsmöglichkeiten der Gel-Chromatographie Verwendung, so zum Beispiel im letzten Schritt der Gewinnung von Proteinen, beim Polishing [27] oder bei der Entsalzung.

Auch in der Zuckerchemie wurde schon früh der mögliche Einsatz von Gel-Chromatographie untersucht. Übersichten aus den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts findet man bei Granath [28; 29]. Einen kurzen Überblick über den Einsatz der Gel-Chromatographie zur Trennung von Stärkeprodukten zeigt Praznik [70].

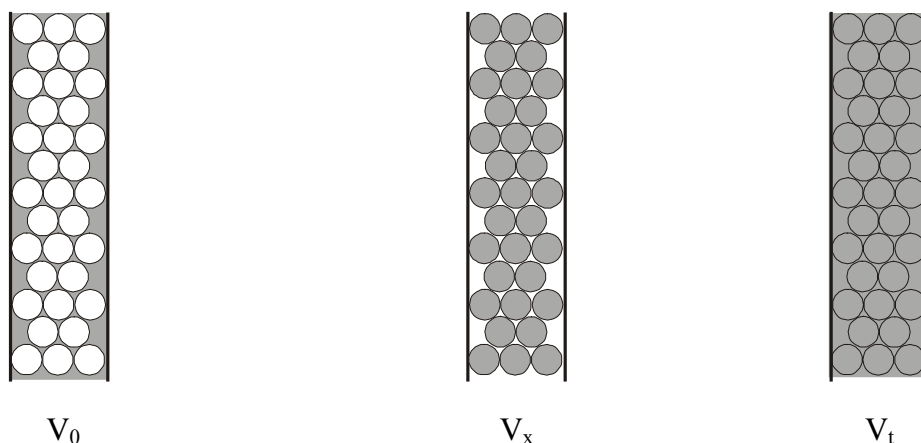
### 2.3.1 Theoretische Grundlagen der Gel-Chromatographie

Mit Hilfe der Gel-Chromatographie zeigten Porath und Flodin 1959 als erste die Trennung von wasserlöslichen Makromolekülen aufgrund ihres Größenunterschiedes [30]. Bei diesem Verfahren wandern Moleküle in einer Säule durch ein poröses Material und werden aufgrund eines "Siebeffektes" separiert. Daraus leiten sich auch die verschiedenen Namen dieser Technik ab: Die Größenausschluß-Chromatographie (size exclusion chromatography, SEC) wird im Fall von wäßrigen Trennsystemen auch Gel-Filtrations-Chromatographie (GFC) und bei nichtwäßrigen Systemen auch Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) genannt.



Die wichtigsten Faktoren in der Gel-Chromatographie sind die Bett-Geometrie und die Flußrate. Für ersteres spielen nicht nur die Betthöhe und der Bettdurchmesser eine Rolle, sondern auch verschiedene Volumina: Das Gesamtbettvolumen  $V_t$  (oder auch BV) wird wie ein Zylinder aus Höhe und Durchmesser des Gelbettes berechnet ( $V = h\pi r^2$ ).

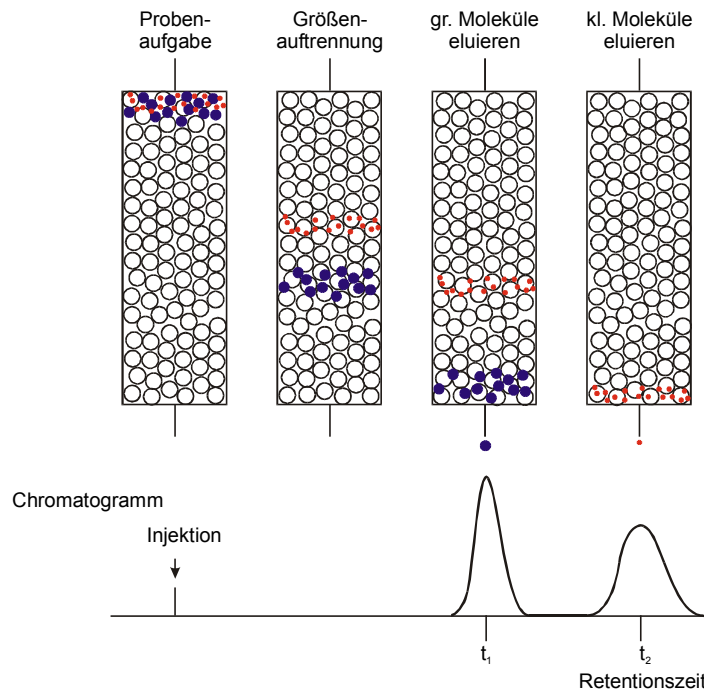
Das Hohlräumvolumen, auch interstitieller Raum oder Totvolumen genannt,  $V_0$  beschreibt das Volumen der flüssigen Phase zwischen den Gelkörnern. Dieses Volumen wird mit Hilfe einer Substanz, die nicht vom Gelbett retardiert wird, über die Messung des Elutionsvolumens bestimmt. In der Gel-Chromatographie wird häufig Dextran blue mit einer Molekülmasse von über 2 Millionen Da verwendet. In Abbildung 2.5 sind die verschiedenen Variablen zur Beschreibung eines Gelbettes noch einmal veranschaulicht.



**Abb. 2.5:** Variablen zur Bestimmung des chromatographischen Betts [nach 31].



Abbildung 2.6 zeigt schematisch eine Trennung von Molekülen mittels SEC und dem daraus resultierenden Chromatogramm.

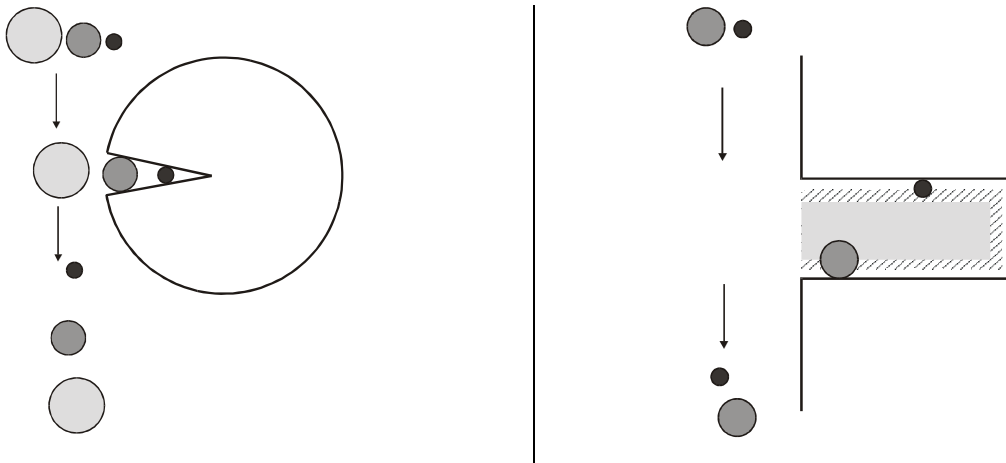


**Abb. 2.6:** Schematische Darstellung der Trennung von Probenmolekülen bei der Gel-Chromatographie mit resultierendem Chromatogramm [nach 32].

Für den Trennmechanismus bei der Gel-Chromatographie wurden zahlreiche Modelle entwickelt. Dabei spielen die Trennung durch den Fluß, geometrische Überlegungen, begrenzte Diffusion und thermodynamische Überlegungen eine Rolle [23]. Jedoch sind dies alles nur vereinfachte Vorstellungen; der tatsächliche Vorgang ist noch nicht vollständig geklärt. Mit Hilfe der folgenden geometrischen und thermodynamischen Modelle soll der Trennmechanismus veranschaulicht werden.

### 2.3.1.1 Geometrisches Modell (Porenmodell) der Gel-Chromatographie

Das geometrische Modell vereinfacht die komplizierte Porenform eines Gels in konische oder zylindrische Porenöffnungen (s. Abbildung 2.7). Natürlich spielt auch die molekulare Konformation der Probenmoleküle eine Rolle; hier werden sie jedoch vereinfacht als runde Kugeln angesehen.



**Abb. 2.7:** Geometrische Modelle der Gel-Chromatographie: konische Porenöffnung (links), zylindrische Porenöffnung (rechts) [nach 23].

Das konische Modell nimmt eine Verengung der Pore mit zunehmender Entfernung zur Außenseite an. Die Probenmoleküle können so weit in die Pore eindringen, wie es das Verhältnis Pore zu Moleküldurchmesser zuläßt. Die kleinsten, in Abbildung 2.7 links schwarz gezeichneten, Moleküle können tief in die Pore eindringen und ihnen steht somit das gesamte Porenvolumen zur Verfügung. Sie eluieren durch die lange Verweilzeit daher zuletzt. Das mittelgroße Molekül (dunkelgrau) kann nur so weit in die Pore eindringen, bis der Durchmesser des Moleküls dem Porendurchmesser an dieser Stelle entspricht. Das größte Molekül (hellgrau) wiederum kann nicht in die Pore eindringen und verläßt deshalb die Säule zuerst. Die Moleküle werden demnach nach sinkendem Durchmesser aufgetrennt.

Beim zylindrischen Porenmodell wird angenommen, daß die Pore überall den gleichen Durchmesser hat. Jedoch ist das zugängliche Porenvolumen für Kugeln nicht gleich dem Gesamtporenvolumen, sondern hängt vom Moleküldurchmesser ab. Für kleine Moleküle (schwarz) steht ein größeres Porenvolumen (schraffierte Fläche) als für größere Moleküle (dunkelgrau; Porenvolumen hellgrau) zur Verfügung. Die größeren Moleküle eluieren deshalb schneller als die kleineren Moleküle.

Dieses Modell geht jedoch von einer idealen Porenstruktur in der Matrix aus, und auch die Molekülstruktur der Probe ist nicht ideal, wie in dem Modell angenommen. Eine komplexere Betrachtungsweise wird mit dem thermodynamischen Modell wiedergegeben.

### 2.3.1.2 Thermodynamisches Modell (Knäuelmodell) der Gel-Chromatographie

Die Bildung eines thermodynamischen Gleichgewichtes zwischen einem Polymer im interstitiellen Raum und dem Porenvolumen stellt die Grundlage für die Überlegungen des thermodynamischen Modells dar.

Die folgende Gleichung 2.8 beschreibt den Verteilungskoeffizienten  $K$  für einen gelösten Stoff im Gleichgewicht zwischen zwei Phasen [33].

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta H^0}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S^0}{R}\right) \quad (\text{Gl. 2.8})$$

mit:  $R$ : Gaskonstante

$T$ : absolute Temperatur

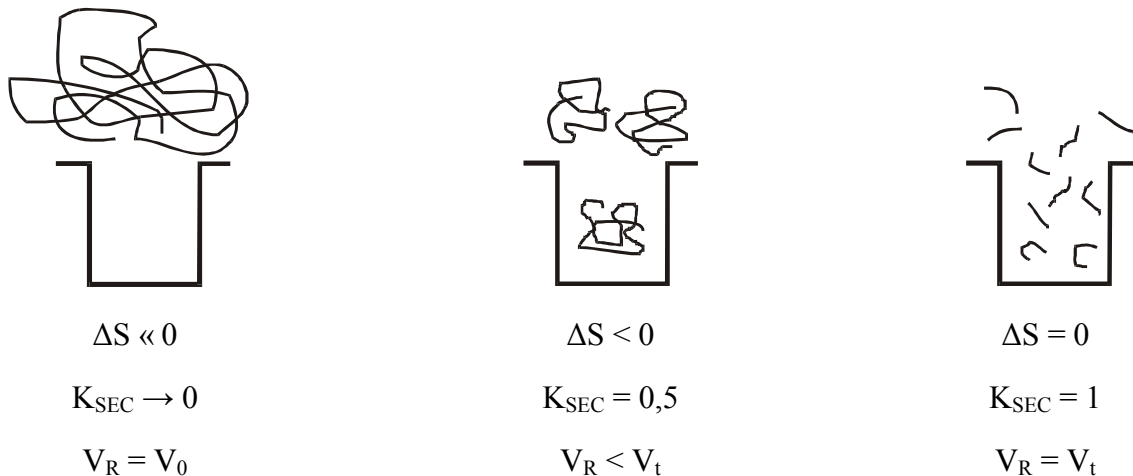
$\Delta H^0$ : Enthalpieänderung

$\Delta S^0$ : Änderung der Konformationsentropie, wenn 1 Mol des gelösten Stoffes bei Standardbedingungen vom interstitiellen Volumen in die Pore überwechselt.

Bei idealem Verhalten finden in der Gel-Chromatographie keine Wechselwirkungen zwischen dem gelösten Stoff und dem Gel statt; die Enthalpieänderung ist gleich Null. Der Verteilungskoeffizient  $K_{\text{SEC}}$  bei der Gel-Chromatographie vereinfacht sich zu:

$$K_{\text{SEC}} = \exp\left(\frac{\Delta S^0}{R}\right) \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Da die Konformationsfreiheitsgrade eines Moleküls in den Poren der Packung stärker eingeschränkt sind als im umgebenden Raum, nimmt die Entropie der Kette durch Eindringen in die Pore ab. Die Triebkraft für  $\Delta S^0$  entsteht durch den Konzentrationsgradienten des gelösten Stoffes zwischen Pore und interstitiellen Raum. Die Beschränkung der Konformationsfreiheit einer flexiblen Kette in den Grenzen einer Pore verursacht ein Abnehmen der Entropie. Dadurch wird das Vorzeichen von  $\Delta S^0$  negativ und der Wert des Verteilungskoeffizienten  $K_{\text{SEC}}$  liegt zwischen Null und Eins. Die folgende Abbildung 2.8 verdeutlicht den Zusammenhang.



**Abb. 2.8:** Thermodynamisches Modell der Gel-Chromatographie: Elution verschieden großer Moleküle [nach 23].

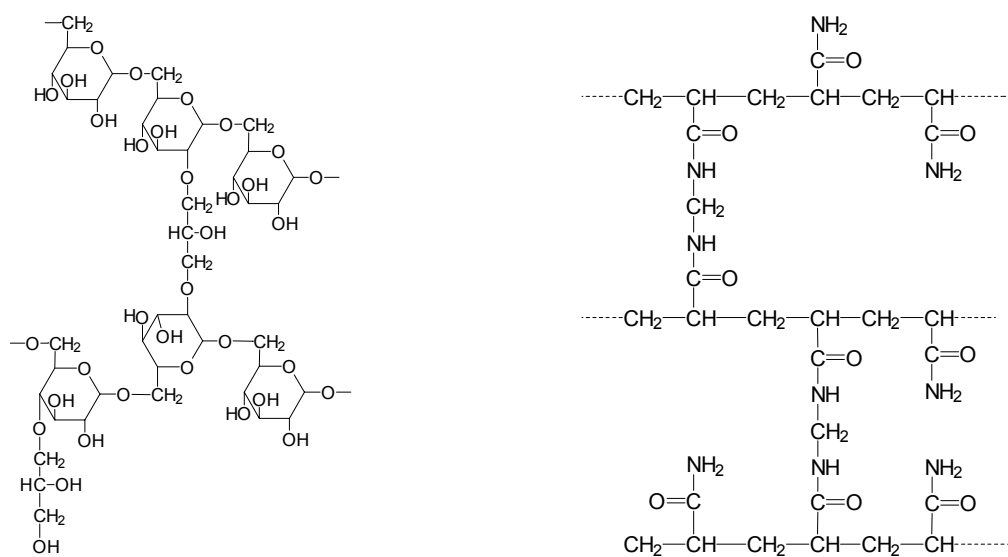
Bei großen Molekülen, die von der Pore ausgeschlossen sind, wird  $\Delta S^0$  sehr klein und  $K_{SEC}$  geht gegen Null. Mittelgroße Molekülen dagegen, die in etwa das Ausmaß der Pore besitzen, belegen ein begrenztes Porenvolumen. Dadurch wird  $\Delta S^0$  negativ und  $K_{SEC}$  nimmt zu. Bei sehr kleinen Molekülen steht dem gelösten Stoff letztendlich das gesamte Porenvolumen zur Verfügung. Dadurch tritt keine Änderung in  $\Delta S^0$  und  $K_{SEC}$  auf.

Im Gegensatz zu allen anderen Trennmethode ist der Verteilungskoeffizient in der Gel-Chromatographie  $K_{SEC}$  unabhängig von der Temperatur und hängt nur von der Größe und Form des Moleküls und der Poren ab. Andere Faktoren sind allerdings temperaturabhängig: So hängt die Molekülgröße des gelösten Stoffes von der Temperatur ab, und bei nicht-starren Packungen kann die Porengröße durch Temperaturänderung variieren. Allgemein wurde festgestellt, daß bei zunehmender Temperatur die Bandenverbreiterung abnimmt. Höhere Temperaturen können ebenfalls hilfreich sein, um die Löslichkeit der Proben sicherzustellen.

### 2.3.2 Säulenmaterialien

Generell wird in der Gel-Chromatographie zwischen fünf Arten von Materialien unterschieden: Quervernetzte Dextrane, Agarose, Polyacrylamid, Polyacryloylmorpholin und Polystyrole. Drei Arten finden jedoch nur breitere Anwendung: Agarose (z. B. Bio-Gel A, Sepharose), Dextrane (z. B. Sephadex, Sephacryl) und Polyacrylamide (z. B. Bio-Gel P, Toyopearl).

Dextrane waren die ersten Trennmaterialien, die in der Gel-Chromatographie zum Einsatz kamen. Durch Fermentation von Saccharose mit *Leuconostoc mesenteroides*-Stämmen werden die Polysaccharide hergestellt [31], die ausschließlich aus Glucose aufgebaut sind und zu 90 %  $\alpha$ -1,6-glycosidische Bindungen enthalten. Das Rohdextran wird gereinigt, partiell hydrolysiert und mit Ethanol fraktioniert ausgefällt. Danach werden die Dextrane mit Hilfe von Epichlorhydrin zu einem dreidimensionalen Netzwerk quervernetzt, wodurch es in Wasser schwerlöslich wird. Es bleibt weiterhin hydrophil und quillt in wässrigen Medien schnell auf. Abbildung 2.9 links zeigt einen Ausschnitt der schematischen Struktur von Sephadex.



**Abb. 2.9:** Ausschnitt aus den schematischen Strukturen von Dextran-Gel (links) und dem Polyacrylamid-Gel Bio-Gel P (rechts).

Dextrane sind in verschiedenen Typen erhältlich, die sich zum einen durch ihr Quellvermögen und zum anderen durch den Grad der Vernetzung unterscheiden. Das Quellvermögen eines Gels nimmt ab, wenn eine größere Menge an Epichlorhydrin zugegeben wird, bzw. wenn das Molekulargewicht des Dextrans zunimmt [34]. Die Gele sind in einem pH-Bereich von pH 2–13 stabil. Durch freie Carboxyl-Gruppen können jedoch Wechselwirkungen mit Kationen stattfinden. Deshalb sollten Laufmittel mit einer Ionenkonzentration über 20 mM vermieden werden [35].

Agarose-Gele werden aus Agar hergestellt und bestehen aus linearen Polysacchariden, deren Kette abwechselnd D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-galactose enthält. Ihre gelbildenden Eigenschaften führt man auf zahlreiche Wasserstoff-Brücken inter- und intramolekularer Art zurück. Aufgrund ihrer stark hydrophilen Eigenschaften und dem nahezu völligen Fehlen geladener Gruppen treten bei Agarose-Gelen wie bei den Dextranen nur geringe Denaturierung und kaum Adsorption der empfindlichen biochemischen Substanzen auf. Agarose-Gele werden deshalb hauptsächlich bei der Fraktionierung von Molekülen mit großer Molekülmasse, z. B. Viren, Phagen und Zellpartikeln verwendet. Das Material ist anfällig für Bakterienwachstum, deshalb sollte zur Verhinderung des Bewuchses dem Elutionsmittel immer Natriumazid zugegeben werden. Ebenfalls können keine Wasserstoffbrücken-brechende (z. B. Harnstoff) oder organische Lösemittel verwendet werden, da diese das Trennmittel zerstören [34]. Die Gele sind im allgemeinen in einem pH-Bereich von pH 3–12 stabil [35].

Polyacrylamid-Gele finden ihre Hauptanwendung in der Gel-Elektrophorese. Doch seit Anfang der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts finden diese Materialien auch Einzug in der Gel-Chromatographie. Die vollsynthetischen Gele werden in der Hitze zum Beispiel bei Bio-Gel P aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bis-acrylamid copolymerisiert. Abbildung 2.9 rechts zeigt einen Ausschnitt eines Bio-Gel P-Gels.

Auch Bio-Gele vom P-Typ sind mit verschiedenen Eigenschaften erhältlich, die sich ebenfalls in ihrem Quellvermögen und durch ihre unterschiedlichen Ausschlußgrenzen unterscheiden. Die Gele sind bei Raumtemperatur in einem pH-Bereich von pH 2–10 stabil. Der Vorteil vom Bio-Gel P-Typ ist, daß dieses Polyacrylamid-Gel laut Herstellerangaben kaum dem Befall durch Mikroorganismen unterliegt.

## 2.4 Immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie

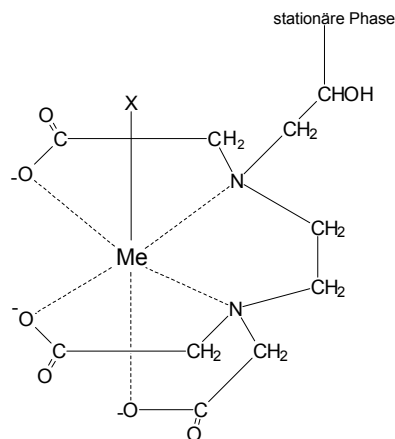
Die immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) stellt eine Untergruppe der Affinitäts-Chromatographie dar. Das Trennprinzip beruht auf der spezifischen, jedoch reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen speziellen, matrixgebundenen Bindungspartner. Typische Bindungspaare für die Affinitäts-Chromatographie sind zum Beispiel Enzym und Coenzym oder Antigen und Antikörper.

Die IMAC wurde 1975 von Porath für Separationen von Proteinen entwickelt [36]. An eine stationäre chelatisierende Matrix werden Metallionen gebunden, die mit speziellen Gruppen (z. B. Histidin-Reste) schwache Koordinationsbindungen eingehen können. Die Matrices können anorganischen (Silika-Gel), biologischen (Agarose) oder synthetischen Ursprungs sein. Als chelatisierende Liganden werden Moleküle mit Iminodiacetat-Struktur verwendet, wie z. B. Iminoacetessigsäure (IDA), Nitrilotriessigsäure (NTA) oder Tris-(carboxymethyl)-ethylendiamin (TED) (s. Abbildungen 2.10 und 2.11).



**Abb. 2.10: Struktur von zwei immobilisierten Metall-Chelatisierungs-Liganden. Links: Iminoacetessigsäure (IDA) und rechts: Nitrilotriessigsäure (NTA).**

Der Nachteil der schon lange verwendeten Iminoacetessigsäure besteht darin, daß sie nur drei Metall-chelatisierende Bindungsstellen hat, während andere Substanzen vier oder mehr Bindungsstellen besitzen, wie z. B. Tris-(carboxymethyl)-ethylendiamin mit fünf Komplexierungsstellen (s. Abbildung 2.11).



**Abb. 2.11: Schematische Darstellung des Liganden Tris-(carboxymethyl)-ethylendiamin (TED) [nach 37].**

Die chelatisierenden Liganden verbinden sich fest mit Metallionen, wie z. B.  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  oder auch  $\text{Ca}^{2+}$ . Ihre Struktur ermöglicht es, daß nicht alle Koordinationsstellen des Metalls

belegt sind. Die freien Stellen sind locker mit Lösemittel-Molekülen besetzt und können durch einen stärkeren Bindungspartner, z. B. einem Protein, ersetzt werden.

Die immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie wird hauptsächlich zur Aufreinigung von Proteinen und Peptiden verwendet. Eine Übersicht über die stetig wachsende Anwendung der IMAC geben Sulkowski [38], Fatiadi [39] und Kagedal [40]. Zusätzlich zur Proteinreinigung wird die IMAC auch in anderen analytischen Applikationen verwendet, wie dem Mapping proteolytischer Abbauprodukte, bei der Analyse von Peptid-Aminosäure-Verbindungen oder der Aufklärung von Protein-Oberflächenstrukturen [41].

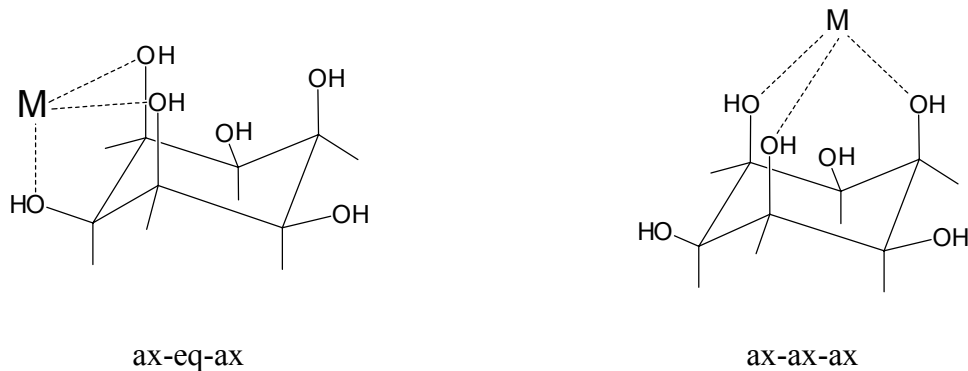
## 2.5 Metallkomplexe mit Zuckern

Kohlenhydrate sind als Energiequellen unentbehrlich für den lebenden Organismus und spielen ebenfalls in vielen weiteren biologischen Funktionen eine wichtige Rolle. Untersuchungen über Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Metallionen wurden durch die Entdeckung, daß viele Zucker-metabolisierende Enzyme mit Metallionen, wie  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  in den aktiven Zentren arbeiten, zunehmend interessant. Die bioanorganische Chemie von Zuckern ist im Vergleich zu den der Amino- und Nucleinsäuren ein weitgehend unerforschtes Gebiet. Das liegt vor allem an ihrer Multifunktionalität, der komplizierten Stereochemie, ihrer hygroskopischen Natur und ihrer relativ geringen Koordinationsfähigkeit zu Metallionen. Eine gute Übersicht über Zucker-Metall-Komplexe findet man bei Angyal [42], der jedoch hauptsächlich Monosaccharide untersucht hat. Er fand heraus, daß Monosaccharide sehr schwache Komplexe bilden. Auch andere Gruppen, wie z. B. Burger und Nagy [43] haben sich mit dem Thema Komplexbildung von Monosacchariden mit Metallen beschäftigt; die Ergebnisse sind jedoch kontrovers [44]. Eine Zusammenfassung der Untersuchungen der letzten 20 Jahre über das Gebiet der Komplexbildung von Kohlenhydraten mit Metallionen geben Gyurcsik und Nagy [45].

In wäßriger Lösung können die OH-Gruppen der Zucker mit Metallkationen Wechselwirkungen eingehen. Dafür ist mehr als eine OH-Gruppe pro Metallkation nötig, da die Konkurrenz des Lösemittels sonst zu groß ist. Es ist bekannt, daß die vorhandenen OH-Gruppen zusätzlich noch sterisch speziell angeordnet sein sollten, damit eine starke Komplexbildung stattfinden kann.



Kohlenhydrate in der Pyranose-Form können Komplexe mit Metallionen bilden, wenn drei benachbarte OH-Gruppen in der Stellung axial – äquatorial – axial (ax-eq-ax) stehen [46] (s. Abbildung 2.12, links), wie es z. B. beim cis-Inositol der Fall ist. Die seltene 1,3,5-triaxiale (ax-ax-ax) Anordnung, auch beim cis-Inositol vorhanden, ist ebenfalls gut geeignet zur Komplexbildung.

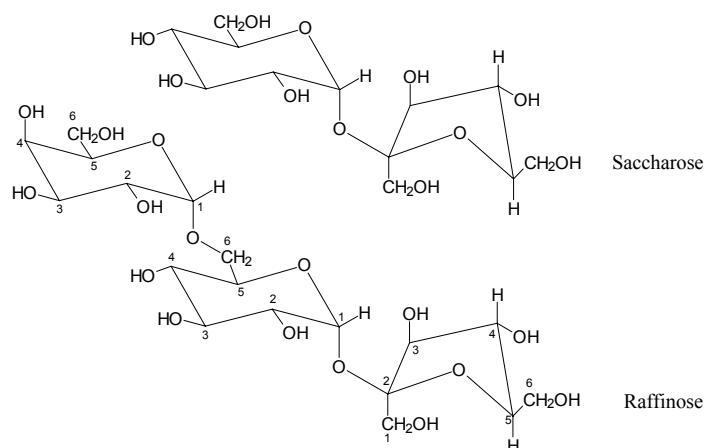


**Abb. 2.12:** Komplexbildung von kleinen (rechts) und großen (links) Metallionen mit cis-Inositol mit ax-eq-ax und ax-ax-ax Konformation der OH-Gruppen [nach 47].

Angyal stellte 1981 fest [48], daß Metallionen mit einem Radius größer als 0,8 Å eher mit der ax-eq-ax Anordnung von OH-Gruppen der Monosaccharide einen Komplex bilden und kleinere Kationen mit einem Radius unter 0,8 Å bevorzugt mit OH-Gruppen in ax-ax-ax Anordnung. Das hängt mit der Größe der sich bildenden Chelatringe und den dazugehörigen Regeln zusammen [49]: Große Metallionen chelatisieren mit geringerer sterischer Belastung als Zentralatom in einem Chelat-Fünfring. Die ax-eq-ax Struktur maximiert die Anzahl der Chelat-Fünfringe, bei welchen das große Metallion das Zentralion darstellt. Kleine Metallionen bevorzugen die ax-ax-ax Struktur, da diese die Bildung von Chelat-Sechsringen mit dem Kation begünstigen.

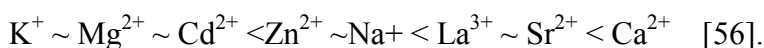
In der Furanose-Form ist die günstigste Konformation zur Komplexbildung mit Metallionen mit drei benachbarten OH-Gruppen in cis-cis-Anordnung. In Oligo- und Polysacchariden schließlich nimmt der Grad der Komplexbildung gewöhnlich mit steigender Kettenlänge zu, teils wegen der größeren Zahl der Komplexbildungsmöglichkeiten im Molekül und teils wegen der Quervernetzung zwischen den Ketten, der in einer in günstigen Bindungsumgebung resultiert [43].

Der Aufbau von Saccharose und Raffinose in Abbildung 2.13 zeigt, daß beide Zucker nicht die ideale axial – äquatoriale – axiale Konformation der OH-Gruppen besitzen. Trotzdem wurden schon einige Saccharose-Komplexe mit Metallionen entdeckt, so z. B. ein Eisen-Saccharose-Komplex [50], Saccharose-Komplexe mit Mangan [51] und Komplexe mit Calcium [52; 53] und ein Raffinose-Komplex mit Eisen bei pH 12,5 [54].



**Abb. 2.13: Schematischer Aufbau von Saccharose (oben) und Raffinose (unten).**

Doch nicht nur die Konformation der Zucker, sondern auch die Größe der verwendeten Metallionen sind, wie bereits erwähnt, wichtig für die Komplexbildung. Allgemein stellte Angyal schon 1972 fest, daß man Metall-Kationen nach zunehmender Tendenz zur Komplexbildung mit Zuckern ordnen kann [55], (hier z. B. für D-Glucose):



Die Reihenfolge ändert sich jedoch für verschiedene Zucker. Gleichzeitig ist auch der Radius der Metallkationen entscheidend. Der optimale Radius für die Komplexbildung mit Kohlenhydraten ist etwa 100 pm ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ). Größere und kleinere Kationen bilden schwächer wirkende Komplexe. Generell bilden Metallionen mit höheren Ladungen (+3 oder +2) stärkere Komplexe als die einwertigen [57]. Härmäläinen und Lönnberg [58] konnten jedoch nachweisen, daß der Ionenradius eine größere Rolle als die Ladungszahl spielt, da  $\text{Al}^{3+}$  keine stärkeren Komplexe mit Zuckern bildet als  $\text{Na}^+$ .

Die Stärke einer Komplexbildung zwischen einem Metall und einem Kohlenhydrat kann man anhand der Komplexbildungskonstante bestimmen. Jedoch ist die genaue Bestimmung dieser Konstanten schwierig und es ist häufig unmöglich, die Ergebnisse unterschiedlicher Versuchsanordnungen miteinander zu vergleichen [58].

### 3 Experimenteller Teil

#### 3.1 Entwicklung einer geeigneten Prozeß-Analytik

Ziel dieser Arbeit ist, Raffinose aus der sogenannten S1b-Fraktion (vgl. Kapitel 1.3) zu isolieren. Verschiedene chromatographische Trennmethode sollen auf ihre Eignung für die Trennung von Saccharose – Raffinose getestet werden.

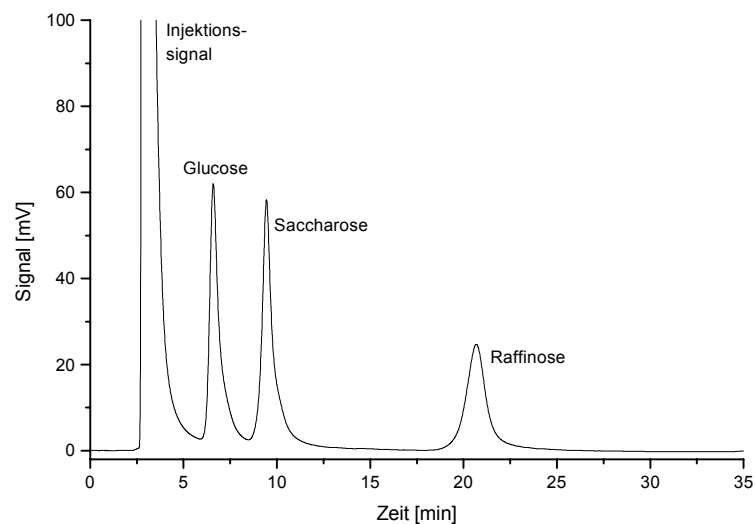
Die analytische Bestimmung von Kohlenhydraten kann auf vielerlei Wegen erfolgen: Dünnschicht-Chromatographie, Gaschromatographie, Flüssig-Chromatographie (LC), Kapillarelektrophorese und nicht zuletzt HPLC-Methoden werden in der Literatur erwähnt. Die Dünnschicht-Chromatographie (DC) stellt neben der Gaschromatographie (GC) die klassische Bestimmungsmethode dar. Bei der GC nimmt jedoch die Vorderivatisierung der Zucker in Trimethylsilylether sehr viel Zeit in Anspruch [59], daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Analytik mittels HPLC durchgeführt. In der HPLC-Analytik können verschiedene Systeme zum Einsatz kommen. Eine gute Übersicht geben Churms [60; 61], Clarke [62] und Herbreteau [63]. Es wird unterschieden zwischen Normalphasen-Verteilungschromatographie auf Silicagel-Basis, modifiziert mit Amino- oder Cyano-Gruppen, Ionenaustauscher-Materialien in  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Na}^+$ -,  $\text{H}^+$ - oder  $\text{Pb}^{2+}$ -Form und Ionenchromatographie gekoppelt mit gepulster amperometrischer Detektion. Bei den Kationenaustauschersäulen dient als Elutionsmittel bidestilliertes Wasser bei erhöhten Temperaturen (70–80 °C). Der Retentionsmechanismus wird allgemein als eine Kombination von Liganden-Austausch, hydrophobischer Adsorption und Ionen- oder Größenausschluß beschrieben [64]. Hier spielen also andere Faktoren als die Komplexbildung zwischen einem Kohlenhydrat und einem Metallion eine Rolle.

Um die Effizienz der verwendeten chromatographischen Methode für die Trennung von Saccharose und Raffinose zu ermitteln, wurde folgende HPLC-Methode entwickelt: Die analytische Bestimmung der Kohlenhydrate in den Proben (Standardproben und verdünnte S1b-Fraktion) erfolgte über eine Amino-Säule (Merck KGaA, Darmstadt) in einem Merck–Hitachi HPLC-System. Die kovalent gebundenen Aminogruppen der stationären Phase wirken in Wasser als schwacher Ionenaustauscher und trennen mit einem Wasser/Acetonitril-Gemisch als Laufmittel hervorragend Zucker. Die Aminogruppe bewirkt eine Entmischung des Eluenten in eine wasserreiche stationäre Phase. Die Probe verteilt sich im Eluenten und der mit Wasser angereicherten stationären Phase und die Kohlenhydrate werden so getrennt.

**Tab. 3.1: Übersicht der verwendeten Prozeßparameter für die HPLC-Analytik.**

Säule, Vorsäule	LiChrospher 100 NH <sub>2</sub> , 5 µm (Merck KGaA)
Elutionsmittel	Acetonitril – Bidest. Wasser (80:20)
Flußrate	1 mL/min
Temperatur	30 °C
Detektion	Brechungsindex

Abbildung 3.1 zeigt als Beispiel das HPLC-Chromatogramm einer Zuckerlösung. Die Zucker werden in der Reihenfolge ansteigender Molekülmasse aufgetrennt, d. h. erst werden die Monosaccharide, dann die Disaccharide und schließlich die Trisaccharide eluiert.

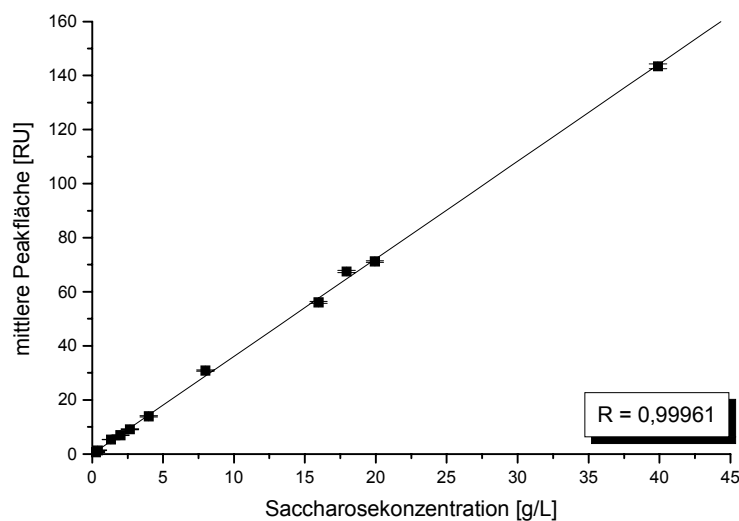


**Abb. 3.1: HPLC-Chromatogramm einer Zuckerlösung.**  
**Probe: Glucose (7,4 g/L), Saccharose (7,7 g/L) und Raffinose (7,5 g/L).**  
**Säule: LiChrospher 100 NH<sub>2</sub>, Laufmittel: Acetonitril – Bidest. Wasser (80:20), 1 mL/min, 30 °C.**

### 3.1.1 Linearer Bereich der verwendeten HPLC-Methode

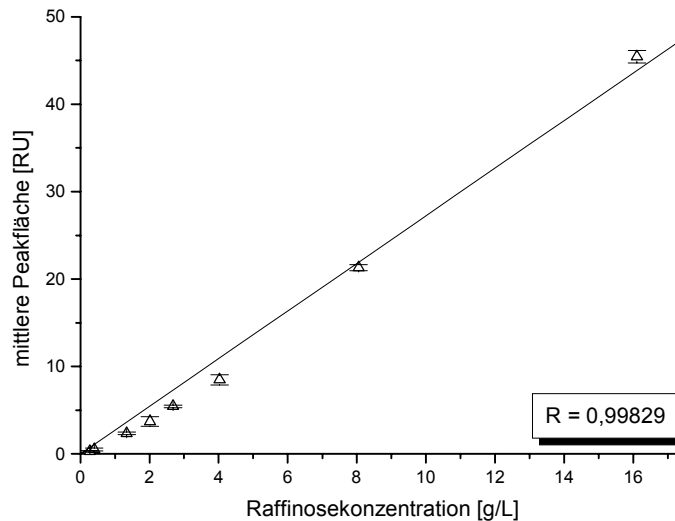
Zur Gewährleistung zuverlässiger Analysenergebnisse muß die Analytik in einem linearen Signalbereich durchgeführt werden. Saccharose kann in realen Proben in einem fast zehnfachen Überschuß gegenüber Raffinose vorliegen. Daher ist es wichtig, daß die Saccharosekonzentration auch in einem hohen Konzentrationsbereich zuverlässig bestimmt werden kann. In der von der Amino GmbH, Frellstedt, zur Verfügung gestellten unverdünnten S1b-Fraktion liegt die Saccharose-Konzentration bei 412 g/L (vgl. Tabelle 1.1). Die zähflüssige Lösung wird vor dem Einsatz 1:5 mit bidest. Wasser verdünnt, um die Viskosität zu erniedrigen. Durch den zusätzlichen Verdünnungseffekt während der chromatographischen Auftrennung (ca. Faktor zwei), ist eine maximale Analytenkonzentration von 40 g/L für Saccharose und 5 g/L für Raffinose zu erwarten. Daher muß die verwendete Methode in diesem Konzentrationsbereich einen linearen Zusammenhang der jeweiligen Zucker-Konzentration zur Signalfläche liefern. Anderenfalls müßten die Proben zweimal gemessen werden: Einmal, um die Raffinosekonzentration bestimmen zu können und ein weiteres Mal eine verdünnte Probe, um die höhere Saccharosekonzentration zu ermitteln.

Der lineare Konzentrationsbereich der verwendeten Säule ist in Abbildung 3.2 für Saccharose und in Abbildung 3.3 für Raffinose dargestellt. Die lineare Regression erfolgt mit den Meßpunkten einer Dreifachbestimmung der einzelnen Proben. Die verwendeten Zuckerlösungen wurden in bidest. Wasser angesetzt.



**Abb. 3.2:** Lineare Regression für die Saccharosebestimmung im Bereich von 0,27 – 39,88 g/L. Säule: LiChrospher 100 NH<sub>2</sub>, Laufmittel: Acetonitril – bidest. Wasser (80:20), 1 mL/min, 30 °C.

Für Saccharose wurden Konzentrationen von 0,27 g/L bis 39,88 g/L und für Raffinose von 0,27 g/L bis 16,10 g/L gemessen. Für den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Zucker-Konzentration und Signalfläche. Der Regressionskoeffizient beträgt für die Saccharosebestimmung  $R = 0,99961$ , für die Raffinosebestimmung  $R = 0,99829$ .



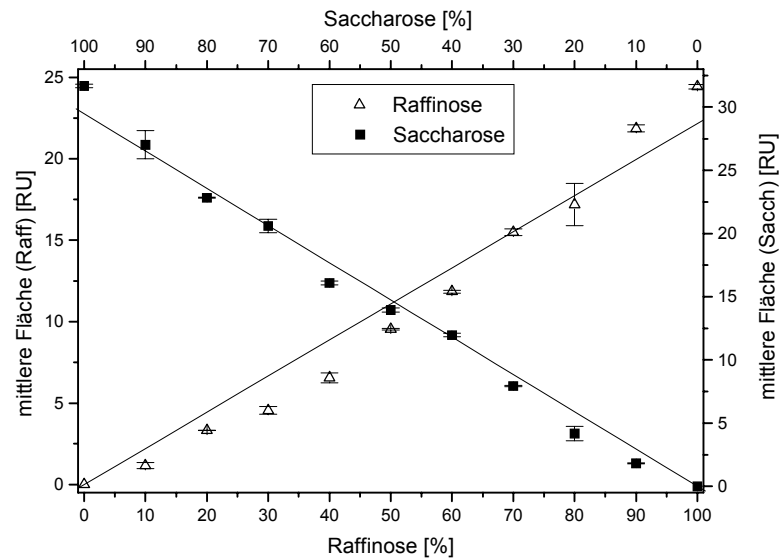
**Abb. 3.3:** Lineare Regression für die Raffinosebestimmung im Bereich von 0,27 – 16,10 g/L. Säule: LiChrospher 100 NH<sub>2</sub>, Laufmittel: Acetonitril – bidest. Wasser (80:20), 1 mL/min, 30 °C.

Durch die Linearität der verwendeten HPLC-Methode in dem relevanten Konzentrationsbereich ist es möglich, in den realen Proben mit einer einzigen Messung gleichzeitig die Saccharose- wie auch die Raffinose-Konzentrationen zu bestimmen.

### 3.1.2 Charakterisierung der HPLC-Methode

#### 3.1.2.1 Genauigkeit der Methode in Abhängigkeit von der Probenzusammensetzung

Hier wird untersucht, in wie weit die Konzentrationsbestimmung von Saccharose und Raffinose von der Zusammensetzung der Probe abhängig ist. Dazu werden zwei Lösungen mit je 10 g/L Saccharose bzw. Raffinose im Verhältnis 0 %/100 % bis 100 %/0 % in 10 %-Schritten gemischt und danach die Zucker-Konzentrationen bestimmt. Die Messungen erfolgen als Dreifachbestimmung. Der berechnete Mittelwert mit der jeweiligen Standardabweichung ist in Abbildung 3.4 aufgetragen.



**Abb. 3.4:** Signalfläche im Verhältnis unterschiedlicher Probenzusammensetzungen für Raffinose und Saccharose.

Der Regressionskoeffizient für die Bestimmung der Saccharose beträgt 0,99601, der für Raffinose liegt bei 0,98963. Die Untersuchung zeigt, daß die Zusammensetzung der Probe im untersuchten Konzentrationsbereich keinen Einfluß auf die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung der Analyten hat.

### 3.1.2.2 Spezifität der HPLC-Methode

Zur Untersuchung der Spezifität der HPLC-Methode werden die Proben mit einem internen Standard versetzt, der eine von Saccharose und Raffinose verschiedene Retentionszeit besitzt. Dieses trifft auf das Disaccharid Melibiose zu, welches zwischen Saccharose und dem Trisaccharid Raffinose bei einer Retentionszeit von etwa 15 Minuten eluiert wird. Die Melibiosekonzentration beträgt bei den Versuchen 5,08 g/L, die Raffinose- und Saccharosekonzentration wird in einem Bereich von 1,5 – 15 g/L variiert. Die Proben werden jeweils dreimal vermessen. Aus den erhaltenen Ergebnissen werden der Mittelwert der Signalflächen  $\bar{A}$  und die jeweilige Standardabweichung (sd) für die drei Kohlenhydrate berechnet.

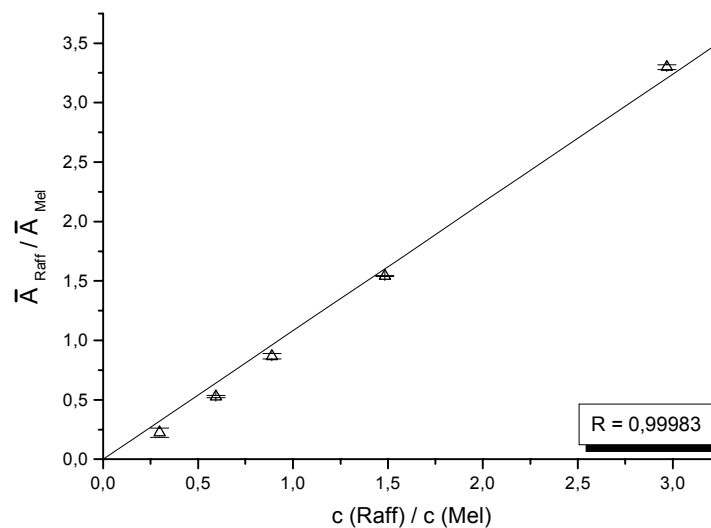
Der Fehler ergibt sich als Summe der relativen Einzelfehler  $\left( \frac{\text{sd}(\text{Raff})}{\bar{A}(\text{Raff})} + \frac{\text{sd}(\text{Mel})}{\bar{A}(\text{Mel})} \right)$ .

Die Tabelle 3.2 gibt am Beispiel der Raffinosebestimmung einen Überblick über die Ergebnisse in Gegenwart des internen Standards Melibiose (Mel).

**Tab. 3.2: Kalibration für Raffinose (Raff) bei Anwesenheit eines internen Standards.**

c (Raff) [g/L]	$\bar{A}$ (Raff) [mV·s]	sd (Raff)	c (Mel) [g/L]	$\bar{A}$ (Mel) [mV·s]	sd (Mel)	Fehler	$\frac{\bar{A}(\text{Raff})}{\bar{A}(\text{Mel})}$	$\frac{c(\text{Raff})}{c(\text{Mel})}$
1,51	30.1587	10.306,2	5,08	1,34·E6	6.570,3	0,039	0,23	0,30
3,02	69.9234	5.196,9	5,08	1,33·E6	3.285,1	0,010	0,53	0,60
4,52	1,17·E6	11.289,0	5,08	1,35·E6	15.588,9	0,021	0,87	0,89
7,54	2,04·E6	5505,0	5,08	1,32·E6	1.278,4	0,004	1,54	1,48
15,08	4,33·E6	60.400,3	5,08	1,31·E6	7.988,1	0,020	3,30	2,97

Trägt man die Quotienten der Konzentrationen (Raffinose und Melibiose) gegen den Quotienten der Peakflächen beider Zucker auf, erhält man den in Abbildung 3.5 gezeigten Verlauf.



**Abb. 3.5: Kalibration für Raffinose bei Verwendung eines internen Standards.**

Die Verwendung eines internen Standards (Melibiose) zeigt ebenfalls, daß die verwendete HPLC-Methode in dem untersuchten Konzentrationsbereich präzise Ergebnisse in Bezug auf die Konzentrationsbestimmung von Saccharose und Raffinose liefert. Der Regressionskoeffizient dieser Auftragung liegt für Raffinose bei 0,99983, für Saccharose bei 0,99893.



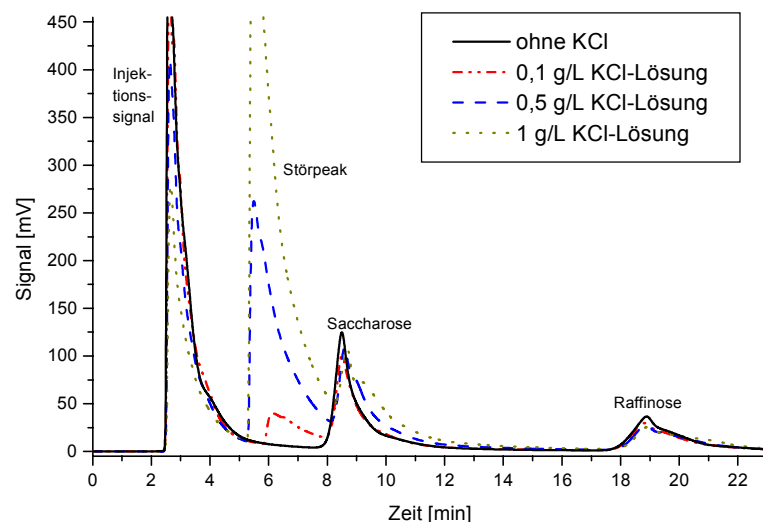
### 3.1.2.3 Einfluß von Salzen

Wie schon in Kapitel 1.2 erwähnt, werden bei der chromatographischen Auftrennung von Melasse bei der Amino GmbH viele Salze aus der Melasse zeitgleich mit der Raffinose eluiert. Dadurch ist die Gewinnung von Raffinose mit akzeptabler Reinheit an dem Standort technisch zur Zeit nicht möglich. Die Fraktion S1b (30.–40. Minute) wurde für die hier vorliegende Arbeit bei der Amino GmbH, Frelstedt, entsalzt [19; 20], um den störenden Einfluß hoher Salzkonzentrationen in der Aufarbeitung zu verringern. In diesem Abschnitt soll nun untersucht werden, inwieweit Salze Einfluß auf die verwendete HPLC-Methode haben.

Es werden zwei verschiedene Modellsalze, Kaliumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat, auf ihren Einfluß hin untersucht. Kalium stellt etwa 70 % der Gesamtkationen der Melasse (vgl. Kapitel 1.1); bei den Anionen bilden Chloridionen etwa 48 % der Gesamtanionen-Konzentration anorganischer Säuren [5]. Damit sind dies die Hauptionen in der Melasse. In der immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie wird unter anderem häufig Phosphatpuffer als Elutionsmittel eingesetzt [65; 66]. Deshalb soll schon im Vorfeld untersucht werden, ob dieses Salz einen störenden Einfluß auf die eingesetzte HPLC-Methode hat.

Es werden Zucker-Standards (30,15 g/L Saccharose und 20,05 g/L Raffinose) mit Lösungen unterschiedlicher Salzkonzentrationen gemischt und chromatographisch aufgetrennt.

#### a) Kaliumchlorid

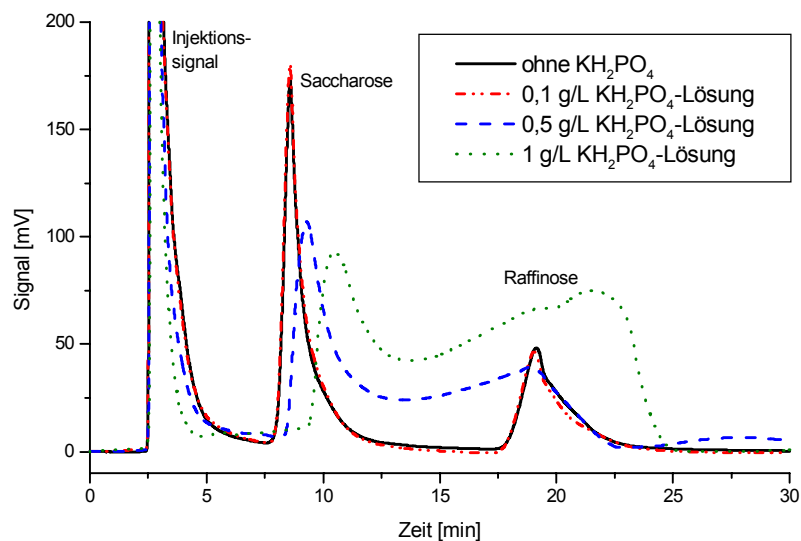


**Abb. 3.6: Einfluß von Kaliumchlorid auf die Trennung von Saccharose und Raffinose.**

Deutlich ist in Abbildung 3.6 ein Störpeak bei einer Retentionszeit von sechs Minuten zu sehen. Je höher die Konzentration von Kaliumchlorid (KCl), desto größer wird der Störpeak. Zudem zeigt der Saccharosepeak bei höherer KCl-Konzentration ein verstärktes Tailing. Der Einfluß von KCl auf das Elutionssignal der Raffinose ist eher gering. Eine präzise Bestimmung von Saccharose ist somit nicht mehr möglich, da schon KCl-Konzentrationen ab 0,5 g/L das Meßverfahren stören.

#### b) Kaliumdihydrogenphosphat

Kaliumdihydrogenphosphat- ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -) Lösung zeigt einen noch größeren störenden Einfluß auf die verwendete HPLC-Methode. In Abbildung 3.7 erkennt man deutlich, daß der Saccharose-Peak nicht nur extrem seine Form verändert, sondern auch in seiner Retentionszeit zu größeren Werten verschoben wird. Die Raffinose ist bei der maximalen  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration (1 g/L) nicht mehr als Peak erkennbar.



**Abb. 3.7:** Einfluß von Kaliumdihydrogenphosphat auf die Trennung von Saccharose und Raffinose.

Durch das starke Tailing und das Verschieben der Retentionszeiten ist eine eindeutige Bestimmung der Kohlenhydrate in Gegenwart von Kaliumdihydrogenphosphat nicht mehr möglich. Nur bei geringen Salzkonzentrationen von 0,1 g/L liefert die Methode zuverlässige Ergebnisse.

### 3.1.3 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, daß die verwendete HPLC-Analysenmethode mit einer Aminosäule und einem Acetonitril-Wasser-Gemisch als Eluent zur Trennung von Saccharose und Raffinose auch bei sehr unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen der beiden Analyten und bis in hohe Konzentrationen von Saccharose und Raffinose geeignet ist.

Anhand von zwei Modellsalzen (Kaliumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat) konnte gezeigt werden, daß die Trennleistung bereits bei geringen Salzkonzentrationen stark beeinflusst wird: Die chromatographische Auflösung sank mit steigender Salzkonzentration, bei  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  kam es neben Peakverbreiterung und Tailing auch zu einer Verschiebung der Elutionszeiten. Die verwendete HPLC-Methode ist somit nur für die Untersuchung von der entsalzten S1b-Fraktion geeignet, bzw. müßten die einzelnen Proben anderenfalls vor der Analyse entsalzt werden. Der Einsatz von salzhaltigen Laufmitteln bei den folgenden chromatographischen Trennversuchen ist somit ausgeschlossen.

## 3.2 Trennung von Saccharose und Raffinose mittels der immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie

### 3.2.1 Einführung

Wie in Kapitel 2.1 erwähnt, findet die immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) derzeitig überwiegend bei der Aufreinigung von Proteinen Anwendung. Da zahlreiche Komplexe von Zuckern mit Metallionen bekannt sind, soll versucht werden, Raffinose und Saccharose mit Hilfe dieser Technik zu trennen.

Das Säulenmaterial (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) besteht aus Sepharose, an die die chelatisierende Gruppe Iminoacetessigsäure (IDA) gebunden ist. Die Partikel besitzen einen mittleren Durchmesser von 34  $\mu\text{m}$ . Die Matrix bildet stabile Komplexe mit Metallionen (z. B.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Anzahl von OH-Gruppen im Molekül sollten die Zuckermoleküle mit abweichender Affinität an die Metallionen binden [43].

Die Auswahl der Metallionen für die nachfolgend vorgestellten Versuche erfolgt basierend auf Grundlagenliteratur und auf Veröffentlichungen über Metallkomplexe mit Zuckern (vgl. Kapitel 2.5). Als weiteres Kriterium sollen sich die Atomradien der verwendeten Metalle in ihrer Größe möglichst stark unterscheiden. Bekannt ist, daß Monosaccharide bevorzugt Komplexe mit Metallionen mit einem Durchmesser von 100 pm bilden [42]. Bei Oligosacchariden spielen die sterische Anordnung der OH-Gruppen und die Größe der Zucker im Verhältnis zur Anzahl an OH-Gruppen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Komplexbildung.

Mit  $Mg^{2+}$  wird ein relativ kleines zweiwertiges Metallkation gewählt, mit  $Pb^{2+}$  ein verhältnismäßig großes.  $Co^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  liegen mit ihren entsprechenden Radien dazwischen.

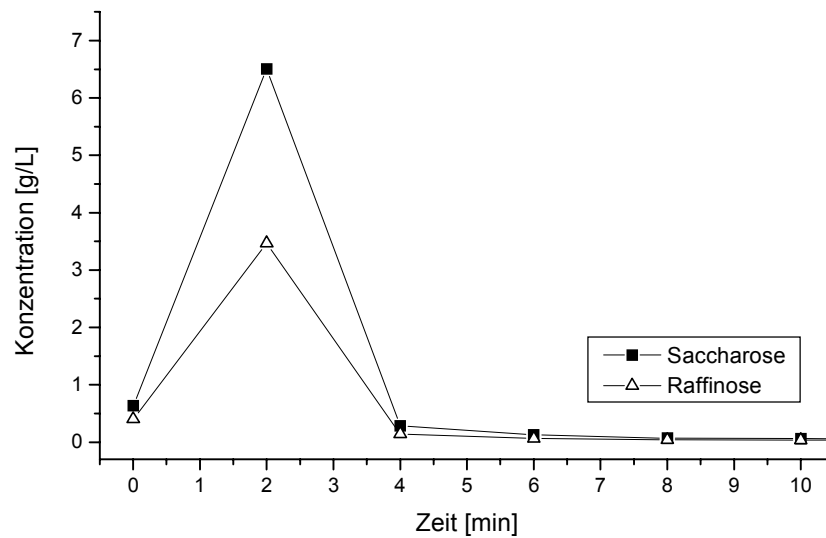
**Tab. 3.3: Atomradien der verwendeten Metallionen [67]**

Kation	$Mg^{2+}$	$Co^{2+}$	$Ca^{2+}$	$Pb^{2+}$
Radius [pm]	66	72	99	120

Nachdem die jeweiligen Metallionen an die Säulenmatrix gekoppelt wurden (vgl. Kapitel 5.1.2), werden jeweils 300  $\mu$ L einer Saccharose-Raffinose-Lösung (10 g/L Saccharose und 6 g/L Raffinose) auf die Säule gegeben. Als Laufmittel wird bidest. Wasser verwendet. Es werden Fraktionen über einen Zeitraum von einer Minute (bzw. zwei Minuten) gesammelt und anschließend mittels HPLC analysiert. Die ermittelten Zuckerkonzentrationen in den Fraktionen werden gegen die Zeit aufgetragen.

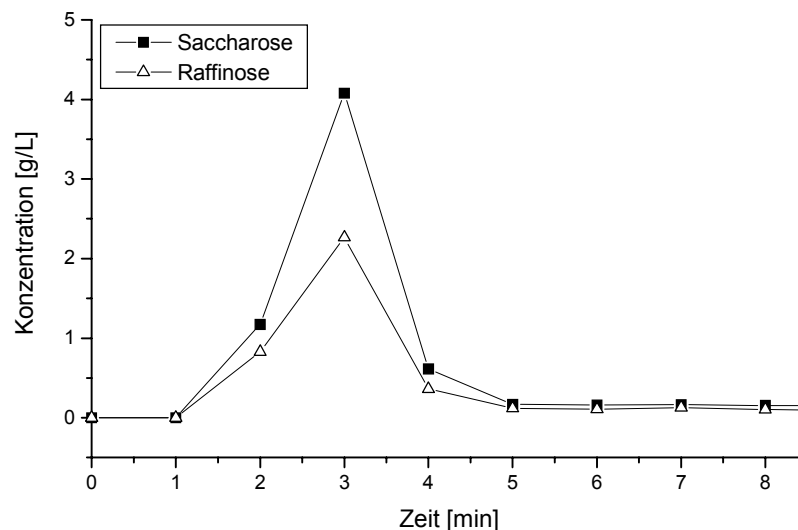
### 3.2.2 Ergebnisse

Abbildungen 3.8 und 3.9 zeigen beispielhaft die Läufe mit einer  $Co^{2+}$ - und einer  $Ca^{2+}$ -beladenen IMAC-Säule. Die Ergebnisse der Versuche mit den anderen Ionen sind vergleichbar.



**Abb. 3.8:** Trennung von Saccharose und Raffinose auf einer IMAC-Säule mit  $\text{Co}^{2+}$  beladen. Laufmittel: Bidest. Wasser; RT, AV 300  $\mu\text{L}$ .

Beide Zucker werden nicht adsorbiert, sondern ohne Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial sofort wieder eluiert. Eine Trennung von Raffinose oder Saccharose erfolgt nicht. Auch die Verwendung von  $\text{Ca}^{2+}$ , das durch seine Größe bevorzugt Kohlenhydrate komplexieren sollte, zeigt kein besseres Ergebnis. Lediglich die Retentionszeit ist geringfügig größer.



**Abb. 3.9:** Trennung von Saccharose und Raffinose auf einer IMAC-Säule mit  $\text{Ca}^{2+}$  beladen. Laufmittel: Bidest. Wasser; RT, AV 300  $\mu\text{L}$ .

### 3.2.3 Zusammenfassung

Wie zu erkennen ist, eignet sich das Prinzip der immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) in der verwendeten Versuchsdurchführung nicht zur Auftrennung der Zucker, da keine Trennung der beiden Kohlenhydrate erfolgt. Offenbar findet keine Komplexbildung statt.

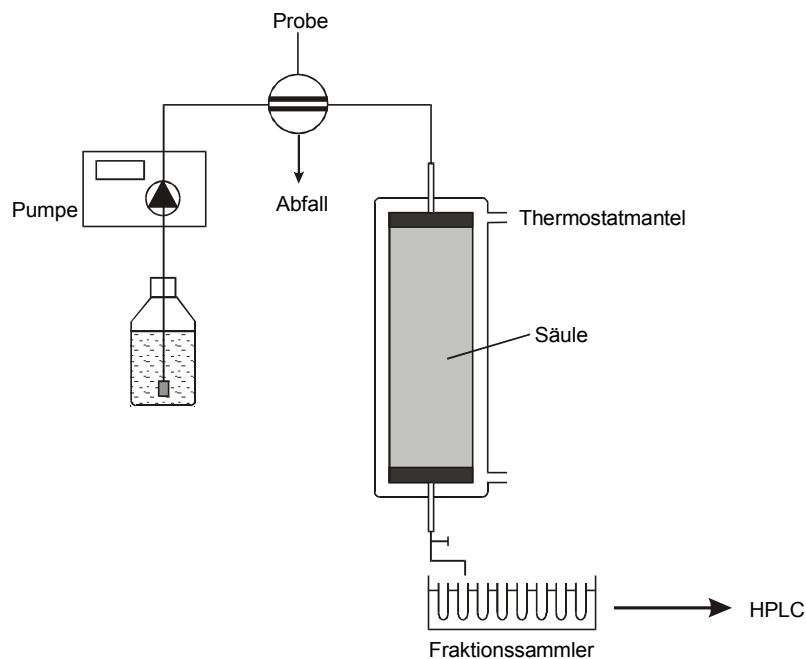
Pufferlösungen (z. B. Phosphat-Puffer) können als Laufmittel, wie sie bei Proteintrennungen mit der IMAC üblicherweise benutzt werden [65; 66], nicht eingesetzt werden, da die Salze die Analytik stark beeinflussen (s. Kapitel 3.1.2.3).

Eine weitere Möglichkeit, um stabile Komplexe mit Zuckern zu erhalten, ist die in einigen Veröffentlichungen angesprochene Erhöhung des pH-Wertes des Laufmittels [68]. Dadurch werden Zuckeranionen gebildet, die eine stärkere Bindung mit den Metallkationen eingehen können. Die dabei zusätzlich eingebrachten Ionen würden jedoch wieder die Analytik stören. Aufgrund der schlechten Trennung wird von weiteren Versuchen mit der IMAC in der vorliegenden Arbeit abgesehen.

### 3.3 Trennung von Saccharose und Raffinose mit Hilfe der Gel-Chromatographie

In der Gel-Chromatographie verlassen die gelösten Substanzen das Gelbett in der Reihenfolge abnehmenden Molekulargewichts. Die in den nachfolgend vorgestellten Experimenten verwendeten Gelmaterialien sind zum Teil auf Saccharid-Basis (Sephadex-Gele), zum Teil auf Polyacrylamid-Basis (Toyopearl-Gel, Bio-Gel P).

Die folgende Abbildung 3.10 zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten Apparatur.



**Abb. 3.10: Schematischer Aufbau der verwendeten Apparatur.**

Wenn nicht anders angegeben, werden alle Versuche bei Raumtemperatur (18–25 °C) und mit bidest. Wasser als Laufmittel durchgeführt. Die Fraktionen werden über einen Zeitraum von je einer Minute gesammelt und anschließend mit Hilfe der HPLC analysiert. Die Bestimmung der chromatographischen Kenngrößen (Retentionszeit, Peakbreite) für die einzelnen Läufe erfolgt durch Anpassung der Ergebnisse an eine theoretische Kurve (s. Kapitel 2.2).

Es werden zwei Glassäulen mit folgenden Abmessungen verwendet:

**Tab. 3.4: Verwendete Glassäulen**

	Säulenlänge	Säulen- durchmesser	max. mgl. Betthöhe	verwendete Betthöhe	verwendetes Bettvolumen
<b>Säule 1</b>	230 mm	15 mm	200 mm	190 mm	33,5 mL
<b>Säule 2</b>	1000 mm	15 mm	950 mm	800 mm	141,4 mL

Da beide Säulen den gleichen Durchmesser haben, wird im Weiteren zur Unterscheidung nur die Betthöhe genannt.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die wesentlichen Unterschiede der verwendeten Gelmaterialien (Herstellerangaben).

**Tab. 3.5: Eigenschaften der verwendeten Gelmaterialien (Herstellerangaben).**

Name	Polymer	Durchmesser, hydr. [ $\mu\text{m}$ ]	Porengröße [pm]	Ausschlußgrenze [Da]
Sephadex G-15	Dextran	60–181	keine Angaben	100–5.000
Sephadex G-25, fine	Dextran	34–138		< 1.500
Bio-Gel P-2, fine	Polyacrylamid	45–90		800–4.000
Toyopearl HW-40 S	Polyacrylamid	20–40	50	3.000

Der Vorteil der vollsynthetischen Polyacrylamid-Gele besteht darin, daß sich keine Saccharide von der Matrix lösen können, die das Analysenergebnis beeinflussen könnten.

### 3.3.1 Sephadex G-15 und Sephadex G-25

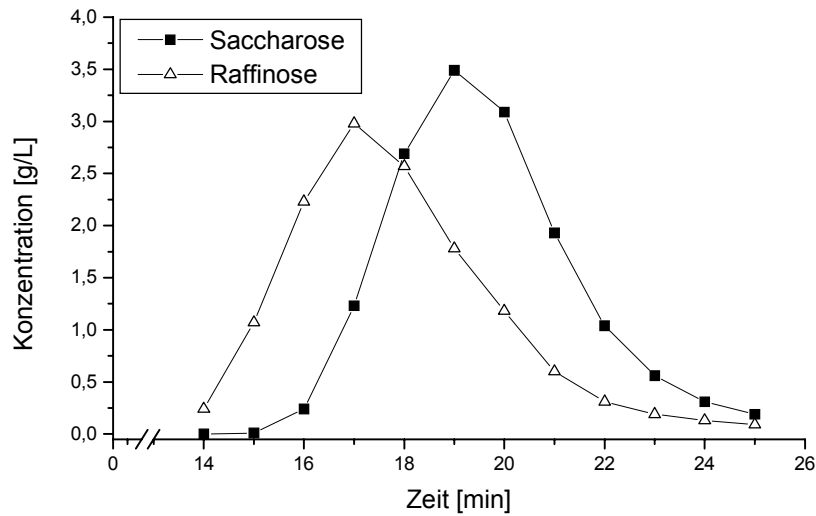
Bei Sephadex-Materialien (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) handelt es sich um Dextrane, die mit Epichlorhydrin vernetzt sind.

Für die Versuche werden Lösungen aus Raffinose und Saccharose immer frisch hergestellt. Daher werden unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse der beiden Zucker bei den einzelnen Versuchen verwendet, die jedoch so gering ausfallen, daß kein Einfluß auf die Trennqualität der Säulen bewirkt wird.

#### 3.3.1.1 Ergebnisse für Sephadex G-15

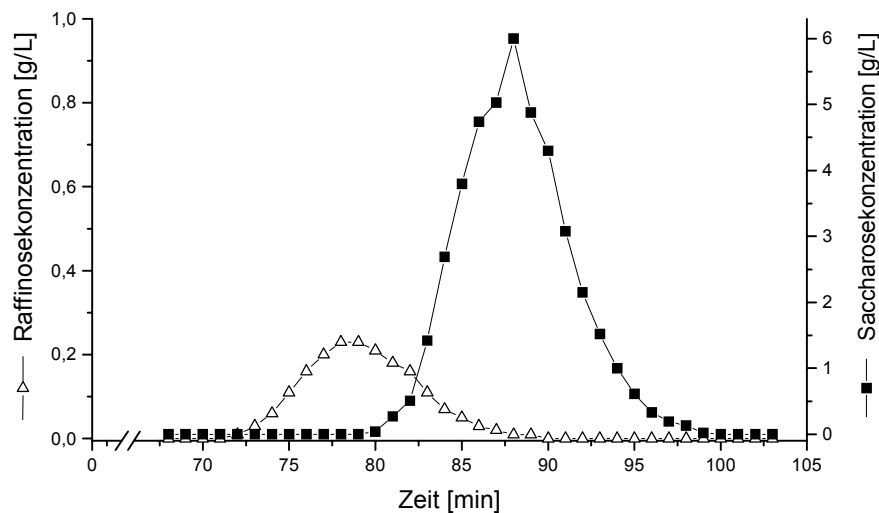
Der Lauf mit einer Sephadex G-15 Säule 1 (190 mm) mit einem Auftragungsvolumen (AV) von 400  $\mu\text{L}$  führt nur zu einer teilweisen Trennung der beiden Zucker. Die Peaks überlagern sich stark (s. Abbildung 3.11).





**Abb. 3.11:** Sephadex G-15, Betthöhe: 190 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,9 mL/min; RT.  
 Probe: 33,4 g/L Saccharose, 27,5 g/L Raffinose in bidest. Wasser, AV 500  $\mu$ L.

Eine Verlängerung der Trennstrecke (Säule 2, 800 mm) führt bei der Verwendung des gleichen Säulenmaterials zu einer deutlich besseren Auftrennung, wie in Abbildung 3.12 zu erkennen ist.



**Abb. 3.12:** Sephadex G-15, Betthöhe 900 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,675 mL/min; RT.  
 Probe: 90,2 g/L Saccharose, 74,52 g/L Raffinose in bidest. Wasser, AV 400  $\mu$ L.

Durch die veränderte Säulenauslegung (4fache Länge) und die geringere Flußrate kann mit der gleichen Matrix eine noch deutlich bessere Trennung erzielt werden. Allerdings liegt die Wiederfindungsrate von Raffinose nur bei 6,3 %. Eine Ursache für diesen Verlust konnte auch bei einer Wiederholung des Versuches nicht gefunden werden.

Die Berechnung der chromatographischen Auflösung R nach Gleichung 2.1 (Kapitel 2.1) ergab für die beiden mit Sephadex G-15-Säulen folgendes Ergebnis (s. Tabelle 3.6):

**Tab. 3.6: Chromatographische Auflösung R der Saccharose-Raffinose-Trennung auf Sephadex G-15-Säulen.**

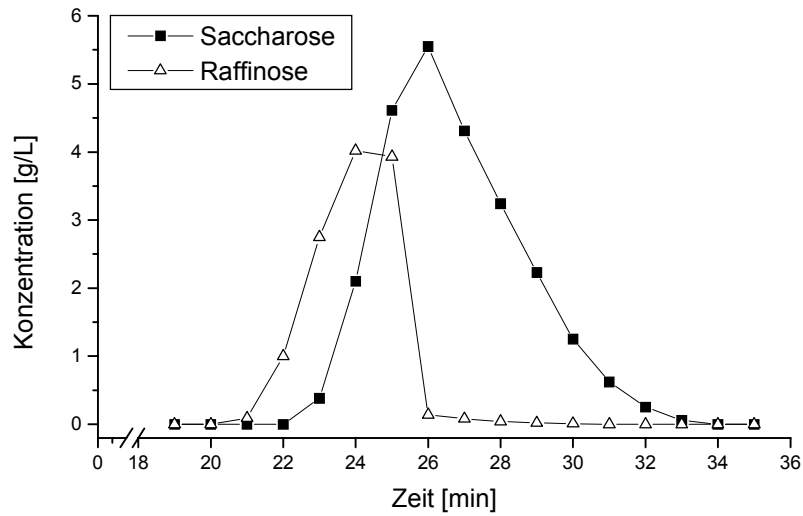
Betthöhe [mm]	Flußrate [mL/min]	t (Raff) [min]	t (Sacch) [min]	<b>R</b>
190	0,90	17,4	19,3	<b>0,29</b>
800	0,60	84,7	94,4	<b>0,75</b>
800	0,68	79,0	87,9	<b>0,70</b>

Man erkennt, daß selbst bei einer großen Betthöhe nur eine chromatographische Auflösung R von 0,75 erreicht werden kann. Aufgrund der Ergebnisse werden mit diesem Material keine weiteren Experimente durchgeführt.

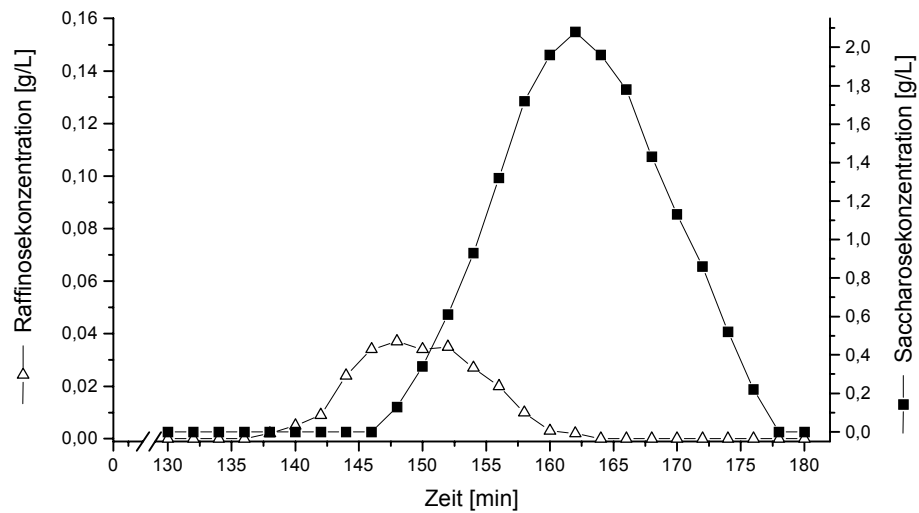
### 3.3.1.2 Ergebnisse für Sephadex G-25

Sephadex G-25 unterscheidet sich von Sephadex G-15-Material durch eine kleinere Korngröße (34–138  $\mu\text{m}$ ) und auch eine geringere Korngrößenverteilung.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen, daß sowohl mit Säule 1 (190 mm) als auch mit Säule 2 (800 mm) die Zucker nur unzureichend getrennt werden.



**Abb. 3.13:** Sephadex G-25, Betthöhe 190 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,9 mL/min; RT.  
 Probe: Saccharose 50,3 g/L, Raffinose 32,8 g/L in bidest. Wasser, AV 400  $\mu$ L.



**Abb. 3.14:** Sephadex G-25, Betthöhe 800 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,40 mL/min; RT.  
 Probe: Saccharose 65,7 g/L, Raffinose 22,7 g/L in bidest. Wasser, AV 400  $\mu$ L.

Die Werte für die chromatographischen Auflösungen R (s. Tabelle 3.7) liegen trotz der geringen Flußrate noch unter den berechneten Werten für die Sephadex G-15 Matrix.

**Tab. 3.7: Chromatographische Auflösung R der Saccharose-Raffinose-Trennung auf Sephadex G-25-Säulen.**

Bethöhe [mm]	Flußrate [mL/min]	t (Raff) [min]	t (Sacch) [min]	<b>R</b>
190	0,90	24,1	26,4	<b>0,38</b>
800	0,40	149,6	162,5	<b>0,54</b>
800	0,52	121,8	131,0	<b>0,50</b>

### 3.3.1.3 Zusammenfassung für Sephadex-Materialien

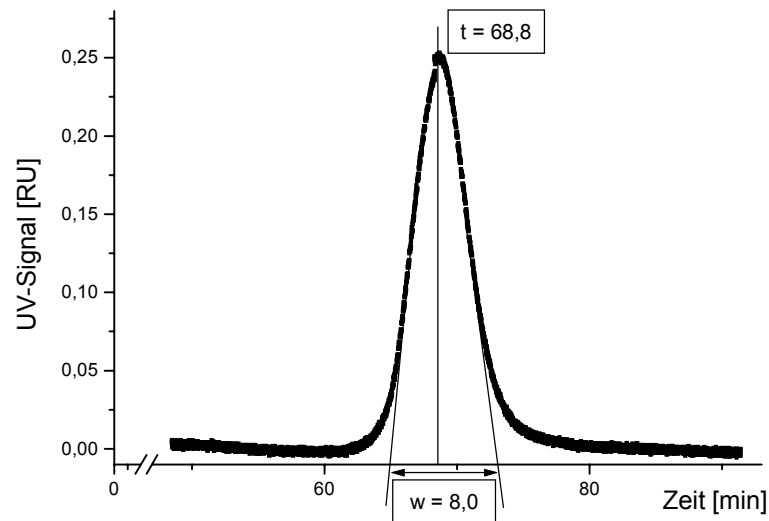
Es konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, daß sich kleine Kohlenhydrate mittels Gel-Chromatographischer Verfahren trennen lassen. Die beiden Sephadex-Materialien zeigen jedoch für Moleküle mit einem so geringen Größenunterschied wie bei Saccharose (MW 342,3) und Raffinose (MW 504,5) nur eine ungenügende Trennleistung. Ein Grund dafür kann der große Partikel-Querschnitt sein.

Bekannt ist, daß einheitliche Partikel auch in einem gleichmäßigen Säulenbett resultieren, wogegen unregelmäßig große Partikel die Trennung durch Bandenverbreiterung negativ beeinflussen. Im folgenden soll untersucht werden, ob synthetische Materialien mit einer geringeren Korngrößenverteilung bessere Ergebnisse liefern.

### 3.3.2 Bio-Gel P-2

Das Bio-Gel P-2-Trägermaterial (Bio-Rad, USA) wird durch Copolymerisation von Acrylamid und N, N'-Methylen-bis-acrylamid hergestellt. Die Partikelgröße von gequollenem Bio-Gel P-2-Material beträgt 45–90 µm.

In einem Vorversuch wird die Bodenzahl  $n$  (s. Kapitel 2.1) der Säule 1 durch Auswertung des Chromatogramms einer voll retardierenden Substanz (s. Abbildung 3.15) bestimmt. Es werden 100 µL 1 %iger Acetonlösung auf die Säule gegeben (vgl. Kapitel 5.1.3).



**Abb. 3.15:** Chromatogramm zur Bestimmung der Bodenzahl  $n$  einer Bio-Gel P-2 Säule 1.

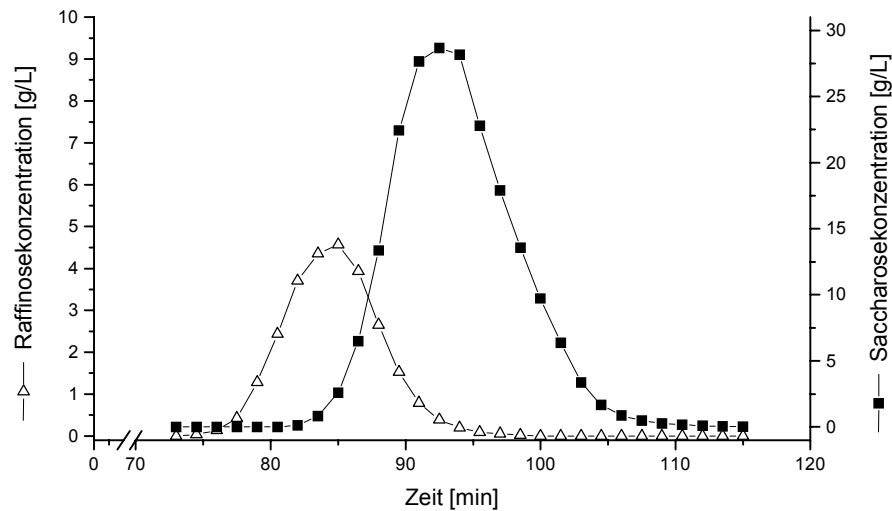
Für die Bestimmung der Bodenzahl benötigt man die Retentionszeit  $t$  und die Peakbreite  $w$  des Analyten. Die Retentionszeit  $t$  beträgt bei diesem Versuch 68,8 min und die Peakbreite  $w = 8,0$  min. Dieses ergibt nach Formel 2.2 (s. Kapitel 2.1) eine Bodenzahl  $n$  von 1174.

Bei den folgenden Versuchen werden, wenn nicht anders angegeben, 400  $\mu\text{L}$  Standardlösung 1 (s. Kapitel 5.1.3) auf Säule 1 gegeben. Dies entspricht 1,2 % des Gesamtbettvolumens.

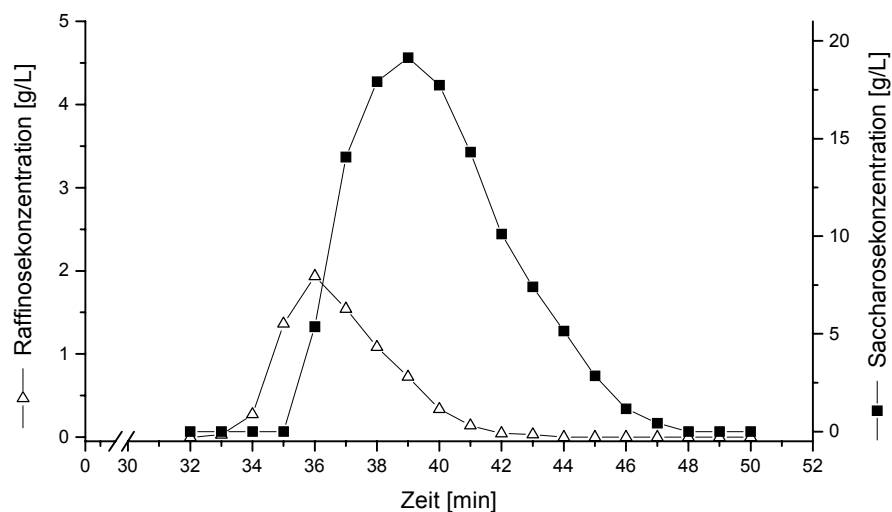
### 3.3.2.1 Versuche mit Standardlösungen

#### a) Versuche mit Standardlösungen bei konstanter Probenmenge

Für die Bio-Gel P-2-Säule 1 werden verschiedene Flußraten von 0,09 mL/min bis 0,57 mL/min getestet. Als Beispiele sind hier nur exemplarisch die Trennungen bei einer Flußrate von 0,23 mL/min und 0,49 mL/min graphisch dargestellt (siehe Abbildungen 3.16 und 3.17).



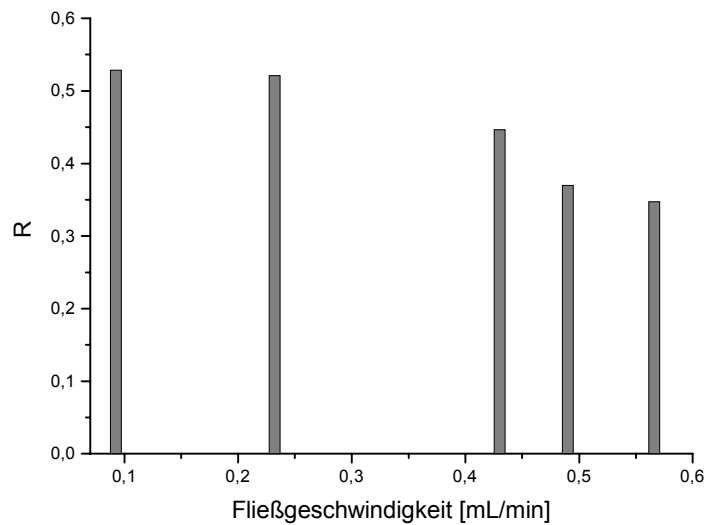
**Abb. 3.16: Bio-Gel P-2, Betthöhe 190 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,23 mL/min; RT. Probe: Standardlösung 1, AV 400  $\mu$ L [69].**



**Abb. 3.17: Bio-Gel P-2, Betthöhe 190 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,49 mL/min; RT. Probe: Standardlösung 1, AV 400  $\mu$ L [69].**

Die Auftrennung beider Zucker ist wie zu erwarten bei kleinerer Fließgeschwindigkeit besser. Das verhältnismäßig starke Tailing könnte ein Anzeichen für das Überladen der Säule sein.

Die Berechnung der chromatographischen Auflösung  $R$  für die verwendete Säule 1 zeigt eine Erhöhung von  $R$  mit abnehmender Fließgeschwindigkeit des Lösemittels (s. Abbildung 3.18 und auch Tabelle 3.8).



**Abb. 3.18:** Chromatographische Auflösung  $R$  für die Saccharose-Raffinose-Trennung auf Bio-Gel P-2 Säule 1; Probe: Standard-Lösung 1, AV 400  $\mu\text{L}$ .

Da mit abnehmender Fließgeschwindigkeit keine weitere Zunahme von  $R$  über 0,53 erreicht wird, stellt dieser Wert offenbar für das hier gewählte System das Maximum dar.

Die Tabelle 3.7 zeigt die erhaltenen Ergebnisse mit ihren numerischen Werten.

**Tab. 3.8:** Chromatographische Auflösung  $R$  der Saccharose-Raffinose-Trennung auf Bio-Gel P-2 Säule 1; Probe: Standard-Lösung 1, AV 400  $\mu\text{L}$ .

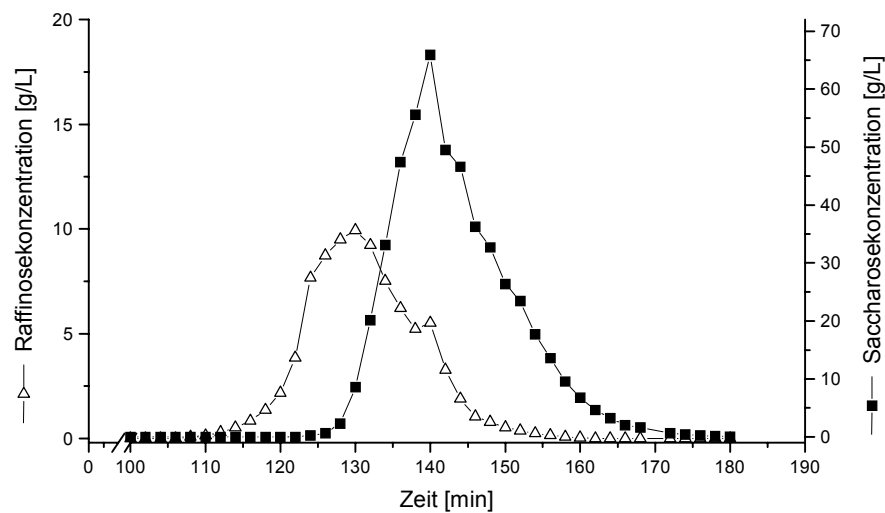
Versuch Nummer	Fließgeschw. [mL/min]	t (Raff) [min]	t (Sacch) [min]	$R$
1	0,09	165,7	184,6	<b>0,53</b>
2	0,23	84,5	93,2	<b>0,52</b>
3	0,43	45,1	49,5	<b>0,45</b>
4	0,49	36,5	39,4	<b>0,37</b>
5	0,57	34,4	37,9	<b>0,35</b>

Zusammenfassend kann man für die Bio-Gel P-2-Säule 1 (BH 190 mm) feststellen, daß kleine Fließgeschwindigkeiten um 0,2 mL/min die besten Trennergebnisse zeigen. Ein Nachteil liegt darin, daß es durch die verstärkte Diffusion der Substanzen auf der Säule zu Peakverbreiterungen kommt und die Analysenzeiten verhältnismäßig lang sind. Daher ist die Methode für die Umsetzung in den industriellen Maßstab ungeeignet.

## b) Variation der Probemenge

Diese Versuche sollen zeigen, ob die anfangs gewählte Probemenge von 400  $\mu\text{L}$  im Verhältnis zum Säulenvolumen zu groß ist und das Tailing sich durch kleinere Probenmengen verringert.

Aufgrund der zuvor erhaltenen Ergebnisse wird eine geringe Fließgeschwindigkeit von 0,12 mL/min gewählt. Auf die Säule werden Probenvolumina von 200  $\mu\text{L}$  (= 0,6 % BV) bis 1000  $\mu\text{L}$  (= 3,0 % BV) gegeben. Die folgende Abbildung 3.19 zeigt als Beispiel eine aufgetragene Probenmenge von 1000  $\mu\text{L}$ .



**Abb. 3.19: Bio-Gel P-2, Betthöhe 190 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,12 mL/min; RT. Probe: Standardlösung 1, AV 1000  $\mu\text{L}$  [69].**

Beide Zuckerpeaks zeigen ein verstärktes Tailing. Dies ist ein deutliches Zeichen für die Überladung der Säule. Schon bei einem aufgetragenen Probenvolumen von 600  $\mu\text{L}$  (= 1,8 % BV) ist starkes Tailing zu beobachten, so daß die in den vorigen Versuchen verwendete Probenmenge von 400  $\mu\text{L}$  (1,2 % BV) sich als gut geeignet herausstellt und in den folgenden Versuchen weiter verwendet wird.

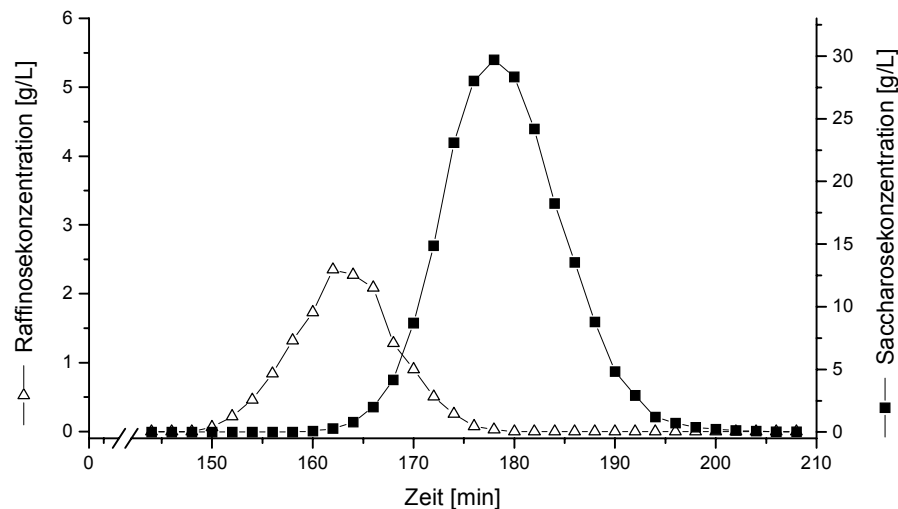
In der Literatur wird im allgemeinen bei Trennproblemen ein Auftragungsvolumen von 1-2 % des Gesamtbettvolumens  $V_t$  (hier  $V_t = 33,5$  mL) empfohlen. Jedoch kann diese Menge bei einigen Säulenmaterialien auch ohne Probleme vergrößert werden.

Aufgrund des starken Tailing ist es nicht sinnvoll  $R$  zu berechnen.



### 3.3.2.2 Versuche mit verdünnter S1b-Fraktion

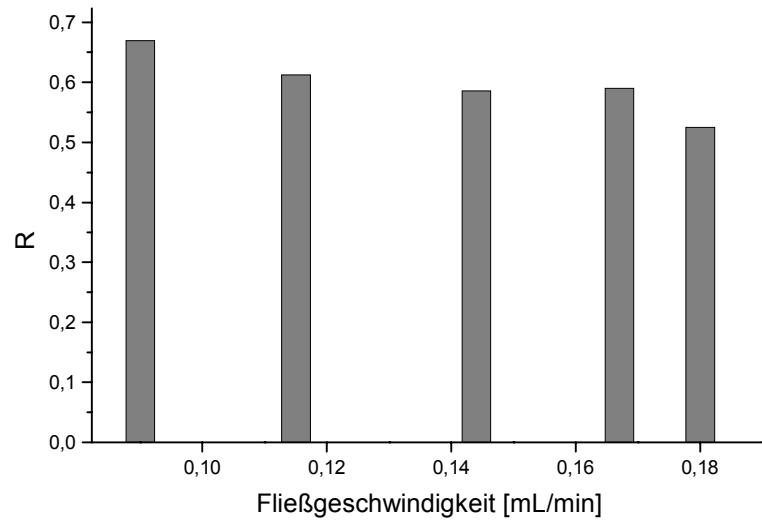
Bei den Versuchen in Kapitel 3.3.2.1 wurden die besten Ergebnisse mit Fließgeschwindigkeiten um 0,2 mL/min erzielt. In den folgenden Untersuchungen mit verdünnter S1b-Fraktion werden daher verschiedene niedrige Flußraten von 0,09 mL/min bis 0,18 mL/min verwendet. Das Probenvolumen ist wiederum 400  $\mu$ L (= 1,2 % BV). In Abbildung 3.20 ist exemplarisch die Separation mit einer Flußrate von 0,12 mL/min dargestellt.



**Abb. 3.20:** Bio-Gel P-2, Betthöhe 190 mm; Laufmittel: Bidest. Wasser, 0,12 mL/min; RT. Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 400  $\mu$ L [69].

Trotz der komplexeren Probenzusammensetzung können Saccharose und Raffinose auf der Säule gut getrennt werden. Im Chromatogramm nicht aufgetragen ist, daß zwischen der 130. und 140. Minute ein Teil der farbgebenden Stoffe (Maillard-Produkte, vgl. Kapitel 1.1) vor den Zuckerfraktionen eluiert werden und somit gleich eine teilweise Decolorierung erreicht wird. Da Melasse-Fraktionen stark braun gefärbt sind, ist eine Überprüfung der Farbabnahme durch photometrische Methoden nicht möglich. Es kann also nur rein visuell die Farbänderung bestimmt werden.

Die chromatographische Auflösung  $R$  zeigt in Bezug auf die Fließgeschwindigkeit des Lösemittels folgende Tendenz: Bei geringer Fließgeschwindigkeit wird die Trennung besser (siehe Abbildung 3.21 und auch Tabelle 3.9). Aber auch hier wird ein maximaler Wert von  $R \sim 0,65$  nicht überschritten.



**Abb. 3.21:** Chromatographische Auflösung R für die Saccharose-Raffinose-Trennung auf Bio-Gel P-2 Säule 1; Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 400  $\mu\text{L}$ .

Eine Erhöhung der Fließgeschwindigkeit auf 0,18 mL/min läßt die chromatographische Auflösung auf 0,5 absinken. Bei einer geringen Flußrate von 0,09 mL/min erreicht man fast eine Auflösung von 0,7, jedoch zeigt die folgende Tabelle 3.9 auch den Nachteil der Methode: Die Verweilzeit der Kohlenhydrate auf der Säule liegt bei fast vier Stunden.

**Tab. 3.9:** Chromatographische Auflösung R der Saccharose-Raffinose-Trennung auf Bio-Gel P-2 Säule 1, Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 400  $\mu\text{L}$ .

Versuch Nummer	Fließgeschw. [mL/min]	t (Raff) [min]	t (Sacch) [min]	R
1	0,09	225,8	243,1	<b>0,67</b>
2	0,12	163,2	178,6	<b>0,61</b>
3	0,14	131,6	144,4	<b>0,59</b>
4	0,17	100,7	110,3	<b>0,59</b>
5	0,18	103,9	113,8	<b>0,53</b>

### 3.3.2.3 Zusammenfassung für Bio-Gel P-2

Es konnte gezeigt werden, daß Bio-Gel P2-Material für die Separation von Saccharose und Raffinose prinzipiell gut geeignet ist. Die chromatographische Auflösung ist bei geringen Flußraten hoch, jedoch ist dieses Vorgehen nicht wirtschaftlich, da die Elutionszeiten zu lang sind (über drei Stunden).

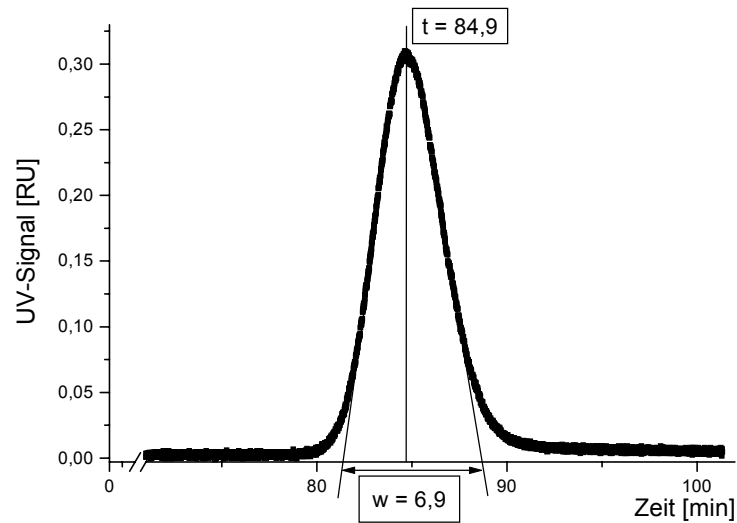
Man sieht allerdings eine deutliche Abtrennung einiger Farbstoffe der S1b-Fraktion auf den Säulen. Die Fraktionen sind nicht farblos, aber signifikant heller als die aufgetragene Probe und einige vor den Zuckern eluierte Fraktionen. Auf weitere Untersuchungen mit diesem Säulenmaterial wird wegen der schlechten Handhabbarkeit und den langen Analysenzeiten verzichtet.

### 3.3.3 Toyopearl HW-40 S

Das Toyopearl-Trägermaterial (TosoHaas, USA) wird durch Copolymerisation von Methacrylat und Ethylenglycol hergestellt. Die Partikelgröße von hydratisiertem Toyopearl HW-40 S-Material beträgt 20–40 µm. Dieses synthetische Trägermaterial besitzt nicht nur eine geringere Partikelgröße als das Bio-Gel P-2-Material, sondern weist auch eine geringere Korngrößenverteilung auf. Dadurch ist eine homogenere Säulenpackung und eine schärfere Trennung möglich.

#### 3.3.3.1 Versuche mit Standardlösungen

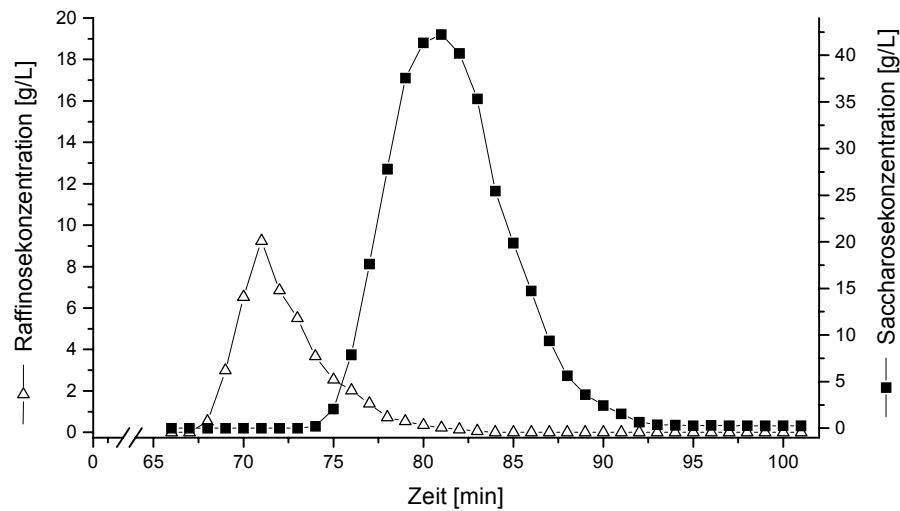
Die Versuche mit Standardlösungen werden auf der Trennsäule 1 durchgeführt. Es wird zuerst die Bodenzahl  $n$  (s. Kapitel 3.2 und Kapitel 5.1.3) bestimmt (s. Abbildung 3.22).



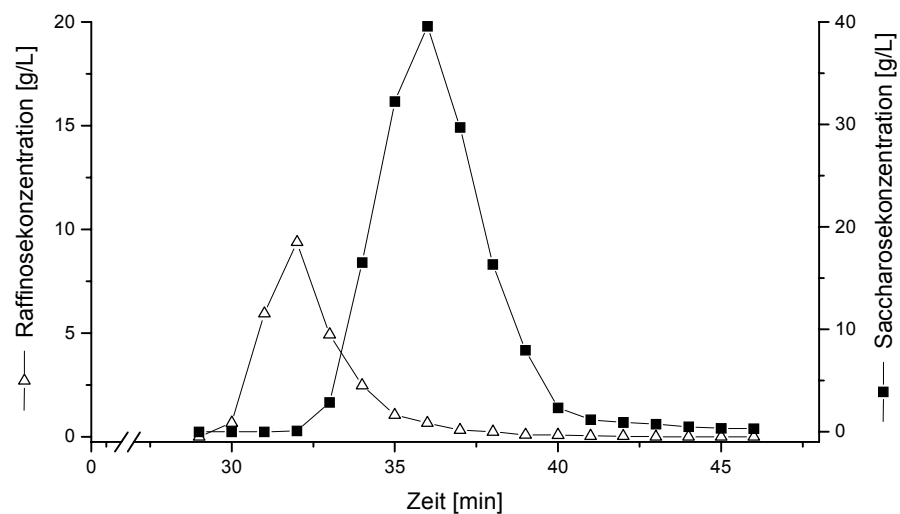
**Abb. 3.22: Chromatogramm zur Bestimmung der Bodenzahl  $n$  für die Toyopearl HW-40 S Säule 1.**

Die Zeit  $t$  beträgt bei diesem Versuch 84,9 min und die Peakbreite  $w = 6,9$  min. Damit ergibt sich nach Gleichung 2.2 (s. Kapitel 2.1) eine Bodenzahl  $n$  von 2414. Im Vergleich zur Bodenzahl von 1174 für die gleich dimensionierte Bio-Gel P2-Säule ist hier die Bodenzahl mehr als doppelt so hoch, was auf ein besseres Trennvermögen schließen läßt.

Bei Raumtemperatur werden jeweils 400  $\mu\text{L}$  (= 1,2 % BV) Standardlösung 2 (s. Kapitel 5.1.3) auf die Säule 1 aufgetragen. Für die Toyopearl HW-40 S-Säule werden Flußraten von 0,15 mL/min bis 0,72 mL/min getestet. Als Beispiele werden hier nur die Trennungen mit einer Flußrate von 0,19 mL/min und mit 0,57 mL/min graphisch dargestellt (siehe Abbildungen 3.23 und 3.24).



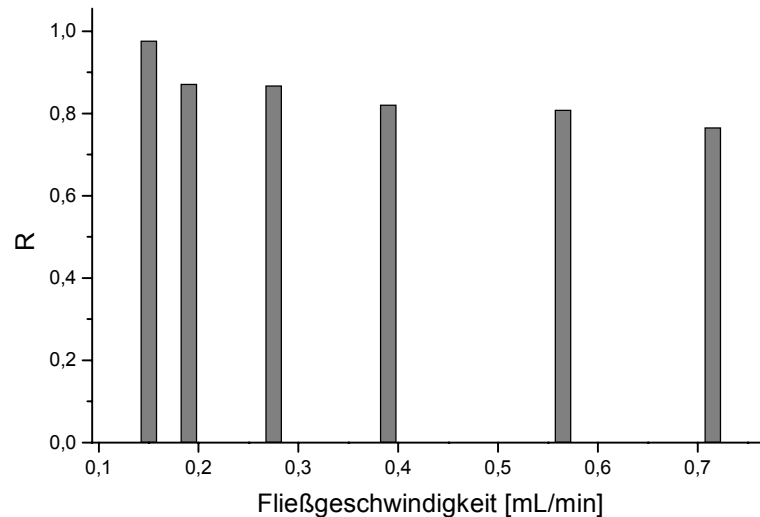
**Abb. 3.23:** Toyopearl HW-40 S, Betthöhe 190 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,19 mL/min; RT; Probe: Standardlösung 2, AV 400  $\mu$ L.



**Abb. 3.24:** Toyopearl HW-40 S, Betthöhe 190 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,57 mL/min; RT; Probe: Standardlösung 2, AV 400  $\mu$ L.

Auffällig ist bei diesem Material das relativ starke Tailing beim Raffinose-Peak. Die Saccharose eluiert in einem breiten jedoch fast symmetrischen Peak. Wie erwartet, ist die Trennung beider Zucker bei kleinerer Fließgeschwindigkeit besser.

Die Berechnung von  $R$  für die Toyopearl HW-40 S-Säule 1 zeigt eine weniger große Abhängigkeit der chromatographischen Auflösung von der Fließgeschwindigkeit des Laufmittels (s. Abbildung 3.25 und auch Tabelle 3.10). Nur bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,15 mL/min ist ein deutlicher Anstieg von  $R$  zu beobachten. Hier liegt  $R_{\max}$  in der Größenordnung von 1.



**Abb. 3.25: Chromatographische Auflösung  $R$  für die Saccharose-Raffinose-Trennung auf Toyopearl HW-40 S Säule 1; Probe: Standard-Lösung 2, AV 400  $\mu$ L.**

Im Vergleich zu der Bio-Gel-Säule 1 ist die chromatographische Auflösung für das Toyopearl-Material auch bei höheren Fließgeschwindigkeiten deutlich besser. In industriellen Prozessen wird bevorzugt eine Flußrate von einem Bettvolumen (BV) pro Stunde genutzt (vgl. Kapitel 2.3.1), da so das beste Zeit-Ausbeute-Verhältnis erzielt werden kann. Für das Toyopearl-Material liegt die Flußrate von einem BV/h bei etwa 0,6 mL/min. Auch unter diesen Bedingungen wird ein  $R$ -Wert von ca. 0,8 erreicht.

Die folgende Tabelle 3.10 gibt noch einmal eine Übersicht über alle Ergebnisse und zeigt die gute, bis in hohe Flußraten konstante chromatographische Auflösung bei der Saccharose-Raffinose-Trennung in der 190 mm Toyopearl HW-40 S Säule 1.

**Tab. 3.10: Chromatographische Auflösung R der Saccharose-Raffinose-Trennung auf Toyopearl HW-40 S Säule 1, Probe: Standard-Lösung 2, AV 400  $\mu$ L.**

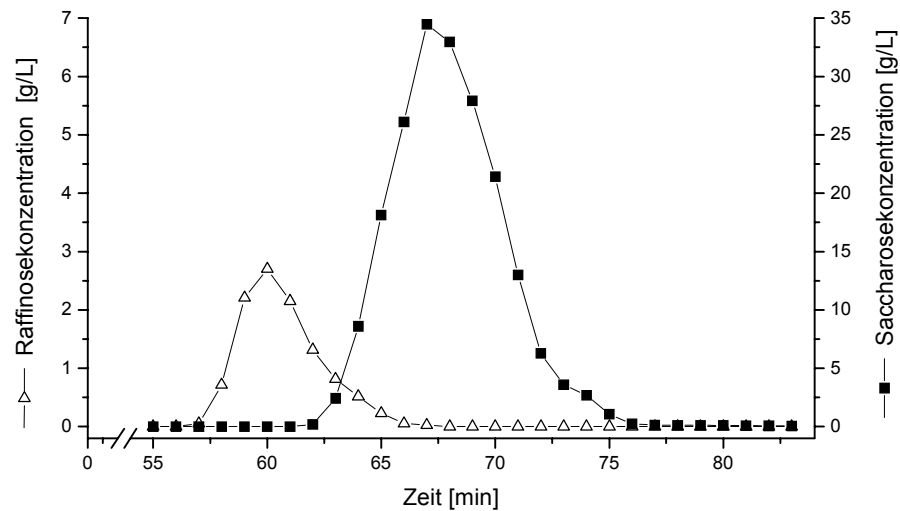
Versuch Nummer	Fließgeschw. [mL/min]	t (Raff) [min]	t (Sacch) [min]	R
1	0,15	91,7	103,5	<b>0,98</b>
2	0,19	71,7	81,1	<b>0,87</b>
3	0,28	61,2	69,3	<b>0,87</b>
4	0,39	46,2	52,1	<b>0,82</b>
5	0,57	32,0	36,0	<b>0,81</b>
6	0,72	25,3	28,4	<b>0,77</b>

Zusammenfassend kann man sagen, daß die 190 mm Toyopearl-Säule 1 bei allen untersuchten Fließgeschwindigkeiten akzeptable Ergebnisse zeigt.

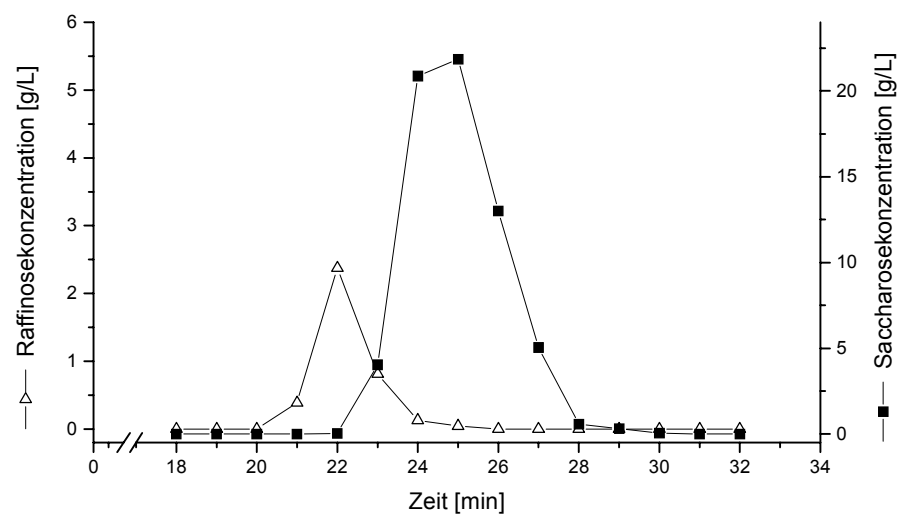
### 3.3.3.2 Versuche mit verdünnter S1b-Fraktion

#### a) Versuche mit verdünnter S1b-Fraktion auf der 190 mm Trennsäule

Bei Versuchen mit realen Lösungen (verdünnte S1b-Fraktion) werden nachfolgend unterschiedlich hohe Fließgeschwindigkeiten untersucht, da durch die komplexere Probenzusammensetzung ein verändertes Trennverhalten erwartet wird. Exemplarisch sind hier zwei Versuche dargestellt: Einer bei einer niedrigen Flußrate von 0,27 mL/min (Abbildung 3.26) und ein weiterer bei einer dreifach höheren Flußrate von 0,83 mL/min (Abbildung 3.27).



**Abb. 3.26:** Toyopearl HW-40 S, Betthöhe 190 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,27 mL/min; RT; Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 400  $\mu$ L.

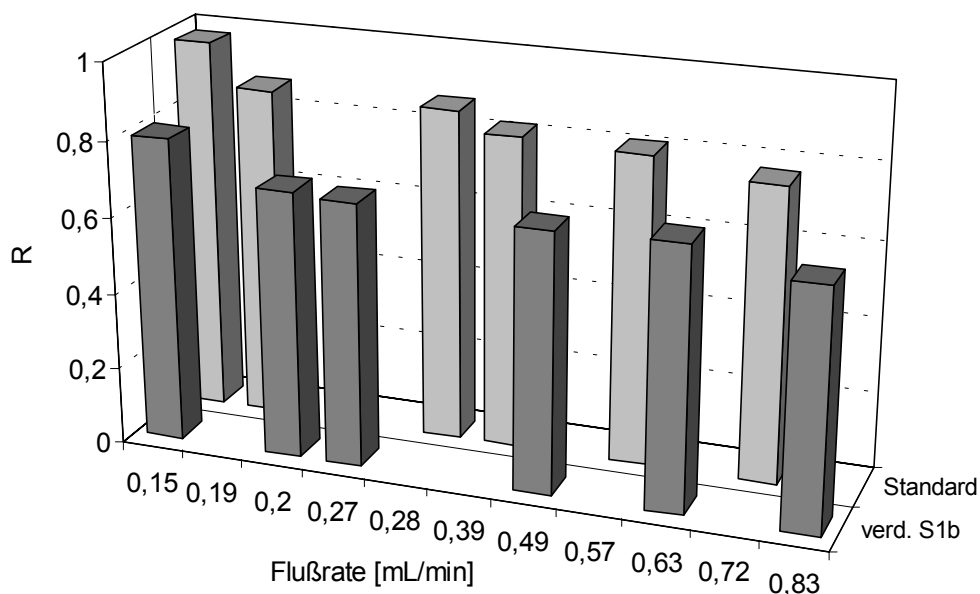


**Abb. 3.27:** Toyopearl HW-40 S, Betthöhe 190 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 0,83 mL/min; RT; Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 400  $\mu$ L.

Die Ergebnisse zeigen, daß das Säulenmaterial die beiden Kohlenhydrate auch in der komplexeren Probenmatrix der verdünnten S1b-Fraktion sehr gut separiert. Wie bereits bei der Standardlösung ist auch hier die Auflösung bei geringeren Flußraten deutlich besser. Wieder ist ein Tailing bei beiden Zuckerpeaks zu beobachten, bei Raffinose stärker ausgeprägt als bei der Saccharose.



Trotz der komplexeren Probenzusammensetzung ist die Qualität der Auftrennung vergleichbar mit den Versuchen mit der Standard-Lösung. Die folgende Abbildung 3.28 und die anschließende Tabelle 3.11 fassen die Ergebnisse der Versuche mit verdünnten S1b-Proben zusammen.



**Abb. 3.28: Chromatographische Auflösung R für die Saccharose-Raffinose-Trennung auf Toyopearl HW-40 S Säule 1.**

**Probe: Verdünnte S1b-Fraktion und Standard-Lösung 2, AV 400 µL.**

Der Wert für die chromatographische Auflösung R sinkt mit steigender Flußrate nur gering ab. Der erreichte  $R_{\max}$  Wert ist, wahrscheinlich durch die Komplexität der Probe, geringer ( $R = 0,8$ ) als bei den Versuchen mit der Standardlösung 2. Im Vergleich zu den erreichten Werten für die chromatographische Auflösung bei Standardlösungen zeigen sich Abnahmen um etwa 0,2. Die folgende Tabelle 3.11 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse für die verdünnte S1b-Fraktion.

**Tab. 3.11: Chromatographische Auflösung R der Saccharose-Raffinose-Trennung auf Toyopearl HW-40 S Säule 1, Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 400  $\mu$ L.**

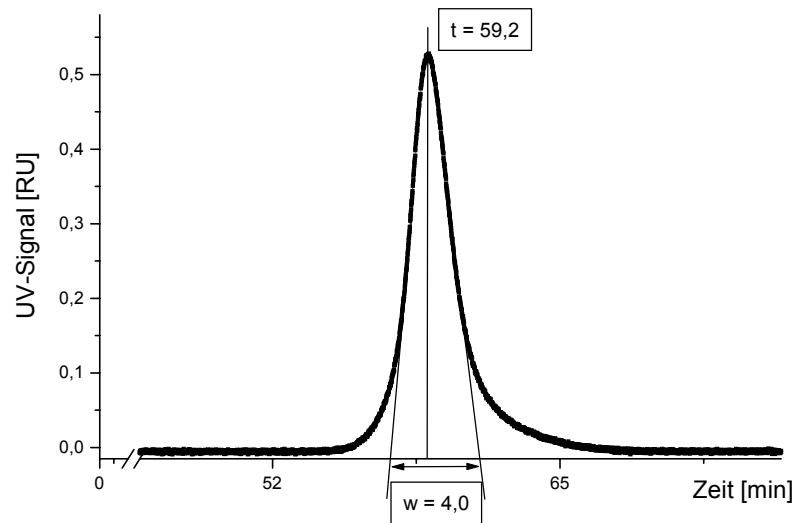
Versuch Nummer	Fließgeschw. [mL/min]	t (Raff) [min]	t (Sacch) [min]	R
1	0,15	93,4	105,4	<b>0,80</b>
2	0,20	73,0	82,0	<b>0,70</b>
3	0,27	60,5	67,7	<b>0,69</b>
4	0,49	38,8	45,0	<b>0,68</b>
5	0,63	27,1	30,0	<b>0,69</b>
6	0,83	22,1	24,8	<b>0,63</b>

Im Vergleich zu den Standardlösungen ist die chromatographische Auflösung R etwas schlechter, jedoch nimmt sie auch bei höherer Flußrate nicht so sehr ab wie bei dem Bio-Gel P-2-Material.

b) Versuche mit verdünnter S1b-Fraktion auf der 800 mm Trennsäule

Aufgrund der guten Ergebnisse mit dem Toyopearl-Trägermaterial auf der 190 mm Säule (Säule 1) werden weitere Versuche in der 800 mm Säule (Säule 2) durchgeführt (BV = 141 mL). Dadurch ist eine bessere Auftrennung der Saccharide zu erwarten, verbunden mit der Möglichkeit, ein größeres Auftragungsvolumen (AV) zu verwenden.

Vorab wird die Bodenzahl  $n$  der Säule 2 bestimmt (s. Abbildung 3.29).

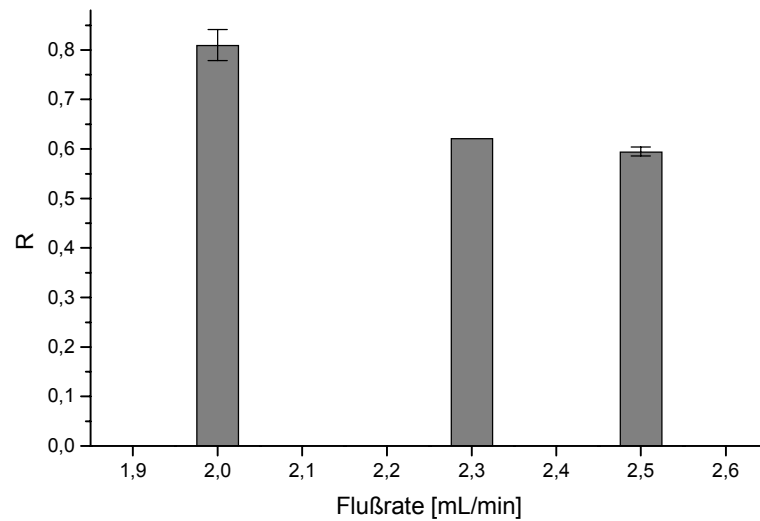


**Abb. 3.29: Chromatogramm zur Bestimmung der Bodenzahl  $n$  für die Toyopearl HW-40 S Säule 2.**

Die Peakbreite  $w$  beträgt bei diesem Versuch 4,0 min und die Zeit  $t = 59,2$  min. Damit ergibt sich eine Bodenzahl  $n$  von 3518. Die Säule 1 besitzt zum Vergleich eine Bodenzahl von 2414. Laut Herstellerangaben soll bei der Gel-Chromatographie mit Toyopearl HW-40 S-Material bei Säulen mit einem Innendurchmesser zwischen 2,2 und 10,8 cm eine Bodenzahl von mindestens 5.000 erreicht werden. Bei Verwendung von Säulen mit einem Innendurchmesser von 1,5 cm sollten laut Herstellerangaben [70] vergleichbare Bodenzahlen erreicht werden.

In dem Fall der Säule 2 konnten diese Werte nicht erzielt werden. Das Packen der viermal so langen Säule ist technisch schwieriger umzusetzen. Dieses kann zu Unregelmäßigkeiten im Säulenbett führen, was sich in diesem Versuch durch die geringe Bodenzahl widerspiegelt.

Die verwendete Säule 2 besitzt ein Bettvolumen (BV) von 141 mL. Da vorangegangene Versuche gezeigt haben, daß das Trennmateriale bei fast allen Flußraten gute Trennergebnisse liefert, werden nur Versuche mit industriell umsetzbaren Flußraten um 1 BV/h (2–2,5 mL/min) durchgeführt. Die Abbildung 3.30 zeigt die Ergebnisse bei den drei untersuchten Flußraten.

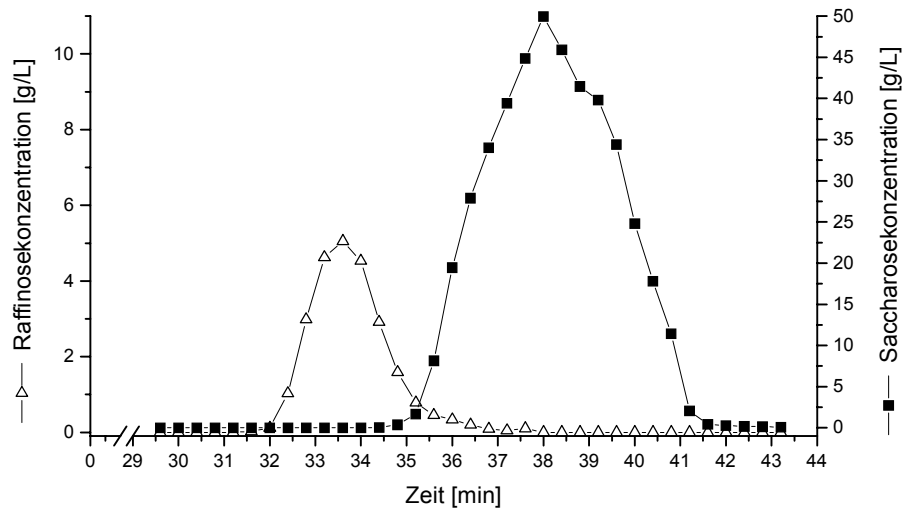


**Abb. 3.30: Chromatographische Auflösung R in Abhängigkeit von der Flußrate für die Saccharose-Raffinose-Trennung auf Toyopearl HW-40 S Säule 2, RT. Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 3 mL.**

Die chromatographische Auflösung liegt bei höherer Flußrate erwartungsgemäß niedriger. Selbst bei diesen hohen Flußraten ist die Trennleistung auf der 800 mm Säule ähnlich gut wie auf der 190 mm Säule mit extrem niedrigen Flußraten.

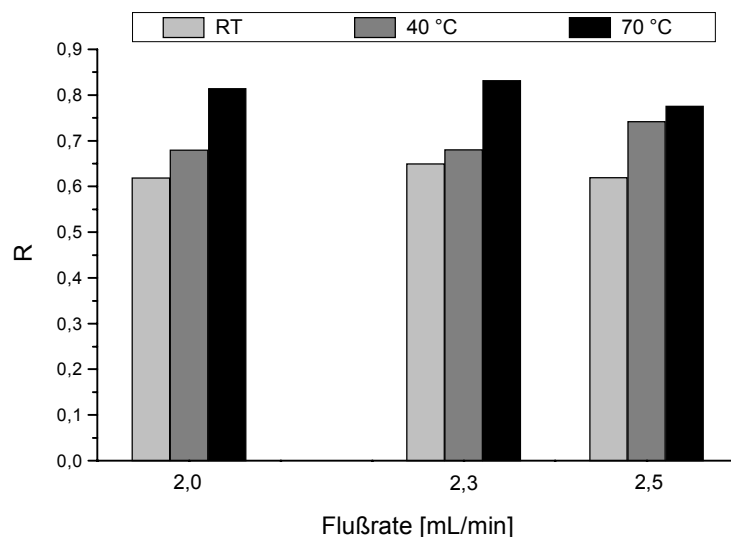
Die gute chromatographische Auflösung bei gleichzeitig erhöhtem Auftragungsvolumen von 3 mL (= 2,1 % BV) zeigt, daß das Toyopearl-Material sehr gutes Trennvermögen besitzt. In diesem Fall kann das in der Literatur bei Trennproblemen empfohlene Auftragungsvolumen von 1–2 % des Gesamtbettvolumens ohne Probleme überschritten werden.

Zum Abschluß der Versuchsreihen mit der Säule 2 soll der Einfluß der Temperatur auf die Trennung der beiden Saccharide untersucht werden. Es werden bei je drei Flußraten im Bereich von einem Bettvolumen pro Stunde (das entspricht 2–2,5 mL/min) bei drei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur, 40 °C und 70 °C) Säulenläufe durchgeführt. Bei höheren Temperaturen sollte die chromatographische Auflösung besser sein als bei Raumtemperatur, da die Peakbreite abnimmt [23]. Die Abbildung 3.31 zeigt das Chromatogramm bei einer Flußrate von 2,5 mL/min und einer Temperatur von 70 °C.



**Abb. 3.31:** Toyopearl HW-40 S, Betthöhe 800 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 2,5 mL/min; 70 °C; Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 3 mL.

Beide Zucker werden bei 70 °C sehr gut voneinander getrennt. Der Saccharose-Peak zeigt stärkeres Tailing, was im Ansatz schon bei niedrigen Temperaturen zu beobachten war. Abbildung 3.32 zeigt graphisch die chromatographische Auftrennung in Abhängigkeit von der Temperatur.



**Abb. 3.32:** Chromatographische Auflösung R für die Saccharose-Raffinose-Trennung auf Toyopearl HW-40 S Säule 2 bei unterschiedlicher Temperatur. Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 3 mL.

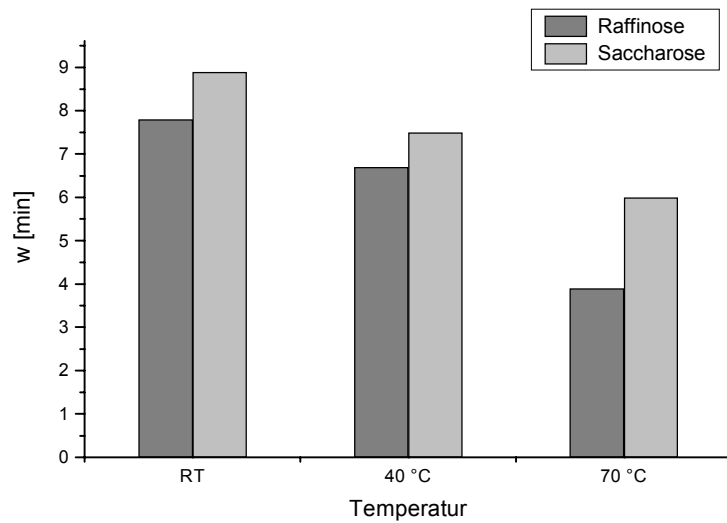
Die folgende Tabelle 3.12 gibt in einem Überblick die numerischen Werte der erhaltenen chromatographischen Auflösung bei allen drei untersuchten Temperaturen wieder.

**Tab. 3.12: Übersicht der Ergebnisse der Saccharose-Raffinose-Trennung auf Toyopearl HW-40 S Säule 2, unterschiedliche Temperaturen, Probe: Verd. S1b-Fraktion, AV 3 mL.**

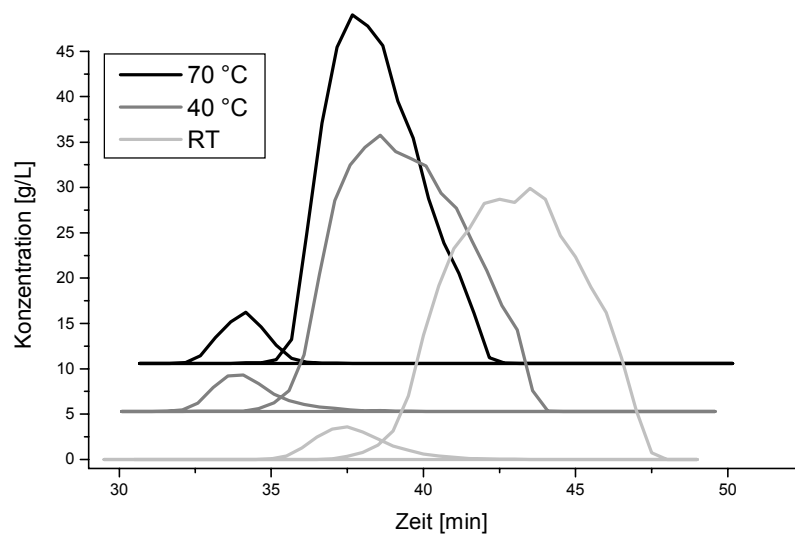
Temperatur	Fließgeschw. [mL/min]	t (Raff) [min]	w (Raff) [min]	t (Sacch) [min]	w (Sacch) [min]	<b>R</b>
RT	2,0	37,9	7,5	43,1	9,2	<b>0,62</b>
	2,3	37,6	7,8	43,1	8,9	<b>0,65</b>
	2,5	33,9	7,3	39,1	9,3	<b>0,62</b>
40 °C	2,0	38,1	7,7	43,3	7,5	<b>0,68</b>
	2,3	33,5	6,7	38,7	7,5	<b>0,68</b>
	2,5	31,3	4,9	35,9	7,5	<b>0,74</b>
70 °C	2,0	39,3	5,1	44,3	7,4	<b>0,82</b>
	2,3	32,9	3,9	37,1	6,0	<b>0,83</b>
	2,5	33,7	5,6	38,2	5,9	<b>0,76</b>

Bemerkenswert ist, daß bei der höchsten untersuchten Temperatur von 70 °C der Wert für R auch bei höherer Flußrate vergleichsweise nur geringfügig abnimmt. Temperaturabhängige Parameter bei der Gel-Chromatographie sind die Molekülgröße der Probenbestandteile und bei nicht-starren Packungen kann die Porengröße durch Temperaturänderung beeinflusst werden (vgl. Kapitel 2.3.1.2). Zudem wird beobachtet, wie in der Literatur beschrieben, daß bei erhöhter Temperatur die Peakbreite w bei beiden Zuckern abnimmt [23].

Am signifikantesten ist die Abnahme der Peakbreite w bei der Flußrate von 2,3 mL/min (s. Abbildungen 3.33 und 3.34).



**Abb. 3.33:** Peakbreite  $w$  von Saccharose und Raffinose auf Toyopearl HW-40 S Säule 2 bei unterschiedlichen Temperaturen, Flußrate 2,3 mL/min. Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 3 mL.



**Abb. 3.34:** Toyopearl HW-40 S, Betthöhe 800 mm, Laufmittel: Bidest. Wasser 2,3 mL/min; RT, 40°C, 70°C; Probe: Verdünnte S1b-Fraktion, AV 3 mL.

Beide Abbildungen verdeutlichen die starke Abnahme der Peakbreite  $w$  bei Erhöhung der Temperatur auf 70 °C. Eine geringe Peakbreite bringt den Vorteil mit sich, daß die gewünschte Fraktion schneller eluiert wird und damit das Volumen für spätere Refining-Schritte nicht zu groß ist.

---

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bei der Toyopearl-Säule 2 (800 mm Betthöhe) bei einer Fließgeschwindigkeit von einem Bettvolumen pro Stunde eine Temperaturerhöhung die chromatographische Auflösung positiv beeinflusst.

#### *3.3.2.3 Zusammenfassung für Toyopearl HW-40 S*

Es wurde gezeigt, daß Toyopearl-HW 40 S-Material für die Trennung von Saccharose und Raffinose gut geeignet ist. Die erreichte chromatographische Auflösung auf der 190 mm Trennsäule ist auch bei höheren Fließgeschwindigkeiten konstant. Für die verdünnte S1b-Fraktion ist die Auflösung, hervorgerufen durch die komplexe Probenzusammensetzung, etwas schlechter, jedoch werden selbst bei hohen Flußraten weiterhin R-Werte von 0,7 erreicht.

Einen ausgesprochen positiven Einfluß auf die Trennleistung der Säule hat die Temperatur: Bei 70 °C wird die Auflösung deutlich besser. Auch bei Fließgeschwindigkeiten über einem Bettvolumen pro Stunde können die beiden Kohlenhydrate gut separiert werden, wobei die Peakbreite mit erhöhter Temperatur abnimmt. Die chromatographische Auflösung erreicht bei der höchsten Temperatur Werte von bis zu 0,83.



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Amino GmbH in Frellstedt befaßt sich mit der Wertstoff-Gewinnung aus Zuckerrübenmelasse mittels Auftrennung über Ionenaustausch-Chromatographie im Tonnenmaßstab. Zur Zeit ist eine Isolierung des Kohlenhydrates Raffinose, das zu knapp 3% in der Melasse enthalten ist, mittels des bestehenden Verfahrens nicht möglich. Die Aufgabe der hier vorgestellten Arbeit bestand darin, Raffinose durch chromatographische Verfahren aus einer Melasse-Fraktion (S1b-Fraktion, 30.–40. Minute) zu isolieren. Das hauptsächliche Problem besteht in der Abtrennung von Saccharose, deren Konzentration in der betreffenden Fraktion fast um den Faktor zehn höher ist. Aus der in dieser Arbeit verwendeten S1b-Fraktion wurde im Vorfeld bei der Amino GmbH ein Großteil der in der Melasse enthaltenen Salze entfernt [20]. Da die zur chromatographischen Melasseentzuckerung bei der Amino GmbH genutzte Matrix keine ausreichende Trennung von Saccharose und Raffinose bewirkt, wurden andere chromatographische Trennmethode auf ihre Eignung untersucht. Anwendung fanden zum einen das Prinzip der Gel-Chromatographie mit verschiedenen Trägermaterialien, zum anderen immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie mit unterschiedlichen Metallionen. Die Auswahl der Trennmaterialien erfolgte aufgrund von in der Literatur beschriebenen erfolgreichen Anwendungen dieser Verfahren bei der Kohlenhydrat-Trennung.

Vor den Trennversuchen wurde eine geeignete Analytik entwickelt, um die Effizienz der untersuchten chromatographischen Methoden für die Trennung von Saccharose und Raffinose zu ermitteln. Die Bestimmung beider Zucker mit der verwendeten HPLC-Analysenmethode, mit einer Amino-Säule und einem Acetonitril-Wasser-Gemisch als Eluent, ist auch bei sehr unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen beider Analyten und bis in hohe Konzentrationen gut geeignet. Anhand von zwei Modellsalzen (Kaliumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat) konnte gezeigt werden, daß die Methode bereits bei geringen Salzkonzentrationen stark beeinflusst wird. Die chromatographische Auflösung sank mit steigender Salzkonzentration, bei  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  kam es neben Peakverbreiterung und Tailing auch zu einer Verschiebung der Elutionszeiten. Die verwendete HPLC-Methode ist somit nur für die Untersuchung von salzarmen Proben einsetzbar.

In ersten Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die Affinitäts-Chromatographie eine Alternative zur Gelfiltration darstellt.

Die bei der immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) verwendete Matrix bewährte sich jedoch nicht bei der Auftrennung der Zucker, da die beide Kohlenhydrate für verschiedene Metallionen keine ausreichend unterschiedliche Tendenz zur Komplexbildung zeigten. Wegen der schlechten Ergebnisse wurden die Versuche nicht weitergeführt.

Durch die Verwendung einer Matrix mit mehr als zwei Bindungsstellen, z. B. Tris-(carboxymethyl)ethylendiamin (TED), das fünf Komplexbildungsstellen besitzt, könnte eine effektivere Komplexbildung mit den Zuckern erreicht werden. Auch könnten noch andere Ionen als die bisher verwendeten mit größerem ( $\text{Cs}^+$ : 167 pm) oder kleinerem ( $\text{Be}^{2+}$ : 35 pm) Durchmesser bzw. höherwertige Ionen untersucht werden. Für letztere sind einschlägige Literaturstellen über die Bildung stabiler Komplexe bekannt [42]. Gegen einen technischen Einsatz der IMAC sprechen allerdings die hohen Kosten für das Trägermaterial.

Auf dem Gebiet der Affinitäts-Chromatographie würden sich noch zwei weitere Komplexbildner für weitergehende Versuche anbieten: Borsäure-Derivate, z. B. Affi-Gel<sup>®</sup> von Bio-Rad, und Lectine. Beide Komplexbildner werden hauptsächlich in der Aufreinigung von Proteinen eingesetzt. Auch in diesen Fällen sprechen die hohen Kosten der Matrices gegen einen technischen Einsatz.

Im Gegensatz zu der Affinitäts-Chromatographie findet die Gel-Chromatographie auch in industriellen Anlagen zahlreiche Verwendung. Beruhend auf diesem Trennprinzip wurden hier Dextran- und Polyacrylamid-Materialien auf ihre Eignung für eine Saccharose/Raffinose-Trennung getestet. Die Gel-Chromatographie findet in der Kohlenhydrat-Trennung großtechnisch hauptsächlich Einsatz bei der Separation von Oligosacchariden [71]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß sich kleine Zucker (Di- und Trisaccharide) mit Hilfe der Gel-Chromatographie gut trennen lassen. Dabei zeigten die untersuchten Sephadex-Materialien nur eine ungenügende Trennleistung. Ein wahrscheinlicher Grund dafür ist der vergleichsweise große Partikelgrößen-Querschnitt dieser Materialien .

Bei den synthetischen Trennmaterialien wurden Bio-Gel P-2- sowie Toyopearl-HW 40-S-Materialien für die Separation von Saccharose und Raffinose verwendet. Das sehr weiche Bio-Gel-Material (Bio-Rad) zeigte bei niedrigen Flußraten (0,09 mL/min) eine chromatographische Auflösung um 0,5; jedoch ist die Elutionszeit fast vier Stunden. Der Vorteil dieses Materials liegt in einer teilweisen Decolorierung der Zuckerfraktionen.

Allerdings ist ein wirtschaftlicher Einsatz dieses Materials aufgrund der langen Analysenzeiten und schlechten Handhabbarkeit nicht sinnvoll.

Das Toyopearl-Material (TosoHaas) eignet sich gut für die Trennung von Saccharose und Raffinose. Die erreichte chromatographische Auflösung bei diesem Trennmateriale lag bei Standard-Lösungen (Saccharose und Raffinose in bidest. Wasser) bei ca. 0,9 und nahm mit erhöhter Fließgeschwindigkeit nur minimal ab. Bei verdünnter S1b-Fraktion war die Auflösung, hervorgerufen durch die komplexe Probenzusammensetzung, schlechter. Doch auch hier wurden selbst bei hohen Flußraten immer noch Werte von 0,7 erreicht. Dieses Material zeigte die besten Ergebnisse für das Trennproblem Raffinose/Saccharose. In präparativen Versuchen mit einem höheren Säulenbett (800 mm) wurden jedoch bei Raumtemperatur nur eine geringfügig höhere chromatographische Auflösung aus verdünnter S1b-Fraktion erreicht als in Säulen mit geringerer Betthöhe (190 mm). Eine deutliche Verbesserung der Trennung konnte mit der Erhöhung der Lauftemperatur auf 70 °C erreicht werden. Auch bei Fließgeschwindigkeiten über einem Bettvolumen pro Stunde – einer Vorgabe für technische Prozesse – können beide Kohlenhydrate gut getrennt werden ( $R = 0,83$ ).

Zur Verbesserung der erzielten Ergebnisse auf dem Gebiet der Gel-Chromatographie könnte für ein Upscaling mit dem Toyopearl-Material das Prinzip der annularen Chromatographie untersucht werden. Separationsversuche für Melasse mit Hilfe der annularen Chromatographie führten Barker und Bridges schon 1990 durch [72]. Die Arbeit verfolgte jedoch hauptsächlich die Abtrennung der Saccharose von den in der Melasse enthaltenen Salzen. Mit Hilfe dieser Technik würde im vorliegenden Fall ein kontinuierlicher präparativer Chromatographie-Prozeß möglich sein.

Eine Verbesserung der chromatographischen Auflösung könnte durch industriell gepackte Säulen erreicht werden. Diese standen jedoch für die Versuche in der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung.

Eine Kombination zweier gelchromatographischen Säulen schließlich, wie auch in Literaturstellen beschrieben [71], könnte das Trennproblem gleichzeitig von zwei Seiten angreifen: Zum einen die Trennung der beiden Zucker, zum anderen die Abtrennung der farbgebenden Substanzen.

## 5 Anhang

### 5.1 Material und Methoden

#### 5.1.1 Analytik

##### Chemikalien:

Acetonitril	Roth
Saccharose	Fluka
Raffinose	Serva
Glucose	Fluka
Fructose	Fluka
Melibiose	Sigma
KCl	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma

Alle verwendeten Zuckerstandardlösungen werden direkt vor Gebrauch mit bidest. Wasser angesetzt.

##### Geräte:

Pumpe 7100, RI-Detektor 7490, Säulenofen 7350 Merck-Hitachi, Darmstadt  
und Autosampler 7200

Computer zur Datenerfassung und Auswertung

#### 5.1.2 Immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie

##### Chemikalien:

Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )·3 H <sub>2</sub> O	Riedel deHaen
EDTA	Sigma-Aldrich
CoSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	Fluka
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	Riedel deHaen
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden

Die IMAC-Säule (Säulenabmessung: 40 mm × 8 mm) wird vor jedem Lauf mit konzentrierter EDTA-Lösung gespült, um eventuell vorhandene Metallionen von der Matrix zu entfernen. Anschließend wird die Säule mit bidestilliertem Wasser gespült. Danach werden 2 mL einer 100 mM Metallionen-Lösung auf die Säule gegeben und anschließend erneut mit ca. 10 mL bidest. Wasser (= 2 BV) gespült, um nicht gebundene Ionen von der Säule zu entfernen. Die Säule wird ohne Pumpe betrieben; das Elutionsmittel fließt nur durch Gravitation.

### 5.1.3 Gel-Chromatographie

#### Trägermaterialien:

Sephadex-G 15, Sephadex-G 25, fine	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Bio-Gel P 2, fine	Bio-Rad, München
Toyopearl HW-40 S	Toso Haas, USA

#### Apparativer Aufbau:

Glassäule, 23 cm (Säule 1), Ø 1,5 cm	Bio-Rad, München
Schlauchpumpe, Typ IPS 8	Ismatec, Zürich, Schweiz
Probensammler, Modell 2128	Bio-Rad, München
Glassäule, 100 cm (Säule 2), Ø 1,5 cm	Kronlab, Sinsheim
HPLC-Pumpe, Modell SDS 9404	Schambeck, Bad Honnef
Thermostat 5b	Yulabo, Seelbach
6-Wege Ventil	Knauer, Berlin
Probensammler, Modell 2128	Bio-Rad, München

#### Packen der Säulen

Das Trägermaterial wird, soweit nicht vorgequollen, laut Vorschrift in entgastem, bidestilliertem Wasser gequollen. Danach wird es in den Säulenkörper eingebracht, welcher vorher zu einem Drittel mit Lösemittel gefüllt wurde. Das Material setzt sich allein durch Gravitation. Vor dem ersten Lauf wird die Säule mindestens eine Stunde bei der entsprechenden Flußrate equilibriert.

---

### Bestimmung der Bodenzahl n

Chemikalie: Aceton (Fluka)

Apparatur: BioLogic LP (Bio-Rad, München)

Peristaltikpumpe, Mischkammer, manuell verstellbares Probenaufgabeventil, elektronische Steuereinheit, UV-Detektor ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ )

Computer zur Datenerfassung und Auswertung

Auftragungsvolumen: 100  $\mu\text{L}$  (Bio-Gel-Säule 1)

150  $\mu\text{L}$  (Toyopearl-Säule 1)

500  $\mu\text{L}$  (Toyopearl-Säule 2)

Es wird jeweils eine 1 %ige Acetonlösung hergestellt und auf die Säule gegeben. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgt über einen Computer einer BioLogic-Anlage.

#### Standardlösung 1:

Zuckerstandard mit einem Raffinose-Saccharose-Verhältnis von 1:6 (153,4 g/L Saccharose und 25,6 g/L Raffinose) in bidestilliertem Wasser; der Standard wird in 1 mL Alliquots bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### Standardlösung 2:

Zuckerstandard mit einem Raffinose-Saccharose-Verhältnis von 1:6,6 (176,0 g/L Saccharose und 26,8 g/L Raffinose) in bidestilliertem Wasser; der Standard wird in 1 mL Alliquots bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### Verdünnte S1b-Fraktion:

Die Proben der S1b-Fraktion werden vor dem Einfrieren im Verhältnis 1:5 verdünnt, um die Zähflüssigkeit der Lösung zu verringern (82,4 g/L Saccharose und 8,4 g/L Raffinose). Die Alliquots von 1 mL bzw. 5 mL werden bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Bei den Versuchen werden, wenn nicht anders angegeben, 400  $\mu\text{L}$  Lösung auf Säule 1 bzw. 3 mL auf Säule 2 gegeben.

## 5.2 Verwendete Abkürzungen

$\Delta H^0$	Enthalpieänderung
$\Delta S^0$	Änderung der Konformationsentropie
$^{\circ}\text{Bx}$	Grad Brix, $1^{\circ}\text{Bx} \hat{=} 1\%$ Trockensubstanz
AV	Auftragungsvolumen
BH	Betthöhe
BV	Bettvolumen
CE	capillary electrophoresis; Kapillarelektrophorese
DC	Dünnschicht-Chromatographie
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid; Ethylendiamintetraessigsäure
GC	Gaschromatographie
GFC	Gel-Filtrations-Chromatographie
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
h	Peak-Höhe
HPLC	high performance liquid chromatography
ICUMSA	International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis
IDA	Iminodiacetic acid; Iminoacetessigsäure
IMAC	immobilized metal affinity chromatography; Immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie
K	Verteilungskoeffizient
$K_{\text{SEC}}$	Verteilungskoeffizient der Gel-Chromatographie
LC	liquid chromatography; Flüssig-Chromatographie
Mel	Melibiose
MW	Molekulargewicht
n	Bodenzahl
NTA	nitrilo triacetic acid; Nitrilotriessigsäure
R	Regressionskoeffizient
R	Chromatographische Auflösung
R	Gaskonstante
Raff	Raffinose

---

RI-Detektor	refractive index detektor; Brechungsindex-Detektor
RU	relative unit; relative Einheit
Sacch	Saccharose
sd	standard deviation; Standardabweichung
SEC	size exclusion chromatography; Größenausschluß-Chromatographie
t	Retentionszeit
t <sub>0</sub>	Totzeit
T	absolute Temperatur
T	Peak-Asymmetrie
TED	Tris-(carboxymethyl)ethylendiamin
TS	Trockensubstanz
UV-Detektor	Ultraviolett-Detektor
V <sub>0</sub>	Hohlraumvolumen
V <sub>t</sub>	Gesamtbettvolumen
V <sub>x</sub>	Gelbettvolumen
w	Peakbreite
σ <sup>2</sup>	Varianz



---

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] **QUADBECK-SEEGER, H.-J.:** Nachwachsende Rohstoffe – Perspektiven für die Chemie, in: Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in der Chemie (H. Eierdanz Hrsg.), VCH, Weinheim (1996).
- [2] **BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN:** Bericht des Bundes und Länder über nachwachsende Rohstoffe, Schriftenreihe des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Reihe A: Angewandte Wissenschaft, Sonderheft (1995).
- [3] **GOUGH, S.; MCHALE, A.P.:** Continuous ethanol production from molasses at 45 °C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in a continuous-flow bioreactor, *Bioprocess Engineering* **19**, 33-36 (1998).
- [4] **SCHIWECK, H.:** Zucker, Rüben- und Rohr-, in: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, Band 24, Verlag Chemie, 703-749 (1983).
- [5] **SCHIWECK, H.:** Zusammensetzung von Zuckerrübenmelassen, *Zuckerindustrie* **119** (4), 272-282 (1994).
- [6] **HONGISTO, H. J.:** Chromatographic separation of sugar solutions – the Finnsugar molasses desugarization process I, *International Sugar Journal* **79** (940), 100-104, 3B (1977).
- [7] **HONGISTO, H., LOISA, M.:** Finnsugar-Trennverfahren zur Melasseentzuckerung, *Zeitschrift für Zuckerindustrie* **27** (5), 279-283 (1977).
- [8] **HEIKKILÄ, H.:** Separating sugars and amino acids with chromatography, *Chemical Engineering* **90**, 50-52(1983).
- [9] **KLOPPENBURG, E.; GILLES E. D.:** Ein neues Prozeßführungskonzept für die Chromatographie mit simuliertem Gegenstrom, *Chemie Ingenieur Technik* **70** (12), 1526-1529 (1998).
- [10] **PAANANEN, H.:** Trends in the chromatographic separation of molasses, *Zuckerind.* **122** (1), 28-33 (1997).

- 
- [11] **THIELECKE, K.:** Zur Zusammensetzung von Rübenmelassen, *Branntweinwirtschaft* **127** (13), 193-195 (1987).
- [12] **AMINO GMBH:** Angaben AMINO GmbH, Abt. Forschung & Entwicklung, Frellstedt (1998).
- [13] **OLBRICH, H.:** Raffinose aus Rübenmelasse, ein Handelsprodukt ohne Marktentwicklung, *Branntweinwirtschaft* **119** (6), 100-102 (1979).
- [14] **SAYAMA, K.; KAMADA, T.; OIKAWA, S.; MASUDA, T.:** Production of raffinose: a new byproduct of the beet sugar industry, *Zuckerindustrie* **117** (11), 893-898 (1992).
- [15] **XIE, G.; TIMASEFF, S. N.:** The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose, *Biophysical Chemistry* **64**, 25-43 (1997).
- [16] **TOMOMATSU, H.:** Health effects of oligosaccharides, *Food Techn.*, 61-64 (1994).
- [17] **KURODA, A.; HAYASE, M.:** Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2000063224 A2, 29 Feb. 2000, Patent.
- [18] **SCATENA, R.; GIARDINA, B.:** O-raffinose-polymerised haemoglobin. A biochemical and pharmacological profile of an oxygen carrier, *Exp. Opin. Biol. Ther.* **1** (1), 121-127 (2001).
- [19] **RISSLAND, M. M.:** Entwicklung und Charakterisierung von Aufreinigungsstrategien zur Isolierung von Raffinose und Melibiose aus Reststoffströmen der chromatographischen Melasseentzuckerung, Diplomarbeit TU Braunschweig (1997).
- [20] **OELTJEN, A. K.:** Restmelasseentzuckerung mit Elektrodialyse, Diplomarbeit Fachhochschule Ostfriesland, Emden (1998).
- [21] **SHIMIZU, Y.:** Purification of water-soluble natural products, in: Natural product isolation, (R. J. P. Cannell Hrsg.), Humana, Totowa (1998).
- [22] **LOTTSPREICH, F.; ZORBAS, H. (HRSG.):** Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin (1998).

- 
- [23] **MORI, S.; BARTH, H. G.:** Size Exclusion Chromatography, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Singapur, Tokio (1999).
- [24] **WILSON, K.; WALKER, J. M.:** Principles and techniques of practical biochemistry, Cambridge University Press (1984).
- [25] **MEYER, V.:** Practical High-Performance Liquid Chromatography, Wiley (1994).
- [26] **BRONSTEIN, I. N.; SEMENDJAJEW, K. A.:** Taschenbuch der Mathematik (G. Grosche, V. Ziegler und D. Ziegler Hrsg.), Gemeinschaftsausgabe Verlag Nauka, Moskau und BSB B. G. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig (1985).
- [27] **JOSIĆ, D.; HORN, H.; SCHULZ, P.; SCHWINN, H.; BRITSCH, L.:** Size-exclusion chromatography of plasma proteins with high-molecular mass, *J. Chrom. A* **796**, 289-298 (1998).
- [28] **GRANATH, K.:** Fractionation of polysaccharides by gel filtration, in: New Biochemical Separations, (A. T. James und L. J. Morris Hrsg.), D. van Nostrand, London, 93-109 (1964).
- [29] **GRANATH, K.:** Abhandlungen der dtsh. Akad. Wissenschaften, Berlin, 91 (1964).
- [30] **PORATH, J.; FLODIN, P.:** Gel filtration: a method for desalting and group separation, *Nature* **183**, 1657-1659 (1959).
- [31] **FISCHER, L.:** Gel filtration chromatography, Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford (1980).
- [32] **YAU, W. W.; KIRKLAND, J. J.; BLY, D. D.:** Modern size-exclusion liquid chromatography, Wiley&Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto (1979).
- [33] **WEDLER, G.:** Lehrbuch der Physikalischen Chemie, VCH, Weinheim, New York (1987).
- [34] **DETERMANN, H.:** Gelchromatographie, Springer, Berlin, New York (1967).

- 
- [35] WILLIAMS, A.; HAGEL, L.: Size exclusion for analysis and purification of aqueous macromolecules, in: Column handbook for size exclusion chromatography (C.-s. Wu, Hrsg.), Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto (1999).
- [36] PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G.: Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature* **258**, 598-599 (1975).
- [37] YIP, T.-T.; HUTCHENS, T. W.: Immobilized Metal Ion affinity chromatography, in: Methods in Molecular Biology – Practical protein chromatography (A. Kenney, S. Fowell Hrsg.), Humana Press, Totowa, 17-44 (1992).
- [38] SULKOWSKI, E.: Purification of proteins by IMAC, *Trends Biotechnol.* **3**, 1-7 (1985).
- [39] FATIADI, A. J.: Affinity chromatography and metal chelate affinity chromatography, *CRC Critical Rev. Anal. Chem.* **18**, 1-44 (1987).
- [40] KAGEDAL, L.: Immobilized metal ion affinity chromatography, in: High Resolution Protein Purification (L. Ryden und J.-C. Jansson Hrsg.), Verlag Chemie Inst., Deerfield Beach, FL, 227-251 (1989).
- [41] YIP, T.-T.; HUTCHENS, T. W.: Immobilized Metal Ion affinity chromatography, in: Methods in Molecular Biology – Protein Purification Protocols (S. Doonan Hrsg.), Humana Press, Totowa, 197-210 (1996).
- [42] ANGYAL, S. J.: Complexes of metal cations with carbohydrates in solution, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **47**, 1-43 (1989).
- [43] BURGER, K.; NAGY, L.: Biocoordinate chemistry, coordination equilibria in biologically active systems (K. Burger Hrsg.), Ellis Horwood, New York, 236 f. (1990).
- [44] KOZŁOWSKI, H.; JEZOWSKA-BOJCZUK, M.: Metal complexes with carbohydrates, in: Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids: bioinorganic chemistry Vol. I (G. Berthon Hrsg.), Dekker, New York, Basel, Hong Kong, 679-685 (1995).
- [45] GYURCSIK, B.; NAGY, L.: Carbohydrates as ligands: coordination equilibria and structure of the metal complexes, *Coord. Chem. Rev.* **203**, 81-149 (2000).

- 
- [46] MEYER, V.: Practical High-Performance Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto (1999).
- [47] MARTELL, A. E.; HANCOCK, R. D.: Metal complexes in aqueous solutions, Plenum, New York und London (1996).
- [48] ANGYAL, S.J.: Sugar-cation complexes – Structure and applications, *Chem. Soc. Rev.* 10 (9), 415-428 (1981).
- [49] HANCOCK, R. D.; HEGETSCHWEILER, K.: A molecular mechanics study of the complexation of metal ions by inositols, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2137-2140 (1993).
- [50] RAUCH, P.; KÁŠ, J.; RANNÝ, M.: Iron Bioavailability from its complex with sucrose, *Food Chemistry* 36, 129-134 (1990).
- [51] NAGY, L.; GAJDA, T.; BURGER, K.: Saccharose complexes of manganese in different oxidation states, *Inorg. Chim. Acta* 123, 35-40 (1986).
- [52] TAJMIR-RIAHI, H. A.: Sucrose interaction with alkaline earth metal ions. Synthesis, spectroscopic and structural characterization of sucrose adducts with Mg(II) and Ca(II) halides, *J. Inorg. Biochem.* 31, 255- 265 (1987).
- [53] PONCINI, L.: Proton magnetic resonance study of solute-solvent interactions of sucrose with calcium ions in aqueous solution, *Indian J. Chem., Sect. A* 18, 167-168 (1979).
- [54] NAGY, L.; BURGER, K.; KÜRTI, J.; MOSTAFA, M. A.; KORECZ, L.; KIRICSI, I.: Iron(III) complexes of sugar-type ligands, *Inorg. Chim. Acta* 124, 55-59 (1986).
- [55] ANGYAL, S. J.: Complexes of carbohydrates with metal cations. I Determination of the extent of complexing by N.M.R. spectroscopy, *Aust. J. Chem.* 25, 1957-66 (1972).
- [56] FRANKS, F.; HALL, J. R.; IRISH, D.E.; NORRIS, K.: The effect of cations on the anomeric equilibrium of D-glucose in aqueous solutions – a raman-spectral study, *Carbohydr. Res.* 157, 53-64 (1986).

- 
- [57] **BANDWAR, R. P.; RAO, C. P.:** Transition metal-saccharide chemistry and biology: an emerging field of multidisciplinary interest, *Current Science* **72** (11), 788-796 (1997).
- [58] **HÄMÄLÄINEN, M.M.; LÖNNBERG, H.:** Complexing of sugars and sugar alcohols with metal ions: a comparative study by ion-exchange chromatography, *Carbohydr. Res.* **215**, 357-360 (1991).
- [59] **PREUSS, A.; SCHULTE, E.; THIER, H.-P.:** Nachweis von Mono-, Di- und Trisacchariden neben Saccharose in Zwischen- und Endprodukten der Zuckerindustrie, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **17** (3), 163-166 (1984).
- [60] **CHURMS, S.C.:** Recent developments in the chromatographic analysis of carbohydrates, *J. Chromatogr.* **500**, 555-583 (1990).
- [61] **CHURMS, S.C.:** Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction, *J. Chrom. A* **720**, 75-91 (1996).
- [62] **CLARKE, M.A.:** HPLC in the sugar industry - an overview, *Sugar y azucar*, 21-25 (August 1985), 21-41 (Oktober 1985), 13-33 (Dezember 1985).
- [63] **HERBRETEAU, B.:** Review and state of sugar analysis by high performance liquid chromatography, *Analisis* **20**, 355-374 (1992).
- [64] **STEFANSSON, M.; WESTERLUND, D.:** Strong complex formation of carbohydrates with metal ions at alkaline pH studied by ligand exchange chromatography, *Chromatographia* **35** (3-4), 199-205 (1993).
- [65] **TODD, R. J.; JOHNSON, R. D.; ARNOLD, F. H.:** Multiple-site binding interaction in metal-affinity chromatography. I Equilibrium binding of engineered histidine-containing cytochromes c, *J. Chromatogr. A* **662** (1), 13-26 (1994).
- [66] **ESSEN, L.-O.; SKERRA, A.:** Single-step purification of a bacterially expressed antibody Fv fragment by immobilized-metal affinity chromatography in the presence of betain, *J. Chromatogr. A* **657** (1), 55-61 (1993).

- 
- [67] **HOLLEMANN, A. F.; WIBERG, N.:** Lehrbuch der anorganischen Chemie, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1985).
- [68] **PIARULLI, U.; FLORIANI, F. C.:** Assembling sugars and metals: novel architectures and reactivities in transition metal chemistry, in: Progress in inorganic chemistry, Vol 45 (K. D. Karlin Hrsg.), Wiley&Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Weinheim (1997).
- [69] **YUAN, S.:** Grundlegende Untersuchungen zur Auftrennung von Melassebestandteilen an Bio-Gel P-2, Protokoll zum Schwerpunktpraktikum, Universität Hannover (2000).
- [70] **SPRAUER, A.** (Technical Specialist, TOSOH Biosep GmbH): Mündliche Mitteilung, 25.02.02.
- [71] **PRAZNIK, W.:** GPC-Analyse von Stärkepolysacchariden, *Starch* **38** (9), 292-296 (1986).
- [72] **BARKER, P. E.; BRIDGES, S.:** Continuous annular chromatography for the separation of beet molasses, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 347-359 (1991).

## **Curriculum vitae**

Ingrid Langwost

geboren am 02.02.1968 in Bielefeld

ledig

### **schulische Ausbildung**

1974 – 1978	Grundschule in Hannover
1978 – 1979	Orientierungsstufe in Hannover
1979 – 1980	Gymnasium in Scheeßel
1980 – 1987	Gymnasium in Hannover; Abschluß: allg. Hochschulreife

### **Hochschulstudium**

04/1988 – 10/1996	Studium der Chemie an der Universität Hannover
11/1996 – 05/1997	Diplomarbeit im Fachbereich Technische Chemie (Biotechnologie)
10/1997 – 05/2002	Promotion in der Technischen Chemie (Biotechnologie)

### **Arbeitsverhältnisse**

10/1997 – 06/2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technische Chemie (Biotechnologie) an der Universität Hannover
-------------------	--