

Untersuchungen zur Anwendung anorganischer Adsorbentien für die Separation biologisch aktiver Substanzen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation von

M. Sc. Dipl. Ing. (FH) Kathrin Ralla
geboren am 30. Oktober 1979 in Hannover

2009

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin: PD Dr. Cornelia Kasper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 16. März 2009

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen durchgeführt habe. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im März 2009

Inhalt

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung und Aufgabenstellung	3
2 Grundlagen	5
2.1 Tonminerale	5
2.1.1 Aufbau und Klassifizierung	5
2.1.2 Aufbau und Klassifizierung smektitischer Tonminerale	8
2.1.3 Oberflächenreaktivität	10
2.1.4 Wechselwirkungen mit organischen Molekülen	12
2.1.5 Applikationen von Tonmineralen	16
2.2 Hydrotalcite	17
2.2.1 Struktureller Aufbau	17
2.2.2 Anwendungen von Hydrotalciten	18
2.3 Kartoffelfruchtwasser	18
2.3.1 Kartoffelprotein	19
2.3.2 Glykoalkaloide der Kartoffel	21
3 Experimenteller Teil – Proteinadsorption im Modellsystem	23
3.1 Charakterisierung der Adsorbentien	24
3.1.1 Tonminerale	24
3.1.2 Synthetische Hydrotalcite	26
3.2 Modellproteine	27
3.3 Adsorptionseigenschaften von Tonmineralen	28
3.3.1 Proteinadsorption an geladene Tonminerale	28
3.3.2 Adsorptionseigenschaften eines ungeladenen Tonminerals	30
3.4 Charakterisierung von EX M 1607	32
3.5 Statische Adsorptionseigenschaften von EX M 1607	34
3.5.1 pH-Wert-Abhängigkeit der Proteinadsorption	34

3.5.2 Adsorptionsisothermen	38
3.5.3 Zeitabhängigkeit der Adsorption	43
3.5.4 Abhängigkeit der Adsorption von der Ionenstärke	44
3.5.5 Desorptionseigenschaften	46
3.6 Dynamisches Adsorptionsverhalten	48
3.6.1 EX M 1607 als Säulenmaterial	48
3.6.2 Separation eines binären Proteingemisches	49
3.7 Synthetische Hydrotalcite als Anionentauscher	51
3.7.1 Adsorptionseigenschaften unter statischen Bedingungen	51
3.7.2 Desorptionseigenschaften	54
3.7.3 Adsorptionseigenschaften im dynamischen System	55
3.8 Zusammenfassung	56
4 Experimenteller Teil – Glykoalkaloidadsorption im Modellsystem	58
4.1 pH-Wert-Abhängigkeit der Adsorption von α -Solanin	59
4.1.1 Adsorption von α -Solanin an Tonminerale	59
4.1.2 Adsorption von α -Solanin an synthetische Hydrotalcite	62
4.2 Moleküldynamik-Simulation zur α -Solaninadsorption	64
4.3 Adsorptionsisothermen	68
4.4 Zeitabhängigkeit der Adsorption	70
4.5 Desorption	71
4.6 Zusammenfassung	74
5 Experimenteller Teil – Separation von Inhaltsstoffes des KFW	75
5.1 Vorversuche zur Proteinseparation	76
5.1.1 Selektive Adsorption von Kartoffelproteinen	76
5.1.2 Desorption	78
5.2 Aufreinigung der Proteinfractionen im KFW	80
5.2.1 Bestimmung der biologischen Aktivität	82
5.3 Abreicherung von Glykoalkaloiden aus KFW	84
5.4 Proteinseparation in Kombination mit einer GA-Abreicherung	87
5.5 Separation von KFW-Inhaltsstoffen mittels präparativer HPLC	89

5.5.1 Separation der Proteine	89
5.5.2 Bestimmung der Patatin- und Protease-Inhibitorenaktivität	91
5.5.3 Bestimmung des GA-Gehaltes der Proteinfractionen	93
5.6 Adsorption von Kartoffelproteinen mit Hydrotalciten	93
5.7 Zusammenfassung	94
6 Zusammenfassung und Ausblick	96
7 Anhang	101
7.1 Ergänzende Daten	101
7.2 Versuchsdurchführung	111
7.3 Analytik	117
7.4 Statistik	127
Literaturverzeichnis	129
Geräte, Materialien und Chemikalien	139

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Aceton
ACN	Acetonitril
AIC	Akaike-Informationskriterium, <i>Akaike's Information Criterion</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
calc.	calciniert
CAPS	(3-Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure)
CHY	α -Chymotrypsin
EtOH	Ethanol
GA	Glykoalkaloid(e)
HEM	Hämoglobin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
Hex	Hexan
HSA	Humanes Serumalbumin
HT	Hydrotalcit
IEP	Isoelektrischer Punkt
IsoProp	Iso-Propanol
KFW	Kartoffelfruchtwasser
LF-Isotherme	Langmuir-Freundlich-Isotherme
LYS	Lysozym
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MW	Molekulargewicht, <i>molecular weight</i>
OVA	Ovalbumin
PAT	Patatin
PEG	Polyethylenglykol
PI	Protease-Inhibitoren

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, <i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TAME	N- α -Tosyl-L-Argininmethylester
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRY	Trypsinogen
1-But	1-Butanol
2-Prop	2-Propanol

Abbildungsverzeichnis

2.1	Modell der 1:1- und 2:1-Schichttypstrukturen von Tonmineralen	6
2.2	Übersicht und Zuordnung von 2:1-Tonmineralen	7
2.3	Schematische Darstellung der Strukturen von dioktaedrischen und trioktaedrischen Tonmineralen	8
2.4	Ableitung der di- und trioktaedrischen Smektite	8
2.5	Kristallstruktur eines Smektits am Beispiel von Montmorillonit	9
2.6	Schematische Darstellung der Organisation von Montmorillonitplättchen	10
2.7	Oberfläche von Tonmineralen im hydroxylierten und dehydroxylierten Zustand	10
2.8	Schichtsilikatoberfläche in Abhängigkeit vom pH-Wert Anwesenheit von Na ⁺	11
2.9	Vergleich des dynamischen Adsorptionsmodells mit einer irreversiblen Adsorption (durch Interkalation) und einer Langmuir-Isotherme	13
2.10	Schematische Darstellung der Dispergierung von Montmorillonitplättchen in Wasser und Interkalation von Lysozym	14
2.11	Schematischer Aufbau von Hydrotalciten	18
2.12	Prozentuale Zusammensetzung von industriellem Kartoffelfruchtwasser	19
2.13	Die Hauptglykoalkaloide der Kartoffel α -Solanin und α -Chaconin	21
3.1	Aufreinigungstechniken bei Proteinen	23
3.2	IEP und Molekulargewichte der verwendeten Modellproteine	27
3.3	pH-Wert-abhängige Adsorption von Ovalbumin und α -Chymotrypsin an EX M 1607, EX M 1753, EX M 926 I und Puranit UF	29
3.4	pH-Wert-abhängige Adsorption von Ovalbumin, alkalischer Phosphatase, humanem Serumalbumin und Lysozym an das ungeladene Tonmineral Westmin D100	31
3.5	Schematische Darstellung der Struktur von Sepioliten	32
3.6	Vorläufiges Strukturmodell des Materials EX M 1607	33
3.7	REM-Aufnahmen von EX M 1607 > 45 μ m	34
3.8	pH-Wert-abhängige Adsorption unterschiedlicher Modellproteine mit einem IEP < pH 7 an EX M 1607	35

3.9	pH-Wert-abhängige Adsorption unterschiedlicher Modellproteine mit einem IEP > pH 7 an EX M 1607	38
3.10	Adsorptionsisothermen von Ovalbumin, Hämoglobin und Trypsinogen an EX M 1607	40
3.11	Adsorption von Ovalbumin an EX M 1607 und den kommerziellen Kationentauscher UNOsphere S (BIO-RAD) in Abhängigkeit von der Zeit.	44
3.12	Adsorption von Ovalbumin an EX M 1607 und UNOsphere S in Abhängigkeit von der Ionenstärke	45
3.13	Desorption von Ovalbumin	47
3.14	Druckabfall unterschiedlicher Materialien	48
3.15	Chromatogramm der Separation von Ovalbumin und Lysozym mit EX M 1607	50
3.16	SDS-PAGE der der Separation von Ovalbumin und Lysozym mit EX M 1607	50
3.17	pH-Wert-abhängige Adsorption unterschiedlicher Modellproteine an Synthal 696	52
3.18	Prozentuale Desorption von Ovalbumin nach Adsorption an Synthal 696	55
3.19	Beladung von Synthal 696 und MacroPrep 25 Q mit BSA	56
4.1	pH-Wert-abhängige Adsorption von α -Solanin an Tonminerale	60
4.2	pH-Wert-abhängige Adsorption von α -Solanin an synthetische Hydrotalcite	63
4.3	Orientierung von α -Solanin zur Talk-Oberfläche nach der Moleküldynamik-Simulation	66
4.4	Mittlere, auf der Simulation basierende berechnete potentielle Adsorptionsenergien	66
4.5	Adsorption von α -Solanin an Puranit UF und Puranit UF calciniert in Abhängigkeit von der konsekutiv zugegebenen Solaninmenge	69
4.6	Zeitabhängigkeit der Adsorption von α -Solanin	70
4.7	Anteile von desorbiertem α -Solanin in Prozent von der adsorbierten Menge	72
5.1	SDS-PAGE-Gele der Überstände nach der Adsorption von KFW an EX M 1607 und Puranit UF bei pH 4-9	77
5.2	Desorption der Kartoffelproteine	79
5.3	Sequentielle Desorption der Kartoffelproteine	79

5.4	SDS-PAGE der mittels Puranit UF aufgereinigten Proteinfractionen nach Aufkonzentrierung und anschließender Lyophilisierung	81
5.5	Patatinaktivität und Trypsininhibierung der mittels Puranit UF unter statischen Bedingungen separierten Proteinfractionen	83
5.6	Abreicherung von α -Solanin aus Kartoffelfruchtwasser	85
5.7	Prozentuale Abreicherung von α -Solanin aus KFW bezogen auf die zur Abreicherung verwendete Adsorbensmenge	86
5.8	Prozentuale Glykoalkaloidgehalte der Proteinfractionen nach Aufreinigung mit EX M 1607, Puranit UF und calciniertem Puranit UF	88
5.9	Chromatogramm der Separation von Kartoffelproteinen mittels präparativer HPLC mit dem Material EX M 1607 > 45 μ m	90
5.10	SDS-PAGE der mittels präparativer HPLC mit EX M 1607 aufgereinigten Proteinfractionen	90
5.11	Patatinaktivität und Trypsininhibierung der mittels EX M 1607 chromatographisch separierten Proteinfractionen	92
5.12	SDS-PAGE-Gele der Überstände nach der Adsorption von KFW an Synthal 696 bei pH 5-9	94
7.1	pH-Wert-abhängige Adsorption von Modellproteinen an EX M 1753	101
7.2	pH-Wert-abhängige Adsorption von Modellproteinen an EX M 926 I	102
7.3	pH-Wert-abhängige Adsorption von HSA, Lysozym und Trypsinogen an Puranit UF	103
7.4	Adsorption von Ovalbumin (OVA) und humanem Serumalbumin (HSA) an EX M 926 I (Kerolit/Saponit) in Abhängigkeit von der Ionenstärke	104
7.5	Adsorptionsisothermen von Ovalbumin an EX M 1753 und EX M 926 I	105
7.6	Desorption von Ovalbumin (EX M 1753 und EX M 926 I)	106
7.7	Desorption von Ovalbumin (EX M 1753)	106
7.8	REM-Aufnahmen von Puranit UF „grob“	107
7.9	REM-Aufnahmen von EX M 1753 > 45 μ m	107
7.10	REM-Aufnahmen von Synthal 696	108
7.11	SDS-PAGE-Gel von KFW nach der Adsorption an EX M 1753 bei pH 4-9	108

7.12	SDS-PAGE der mittels calciniertem Puranit UF aufgereinigten Proteinfraktionen nach Aufkonzentrierung und anschließender Lyophilisierung	109
7.13	Chromatogramm der Separation von Kartoffelproteinen mittels präparativer HPLC mit einem EX M 1607-ähnlichen Granulat	110
7.14	SDS-PAGE der mittels präparativer HPLC mit dem EX M 1607-ähnlichen Granulat aufgereinigten Proteinfraktionen	110
7.15	Beispiel einer Kalibriergerade zur UV-photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration (Ovalbumin, 50 mM Acetat, pH 5)	118
7.16	Reaktion des BCA-Assays	118
7.17	Beispiel einer Kalibriergerade für α -Solanin zur chromatographischen Bestimmung der α -Solaninkonzentration	120
7.18	Chromatogramm von KFW nach essigsaurer Extraktion und Festphasenextraktion	121
7.19	Umsetzung von p-Nitrophenolcaprat zu p-Nitrophenolat durch Patatin	121
7.20	Enzymreaktion von N- α -Tosyl-L-Argininmethylester (TAME) mit Trypsin	123

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht über die im KFW enthaltenen Klassen von Protease-Inhibitoren	20
3.1	Einige relevante Eigenschaften der Materialien EX M 1753, EX M 926 I, EX M 1607, Puranit UF und Westmin D100	25
3.2	Einige relevante Eigenschaften der synthetischen Hydrotalcite Synthal 696 und EX M 1994	26
3.3	Stokes'sche Radien der verwendeten Modelproteine	
3.4	Chemische Zusammensetzung von EX M 1607	
3.5	Berechnete Parameter m und q_{\max} der Anpassung der experimentell ermittelten Daten an das LF-Modell	40
3.6	Berechnete AIC-Werte für die LF-Isotherme und die Freundlich-Isotherme	42
3.7	Vergleich der dynamischen Kapazitäten von zwei kommerziellen Kationentauschern und EX M 1607 bei unterschiedlichen Flussraten	49
4.1	Einige relevante Eigenschaften der zur α -Solaninadsorption untersuchten anorganischen Adsorbentien.	58
4.2	Zetapotentiale von Synthal 696 in einem pH-Bereich zwischen pH 6-10	63
4.3	Parameter der Moleküldynamik-Simulation	65
4.4	Beladung der untersuchten Adsorbentien mit α -Solanin bei pH 7	67
4.5	Adsorption von α -Solanin an unterschiedliche Adsorbentien nach 5 Minuten Inkubationszeit	71
7.1	Puffer zur Equilibrierung (100 mM) und Adsorption (50 mM)	111
7.2	Vorschrift zur Aufnahme von Protein-Adsorptionsisothermen	112
7.3	Verwendete Ionenstärken (NaCl-Konzentration plus 50 mM Pufferkonzentration)	113
7.4	Zusammensetzung von Reagenz A und Reagenz B des BCA-Assays	119
7.5	Bedingungen der HPLC-Methode zur Glykoalkaloid-Analytik	119
7.6	Reagenzien und Bedingungen zur Durchführung des Patatin-Aktivitätsassays	122
7.7	Reagenzien und Bedingungen zur Durchführung des Trypsin-Aktivitätsassays	123

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden natürliche Tonminerale mit negativer Oberflächenladung und synthetische Hydrotalcite mit positiver Oberflächenladung auf ihre Eignung als Kationentauscher bzw. Anionentauscher für die Aufreinigung von Proteinen, sowie zur Bindung von α -Solanin untersucht.

Zunächst wurden Tonminerale und synthetische Hydrotalcite mit unterschiedlichen Ladungseigenschaften im Modellsystem bezüglich ihrer Adsorptionseigenschaften gegenüber ausgewählten Modellproteinen charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Bindekapazität als Funktion des pH-Wertes sich mit einem Kationentauscher- bzw. Anionentauscherverhalten beschreiben lässt. Das Tonmineral EX M 1607 wurde dabei für den Einsatz als Kationentauscher als besonders geeignet bewertet. Die im Modellsystem ermittelten Daten belegen, dass EX M 1607 und Synthal 696 im Vergleich zu kommerziellen Kationen- bzw. Anionentauschern wesentlich höhere Kapazitäten, sowohl unter statischen, als auch unter dynamischen Bedingungen aufweisen.

Des Weiteren wurde, um einen neuen Prozess zur Abreicherung von Glykoalkaloiden aus Kartoffelfruchtwasser zu entwickeln, im Modellsystem systematisch die Eignung unterschiedlicher Adsorbentien mit variierenden Ladungseigenschaften bezüglich der Adsorption von α -Solanin untersucht. Dabei zeigte sich, dass Tonminerale mit hoher negativer Ladung am besten geeignet sind, α -Solanin mit hohen Bindungskapazitäten zu adsorbieren.

Die Erkenntnisse der Modelluntersuchungen zur Protein- und α -Solaninadsorption wurden auf die Entwicklung eines neuen Aufreinigungsverfahrens für Kartoffelfruchtwasser übertragen. Unter Verwendung natürlicher Tonminerale ist die Separation der Patatine und Protease-Inhibitoren unter gleichzeitiger Abreicherung der Glykoalkaloide im Kartoffelfruchtwasser sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Bedingungen durchführbar. Die biologische Aktivität der aufgereinigten Proteinfractionen bleibt bei diesem Separationsprozess erhalten.

Schlagwörter: Tonminerale, Smektite, Hydrotalcite, Proteinseparation, Glykoalkaloid-abreicherung, Kartoffelfruchtwasser

Abstract

In the present study natural clay minerals with a negative surface charge and synthetic hydrotalcites with a positive surface charge were characterized regarding their ability to serve as cation-exchanger or anion-exchanger, respectively. Furthermore their binding behaviour concerning α -solanine was examined.

At first, experiments in model systems with diverse clay minerals and a synthetic hydrotalcite with differing charge properties were characterized concerning their adsorption behaviour for different model proteins with varying isoelectric points and molecular weights. According to the experimental data, the binding capacity of the materials is related to the adsorption pH. The natural clay and the hydrotalcite show an adsorption, which can be described with the behaviour of cation-exchangers or anion-exchangers, respectively. The clay EX M 1607 is especially suitable as cation-exchange material. It was shown, that this material provides higher binding capacities for proteins than a commercially available cation exchanger under static as well as under dynamic conditions. The synthetic hydrotalcite Synthal 696 was also able to bind higher amounts of protein compared to a commercially available anion-exchanger under static and dynamic conditions.

To develop a new process for the depletion of glycoalkaloids present in potato fruit juice, the ability of different adsorbents to bind α -solanine was tested. Therefore adsorbents with varying surface charges were applied. It was found, that especially clays with a highly negative surface charge provide high adsorption capacities for the glycoalkaloid.

The data obtained by the characterization experiments with model proteins and α -solanine were adapted to develop a new separation process for potato fruit juice. With this new process the separation of patatine and protease inhibitors is possible in one step with the depletion of the glycoalkaloids. The biological activity of the separated proteins is maintained during the separation.

Key words: clay minerals, smectites, hydrotalcites, protein separation, depletion of glycoalkaloids, potato fruit juice

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die meisten Isolations- und Aufreinigungsprozesse für biologisch aktive Substanzen schließen neben anderen Separationsmethoden (z. B. Filtration) chromatographische Schritte ein. Chromatographische Verfahren sind generell kostenintensiv, wobei das Sorbens in hohem Maße zu den Kosten beiträgt. Ionentauscher gehören zu den am häufigsten verwendeten stationären Phasen. In Bezug auf die Reinheit des Zielproduktes und für die Verlängerung der Standzeiten des Sorbens sind Regeneration, Reinigung und Sterilisation im Anschluss an den Trennschritt von hoher Relevanz. Diese erfordern einen zum Teil sehr hohen Verbrauch an Wasser, Puffern oder Lösungsmitteln. Zudem müssen Chromatographiematerialien bei Mehrfachverwendung fortlaufend auf ihre Trennleistung oder mikrobielle Kontaminationen überprüft werden. Aus dem Einsatz von Einweg-Materialien könnte eine teilweise Einsparung der Kosten für die Regeneration und Reinigung resultieren. Ein Bereich, in welchem die Verwendung kostengünstiger Einmal-Chromatographiematerialien sinnvoll sein könnte, ist die Isolierung von prinzipiell wertvollen Komponenten aus industriellen Reststoffen und Beiprodukten.

Der erfolgreiche Einsatz eines chromatographischen Materials für den einmaligen Gebrauch hängt von einer reproduzierbaren hohen Trennleistung, verbunden mit einem sehr niedrigen Investitionsaufwand, hohen Bindungskapazitäten, sowie einer hohen Bindungskinetik für die Zielproteine bzw. störende Kontaminanten ab. Des Weiteren muss ein solches Material in großer Menge verfügbar sein.

Natürlich vorkommende, anorganische Tonminerale oder synthetische Hydrotalcite stellen aufgrund ihrer hohen Bindungskapazitäten für Proteine und verschiedenste andere organische Moleküle eine Alternative zu konventionellen chromatographischen Medien dar. Die Fähigkeit, mit organischen Molekülen Wechselwirkungen einzugehen, resultiert aus einer hohen spezifischen Oberfläche sowie einer hohen Oberflächenreaktivität (permanente Ladung und Ionenaustausch). Der Einsatz von Hydrotalciten ist bislang auf die Anwendung als Katalysatoren, im medizinischen Bereich als Antazida, bei der Entfernung von Umweltkontaminanten und als Füllstoffe in Polymeren beschränkt. Einer Anwendung von Tonmineralen als Chromatographiematerialien steht die Eigenschaft entgegen, in wässriger Lösung zu quellen und viskose Gele auszubilden. Aufgrund dieser Einschränkung war der Einsatz dieser bislang nur im Batch-Verfahren möglich. Kürzlich wurden Tonminerale

identifiziert, bei welchen das Quellen und die Bildung viskoser Gele unterbleiben. Daraus resultiert die Möglichkeit, mit diesen Materialien Chromatographiesäulen zu befüllen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden unterschiedliche natürliche Tonminerale sowie synthetische Hydrotalcite der Süd-Chemie AG auf ihre Eignung als Kationentauscher bzw. Anionentauscher für die chromatographische Aufreinigung von Proteinen und die Abreicherung von unerwünschten Nebenprodukten wie z. B. Glykoalkaloiden untersucht. Unterschiedliche Tonminerale sowie synthetische Hydrotalcite sollen dazu bezüglich ihres Adsorptionsverhaltens gegenüber Modellproteinen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten und Molekulargewichten charakterisiert werden. Des Weiteren soll die Eignung unterschiedlicher Adsorbentien mit variierenden Oberflächeneigenschaften untersucht werden, α -Solanin zu adsorbieren. Die in den Modellsystemen gewonnenen Erkenntnisse sollen in einem Separationsprozess angewendet werden.

Die Separation zweier Proteinfractionen in Kartoffelfruchtwasser, welches bei der industriellen Stärkegewinnung in großer Menge als Beiprodukt anfällt, soll mittels kostengünstiger Adsorbentien unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität erfolgen. Patatin, welches mit 40-60 % den größten Anteil des Kartoffelproteins darstellt, weist eine hohe ernährungsphysiologische Qualität auf. Des Weiteren enthält das Protein des KFW etwa 20-30 % verschiedene Protease-Inhibitoren. Eine Verwendung von Patatin als Proteinzusatz in der Lebensmittelindustrie ist denkbar, während der Einsatz von Protease-Inhibitoren auf Grund ihrer appetitzügelnden Wirkung im Bereich des Functional Food vorstellbar ist. Eine Gewinnung der Proteine des KFW erfolgt zurzeit mittels Hitzeoagulation. Bei diesem Verfahren entsteht ein unlösliches Proteinpräzipitat ohne biologische Aktivität, welches als Futtermittelzusatz dient. Eine Verwendung natürlicher Adsorbentien zur Separation könnte die kostengünstige Herstellung von Proteinisolaten unter Erhaltung der biologischen Aktivität ermöglichen, woraus eine höhere Wertschöpfung resultieren könnte. Ein weiterer relevanter Aspekt der Verwendung von Kartoffelproteinen im Lebensmittelbereich ist die Existenz von toxischen Glykoalkaloiden im KFW, welche auch im isolierten Protein auftreten. Die Abreicherung der Glykoalkaloide ist zum einen auf Grund der Toxizität von hoher Bedeutung. Zum anderen führen Glykoalkaloide ab einer bestimmten Konzentration zu sensorischen Beeinträchtigungen des Proteinisolats. Die Untersuchung der Abreicherung von GA aus KFW mittels anorganischer Adsorbentien ist somit ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit.

2 Grundlagen

2.1 Tonminerale

2.1.1 Aufbau und Klassifizierung

Tonminerale bestehen aus schichtartigen Kristallstrukturen. Sie kommen ubiquitär auf der Erde (hauptsächlich in marinen und geologischen Sedimenten) vor und üben dort wichtige Funktionen bei physikochemischen Vorgängen (chemische Homöostase der Ozeane, terrestrischer biogeochemischer Kreislauf von Metallen) aus [1-3]. An der chemischen Evolution waren sie durch Akkumulation biologischer Vorläufermoleküle und anschließender Polymerisation zu biologischen Makromolekülen wahrscheinlich maßgeblich beteiligt [4]. Tonminerale verfügen über folgende charakteristische Eigenschaften:

- Schichtstrukturdicke im Nanometerbereich (0,7-1,0 nm), Anisotropie der Schichten oder Partikel [5],
- Hohe spezifische Oberfläche und hohe Oberflächenreaktivität [1,6,7],
- Verschiedene Oberflächentypen (externe Flächen und Kanten, interne Oberflächen/Zwischenschichtoberflächen) [8],
- Quellung, Ionenaustausch und Oberflächenazidität [9].

Als schichtartig aufgebaute Aluminosilikate sind Tonminerale aus Tetraedern und Oktaedern aufgebaut. Si-Tetraeder bilden im Zusammenschluss die tetraedrischen Schichten, wobei die Möglichkeit einer Substitution von Si durch z. B. Al oder Fe besteht. Die Tetraeder sind durch drei basale Sauerstoffatome miteinander verbunden. Ein viertes Sauerstoffatom verknüpft die tetraedrischen Schichten mit der Oktaederschicht [10,11]. Eine laterale Bindung der Oktaeder miteinander entsteht durch das gemeinsame Belegen der Kanten.

Tonminerale werden nach Anzahl ihrer tetraedrischen und oktaedrischen Schichten und deren Kombination dem 1:1-Schichttyp oder dem 2:1-Schichttyp zugeordnet [5,6]. Der Aufbau beider Schichttypen ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Tonminerale, welche eine

gemischte Anordnung der Schichten aufweisen und aus mehreren unterschiedlichen, zufällig verteilten Komponenten bestehen, kommen seltener vor [5].

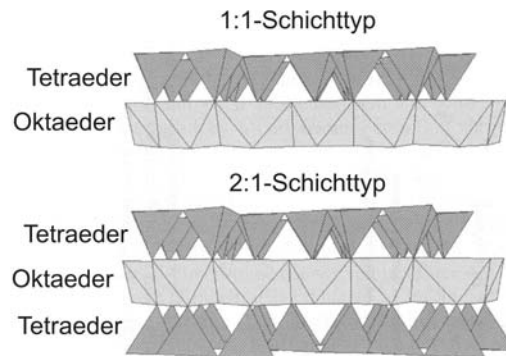


Abbildung 2.1: Modell der 1:1- und 2:1-Schichttypstrukturen von Tonmineralen (adaptiert nach [5]).

a) Der 1:1-Schichttyp

Tonminerale des 1:1-Schichttyps setzen sich aus einer tetraedrischen und einer daran gebundenen, oktaedrischen Schicht zusammen und werden der Gruppe der Serpentine-Kaoline zugeordnet. Diese haben die allgemeine Formel $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ (Serpentine) bzw. $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ (Kaoline). In den Zwischenräumen der Oktaeder- und Tetraederschichten befinden sich keine Ionen, es kann aber Wasser interkaliert sein. Bei Serpentine-Kaolinen treten keine Substitutionen für Si in den Tetraederschichten und nur wenige für Al in den Oktaederschichten auf, so dass dieser Gruppe Tonminerale keine oder kaum negative Schichtladungen aufweist [1,5].

b) Der 2:1-Schichttyp

Der 2:1-Schichttyp besteht aus einer oktaedrischen Schicht, welche zwischen zwei tetraedrischen Schichten gebunden vorliegt. Zu diesem Schichttyp gehören Talk-Pyrophyllite, Glimmererden, Vermikulite und Smektite. Diese Gruppen werden abhängig von ihrer Schichtladung, welche durch isomorphe Substitutionen entsteht, voneinander unterschieden. Beispielsweise werden Vermikulite von Smektiten durch eine höhere Schichtladung resultierend aus einem höheren Anteil an Substitutionen in den Tetraederschichten abgegrenzt [3], wodurch Vermikulite z. B. ein geringeres Quellvermögen aufweisen [12], sowie durch eine bestimmte Anordnung der Substitutionen

bei den Vermikuliten, welche im Gegensatz zu den Smektiten zufällig verteilt vorkommen [13,14]. Abbildung 2.2 zeigt eine Klassifizierung der 2:1-Tonminerale.

Gruppe	Zwischenschichtmaterial	Ladung	dioktaedrisch	trioktaedrisch
Talk-Pyrophyllite	keines	0	Pyrophyllit	Talk, Kerolit
Smekтите	hydratisierte austauschbare Kationen	0,2 - 0,6	Montmorillonit Beidellit Nontronit	Saponit Hektorit Stevensit
Vermikulite	hydratisierte austauschbare Kationen	0,6 - 0,9	dioktaedrische Vermikulite	trioktaedrische Vermikulite
Glimmererden	nicht-hydratisierte monovalente Kationen	0,6 - 1,0	Lepidolit Phlogopit	Illit Muskovit

Abbildung 2.2: Übersicht und Zuordnung von 2:1-Tonmineralen. Die angegebene Schichtladung bezieht sich auf eine Formeleinheit. Die Schichtladung nimmt in der Reihenfolge Glimmererden → Vermikulite → Smekтите → Talk-Pyrophyllite ab (adaptiert nach [15]).

Eine weitere Gliederung von Tonmineralen erfolgt in den di- oder trioktaedrischen Strukturtyp. Bei dioktaedrischen Tonmineralen sind pro Formeleinheit ($[\text{Si}_4\text{O}_{10}]^{4-}$) der Tetraederschichten die oktaedrischen Schichten jeweils mit zwei dreiwertigen Kationen besetzt. Durch Substitution von Al^{3+} durch zweiwertige Ionen oder Si durch Al in der Tetraederschicht kann noch eine zusätzliche anionische Ladung entstehen.

Bei einem 2:1-Schichtsilikat, bei dem alle oktaedrischen Plätze, ähnlich der Struktur des Brucits ($\text{Mg}(\text{OH})_2$), besetzt sind, spricht man von einem trioktaedrischen Tonmineral [11]. In Abbildung 2.3 ist der schematische Aufbau dioktaedrischer und trioktaedrischer Tonminerale vergleichend dargestellt.

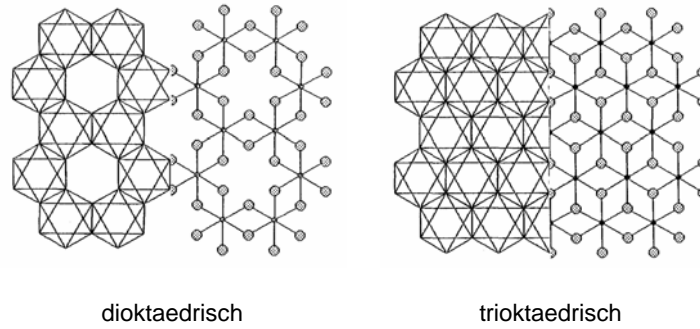


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Strukturen von dioktaedrischen (vorrangig Al) und trioktaedrischen (vorrangig Mg) Tonmineralen [11]. (Polyederprojektion/Atome und Bindungen)

2.1.2 Aufbau und Klassifizierung smektitischer Tonminerale

Die untersuchten und im Folgenden näher beschriebenen Tonminerale werden den Smektiten zugeordnet, welche als quellende 2:1-Tonminerale in der Natur sehr verbreitet sind und einen wichtigen Bestandteil des Bodens bilden [16]. Wie bereits in Abschnitt 2.1.1 dargestellt, verknüpft sich in der Smektitstruktur eine Oktaederschicht mit zwei Tetraederschichten. Smektite weisen eine Schichtladung zwischen 0,2-0,6 pro Formeleinheit auf. In den Oktaederschichten sind in erster Linie trivalente Kationen (dioktaedrische Smektite) oder divalente Kationen (trioktaedrische Smektite) eingebaut. Abbildung 2.4 zeigt eine Klassifizierung der smektitischen Tonminerale, welche nach den Substitutionen in den Tetraeder- und Oktaederschichten erfolgt.

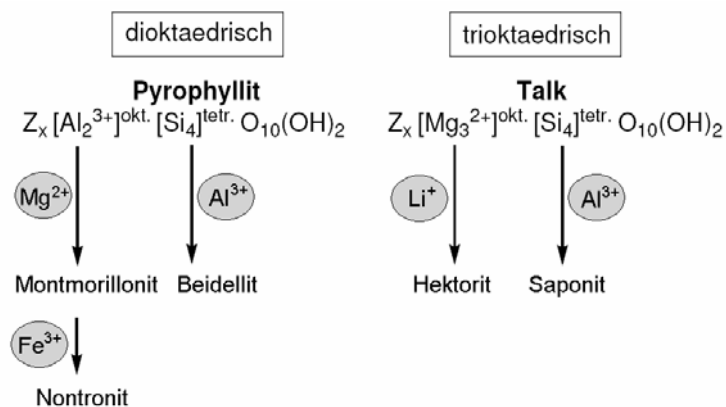


Abbildung 2.4: Ableitung der di- und trioktaedrischen Smektite. Durch Substitutionen in den Oktaedern und Tetraedern der ungeladenen 2:1-Tonminerale Talk und Pyrophyllit entstehen z. B. Montmorillonit, Beidellit, Nontronit, Hektorit und Saponit (nach [5]).

Ausgehend von den beiden ungeladenen 2:1-Schichtsilikaten Talk und Pyrophyllit werden die Strukturen der einzelnen smektitischen Tonminerale abgeleitet, wie in Abbildung 2.4 dargestellt ist. Ausgehend von der Pyrophyllitstruktur entsteht durch eine partielle Substitution der Al^{3+} -Ionen der Oktaederschicht Montmorillonit, während Beidellit aus der Substitution von Si^{4+} durch Al^{3+} in der Tetraederschicht hervorgeht. Analog dazu ist eine Ableitung der trioktaedrischen Smektite von Talk möglich, indem entweder Si^{4+} in der Tetraederschicht durch dreiwertige Ionen wie Al^{3+} (z. B. bei Saponiten) oder Mg^{2+} durch Li^{+} (wie bei Hektoriten) ersetzt wird. In allen Fällen wird abhängig vom Substitutionsgrad mit niedriger geladenen Ionen eine permanente negative Schichtladung erzeugt. Die negative Ladung wird durch den Einbau von Zwischenschichtkationen ausbalanciert. Ein Austausch dieser Kationen ist möglich [5].

Smektite enthalten Wasser in unterschiedlicher Form. Es kann in Mikroporen kapillar zurückgehalten werden oder im Schichtzwischenraum mit der internen oder externen Oberfläche assoziiert vorliegen [3,5].

Abbildung 2.5 zeigt eine typische Kristallstruktur eines smektitischen Tonminerals am Beispiel von Montmorillonit. In Abbildung 2.6 ist die Organisation von Montmorillonitplättchen dargestellt.

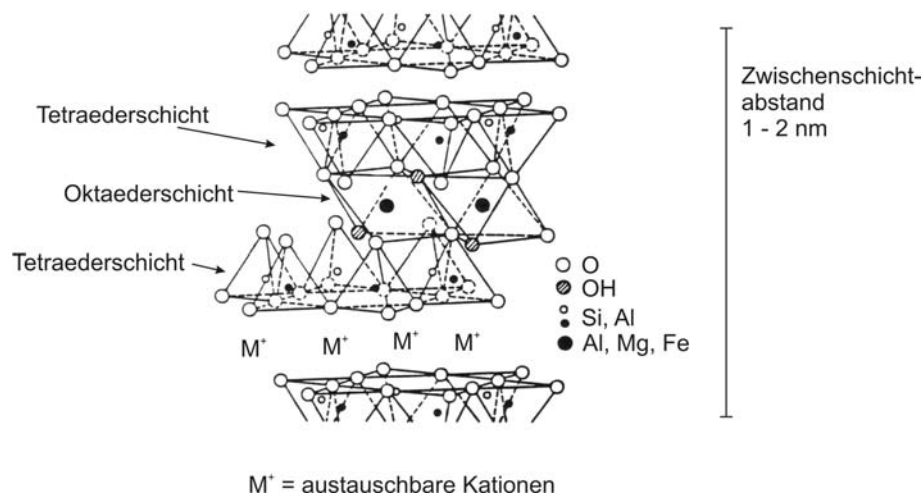


Abbildung 2.5: Kristallstruktur eines Smektit am Beispiel von Montmorillonit (adaptiert nach [17]).

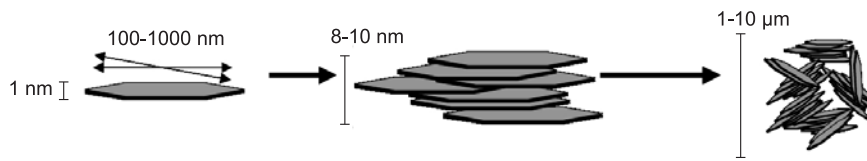


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Organisation von Montmorillonitplättchen. (adaptiert nach [18])

2.1.3 Oberflächenreaktivität

Auf den meisten Tonmineraloberflächen liegen etwa sechs OH-Gruppen pro nm^2 vor [19]. Die Silanolgruppen auf der Oberfläche sind die Stellen, an denen die Adsorption von Wasser als auch vieler organischer Moleküle stattfindet. Dies geschieht z. B. durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Die Eigenschaft, Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden, wird durch den Lewisbasencharakter (Elektronenpaardonor) der (Si, Al)-O-Bindungen bestimmt [20]. Bei einer Calcinierung (Erhitzung auf mehrere hundert Grad für mehrere Stunden) werden die Silanolgruppen eliminiert. In Folge dessen weist die Oberfläche überwiegend Siloxangruppen auf, und die Oberfläche verfügt nun über einen eher hydrophoben Charakter [19]. In Abbildung 2.7 ist eine Silikatoberfläche im hydroxylierten (A) und im dehydroxylierten (B) Zustand dargestellt.

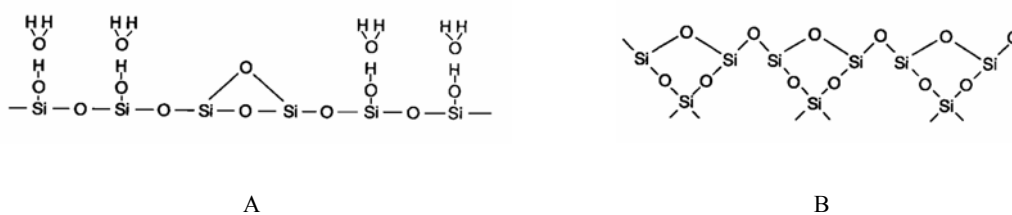


Abbildung 2.7: Oberfläche von Tonmineralen im hydroxylierten (A) und dehydroxylierten (B) Zustand [19].

Besonders bei der Adsorption großer Moleküle fällt der Eigenschaft der Tonmineraloberfläche, Wasserstoffbrücken zu bilden, eine signifikante Bedeutung zu. Auch die Ausbildung von van-der-Waals-Kräften übt einen wesentlichen Einfluss auf die Adsorption großer organischer Moleküle aus [21]. Smektitische Oberflächen tragen zwei unterschiedliche Arten von Ladungen. Diese ist zum einen die permanente negative Ladung,

2.1.4 Wechselwirkungen mit organischen Molekülen

a) Wechselwirkungen mit Proteinen

Smektitische Tonminerale weisen eine Affinität zur Bindung von Proteinen auf. Diese beruht auf der hohen spezifischen Oberfläche in Kombination mit Quellfähigkeit und Ladung sowie der Eigenschaft Kationen auszutauschen [25]. Die Mechanismen, die bei der Adsorption von Proteinen auf Tonmineraloberflächen von Bedeutung sind, wurden bisher nicht vollständig aufgeklärt [26]. Die Wechselwirkungen von Proteinen und Tonmineralen hängen vom pH-Wert, von der Kationenaustauschkapazität und von der Art der Kationen zwischen den Schichten des Tonminerals, vom isoelektrischen Punkt und der Größe des Proteins sowie von der Temperatur ab [27]. Die Proteinadsorption an Tonminerale ist ein dynamischer Prozess, wobei die Eigenschaften der Oberfläche bedeutsam sind. Größtenteils werden Proteine mehr von einer nichtionischen und hydrophoben, als von einer polaren und hydrophilen Oberfläche beeinflusst [28]. Proteine adsorbieren generell durch elektrostatische, hydrophobe und/oder hydrophile Wechselwirkungen [25,29]. Tonmineraloberflächen sind in der Lage, als Lewissäuren und -basen sowie als Brønstedsäuren und -basen zu agieren [30,31]. Die Proteinadsorption ist oft irreversibel [28,32] und erfolgt meist in einer monomolekularen Schicht [29,33], ist aber auch in einer zweiten, locker gebundenen Schicht möglich, wobei die Proteinmoleküle der zweiten Schicht vermutlich weiter verteilt und stark hydratisiert vorliegen [28]. Außerdem sind an den Adsorptionsvorgängen Wasserstoffbrückenbindungen der N-H- und O-H-Gruppen mit den basalen Sauerstoffatomen sowie van-der-Waals-Kräfte beteiligt. Die Adsorption von Proteinen an Tonmineraloberflächen zeigt eine enge Korrelation zum pH-Wert der Proteinlösung. Proteine haben an ihrem isoelektrischen Punkt häufig ein Adsorptionsmaximum [29,34]. Dieses Phänomen resultiert aus der Tatsache, dass Proteine unter (und über) ihrem isoelektrischen Punkt eine lockerere makromolekulare Struktur einnehmen. Bei extremeren pH-Werten liegt ein Protein im Vergleich zum nativen Zustand stärker expandiert vor [29,35], und die Seitenketten sind in Richtung Denaturierung alterniert. Dabei weist das Peptidrückgrat allerdings eine Faltung auf, die dem nativen Zustand analog ist. Ein solches Verhalten tritt besonders bei globulären Proteinen auf [35]. Resultierend daraus strecken sich die Proteinmoleküle bei der Adsorption in gewissem Maße auf der Oberfläche aus. Die stärker werdenden elektrostatischen Wechselwirkungen bei extremeren pH-Werten zwischen dem positiv geladenen Protein und der negativ

geladenen Oberfläche amplifizieren diesen Effekt [29]. Demzufolge nimmt ein einzelnes Proteinmolekül ein größeres Areal auf der Oberfläche ein, so dass insgesamt weniger Moleküle adsorbiert werden können. Polypeptide, welche über viele α -helikale und zufällig aufgewickelte Strukturelemente verfügen, tendieren während der Adsorption in erhöhtem Maße dazu, sich zum Teil zu entfalten und gestreckt adsorbiert zu werden [25].

Es ist wahrscheinlich, dass eine Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche von Tonmineralen konformative Änderungen auf der Sekundärstrukturebene bewirkt. Eine Verringerung der Aktivität adsorbierter Enzyme ist die Konsequenz [36]. Allerdings erstrecken sich konformative Änderungen vermutlich nur auf die Bereiche eines Proteins, die in direktem Kontakt mit der Oberfläche stehen. Die katalytische Aktivität von Enzymen bleibt nach der Adsorption dennoch meist in verringerter Form erhalten [26].

Die Adsorption von Proteinen an Tonminerale kann vereinfacht mit Langmuir- und Freundlich-Isothermen modelliert werden [32,40-42]. Das Langmuir-Modell liefert allerdings nur eine begrenzte Beschreibung [43], während dynamische Modelle eine genauere Darstellung der Adsorptionsvorgänge ermöglichen, wobei zusätzlich die Orientierung, die Konformation sowie eine gewisse laterale Mobilität der Proteine auf der Oberfläche beachtet werden [28]. Ein graphischer Vergleich zwischen irreversibler Adsorption, einem dynamischen Adsorptionsmodell und dem Langmuir-Modell ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Die Proteinkonzentration der Lösung beeinflusst die Orientierung der adsorbierten Proteine, wobei sich eine zufällige Verteilung auf der Oberfläche ergibt [28,33].

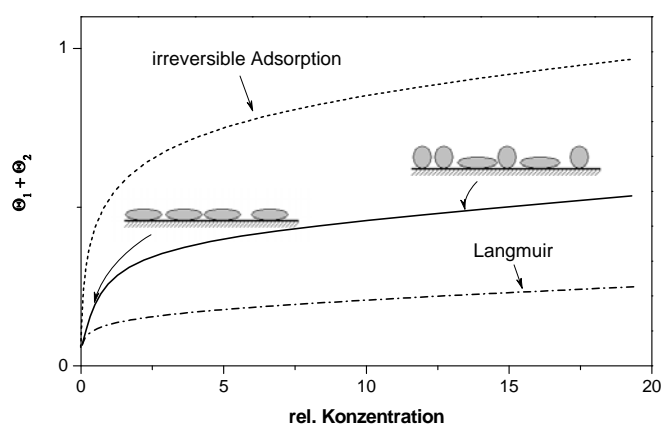


Abbildung 2.9: Vergleich des dynamischen Adsorptionsmodells mit einer irreversiblen Adsorption (durch Interkalation) und einer Langmuir-Isotherme [28].

Interkalation

Durch einen Austausch mit den eingelagerten Kationen können Proteine in die aufgeweiteten Schichten quellfähiger Tonminerale interkaliert werden [26,27,32,37]. Diese Annahme stützt sich auf Röntgendiffraktionsanalysen [32]. Durch NMR-Experimente wurde die Interkalation von Polypeptidseitenketten von Poly-D-Lysin in die Zwischenschichten von synthetischem Montmorillonit und Beidellit direkt nachgewiesen [38]. Die Möglichkeit der Proteininterkalation besteht, wenn sich die Proteine in einen positiven, neutralen oder nur leicht negativen Ladungszustand befinden. Bei stark negativer Nettoladung des Proteins ist eine Einlagerung erschwert [27]. Ein Modell zur Beschreibung der Interkalationsvorgänge ist am Beispiel von Montmorillonit und Lysozym im Folgenden dargestellt (Abbildung 2.10).

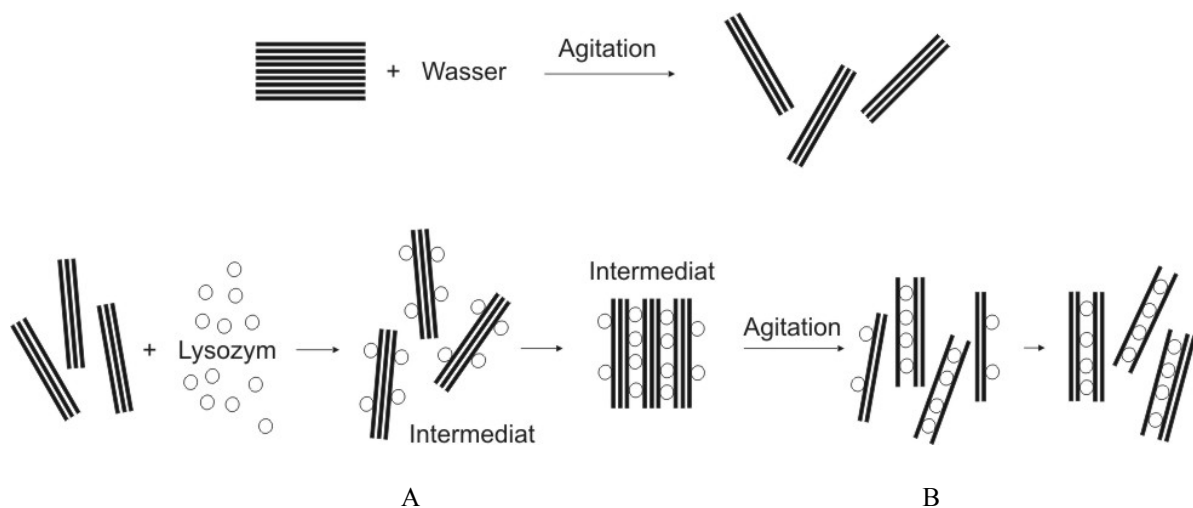


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Dispergierung von Montmorillonitplättchen in Wasser (oben). Bei einer Addition eines Proteins, hier am Beispiel von Lysozym, resultiert die Bildung unterschiedlicher Intermediate, woraus anschließend ein Tonmineral-Lysozym-Komplex gebildet wird (adaptiert nach [37]).

Bei der Dispergierung von Smektiten in wässriger Umgebung kann es zu einer partiellen Delaminierung kommen, allerdings liegen die Plättchen größtenteils aggregiert vor (vergl. Abbildung 2.10 oben). Die Fähigkeit zur Dispergierung hängt von der Bindungsstärke zwischen den einzelnen Plättchen in Bezug auf die Scherkräfte ab, welche während der Dispergierung auf die Montmorillonitplättchen einwirkt. Lysozym mit einem IEP bei pH 11 liegt bei pH 7 positiv geladen vor. Folglich resultiert die Zugabe von Lysozym zum

Tonmineral in Lösung bei pH 7 in eine Adsorption (vergl. Abb. 2.10 A). Die negative Nettoladung des sich so bildenden Tonmineral-Lysozymkomplexe verringert sich mit zunehmender Menge an adsorbiertem Lysozym. Eine erhöhte Tendenz dieser Komplexe, Aggregate zu bilden ist die Konsequenz. (vergl. Abb. 2.10 B). Die maximale Neigung zur Aggregatbildung ist bei Lysozymkonzentrationen zu erwarten, bei welchen soviel Lysozym zwischen zwei Montmorillonitschichten adsorbiert ist, dass die negative Nettoladung neutralisiert wird. Die Komplexe werden mittels starker ionischer Bindungen zusammen gehalten. Die Interkalation der Proteinmoleküle zwischen Montmorillonitplättchen ist irreversibel [37].

Adsorption

Anderen Quellen nach geschieht die Adsorption von Proteinen an Tonmineraloberflächen nur peripher durch die Wechselwirkungen der Proteinseitenketten, woraus keine Interkalation des Polypeptidrückgrats in die Schichtzwischenräume resultiert [25,39]. Dies ist bei Tonmineralen der Fall, bei denen eine Aggregation der Plättchen in Dispersion weitestgehend unterbleibt und die Plättchen delaminiert vorliegen. So kann eine Proteinadsorption an die Oberflächen ohne eine Interkalation erfolgen.

b) Wechselwirkungen mit anderen organischen Molekülen

Tonminerale gehen durch die verschiedenen Wechselwirkungsmechanismen Interaktionen mit unterschiedlichsten organischen Molekülen ein. Unter Anderem ist die Adsorption von Alkaloiden durch Interkalation (Kationentausch, van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen) in der Literatur beschrieben [44-47].

Des Weiteren interagieren Nukleinsäuren unter sauren Bedingungen durch die Protonierung von Adenin, Guanin und Cytosin durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der permanent negativ geladenen Tonmineraloberfläche. Bei höheren pH-Werten werden die nach außen durch die Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuren mittels der ungeladenen Ribose durch Wasserstoffbrückenbindungen adsorbiert [48,49].

Ebenso können z. B. Organothiophosphorpestizide durch koordinative Wechselwirkungen oder durch Brønstedtsäure-/Brønstedbase-Wechselwirkungen mit den austauschbaren Zwischenschichtkationen und dem Hydratwasser interkaliert werden [50-52]. Für

Nitroaromaten ist die Ausbildung von Elektronendonator/Elektronenakzeptor-Komplexen mit den Sauerstoffatomen der Siloxanoberfläche von Tonmineralen konstituiert [53,54]. Ferner werden, aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen, auch Viren an Tonmineraloberflächen adsorbiert [55-57]. Unterschiedliche mikrobielle Toxine (z. B. Aflatoxine, bakterielle Enterotoxine) interagieren und interkalieren mittels Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben oder ionischen Wechselwirkungen [58-60]. Polysaccharide/Saccharide werden je nach Ladungszustand durch elektrostatische Wechselwirkungen adsorbiert oder zum Teil interkaliert [2,61]. Generell wird die Adsorption negativ geladener Polymere durch die Anwesenheit von polyvalenten Kationen, welche als Brücken zwischen den anionischen Gruppen des Adsorbats und der negativ geladenen Oberfläche fungieren, begünstigt [2].

Darüber hinaus sind Wechselwirkungen von Tonmineralen mit Aminen beschrieben. An den Wechselwirkungen von Tonmineralen mit aliphatischen und zyklischen Aminen kann durch einen Austausch der interkalierten Kationen erfolgen. Eine weitere Möglichkeit zur Adsorption stellen Interkalationsprozesse mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit den Sauerstoffatomen der Silikatschichten sowie ionische Wechselwirkungen mit den interkalierten Kationen dar [62,63].

2.1.5 Applikationen von Tonmineralen

Tonminerale werden in erster Linie wegen ihrer Stabilität und Inertheit, sowie ihrer besonderen rheologischen Eigenschaften in Dispersionen eingesetzt. Sie stellen einen wichtigen Rohstoff bei der Produktion von keramischen Materialien dar und dienen darüber hinaus der Herstellung von Gießereisanden und Bleicherden, als Zusatz zu Spülmitteln für Erdölbohrungen und bei der Pelletierung in der Eisenerzindustrie [21]. Weitere Einsatzgebiete sind beim Recycling und der Reinigung von Wasser sowie bei der Lagerung radioaktiver Abfallstoffe zu nennen [3,12,23,64-66]. Aufgrund ihrer Inertheit finden sie Verwendung als Füllstoffe oder Beschichtungsmittel (Kosmetika, Papier, Kunststoffe) [2], als Isolationsmaterialien und in Dichtungsmitteln (Bauindustrie, Elektroindustrie) [67] oder als Träger für Pestizide, Insektizide oder Katalysatoren [5]. Des Weiteren lassen sich Anwendungsbeispiele in der Lebensmittelindustrie bei der Entfärbung, Stabilisierung und Klärung (durch Proteinentfernung) von Wein und Öl [68-72], sowie in pharmazeutischen

Produkten als Träger zur Wirkstofffreisetzung [61,73], anführen. Basierend auf der Fähigkeit, unterschiedlichste Moleküle zu interkalieren, ist die Konstruktion funktioneller Kompositmaterialien bestehend aus Schichtsilikaten und interkalierten Biopolymeren beschrieben [61]. Mögliche Applikationen solcher Materialien sind z. B. für die Bereiche biomedizinische Materialien [61], Biosensoren [74,75] und Enzymimmobilisierung [76,77] denkbar.

2.2 *Hydrotalcite*

2.2.1 Struktureller Aufbau

Hydrotalcite gehören zur Klasse der Schicht-Hydroxide mit der Idealformel $\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16} \cdot \text{CO}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Die Kristallstruktur basiert auf der hexagonal dichtesten Kugelpackung der Brucit-Struktur ($\text{Mg}(\text{OH})_2$). Es besteht die Möglichkeit der Substitution von Al und Mg, beispielsweise durch Erdalkalimetalle und viele Übergangselemente (besonders der N-Schale). Bei Hydrotalciten wird das durch Hydroxid-Ionen oktaedrisch koordinierte Mg^{2+} partiell durch Al^{3+} ersetzt, woraus eine positive Nettoladung resultiert. Dieses zweidimensional unendliche quasi Makrokation ist über eingelagerte Anionen elektrostatisch an eine weitere Lage gebunden, sodass eine Schichtstruktur erzeugt wird. Zusätzlich zu den ladungsausgleichenden Anionen, wie Carbonat oder Chlorid, wird reversibel Kristallwasser in den Zwischenschichten eingelagert [78]. In den Zwischenschichten können Halogene, nichtmetallische Oxoanionen (z. B. BO_3^{3-} , CO_3^{2-}), Oxometallanionen (z. B. CrO_4^{2-} , MnO_4^-), oder auch anionische Komplexe von Übergangsmetallen wie $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ sowie flüchtige organische Anionen (z. B. CH_3COO^-) eingebaut sein. Ihre Struktur, ihre unterschiedliche chemische Zusammensetzung (durch variable isomorphe Substitutionen), ihre veränderliche Schichtladung und die Fähigkeit, Ionen auszutauschen sowie ihre reaktiven Schichtzwischenräume, ihre rheologischen und kolloidalen Eigenschaften lassen Hydrotalcite den Tonmineralen gegenüber sehr ähnlich erscheinen [5]. Abbildung 2.11 zeigt den schematischen Aufbau von Hydrotalciten.

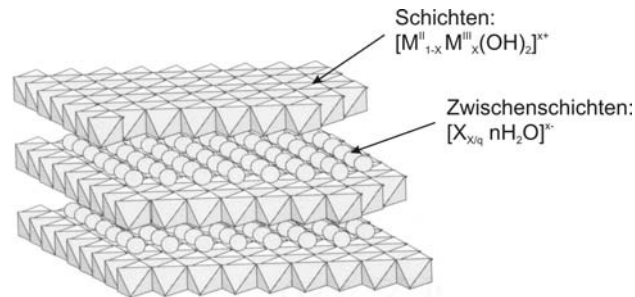


Abbildung 2.11: Schematischer Aufbau von Hydrotalciten (Adaptiert nach [5]).

2.2.2 Anwendungen von Hydrotalciten

Anwendung finden Hydrotalcite hauptsächlich als Katalysatoren bei unterschiedlichsten Reaktionen (Polymerisation von Alkenoxiden, Aldolkondensation, Alkoholsynthese, Nitrilhydrolyse), sowie als Anionenaustauscher für organische und anorganische Materialien [5]. Ein Austausch der Anionen der Zwischenschicht gegen eine Reihe von anderen Anionen ist möglich, woraus eine Aufweitung der Zwischenschicht resultieren kann [79]. Als Beispiele für interkalierte Teilchen sind aliphatische und aromatische Carboxylate [80], Sulfonate und Phosphonate [81], sowie diverse Biomoleküle wie Enzyme [82,83], Aminosäuren [84], Triacylglycerole [85] oder DNA-Fragmente [86,87] anzuführen. Den wichtigsten Einfluss auf die Realisierbarkeit des Anionenaustauschs üben die Art des verwendeten Hydrotalcits (Schichtabstände, spezifische Oberfläche, eingelagerte Anionen) und die Natur des Interkalats (Größe, Konformation, Ladung) aus. Neben elektrostatischen Wechselwirkungen müssen auch sekundäre Effekte wie hydrophobe Interaktionen oder Wasserstoffbrückenbindungen beachtet werden [78,82,84]. Aufgrund ihrer puffernden Eigenschaften werden Hydrotalcite im medizinischen Bereich als Antazida eingesetzt. Ein weiteres Einsatzgebiet für Hydrotalcite aufgrund ihrer adsorptiven Eigenschaften und der Fähigkeit, Anionen auszutauschen, ist bei der Entfernung von Umweltkontaminanten zu nennen. Sie finden des Weiteren Anwendung als Füllstoffe in Polymeren [5].

2.3 Kartoffelfruchtwasser

Bei der industriellen Stärkegewinnung fällt als flüssiges Nebenprodukt das so genannte Kartoffelfruchtwasser (KFW) an, welches etwa 1,8 % Protein enthält (Vergl. Abb. 2.12).

Die industrielle Gewinnung von Kartoffelprotein aus KFW geschieht vorrangig durch Hitzeagulation. Mittels Hitzeagulation gewonnenes Kartoffelprotein ist irreversibel präzipitiert, schlecht löslich und verfügt über keinerlei Funktionalität [88-91]. Anwendung findet das Proteinpräzipitat als Tierfutterzusatz [92].

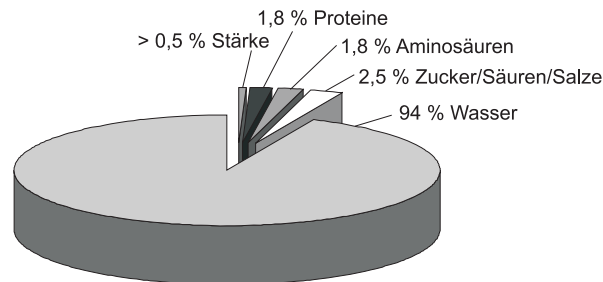


Abbildung 2.12: Prozentuale Zusammensetzung von industriellem Kartoffelfruchtwasser [93].

2.3.1 Kartoffelprotein

Die Proteine im KFW lassen sich in drei große Gruppen unterteilen. Zur ersten Gruppe gehören die Isoformen des Patatins. Bei den Patatinen handelt es sich um eine Klasse von etwa 15 verschiedenen, immunologisch identischen Glykoproteinisoformen mit einer molekularen Masse von ca. 40-43 kDa und isoelektrischen Punkten zwischen pH 4,6 und 5,2. Die in den Vakuolen der parenchymatischen Zellen lokalisierten Patatine liegen in nativer Form wahrscheinlich als Dimere oder Oligomere vor. Patatin stellt etwa 40-60 % des löslichen Proteins in Kartoffelknollen dar und wird, aufgrund seiner hohen Akkumulation, als Speicherprotein angesehen. Im Gegensatz zu anderen Speicherproteinen weist es eine Enzymaktivität (Lipid-Acylhydrolase- sowie Acyltransferase-Aktivität) auf [94-97]. Patatin zeigt eine weite Substratspezifität und ist hydrolytisch aktiv gegenüber Phospholipiden, neutralen Lipiden (Mono- und Diacylglycerolen), Glykolipiden und Estern von langkettigen Fettsäuren. Eine besonders hohe Enzymaktivität ist bei Kettenlängen von C8/C10 und C14/C16 zu verzeichnen [95,98]. Patatin als Monomer besteht aus 366 Aminosäuren [94] und ist an Asparagin 60 und Asparagin 90 *N*-glykosiliert, wobei die Glykosilierungen etwa 4 % der Molekülmasse bilden [99]. Auf Grund einer hohen ernährungsphysiologischen Qualität und einer ausgewogenen Aminosäurezusammensetzung

[88,100-103] wäre Patatin, in seiner funktionellen Form isoliert, ein interessanter Zusatz in der Lebensmittelindustrie [93].

Die zweite Gruppe besteht aus sieben unterschiedlichen Klassen von Protease-Inhibitoren, welche zusammen etwa 20-30 % des Gesamtproteins repräsentieren (minores Kartoffelprotein). Bei den Protease-Inhibitoren handelt es sich, im Gegensatz zu den Patatinen, um eine heterogene Gruppe von Proteinen, die sich sowohl in ihrer Aminosäuresequenz, ihrem Molekulargewicht als auch in ihrer Aktivität unterscheiden [90]. In Tabelle 2.1 sind die sieben Klassen der Protease-Inhibitoren mit einigen relevanten Eigenschaften aufgelistet.

Tabelle 2.1: Übersicht über die im KFW enthaltenen Klassen von Protease-Inhibitoren [90].

Klasse	Inhibitor-Typ	MW [kDa]	IEP	Anteil vom Gesamtprotein [%]
Protease-Inhibitor 1 (PI-1)	penta-merischer Serin-PI	fünf Iso-Inhibitor Promotoren 7,0 - 8,0	5,1 - 7,8	4,5
Protease-Inhibitor 2 (PI-2)	dimerischer Serin-PI	zwei 10,2 Untereinheiten	5,5 - 6,9	22
Cysteiny-Protease-Inhibitoren (PCPI)	neun verschiedene Cystein-PI	20,1 - 22,8	5,8 - < 9,0	12
Aspartyl-Protease-Inhibitoren (PAPI)	sechs verschiedene Aspartat-PI	19,9 - 22,0	6,2 - 8,7	6
Kunitz-Protease-Inhibitoren (PKPI)	Kunitz-PI	Zwei 20,2 Untereinheiten	8,0 - < 9,0	4
Weitere Serin-Protease-Inhibitoren		21,0 21,8 12,3	7,5 - 8,8	1,5
Carboxypeptidase-Inhibitoren (PKPI)	Carboxypeptidase-Inhibitor	4,1 - 4,3	n. a.	1

Die Protease-Inhibitoren werden allgemein als Speicherproteine angesehen (Stickstoffquelle) und sind an der verletzungsinduzierten Abwehr von Herbivoren und Pathogenen beteiligt [104-107]. In den letzten Jahren ist das Interesse an den Protease-Inhibitoren der Kartoffel aufgrund ihrer antikarzinogenen Aktivität gestiegen [104,108]. Die antikarzinogene Wirkung konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* festgestellt werden [109] und zeigt sich z. B. durch eine proliferationsinhibierende Aktivität von Serin-Protease-Inhibitoren gegenüber Tumorzellen [105]. Die höchste antikarzinogene Wirkung geht von Protease-Inhibitoren mit Chymotrypsin inhibierender Aktivität aus [110].

Basierend auf einem sättigenden Effekt könnten sie im Bereich Functional Food eingesetzt werden. Die Sättigungswirkung beruht auf der Freigabe des Darmpeptids Cholecystokinin durch die Inhibierung von Trypsin [90,104,111].

Die dritte Klasse von Kartoffelproteinen bilden die Polyphenoloxidasen (ca. 20-30 % vom Gesamtprotein), welche die Oxidation von Polyphenolen zu ortho-Chinonen katalysieren. Polyphenoloxidasen sind dadurch ein entscheidender Faktor bei Bräunungsreaktionen in Früchten und Gemüse. Zwei der wichtigsten Polyphenoloxidasen sind Tyrosinase (Umsetzung von Monophenolen und ortho-Diphenolen) und Laccase (Oxidation von ortho- und para-Diphenolen, sowie von substituierten Polyphenolen und aromatischen Aminen) [112,113].

2.3.2 Glykoalkaloide der Kartoffel

Glykoalkaloide (in erster Linie ca. 60 % α -Chaconin und ca. 40 % α -Solanin) kommen als Sekundärmetabolite in allen Teilen der Kartoffelpflanze vor. Besonders hohe Glykoalkaloidkonzentrationen treten in der Schale der Knollen, in Blüten und Sprossen auf [114-118]. In Abbildung 2.13 sind die Strukturformeln von α -Solanin und α -Chaconin dargestellt.

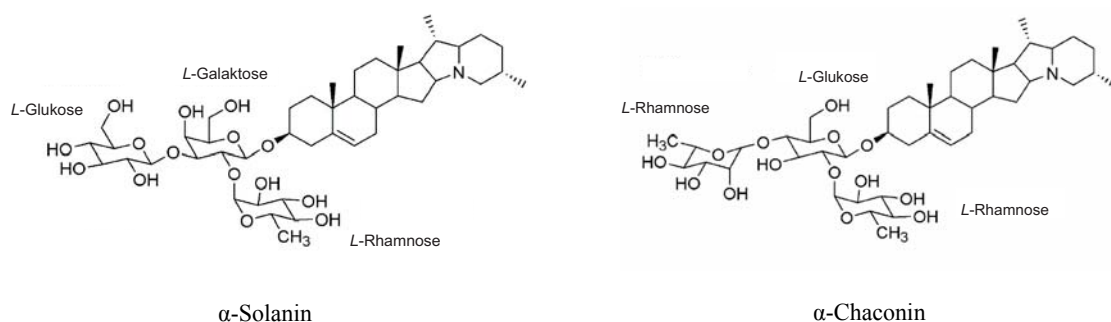


Abbildung 2.13: Die Hauptglykoalkaloide der Kartoffel α -Solanin und α -Chaconin [119]. Sowohl α -Solanin als auch α -Chaconin setzen sich aus dem Steroid-Alkaloid Solanidin und einem an die Hydroxylgruppe gebundenen, verzweigten Trisaccharid zusammen. Solanidin wird über den Cholesterolsyntheseweg ausgehend von Acetat gebildet. α -Solanin und α -Chaconin unterscheiden sich lediglich durch die drei Hexosebausteine des Zuckerrestes [116,120].

Es existieren differierende Angaben über die Reaktionen von Kartoffelglykoalkaloiden gegenüber typischen Prozessschritten in der Nahrungsmittelverarbeitung. Einige Quellen geben an, dass die Glykoalkaloide eine hohe Temperaturstabilität aufweisen [121-126]. Andere stellen heraus, dass Backen, Frittieren oder die Behandlung mit Mikrowellen, besonders bei einer Erhitzung auf über 170 °C [121], zu einer geringen Reduktion des Glykoalkaloidgehaltes führt [114,116]. Aufgrund der toxischen Eigenschaften ab einer Konzentration von ca. 20 mg pro 100 g Frischgewicht und eines bitteren Geschmacks [114,122] ist es von Interesse, die Kartoffelglykoalkaloide mit Hilfe einer kostengünstigen Methode aus dem KFW zu entfernen, um das isolierte Kartoffelprotein in der Lebensmittelindustrie verwenden zu können.

Die Glykoalkaloide der Kartoffel wirken aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung auf Acetyl- und Butylcholinesterasen toxisch auf das zentrale Nervensystem (Hemmung der Hydrolyse des Neurotransmitters Acetylcholin) und schädigen Zellmembranen im Verdauungssystem und in anderen Organsystemen. Des Weiteren sind Interferenzen mit dem Sterol- bzw. Steroidmetabolismus wahrscheinlich. Diese Effekte können zu Magen-Darm-Beschwerden, neurologischen Funktionsstörungen, Delirium, Koma oder zum Tod führen. Erste Auswirkungen treten bei etwa 1-3 mg/kg Körpergewicht auf. Konzentrationen ab etwa 3-6 mg/kg Körpergewicht können letal wirken [119,121,124,127,128].

In Studien, die sich mit Auswirkungen von Glykolalkaloiden verschiedener Nachtschattengewächse auf die Proliferation von Krebszellen befassen, wurde eine proliferationsinhibierende Wirkung nachgewiesen. Diese beruht auf der Zerstörung von Zellmembranen durch Veränderung des Membranpotentials [129,130], sowie auf Brüchen in der Membran durch Einfügen der Glykoalkaloide in die Membranen [131]. Zum anderen kann eine Induktion von Apoptose erfolgen [125,132-134]. Ein Nachweis darüber, ob sich der Einfluss der Glykoalkaloide selektiv auf Krebszellen bezieht, steht allerdings noch aus.

Das Aglykon von α -Solanin und α -Chaconin (Solanidin) könnte darüber hinaus eine Einsatzmöglichkeit als Ausgangsverbindung zur Synthese von Dehydropregnenolon (DPA) finden. Basierend auf DPA werden unterschiedliche Steroidhormone wie z. B. Progesteron, Östrogene oder Kortison hergestellt [135,136].

Aufgrund ihrer biologischen Aktivität sind α -Chaconin und α -Solanin prinzipiell für pharmazeutische Anwendungen attraktiv, so dass sich eine Aufreinigung aus KFW als interessant herausstellen könnte.

3 Proteinadsorption im Modellsystem

Die meisten Aufreinigungsprozesse für Proteine schließen chromatographische Schritte ein, bei welchen unterschiedlichen Wechselwirkungsmöglichkeiten der stationären Phasen mit Proteinmolekülen für die Separation von Bedeutung sind. Anionentauscher und Kationentauscher gehören dabei zu den am häufigsten verwendeten stationären Phasen [137]. In Abbildung 3.1 ist eine kurze Übersicht über Wechselwirkungsmöglichkeiten mit Proteinen dargestellt.

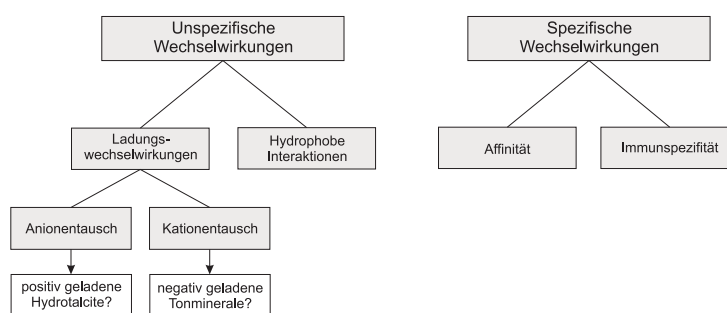


Abbildung 3.1: Aufreinigungstechniken bei Proteinen.

Natürliche Tonminerale können aufgrund einer permanenten negativen Ladung ladungsbasierte Wechselwirkungen mit Proteinmolekülen eingehen. Die elektrostatischen Wechselwirkungen verbunden mit einer großen Oberfläche und einer hohen Porosität resultieren in hohe Adsorptionskapazitäten für Proteine. Synthetische Hydrotalcite weisen als Konsequenz ihres strukturellen Aufbaus eine permanente positive Oberflächenladung auf und verfügen wie natürliche Tonminerale als poröse Materialien über große Oberflächen. Hohe Adsorptionskapazitäten für Proteine sind ebenfalls aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen möglich.

Resultierend aus den genannten Eigenschaften ist die Verwendung von natürlichen Tonmineralen (analog zu Kationentauschern) und synthetischen Hydrotalciten (analog zu Anionentauschern) als alternative und kostengünstige Adsorbentien in Separationsprozessen für Proteine denkbar.

In diesem Kapitel werden die Adsorptionseigenschaften dieser beiden Systeme anhand ausgewählter Materialien mit verschiedenen Modellproteinen unter unterschiedlichen

Bedingungen untersucht. Die Versuche im Modellsystem sollen Aufschluss über die Bindungseigenschaften in Bezug auf Ladungseigenschaften der Materialien geben.

Die Versuche wurden zum einen unter statischen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde das entsprechende Adsorbens mit einer Proteinlösung in einem geschlossenen Reaktionsgefäß inkubiert, d.h. in einem nicht durchströmten System mit einer relativ langen Kontaktzeit zwischen Proteinlösung und Adsorbens. Als statische Adsorptionskapazität wird in diesem Zusammenhang die maximale Beladung im Gleichgewichtszustand bezeichnet. Zum anderen wurden Versuche unter dynamischen Bedingungen durchgeführt, wobei die Beladung des Adsorbens mit Protein im Durchfluss erfolgte. Die dynamische Kapazität wird dabei als Beladung in Abhängigkeit von der Flussrate definiert. Von der Flussrate hängt ab, wie viel Zeit ein Molekül hat, um zur Bindungsstelle zu diffundieren. Dynamische Kapazitäten sind oft bedeutend niedriger als statische Kapazitäten.

3.1 Charakterisierung der Adsorbentien

3.1.1 Tonminerale

Die negative Oberflächenladung bzw. die Kationenaustauschkapazität von Tonmineralen beeinflussen die Adsorption von Proteinen. Unterschiedliche smektitische Tonminerale mit verschiedenen Ladungseigenschaften wurden ausgewählt, um diesen Einfluss auf die Proteinadsorption zu untersuchen.

Als gering geladenes Material wurde EX M 926 I ausgewählt, bei welchem es sich um eine Mischphase bestehend aus Saponit und Kerolit handelt. Kerolite weisen als Tonminerale, die zwischen Smektiten und Talk einzuordnen sind, keine Ladung auf. EX M 1753, welches den Saponiten zugeordnet wird, kann als das nächst höher geladene Material klassifiziert werden. Die Materialien EX M 926 I und EX M 1753 verfügen zudem über hydrophobe Eigenschaften.

Puranit UF stellt als Montmorillonit ein System mit einer sehr hohen Kationenaustauschkapazität dar, weist aber als reines Montmorillonit ein starkes Quellverhalten auf [138].

Des Weiteren wurde EX M 1607 in die Untersuchung einbezogen. Die Gesamtkationenaustauschkapazität dieses Materials ist zwar als eher gering zu bewerten, aber in

Anbetracht der Tatsache, dass dieses Material zu etwa 40-50 % aus Nebenmineralen und Kieselgel besteht, ist die Kationenaustauschkapazität des Montmorillonitanteils ähnlich einzuordnen wie die des Puranit UF.

Darüber hinaus wird zum Vergleich das Material Westmin D100 (Mondo Minerals OY, Finnland), welches als Talk ein ungeladenes System repräsentiert, untersucht.

Die ausgewählten Materialien werden auf Grund ihrer unterschiedlichen Ladungseigenschaften hinsichtlich ihrer Eignung als Kationentauscher untersucht. Eine Zusammenfassung einiger relevanter Eigenschaften der ausgewählten Tonminerale ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Einige relevante Eigenschaften der Materialien EX M 1753 (Saponit), EX M 926 I (Kerolit/Saponit), EX M 1607 (Montmorillonit/amorphes Silika + Sepiolit), Puranit UF (Montmorillonit mit hoher Schichtladung) und Westmin D100 (Talk, ungeladen). *Die Messung der Zetapotential wurde bei der Surfay Nanotec GmbH durchgeführt. (Methode siehe 7.3.8)

	EX M 1753	EX M 926 I	EX M 1607	Puranit UF	Westmin D100
Zuordnung	Saponit	Kerolit/Saponit	Montmorillonit/Kieselgel	Montmorillonit	Talk
Ladungseigenschaften	mittlere Ladung	geringe Ladung	mittlere bis höhere Ladung	hohe Ladung	keine Ladung
CEC [meq/100 g]	20 – 30	20 – 30	52	105	-
BET Oberfläche [m²/g]	124	215	208	80	15
Kumulatives Porenvolumen (BJH) für einen Porendurchmesser zwischen 1,7-300 nm [cm³/g]	0,12	0,26	0,9	0,13	k. a.
Durchschnittsporendurchmesser (BJH) [nm]	6,06	7,20	17,8	9,9	k. a.
Zetapotential bei pH 7 [mV]*	k. a.	- 27,7	-69,2	k. a.	-

Das Material EX M 1607 verfügt über eine relativ große Oberfläche, ein hohes Porenvolumen sowie einen großen Porendurchmesser verbunden mit einem geringen Sedimentvolumen. Aufgrund dieser Eigenschaften könnte sich dieses Material als ein interessantes System für den Einsatz als Kationentauscher erweisen.

3.1.2 Synthetische Hydrotalcite

Aus dem strukturellen Aufbau von Hydrotalciten (siehe Abschnitt 2.2.1) resultiert eine positive Schichtladung. Basierend auf dieser Eigenschaft werden ausgesuchte synthetische Hydrotalcite als Anionentauscher für Proteine untersucht.

Die Hydrotalcite Synthal 696 und EX M 1994 lassen sich mit der allgemeinen Formel $[Mg_{1-x}Al_x(OH)_2]^{x+} \cdot [(CO_3)_{x/n}]^{x-} \cdot m H_2O$ beschreiben. Der Hauptunterschied beider Hydrotalcite liegt in der höheren Schichtladung von EX M 1994, welcher durch einen höheren Aluminium-Anteil bedingt ist. Anhand dieser beiden unterschiedlichen Hydrotalcite soll der Einfluss des Mg:Al-Verhältnisses und die daraus resultierenden Ladungsunterschiede auf die Adsorption von Proteinen untersucht werden. Beide Hydrotalcite liegen in der Carbonat-Form vor, welche aufgrund einer schweren Austauschbarkeit der Carbonationen sehr stabil ist. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass keine Interkalation von Proteinen erfolgt, sondern dass die Adsorption der Proteinmoleküle lediglich an der Hydrotalcitoberfläche stattfindet. Eine Interkalation würde eine Erschwerung der Wiedergewinnung der adsorbierten Proteine zur Folge haben und ist daher nicht erwünscht.

Einige physikalische Eigenschaften der beiden Hydrotalcite sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Messung des Zetapotentials der Hydrotalcite dokumentiert die kationische Oberflächenladung.

Tabelle 3.2: Einige relevante Eigenschaften der synthetischen Hydrotalcite Synthal 696 und EX M 1994. *Die Messung der Zetapotentiale wurde bei der Surflay Nanotec GmbH durchgeführt. (Methode siehe 7.3.8)

	Synthal 696	EX M 1994
Molverhältnis Mg:Al	1,85	0,49
BET Oberfläche [m²/g]	61,4	192,8
Kumulatives Porenvolumen (BJH) für einen Porendurchmesser zwischen 1,7-300 nm [cm³/g]	0,48	0,39
Durchschnittsporendurchmesser (BJH) [nm]	24,6	7,5
Zetapotential bei pH 7 (1 mM Tris) [mV]*	+32,9	+33,8
Zetapotential bei pH 5,6 (1 mM Acetat) [mV]*	+35,0	+45,5

3.2 Modellproteine

Zur Abschätzung der Eigenschaften unterschiedlicher Tonminerale und Hydrotalcite hinsichtlich der Adsorption und Separation von Proteinen wurde das Adsorptionsverhalten der Materialien im Modellsystem mit unterschiedlichen Proteinen untersucht. Mit der Auswahl der Modellproteine soll ein weites Spektrum isoelektrischen Punkten abgedeckt werden, da die Ladung der Proteine bei der Adsorption an positiv und negativ geladenen Oberflächen relevant ist. Bei der Auswahl wurde ebenfalls die Variation der Molekulargewichte der Modellproteine beachtet, da davon auszugehen ist, dass aufgrund der Porosität der Adsorbentien dem Proteindurchmesser bei der Adsorption ebenfalls eine Bedeutung zukommt. Proteine mit Abbildung 3.2 zeigt das IEP- und Molekulargewichtsspektrum der verwendeten Modellproteine. In Tabelle 3.3 sind die hydrodynamischen Radien (Stokes'sche Radien) der Modellproteine aufgelistet.

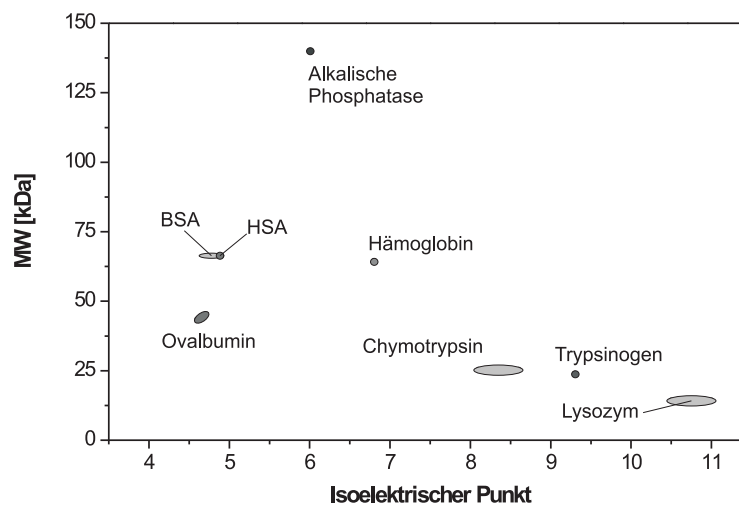


Abbildung 3.2: IEP und Molekulargewichte der verwendeten Modellproteine. (Ovalbumin: 43,5-45 kDa, IEP 4,6-4,7; Bovines Serumalbumin: 66,4 kDa, IEP 4,7-4,9; Humanes Serumalbumin: 66,4 kDa, IEP 4,9; Alkalische Phosphatase: 140 kDa, IEP 6,0; Hämoglobin: 64,5 kDa, IEP 6,8; α -Chymotrypsin: 25,3 kDa, IEP 8,1-8,6; Trypsinogen: 23,9 kDa, IEP 9,3; Lysozym: 14,3 kDa, IEP 10,5-11,0)

Tabelle 3.3: Stokes'sche Radien der verwendeten Modellproteine.

	Stokes'scher Radius [Å]
Alkalische Phosphatase	77,0 [139]
Bovines Serumalbumin	36,0 [140]
α-Chymotrypsin	20,0-22,0 [141]
Hämoglobin	24,0 [142]
Humanes Serumalbumin	31,5 [143] 35,6 [144]
Lysozym	14,6 [145] 18,7 [146] 19,5 [147]
Ovalbumin	30,0 [140] 28,0 [142]
Trypsinogen	19,6 [148]

3.3 Adsorptionseigenschaften von Tonmineralen

3.3.1 Proteinadsorption an geladene Tonminerale

Um abschätzen zu können, inwieweit sich die unter 3.1.1 beschriebenen Tonminerale als Kationentauscher eignen, wurde die Adsorption unterschiedlicher Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert unter statischen Bedingungen untersucht. Dazu wurde eine definierte Menge des entsprechenden Materials mit einem definierten Volumen einer Proteinlösung bekannter Konzentration in einem Überkopfmischer inkubiert. Erfahrungswerte haben gezeigt, dass in einer Adsorptionszeit von weniger als einer Stunde die maximale Adsorption erreicht wird. Nach erfolgter Inkubation wurde im Anschluss an eine Zentrifugation anhand der verbliebenen Proteinkonzentration im Überstand die adsorbierte Proteinmenge berechnet. Die Versuchsdurchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.2.1) zu entnehmen. Die pH-Werte wurden mit folgenden Puffern eingestellt: pH 4 und pH 5 mit Acetat, pH 6 mit MES, pH 7 mit HEPES, pH 8 und pH 9 mit Tris und pH 10 sowie pH 11 mit CAPS. Als Modellproteine wurden beispielhaft Ovalbumin als Protein mit einem niedrigen IEP (4,6-4,7) und α -Chymotrypsin mit einem hohen IEP (8,1-8,6) herangezogen. In Abbildung 3.3 sind die Adsorptionseigenschaften der natürlichen Tonminerale in Abhängigkeit vom pH-Wert bezüglich Ovalbumin und α -Chymotrypsin dargestellt.

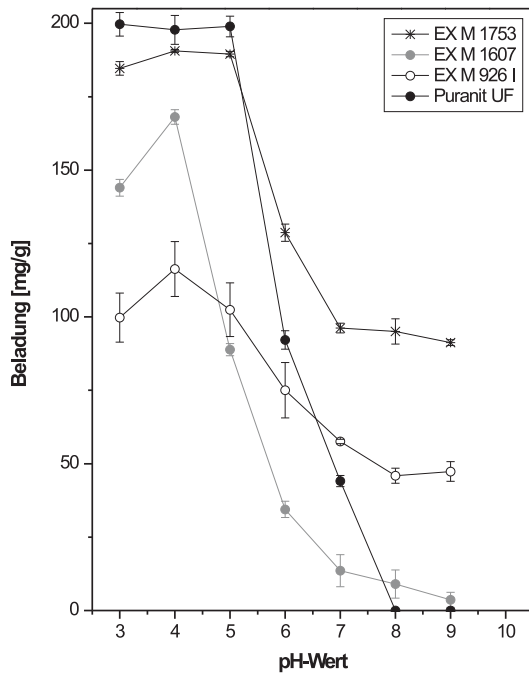
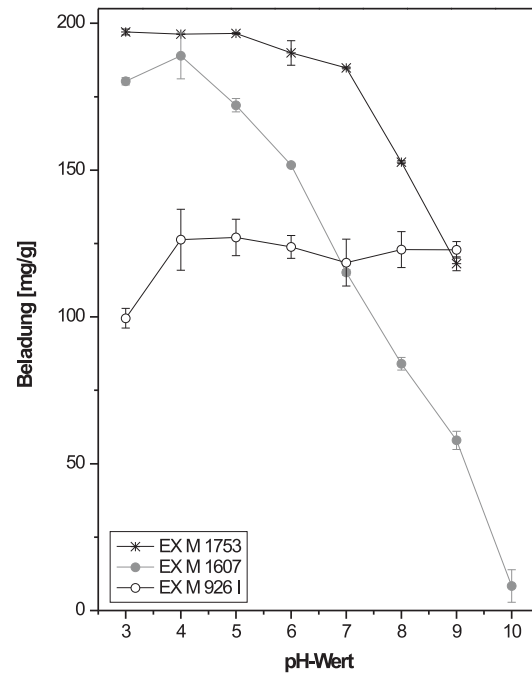
Ovalbumin: α -Chymotrypsin:

Abbildung 3.3: pH-Wert-abhängige Adsorption von Ovalbumin (links) und α -Chymotrypsin (rechts) an EX M 1607 (Montmorillonit/amorphe Silikaphase), EX M 1753 (Saponit), EX M 926 I (Kerolit/Saponit) und Puranit UF (Montmorillonit). Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt, die Anfangsproteinkonzentration betrug je 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Im Fall von Ovalbumin (Abb. 3.3, links) verhalten sich alle vier getesteten Smektite wie Kationentauscher, d. h. die Adsorption verringert sich mit steigendem pH-Wert aufgrund der höheren Repulsion zwischen der permanent negativ geladenen Tonmineraloberfläche und dem über seinem IEP negativ geladenen Proteinmolekül. Die pH-Wert-abhängige Protonierung und Deprotonierung an den Kanten der Tonmineralplättchen resultierend aus Adsorptions- und Desorptionsvorgänge von Protonen sind als vernachlässigbare Nebeneffekte zu betrachten.

Die am stärksten ausgeprägte pH-Wert-Abhängigkeit der Adsorption zeichnet sich bei den Materialien EX M 1607 (Montmorillonit/amorphes Silika) und Puranit UF (Montmorillonit) ab. Bei diesen Smektiten sinkt die Adsorption oberhalb des IEP zum Teil bis auf Null ab. Bei EX M 1753 (Saponit) und EX M 926 I (Kerolit/Saponit) ist die pH-Wert-Abhängigkeit

der Adsorption weniger stark ausgeprägt. Auch bei pH-Werten, die deutlich über dem isoelektrischen Punkt von Ovalbumin liegen, kann eine statische Adsorption von etwa 100 mg/g im Fall von EX M 1753 und 50 mg/g im Fall von EX M 926 I beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass die Adsorption an diese beiden Materialien im Vergleich zu EX M 1607 und Puranit UF in einem hohem Maße von weiteren Wechselwirkungen beeinflusst wird, die nicht elektrostatischer Natur sind, wie z. B. hydrophobe Interaktionen. Außerdem kann das Adsorptionsverhalten von EX M 1753 damit erklärt werden, dass dieses Material eine leichte positive Überschussladung der Oktaederschicht aufweist (laut einer Analyse des Forschungszentrums Karlsruhe), welche elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Proteinmolekülen begünstigt. Dieses Verhalten zeigt sich ebenfalls deutlich bei der Adsorption von α -Chymotrypsin (IEP: 8,1-8,6) (Abbildung 3.3 rechts). EX M 1753 weist hier ebenfalls eine wenig ausgeprägte pH-Wert-abhängige Adsorption auf. Im Fall von EX M 926 I konnte keine Abhängigkeit der Adsorption vom pH-Wert festgestellt werden, was weiterhin einen starken Einfluss weiterer Wechselwirkungen auf die Proteinadsorption wie hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen vermuten lässt. Es besteht die Möglichkeit, dass starke Van-der-Waals-Kräfte die elektrostatische Repulsion überdecken [5]. Weitere experimentell ermittelte Daten sind analog einzuordnen. (siehe Anhang, Abschnitt 7.1.1) Besonders für die Materialien EX M 1607 und EX M 926 I ist anzumerken, dass diese delaminiert vorliegen. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass bei der Adsorption Interkalationseffekte nicht relevant sind.

3.3.2 Adsorptionseigenschaften eines ungeladenen Tonminerals

Als Vergleich zur Proteinadsorption an Tonminerale, welche eine negative Schichtladung aufweisen, ist im Folgenden die Adsorption von Modellproteinen mit unterschiedlichen Molekulargewichten und IEP an das Material Westmin D100 (Talk) als ungeladenes Tonminerale dargestellt. Die Durchführung erfolgte analog zu 3.3.1. In Abbildung 3.4 ist das Ergebnis der pH-Wert-abhängigen Adsorption von Ovalbumin, alkalischer Phosphatase, Lysozym und humanem Serumalbumin an das ungeladene Tonminerale dargestellt.

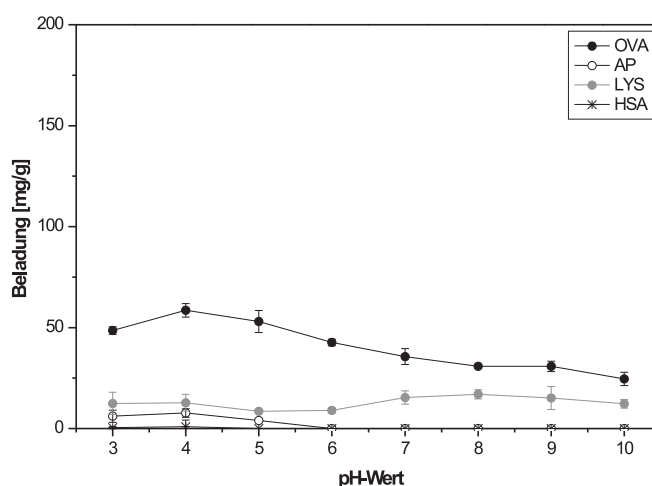


Abbildung 3.4: pH-Wert-abhängige Adsorption von Ovalbumin (OVA), alkalischer Phosphatase (AP), humanem Serumalbumin (HSA) und Lysozym (LYS) an das ungeladene Tonmineral Westmin D100. Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt, die Anfangsproteinkonzentration betrug je 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Das ungeladene Tonminerale weist für die verwendeten Modellproteine relativ geringe Adsorptionskapazitäten auf. Für Ovalbumin konnte bei pH 4 eine maximale Adsorption von ca. 60 mg/g festgestellt werden, während bei den anderen Proteinen sogar noch geringere Mengen adsorbiert wurden. Die Adsorptionskapazitäten geladener Tonminerale liegen in einem wesentlich höheren Bereich (vergl. Abschnitt 3.3.1 und Abschnitt 7.1.1 im Anhang). Diese Ergebnisse belegen die Tatsache, dass bei der Adsorption von Proteinen an Tonminerale die Oberflächenladung von großer Bedeutung ist. Des Weiteren ist keine Abhängigkeit der Adsorption von pH-Wert zu verzeichnen, was die Annahme unterstützt, dass die pH-Wert-Abhängigkeit der Adsorption umso stärker ist, je höher die Kationenaustauschkapazität des Tonminerals ist. Auch die Oberfläche und die Porosität eines Materials sind bei der Adsorption bedeutsam. Westmin D100 weist eine wesentlich geringere Oberfläche im Vergleich zu den anderen Materialien auf (vergl. Tabelle 3.1).

3.4 Charakterisierung von EX M 1607

Ausgehend von den vorangegangenen Ergebnissen wurden im Folgenden die Eigenschaften des Materials EX M 1607 eingehender untersucht. EX M 1607 zeigt im Gegensatz zu EX M 1753 und EX M 926 I eine stärkere Korrelation der Adsorption zum pH-Wert und erscheint unter diesem Gesichtspunkt am ehesten als Kationentauscher geeignet. Im Vergleich zu EX M 1607 weist das Material Puranit UF ebenfalls geeignete Adsorptionseigenschaften auf. Allerdings handelt es sich bei Puranit UF um ein stark quellendes Tonmineral, was eine Verwendung dieses Materials als Säulenpackung erschwert. Als Konsequenz dieser Kriterien wird das smektitische Tonmineral EX M 1607 zu einer weiteren Untersuchung ausgewählt und im Folgenden in Hinblick auf die Verwendbarkeit als Kationentauscher bewertet.

Eine präzise physikalische und chemische Charakterisierung von EX M 1607 wurde zum Teil vom Forschungszentrum Karlsruhe und von der Süd-Chemie durchgeführt [149]. EX M 1607 ist ein nicht quellfähiger Montmorillonit, welcher mit amorphen Siliziumdioxid und Sepiolit gemischt vorliegt. Bei Sepioliten handelt es sich um Phyllosilikate, welche wie auch Smektiten über kontinuierliche Tetraederschichten verfügen. Im Gegensatz dazu sind die Oktaederschichten nicht kontinuierlich aufgebaut. Sepiolite sind durch eine schleifenartige Anordnung der 2:1-Struktur gekennzeichnet. Jede Schleife innerhalb einer Abfolge von Si-O-Bindungen ist dabei mit der folgenden Inversion der SiO_4 -Tetraeder verknüpft. Dadurch zeigen die Spitzen der Tetraeder entgegengesetzt in Richtung der benachbarten Schleifen [5]. Die allgemeine Struktur von Sepioliten ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

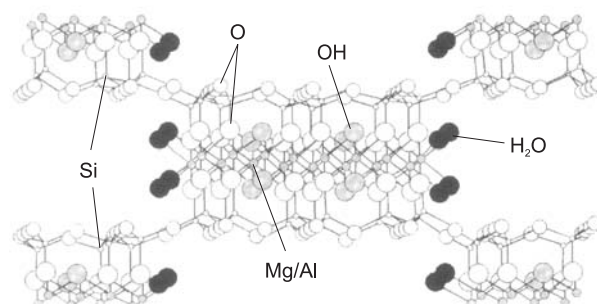


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Struktur von Sepioliten (adaptiert nach [5]).

Bei dem Material EX M 1607 sind die Smektitsschichten in die poröse, amorphe Kieselgelstruktur fest eingelagert, wobei sie hauptsächlich in der Form von dünnen Plättchen und teilweise sogar komplett delaminiert vorliegen. Dadurch bedingt weist das Material EXM 1607 kaum bzw. nur schwache kristalline Röntgenreflexe auf, d.h. ist im Wesentlichen röntgenamorph. Resultierend aus dem eingelagerten Schichtsilikat weisen diese porösen Strukturen eine signifikante Kationenaustauschkapazität auf, wie sie normalerweise für reine Smektite typisch ist. Die für Smektite typischen Quelleffekte [138] treten auf Grund der Fixierung der Schichtsilikat-Lamellen in der Silikamatrix nicht auf, wodurch das Packen von Chromatographiesäulen ermöglicht wird [195].

Röntgenographisch wurden in dem Material weiterhin verschiedene Feldspäte identifiziert. Daneben enthält die Probe geringe Mengen Muskovit und Illit. Aus der Gesamtprobe konnte mittels chemischer Analyse eine Formel berechnet werden, die typisch für einen mittel geladenen Montmorillonit ist: $M^{+}_{0.37}(Si_{3.97}Al_{0.03})(Al_{1.29}Fe^{3+}_{0.37}Mg_{0.34})O_{10}(OH)_2$. Tabelle 3.4 gibt die chemische Zusammensetzung von EX M 1607 an. Abbildung 3.6 zeigt ein vorläufiges Strukturmodell des Materials, welches in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Karlsruhe entwickelt wurde.

Tabelle 3.4: Chemische Zusammensetzung von EX M 1607 [%].

SiO ₂	Al ₂ O ₃	MgO	Fe ₂ O ₃	Na ₂ O	CaO	K ₂ O	TiO ₂	MnO	P ₂ O ₅
64,84	8,98	4,12	2,67	0,07	1,62	1,84	0,25	0,09	0,1

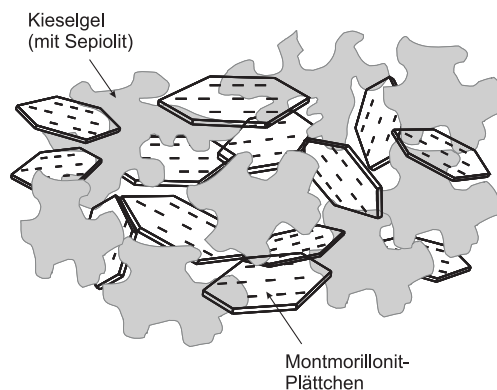


Abbildung 3.6: Vorläufiges Strukturmodell des Materials EX M 1607. Es handelt sich um ein amorphes Kieselgel, in welche Montmorillonitplättchen eingebunden sind. Das Montmorillonit liegt laut Röntgendiffraktionsuntersuchungen fast vollständig delaminiert vor.

Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Materials EX M 1607 ist in Abbildung 3.7 gezeigt. Die REM-Aufnahme in der 50-fachen Vergrößerung zeigt relativ sphärische Partikel, die der Struktur von Silika-Partikeln ähneln. Eine plättchenartige Struktur, vergleichbar mit der eines Standard-Montmorillonits, kann in der 1000-fachen Vergrößerung nicht festgestellt werden. (REM-Aufnahmen weiterer Adsorbentien sind im Anhang (Abschnitt 7.1.5) dargestellt.)

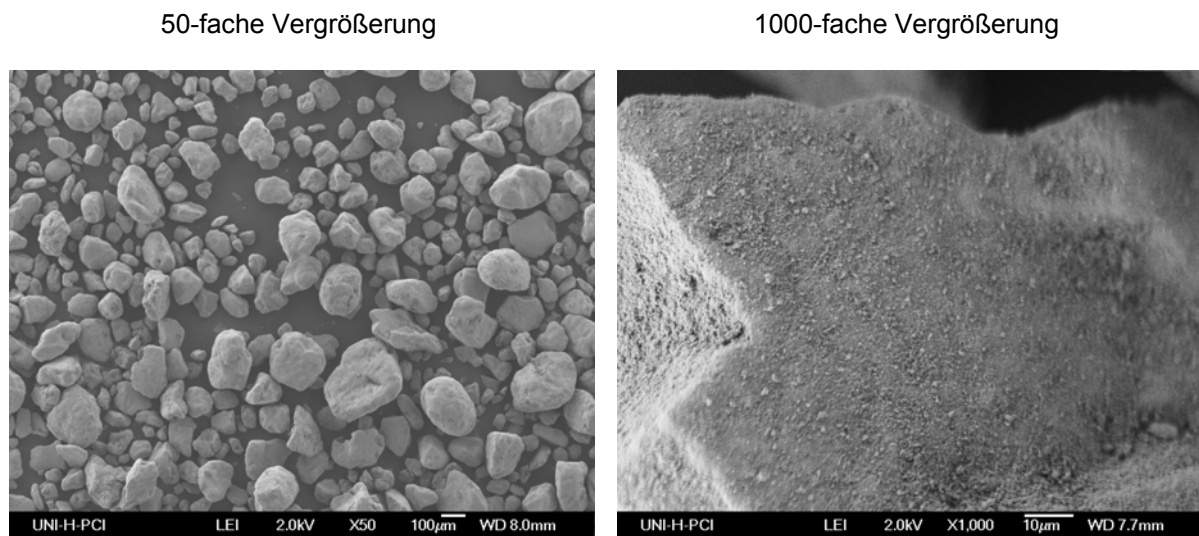


Abbildung 3.7: REM-Aufnahmen von EX M 1607 > 45 μm .

3.5 Statische Adsorptionseigenschaften von EX M 1607

3.5.1 pH-Wert-Abhängigkeit der Proteinadsorption

Anhand weiterer Modellproteine wurde die pH-Wert-abhängige Adsorption des Materials unter statischen Bedingungen genauer untersucht. Die Durchführung erfolgte analog zu 3.3.1. In Abbildung 3.8 (Adsorption von Proteinen mit einem IEP < pH 7) und 3.9 (Adsorption von Proteinen mit einem IEP > pH 7) sind die Ergebnisse dargestellt. Die Durchführung erfolgte analog zu Abschnitt 3.3.1.

Proteine mit einem IEP < pH 7

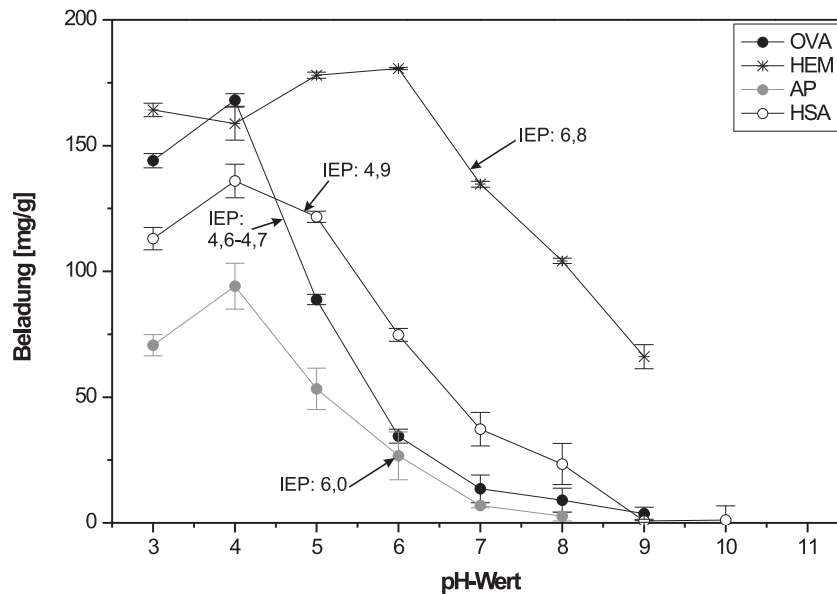


Abbildung 3.8: pH-Wert-abhängige Adsorption unterschiedlicher Modellproteine mit einem IEP < pH 7 an EX M 1607 (Montmorillonit / amorphe Silikaphase + Sepiolit). Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt, die Anfangsproteinkonzentration betrug je 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Ovalbumin, Hämoglobin, Alkalische Phosphatase und humanes Serumalbumin zeigen ein Adsorptionsmaximum bei etwa 0,5-2 pH-Einheiten unter ihrem isoelektrischen Punkt (positive Nettoladung der Proteinmoleküle). Bei pH-Werten über dem IEP ist ein deutliches Absinken der Adsorptionskapazität aufgrund der steigenden Repulsion zwischen der negativ geladenen Oberfläche des Materials und den Proteinen zu verzeichnen und die Adsorption nimmt z. T. bis auf Null ab. Die Adsorptionskapazität für Alkalische Phosphatase (mit etwa 140 kDa) ist im Vergleich zu den anderen Proteinen geringer. Möglicherweise ist die Porenstruktur der smektitischen Oberfläche bei der Zugänglichkeit für unterschiedlich große Proteine bedeutsam. Der Durchschnittsporendurchmesser von EX M 1607 beträgt etwa 178 Å (vergl. Tabell 3.1). Für Alkalische Phosphatase ist in der Literatur ein hydrodynamischer Radius von ca. 77 Å angegeben [139]. So liegt der hydrodynamische Durchmesser des Proteinmoleküls zwar noch unter dem Durchschnittsporendurchmesser, allerdings existieren auch Poren, die einen kleineren Durchmesser aufweisen, in welchen den Zugänglichkeit für die relativ große Alkalische Phosphatase beschränkt ist. Des Weiteren bezeichnet der Stokes'sche Radius (hydrodynamischer Radius) den Radius einer

hypothetischen festen Kugel mit denselben hydrodynamischen Eigenschaften, wie das durch den hydrodynamischen Radius beschriebene Molekül. Als Konsequenz der Asymmetrie von Proteinen kommt es häufig zu einer Unterschätzung bei der Bestimmung der hydrodynamischen Radien [142]. So ist als Erklärung für die geringere Adsorptionskapazität von EX M 1607 für die Alkalische Phosphatase eine schlechtere Zugänglichkeit des Proteinmoleküls in die Poren des Materials denkbar. Das HSA mit einem hydrodynamischen Radius von etwa 32-35 Å ist innerhalb der Auswahl der Modellproteine das zweitgrößte und weist wie die Alkalische Phosphatase eine etwas geringere Adsorptionskapazität im Vergleich zu den kleineren Proteinen auf. Dies lässt ebenfalls auf einen Einfluss der Porendurchmesser des Material EX M 1607 bei der Zugänglichkeit für unterschiedlich große Proteine schließen.

Das Adsorptionsverhalten von EX M 1607 gegenüber den unterschiedlichen Modellproteinen bestätigt die unter 3.3 beschriebenen Ergebnisse und zeigt, dass die Wechselwirkungen dieses Materials mit Proteinen in erster Linie elektrostatischer Natur sind und sich das Material wie ein Kationentauscher verhält. Ausgehend von dieser Annahme fällt auf, dass Wechselwirkungen zwischen Protein und Adsorbens auch direkt am IEP der Proteine auftreten, wenngleich die Ladung der Proteine theoretisch Null beträgt. In der Literatur ist beschrieben, dass Proteine auch an ihrem IEP an negativ geladenen Oberflächen adsorbieren [34]. Bei pH-Werten über dem IEP konnte ebenfalls eine geringe Adsorption an die negativ geladene Adsorbensoberfläche trotz der negativen Nettoladung des Proteinmoleküls festgestellt werden. Zum einen geschieht die Proteinadsorption oberhalb und am IEP durch hydrophobe Wechselwirkungen [20,150] oder kann mit der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen der Oberfläche und denen der Proteine erklärt werden [22,151]. Weiterhin ist eine partielle Überlagerung der elektrostatischen Repulsion durch van-der-Waals-Kräfte denkbar [5].

Die Adsorptionskapazität nimmt bei allen vier Modellproteinen mit niedriger werdendem pH-Wert unterhalb des IEP ab. Auf Grund der zunehmenden positiven Nettoladung wäre zu erwarten gewesen, dass die Adsorption bei pH-Werten, die weiter unterhalb des IEP liegen, steigt. Dieses Phänomen lässt sich aufgrund der lockereren makromolekularen Struktur der Proteine unterhalb ihres IEP erklären. Bei extremen pH-Werten liegt ein Protein im Vergleich zum nativen Zustand stärker expandiert vor [29,35], was häufig als *A state* eines Proteins oder auch als *molten globule* bezeichnet wird. Die Sekundärstruktur ist dabei ähnlich kompakt wie die des nativen Proteinmoleküls, allerdings ist die Tertiärstruktur

ungeordneter und flexibler [143]. Ein solches Verhalten tritt besonders bei globulären Proteinen auf [35]. Im *A state* oder *molten globule*-Zustand erfolgt bei der Adsorption eine partielle Ausstreckung der Proteine auf der Oberfläche. Die stärker werdenden elektrostatischen Wechselwirkungen unterhalb des IEP zwischen dem positiv geladenen Protein und der negativ geladenen Tonmineraloberfläche verstärken diesen Effekt [29,36]. Folglich nehmen Proteine ein größeres Areal auf der Oberfläche ein, so dass verglichen mit Proteinen in einem kompakten Zustand insgesamt weniger Proteinmoleküle adsorbiert werden können. Das Sinken der Adsorptionskapazität bei pH 3 bzw. pH 4 könnte weiterhin als Konsequenz einer Repulsion resultierend aus einer teilweisen Protonierung der Hydroxylgruppen der Oberfläche erklärt werden. Des Weiteren ist bei Proteinen, die sich im *molten globule*-Zustand befinden, von einem größeren hydrodynamischen Radius auszugehen [143], so dass sich auch die Zugänglichkeit für die Poren des Materials verringern kann.

In der folgenden Abbildung ist die Adsorption von Proteinen mit einem IEP > pH 7 an EX M 1607 dargestellt.

Proteine mit einem IEP > pH 7

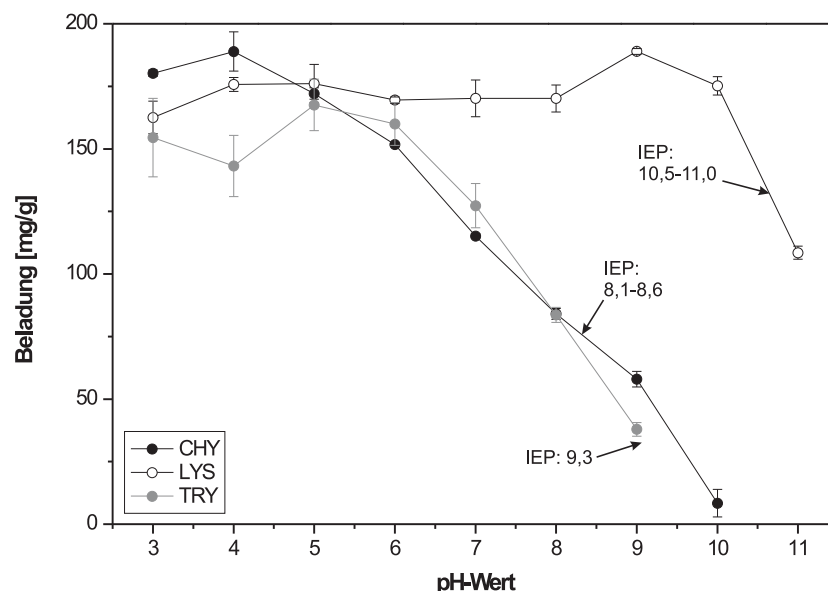


Abbildung 3.9: pH-Wert-abhängige Adsorption unterschiedlicher Modellproteine mit einem IEP > pH 7 an EX M 1607 (Montmorillonit/amorphe Silikaphase). Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt, die Anfangsproteinkonzentration betrug je 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Im Fall von α -Chymotrypsin (IEP: 8,1-8,6) und Trypsinogen (IEP: 9,3) (vergl. Abb. 3.9) liegt das Adsorptionsmaximum etwa drei pH-Einheiten unter dem IEP. Die Adsorption sinkt mit steigendem pH bis zum IEP aufgrund der abnehmenden elektrostatischen Anziehung ab. Auch bei diesen beiden Proteinen ist bei pH 3 und pH 4 ein Sinken der Adsorptionskapazität trotz theoretisch hoher elektrostatischer Wechselwirkungen zu verzeichnen. Für dieses Phänomen können ebenfalls die oben genannten Erklärungen herangezogen werden. Die Adsorption von Lysozym zeigt sich über den untersuchten pH-Bereich etwa gleich bleibend. Dies könnte damit erklärt werden, dass im Fall von Lysozym zu keiner Ausbildung einer *molten globule* oder *A state* Struktur kommt [35]. Ab dem isoelektrischen Punkt (pH Die Adsorption nimmt kurz vor dem IEP (10,5-11,0) ab. Auch die Adsorption vom Lysozym an das Material EX M 1607 gestaltet sich, wie es theoretisch von einem Kationentauscher zu erwarten gewesen wäre.

Die hier beispielhaft verwendeten Modellproteine weisen Durchmesser zwischen 30-70 Å auf (s. Tabelle 3.3). Davon ausgenommen ist die Alkalische Phosphatase mit einem Durchmesser von ca. 154 Å. Der für EX M 1607 angegebene Durchschnittsporendurchmesser liegt mit ca. 178 Å über dem Durchmesser der Modellproteine (vergl. Tabelle 3.2). So ist von einer guten Porenzugänglichkeit der Modellproteine bei der Adsorption an EX M 1607 auszugehen. Aufgrund der Ergebnisse der pH-Wert-abhängigen Adsorption der unterschiedlichen Modellproteine eignet sich das Material EX M 1607 als Kationentauscher.

3.5.2 Adsorptionsisothermen

Zur Abschätzung der statischen Adsorptionskapazität von EX M 1607 und für Rückschlüsse auf die Art der Proteinadsorption wurden Modellproteine unter statischen Bedingungen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im Überstand adsorbiert. Die Durchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.2.2) zu entnehmen. Die experimentell ermittelten Daten der Adsorptionsisothermen wurden an das Langmuir-Freundlich- und das Freundlichmodell angepasst.

Wie im Abschnitt 2.1.4 bereits aufgeführt, können für die Adsorption von Proteinen das Langmuir- oder das Freundlichmodell herangezogen werden [32,40,41]. Das Langmuir-Modell liefert allerdings nur eine begrenzte Beschreibung der Proteinadsorption [43] und

stellt das einfachste Modell für Adsorptionsprozesse an Oberflächen mit den Annahmen dar, dass das Adsorbat in einer Monoschicht adsorbiert wird, dass alle Plätze auf der Oberfläche energetisch gleichwertig sind und dass die Oberfläche homogen ist. Weiterhin wird die Annahme getroffen, dass keine Wechselwirkungen zwischen benachbarten Adsorptionsplätzen oder den adsorbierten Molekülen auftreten. Aufgrund der Tatsache, dass von unterschiedlichen Arten von Wechselwirkungen zwischen Tonmineraloberfläche und Protein ausgegangen werden muss, und dass auch die polaren Gruppen der Seitenketten der Proteinmoleküle im adsorbierten Zustand prinzipiell miteinander interagieren können [152], wurde die Langmuir-Isotherme nicht zur Modellierung herangezogen. Das Material EX M 1607 besteht zudem aus mehreren unterschiedlichen Komponenten (Montmorillonit, amorphes Silika und Sepiolit). Anstelle des Langmuir-Modells wird eine Kombination aus der Langmuir- und Freundlich-Isotherme verwendet, welche auch als Sips-Isotherme bezeichnet wird. Diese wird folgendermaßen ausgedrückt [153]:

$$q = \frac{q_{\max} \cdot K \cdot C_{eq}^m}{1 + K \cdot C_{eq}^m}$$

K	Koeffizient (Maß für die Bindeaffinität)
q	adsorbierte Proteinmenge
q_{\max}	max. adsorbierbare Proteinkonzentration
C_{eq}	Proteinkonzentration im Überstand
m	Heterogenitätsindex (zwischen 0 und 1)

Mittels Langmuir-Freundlich-Isotherme (LF-Isotherme) können Adsorptionsprozesse auf heterogenen und homogenen Oberflächen sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Konzentrationen gut modelliert werden. Wenn z. B. $m = 1$ ist ($m = 1$ bedeutet homogene Oberfläche), wird die LF-Isotherme auf die Langmuir-Isotherme reduziert, in welcher K direkt die Bindeaffinität bezeichnet [154,155]. Die LF-Isotherme verhält sich für hohe Konzentrationen wie die klassische Langmuir-Isotherme [155]. Wenn C_{eq} oder K gegen Null gehen (bei sehr kleinen Konzentrationen), reduziert sich die LF-Isotherme auf die Freundlich-Isotherme [154,155].

Langmuir-Isotherme:

$$q = \frac{K \cdot q_{\max} \cdot C_{eq}}{1 + K \cdot C_{eq}}$$

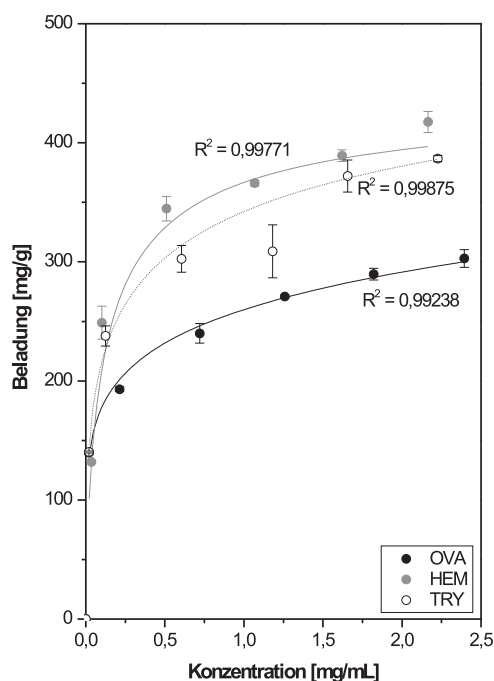
Freundlich-Isotherme:

$$q = K \cdot C_{eq}^m$$

Die Freundlich-Isotherme kann ebenfalls für die Beschreibung von Adsorptionsprozessen an heterogenen Oberflächen verwendet werden. Allerdings ist es aufgrund des exponentiellen Charakters nicht möglich, damit eine maximale Adsorption auf Oberflächen darzustellen (kein asymptotischer Verlauf in Richtung Sättigung) [43,156].

Die Adsorptionsisothermen von Ovalbumin, Hämoglobin und Trypsinogen sind in Abbildung 3.10 dargestellt und jeweils an die Freundlich- bzw. LF-Isotherme angepasst. Tabelle 3.5 (s. folgende Seite) zeigt die auf der LF-Modellierung basierenden Parameter.

LF-Isotherme:



Freundlich-Isotherme:

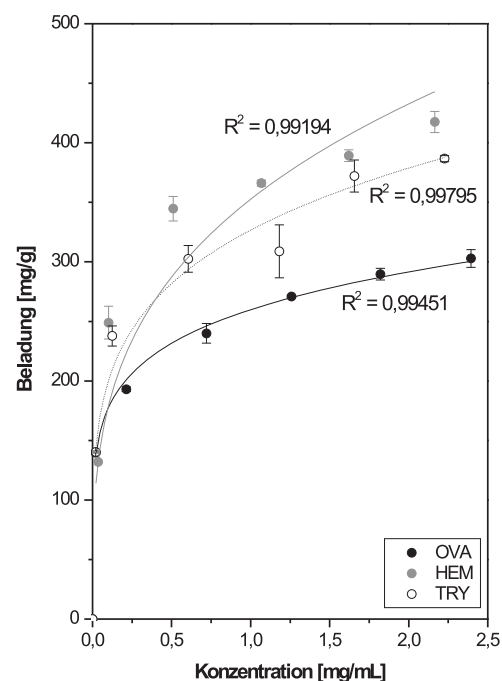


Abbildung 3.10: Adsorptionsisothermen von Ovalbumin, Hämoglobin und Trypsinogen an EX M 1607. Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer durchgeführt. Es wurde je der pH-Wert gewählt, bei welchem während der pH-Wert-abhängigen Adsorption die maximale Kapazität festgestellt werden konnte. Ovalbumin: Acetat pH 5, Hämoglobin: MES pH 6, Trypsinogen: Acetat pH 5. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Die bei der LF-Anpassung berechneten Werte für den Heterogenitätsindex m sind für alle drei Proteine < 1 , weshalb davon ausgegangen werden kann, dass eine heterogene

Oberfläche vorliegt [154]. Eine Berechnung von q_{\max} ergab für Hämoglobin $445,9 \pm 55,2$ mg/g und für Trypsinogen $625,6 \pm 172,3$ mg/g.

Tabelle 3.5: Berechnete Parameter m und q_{\max} der Anpassung der experimentell ermittelten Daten an das LF-Modell.

	Heterogenitätsindex m	q_{\max} [mg/g]
Ovalbumin	$0,831 \pm 0,086$	n. a.
Hämoglobin	$0,279 \pm 0,169$	$445,9 \pm 55,2$
Trypsinogen	$0,639 \pm 0,076$	$625,6 \pm 172,3$

Im Fall von Ovalbumin war eine Abschätzung von q_{\max} anhand der Anpassung an das LF-Modell nicht sinnvoll, da sich für die Standardabweichung ein größerer Wert ergab als für den berechneten Parameter. Die Standardabweichung von q_{\max} beträgt für Hämoglobin etwa 12 %, für Trypsinogen sind sogar 27 % festgestellt worden. Die relativ hohen Standardabweichungen resultieren vermutlich aus der Tatsache, dass eine geringe Anzahl experimenteller Daten vorliegt. Ausgehend vom Verlauf der Isotherme kann für Ovalbumin eine statische Kapazität von etwa 300 mg/g geschätzt werden. Die Adsorptionskapazität von EX M 1607 ist im Vergleich zu der Kapazität eines kommerziellen Kationenauschers wesentlich höher. (Zum Vergleich: die statische Kapazität von Lewatit S 2528 für α -Chymotrypsin bei pH 4 liegt bei < 50 mg/g, während für EX M 1607 eine Kapazität von 270 mg/g festgestellt wurde [157].)

Die experimentell ermittelten Daten können sowohl mit der Freundlich-Isotherme als auch mit der LF-Isotherme modelliert werden. Die Regressionskoeffizienten bei der Anpassung an das LF-Modell liegen zwischen 0,99238 und 0,99875. Für das Freundlich-Modell sind R^2 zwischen 0,99194 und 0,99795 angegeben. Ist eine Anpassung an das Freundlichmodell möglich, kann davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche Adsorptionsenergien auf der Oberfläche existieren [41]. Auch bei einer Anpassung an die LF-Isotherme kann geschlossen werden, dass die Oberfläche, die zur Adsorption zur Verfügung steht, von heterogener Natur ist [154,155]. Dies wird ebenfalls anhand der Heterogenitätsindizes deutlich (vergl. Tabelle 3.4). Die generelle Heterogenität der Adsorption, welche sich in der passenden Modellierung der experimentellen Daten mit der LF- und Freundlich-Isotherme

ausdrückt, könnte auch dynamische Prozesse bei der Adsorption einschließen. Bei geringeren Proteinkonzentrationen ist eine zunächst eher ungeordnete Adsorption denkbar, bei welcher die Proteine in unterschiedlichen Orientierungen und weiter Verteilung adsorbiert werden. (Relativ hohe Steigung der Isotherme bei geringen Proteinkonzentrationen.) Bei höheren Proteinkonzentrationen in der umgebenden Lösung könnte es zu einer Anordnung durch laterale Bewegung der Proteine auf der Oberfläche kommen [152]. Dies drückt sich bei der LF-Isotherme dadurch aus, dass bei höheren Konzentrationen eine Reduzierung auf die klassische Langmuir-Isotherme erfolgen kann [155]. Folglich könnte die Adsorption bei höheren Konzentrationen ähnlich einer Langmuir-Isotherme verlaufen, wenn während des Adsorptionsprozesses die Anzahl an Adsorptionsplätzen auf der Oberfläche geringer wird. Durch laterale Bewegung der Proteine auf der Oberfläche könnte ein Zusammenrücken der Proteinmoleküle auf der Oberfläche geschehen, so dass eine Besetzung freier Bindungsstellen erfolgen kann. Die Konsequenz wäre eine geordnete Positionierung der Proteine auf der Oberfläche. Damit könnte das aus der LF-Isotherme resultierende Plateau, was die Bildung einer monomolekularen Schicht und somit die Oberflächenkonzentration der adsorbierten Proteinmoleküle angibt, erklärt werden.

Werden lediglich die Regressionskoeffizienten betrachtet, scheinen sowohl das LF- als auch das Freundlich-Modell eine gute Anpassung der Daten zu liefern. Im Rahmen der Standardabweichung kann keine Unterscheidung dahingehend getroffen werden, welches der beiden Modelle die Daten besser widerspiegelt. Um feststellen zu können, welches der beiden einfachen Modelle die Proteinadsorption an das Material EX M 1607 besser beschreibt, wurden beide Anpassungen mittels AIC (*Akaike's Information Criterion*) [158] bewertet. Das Verfahren ist im Anhang, Abschnitt 7.4 erläutert. Eine weite Anwendbarkeit zeichnet das AIC aus, wobei das Modell, welches in Bezug auf die experimentell ermittelten Daten niedrigere AIC-Werte aufweist, als passender angesehen wird [159]. Das Ergebnis der statistischen Bewertung ist in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Berechnete AIC-Werte für die LF-Isotherme und die Freundlich-Isotherme.

	AIC-Wert	
	LF	Freundlich
Ovalbumin	56,630	26,391
Hämoglobin	54,437	33,722
Trypsinogen	48,469	23,171

Aufgrund der AIC-Werte, welche bei allen drei Proteinen im Fall der Anpassung an das Freundlich-Modell niedriger sind als bei der LF-Anpassung, könnte angenommen werden, dass das Freundlich-Modell die Adsorption von Proteinen an dieses Material besser beschreibt. Bei der Freundlich-Adsorption besteht die Möglichkeit, dass eine Adsorption nicht unbedingt auf eine monomolekulare Schicht beschränkt ist, und auch laterale Interaktionen zwischen den adsorbierten Molekülen denkbar sind [160]. Es ist bekannt, dass die Adsorption von Proteinen an Tonmineraloberflächen auch in einer zweiten, locker gebundenen Schicht erfolgen kann. Die Proteinmoleküle der zweiten Schicht liegen vermutlich weiter verteilt und stärker hydratisiert vor [161]. Dies könnte auch bei dem Material EX M 1607 zutreffend sein.

3.5.3 Zeitabhängigkeit der Adsorption

Soll ein Material zur Separation von Proteinen eingesetzt werden, ist die Bindungskinetik, also eine möglichst schnelle Adsorption der zu trennenden Substanzen von Relevanz. Im Folgenden wurde die Bindungszeit von EX M 1607 im Vergleich zu der Bindungszeit eines kommerziellen Kationentauschers untersucht. Dazu wurden die Materialien für unterschiedliche Zeitintervalle zwischen einer und 120 Minuten mit einer Proteinlösung bekannter Konzentration inkubiert, im Anschluss daran zentrifugiert und anhand der verbliebenen Proteinkonzentration im Überstand die zu dem entsprechenden Zeitpunkt gebundene Proteinmenge bestimmt. Die Versuchsdurchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.2.3) zu entnehmen. Die Bestimmung der Bindungszeit anhand der Verminderung der Proteinkonzentration ist eine gängige Methode zur Kinetikbestimmung [24,162-164]. In Abbildung 3.11 ist die Adsorption von Ovalbumin an EX M 1607 im Vergleich zu einem

kommerziellen Kationentauscher (UNOsphere S, Bio-Rad) in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

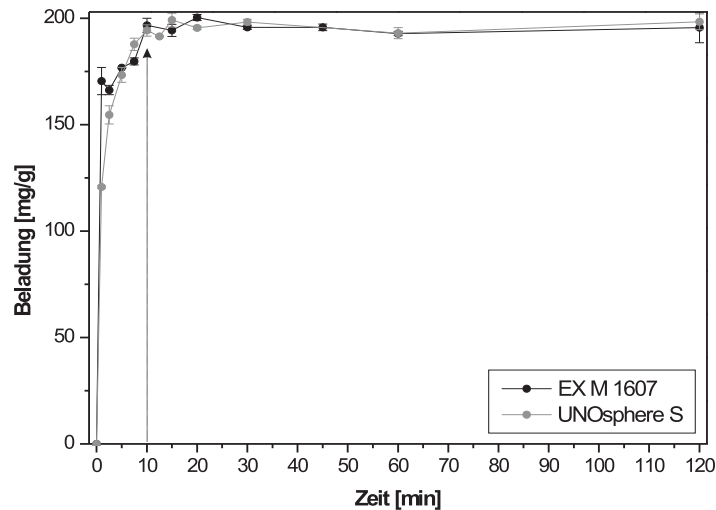


Abbildung 3.11: Adsorption von Ovalbumin an EX M 1607 und den kommerziellen Kationentauscher UNOsphere S (BIO-RAD) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Adsorption erfolgte jeweils bei pH 4 in 50 mM Acetatpuffer. Die Anfangsproteinkonzentration betrug 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Die maximale Adsorption wurde bei dem Material EX M 1607 nach etwa zehn Minuten festgestellt (siehe Pfeil). Nach einer Minute konnten etwa 85 % der unter diesen Bedingungen maximalen Adsorption (ca. 200 mg/g) erreicht werden. Die Bindung des Modellproteins Ovalbumin erfolgt im Vergleich zu dem konventionellen Kationentauscher sogar schneller. Der kommerzielle Kationentauscher UNOsphere S (BIO-RAD) wies nach einer Minute etwa 60 % der maximalen Adsorption von 200 mg/g auf. Von diesem Gesichtspunkt aus betrachtet zeigt das smektitische Material ebenfalls eine gute Eignung für den Einsatz als kationisches Separationsmaterial.

3.5.4 Abhängigkeit der Adsorption von der Ionenstärke

Häufig weist das Medium, aus welchem Proteine separiert werden soll, eine relativ hohe Leitfähigkeit auf (z. B. Zellkulturmedien: 12-15 mS/cm [165,166], Kartoffelfruchtwasser: 30 mS/cm). Bei der Verwendung von Ionenaustauschmaterialien kann dies eine

Erschwerung des Trennprozesses bedeuten. Die Proteinbindung an Ionentauscher wird durch eine hohe Salzkonzentration verringert bzw. verhindert [166,167]. So kann zum Beispiel ein Entsalzungs- oder Verdünnungsschritt notwendig werden [166]. Ein Verdünnungsschritt resultiert in hohe Volumenströme, welche im Produktionsmaßstab eine große Herausforderung darstellen können [168,169], während ein Entsalzungsschritt durch Ultra- oder Diafiltration zeitaufwändig ist [165].

Im Folgenden ist die Abhängigkeit der Adsorption von der Ionenstärke am Beispiel von Ovalbumin an das Material EX M 1607 im Vergleich zu dem kommerziellen Kationentauscher UNOsphere S (Bio-Rad) dargestellt (Abbildung 3.12). Die Ionenstärke wurde mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen eingestellt. Die Versuchsdurchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.2.4) zu entnehmen.

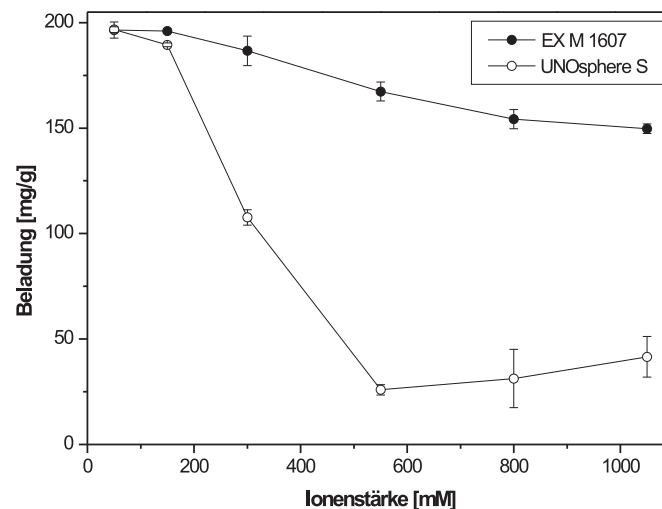


Abbildung 3.12: Adsorption von Ovalbumin an EX M 1607 und UNOsphere S in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Die Adsorption erfolgte in 50 mM Acetatpuffer (pH 4) unter Zugabe von 100 bis 1000 mM NaCl. Die Anfangsproteinkonzentration betrug 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Das smektitische Tonmineral zeigt eine deutlich geringere Abhängigkeit der Adsorption von der Ionenstärke als der kommerzielle Kationentauscher. Dieses Verhalten kann auch bei anderen Smektiten festgestellt werden. (Siehe Abschnitt 7.1.2) Die Adsorption bei einer Ionenstärke von 1050 mM ist bei diesem Material nur etwa 25 % geringer als bei einer Ionenstärke von 50 mM. Die Kapazität des kommerziellen Kationentauschers

UNOsphere S fällt im Vergleich dazu bei einer Ionenstärke von 1050 mM 80 % geringer aus. Die wenig ausgeprägte Abhängigkeit der Adsorption von der Ionenstärke könnte in manchen Fällen für einen Prozess von Vorteil sein, wenn Proteine aus einem Medium mit hoher Leitfähigkeit mittels Ionentauscher separiert werden sollen, und so ein Verdünnungs- oder Entsalzungsschritt entfallen kann. Ein Nachteil dieses Adsorptionsverhaltens ergibt sich aus der Tatsache, dass eine Desorption bzw. Elution durch Erhöhung der Leitfähigkeit erschwert ist, wie es sonst häufig bei Ionenaustauschmaterialien durchgeführt wird. Alternative Möglichkeiten zur Desorption von Proteinen nach einer Bindung an Tonminerale sollen daher im Folgenden untersucht werden.

3.5.5 Desorptionseigenschaften

Für die Anwendbarkeit eines Materials zur Proteinseparation sollte die Adsorption der zu aufreinigenden Substanzen an das entsprechende Material reversibel sein. In den folgenden Versuchen wurden die Desorptionseigenschaften von EX M 1607 unter statischen Bedingungen am Beispiel des Modellproteins Ovalbumin untersucht. Es wurden die Effekte einer Erhöhung des pH-Wertes (Erhöhung der Repulsion von Protein und Adsorbensoberfläche), einer Erhöhung der Ionenstärke (Ionenaustausch) sowie die Zugabe unterschiedlicher Additive (möglicher Verdrängungseffekt) auf die Adsorption miteinander verglichen. Als Additive wurden Iso-Propanol, Polyethylenglykol 200, Glycerol und Ethylenglykol verwendet. Eine Elution von auf Tonmineralen adsorbierten Proteinen mittels Glycerol als Pufferadditiv gelang bereits bei der Aufreinigung von Enzymen aus Zuckerrübendicksaft [170].

Eine definierte Menge des Materials wurde mit einem definierten Volumen einer Ovalbuminlösung bekannter Konzentration unter statischen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Material abzentrifugiert und anhand der verbliebenen Proteinkonzentration im Überstand die adsorbierte Proteinmenge berechnet. Nach einem Waschschrift mit einem definierten Volumen des Adsorptionspuffers und anschließender Bestimmung der Proteinkonzentration im Waschpuffer wurde mit einem definierten Volumen desorbirt und wiederum nach Zentrifugation anhand der Proteinkonzentration im Überstand die desorbierte Proteinmenge berechnet. Die Durchführung ist in 7.2.5 beschrieben. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.13 dargestellt.

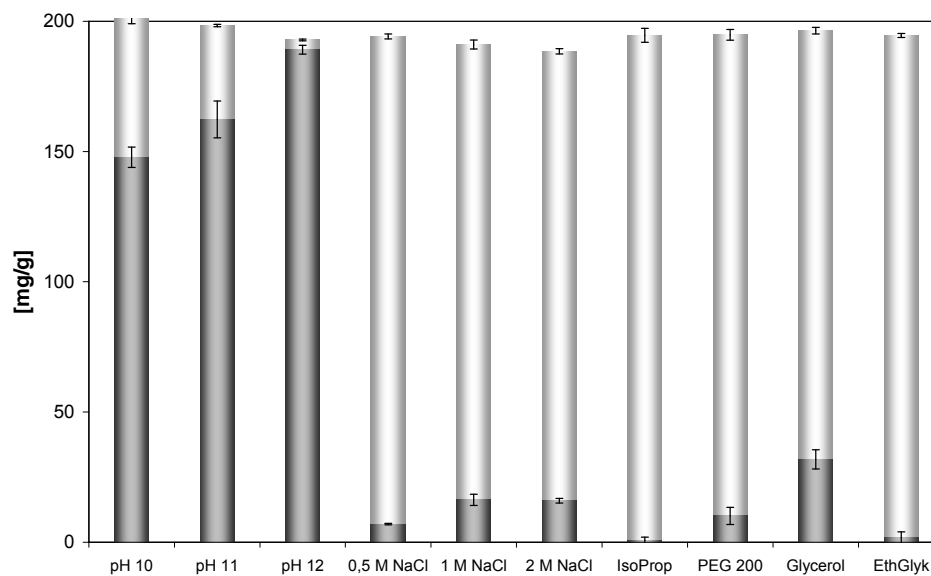


Abbildung 3.13: Desorption von Ovalbumin. Die Adsorption wurde bei pH 4 in 50 mM Acetatpuffer durchgeführt (200 mg/g). Es wurden unterschiedlichen pH-Werte (pH 10 und pH 11: 100 mM CAPS, pH 12: 100 mM Phosphat), unterschiedliche NaCl-Konzentrationen in 50 mM Acetatpuffer, pH 4 sowie unterschiedliche Additive (je 20 % Iso-Propanol (IsoProp), Polyethylenglykol 200 (PEG 200), Glycerol und Ethylenglykol (EthGlyk) in 50 mM Acetatpuffer, pH 4) zur Desorption untersucht. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Zwecks Desorption unter statischen Bedingungen ist ein pH-Shift zur Erhöhung der Repulsion zwischen Protein und Adsorbensoberfläche am effektivsten. Mit pH 11 konnten 82 % und mit bei pH 12 sogar 98 % des Ovalbumins desorbiert werden. Eine Erhöhung der Ionenstärke, wie sie häufig zur Elution bei konventionellen Ionenaustauschmaterialien eingesetzt wird, zeigt in diesem Fall nur einen geringen Effekt (1 M NaCl: 8,5 %). Dieses Verhalten ließ sich bereits anhand der Ergebnisse des Versuchs zur Ionenstärke-abhängigen Adsorption vermuten. Auch die ausgewählten Additive eignen sich nur bedingt zur Desorption (20 % Glycerol: 16 %).

Je nach Anwendung könnten die Additive synergetisch verwendet werden, was bei der Desorption von Ovalbumin von EX M 926 I und EX M 1753 gezeigt werden konnte (siehe Anhang, Abschnitt 7.1.4). Die Desorption von Proteinen von Tonmineralen ist generell unter extremen Bedingungen möglich. Sehr hohe oder niedrige pH-Werte können die Aktivität von Proteinen beeinträchtigen [171]. Um einer Verminderung der biologischen Aktivität entgegenzuwirken, kann das Zielprotein im Anschluss an die Elution in einem Neutralisationspuffer aufgefangen werden. Eine ähnliche Verfahrensweise findet z. B. bei

der Aufreinigung von IgG Anwendung, wobei eine Elution bei pH 2 mit einem anschließenden Auffangen in einem Puffer mit pH 9 erfolgt [166]. Eine weitere Umgehung einer Elution unter extremen Bedingungen ist dadurch möglich, dass unerwünschte Proteine durch Adsorption abgereichert werden und das Zielprotein nicht gebunden wird, so dass eine Elution entfällt (SNAP-Chromatographie; *selective non-adsorption preparative chromatography*) [172].

3.6 Dynamisches Adsorptionsverhalten von EX M 1607

3.6.1 EX M 1607 als Säulenmaterial

Für das Material EX M 1607 konnte ein relativ geringes Sedimentvolumen bestimmt werden (siehe Tabelle 3.1). Dies spricht für die Möglichkeit, dass das Material problemlos in Säulen gepackt werden kann. Für eine Beurteilung des Verhaltens dieses Materials als Säulenmaterial wurde der Druckabfall bei unterschiedlichen Flussraten bestimmt und mit anderen Materialien verglichen. Eine definierte Menge des entsprechenden Materials wurde in eine Quarzsäule mit beweglichem Stempel gegeben und mit ddH₂O als mobile Phase von unten nach oben durchströmt. Das Protokoll zum Befüllen der Säule ist im Anhang, Abschnitt 7.2.6 angegeben. Die Drücke wurden für die unterschiedlichen Flussraten abgelesen und sind in Abbildung 3.14 dargestellt. In Tabelle 3.7 sind die dynamischen Kapazitäten unterschiedlicher kommerzieller Kationentauscher für einige Proteine im Vergleich zu den dynamischen Kapazitäten von EX M 1607 bei unterschiedlichen Flussraten miteinander verglichen.

Beim Vergleich der Vorsäulendrucke bei unterschiedlichen Flussraten in Abbildung 3.14 konnte für EX M 1607 ein Druckaufbau verzeichnet werden, der sich im gleichen Bereich befindet, wie der des kommerziellen Kationenaustauschers Macro-Prep High S. Für beide Materialien sind die gemessenen Drücke mit denen einer leeren Säule vergleichbar.

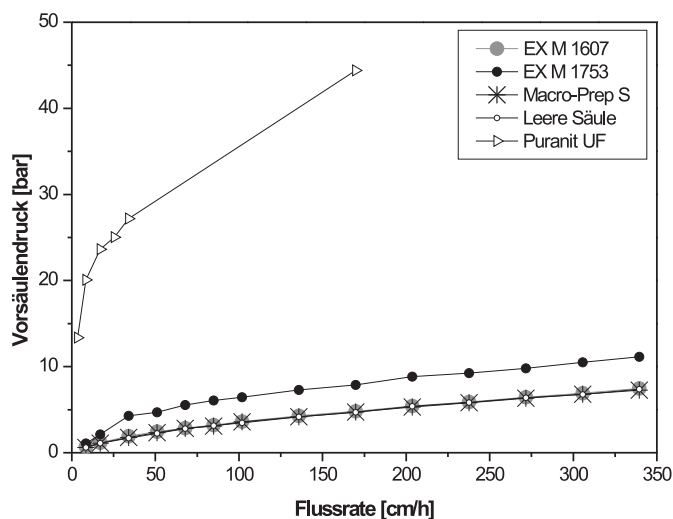


Abbildung 3.14: Druckabfall unterschiedlicher Materialien im Vergleich (EX M 1607, EX M 1753, Puranit UF und Macro-Prep High S (Bio-Rad). Es wurden je 500 mg des entsprechenden Materials verwendet, so dass sich Betthöhen zwischen 3 und 5 mm bei einem Säulendurchmesser von 15 mm ergaben. Als mobile Phase wurde ddH₂O verwendet. Bild rechts: EX M 1607 als Säulenpackung.

Tabelle 3.7: Vergleich der dynamischen Kapazitäten von zwei kommerziellen Kationentauschern und EX M 1607 bei unterschiedlichen Flussraten.

Flussrate [cm/h]	UNOsphere S (Bio-Rad)	Streamline SP (Pharmacia Biotech)	EX M 1607
17			183 mg/g (α -Chymotrypsin)
25		115 mg/g (Lysozym) 87 mg/g (γ -Globulin)	
34			117 mg/g (α -Chymotrypsin)
100	120 mg/g (humanes IgG)		90 mg/g (α -Chymotrypsin)
300		58 mg/g (Lysozym)	50 mg/g (α -Chymotrypsin)

Das Material Puranit UF zeigt wie erwartet als reines Montmorillonit aufgrund von Quelleffekten einen sehr hohen Druckaufbau und kann aus diesem Grund als Säulenmaterial ausgeschlossen werden. EX M 1753 weist zwar einen relativ geringen Druckaufbau auf, wurde aber bereits angesichts der Adsorptionseigenschaften als ungeeignet für den Einsatz als Kationentauscher bewertet. Die dynamischen Adsorptionskapazitäten von EX M 1607 sind mit den Kapazitäten kommerzieller Kationentauscher vergleichbar (s. Tabelle 3.7).

3.6.2 Separation eines Proteingemisches mit EX M 1607

EX M 1607 zeigte in den vorangegangenen Versuchen eine Eignung als Kationentauscher. Im Folgenden soll die Trennung eines binären Proteingemisches mit diesem Material untersucht werden. Mit dem Material EM M 1607 wurde zu diesem Zweck eine Quarzsäule befüllt und ein gepuffertes Proteingemisch aus Ovalbumin und Lysozym im Durchfluss separiert. Die Versuchsdurchführung zur Adsorption im dynamischen System ist in Abschnitt 7.2.6 beschrieben. Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16 zeigen das Chromatogramm der Trennung bzw. ein SDS-PAGE-Gel der aufgefangenen Fraktionen.

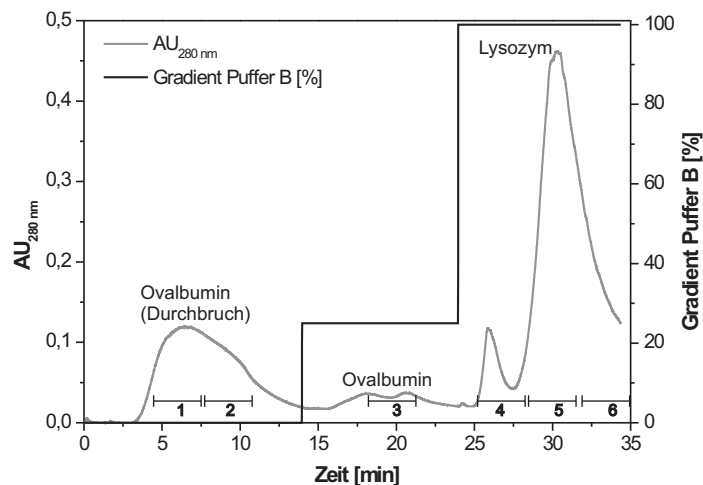


Abbildung 3.15: Chromatogramm der Separation von Ovalbumin und Lysozym mit EX M 1607. Flussrate: 33,9 cm/h, Betthöhe: ca. 4 mm. Probe: 1,5 mL mit je 1 mg/mL Ovalbumin und Lysozym. Die Adsorption wurde bei pH 9 (Puffer A: Tris-Puffer, 50 mM) durchgeführt. Die Elution erfolgte mittels Stufengradient (Stufe 1: 100 % Puffer A → 75 % Puffer A und 25 % Puffer B (50 mM Phosphatpuffer, pH 12); Stufe 2: % 50 mM Puffer A und 25 % Puffer B → 100 % Puffer B mit 20 % PEG 200 als Pufferadditiv). Die im Chromatogramm mit 1-6 gekennzeichneten Fraktionen wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE untersucht.

Die Separation eines Gemisches bestehend aus den beiden Modellproteinen Ovalbumin und Lysozym ist unter Verwendung eines Stufengradienten mit EX M 1607 möglich. Ovalbumin (IEP: 4,6-4,7) bindet unter diesen Bedingungen kaum an das Material und ist in erster Linie in der Durchlaufraction zu finden (Fraktion 1 und 2 in den Abb. 3.14 und 3.15).

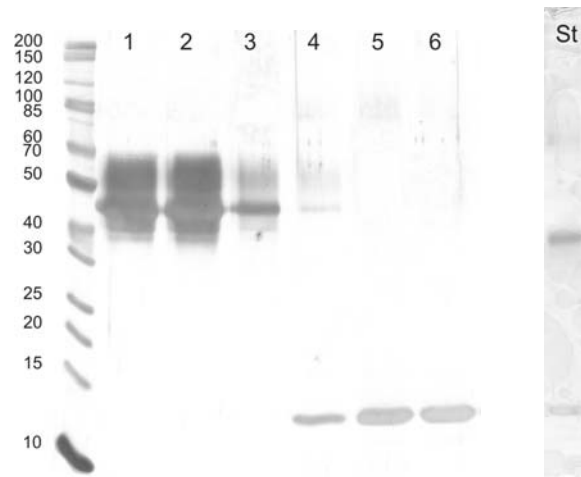


Abbildung 3.16: SDS-PAGE der Fraktionen 1-6 der Separation von Ovalbumin und Lysozym EX M 1607. Bahnen 1-3: Ovalbumin mit 43,5-45 kDa, Bahnen 4-6: Lysozym mit 14 kDa, Bahn rechts (St): verdünnte Standardmischung (ca. 0,05 mg/mL Gesamtproteinkonzentration) mit Ovalbumin bei etwa 40 kDa und Lysozym bei etwa 14 kDa. (12 %iges Gel nach Silberfärbung)

Trotz der vornehmlich elektrostatischen Interaktionen des Materials mit Proteinmolekülen wird eine geringe Menge des Ovalbumins bei pH 9 gebunden (durch hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder van-der-Waals-Kräfte, vergl. Abschnitt 3.3.2). Ovalbumin wird mit einem pH-Shift (Elutionsstufe 1: 100 % 50 mM Tris (pH 9) → 75 % 50 mM Tris (pH 9) und 25 % 50 mM Phosphatpuffer, pH 12) eluiert. (Fraktion 3 in Abb. 3.14 und 3.15).

Lysozym (IEP: 10,5-11,0) wird bei pH 9 komplett gebunden und bleibt auch bei der Erhöhung des pH-Wertes in der ersten Elutionsstufe gebunden. Die Elution des Lysozyms ist mit einer Erhöhung des pH-Wertes unter Zugabe von Polyethylenglykol 200 als Additiv möglich (siehe Fraktion 5 und 6). Das Chromatogramm zeigt zwei Peaks für Lysozym (siehe Fraktion 4). Im ersten Peak wird laut des SDS-PAGE-Gels noch ein kleinerer Anteil Ovalbumin zusammen mit einem Teil des Lysozyms eluiert. Da bei der Adsorption von Proteinen an Tonminerale prinzipiell die Möglichkeit der Adsorption einer zweiten, lockerer gebundenen Proteinschicht besteht, wäre denkbar, dass es sich bei dem Lysozym im ersten Peak um Proteinmoleküle handelt, die einer zweiten adsorbierten Schicht angehören.

Mit der Separation dieses einfachen Proteingemisches konnte gezeigt werden, dass eine Proteintrennung mit diesem Material möglich ist. Eine Separation eines komplexen Proteingemisches ist in Abschnitt 5 anhand des Beispiels von KFW beschrieben.

3.7 Synthetische Hydrotalcite als Anionentauscher

3.7.1 Adsorptionseigenschaften unter statischen Bedingungen

Im Vergleich zu den negativ geladenen Materialien wurden die Adsorptionseigenschaften eines synthetischen Hydrotalcits in Hinblick auf eine Verwendbarkeit als anorganische Anionentauscher untersucht. Ausgehend von der Messung des Zetapotentials kann von einer positiven Ladung dieser Materialien ausgegangen werden (vergl. Tabelle 3.2). Die Untersuchung des pH-Wert-abhängigen Adsorptionsverhaltens von Synthal 696 erfolgte anhand von Modellproteinen mit unterschiedlichen IEP und Molekulargewichten analog zu den Adsorptionsversuchen mit den Tonmineralen (Abschnitt 3.3.1). Eine definierte Menge des Hydrotalcits wurde mit einem definierten Volumen einer Proteinlösung bekannter Konzentration in einem Überkopfmischer inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde nach einer Zentrifugation anhand der verbliebenen Proteinkonzentration im Überstand die adsorbierte Proteinmenge berechnet. Die Durchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.2.1) zu entnehmen. Die pH-Werte wurden mit folgenden Puffern eingestellt: pH 5 mit Acetat, pH 6 mit MES, pH 7 mit HEPES, pH 8 und pH 9 mit Tris und pH 10 sowie pH 11 mit CAPS. Die Versuche wurden bei pH-Werten ab pH 5 aufwärts durchgeführt, da bei pH-Werten < 5 eine Herauslösung der interkalierten Carbonationen aus den Hydrotalcitschichten erfolgen kann. In Abbildung 3.17 ist die pH-Wert-abhängige Adsorption an Synthal 696 dargestellt.

Humanes Serumalbumin, Hämoglobin und Lysozym binden abhängig von ihrer Nettoladung an Synthal 696. Im Fall von HSA und Hämoglobin nimmt die Adsorption oberhalb des IEP zu. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Adsorption in erster Linie durch elektrostatische Wechselwirkungen des positiv geladenen Hydrotalcits mit den negativ geladenen Proteinmolekülen ausgelöst wird. Mit einem hohen IEP von ca. 10,5-11,0 erfolgt beim Lysozym aufgrund der Repulsion über den untersuchten pH-Bereich lediglich eine sehr geringe Adsorption, was dem Adsorptionsverhalten von HSA und Hämoglobin entspricht. Bei α -Chymotrypsin und Trypsinogen kann bereits drei pH-Einheiten unterhalb der IEP trotz der positiven Nettoladung des Proteinmoleküls eine Zunahme der Adsorption bis auf etwa 80 bzw. 125 mg/g festgestellt werden. Möglicherweise resultiert das Adsorptionsverhalten dieser beiden Proteine aus spezifischen Eigenschaften dieser (Wechselwirkungen von Proteinseitenketten).

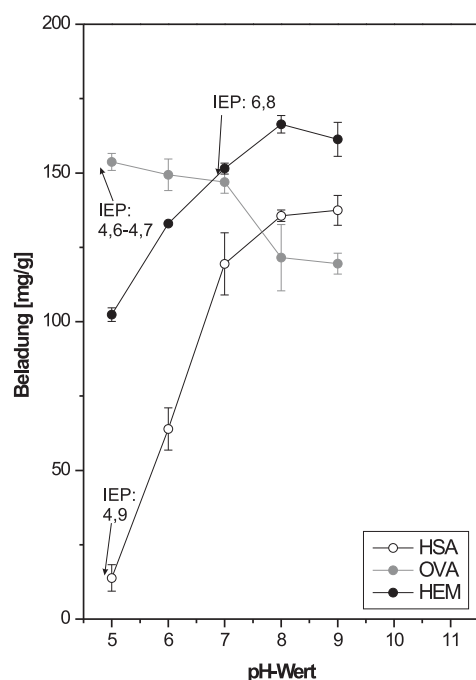
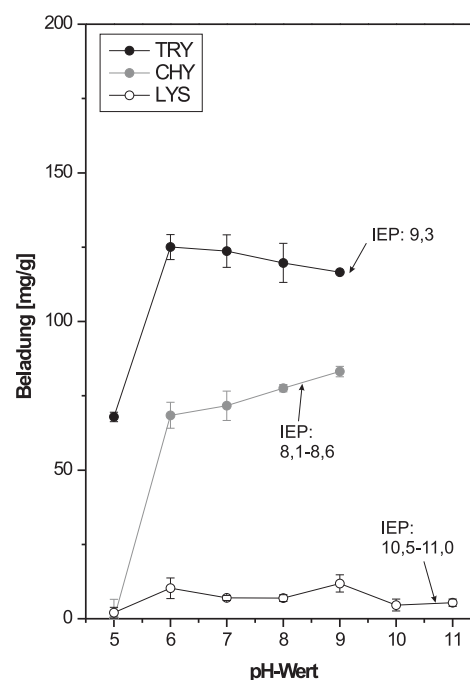
Proteine mit einem IEP < pH 7:Proteine mit einem IEP > pH 7:

Abbildung 3.17: pH-Wert-abhängige Adsorption von Modellproteinen an Synthal 696. Rechts: Proteine mit einem IEP < pH 7 (OVA: Ovalbumin, HSA: humanes Serumalbumin, HEM: Hämoglobin), links: Proteine mit einem IEP > pH 7 (CHY: α -Chymotrypsin, LYS: Lysozym, TRY: Trypsinogen). Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt, die Anfangsproteinkonzentration betrug je 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Ein den Erwartungen entgegengesetztes Adsorptionsverhalten wurde beim Ovalbumin festgestellt, bei welchem mit steigendem pH-Wert eine leichte Abnahme der Adsorptionskapazität oberhalb des IEP verzeichnet wurde. Beim Ovalbumin ist das Adsorptionsverhalten vermutlich mit spezifischen Eigenschaften des Proteins zu erklären. Ovalbumin verfügt als Glykoprotein über einen Glykoanteil von etwa 4 % [173,174]. Wechselwirkungen über den Glykoanteil (OH-Gruppen) unabhängig von den zu erwartenden elektrostatischen Wechselwirkungen sind denkbar.

Die hier beispielhaft verwendeten Modellproteine weisen Durchmesser zwischen 30-70 Å auf (vergl. Tabelle 3.3). Der für Synthal 696 angegebene Durchschnittsporendurchmesser liegt mit ca. 240 Å weitaus darüber (vergl. Tabelle 3.2). So ist davon auszugehen, dass den hydrodynamischen Radien der Proteine bei der Adsorption an Synthal 696 keine hindernde

Bedeutung zukommt. Die Poren des Materials sollten für die verwendeten Proteine gut zugänglich sein. Auf Grund des relativ großen Durchschnittsporendurchmessers von Synthal 696 ist auch die Separation von großen Proteinen mit diesem Material denkbar. (Zum Vergleich: β -Galaktosidase mit einem Molekulargewicht von ca. 465 kDa verfügt über einen Stokes'schen Radius von ca. 69 Å, Thyroglobulin mit etwa 669 kDa weist einen Stokes'schen Radius von ca. 86 Å auf [142].)

Diese Ergebnisse lassen schließen, dass Synthal 696 als kationisches Separationsmaterial geeignet ist, da die Wechselwirkungen in Abhängigkeit vom pH-Wert oberhalb des IEP stattfinden und das Material einen relativ großen Durchschnittsporendurchmesser aufweist. Proteinspezifische Ausnahmen müssen eventuell berücksichtigt werden.

3.7.2 Desorptionseigenschaften

Für die Verwendbarkeit des Hydrotalcits für Separationsprozesse sollte die Adsorption reversibel sein. In den folgenden Versuchen wurden die Desorptionseigenschaften von Synthal 696 unter statischen Bedingungen am Beispiel des Modellproteins Ovalbumin untersucht. Der Effekt einer Erhöhung der Ionenstärke (Ionenaustausch) sowie die Zugabe unterschiedlicher Additive auf Grund eines möglichen Verdrängungseffektes, wurden miteinander verglichen. Als Additive wurden analog zu den Desorptionsversuchen mit dem Tonmineral EX M 1607 Polyethylenglykol 200, Glycerol und Ethylenglykol untersucht. Die Adsorption wurde in zwei parallelen Versuchsreihen bei pH 5 und pH 7 unter den gleichen Bedingungen wie unter Abschnitt 3.5.5 durchgeführt. Abbildung 3.18 (folgende Seite) zeigt die desorbierte Menge Ovalbumin in Prozent von der adsorbierten Menge. Bei pH 5 wurden etwa 159 mg/g adsorbiert, bei pH 7 etwa 126 mg/g.

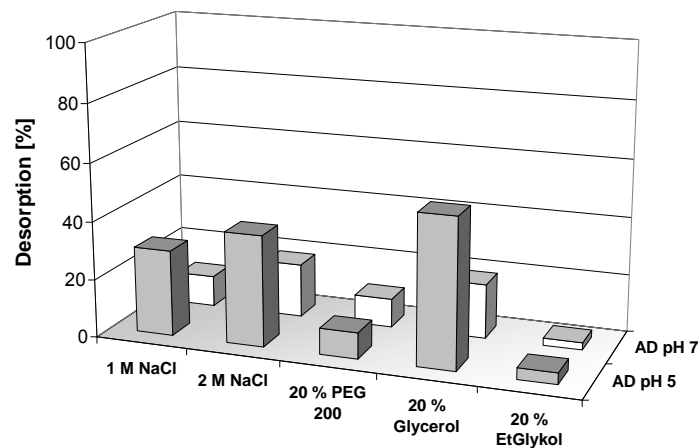


Abbildung 3.18: Prozentuale Desorption von Ovalbumin nach Adsorption an Synthal 696. Adsorption: 50 mM Acetat, pH 5 bzw. 50 mM HEPES, pH 7. Es wurden unterschiedliche NaCl-Konzentrationen sowie unterschiedliche Additive (je 20 % Polyethylenglykol 200 (PEG 200), Glycerol und Ethylenglykol (EthGlykol) Desorption untersucht. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

Die Reversibilität der Adsorption hängt vom Adsorptions-pH-Wert ab. Im Vergleich zu pH 7 ist nach der Adsorption bei pH 5 eine Desorption größerer Anteile des adsorbierten Ovalbumins möglich. Aufgrund von stärkeren elektrostatischen Wechselwirkungen findet bei pH 7 eine stärkere Bindung des Proteinmoleküls statt. Der höchste Desorptionseffekt von etwa 40 % konnte mit der Zugabe von Glycerol erreicht werden. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Adsorption an Synthal 696 reversibel ist. Eine Optimierung der Desorptionsbedingungen könnte mittels pH-Shift in den sauren Bereich zur Erhöhung der elektrostatischen Abstoßung erfolgen. Dabei wäre zu berücksichtigen, dass es zu einer Herauslösung der Carbonationen kommen kann. Eine Desorption mittels Phosphatpuffer ist ebenfalls möglich [175]. Allerdings bedingt dies die Bildung von Aluminium- und Magnesiumphosphat, woraus eine irreversible Zerstörung der Hydrotalcitstruktur resultiert.

3.7.3 Adsorptionseigenschaften im dynamischen System

Im Folgenden wurden die dynamischen Bindungseigenschaften von Synthal 696 im Vergleich zu den Bindungseigenschaften des kommerziellen Anionentauschers MacroPrep 25 Q (BIO-RAD) untersucht. Hydrotalcite weisen im Gegensatz zu reinen smektitischen Tonmineralen keine Quelleigenschaften auf. Daher ist das Befüllen von Säulen möglich.

Unter den gleichen Bedingungen wurden je 100 mg Synthal 696 bzw. MacroPrep 25 Q bei pH 7 mit BSA bei Flussraten zwischen 1-9 mL/min beladen. Die BSA-Konzentration betrug 1 mg/mL in 50 mM HEPES. Die Materialien wurden mit einem Volumen von 25 mL beladen. Die Durchführung ist dem Anhang, Abschnitt 7.2.6 zu entnehmen. In Abbildung 3.19 sind die Adsorptionseigenschaften der beiden Materialien in Abhängigkeit von der Flussrate dargestellt.

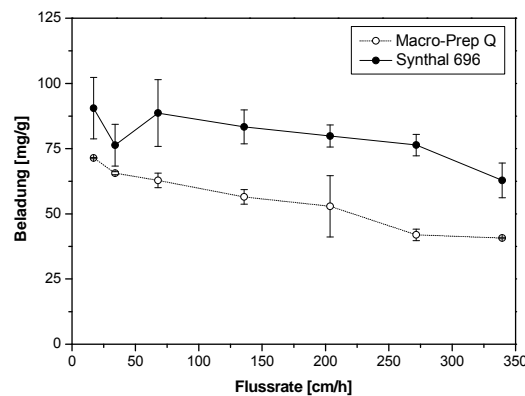


Abbildung 3.19: Beladung von Synthal 696 und MacroPrep 25 Q mit Hämoglobin (1 mg/mL) bei pH 8 (50 mM Tris) bei Flussraten zwischen 0,5-10 mL/min. Die Beladung erfolgte mit einem Volumen von 25 mL mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Synthal 696 weist Vergleich zu Macro-Prep 25 Q unter den gleichen Bedingungen höhere dynamische Adsorptionskapazitäten für Hämoglobin auf. Die Adsorptionskapazität beider Materialien hängt zudem im Bereich der gewählten Flussraten wenig von der Durchflussgeschwindigkeit ab. Ausgehend von diesen Ergebnissen erscheint das synthetische Hydrotalcit Synthal 696 als Anionentauscher zur Proteinseparation geeignet.

3.8 Zusammenfassung

Anhand der Ergebnisse dieses Kapitels lassen sich folgende Aussagen bezüglich der Wechselwirkungen von Proteinen an Tonminerale und synthetische Hydrotalcite treffen:

-
- An der Adsorption von Proteinen an smektitische Tonminerale sind elektrostatische Wechselwirkungen maßgeblich beteiligt.
 - Die Proteinadsorption hängt vom pH-Wert ab. Die pH-Wert-Abhängigkeit ist umso stärker, je höher die Oberflächenladung des anorganischen Adsorbens ist.
 - Die Adsorption an weniger stark geladene Smektite (Kerolite, Saponite) schließt hydrophobe Interaktionen, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte ein.
 - Anhand der Adsorptionseigenschaften wurde ein smektitisches Tonmineral, welches eine Mischphase aus einem Montmorillonit und amorphem Siliziumdioxid darstellt, als besonders geeignet bewertet, um als Kationentauscher Verwendung zu finden (EX M 1607).
 - Dieses Material weist Bindungskinetiken auf, die mit einem kommerziellen Kationentauscher vergleichbar sind.
 - Die Proteinadsorption an EX M 1607 lässt sich mittels Freundlich- und Langmuir-Freundlich-Isothermen beschreiben. Anhand der Isothermen wird angenommen, dass die Adsorptionsoberfläche dieses Tonminerals von heterogener Natur ist und möglicherweise eine Adsorption in einer zweiten Schicht erfolgen kann.
 - Für EX M 1607 wurden höhere statische Adsorptionskapazitäten im Vergleich zu einem kommerziellen Kationentauscher festgestellt.
 - Proteine adsorbieren an EX M 1607 im Gegensatz zu kommerziellen Kationentauschern weitestgehend unabhängig von der Ionenstärke.
 - Eine Desorption ist mittels pH-Shift (pH 10, pH 11, pH 12) möglich.
 - EX M 1607 verfügt beim Packen einer Chromatographiesäule über die gleichen Eigenschaften bezüglich des Vorsäulendruckes wie ein kommerzieller Kationentauscher und weist vergleichbare Bindekapazitäten auf.
 - Die chromatographische Separation eines binären Proteingemisches ist mit dem Material EX M 1607 durchführbar.
 - Die Adsorption an das synthetische Hydrotalcit Synthal 696 erfolgt ebenfalls aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen und ist mit einem Anionentauscher vergleichbar.
 - Für Synthal 696 als kostengünstiges, rein anorganisches Material konnten höhere dynamische Bindungskapazitäten als für einem kommerziellen Anionentauscher bestimmt werden.

4 Glykoalkaloidadsorption im Modellsystem

Tonminerale und Hydrotalcite weisen eine hohe Oberflächenreaktivität auf und können neben den aus der Oberflächenladung resultierenden elektrostatischen Wechselwirkungen weitere Interaktionen (van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen) mit verschiedensten Molekülen eingehen. Darüber hinaus sind bei einigen Tonmineralen (Talk und Kerolite) auch hydrophobe Interaktionen möglich.

Die Untersuchung des Einflusses der Oberflächenladung und der spezifischen Oberfläche auf die Adsorption von α -Solamin, einem der Hauptglykoalkaloide der Kartoffel, soll unter Auswahl unterschiedlicher Materialien erfolgen. Hierzu wurden systematisch die Adsorptionseigenschaften von smektitischen Tonmineralen mit unterschiedlichen Ladungen sowie Hydrotalciten als „kationische Tonminerale“ untersucht. Natürliche Tonminerale oder synthetische Hydrotalcite könnten als alternative, kostengünstige Adsorbentien zur Abreicherung der toxischen Glykoalkaloide (GA) des Kartoffelfruchtwassers (KFW) dienen, um aus dem KFW isoliertes Protein in der Lebensmittelverarbeitung verwenden zu können. In Tabelle 4.1 sind die in diesem Kapitel verwendeten Materialien aufgeführt.

Tabelle 4.1: Einige relevante Eigenschaften der zur α -Solaminadsorption untersuchten anorganischen Adsorbentien.

	EX M 1753	EX M 926 I	EX M 1607	Puranit UF	Westmin D100	Synthal 696	EX M 1994
Ladung	--	o/-	---	----	o	++	+++
CEC [meq/100 g]	20 – 30	20 – 30	52	105	-		-
BET Oberfläche [m²/g]	124	215	208	80	15	61,4	192,8
Kumulatives Porenvolumen (BJH) für einen Porendurchm. zw. 1,7-300 nm [cm³/g]	0,12	0,26	0,9	0,13	k. a.	0,48	0,39
Durchschnitts- porendurchm. (BJH) [nm]	6,06	7,20	17,8	9,9	k. a.	24,6	7,5
Zetapotential bei pH 7 [mV]	k. a.	- 27,7	-69,2	k. a.	-	+32,9	+33,8

4.1 *pH-Wert-Abhängigkeit der Adsorption von α -Solanin*

Unter statischen Bedingungen wurde das Adsorptionsverhalten von Tonmineralen und synthetischen Hydrotalciten in Abhängigkeit vom pH-Wert gegenüber α -Solanin untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass α -Solanin neben α -Chaconin mengenmäßig den größten Anteil an Glykoalkaloiden in der Kartoffelpflanze darstellt, wurde es als Modellglykoalkaloid verwendet. α -Solanin und α -Chaconin unterscheiden sich lediglich durch einen Hexosebaustein am Zuckerrest (vergl. Abschnitt 2.3.2). Aus diesem Grund ist ein analoges Adsorptionsverhalten beider Moleküle zu erwarten. Zur Untersuchung der Adsorption wurde eine definierte Menge des entsprechenden Materials mit einem definierten Volumen einer gepufferten α -Solaninlösung festgelegter Konzentration unter Schütteln inkubiert. Erfahrungswerte zeigten, dass in einer Adsorptionszeit von einer Stunde die maximale Adsorption erreicht wird. Nach erfolgter Inkubation wurde das Adsorbens abzentrifugiert und anhand der verbliebenen α -Solaninkonzentration im Überstand die adsorbierte α -Solaninmenge berechnet. Die Durchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.2.7) zu entnehmen. Die Bestimmung der α -Solaninkonzentration mittels HPLC-Analytik erfolgte nach einer Methode von Alt et al. 2005 [119] (siehe Anhang Abschnitt 7.3.3). Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

4.1.1 Adsorption von α -Solanin an Tonminerale

Die Adsorption von α -Solanin an Tonminerale kann durch hydrophobe Wechselwirkungen stattfinden, wobei hydrophobe Bereiche der Tonmineraloberflächen mit dem Steroidrest des Glykoalkaloids wechselwirken. In der Literatur ist angegeben, dass unpolare Reste von organischen Molekülen mit Siloxanoberflächen interagieren [176,177]. Eine weitere Möglichkeit der Wechselwirkung resultiert aus der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen der Tonmineraloberfläche und dem Zuckerrest des Glykoalkaloids. Die Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, wird durch den Lewisbasencharakter (Elektronendonator) der (Si,Al)-O-Bindungen der Tonminerale bestimmt. Die Sauerstoffatome der Al-O-Oberflächen in tetraedrisch substituierten Tonmineralen (z. B. Saponite, Beidellite) stellen starke Lewisbasen dar, so dass bei diesen Tonmineralen die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen begünstigt ist

[178,179]. Bei oktaedrisch substituierten Tonmineralen (z. B. Montmorillonite, Hektorite) hingegen ist die negative Ladung über mindestens zehn Sauerstoffatome verteilt, so dass diese vermutlich schwächere Lewisbasen darstellen. Die Konsequenz sind schwächere Wasserstoffbrückenbindungen der oktaedrisch substituierten Tonminerale [178,180]. Die Protonierung der tertiären Aminogruppe des Glykoalkaloids bei sauren pH-Werten [181] stellt eine weitere Wechselwirkungsmöglichkeit dar.

Das Adsorptionsverhalten ausgewählter Tonminerale gegenüber α -Solanin in Abhängigkeit vom pH-Wert (pH 4-9) ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

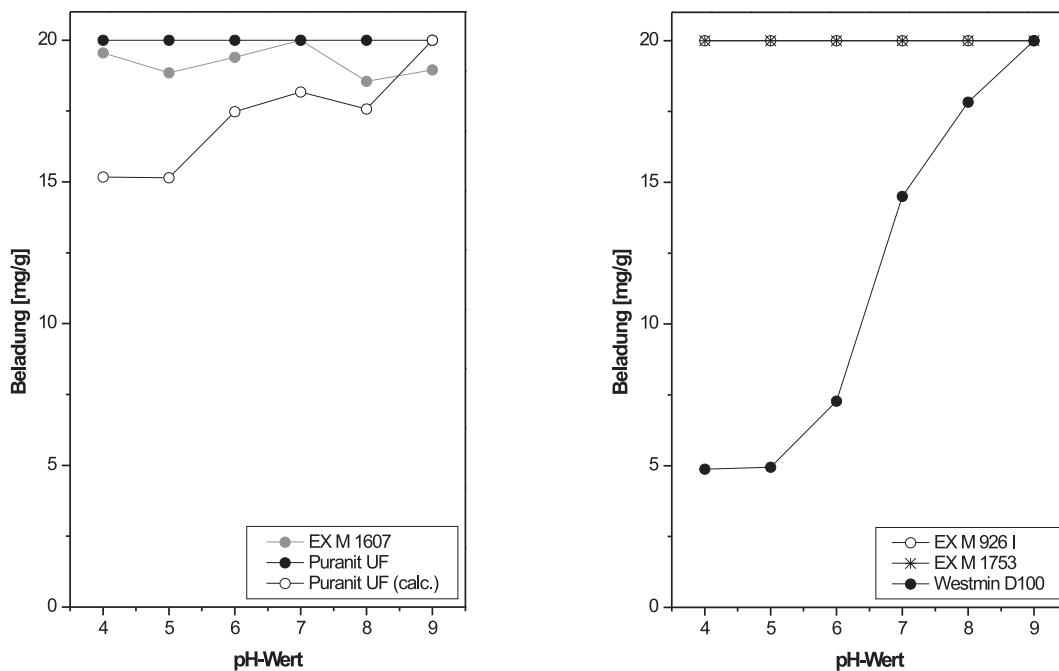


Abbildung 4.1: pH-Wert-abhängige Adsorption von α -Solanin an Tonminerale. Links: EX M 1607 (Montmorillonit/amorphes Silika), Puranit UF und Puranit UF in calcinierter Form. Rechts: EX M 926 I (Kerolit/Saponit), EX M 1753 (Saponit) und Westmin D100 (Talk). Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt. Die Anfangskonzentration von α -Solanin betrug je 0,1 mg/mL. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

Die Adsorption von α -Solanin an die beiden hydrophoberen Materialien EX M 1753 (Saponit) und EX M 926 I (Kerolit/Saponit) ist unabhängig vom pH-Wert (vergl. Abb. 4.1 rechts). Eine Erklärung für dieses Adsorptionsverhalten könnte, wie oben bereits angeführt, in der hydrophoben Struktur des Steroidanteils des Glykoalkaloids liegen. Eine Orientierung des α -Solaninmoleküls mit dem Steroidrest zur Oberfläche und Adsorption mittels hydrophober Wechselwirkungen ist denkbar. Durch Wasserstoffbrückenbindungen, welche aus dem Lewisbasencharakter der Oberflächensauerstoffatome resultieren, wird die Adsorption möglicherweise verstärkt. Bei EX M 1753 und EX M 926 I (Talk-Smektit-Mischphase) könnte so ein synergetischer Effekt zwischen der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und den hydrophoben Eigenschaften auftreten. Somit sind zwei unterschiedliche Eigenschaften des α -Solaninmoleküls an der Adsorption beteiligt. Mit dieser Annahme ließe sich die relativ hohe, pH-Wert-unabhängige Adsorptionskapazität dieser beiden Tonminerale für α -Solanin erklären. Da es sich bei diesen beiden Materialien um Smektite handelt (permanente negative Schichtladung), besteht auch die Möglichkeit elektrostatischer Wechselwirkungen.

Die Adsorption von α -Solanin an EM M 1607 (Montmorillonit/amorphes Silika) und Puranit UF (Montmorillonit) ist ebenfalls weitestgehend unabhängig vom pH-Wert. Diese beiden Adsorbentien sind im Vergleich zu EX M 926 I und EX M 1753 wenig hydrophob und gehen als oktaedrisch substituierte Smektite vermutlich schwächere Wasserstoffbrückenbindungen ein, als EX M 1753 (Saponit) oder EX M 926 I (Kerolit/Saponit). Offensichtlich ist also auch die negative Schichtladung bei der Adsorption von α -Solanin von hoher Relevanz.

Die Adsorption an Westmin D100 zeigt eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert. Westmin D100 verfügt als Talk im Gegensatz zu den anderen Tonmineralen über keine permanente negative Schichtladung (vergl. Tab. 4.1). Wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, zeigen viele Tonminerale zwar eine pH-Wert-abhängige Ladung der Kanten, welche aus der Protonierung und Deprotonierung bei niedrigeren bzw. höheren pH-Werten resultiert, diese Ladung ist bei der Adsorption allerdings zu vernachlässigen. Auch die Oberfläche des Talks verfügt über wenige OH-Gruppen. Die Zunahme der Adsorptionskapazität für α -Solanin an den Talk bei zunehmendem pH-Wert lässt sich vermutlich mit dem neutralen Ladungszustand von α -Solanin erklären. Während das Glykoalkaloid bei sauren pH-Werten protoniert wird, liegt es ab neutralen pH-Werten unprotoniert vor und ist somit unpolarer. Daraus resultiert das Auftreten von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen α -Solanin

und der relativ hydrophoben Talkoberfläche. Neutrale Tonminerale (Talk, Pyrophyllit) weisen allgemein eine stärker ausgeprägter Hydrophobizität als geladene Tonminerale (Smektite) auf [182,183].

Die Adsorption von α -Solanin an den calcinierten Puranit UF zeigt sich im Gegensatz zum uncalcinierten Puranit UF schwach pH-Wert-abhängig. Eine Calcinierung kann eine Reduzierung der Kationenaustauschkapazität zur Folge haben [184]. Ein Einfluss auf die Adsorption von α -Solanin ist vorstellbar, so dass sich die Adsorption von der des uncalcinierten Materials unterscheidet.

Ausgehend von den experimentellen Daten sind Tonminerale mit einer negativen Ladung und hydrophoben Eigenschaften sowie der Möglichkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, geeignet, α -Solanin unabhängig vom pH-Wert der Umgebung aus wässrigen Medien zu adsorbieren. Die trifft auf die Materialien Puranit UF, EX M 1607, EX M 1753 und EX M 926 I zu.

4.1.2 Adsorption von α -Solanin an synthetische Hydrotalcite

Als Vergleichssystem wurde die Adsorption von α -Solanin an synthetische Hydrotalcite untersucht. Aus dem strukturellen Aufbau von Hydrotalciten (siehe Abschnitt 2.2.1) resultiert eine positive Schichtladung. Abbildung 4.2 (s. folgende Seite) zeigt die Ergebnisse der pH-Wert-abhängigen Adsorption von α -Solanin an die Adsorbentien EX M 1994 und Synthal 696 im pH-Bereich von 5-9. In Tabelle 4.2 ist die Veränderung des Zetapotentials in Abhängigkeit vom pH-Wert der umgebenden Lösung von Synthal 696 dargestellt.

Die Adsorption von α -Solanin an die beiden synthetischen Hydrotalcite Synthal 696 und EX M 1994 weist eine ähnlich starke Abhängigkeit vom pH-Wert auf, wie die Adsorption an Talk. Mit steigendem pH-Wert ist eine Zunahme der Adsorptionskapazität zu verzeichnen. Die tertiäre Aminogruppe des Glykoalkaloids liegt bei sauren pH-Werten protoniert vor. Auf Grund dieser Tatsache ist als Erklärung für die relativ geringe Adsorptionskapazität bei niedrigen pH-Werten von einer Repulsion zwischen der permanent positiv geladenen Hydrotalcitoberfläche und dem protonierten α -Solanin auszugehen. Ab pH 7 ist bei beiden untersuchten Hydrotalciten ein Anstieg der Adsorptionskapazität

festzustellen. Bei neutralem pH-Wert liegt die tertiäre Aminogruppe des α -Solaminmoleküls nicht protoniert vor, wodurch eine Abnahme der Repulsion und somit eine Zunahme der Adsorption auftreten kann.

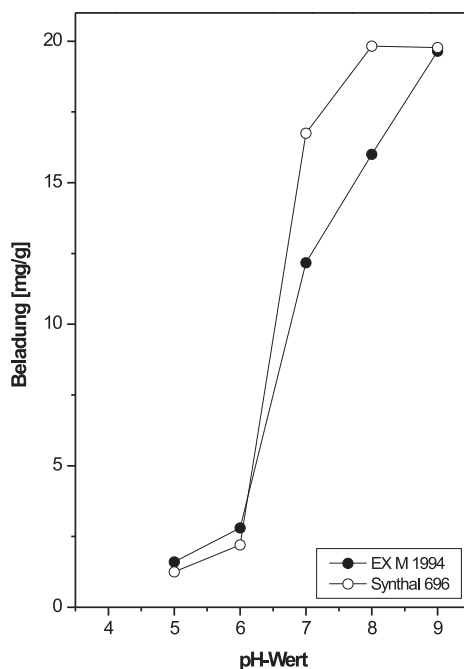


Abbildung 4.2: pH-Wert-abhängige Adsorption von α -Solamin an synthetische Hydrotalcite (EX M 1994 und Synthal 696). Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt, die Anfangskonzentration von α -Solamin betrug je 0,1 mg/mL. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

Tabelle 4.2: Zetapotentiale von Synthal 696 zwischen pH 6-11. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung) Die Messungen wurden bei der Surfay Nanotec GmbH durchgeführt.

pH	Zetapotenzial (mV)
6	+38,5 ± 1,5
7	+36,8 ± 2,2
8	+33,7 ± 0,9
9	+30,3 ± 0,2
10	+21,4 ± 1,5
11	-1,7 ± 5,8

In Tabelle 4.2 ist das Zetapotential von Synthal 696 in Abhängigkeit von pH-Wert dargestellt. Mit einer Zunahme des pH-Wertes kann eine Abnahme des Zetapotentials festgestellt werden. Durch die Verringerung der positiven Ladung wird die Adsorption von α -Solanin offensichtlich begünstigt. Bei dem Hydrotalcit EX M 1994 kann von einem ähnlichen Verhalten des Zetapotentials in Abhängigkeit vom pH-Wert ausgegangen werden. Wie Tonminerale verfügen Hydrotalcite über OH-Gruppen, welche bei höheren pH-Werten deprotoniert werden können. So könnten die hohen Adsorptionskapazitäten für α -Solanin bei pH 8 und pH 9 erklärt werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen erscheinen die synthetischen Hydrotalcite weniger gut geeignet, um Glykoalkaloide aus Kartoffelfruchtwasser abzureichern. Für eine Adsorption wäre im Fall der Hydrotalcite eine Einstellung der pH-Wertes des KFW auf pH 9 notwendig.

4.2 Moleküldynamik-Simulation zur α -Solaninadsorption

Die Moleküldynamik-Simulation wurde von der CAM-D Technologies GmbH durchgeführt. Dabei wurde die zeitliche Entwicklung (Dynamik) durch Lösen der Newtonschen Bewegungsgleichungen bestimmt. Die Parameter für α -Solanin und die Schichtsilikatmodelloberflächen stammen aus dem Kraftfeld COMPASS [185]. Das COMPASS-Kraftfeld dient der Berechnung aller inter- und intramolekularen Wechselwirkungen. Es wurde im NVT-Ensemble simuliert, wobei NVT bedeutet, dass die Anzahl der Teilchen, das Volumen des Systems und die Temperatur während der Simulation konstant sind. Zunächst wurden die Systeme 100 ps bis zum Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts simuliert. Im thermodynamischen Gleichgewicht war die Gesamtenergie als Summe der kinetischen und potentiellen Energie über 50 ps konstant. Anschließend wurde, ebenfalls im NVT-Ensemble, weitere 50 ps simuliert. Die Auswertungen bezogen sich auf die Simulation dieser letzten 50 ps im thermodynamischen Gleichgewicht. Bei der Berechnung der Molekülgröße des α -Solanins (Ausdehnung des Moleküls entlang der Hauptträgheitsachsen) wurde mit der Molekülmechanik-Methode und dem COMPASS-Kraftfeld die molekulare Struktur bei der minimalen potentiellen Energie ermittelt [186,187].

Unter der Annahme, dass die Oberflächenladung von Schichtsilikaten einen wesentlichen Einfluss auf die Adsorption von α -Solanin ausübt, wurden unterschiedlich geladene Modelloberflächen simuliert. Durch die Variation der Ladung der Mg-Atome wurden im Modell eine neutrale eine positive und eine negative Oberflächenladung für die Kraftfeldrechnung verwendet, wobei die positiv geladene Oberfläche real nicht existiert:

- Positive Oberfläche: Mg = + 3,6
- Neutrale Oberfläche: Mg = + 1,8
- Negative Oberfläche: Mg = 0

Die Ausdehnung der Modelloberflächen wurde bei 4 x 4 x 0,8 nm festgelegt. Die Dicke der Modelloberflächen wurde so gewählt, so dass zwei durch Mg verbundene Schichteinheiten berücksichtigt werden. Für jede Modelloberfläche wurde eine Simulation bis zum thermodynamischen Gleichgewicht durchgeführt. Die Simulationen erfolgten bei neutralem pH-Wert. In Tabelle 4.3 sind die zur Simulation angenommenen Parameter dargestellt. Abbildung 4.3 zeigt die Orientierung von α -Solaninmolekülen zur Schichtsilikatoberfläche nach der Moleküldynamik-Simulation.

Tabelle 4.3: Parameter der Moleküldynamik-Simulation.

Temperatur	298 K
Zeitbereich	50 ps
Boxvolumen	4 x 4 x 6 nm (96 nm ³)
Dichte	1 g/cm ³
Integrationszeitschritt	1 fs
Kraftfeld	COMPASS [185]
Computer	64 CPU-Linux-Cluster
Simulationsprogramme	NAMD, LAMMPS [186,187]

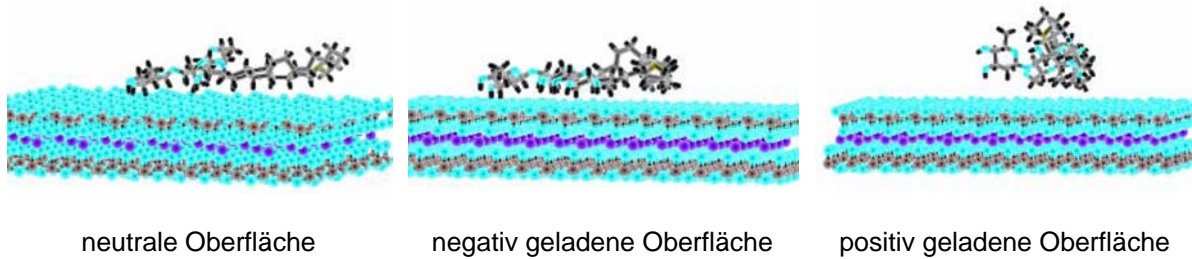


Abbildung 4.3: Orientierung von α -Solanin zur Talk-Oberfläche nach der Moleküldynamik-Simulation. Violett: Mg-Atome, hellblau: O-Atome, grau: Si-Atome. Wassermoleküle sind aufgrund der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

Ausgehend von der Simulation wurden die potentiellen Adsorptionsenergien kalkuliert. Die Adsorptionsenergien berechnen sich durch $E_{(\text{Bulk})} - E_{(\text{Ads})}$. $E_{(\text{Bulk})}$ bezeichnet die potentielle Energie des α -Solanins in der Wasserphase bei unendlichem Abstand zur Oberfläche. Zur Vergleichbarkeit der Adsorption an die drei unterschiedlich geladenen Oberflächen, bei welchen $E_{(\text{Bulk})}$ jeweils gleich ist, wurde die mittlere potentielle Energie des resultierenden Adsorbats an der Oberfläche ausgewertet. In Abbildung 4.4 sind die mittleren berechneten potentiellen Adsorptionsenergien ($E_{(\text{Ads})}$) dargestellt.

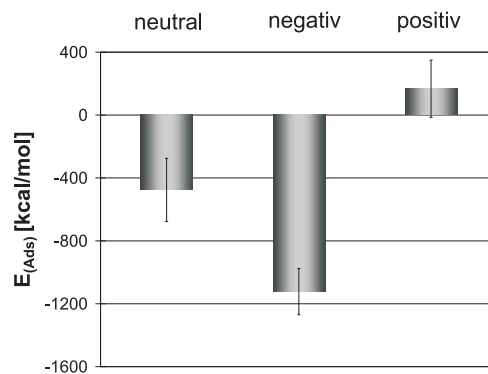


Abbildung 4.4: Mittlere, auf der Simulation basierende berechnete potentielle Adsorptionsenergien [kcal/mol] von α -Solanin bei einer neutralen, einer negativ geladenen und einer positiv geladenen Schichtsilikatoberfläche.

Die Ergebnisse der Simulation lassen folgende Schlussfolgerungen zu: Bei der neutralen und negativen Oberfläche ist von einer negativen Adsorptionsenergie auszugehen. Die

Bindung erfolgt vermutlich unter Einbeziehung von Wasserstoffbrückenbindungen. An der negativen Oberfläche ist der Abstand des N-Atoms zur Oberfläche etwas größer. Die hydrophoben Ringe sind bei der neutralen Oberfläche mehr planar zur Oberfläche orientiert, während sie im Fall der negativen Oberfläche etwas mehr senkrecht stehen. Die Adsorption an eine negative Schichtsilikatoberfläche ist im Vergleich zu der Adsorption an eine neutrale Oberfläche stärker, wobei sich eine stabile gestreckte und weitgehend planar zur Oberfläche orientierte Struktur des α -Solanins ausbildet. Für die positiv geladene Modelloberfläche wurde eine positive Adsorptionsenergie berechnet. Resultierend daraus sollte keine Adsorption auftreten.

Die aus Kraftfeldrechnungen gezogenen Schlussfolgerungen decken sich weitestgehend mit den experimentellen Ergebnissen. Bei pH 7 (siehe Tabelle 4.4) kann tendenziell ein Anstieg der Adsorptionskapazität mit sinkender Ladung der Oberflächen beobachtet werden. Zu berücksichtigen sind besonders bei Westmin D100, EX M 926 I und EX M 1753 mögliche hydrophobe Interaktionen. Bei EX M 1753 und EX M 926 I ist darüber hinaus das Auftreten von van-der-Waals-Kräften begünstigt, welche wie auch die hydrophoben Interaktionen in die Kraftfeldrechnung nicht einbezogen wurden.

Tabelle 4.4: Beladung der untersuchten Adsorbentien mit α -Solanin bei pH 7. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

	Beladung mit α-Solanin bei pH 7 [mg/g]
Puranit UF	20,00
Puranit UF calc.	18,18
EX M 1607	20,00
EX M 1753	20,00
EX M 926 I	20,00
Westmin D100	14,50
Synthal 696	16,75
EX M 1994	12,18

Eine Moleküldynamik-Simulation kann zur Erklärung von Adsorptionsereignissen auf Oberflächen herangezogen werden. Die oben beschriebene Simulation wurde allerdings bei pH 7 durchgeführt. Simulationen bei weiteren pH-Werten wären sinnvoll. So kann die

Simulation als Unterstützung zur Erklärung der experimentell festgestellten Daten betrachtet werden.

4.3 Adsorptionsisothermen

Die Aufnahme von Adsorptionsisothermen analog zu den Proteinadsorptionsisothermen war im Fall von α -Solanin nicht möglich. α -Solanin weist eine geringe Löslichkeit in wässrigen Medien auf [181]. Aus diesem Grund konnte keine wässrige α -Solanin-Lösung mit einer Konzentration größer als ca. 0,5 mg/mL hergestellt werden. Alternativ wurde eine definierte Menge Adsorbens schrittweise mit jeweils dem gleichen Volumen einer α -Solaninlösung gleicher Konzentration inkubiert. Die Durchführung erfolgte analog zu 7.2.7. Anschließend wurde nach Zentrifugation anhand der verbliebenen α -Solanin-Konzentration im Überstand die adsorbierte Menge des Glykoalkaloids bestimmt (HPLC-Methode siehe 7.2.10). Die schrittweise Beladung wurde sieben Mal durchgeführt, so dass bei jedem Adsorptionsschritt prinzipiell ein weiteres Milligramm des Glykoalkaloids an die definierte Menge Adsorbens gebunden werden konnte. Zur Adsorption wurde beim calcinierten Puranit UF pH 9 gewählt, denn bei der pH-Wert-abhängigen Adsorption in Abschnitt 4.1.1 konnte für dieses Material bei pH 9 die höchste Adsorptionskapazität für α -Solanin festgestellt werden. Da beim Puranit UF keine Abhängigkeit der Adsorption vom pH-Wert festgestellt wurde, wurde in Hinblick auf eine spätere Verwendung dieses Materials zur Abreicherung von Glykoalkaloiden aus Kartoffelfruchtwasser pH 6 gewählt, was dem ungefähren pH-Wert des KFW entspricht. Die aufgenommenen Adsorptionsisothermen sind in Abbildung 4.5 auf der folgenden Seite dargestellt.

Für den nicht calcinierten Puranit UF kann eine Adsorptionskapazität von etwa 200 mg/g abgeschätzt werden. Der calcinierte Puranit UF weist eine wesentlich höhere Adsorptionskapazität auf. Anhand der ermittelten Daten konnte eine Kapazität von mindestens 700 mg/g festgestellt werden, welche darüber hinaus linear zunimmt. In der Literatur ist beschrieben, dass eine Calcinierung von Tonmineralen prinzipiell zu einer Vergrößerung der spezifischen Oberfläche führen kann [188].

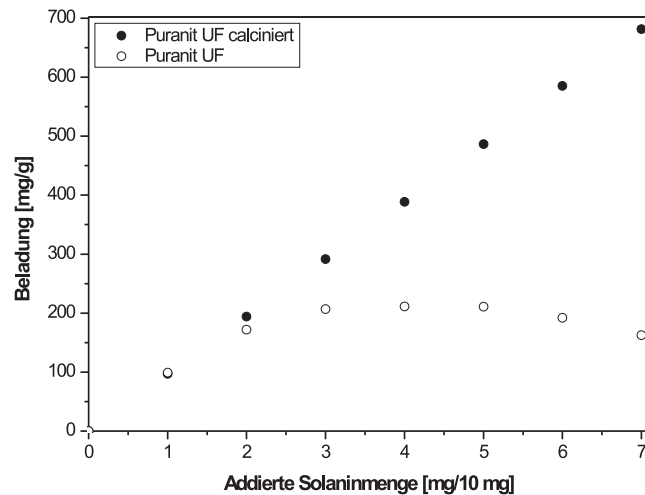


Abbildung 4.5: Adsorption von α -Solanin an Puranit UF und Puranit UF calciniert in Abhängigkeit von der sukzessive zugegebenen Solaninmenge. Die Adsorption erfolgte in 50 mM Puffer (MES, pH 6 bei Puranit UF, Tris, pH 9 bei Puranit UF calciniert). (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

Beim Puranit UF wurde die Calciniierung allerdings bei 700 °C durchgeführt, und es ist bekannt, dass eine Erhitzung auf über 500 °C bei diesem Smektit zu einer Verringerung der Porosität und zu einer Verkleinerung der spezifischen Oberfläche führt. Eine Interpretationsmöglichkeit für das experimentell festgestellte Adsorptionsverhalten resultiert aus einer Kondensation von Resten von freien OH-Gruppen auf der Tonmineraloberfläche, so dass die Oberfläche hydrophober wird. Als Konsequenz wären zunehmende hydrophobe Interaktionen mit dem Glykoalkaloid als Ursache für die hohe Adsorptionskapazität denkbar. Eine genaue Erklärung dieses Adsorptionsverhaltens ist ausgehend von den vorliegenden Informationen allerdings nicht möglich.

Für eine Abreicherung von GA aus KFW wäre der Einsatz eines calcinierten Tonminerals von Vorteil. So könnte im Vergleich zu einem uncalcinierten mineralischen Adsorbens mit der gleichen Menge des calcinierten Materials die Glykoalkaloide aus einem größeren Volumen KFW abgereichert werden.

4.4 Zeitabhängigkeit der Adsorption

Die Adsorption in Abhängigkeit von der Zeit wurde analog zu 4.1 durchgeführt. Eine definierte Menge Adsorbens wurde mit einem definierten Volumen einer gepufferten α -Solaninlösung bekannter Konzentration unter Schütteln für festgelegte Zeitintervalle inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Material abzentrifugiert und anhand der verbliebenen α -Solaninkonzentration im Überstand die adsorbierte α -Solaninmenge mittels HPLC-Analytik (s. Anhang, Abschnitt 7.3.3) bestimmt. Die Durchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.2.7) zu entnehmen. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. In Abbildung 4.6 ist die Adsorption in Abhängigkeit von der Inkubationszeit an EX M 1607, Puranit UF, Puranit UF calciniert, EX M 1994 und Westmin D100 dargestellt. Tabelle 4.5 zeigt die prozentuale Adsorption nach 5 Minuten und nach 24 Stunden im Vergleich.

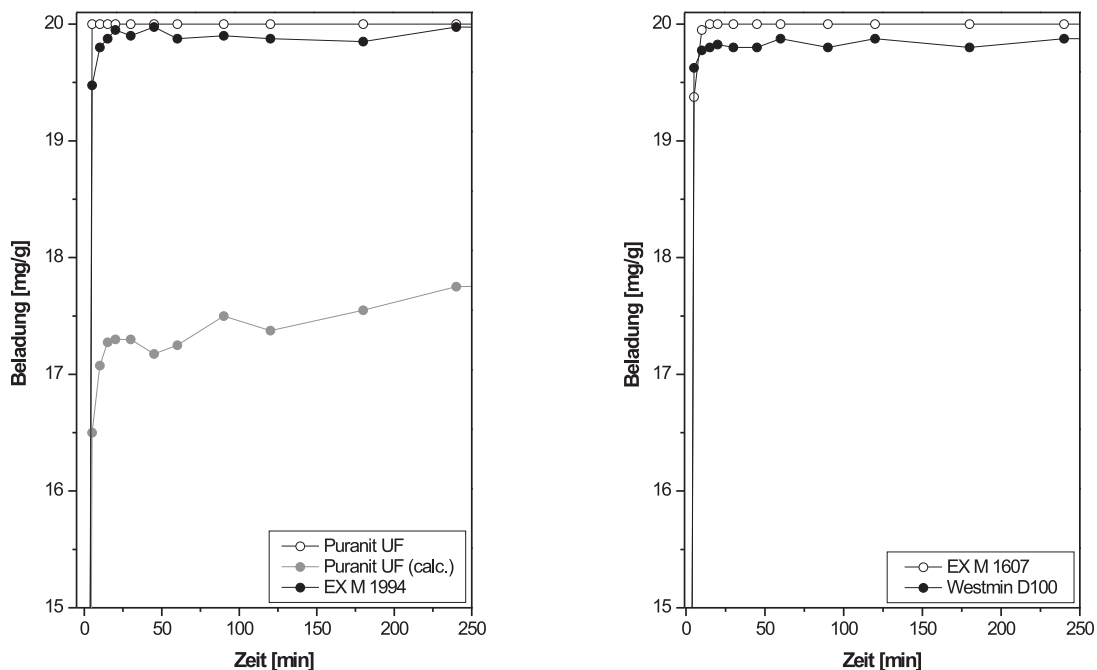


Abbildung 4.6: Zeitabhängigkeit der Adsorption von α -Solanin. Links: Puranit UF, Puranit UF calciniert und EX M 1994, rechts: EX M 1607 und Westmin D100. Die Adsorption wurde bei Puranit UF bei pH 6 (50 mM MES), bei allen anderen Adsorbentien bei pH 9 (50 mM Tris) durchgeführt. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

Tabelle 4.5: Adsorption von α -Solanin an unterschiedliche Adsorbentien nach 5 Minuten Inkubationszeit. Als maximale Adsorption wurde die adsorbierte Menge α -Solanin nach 24 Stunden angenommen. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

	Adsorption nach 5 Minuten		Adsorption nach 24 Stunden [mg/g]
	[mg/g]	[%]	
Puranit UF	20,00	100	20,00
Puranit UF calciniert	16,50	91	18,05
EX M 1607	19,38	97	20,00
Westmin D100	19,63	99	19,85
EX M 1994	19,48	98	19,89

Alle der untersuchten Adsorbentien zeigen nach bereits 5 Minuten einen Adsorptionswert, welcher etwa 91-100 % der maximalen Adsorption entspricht. Als maximale Adsorption wurde die Kapazität angenommen, die unter den gleichen Bedingungen nach 24 Stunden festgestellt wurde (vergl. Tabelle 4.5). Anhand dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass alle der untersuchten Adsorbentien aufgrund der Adsorptionskinetiken für α -Solanin eine prinzipielle Eignung aufweisen, GA aus KFW abzureichern.

4.5 Desorption

Basierend auf der potentiellen Einsatzmöglichkeit von α -Solanin und α -Chaconin für pharmazeutische Zwecke (siehe Abschnitt 2.6.2) sollte am Beispiel von α -Solanin untersucht werden, inwieweit eine Desorption nach erfolgter Adsorption an unterschiedliche anorganische Adsorbentien möglich ist. Dazu wurde α -Solanin analog zu 4.1 mit den Materialien inkubiert und anschließend die adsorbierte α -Solaninmenge bestimmt (Durchführung s. Abschnitt 7.2.9). Nachfolgend wurden die Desorptionseigenschaften unterschiedlicher Lösungsmittel und Additive getestet, indem das mit dem Glykoalkaloid beladene Adsorbens mit unterschiedlichen Lösungsmitteln resuspendiert und wiederholt inkubiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde im Überstand die α -Solanin-Konzentration zur Berechnung der desorbierten Glykoalkaloidmenge mittels HPLC-Analytik nach der Methode von Alt et al. (2005) [119] (s. Anhang, Abschnitt 7.3.3) bestimmt.

Ausgehend von der Tatsache, dass bei der HPLC-Analytik von α -Solanin eine Elution mittels Acetonitril erfolgt, wurden im Fall der anorganischen Adsorbentien zur Desorption unterschiedliche unpolare Lösungsmittel untersucht. Es ist zudem in der Literatur beschrieben, dass Alkohole z. B. die Adsorption von Proteinen an Tonminerale verringern [189]. Ein verringernder Effekt auf die Adsorption von α -Solanin ist daher denkbar. Anhand der Ergebnisse der pH-Wert-abhängigen Adsorption und der Moleküldynamik-Simulation scheint α -Solanin neben anderen Wechselwirkungen mittels Wasserstoffbrückenbindungen von Tonmineralen und Hydrotalciten adsorbiert zu werden. Dabei sind die OH-Gruppen der Zuckerreste des Glykoalkaloids von Bedeutung. Aufgrund dieser Tatsache soll untersucht werden, inwieweit eine kompetitive Desorption mit Verbindungen, die selbst über OH-Gruppen verfügen, möglich ist. Zur Desorption wurden Methanol, Ethanol, 2-Propanol, 1-Butanol, Acetonitril, Aceton sowie Hexan und Glykol in Ethanol (20 % und 40 %) verwendet. In Abbildung 4.7 sind die Desorptionseigenschaften der unterschiedlichen Lösungsmittel dargestellt.

Bei den Adsorbentien, bei welchen eine pH-Wert-unabhängige Adsorption festgestellt wurde (vergl. 4.1), scheint die Adsorption von α -Solanin irreversibel zu sein. Keines der verwendeten unpolaren Lösungsmittel konnte eine signifikante Desorption von α -Solanin bei den Tonmineralen EX M 926 I (Kerolit/Saponit), EX M 1607 (Montmorillonit/amorphes Silika) und Puranit UF (Montmorillonit) hervorrufen. Von Interkalationseffekten als Erklärung für die nahezu irreversible Adsorption ist bei EX M 1607 und EX M 926 I nicht auszugehen, denn sowohl EX M 1607 als auch EX M 926 I liegen fast komplett delaminiert vor, so dass kaum Möglichkeit zur Einlagerung in die Zwischenräume zusammen liegender Plättchen besteht. Die Adsorption findet daher lediglich an den Oberflächen der smektitischen Plättchen statt. Vermutlich resultiert die starke Bindung des Glykoalkaloids aus Ladungswechselwirkungen durch eine Protonierung der tertiären Aminogruppe des α -Solanins sowie aus starken Van-der-Waals-Kräften. Eine partielle Desorption konnte bei diesen Materialien mittels Glykol in Ethanol erreicht werden. Ein Verdrängungseffekt als Konsequenz von Wechselwirkungen der OH-Gruppen mit der Adsorbensoberfläche könnte dabei relevant sein.

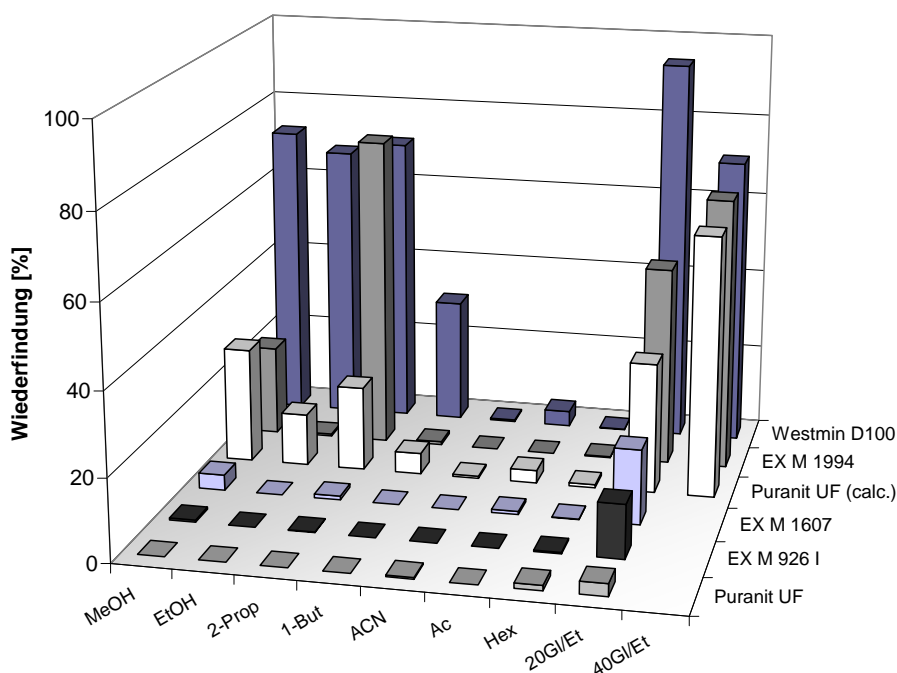


Abbildung 4.7: Anteile von desorbiertem α -Solanin in Prozent von der adsorbierten Menge. Hundert Prozent Adsorption entsprechen 20 mg/g. Abkürzungen in der Graphik: MeOH: Methanol, EtOH: Ethanol, 2-Prop: 2-Propanol, 1-But: 1-Butanol, ACN: Acetonitril, Ac: Aceton, Hex: n-Hexan, 20 GL/Et: 20 % Glykol in Ethanol, 40Gl/Et: 40 % Glykol in Ethanol. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

Westmin D100 (Talk, ungeladen), EX M 1994 (synthetischer Hydrotalcit) und das calcinierte Puranit UF (Montmorillonit) adsorbieren α -Solanin laut der Ergebnisse unter Abschnitt 4.1 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Bei diesen Materialien konnte z. T. eine Reversibilität der Adsorption festgestellt werden. Allgemein ist der Desorptionseffekt der Alkohole Methanol, Ethanol und Propanol am stärksten ausgeprägt. Butanol übt beim Westmin D100 ebenfalls einen deutlichen Desorptionseffekt aus. Die Adsorption an diese Materialien erfolgt aufgrund geringerer bzw. fehlender elektrostatischer Wechselwirkungen weniger stark. Im Fall von Westmin D100 wird die Adsorption wahrscheinlich nur durch hydrophobe Wechselwirkungen ausgelöst, und die Desorption der schwächer gebundenen Glykoalkaloidmoleküle ist mit einem geeigneten Lösungsmittel möglich. Die Desorption beruht möglicherweise auf einem Verdrängungseffekt von α -Solanin durch Alkoholmoleküle bzw. Glykol (OH-Gruppen). Aceton, Acetonitril und Hexan zeigten bei keinem der untersuchten Materialien einen desorbierenden Effekt.

4.6 Zusammenfassung

Anhand der Ergebnisse dieses Kapitels lassen sich folgende Aussagen bezüglich der Wechselwirkungen von α -Solanin mit Tonmineralen und synthetischen Hydrotalciten treffen:

- Bei der Adsorption von α -Solanin an Tonminerale und synthetische Hydrotalcite sind unterschiedliche Wechselwirkungen wie hydrophobe Interaktionen, Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische Wechselwirkungen von Bedeutung.
- Eine negative Schichtladung ist bei der Adsorption von α -Solanin von besonderer Relevanz.
- Die Adsorption an positiv geladene Oberflächen findet nicht oder nur in sehr geringem Maße statt.
- Die experimentell ermittelten Daten decken sich mit den Ergebnissen einer Moleküldynamik-Simulation.
- Sowohl Tonminerale als auch synthetische Hydrotalcite weisen sehr kurze Bindungszeiten für α -Solanin auf.
- Eine teilweise Desorption ist mit Glykol, Methanol, Ethanol oder Propanol möglich, was die Grundlage für eine Wiedergewinnung adsorbierter Glykoalkaloide darstellt.

5 Separation von Inhaltsstoffen des KFW

Wie in der Einleitung angeführt, könnten Patatine und Protease-Inhibitoren mit reduziertem Glykoalkaloid-Gehalt in ihrer funktionellen Form isoliert in der Lebensmittelindustrie bzw. im Bereich Functional Food Verwendung finden. Es existieren unterschiedliche Ansätze, die Proteinfractionen des Kartoffelfruchtwassers zu separieren. Dazu gehört die Isolierung von Patatin mittels ConA-Sepharose kombiniert mit einem Chromatographieschritt an DEAE-Sepharose nach Racusen und Foote (1980) [180]. Dieses Verfahren wird häufig zur Patatinisolierung im Labormaßstab herangezogen [95,99,102]. Eine Methode um ein Gesamtproteinisolat, welches sowohl Patatine als auch Protease-Inhibitoren enthält, mit reduzierten Glykoalkaloidkonzentration zu erhalten, besteht in der Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen [93]. Diese Methode ist im Technikumsmaßstab durchführbar. Darüber hinaus kann die Separation der Proteine des Kartoffelfruchtwassers mittels Ionentauschermembranen erfolgen. Dabei wird Patatin an eine Q-Membran gebunden, während die Protease-Inhibitoren an eine S-Membran gebunden werden. Im Anschluss erfolgt eine separate Elution der Proteinfractionen [191,192]. Diese Methode eignet sich sowohl für den Labormaßstab als auch für größere Maßstäbe. Darüber hinaus ist die Bindung von Glykoalkaloiden aus Kartoffelfruchtwasser mittels Festphasenextraktionsmaterialien (C18) im Labormaßstab beschrieben [193].

Als Nachteile dieser Methoden für die Anwendung in größeren Maßstäben sind die z. T. relativ hohen Kosten für die chromatographischen Medien (z. B. ConA-Sepharose) zu nennen. Zudem ist die Proteinseparation nicht mit einer Glykoalkaloidabreicherung verbunden und müsste in einem zusätzlichen Schritt erfolgen.

Ausgehend von den in Kapitel 3 und 4 beschriebenen Ergebnissen soll in diesem Kapitel unter Verwendung anorganischer Adsorbentien eine Separation der Proteine des Kartoffelfruchtwassers (Patine und Protease-Inhibitoren) in Kombination mit einer Abreicherung der toxischen Glykoalkaloide untersucht werden. Analog zu dem Membranprozess, bei welchem die Patatine an eine Q-Membran gebunden werden und die Protease-Inhibitoren an eine S-Membran, soll die Anwendbarkeit von smektitischen Tonmineralen mit hoher negativer Oberflächenladung (als Kationentauscher) und positiv geladenen Hydrotalciten (als Anionentauscher) für eine Separation der Kartoffelproteine

untersucht werden. Die Proteinseparation soll in einem Schritt zusammen mit einer Anreicherung der Glykoalkaloide erfolgen.

5.1 Vorversuche zur Proteinseparation

5.1.1 Selektive Adsorption von Kartoffelproteinen

In Vorversuchen wurde die selektive Adsorption der Proteine des KFW unter statischen Bedingungen qualitativ untersucht. Als Adsorbentien wurden EX M 1607 (Montmorillonit/amorphes Silika) und Puranit UF (Montmorillonit) herangezogen, welche in den vorangegangenen Versuchen im Modellsystem (vergl. Abschnitt 3.3) als geeignet bewertet wurden. Zwar kann Puranit UF aufgrund der starken Quellung nicht in Säulen verwendet werden, der Einsatz im Batch-Verfahren aber wäre denkbar.

Der IEP der Patatine liegt zwischen 4,6 und 5,2 [92,194], während die IEP der Protease-Inhibitoren im Bereich zwischen 5,1 und 9,0 [90] liegen. Da sich die IEP der beiden zu separierenden Proteinfractionen unterscheiden, kann eine vom pH-Wert abhängige selektive Adsorption einzelner Fraktionen angenommen werden. Zur Untersuchung der Adsorption im pH-Bereich zwischen 4 und 9 wurde eine festgelegte Menge des jeweiligen Tonminerals equilibriert und mit einem definierten Volumen gepuffertem KFW in einem Überkopfmischer für eine Stunde inkubiert. Zur Einstellung der pH-Werte wurde Acetat für pH 4 und pH 5, MES für pH 6, HEPES für pH 7 und Tris für pH 8 und pH 9 verwendet. Nach erfolgter Inkubation und Zentrifugation wurden Aliquots der Überstände einer SDS-PAGE unterzogen. Die Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 7.2.8 beschrieben. Abbildung 5.1 zeigt die SDS-PAGE-Gele von KFW nach Adsorption an EX M 1607 und Puranit UF bei pH 4-9.

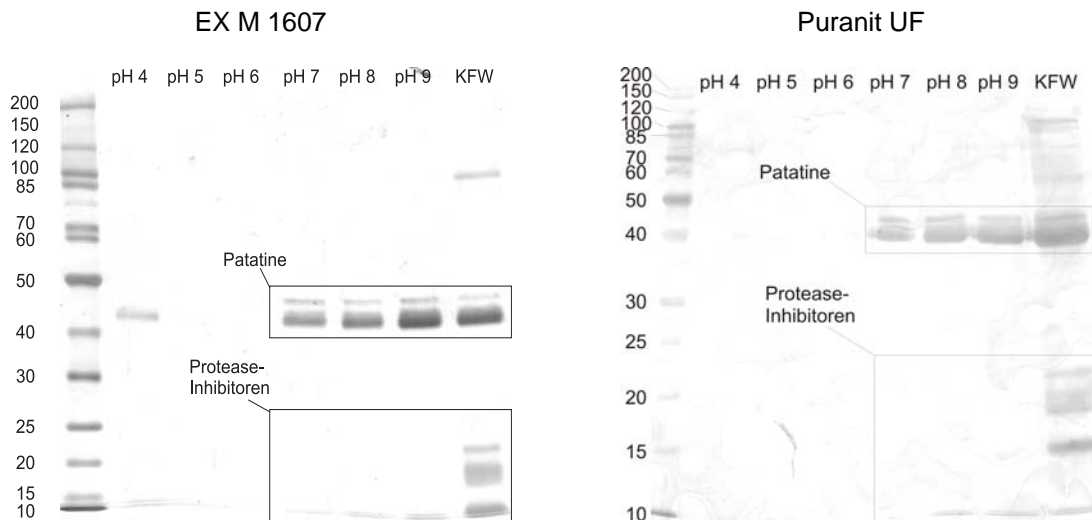


Abbildung 5.1: SDS-PAGE-Gele der Überstände nach der Adsorption von KFW an EX M 1607 (links) und Puranit UF (rechts) bei pH 4-9. (12 %ige Gele, Silberfärbung)

Bei pH 4-6 erfolgte bei den Materialien eine Adsorption beider Proteinfraaktionen. In diesem pH-Wertbereich weisen die Protease-Inhibitoren mit IEP zwischen 5,1 und 9,0 eine positive Nettoladung bzw. einen neutralen Ladungszustand auf und können elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Smektiten eingehen. Zum anderen sind sekundäre Wechselwirkungen (wie in Abschnitt 3.3 beschrieben) möglich, woraus Interaktionen mit den Proteinen resultieren, die sich in einem neutralen Ladungszustand befinden. Die Patatine mit IEP zwischen 4,6-5,2 befinden sich bei pH 4-6 ebenfalls in einem neutralen Ladungszustand. Eine Adsorption kann analog zu den Protease-Inhibitoren mit niedrigeren IEP dennoch erfolgen, da vermutlich weitere Wechselwirkungen zu berücksichtigen sind (vergl. Abschnitt 3.3).

Im pH-Bereich zwischen 7 und 9 kann im Fall der Patatine von einer Repulsion ausgegangen werden (vergl. Abb. 5.1). Im Gegensatz dazu kann in diesem pH-Bereich eine selektive Adsorption der meisten Protease-Inhibitoren resultierend aus elektrostatischen Wechselwirkungen postuliert werden. Die IEP der Protease-Inhibitoren sind über einen relativ weiten pH-Wertbereich verteilt. Aus diesem Grund werden die Protease-Inhibitoren mit niedrigeren IEP basierend auf einer elektrostatischen Abstoßung nicht adsorbiert (wie auch die Patatine). Ausgehend von Tabelle 2.1 in Abschnitt 2.3.1 handelt es sich bei den Protease-Inhibitoren mit niedrigeren IEP um Proteine mit Molekulargewichten zwischen etwa 7 und 10,2 kDa (Protease-Inhibitor I und Protease-Inhibitor II) und mit etwa

20,1-22,8 kDa (einige der Cysteinyl-Protease-Inhibitoren). Auf den Gelen in Abbildung 5.1 erscheinen diese Protease-Inhibitoren auch bei pH 7-9. Das SDS-PAGE-Gel von Puranit UF zeigt weiterhin bei pH 7-9 die Protease-Inhibitoren-Fraktion bei etwa 20,1-22,8 kDa. Der größte Teil der Protease-Inhibitoren jedoch wird im Gegensatz zu den Patatinen zwischen pH 7-9 adsorbiert, was eine Grundlage für eine Separation darstellt.

Auch die höhermolekularen Proteine des KFW (Protein-Kinasen, Polyphenoloxidasen) werden wie die Protease-Inhibitoren bei pH 7-9 adsorbiert. Analoge Versuche wurden mit einigen anderen anorganischen Adsorbentien durchgeführt. Keines der Materialien eignet sich zur Separation der Kartoffelproteine. Zum Vergleich ist ein SDS-PAGE-Gel der Überstände nach einer Adsorption von KFW bei pH 4-9 an EX M 1753 im Anhang (Abschnitt 7.1.6) gezeigt. Dieses Material weist eine geringere negative Oberflächenladung auf, so dass andere Wechselwirkungen wie z. B. Wasserstoffbrückenbindungen zu einer Adsorption unabhängig vom pH-Wert führen.

5.1.2 Desorption

Anschließend an die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnitts wurde die Desorption der Protease-Inhibitoren unter statischen Bedingungen für Puranit UF qualitativ untersucht. Analog zu Abschnitt 5.1.1 wurde gepuffertes KFW bei pH 7-9 an Puranit UF adsorbiert. Nach Adsorption und Zentrifugation wurde ein Aliquot des Überstandes für die SDS-PAGE aufbewahrt. Das mit Protein beladene Adsorbens wurde zur Desorption in jeweils unterschiedlichen Puffern resuspendiert und wiederholt für eine Stunde inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden Aliquots der Überstände mittels SDS-PAGE untersucht. Die Durchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.2.8) zu entnehmen.

Anhand der Ergebnisse aus Abschnitt 3.4.6, in welchem die Desorption von Ovalbumin erfolgreich mit einem pH-Shift erfolgte, wurde die Desorption der Protease-Inhibitoren mit pH 10 und pH 11 (100 mM CAPS) und pH 12 (100 mM Phosphat) untersucht. In einer Publikation von Buttersack et al. (1994) [170] ist die Desorption von Proteinen aus Zuckerrübendicksaft nach Adsorption an Bentonite mittels Polyethylenglykol (PEG) beschrieben. Ausgehend von diesen Daten wurde außerdem die Desorption mittels einer Zugabe von PEG 200 zum Desorptionspuffer untersucht. Abbildung 5.2 und 5.3 zeigen die

SDS-PAGE-Gele der Fraktionen nach Adsorption und Desorption an Puranit UF (Montmorillonit).

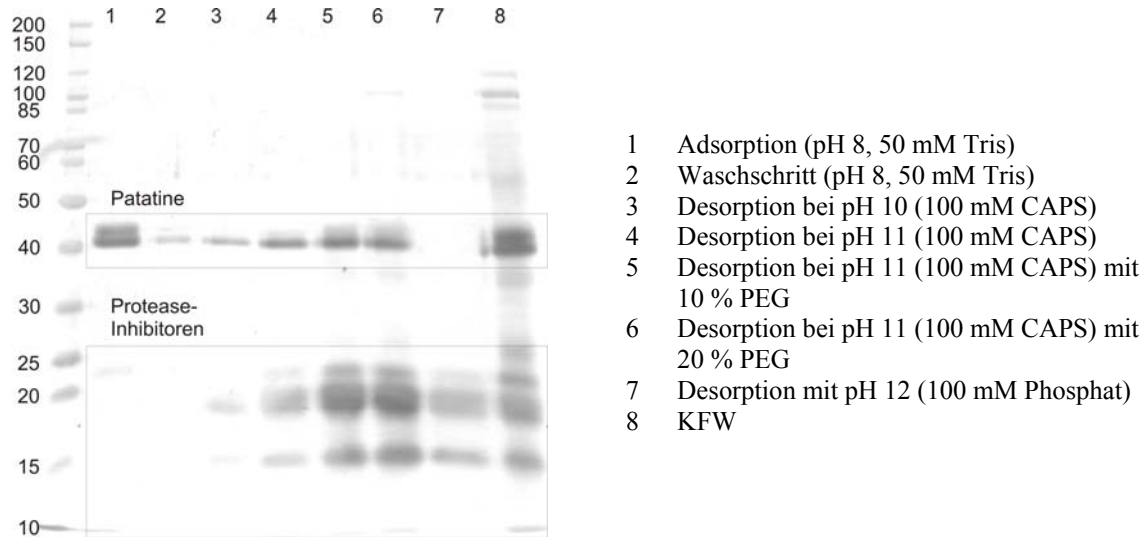


Abbildung 5.2: Desorption der Kartoffelproteine. Die Adsorption an Puranit UF wurde bei pH 8 in 50 mM Tris durchgeführt (Bahn 1). Nach einem Waschschrift bei pH 8 in 50 mM Tris (Bahn 2) erfolgte die Desorption mittels unterschiedlicher Puffer (Bahnen 3-7). (12 %iges Gel, Silberfärbung)

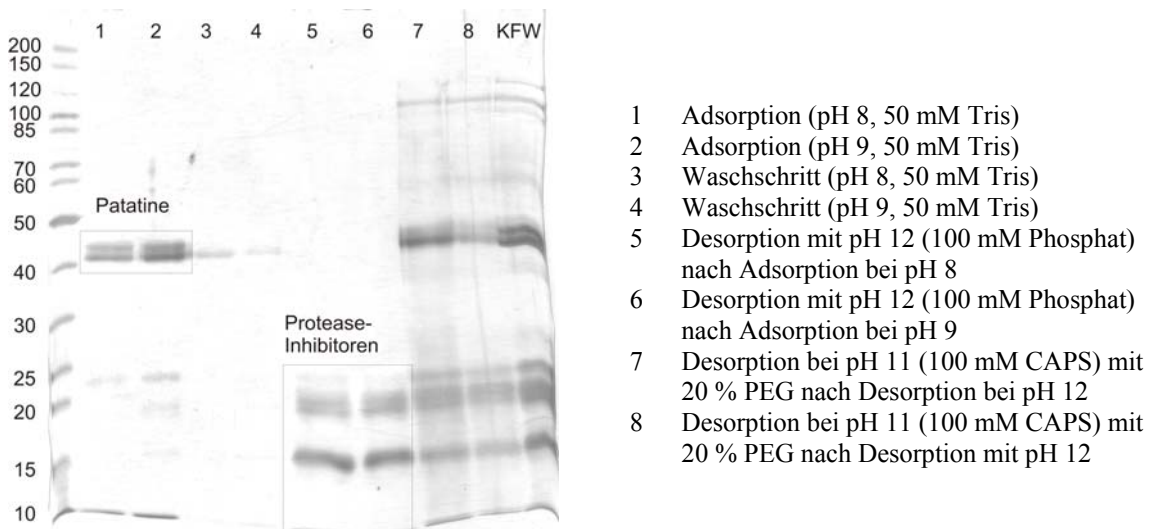


Abbildung 5.3: Sequentielle Desorption der Kartoffelproteine. Die Adsorption an Puranit UF wurde bei pH 8 bzw. pH 9 in 50 mM Tris durchgeführt (Bahnen 1+2). Nach einem Waschschrift bei pH 8 bzw. pH 9 in 50 mM Tris (Bahnen 3+4) erfolgte die Desorption mittels 100 mM Phosphatpuffer bei pH 12 (Bahnen 5+6), anschließend mit 100 mM CAPS bei pH 11 unter Zugabe von 20 % PEG (Bahnen 7+8). (12 %iges Gel, Silberfärbung)

Eine Desorption der Protease-Inhibitoren ist mit einem pH-Shift auf pH 12 durchführbar (vergl. Abb. 5.2, Bahn 7). Die Zugabe von PEG 200 zu den Puffern hat die Desorption aller Proteine zur Folge (vergl. Abb. 5.2, Bahnen 3-6 und Abb. 5.3, Bahnen 7 und 8), da vermutlich von einem Verdrängungseffekt der Proteine durch PEG auszugehen ist, der die Desorption mittels pH-Shift verstärkt. Diese Ergebnisse stellen eine Grundlage zur Separation der KFW-Proteine dar. Ein Problem bei der Desorption mit pH 12 resultiert aus einem möglichen Aktivitätsverlust der Protease-Inhibitoren dar. Dem kann entgegengewirkt werden, indem die desorbierte Fraktion umgepuffert oder auf einen neutralen pH-Wert titriert wird. Diese Vorgehensweise ist ein mögliches Verfahren bei der Aufreinigung von Proteinen [166].

5.2 Aufreinigung der Proteinfractionen im KFW

In den beiden vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass eine Separation von Patatinen und Protease-Inhibitoren durch eine selektive Adsorption der Protease-Inhibitoren bei pH 7-9 mit anschließender Desorption mittels pH-Shift möglich ist. Unter statischen Bedingungen wurde nachfolgend eine Separation der beiden Proteinfractionen in größerem Maßstab (100 mL KFW) durchgeführt.

Die Fraktion der Patatine, welche bei der Adsorption im Überstand verbleibt, wurde auf pH 7 (50 mM HEPES) umgepuffert und aufkonzentriert. Die Protease-Inhibitoren-Fraktion wurde nach einem Waschschrift (50 mM Puffer) mittels pH-Shift auf pH 12 desorbiert (100 mM Phosphatpuffer), auf pH 7 (100 mM HEPES) umgepuffert und im Anschluss daran ebenfalls aufkonzentriert. Des Weiteren erfolgte eine Lyophilisierung der Proteinkonzentrate. Aliquots der Lyophilisate wurden in ddH₂O gelöst und zur Kontrolle des Separationserfolges einer SDS-PAGE unterzogen. Abbildung 5.4 zeigt die Gele der mittels Puranit UF aufgereinigten Proteinfractionen des KFW.

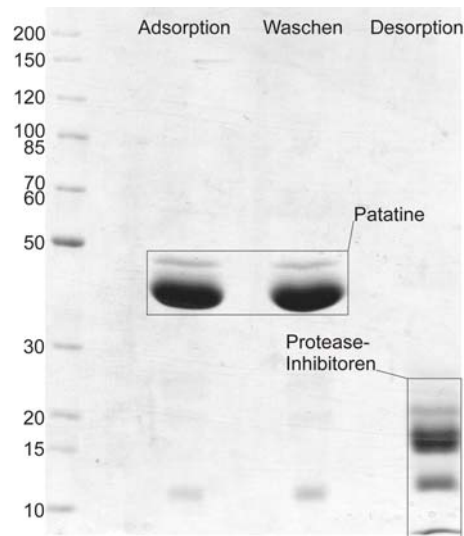


Abbildung 5.4: SDS-PAGE der mittels Puranit UF aufgereinigten Proteinfractionen nach Aufkonzentrierung und anschließender Lyophilisierung. Die Adsorption wurde bei pH 8 (50 mM Tris) durchgeführt. Nach einem Waschschrift bei pH 8 (50 mM Tris) erfolgte die Desorption bei pH 12 (100 mM Phosphat). (12 %iges Gel, Coomassiefärbung)

Anhand der SDS-PAGE der Proteinlyophilisate ist davon auszugehen, dass die Fraktion der Protease-Inhibitoren nahezu frei von Patatinen ist. Die Fraktion der Patatine (sowohl die im Überstand verbliebene als auch die Fraktion nach dem Waschschrift) zeigt zwischen 10-15 kDa eine schwächere Bande, die den Protease-Inhibitoren mit niedrigeren IEP zuzuordnen ist. Den größten Anteil in diesen Fraktionen stellen jedoch die Patatine dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Separation der Patatine und Protease-Inhibitoren unter Verwendung des Montmorillonits Puranit UF im Batch-Verfahren durchführbar ist.

Des Weiteren wurde unter den gleichen Bedingungen die Separation der Kartoffelproteine mittels calciniertem Puranit UF untersucht. Eine Calcinierung verändert die Eigenschaften von Tonmineralen insofern, dass das Quellen in Suspension verringert wird. Ein Einsatz dieses Material in Chromatographiesäulen könnte dadurch ermöglicht werden [195]. Mit der Einschränkung, dass die Patatinfraktion einige der höhermolekularen Kartoffelproteine und weitere Protease-Inhibitoren enthält, konnte eine annähernd vergleichbare Trennung erreicht werden (vergl. Abschnitt 7.1.7 im Anhang). Anhand der SDS-PAGE ist davon auszugehen, dass die Calcinierung abgesehen von einer Modifikation des Quellverhaltens auch eine Veränderung der Adsorptionseigenschaften hervorruft. Das calcinierte Puranit UF wird

aufgrund der geringeren Selektivität in Bezug auf die Adsorption der Kartoffelproteine als weniger für eine Separation geeignet bewertet.

5.2.1 Bestimmung der biologischen Aktivität

Eine Voraussetzung für den Einsatz von Patatin als Zusatz in der Lebensmittelindustrie ist der Erhalt des nativen Zustandes während der Aufreinigung. Zur Überprüfung dessen wurde die biologische Aktivität des aufgereinigten Patatins untersucht. Wie in Abschnitt 2.3.1 dargestellt, weist Patatin eine hydrolytische Aktivität gegenüber Phospholipiden, neutralen Lipiden (Mono- und Diacylglycerolen), Glykolipiden und Estern von langkettigen Fettsäuren auf [94-98]. Diese Enzymaktivität kann als Maß für die biologische Aktivität herangezogen werden. Als Substrat dient p-Nitrophenolcaprat, welches von Patatin in Caprinsäure und p-Nitrophenolat gespalten wird. Die Detektion des freigesetzten p-Nitrophenolats erfolgt bei 400 nm. Die Durchführung ist im Anhang, Abschnitt 7.3.5 beschrieben.

Analog zur Patatinaktivität wurde die Aktivität der Protease-Inhibitoren-Fraktion untersucht. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität ist indirekt über die Messung der Trypsinaktivität möglich. Trypsin ist in der Lage, N- α -Tosyl-L-Argininmethylester (TAME) zu spalten. Die Entstehung des Produktes kann bei 247 nm gemessen werden. Im Anschluss an eine Inkubation von Trypsin mit den Proteinlyophilisaten wurde die Restaktivität von Trypsin als Maß für die inhibitorische Aktivität der entsprechenden Fraktion mittels TAME-Assay bestimmt. Die Durchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.3.6) zu entnehmen.

Abbildung 5.5 zeigt die Trypsin- und Lipid-Acyl-Hydrolase-Aktivitäten der mittels Puranit UF aufgereinigten Proteinfractionen nach Umpufferung, Aufkonzentrierung und Lyophilisierung.

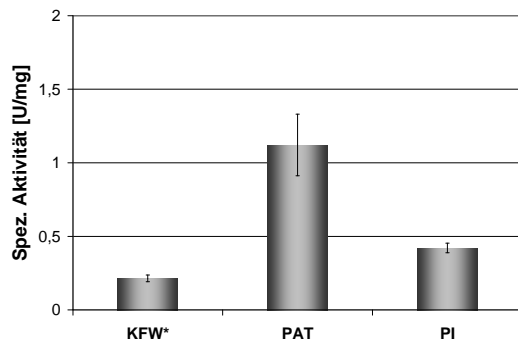
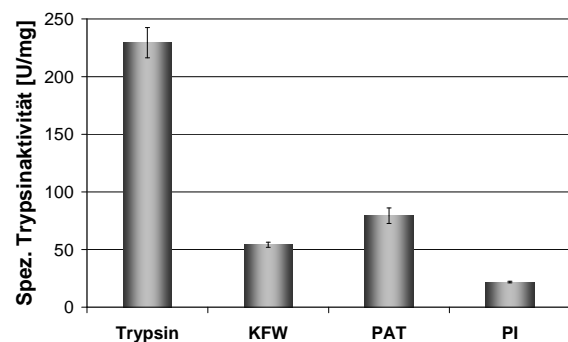
Patatinaktivität:Trypsinaktivität:

Abbildung 5.5: Patatinaktivität und Trypsininhibierung der mittels Puranit UF unter statischen Bedingungen separierten Proteinfraktionen. *Die spezifische Patatinaktivität von KFW als Vergleich ist auf die Gesamtproteinmenge von 22 mg/mL bezogen. Zur Bestimmung der Trypsinaktivität wurde das KFW zehnfach verdünnt. Die Lyophilisate der Patatin- und Protease-Inhibitorenfraktion wurden für das TAME-Assay in einer Konzentration von 1 mg/mL angesetzt. Abkürzungen: PAT: Patatinfraktion, PI: Protease-Inhibitorenfraktion. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung.)

Für das isolierte Patatin konnte eine Aktivität von etwa 1,12 U/mg bestimmt werden. Im Gegensatz dazu verfügt das Lyophilisat der Protease-Inhibitoren über eine geringere Patatinaktivität von etwa 0,42 U/mg. Zum Vergleich konnte für KFW eine Patatinaktivität von etwa 0,21 U/mg bzw. 4,7 U/mL festgestellt werden. Die Aktivität von KFW ist auf die Gesamtproteinmenge von 22 mg/mL bezogen (vergl. Abschnitt 2.3.1). Anhand der Patatinaktivität kann davon ausgegangen werden, dass in der Fraktion der Protease-Inhibitoren auch ein Teil Patatine enthalten sind. Dennoch kann ein deutlicher Aufreinigungseffekt verzeichnet werden. Die Separation von Kartoffelproteinen mittels Puranit UF ist somit unter Erhaltung der biologischen Aktivität von Patatin durchführbar.

Die Aktivität der Protease-Inhibitoren wurde indirekt anhand der Inhibierung der Trypsinaktivität bestimmt. Nicht inhibiertes Trypsin weist eine Aktivität von ca. 230 TAME-Units/mg auf. Anhand der Trypsinaktivität der Patatinfraktion muss davon ausgegangen werden, dass diese einen Anteil biologisch aktiver Protease-Inhibitoren enthält (Inhibierung: ca. 0,0024 μ L/mg). Die Existenz der Protease-Inhibitoren in der Patatinfraktion wurde bereits mittels SDS-PAGE festgestellt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um einige der Cysteinyl-Protease-Inhibitoren und der Protease-Inhibitoren I mit niedrigeren IEP, die auf Grund der Repulsion, wie auch die Patatine, nicht adsorbiert wurden. Für die Fraktion der Protease-Inhibitoren wurde eine inhibierende Aktivität von

etwa 0,0038 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ bestimmt, das KFW weist im Vergleich dazu eine inhibierende Aktivität von etwa 0,0146 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ bezogen auf den Gesamtproteingehalt von 22 mg/mL auf. Ein Teil der Aktivität der Protease-Inhibitoren bleibt demzufolge bei der Separation erhalten. Allgemein ist anzumerken, dass es aufgrund der Lyophilisierung vermutlich zu einer Verringerung der Proteinaktivität kommt.

5.3 Abreicherung von Glykoalkaloiden aus KFW

Eine Separation von Patatinen und Protease-Inhibitoren aus KFW unter Erhaltung der biologischen Aktivität erweist sich unter Verwendung smektitischer Tonminerale als durchführbar. Abgesehen vom Erhalt der biologischen Aktivität ist auch eine Abreicherung der toxischen Glykoalkaloide bedeutsam, wenn das Kartoffelprotein als Zusatz in der Lebensmittelindustrie bzw. im Bereich Functional Food verwendet werden soll.

Im Folgenden soll untersucht werden, inwieweit eine Abreicherung von GA aus KFW mit unterschiedlichen Adsorbentien (Puranit UF und Puranit UF calciniert (Montmorillonit), EX M 926 I (Kerolit/Saponit), EX M 1994 (synthetischer Hydrotalcit mit hoher Schichtladung), EX M 1607 (Montmorillonit/amorphes Silika) sowie Westmin D100 als ungeladener Talk) möglich ist. Gepuffertes KFW wurde dazu mit einer definierten Menge des entsprechenden equilibrierten Adsorbens inkubiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation wurde nach essigsauer Extraktion und Festphasenextraktion mittels HPLC-Analytik der α -Solaningehalt im Überstand als Maß für die Abreicherung der GA nach der Methode von Alt et al. (2005) bestimmt. Ausgehend von den Ergebnissen der pH-Wert-abhängigen Adsorption von α -Solanin im Modellsystem (vergl. Abschnitt 4.1) wurde der Versuch zur Abreicherung bei den Materialien EX M 1607, EX M 926 I und Puranit UF bei pH 6 (50 mM MES), welcher dem natürlichen pH-Wert des KFW entspricht, durchgeführt. Im Modellsystem konnte festgestellt werden, dass die Adsorption von α -Solanin unabhängig vom pH-Wert möglich ist. Die Adsorption im Fall von EX M 1994, Westmin D100 und calciniertem Puranit UF, erfolgte bei pH 9 (50 mM Tris). Laut der Versuche im Modellsystem ist bei diesen Materialien bei pH 9 die höchste Adsorptionskapazität für α -Solanin zu erwarten.

Die Durchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.2.10) zu entnehmen. Das verwendete KFW wies einen α -Solaningehalt von etwa 74 mg/L auf. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

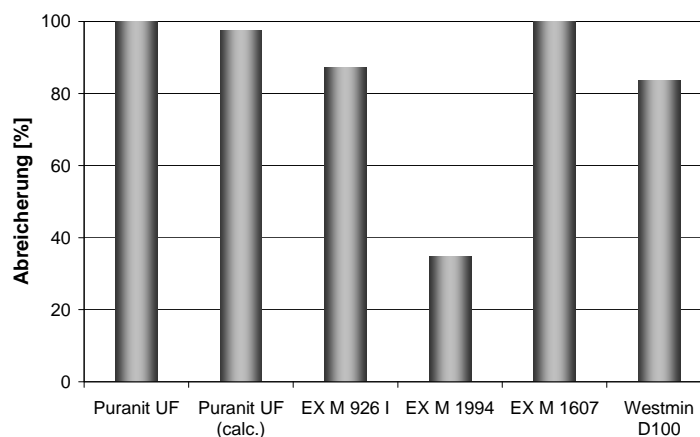


Abbildung 5.6: Abreicherung von α -Solanin aus Kartoffelfruchtwasser. Die Adsorption von KFW erfolgte im Fall von Puranit UF, EX M 1607 bei EX M 926 bei pH 6 (50 mM MES). Bei Westmin D100, calciniertem Puranit UF und EX M 1994 wurde die Adsorption bei pH 9 (50 mM Tris) durchgeführt. Das KFW wies einen anfänglichen α -Solaningehalt von 74 mg/L auf. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

Ausgehend von den in Abbildung 5.6 dargestellten Ergebnissen sind Puranit UF, calciniertes Puranit UF und EX M 1607 besonders für eine Abreicherung von GA aus KFW geeignet. Bei allen drei Smektiten konnte eine Abreicherung von mindestens 97,5 % erreicht werden (EX M 1607: 100%, Puranit UF: 100 % und calciniertes Puranit UF: 97,5 %). Mit einer Abreicherung von 83,5 % und 87,1 % des enthaltenen α -Solanins sind die Adsorbentien Westmin D100 bzw. EX M 926 I ebenfalls relativ gut für eine Abreicherung von GA aus KFW geeignet. Mit dem synthetischen Hydrotalcit EX M 1994 konnten unter den gleichen Bedingungen nur 34,8 % des α -Solanins abgereichert werden. Dieses wird daher als wenig für eine Abreicherung geeignet bewertet.

Mit den Materialien EX M 1607 und Puranit UF ist ausgehend von den Ergebnissen in 5.1.1 eine Separation der Kartoffelproteine durchführbar. So ist eine Kombination der Proteinseparation mit gleichzeitiger Abreicherung der GA mittels dieser Adsorbentien prinzipiell möglich.

Zur Abschätzung der Adsorbensmenge, welche für eine Abreicherung der GA aus KFW nötig ist, wurde gepuffertes KFW mit unterschiedlichen Mengen EX M 1607, Puranit UF und der calcinierten Form von Puranit UF inkubiert. Die Durchführung erfolgte analog zu 5.3.1. Das verwendete KFW wies ebenfalls einen α -Solaningehalt von 74 mg/mL auf.

Abbildung 5.7 zeigt die prozentuale Abreicherung von α -Solanin aus KFW in Abhängigkeit von der verwendeten Adsorbensmenge für Puranit UF, calcinierten Puranit UF und EX M 1607.

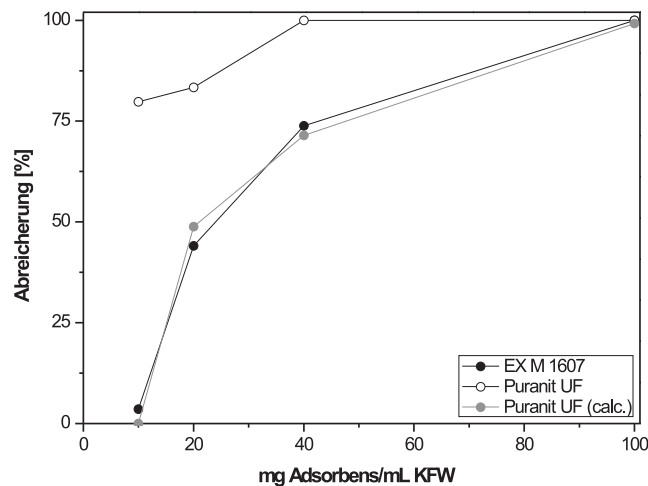


Abbildung 5.7: Prozentuale Abreicherung von α -Solanin aus KFW bezogen auf die zur Abreicherung verwendete Adsorbensmenge. 100 % α -Solanin entsprechen 74 mg/L. Die Adsorption wurde bei calcinierten Puranit UF bei pH 9 (50 mM Tris) durchgeführt. Bei EX M 1607 und nicht calciniertem Puranit UF erfolgte die Adsorption bei pH 6 (50 mM MES). (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

Das smektitische Tonminerale Puranit UF in nicht calcinierter Form zeigt unter diesen Bedingungen den größten Effekt bezüglich der Abreicherung von α -Solanin. Mit EX M 1607 und der calcinierten Form von Puranit UF sind etwa 100 mg Adsorbens pro mL KFW nötig, um 100 % der GA abzureichern. Bei der Verwendung von Puranit UF sind bereits etwa 40 mg des Materials pro mL KFW ausreichend, um denselben Effekt zu erzielen. Dieses Ergebnis steht dem Ergebnis der Adsorptionsisothermen für calcinierten und nicht calcinierten Puranit UF (vergl. Abschnitt 4.3) entgegen. Im Modellsystem konnte für calciniertes Puranit UF im Vergleich zu nicht calciniertem Puranit UF eine höhere Adsorptionskapazität für α -Solanin festgestellt werden. Eine Erklärungsmöglichkeit resultiert aus der Tatsache, dass im Realmedium von anderen Bedingungen für die Adsorption auszugehen ist. Beispielsweise weist Kartoffelfruchtwasser eine Leitfähigkeit von ca. 30 mS/cm auf. Ein Einfluss auf die Adsorption ist vorstellbar. Weiterhin ist die Adsorption der im KFW enthaltenen Proteine als Konkurrenzreaktion zur

α -Solaninadsorption zu berücksichtigen. Bei den Versuchen zur zeitabhängigen Adsorption des GA (vergl. Abschnitt 4.4) konnte eine schnellere Bindung für α -Solanin bei Puranit UF im Vergleich zum calcinierten Puranit UF festgestellt werden. So besteht die Möglichkeit, dass die adsorbierenden Proteine im Fall von calciniertem Puranit UF bereits Bindungsplätze auf der Oberfläche belegen, die für das GA dann nicht mehr zur Verfügung stehen. Beim nicht calcinierten Puranit UF wäre eine sehr schnelle Bindung des α -Solanins vorstellbar, so dass in der gleichen Zeit weniger Proteine auf der Oberfläche adsorbiert werden können als bei calcinierten Puranit UF. So wäre eine größere Menge calciniertes Puranit UF nötig, um das GA komplett abzureichern.

5.4 Proteinseparation in Kombination mit einer GA-Abreicherung

Im Folgenden soll die Proteinseparation in Kombination mit einer GA-Abreicherung untersucht werden. Analog zu den in Abschnitt 5.1 und 5.2 beschriebenen Versuchen wurden die in KFW enthaltenen Proteine mittels EX M 1607, Puranit UF und der calcinierten Form von Puranit UF separiert. Andere Materialien wurden nicht weiter untersucht, da sie entweder geringere Adsorptionskapazitäten für α -Solanin aufweisen, oder für die Proteinauftrennung wenig geeignet sind.

Die Adsorption erfolgte bei pH 7, pH 8 und pH 9. Die anschließende Desorption wurde in zwei parallelen Versuchsreihen, zum einen bei pH 11 (100 mM CAPS) und zum Anderen bei pH 12 (100 mM Phosphat), durchgeführt. In allen neun Proteinfractionen (drei Adsorptionsfraktionen = Patatine, drei Desorptionsfraktionen bei pH 11 und drei Desorptionsfraktionen bei pH 12 = Protease-Inhibitoren) wurde nach essigsaurer Extraktion und Festphasenextraktion mittels HPLC-Analytik der Gehalt an α -Solanin bestimmt. Die anfängliche α -Solaninkonzentration betrug 74 mg/mL. Der Gesamtproteingehalt des Kartoffelfruchtwassers wurde mittels BCA-Assay bei ca. 21,4 mg/ mL bestimmt. Die GA-Gehalte aller Proteinfractionen sind in Abbildung 5.8 dargestellt.

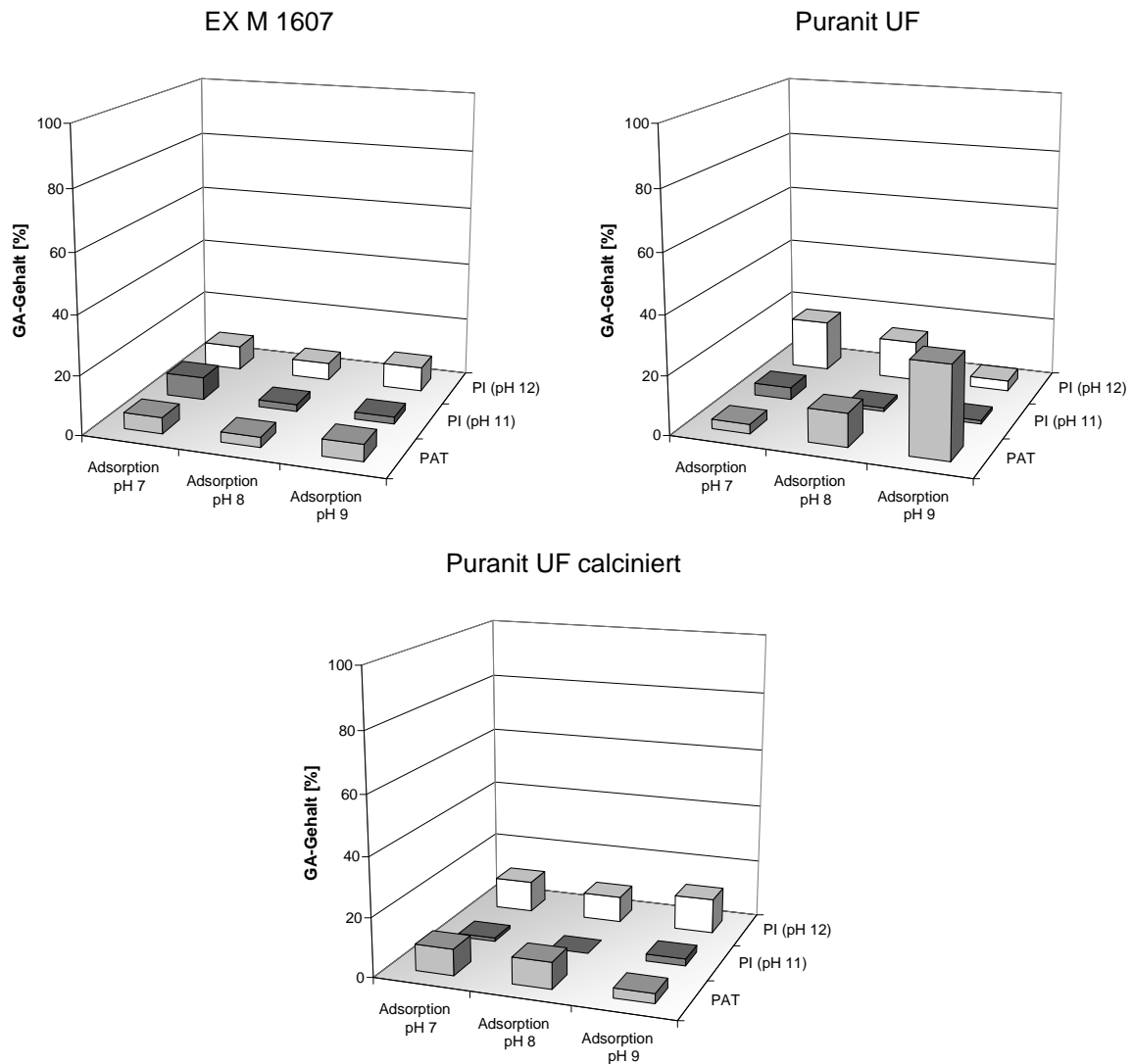


Abbildung 5.8: Prozentuale Glykoalkaloidgehalte der Proteinfractionen nach Aufreinigung mit EX M 1607 (oben links), Puranit UF (oben rechts) und calciniertem Puranit UF (unten). 100 % α -Solanin entsprechen 74 mg/L. Die Adsorption wurde bei drei verschiedenen pH-Werten durchgeföhrt (Tris, 50 mM, pH 7-9). Es wurde nachfolgend jeweils bei pH 11 (100 mM CAPS) oder pH 12 (100 mM Phosphat) desorbiert. Abkürzungen in der Graphik: PAT = Patatine, PI = Protease-Inhibitoren. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

Die Ergebnisse zeigen, dass die Separation der Kartoffelproteine mit einer Abreicherung der Glykoalkaloide kombiniert werden kann. Alle Proteinfractionen weisen eine im Vergleich zum KFW um mindestens 70 % reduzierte α -Solaninkonzentration auf. Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass während der Desorption der Protease-Inhibitoren, besonders bei der Desorption mit pH 12, eine partielle Desorption der GA stattgefunden hat.

Die Proteinfractionen des Überstandes nach der Adsorption (Patatinfraction) an EX M 1607 enthalten nur noch ca. 3,4-5,6 % der ursprünglichen α -Solaninkonzentration, was etwa 2,5-4,1 mg/L entspricht. In den Proteinfractionen der Desorptionsschritte mit pH 11 und pH 12 (Protease-Inhibitoren) konnten α -Solaningehalte von ca. 2,4-8,3 % der Ausgangskonzentration festgestellt werden (etwa 1,8-6,1 mg/L). Bei der Separation und Abreicherung mittels calciniertem Puranit UF befinden sich die GA-Gehalte der Proteinfractionen in einem vergleichbaren Bereich.

Im Fall von Puranit UF wurde bei einer Adsorption bei pH 9 eine Abreicherung von etwa 70 % in der Patatinfraction festgestellt, was einer Konzentration von etwa 23,2 mg/L entspricht. Die Fraction nach der Desorption mit pH 12 (Protease-Inhibitoren) nach einer Adsorption bei pH 7 und pH 8 enthalten noch etwa 13,6-17,2 % der ursprünglichen Konzentration (10,1-12,7 mg/L).

Eine weitere Verringerung der α -Solaninkonzentration in den Proteinfractionen, bzw. eine komplette GA-Abreicherung ist unter Verwendung einer größeren Adsorbensmenge möglich.

5.5 *Separation von KFW-Inhaltsstoffen mittels präparativer HPLC*

5.5.1 Proteinseparation

Das Adsorbens Puranit UF eignet sich aufgrund der starken Quellung in wässrigen Medien nicht als Material für eine Säulenpackung. Wie bereits in Abschnitt 3.5.1 dargestellt, entstehen bereits in kleinem Maßstab mit diesem Material hohe Vorsäulendrücke. Dies ist bei EX M 1607 nicht der Fall. Aus diesem Grund wird EX M 1607 auf seine Eigenschaften bezüglich der Proteinseparation im Durchfluss untersucht. Dem Einsatz von calciniertem Puranit UF steht eine geringere Selektivität der Proteinadsorption entgegen.

Eine Quarzsäule wurde mit 500 mg EX M 1607 befüllt und mit 50 mM Tris-Puffer (pH 8,5) equilibriert. Ein definiertes Volumen KFW wurde anschließend injiziert und bei pH 8,5 durch die Säule gepumpt, um so, analog zu den statischen Versuchen (vergl. 5.1), eine Adsorption der Protease-Inhibitoren zu erreichen. Die Patatine sollten sich in der Durchlaufraction befinden. Mittels unterschiedlicher Gradienten wurde die Elution der Protease-Inhibitoren optimiert. Die Durchführung ist dem Anhang (Abschnitt 7.2.9) zu entnehmen. Abbildung

5.9 zeigt ein Chromatogramm der Separation von KFW-Proteinen mittels EX M 1607. Die im Chromatogramm markierten Fraktionen 1-6 wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE untersucht. Das SDS-PAGE-Gel ist in Abbildung 5.10 dargestellt.

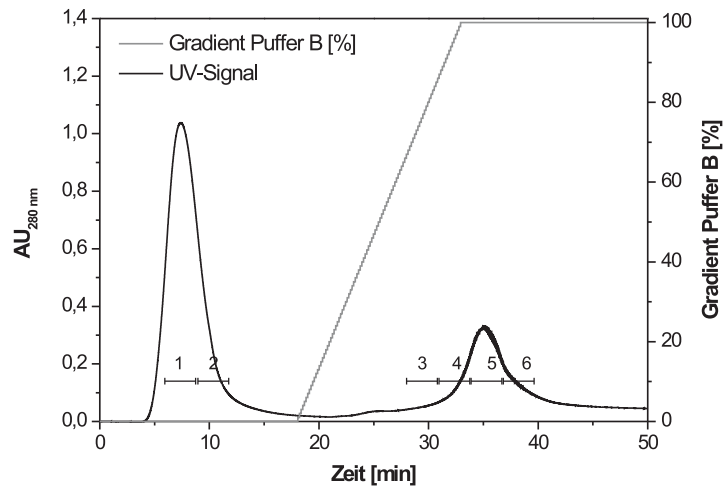


Abbildung 5.9: Chromatogramm der Separation von Kartoffelproteinen mittels präparativer HPLC mit dem Material EX M 1607 > 45 μm . Flussrate: 1 mL/min. Probe: 1,5 mL KFW (1:1 mit 50 mM Tris (pH 8,5) verdünnt. Die Bindung der Proteine erfolgte bei pH 8,5 (Puffer A: 50 mM Tris), die Elution bei pH 12 (Puffer B: 100 mM Phosphat). Gradient: 100 % Puffer A \rightarrow 100 % Puffer B.

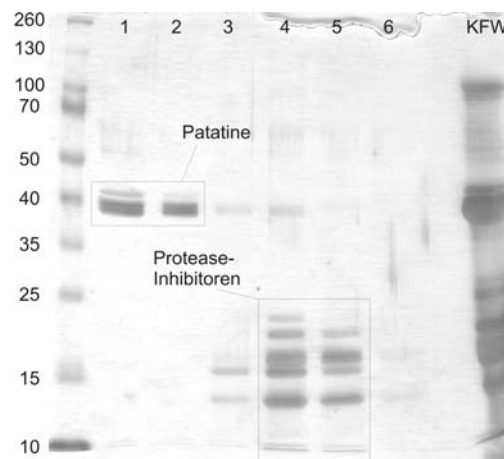


Abbildung 5.10: SDS-PAGE der mittels präparativer HPLC mit EX M 1607 aufgereinigten Proteinfractionen. Die mit 1-6 bezeichneten Bahnen entsprechen den Fraktionen 1-6 des Chromatogramms in Abbildung 5.9. (12 %iges Gel nach Silberfärbung)

Wie ausgehend von den Versuchen im statischen System (vergl. Abb. 5.1) vermutet wurde, befindet sich der größte Teil der Patatine im Durchlauf (vergl. Fraktion 1 und 2 in Abb. 5.9 und 5.10). Dies kann durch die elektrostatische Abstoßung zwischen den bei pH 9 negativ geladenen Patatinmolekülen und dem negativ geladenen Säulenmaterial erklärt werden. Die Adsorption eines geringeren Teils der Patatine war auf Grund alternativer Wechselwirkungen, wie bereits in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, dennoch möglich. Dies ist aus den Bahnen 3 und 4 des SDS-PAGE-Gels (s. Abb. 5.10) ersichtlich, welche im 40-50 kDa-Bereich schwächere Banden zeigen.

Im Gegensatz dazu findet eine Adsorption fast aller Protease-Inhibitoren und höhermolekularen Proteine (z. B. Polyphenoxidasen) des KFW statt. Eine Elution der Protease-Inhibitoren war mit einem linearen Gradienten von pH 8,5 zu pH 12 möglich (vergl. Bahn 4 und 5 in Abb. 5.10). Die höhermolekularen Kartoffelproteine bleiben gebunden.

Demnach ist eine Separation von Patatinen und Protease-Inhibitoren mit EX M 1607 als Säulenmaterial im kleinen Maßstab erfolgreich durchführbar. Für ein Scale-Up wurde unter denselben Bedingungen eine größere Quarzsäule mit 10 g eines Granulats (Partikelgröße 0,3-0,8 mm) befüllt, welches eine dem EX M 1607 sehr ähnliche Struktur aufweist. Die Separation von Patatinen und Protease-Inhibitoren war in diesem Maßstab ebenfalls möglich, allerdings wies dieses Material eine geringere Selektivität bezüglich der Adsorption auf (vergl. Abschnitt 7.1.8).

5.5.2 Bestimmung der Patatin- und Protease-Inhibitoren-Aktivität

Die Proteinfractionen, die wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, mittels EX M 1607 im Durchfluss aufgereinigt wurden, wurden auf pH 7 umgepuffert, aufkonzentriert und lyophilisiert. Dazu wurden die aufgefangenen Fraktionen mehrerer Durchläufe vereinigt. Aliquots der Lyophilisate wurden in ddH₂O gelöst (1 mg/mL) und analog zu Abschnitt 5.2.1 hinsichtlich ihrer Patatinaktivitäten und Inhibierung der Trypsinaktivität untersucht. Abbildung 5.11 zeigt die Aktivitäten von Patatin und der Protease-Inhibitoren-Fraktion.

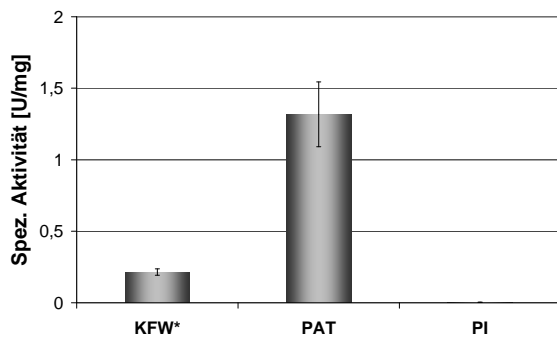
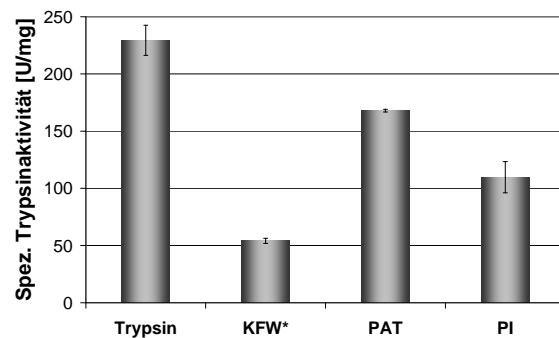
Patatinaktivität:Inhibierung der Trypsinaktivität:

Abbildung 5.11: Patatinaktivität und Trypsininhibierung der mittels EX M 1607 chromatographisch separierten Proteinfraktionen. *Die spezifische Patatinaktivität von KFW als Vergleich ist auf die Gesamtproteinmenge von 22 mg/mL bezogen. Zur Bestimmung der Trypsinaktivität wurde das KFW zehnfach verdünnt. Die Lyophilisate der Patatin- und Protease-Inhibitorenfraktion wurden für das TAME-Assay in einer Konzentration von 1 mg/mL angesetzt. Abkürzungen: PAT: Patatinfraktion, PI: Protease-Inhibitorenfraktion. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung.)

Für das Patatinlyophilisat konnte eine Aktivität von etwa 1,31 U/mg bestimmt werden. Im Gegensatz dazu verfügt das Lyophilisat der Protease-Inhibitoren über eine weitaus geringere Patatinaktivität von etwa 0,0032 U/mg. Zum Vergleich konnte für KFW eine Patatinaktivität von etwa 0,21 U/mg bzw. 4,7 U/mL festgestellt werden. Die Aktivität von KFW ist auf die Gesamtproteinmenge von 22 mg/mL bezogen. Anhand der Patatinaktivität kann davon ausgegangen werden, dass in der Fraktion der Protease-Inhibitoren ein sehr geringer Anteil Teil der Patatine enthalten sind. Einschränkend ist allerdings hinzuzufügen, dass es während der Lyophilisierung vermutlich zu einer Verringerung der Proteinaktivität kommt. So besteht die Möglichkeit, dass geringe Mengen an Patatin, welche in der Protease-Inhibitoren-Fraktion enthalten sind, aufgrund einer Verminderung der Aktivität nach Lyophilisierung mittels des Aktivitätsassays kaum nachzuweisen sind. Ein deutlicher Aufreinigungseffekt der Patatine kann dennoch verzeichnet werden.

Die Bestimmung der Aktivität der Protease-Inhibitoren erfolgte indirekt anhand der Inhibierung der Trypsinaktivität. Nicht inhibiertes Trypsin weist eine Aktivität von ca. 230 TAME-Units/mg auf. Ausgehend von der verringerten Trypsinaktivität der Patatinfraktion ist davon auszugehen, dass diese einen Anteil biologisch aktiver Protease-Inhibitoren enthält (Inhibierung: ca. 0,0011 μ L/mg). Für die Fraktion der Protease-

Inhibitoren wurde eine inhibierende Aktivität von etwa 0,0022 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ bestimmt, das KFW weist im Vergleich dazu eine inhibierende Aktivität von etwa 0,0146 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ bezogen auf den Gesamtproteingehalt von ca. 22 mg/mL auf. Ein Teil der Aktivität der Protease-Inhibitoren bleibt demzufolge bei der Separation erhalten.

Eine chromatographische Proteinseparation unter Verwendung von Ex M 1607 ist demnach unter teilweiser Erhaltung der biologischen Aktivität von Patatinen und Protease-Inhibitoren möglich.

Eine Optimierung der Bedingungen der Lyophilisierung ist unter Zusatz von Protein stabilisierenden Agenzien denkbar. Eine Alternative zur Lyophilisierung kann die Sprühtrocknung darstellen.

5.5.3 Bestimmung des GA-Gehaltes der Proteinfractionen

Entsprechend der Bestimmung des GA-Gehaltes aus Abschnitt 5.3.3 wurde auch in den im Durchflussmodus mit EX M 1607 separierten Proteinfractionen der GA-Gehalt bestimmt. Dazu wurden die Fractionen aus mehreren Separationsläufen vereinigt. Die Analytik erfolgte in Doppelbestimmung nach essigsaurer Extraktion und SPE mittels HPLC. Die α -Solaninkonzentration im KFW betrug etwa 74 mg/mL .

Für die Patatinfraction konnte 4,1-6,4 % der ursprünglichen α -Solaninkonzentration festgestellt werden, was etwa 3,0-4,7 mg/L entspricht. In den Proteinfractionen der Protease-Inhibitoren konnten α -Solaningehalte von ca. 2,2-7,3 % der Ausgangskonzentration festgestellt werden (etwa 1,6-5,3 mg/L).

Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass bei der Proteinseparation im Durchfluss eine Abreicherung der GA von über 90 % erfolgt.

5.6 Adsorption von Kartoffelproteinen mit Hydrotalciten

Vergleichend zur Adsorption von Kartoffelproteinen mittels smektitischer Tonminerale soll im Folgenden die Separation mit dem synthetischen Hydrotalcit Synthal 696 untersucht werden. Anhand der im Modellsystem in Kapitel 3.7 beschriebenen Ergebnisse wurde Synthal 696 als Anionentauscher geeignet bewertet.

Analog zu den Versuchen in Abschnitt 5.1. wurde unter den gleichen Bedingungen die selektive Adsorption der Proteine des KFW im statischen System qualitativ untersucht. Aufgrund der Verteilung der IEP der Kartoffelproteine (vergl. Abschnitt 5.1) wurde angenommen, dass bei hohen pH-Werten eine selektive Adsorption der Patatine mit niedrigen IEP an das positiv geladene Hydrotalcit erfolgen kann, während eine Adsorption der Protease-Inhibitoren unterbleibt. Abbildung 5.12 zeigt das SDS-PAGE-Gel der Überstände nach einer Adsorption von Kartoffelfruchtwasser an Synthal 696 bei pH 5-9.

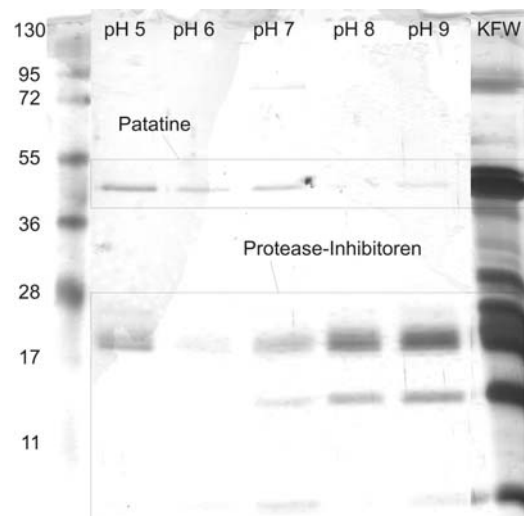


Abbildung 5.12: SDS-PAGE-Gele der Überstände nach der Adsorption von KFW an Synthal 696 bei pH 5-9. (12 %iges Gel, Silberfärbung)

Bei pH 5-7 erfolgte eine partielle Adsorption beider Proteinfractionen. Bei pH 8 und pH 9 hingegen konnte, wie vermutet, eine Adsorption der Patatine festgestellt werden, während die Adsorption zweier Klassen der Protease-Inhibitoren nicht stattfand. Des Weiteren erfolgte eine Adsorption der höhermolekularen Proteine. Die selektive Patatinadsorption bei pH 8 und 9 stellt eine Grundlage für eine Separation der Kartoffelproteine mit Synthal 696 dar.

5.7 Zusammenfassung

Anhand der Ergebnisse dieses Kapitels lassen sich folgende Aussagen bezüglich der Separation von Kartoffelprotein und der Abreicherung von Glykoalkaloiden aus Kartoffelfruchtwasser treffen:

- Mit den smektitischen Tonmineralen EX M 1607 und Puranit UF als Kationentauscher erfolgt eine weitestgehend selektive Adsorption der Protease-Inhibitoren des KFW. Der größte Teil der Patatine verbleibt im Überstand.
- Ein pH-Shift ermöglicht die Desorption der Protease-Inhibitoren.
- Die Separation von Patatinen und Protease-Inhibitoren ist unter Verwendung von Puranit UF im statischen System durchführbar. Die Adsorption erfolgt bei pH 8-9. Die Desorption wird mit einem Shift auf pH 11 oder pH 12 durchgeführt, womit eine Separation der Kartoffelproteine unter Erhaltung der biologischen Aktivität gelang.
- Die Proteinseparation mittels EX M 1607 und Puranit UF unter statischen Bedingungen ist mit einer Abreicherung der GA verbunden.
- Puranit UF weist unter statischen Bedingungen im Vergleich zu EX M 1607 eine höhere Kapazität zur Abreicherung von Glykoalkaloiden aus Kartoffelfruchtwasser auf.
- Die Separation von Patatinen und Protease-Inhibitoren ist mit EX M 1607 als Säulenpackung im dynamischen System möglich.
- Die mittels EX M 1607 chromatographisch separierten Proteinfractionen weisen eine biologische Aktivität auf. Gleichzeitig wurde wie auch unter statischen Bedingungen der GA-Gehalt verringert.
- Mit dem synthetischen Hydrotalcit Synthal 696 als Anionentauschersystem ist eine selektive Adsorption der Patatine durchführbar. Dies ist als Grundlage für einen Separationsprozess zu sehen.

Im Rahmen dieses Kapitels wurde die Entwicklung eines neuen Separationsprozesses für Kartoffelproteine unter Verwendung natürlicher Tonminerale als Kationentauscher beschrieben. Die Proteinseparation erfolgt dabei in einem Schritt zusammen mit einer Abreicherung von Glykoalkaloiden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden natürliche smektitische Tonminerale sowie synthetische Hydrotalcite der Süd-Chemie AG auf ihre Eignung als Kationentauscher bzw. Anionentauscher für die Aufreinigung von Proteinen sowie zur Bindung von α -Solanin untersucht.

Die Erkenntnisse der Modelluntersuchungen zur Protein- und Solaninadsorption wurden auf die Entwicklung eines Aufreinigungsverfahrens für Kartoffelfruchtwasser übertragen, mit welchem eine Separation der Proteinfractionen sowie eine Abreicherung des α -Solanin erfolgen kann.

Proteinadsorption im Modellsystem

Unterschiedliche smektitische Tonminerale sowie ein synthetisches Hydrotalcit wurden bezüglich ihres Adsorptionsverhaltens gegenüber Modellproteinen charakterisiert. Dazu wurden Modellproteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten ausgewählt (Ovalbumin, humanes Serumalbumin, Lysozym, Chymotrypsin, Trypsinogen, alkalische Phosphatase und Hämoglobin).

Bei der Untersuchung der smektitischen Tonminerale wurde festgestellt, dass die Bindekapazität als Funktion des pH-Wertes sich in allen Fällen mit einem Kationentauscherverhalten beschreiben lässt, d.h. die Bindung erfolgt im Wesentlichen unterhalb des IEP. Die pH-Wert-Abhängigkeit der Adsorption wird dabei erwartungsgemäß umso stärker, je höher die Kationenaustauschkapazität des Tonminerals ist. Bei niedrig geladenen Tonmineralen sind auch van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen bedeutsam.

Das smektitische Tonmineral EX M 1607 (Montmorillonit/amorphes Silika) wurde für den Einsatz als Kationentauscher in Proteinseparationsprozessen als besonders geeignet bewertet. Dieses Material besteht aus einem mittel geladenen Montmorillonit, der fast vollständig delaminiert in amorphem Silika vorliegt. Im Modellsystem ermittelte Daten belegen, dass EX M 1607 über Bindungskinetiken verfügt, die mit einem kommerziellen Kationentauscher vergleichbar sind. Des Weiteren konnte die Proteinadsorption laut einer Modellierung mit Freundlich- und Langmuir-Freundlich-Isothermen beschrieben werden.

Unter statischen Bedingungen wurden für EX M 1607 Adsorptionskapazitäten bestimmt, die im Vergleich zu den Kapazitäten kommerzieller Kationentauscher höher sind. Bei pH 4 konnte für den Kationentauscher Lewatit S 2528 eine Kapazität für α -Chymotrypsin von < 50 mg/g bestimmt werden. Unter den gleichen Bedingungen wurde eine Adsorption von ca. 270 mg/g für α -Chymotrypsin an das Material EX M 1607 festgestellt.

Die Proteinadsorption an EX M 1607 (und andere Smektite) findet, im Gegensatz zu kommerziellen Materialien, weitestgehend unabhängig von der Ionenstärke statt. Für eine Proteinseparation ausgehend von Realmedien mit einer hohen Leitfähigkeit, wie es bei Kartoffelfruchtwasser mit einer Konduktivität von ca. 30 mS/cm der Fall ist, kann dies von Vorteil sein, wenn dadurch ein Verdünnungs- oder Entsalzungsschritt entfallen kann.

Die Desorption war mittels pH-Shift zur Verstärkung der Repulsion zwischen der negativ geladenen Tonmineraloberfläche und dem Proteinmolekül durchführbar. Im Durchfluss verhält sich das Adsorbens, in Bezug auf den Vorsäulendruck, analog zu kommerziellen Kationentauschern.

Basierend auf einem positiven Zetapotential wurde angenommen, dass das synthetische Hydrotalcit Synthal 696 sich als Anionentauschermaterial eignen könnte. Die Untersuchung der Adsorptionseigenschaften ergaben, sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Bedingungen, höhere Adsorptionskapazitäten als ein kommerzieller Anionentauscher. Im statischen System konnte bei pH 7 unter den gleichen Bedingungen für Ovalbumin eine Adsorptionskapazität von ca. 150 mg/g festgestellt werden, während der kommerzielle Anionentauscher MacroPrep 25 Q eine Kapazität von ca. 40 mg/g aufwies. Im dynamischen System konnte für Synthal 696 ebenfalls eine höhere Kapazität (Hämoglobin) als für einen kommerziellen Anionentauscher unter den gleichen Bedingungen festgestellt werden. Die Adsorptionskapazität des synthetischen Hydrotalcits hängt zudem im Bereich der gewählten Flussraten (bis 10 mL/min) wenig von der Durchflussgeschwindigkeit ab.

Synthal 696 weist ausgehend von diesen Ergebnissen geeignete Eigenschaften für die Verwendung als kationisches Separationsmaterial auf.

Glykoalkaloidadsorption im Modellsystem

Um einen neuen Prozess zur Abreicherung von Glykoalkaloiden aus Kartoffelfruchtwasser zu entwickeln, wurde zunächst am Modellsystem (gepufferte α -Solanin-Lösung) die Eignung unterschiedlicher Adsorbentien zur α -Solaninadsorption untersucht. Zu diesem Zweck wurden systematisch unterschiedliche Adsorbentien mit variierenden Oberflächeneigenschaften verwendet. Dabei zeigte sich, dass smektitische Tonminerale mit hoher negativer Ladung am ehesten geeignet sind, α -Solanin mit hohen Bindungskapazitäten zu adsorbieren. Der positive Effekt einer negativen Oberflächenladung auf die Adsorption des Glykoalkaloids konnte auch mittels Moleküldynamik-Berechnungen untermauert werden.

Anhand der Ergebnisse der α -Solaninadsorption im Modellsystem zeigten sich zwei Montmorillonite (Puranit UF und EX M 1607) sowie ein Saponit (EX M 1753) und eine Kerolit-Saponit-Mischphase (EX M 926 I) als besonders zur Abreicherung von GA in Kartoffelfruchtwasser geeignet.

Separation von Inhaltsstoffen des Kartoffelfruchtwassers

Es existieren unterschiedliche Methoden, um die Proteinfractionen des Kartoffelfruchtwassers chromatographisch zu separieren, welche als Nachteile z. B. die relativ hohen Kosten für die chromatographischen Medien aufweisen. Zudem müssten die Glykoalkaloide in einem separaten Schritt abgereichert werden.

Ausgehend von den im ersten Teil dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen wurde nachfolgend die Separation der Patatine und Protease-Inhibitoren mittels anorganischer Adsorbentien unter gleichzeitiger Abreicherung der Glykoalkaloide im Kartoffelfruchtwasser durchgeführt.

Mit den smektitischen Tonmineralen EX M 1607 und Puranit UF konnte unter statischen Bedingungen eine selektive Adsorption der Protease-Inhibitoren des KFW bei pH 8-9 erfolgen, wobei der größte Teil der Patatine im Überstand verblieb. Analog zu den Ergebnissen des Modellsystems wurden die Protease-Inhibitoren mittels pH-Shift desorbiert, so dass eine Separation von Patatinen und Protease-Inhibitoren unter Verwendung von Puranit UF im statischen System gelang. Anhand der Bestimmung der

Patatinaktivität und der inhibitorischen Aktivität der Protease-Inhibitoren wurde gezeigt, dass die biologische Aktivität bei dieser Separationsmethode weitestgehend erhalten bleibt.

Des Weiteren wurde unter statischen Bedingungen die Abreicherung von Glykoalkaloiden aus Kartoffelfruchtwasser untersucht. Die Adsorbentien EX M 1607, Puranit UF, EX M 926 I sowie Puranit UF in calcinierter Form waren für eine Abreicherung geeignet.

Eine Untersuchung der Proteinseparation in Kombination mit einer Abreicherung von Glykoalkaloiden ergab, dass die Proteinseparation mittels Puranit UF, der calcinierten Form von Puranit UF und EX M 1607 mit einer Glykoalkaloidabreicherung verbunden ist. Daher kann die Proteinseparation mit der Abreicherung der Glykoalkaloide in einem Prozessschritt erfolgen.

Die Separation von Patatinen und Protease-Inhibitoren aus KFW wurde mittels EX M 1607 mit Partikeln $> 45 \mu\text{m}$ im Durchfluss untersucht. Für die Adsorption wurde ein pH-Wert von 8,5 gewählt, so dass auch wie unter statischen Bedingungen die Adsorption der Patatine weitestgehend unterblieb und sich diese in der Durchlaufraction befanden. Analog zum statischen System war eine Elution der Protease-Inhibitoren mit einem linearen Gradienten (pH 8,5 \rightarrow pH 12) erfolgreich. Die chromatographische Separation von Kartoffelproteinen ist mittels EX M 1607 unter Erhaltung der biologischen Aktivität und unter Reduktion des α -Solaninsgehaltes durchführbar.

Erste Versuche zum Scale-Up dieses Systems mit einem Granulat, welches ähnliche Eigenschaften wie EX M 1607 aufweist, waren ebenfalls erfolgreich.

Die Verwendung des synthetischen Hydrotalcits Synthal 696 als kationisches System, führte zu einer selektiven Adsorption und Desorption der Patatine und weist somit sehr positive Eigenschaften in Hinblick auf eine Verwendung als Separationsmaterial auf.

Ausblick

In Zusammenarbeit mit der Emslandstärke in Emlichheim sind zunächst Versuche zur Abreicherung von Glykoalkaloiden im Technikumsmaßstab geplant. Zusätzlich soll die Separation der Kartoffelproteine in einem größeren Maßstab untersucht werden. Für dynamische Systeme wäre eine Einstellung der Partikelgröße der verwendeten Adsorbentien notwendig. Kleine Partikel resultieren zwar in eine hohe Trennleistung, allerdings steht dem ein Druckaufbau entgegen, der auch bei der Verwendung eines kaum quellenden Materials

wie EX M 1607 im Säulensystem im großen Maßstab zu einer zusätzlichen Herausforderung werden könnte. Eine Einstellung auf größere Partikeldurchmesser kann mittels Absiebung oder durch eine Granulierung erfolgen.

Des Weiteren ist die Anwendung von anorganischen Adsorbentien bei der Separation von Proteinen aus Zellkulturmedien, z. B. bei der fermentativen Herstellung technischer Enzyme, analog zur Separation der Kartoffelproteine, denkbar. Eine Abreicherung von unerwünschten Substanzen ist ebenso vorstellbar, wie die Bindung des Zielproteins. Je nach Einsatzbereich ist die Verwendung von Adsorbentien mit unterschiedlichen Eigenschaften möglich. Eine Modifikation der Adsorptionseigenschaften von Tonmineralen wird mit unterschiedlichen Methoden wie Calcinierung oder Säureaktivierung ermöglicht. Die Mischung von unterschiedlichen Materialien zur Erzielung bestimmter Adsorptionseigenschaften ist denkbar. Da auch die interkalierten Kationen einen Einfluss auf die Adsorptionseigenschaften ausüben, können die Eigenschaften von natürlichen Tonmineralen durch einen gezielten Austausch dieser Kationen variiert werden.

Die Ladungseigenschaften synthetischer Hydrotalcite sind durch die Einstellung des molaren Verhältnisses von Mg^{2+} und Al^{3+} modifizierbar. Der Einbau weiterer Elemente in die Hydrotalcitstruktur zur Veränderung der Eigenschaften ist ebenfalls möglich.

Aus der relativ großen Oberfläche natürlicher Tonminerale bzw. synthetischer Hydrotalcite resultieren relativ hohe Adsorptionskapazitäten für Proteine. Die einfache Durchführbarkeit der Adsorption von Proteinen an diese Materialien eröffnet des Weiteren die Möglichkeit, Tonminerale oder Hydrotalciten als kostengünstige Trägermaterialien für die Enzymimmobilisierung einzusetzen. Die biologische Aktivität von Proteinen bleibt häufig nach der Adsorption, besonders in der Nähe des IEP, weitestgehend erhalten.

Die Oberflächen anorganischer Adsorbentien könnten darüber hinaus, auf Grund der unterschiedlichen Wechselwirkungsmöglichkeiten mit unterschiedlichen (organischen) Liganden versehen werden, um weitere Funktionalitäten zu erhalten. Solche oberflächenmodifizierten Adsorbentien könnten mit einer spezifischeren Proteinbindung ebenfalls in Separationsprozessen eingesetzt werden.

7 Anhang

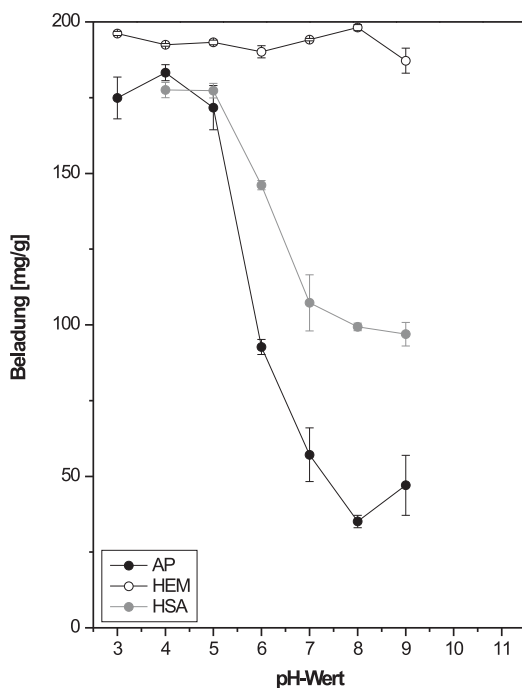
7.1 Ergänzende Daten

7.1.1 pH-Wert-abhängige Proteinadsorption an Tonminerale

Im Folgenden ist die pH-Wert-abhängige Adsorption weiterer Modellproteine an die Tonminerale EX M 1753 (Saponit), EX M 926 I (Kerolit/Saponit) und Puranit UF (Montmorillonit) als Ergänzung zu Abschnitt 3.3.1 dargestellt (Abbildung 7.1 bis 7.3).

EX M 1753 (Saponit)

Isoelektrischer Punkt < pH 7:



Isoelektrischer Punkt > pH 7:

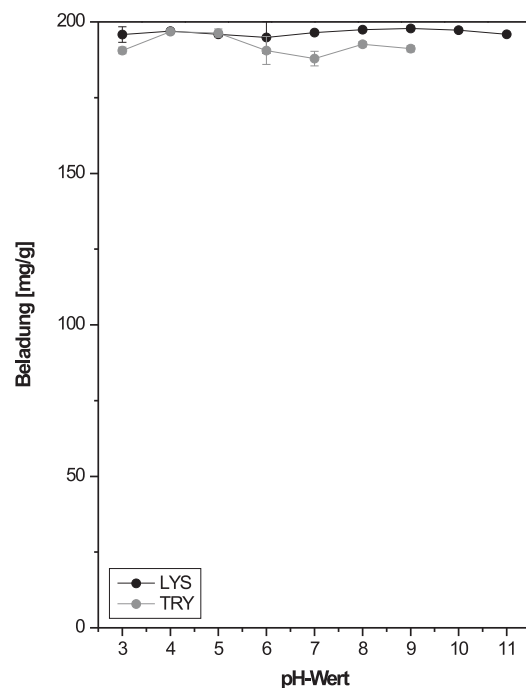
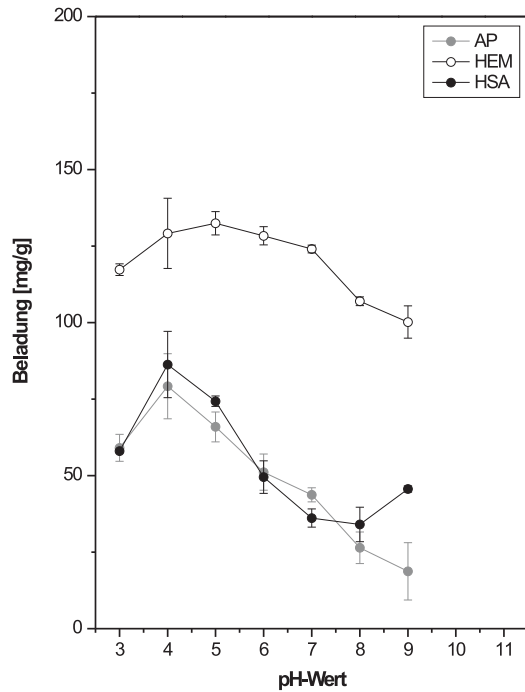


Abbildung 7.1: pH-Wert-abhängige Adsorption von Modellproteinen an EX M 1753 (Saponit). Links: Proteine mit einem IEP unter pH7, rechts: Proteine mit einem IEP über pH 7) Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt, die AnfangsproteinKonzentration betrug je 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

EX M 926 I (Kerolit/Saponit)

Isoelektrischer Punkt < pH 7:



Isoelektrischer Punkt > pH 7:

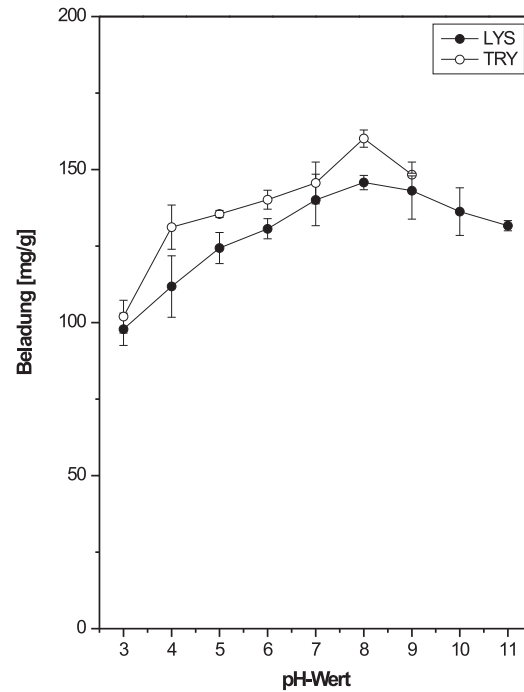


Abbildung 7.2: pH-Wert-abhängige Adsorption von Modellproteinen an EX M 926 I (Kerolit/Saponit). Links: Proteine mit einem IEP unter pH7, rechts: Proteine mit einem IEP über pH 7) Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt, die Anfangsproteinkonzentration betrug je 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

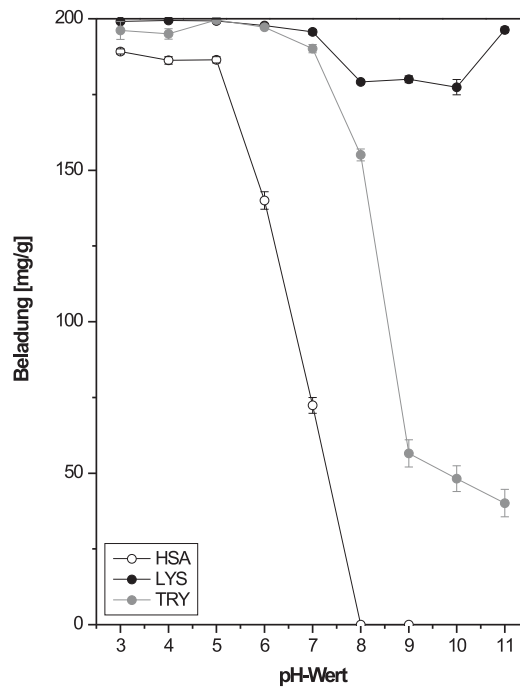
Puranit UF (Montmorillonit)

Abbildung 7.3: pH-Wert-abhängige Adsorption von HSA, Lysozym (LYS) und Trypsinogen (TRY) an Puranit UF. Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes durchgeführt, die Anfangsproteinkonzentration betrug je 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

7.1.2 Ionenstärkeabhängige Proteinadsorption an Tonminerale

Im Folgenden ist die Adsorption von Ovalbumin und humanem Serumalbumin an das Tonmineral EX M 926 I (Kerolit/Saponit) in Abhängigkeit von der Ionenstärke als Ergänzung zu den Daten in Abschnitt 3.5.4 dargestellt (Abbildung 7.4). Wie bei EX M 1607 (Montmorillonit/amorphes Silika) ist auch im Fall von EX M 926 I keine eindeutige Abhängigkeit der Adsorption von der Ionenstärke festzustellen.

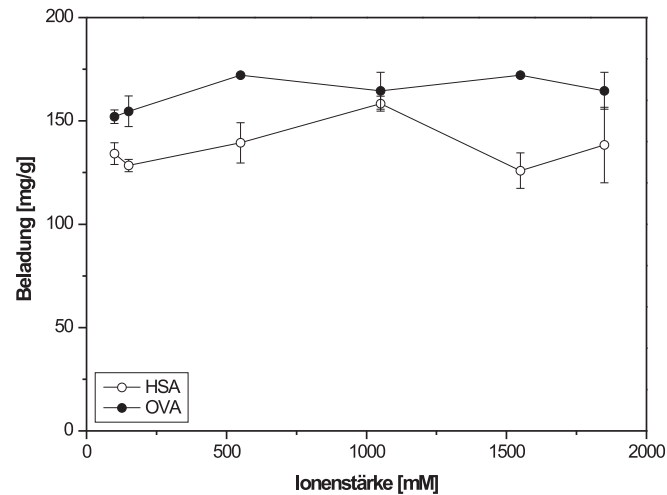


Abbildung 7.4: Adsorption von Ovalbumin (OVA) und humanem Serumalbumin (HSA) an EX M 926 I (Kerolit/Saponit) in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Die Adsorption erfolgte in 50 mM Acetatpuffer (pH 5,75) unter Zugabe von 50 bis 1800 mM NaCl. Die Anfangsproteinkonzentration betrug 1 mg/mL. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

7.1.3 Adsorptionsisothermen

Als Ergänzung zu den Daten in Abschnitt 3.5.2 ist in Abbildung die Adsorptionsisothermen von Ovalbumin an die Tonminerale EX M 1753 und EX M 926 I dargestellt. Die experimentell ermittelten Daten wurden an die Freundlich-Isotherme (Abb. 7.5 rechts) und an die Langmuir-Freundlich-Isotherme (Abb. 7.5 links) angepasst. Anhand der Regressionskoeffizienten bieten beide Modelle eine gute Anpassung der experimentellen Daten. So kann davon ausgegangen werden, dass auch im Fall von EX M 1753 und EX M 926 I die Proteinadsorption an die Oberflächen von heterogener Natur ist.

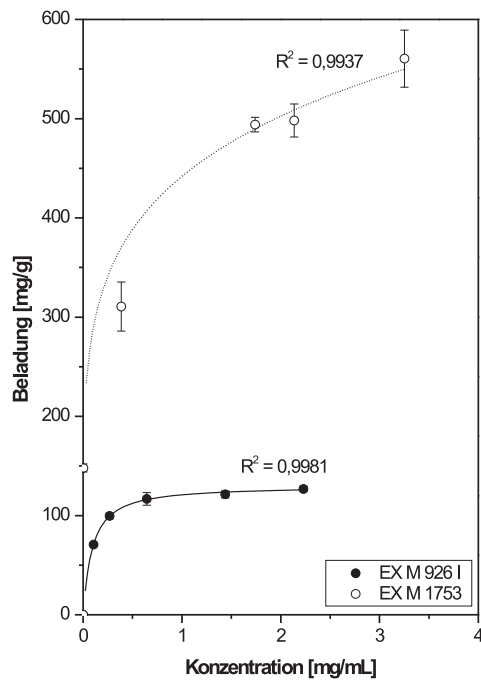
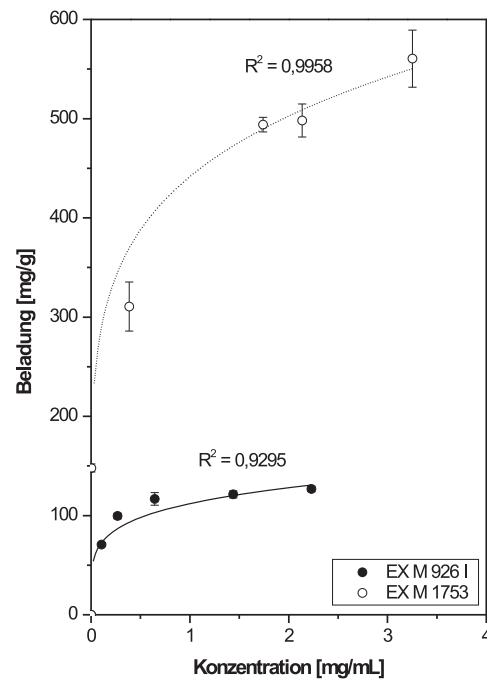
LF-Isotherme:Freundlich-Isotherme:

Abbildung 7.5: Adsorptionsisothermen von Ovalbumin an EX M 1753 und EX M 926 I. Die Adsorption wurde in 50 mM Puffer bei pH 5 durchgeführt. Die experimentell ermittelten Daten wurden an das Langmuir-Freundlich-Modell (rechts) und an das Freundlich-Modell (links) angepasst. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

7.1.4 Desorptionseigenschaften

In Abbildung 7.6 und 7.7 ist die Desorption von Ovalbumin von EX M 1753 (Saponit) und EX M 926 I (Kerolit/Saponit) als Ergänzung zu den Daten in Abschnitt 3.5.5 dargestellt. Die Durchführung erfolgte analog zu 3.5.5.

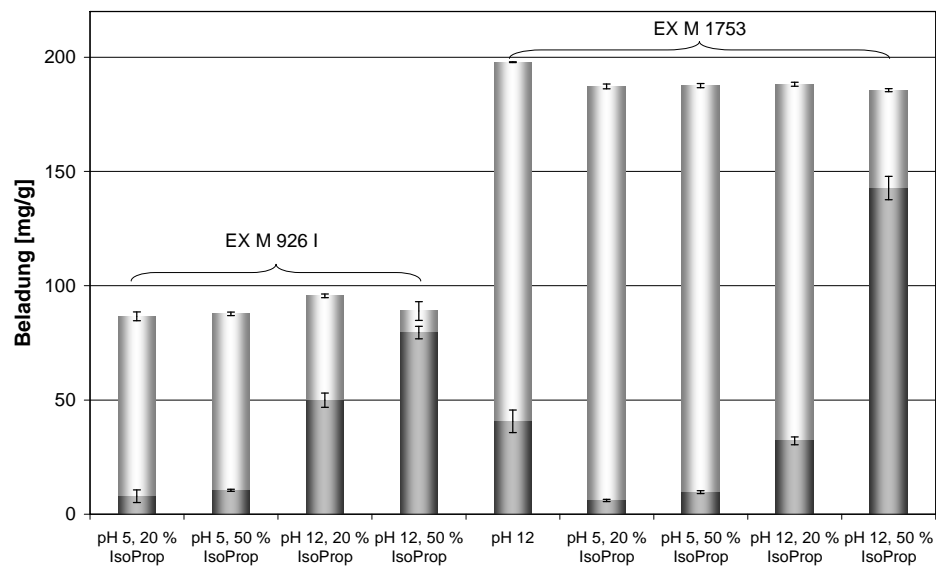


Abbildung 7.6: Desorption von Ovalbumin (EX M 1753 und EX M 926 I). Die Adsorption wurde bei pH 5 in 50 mM Acetatpuffer durchgeführt. Die Desorption wurde bei pH 5 (50 mM Acetat) bzw. pH 12 (50 mM Phosphat) unter Zusatz von 20 % bzw. 50 % Iso-Propanol untersucht. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

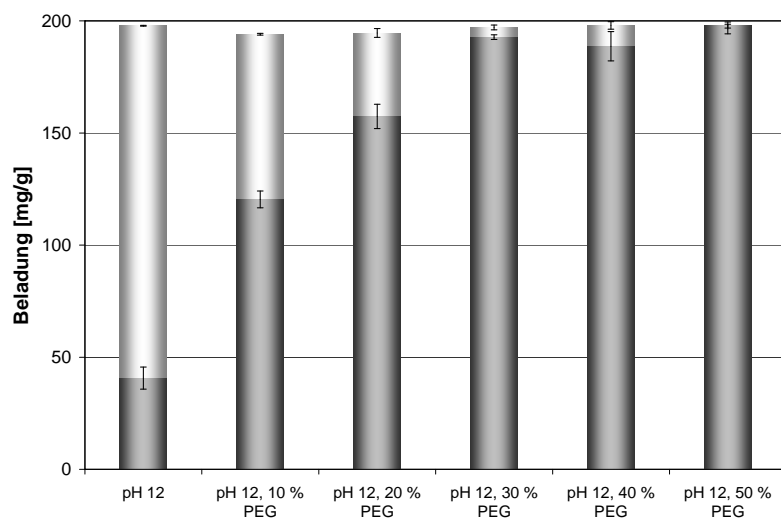
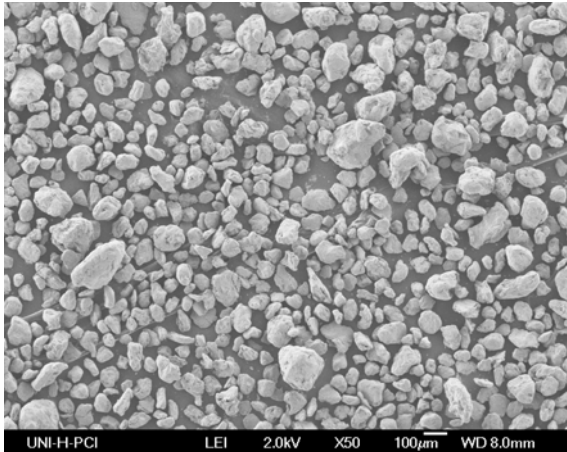


Abbildung 7.7: Desorption von Ovalbumin (EX M 1753). Die Adsorption wurde bei pH 5 in 50 mM Acetatpuffer durchgeführt. Die Desorption wurde bei pH 12 (50 mM Phosphat) unter Zusatz von 10-50 % Polyethylenglykol 200 (PEG) untersucht. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

7.1.5 REM-Aufnahmen

In den Abbildungen 7.8 bis 7.10 sind REM-Aufnahmen von Puranit UF, EX M 1753 und Synthal 696 in 50-facher und 1000-facher Vergrößerung dargestellt.

50-fache Vergrößerung



1000-fache Vergrößerung

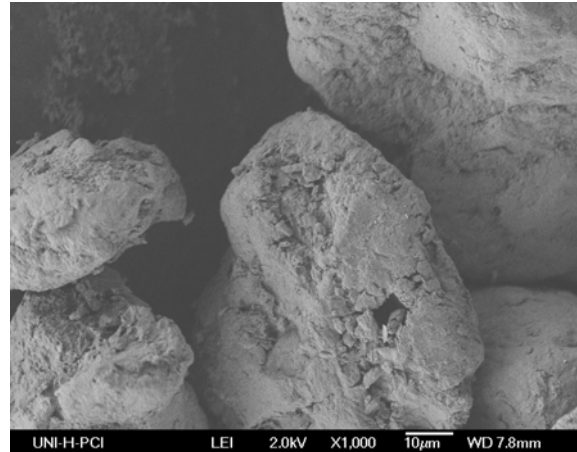
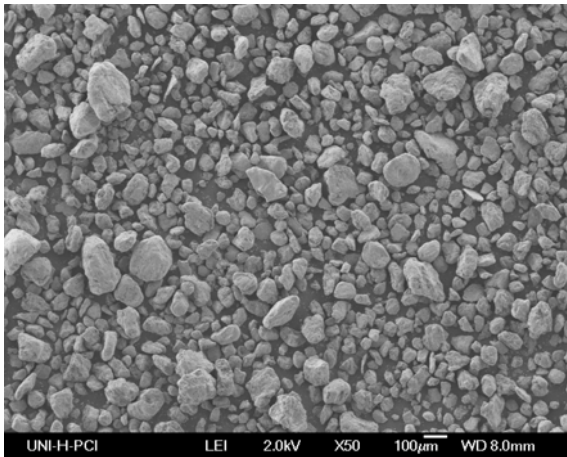


Abbildung 7.8: REM-Aufnahmen von Puranit UF „grob“.

50-fache Vergrößerung



1000-fache Vergrößerung

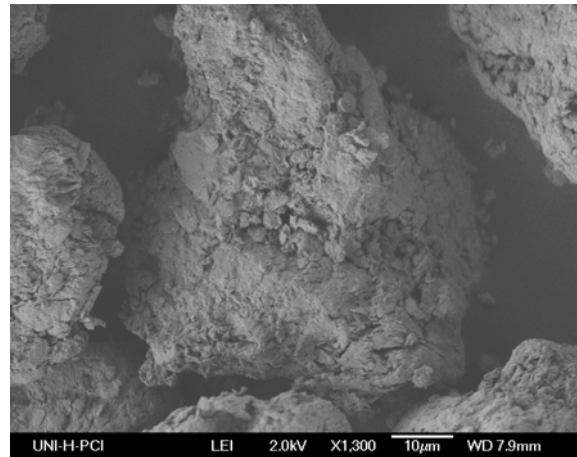


Abbildung 7.9: REM-Aufnahmen von EX M 1753 > 45 µm.

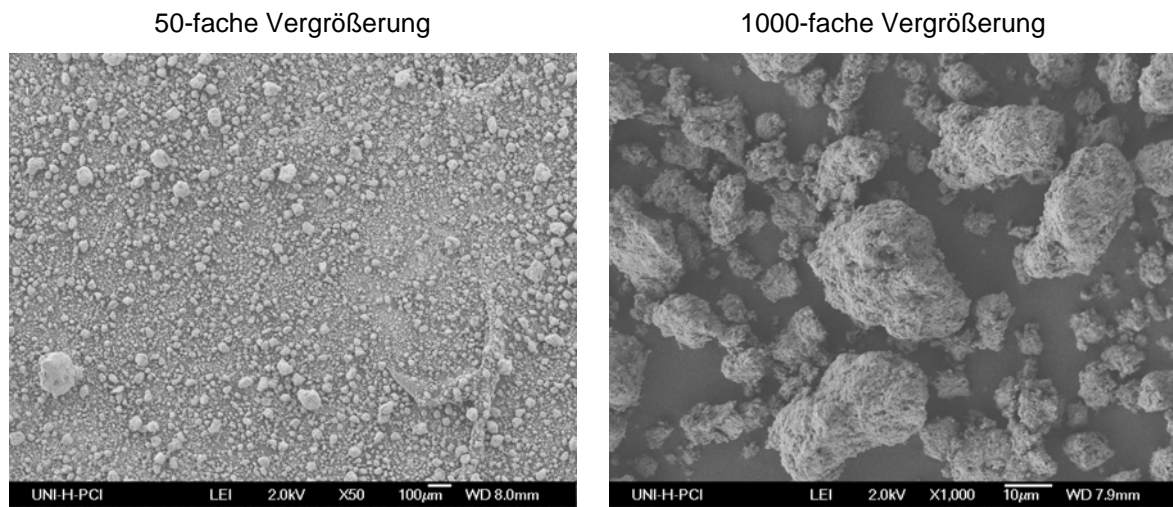


Abbildung 7.10: REM-Aufnahmen von Synthal 696.

7.1.6 Selektive Adsorption von Kartoffelproteinen

Im Folgenden ist die pH-Wert-abhängige Adsorption von KFW an EX M 1753 (Saponit) als Vergleich zu den Daten in Abschnitt 5.1.1 dargestellt. Abbildung 7.11 zeigt das SDS-PAGE-Gel der Überstände nach der Adsorption von Kartoffelbruchwasser an EX M 1753.

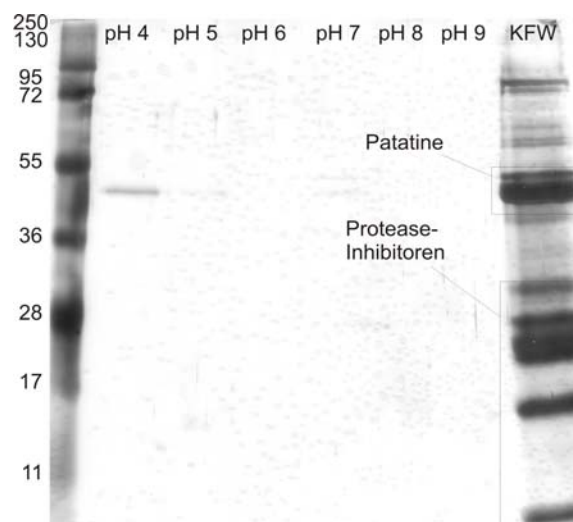


Abbildung 7.11: SDS-PAGE-Gel von KFW nach der Adsorption an EX M 1753 bei pH 4-9. (12 %iges Gel nach Silberfärbung)

7.1.7 Separation von Kartoffelproteinen mit calciniertem Puranit UF

Als Ergänzung zu den Daten in Abschnitt 5.2 (Separation von Patatine und Protease-Inhibitoren mittels Puranit UF unter statischen Bedingungen) ist im Folgenden die Separation der Kartoffelproteine unter den gleichen Bedingungen mittels der calcinierten Form von Puranit UF gezeigt. In Abbildung 7.12 ist das SDS-PAGE-Gel der aufgereinigten Proteinfraktionen dargestellt.

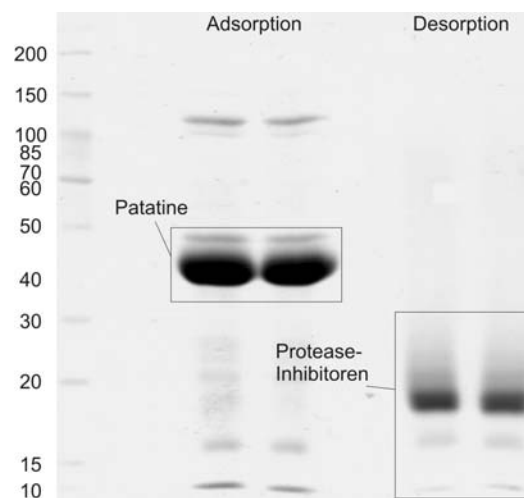


Abbildung 7.12: SDS-PAGE der mittels calciniertem Puranit UF aufgereinigten Proteinfraktionen nach Aufkonzentrierung und anschließender Lyophilisierung. Die Adsorption wurde bei pH 8 (50 mM Tris) durchgeführt. Die Desorption erfolgte bei pH 12 (100 mM Phosphat). (12 %iges Gel nach Coomassiefärbung)

Im Vergleich zu der Separation mit Puranit UF in der nicht calcinierten Form sind ausgehend von der SDS-PAGE mehr Verunreinigungen in den beiden Proteinfraktionen enthalten (vergl. Abschnitt 5.2).

7.1.8 Kartoffelproteinseparation mit EX M 1607-ähnlichen Granulat

In der Abbildung 7.13 ist als Ergänzung zu den Daten in Abschnitt 5.5.1 das Chromatogramm einer Separation von Kartoffelproteinen aus KFW mittels eines Granulates dargestellt, welches ähnliche Struktureigenschaften verfügt, wie EX M 1607. Das Granulat wies einen Partikeldurchmesser von ca. 0,3-0,8 mm auf. Die Bindung und Elution erfolgte

analog zu der Separation mit EX M 1607 in Abschnitt 5.5.1. Die Säule wurde mit 10 g des Materials befüllt. Abbildung 7.14 zeigt das SDS-PAGE-Gel der während des FPLC-Durchlaufes aufgefangenen Fraktionen.

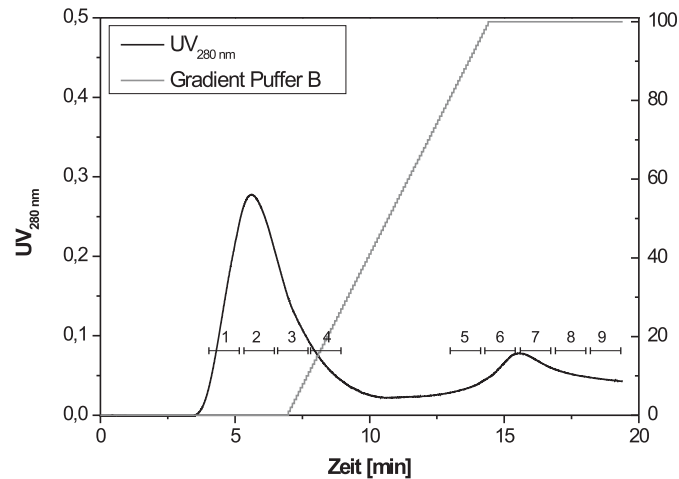


Abbildung 7.13: Chromatogramm der Separation von Kartoffelproteinen mittels präparativer HPLC mit einem EX M 1607-ähnlichen Granulat (0,3-0,8 mm). Flussrate: 2 mL/min. Probe: 2 mL KFW. Die Bindung der Proteine erfolgte bei pH 8,5 (Puffer A: 50 mM Tris), die Elution bei pH 12 (Puffer B: 100 mM Phosphat). Gradient: 100 % Puffer A → 100 % Puffer B.

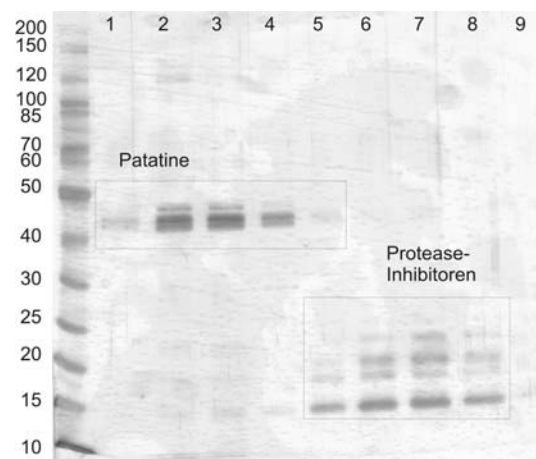


Abbildung 7.14: SDS-PAGE der mittels präparativer HPLC mit dem EX M 1607-ähnlichen Granulat aufgereinigten Proteinfractionen. Die mit 1-9 bezeichneten Bahnen entsprechen den Fraktionen 1-9 des Chromatogramms in Abbildung 7.13. (12 %iges Gel nach Silberfärbung)

7.2 Versuchsdurchführung

7.2.1 pH-Wert-abhängige Proteinadsorption

Zunächst wurden 25 mg des entsprechenden Adsorbens in 5 mL des entsprechenden Puffers (100 mM) in einem Überkopfmischer bei 15 rpm equilibriert. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4000 g wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Eine Lösung des entsprechenden Modellproteins mit einer Konzentration von 2 mg/mL (in ddH₂O) wurde nachfolgend mit dem entsprechenden Puffer (100 mM) im Verhältnis 1:1 vermischt und zu dem equilibrierten Adsorbens gegeben. Es wurden 2,5 mL der Proteinlösung und 2,5 mL des 100 mM Puffers verwendet (insgesamt 5 mg Protein in 50 mM Puffer). Das Adsorbens wurde in der gepufferten Proteinlösung vorsichtig resuspendiert und im Überkopfmischer für 1 h bei 0,5 rpm inkubiert. Nach Abzentrifugation wurde anhand der verbliebenen Proteinkonzentration im Überstand mit Hilfe einer Standardreihe des entsprechenden Proteins im entsprechenden Puffer die adsorbierte Proteinmenge bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde UV-photometrisch oder mittels BCA-Assay bestimmt. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Einstellung des pH-Werte wurden die Tabelle 7.1 aufgeführten Puffer verwendet.

Tabelle 7.1: Puffer zur Equilibrierung (100 mM) und Adsorption (50 mM).

pH	Puffer
3	Formiat
4	Acetat
5	Acetat
6	MES
7	HEPES
8	Tris-HCl
9	Tris-HCl
10	CAPS
11	CAPS
12	Phosphat

7.2.2 Aufnahme von Adsorptionsisothermen

Zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen wurde die Abhängigkeit der Gleichgewichtsbeladung der Adsorbentien von der Modellproteinkonzentration im Überstand untersucht. Die Versuche wurden für die einzelnen Proteine und Adsorbentien jeweils bei den pH-Werten und in den Puffern vorgenommen, für die die Maxima der Adsorption bei der pH-Wert-abhängigen Adsorption ermittelt wurden. Dazu wurde eine Proteinstammlösung mit einem Proteingehalt von 3 mg/mL in 50 mM Puffer hergestellt und nach der in Tabelle 7.2 angegebenen Vorschrift mit dem jeweiligen Puffer verdünnt zu 25 mg des mit dem entsprechenden Puffers equilibrierten Adsorbens gegeben.

Tabelle 7.2: Vorschrift zur Aufnahme von Protein-Adsorptionsisothermen.

Volumen Proteinstammlsg. [mL]	Volumen Puffer [mL]	Proteinkonz. [mg/mL]	Massenverhältnis Protein/Adsorbens
2	33	0,17	0,24
5	30	0,43	0,60
8	27	0,69	0,96
12	23	1,03	1,44
16	19	1,37	1,92
20	15	1,71	2,40
24	11	20,6	2,88

7.2.3 Zeitabhängige Adsorption

Zur Untersuchung der Bindungszeit der Proteinadsorption wurden je 25 mg Adsorbens in 15 mL-Falcontubes eingewogen und im entsprechenden Puffer equilibriert. Anschließend wurde das Adsorbens mit der Proteinlösung (1 mg/mL) in 50 mM Puffer des entsprechenden pH-Wertes in einem Überkopfmischer inkubiert. Die Inkubation wurde in Zeitintervallen mit Bindungszeiten von 1 bis 120 Minuten beendet, indem die Proben bei 5000 g für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Eine weitere Probe wurde für 24 Stunden mit der Proteinlösung inkubiert. Die Proteinkonzentrationen in den Probenüberständen wurden UV-Photometrisch anhand einer Standardreihe im entsprechenden Puffer bestimmt. Aus der Differenz der Proteinkonzentrationen vor und nach der Inkubation, sowie der eingesetzten

Masse des Adsorbens ergibt sich die Beladung zum entsprechenden Zeitpunkt. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.2.4 Adsorption in Abhängigkeit von der Ionenstärke

Die Bestimmung der Adsorption Abhängigkeit von der Ionenstärke erfolgte analog zur Adsorption in Abhängigkeit vom pH-Wert. Für die Adsorption wurde der pH-Wert gewählt, bei welchem das entsprechende Protein die höchste Adsorptionskapazität aufweist. 2,5 mL einer Proteinlösung (2 mg/mL in ddH₂O) wurden mit 2,5 mL des entsprechenden Puffers (100 mM) der gewünschten Ionenstärke gemischt und zu dem equilibrierten Adsorbens (25 mg) pipettiert. Die weitere Durchführung erfolgte analog zu Abschnitt 7.2.1. Nach Zentrifugation (10 Minuten bei 4000 g) wurde anhand der verbliebenen Proteinkonzentration im Überstand mit Hilfe einer Standardreihe des entsprechenden Proteins im entsprechenden Puffers mit der entsprechenden Ionenstärke die adsorbierte Proteinmenge bestimmt. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Einstellung der Ionenstärke wurden unterschiedliche NaCl-Konzentrationen gewählt, welche in Tabelle 7.3 dargestellt sind.

Tabelle 7.3: Verwendete Ionenstärken (NaCl-Konzentration plus 50 mM Pufferkonzentration).

NaCl-Konzentration im Puffer [mM]	Resultierende Ionenstärke der Probe [mM]
0	50
500	300
1000	550
1500	800
2000	1050
3000	1550
3600	1850

7.2.5 Desorption

Zunächst wurden 25 mg des entsprechenden Adsorbens in 5 mL des entsprechenden Puffers (100 mM) in einem Überkopfmischer bei 15 rpm equilibriert. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4000 g wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Eine Lösung des entsprechenden Modellproteins mit einer Konzentration von 2 mg/mL (in ddH₂O) wurde nachfolgend mit dem entsprechenden Puffer (100 mM) im Verhältnis vermischt und zu dem equilibrierten Adsorbens gegeben. Es wurden 2,5 mL der Proteinlösung und 2,5 mL des 100 mM Puffers verwendet (insgesamt 5 mg Protein in 50 mM Puffer). Das Adsorbens wurde in der gepufferten Proteinlösung vorsichtig resuspendiert und im Überkopfmischer für eine Stunde bei 0,5 rpm inkubiert. Nach Abzentrifugation wurde ein Aliquot des Überstandes zur Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen und der Rest des Überstandes verworfen. Nach Zugabe des Adsorptionspuffers (50 mM) wurde das Material zum Waschen 30 Minuten inkubiert (bei 0,5 rpm). Anschließend wurde das Adsorbens abzentrifugiert und ein Aliquot des Waschüberstandes zur Bestimmung der Proteinkonzentration wiederum aufgehoben und der Rest verworfen. Zur Desorption wurde der entsprechende Desorptionspuffer zugegeben und erneut bei 0,5 rpm für eine Stunde inkubiert. Die adsorbierte, ausgewaschene und desorbierte Proteinkonzentration wurde anschließend anhand der verbliebenen Proteinkonzentration im Überstand mit Hilfe einer Standardreihe des entsprechenden Proteins im entsprechenden Puffer bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde UV-photometrisch bestimmt. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.2.6 Adsorption unter dynamischen Bedingungen

Um die Eignung der Adsorbentien als Chromatographiematerialien zu überprüfen, wurden die Materialien in eine Chromatographiesäule (15 x 50 mm mit 10 µm PTFE-Fritten) gefüllt und bei verschiedenen Flussraten beladen. Dazu wurden jeweils 25 mL einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL in 50 mM des entsprechenden Puffers mittels einer FPLC-Pumpe durch die mit 100 oder 500 mg des Adsorbens gepackte Säule gepumpt. Die entsprechende Menge Adsorbens wurde dazu in einem Reaktionsgefäß mit 2 mL des entsprechenden 50 mM Puffers aufgeschlämmt und in die mit einem Stempel nach unten

verschlossene Säule pipettiert. Das zweite Säulenendstück wurde aufgesetzt und die Säule wurde mit der FPLC-Anlage so verbunden, dass sie von der mobilen Phase von unten nach oben durchströmt wurde. Die FPLC-Pumpe wurde auf die Flussrate eingeregelt, für die die Kapazität des Adsorbens ermittelt werden sollte. Der bewegliche Stempel der Säule wurde während der Equilibrierung mit 20 mL des 50 mM Puffers langsam handfest angezogen und anschließend um eine Viertel-Gewindedrehung entlastet. Die Proteinkonzentration des Durchlaufs wurde UV-Photometrisch bei 280 nm anhand einer Standardreihe im entsprechenden Puffer ermittelt. Die Differenz der Proteinmenge im Durchlauf und der aufgetragenen Lösung wurde als an das Adsorbens gebunden angenommen. Dividiert man diese Differenz durch die eingesetzte Masse des Adsorbens, so erhält man dessen Beladung bei der zugehörigen Flussrate.

7.2.7 α -Solaninadsorption und Desorption im Modellsystem

Für die Adsorption in Abhängigkeit vom pH-Wert wurden die Adsorbentien (10 mg) zunächst in dem entsprechenden Puffer (100 mM) equilibriert. Zur Adsorption wurde eine Stammlösung des α -Solanins mit 0,4 mg/mL in 1 mM HCl mit dem entsprechenden Puffer (100 mM) im Verhältnis 1:1 gemischt und zu dem equilibrierten Adsorbens gegeben, so dass die Solaninlösung eine Konzentration von 0,2 mg/mL mit einer Pufferkonzentration von 50 mM aufwies. Das α -Solanin wurde für zwei Stunden bei 0,5 upm mit dem Adsorbentmaterial inkubiert, dann bei 4000 g für 20 min abzentrifugiert und die α -Solaninkonzentration im Überstand mittels HPLC (s. Abschnitt 7.3.3) bestimmt.

Zur Desorption wurde das abzentrifugierte Adsorbens im entsprechenden Desorptionspuffer resuspendiert und für 2 Stunden bei RT im Überkopfmischer inkubiert. Anschließend wurde das Adsorbens wiederum bei 4000 g für 10 min abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurde zur Bestimmung der Glykoalkaloide wie oben beschrieben verfahren.

Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Adsorption von α -Solanin erfolgte analog zur zeitabhängigen Adsorption der Modellproteine (vergl. Abschnitt 7.2.3). Wie bei der pH-Wert-abhängigen Adsorption wurden 10 mg Adsorbens und eine α -Solaninlösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/mL in 50 mM des entsprechenden Puffers verwendet.

7.2.8 Proteinseparation aus KFW unter statischen Bedingungen

Für die pH-Wert-abhängige Adsorption von Kartoffelproteinen wurden die Adsorbentien mit den entsprechenden Puffern equilibriert. Dazu wurden 100 mg Adsorbens eingewogen und 5 mL des entsprechenden Puffers (100 mM) zugegeben. Das im Puffer suspendierte Adsorbens für eine Stunde in einem Überkopfmischer geschüttelt. Das Material wurde anschließend bei 4000 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zur Adsorption des Kartoffelfruchtwassers wurde das KFW 1:50 mit dem Puffer des entsprechenden pH-Wertes verdünnt und 5 mL davon zu dem equilibrierten Adsorbens gegeben. Das verdünnte KFW wurde für zwei Stunden bei 0,5 upm mit dem Adsorbens inkubiert, dann bei 4000 g für 10 min abzentrifugiert.

Zur Desorption wurden 5 mL des entsprechenden Desorptionspuffers zu dem beladenen Adsorbens gegeben und erneut für zwei Stunden bei 0,5 upm im Überkopfmischer geschüttelt. Nach jedem Schritt wurde ein Aliquot des Überstandes zur Untersuchung mittels SDS-PAGE aufbewahrt.

7.2.9 Proteinseparation aus KFW mittels präparativer HPLC

Die Proteinseparation wurde an einer FPLC-Anlage durchgeführt. Das Befüllen der Säule erfolgte analog zu 7.2.6. Das Adsorbens (500 mg oder 10 g) wurde in Chromatographiesäulen (15 x 50 mm bzw. 15 x 150 mm mit 10 µm PTFE-Fritten) gefüllt und bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie des UV-Detektors mit 50 mM Tris-Puffer, (pH 8-9) equilibriert. Anschließend erfolgte die Injektion von Kartoffelfruchtwasser (1,5 mL). Die Elution wurde mittels unterschiedlicher Gradienten optimiert. Die Fraktion, die sich im Durchlauf befand und die eluierte Fraktion wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE untersucht. Zur Bestimmung der biologischen Aktivität und des GA-Gehaltes wurden die Fraktionen mehrere FPLC-Durchläufe vereinigt, umgepuffert und aufkonzentriert.

7.2.10 Glykoalkaloidadsorption aus KFW

Zur Adsorption von Glykoalkaloiden aus KFW mit wurde das KFW 1:1 mit dem entsprechenden Puffer (100 mM) verdünnt und 10 mL davon mit 500 mg des equilibrierten Adsorbens für 2 Stunden bei RT in einem Überkopfmischer inkubiert. Dann wurde das Adsorbens bei 4000 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde die adsorbierte Proteinmenge mittels BCA-Assay anhand einer Standardreihen mit BSA im Überstand bestimmt. Die Bestimmung der Glykoalkaloidkonzentration erfolgte nach essigsaurer Extraktion und Festphasenextraktion mittels HPLC. Zur Desorption wurde das abzentrifugierte Adsorbens mit dem entsprechenden Desorptionspuffer resuspendiert und für 2 Stunden bei RT im Überkopfmischer inkubiert. Anschließend wurde das Adsorbens bei 4000 g für 10 min abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurde zur Proteinbestimmung und zur Bestimmung der Glykoalkaloide wie oben beschrieben verfahren.

7.3 Analytik

7.3.1 UV-photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die photometrische Quantifizierung von Proteinen basiert auf der Messung der UV-Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin (Phenolgruppe, 275 nm), Tryptophan (Indolgruppe, 279 nm) und in geringerem Maße auch Phenylalanin (257 nm) bei 280 nm. Es können je nach der Aminosäurezusammensetzung Konzentrationen zwischen 20 und 3000 $\mu\text{g/mL}$ Protein nachgewiesen werden. Zur Bestimmung einer unbekanntes Protein-konzentration wurden die Absorptionen einer Kalibrationsreihe von Lösungen mit bekannter Proteinkonzentration bei 280 nm gemessen. Anhand des linearen Zusammenhangs zwischen Absorption und Proteinkonzentration wurde sie unbekanntes Proteinkonzentration bestimmt. Ein Nachteil der UV-photometrischen Proteinquantifizierung ist die Störung der Messung durch Purin- bzw. Pyrimidinbasen der Nukleinsäuren, welche ebenfalls bei 280 nm absorbieren. Außerdem ist der Anteil der aromatischen Aminosäuren von Protein zu Protein unterschiedlich, so dass für eine Quantifizierung immer das reine Protein zur Herstellung eines Standards vorliegen muss. In Abbildung 7.15 ist exemplarisch eine Kalibrationsgerade zu UV-photometrischen

Quantifizierung von Proteinen anhand von Ovalbumin bei pH 5 in 50 mM Acetatpuffer dargestellt.

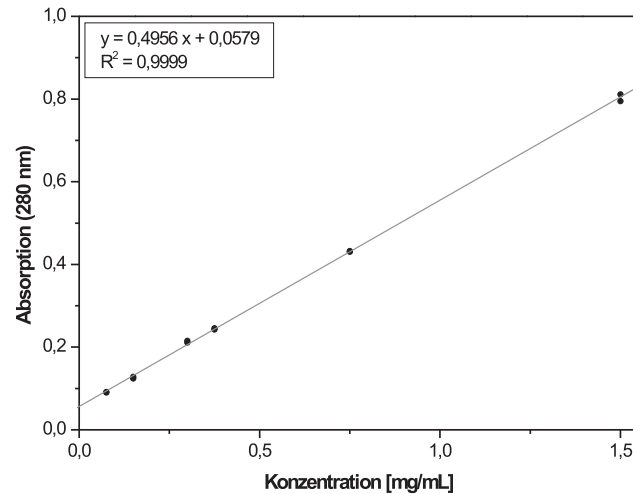


Abbildung 7.15: Beispiel einer Kalibriergerade (Ovalbumin, pH 5, 50 mM Acetat) zur UV-photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration.

7.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan sowie Peptidbindungen sind in der Lage Cu^{2+} zu Cu^+ zu reduzieren. Bicinchoninsäure (BCA) bildet spezifisch mit Cu^+ einen Farbkomplex, welcher kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt werden kann. Die Reaktion des BCA-Assays ist in Abbildung 7.16 dargestellt.

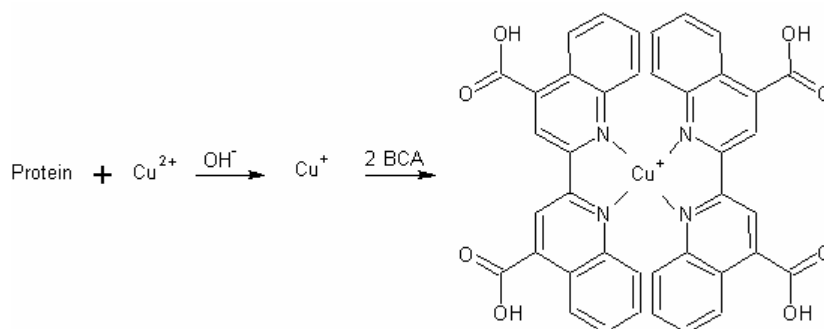


Abbildung 7.16: Reaktion des BCA-Assays.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen im Kartoffelfruchtwasser und in den Fraktionen der einzelnen Aufreinigungsschritte wurde das BCATM Protein Assay Kit von Pierce (Perbio, USA) verwendet. In einer 96-Lochplatte werden je 25 μL BSA-Standard und die Proben (gegebenenfalls verdünnt) sowie Blindwerte mit 200 μL Gebrauchslösung vorsichtig gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Gebrauchslösung wird direkt vor der Verwendung aus Reagenz A und Reagenz B (vergl. Tabelle 7.4) in einem Verhältnis von 50:1 hergestellt. Nach der Inkubation wird die 96-Lochplatte auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wird die Absorption bei 562 nm gemessen und anhand der Standardreihe die Proteinkonzentration in den Proben errechnet.

Tabelle 7.4: Zusammensetzung von Reagenz A und Reagenz B des BCA-Assays.

Reagenz A	Reagenz B
1,0 % Bicinchoninsäure	4,0 % Kupfersulfat
2,0 % Natriumbicarbonat	
0,16 % Natriumtartrat	
0,4 % Natriumhydroxyd (1 M)	
0,95 % Natriumcarbonat	

7.3.3 HPLC-Analytik von Glykoalkaloiden

Die Analytik von α -Solanin erfolgte nach einer Methode von Alt et al. (2005) [119]. Die α -Solanin- und α -Chaconinkonzentrationen mittels HPLC anhand von Standardkonzentrationen bestimmt. Bei den in Tabelle 7.5 aufgeführten Bedingungen hat α -Solanin eine Retentionszeit von ca. 13-14 min und α -Chaconin von etwa 6-7 min. Abbildung 7.17 zeigt eine Kalibrierung von α -Solanin.

Tabelle 7.5: Bedingungen der HPLC-Methode zur Glykoalkaloid-Analytik nach Alt et al. (2005).

Säule	Reposil-pur NH ₂ , 5 μm , 250 x 4 mm	Detektion	203 nm
Eluent A	20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 6	Elution	Isokratisch (25 % A, 75 % B)
Eluent B	Acetonitril	Flussrate	1,3 mL/min
Temperatur	40 °C	Injektionsvolumen	20 μL

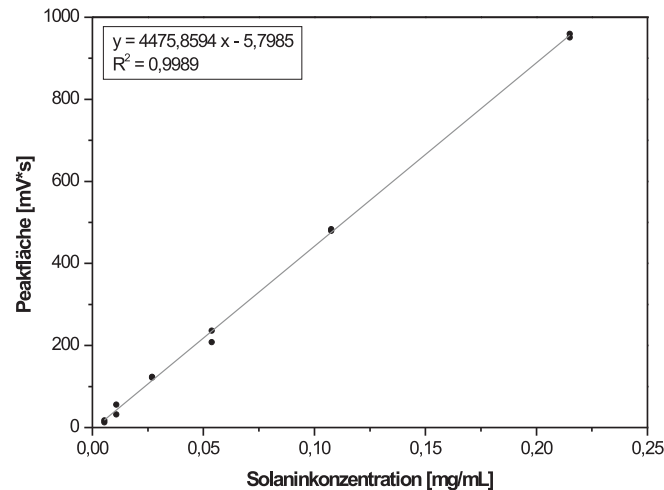


Abbildung 7.17: Beispiel einer Kalibriergerade für α -Solanin zur chromatographischen Bestimmung der α -Solaninkonzentration.

7.3.4 Essigsäure Extraktion und Festphasenextraktion

Die Extraktionsmethode ist angelehnt an eine Methode von Hellenäs et al. (1997) [115]. Zunächst wurde eine essigsäure Extraktion vorgenommen. Dafür wurden 10 mL Extraktionslösung (50 mL konzentrierte Essigsäure und 6,05 g Na_2SO_3 mit bidest. Wasser auf 1 L) mit 5 mL des KFW bzw. Adsorptionsüberstandes für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Ultraturrax homogenisiert und anschließend bei 5000 g für 30 Minuten abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Festphasenextraktion an Oasis[®] HLB-Kartuschen durchgeführt. Die Kartusche wurde zunächst mit 1 mL Methanol vorkonditioniert und mit 1 L bidest. Wasser equilibriert. Anschließend wurden 1-10 mL Probe aufgegeben. Nach einem kombinierten Waschschrift mit 2 mL HCl, 2 mL NH_3 und 2 mL 30 % Methanol + 70 % NH_3 erfolgte die Elution mit 1 mL Methanol. Das Eluat wurde mittels HPLC nach der unter 7.3.3 beschriebenen Methode analysiert. In Abbildung 7.18 ist ein Beispielchromatogramm von zwei Kartoffelfruchtwasserproben nach essigsaurer Extraktion und anschließender Festphasenextraktion gezeigt.

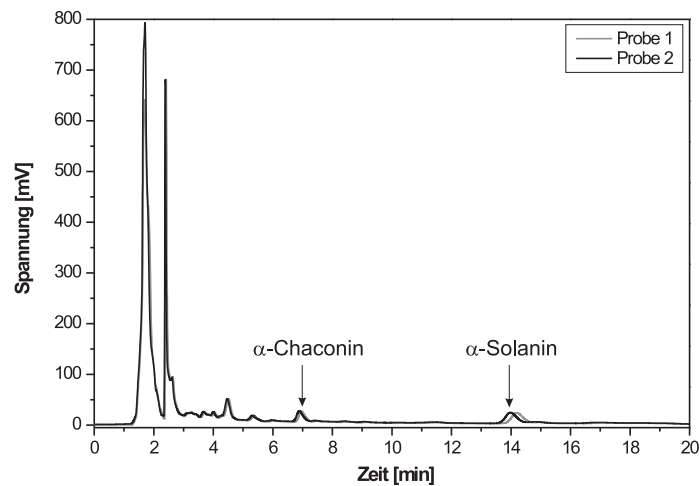


Abbildung 7.18: Chromatogramm von KFW nach essigsaurer Extraktion und Festphasenextraktion. α -Solanin zeigt eine Retentionszeit von ca. 14 Minuten. α -Chaconin retentiert nach etwa 7 Minuten.

7.3.5 Aktivitätsbestimmung von Patatin

Patatin weist eine Lipid-Acyl-Hydrolase-Aktivität auf. Als Substrat wurde p-Nitrophenolcaprat verwendet. In Abbildung 7.19 ist die Reaktion von p-Nitrophenolcaprat zu p-Nitrophenolat dargestellt. Die Freisetzung von p-Nitrophenolat kann bei 400 nm gemessen werden, so dass anhand der Anfangssteigung die Aktivität von Patatin bestimmt werden kann.

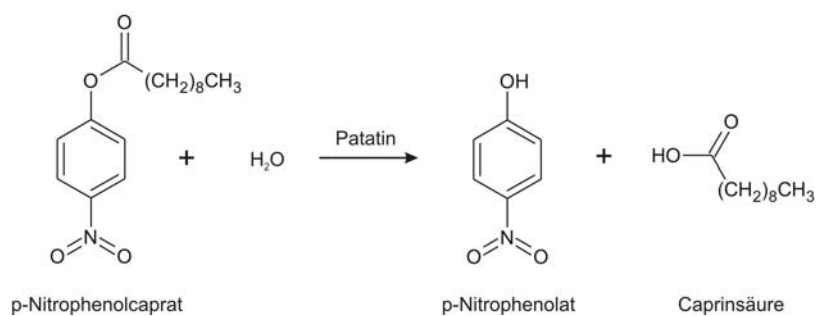


Abbildung 7.19: Umsetzung von p-Nitrophenolcaprat zu p-Nitrophenolat durch Patatin

Alle Lösungen wurden etwa 15 min auf 25 °C vortemperiert. In einer Halbmikroküvette wurden kurz vor der Reaktion 690 µL Tris-Puffer, 250 µL Triton-Lösung und 10 µL p-Nitrophenolcaprat-Lösung gemischt. Zum Starten der Reaktion wurden 50 µL Probe (evtl. mit Tris-Puffer, pH 8 verdünnt) zugegeben. Die Absorption wurde anschließend für 10 Minuten gemessen. Die verwendeten Reagenzien und Bedingungen sind in Tabelle 7.6 aufgeführt.

Tabelle 7.6: Reagenzien und Bedingungen zur Durchführung des Patatin-Aktivitätsassays.

Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8
Triton	4 mM Triton X-100 in 10 mM Tris-HCl, pH 8
Substrat-Stammlösung	10 mM p-Nitrophenolcaprat in ACN (HPLC grade)
Substratkonzentration im Ansatz	0,1 mM
Temperatur	25 °C
Wellenlänge	400 nm
Extrinktionskoeffizient	16888 L/mol·cm [193]
Schichtdicke	1 cm
Reaktionsvolumen	1 mL

7.3.6 Assay zur Aktivitätsbestimmung der Protease-Inhibitoren

In Abbildung 7.20 ist die Enzymreaktion von N- α -Tosyl-L-Argininmethylester (TAME) mit Trypsin dargestellt. Die für das Assay verwendeten Reagenzien und Bedingungen sind in Tabelle 7.7 aufgeführt.

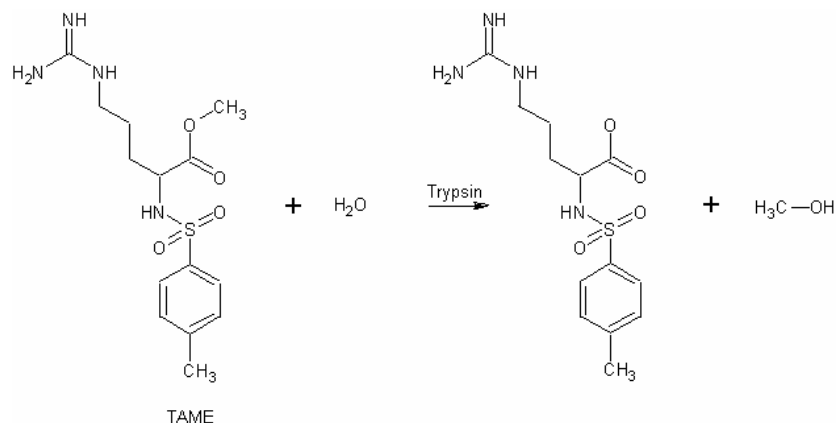


Abbildung 7.20: Enzymreaktion von N- α -Tosyl-L-Argininmethylester (TAME) mit Trypsin.

Tabelle 7.7: Reagenzien und Bedingungen zur Durchführung des Trypsin-Aktivitätsassays.

Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,3 mit 10 mM CaCl ₂
Substrat-Stammlösung	1,0 mg/mL TAME
Substratkonzentration im Ansatz	0,4 mg/mL (\approx 1 mM)
Trypsin-Stammlösung	0,1 mg/mL
Trypsinkonzentration im Ansatz	0,001 mg/mL
Temperatur	25 °C
Wellenlänge	247 nm
Extrinktionskoeffizient	449,5 L/mol·cm [193]
Schichtdicke	1 cm
Reaktionsvolumen	1 mL

Tris-Puffer und TAME-Lösung wurden etwa 15 Minuten auf 25 °C vortemperiert. Trypsin und Trypsin-Inhibitor wurden 1:1 (v/v) gemischt ebenfalls für 15 Minuten bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden 580 μ L Tris-Puffer und 400 μ L TAME-Lösung in einer UV-Halbmikroküvette gemischt und zum Starten der Reaktion 20 μ L des Trypsin-Inhibitor-Trypsin-Gemisches zugegeben. Die Absorption wurde anschließend für 30 Minuten gemessen.

7.3.7 SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) -Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Eigenladungen der Proteine werden dabei mit SDS, einem anionischen Detergenz, maskiert, sodass sich eine konstante Ladungsverteilung ergibt, und sich die Proteine nur abhängig von ihrer Masse und dem Vernetzungsgrad des Gels im elektrischen Feld bewegen. Als Trennmedium wird bei dieser Elektrophorese ein Gel auf Polyacrylamid-Basis verwendet. Die Migrationsgeschwindigkeit der Teilchen hängt dabei von der angelegten Spannung ab.

Zur Probenvorbereitung werden die Analyten mit einem Überschuss SDS versetzt und auf 95°C erhitzt, wodurch Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgebrochen werden. Durch vorherige Zugabe von reduzierend wirkendem 2-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken gespalten und dadurch das Protein irreversibel denaturiert.

SDS-Probenpuffer: 20 mM Tris-HCl
 2 mM EDTA (Natrium-Salz)
 5 % SDS
 0,02 % Bromphenolblau
 in 90 mL ddH₂O
 Vor der Verwendung werden 10 % 2-Mercaptoethanol und 10 %
 Glycerin zugesetzt

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0,1 % SDS
 pH 8,3

Zur Herstellung eines 12 %igen Polyacrylamid-Gels wurde zunächst das Trenngel angemischt und zwischen die beiden Glasplatten der Gießapparatur pipettiert. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Trenngel mit dem Sammelgel (6 %ig) überschichtet. Zur Generierung von Taschen im Gel wurde unmittelbar nach Einfüllen des Sammelgels ein Kamm hineingesteckt. Sobald das gesamte Gel auspolymerisiert ist, kann es zur Elektrophorese eingesetzt werden.

<i>Trenngel:</i>	2,92 mL Acrylamid (40 %ig)
	1,56 mL <i>N, N'</i> -Methylen-Bisacrylamid (2%ig)
	2,80 mL Tris (1,5 M) pH 8,8
	1 mL SDS (1 %ig)
	1,72 mL ddH ₂ O
	25 µL TEMED
	25 µL APS
<i>Sammelgel:</i>	731 µL Acrylamid (40 %ig)
	390 µL <i>N, N'</i> -Methylen-Bisacrylamid (2%ig)
	760 µL Tris (1,5 M) pH 6,8
	300 µL SDS (1 %ig)
	3,82 mL ddH ₂ O
	12,5 µL TEMED
	12,5 µL APS

Die Proben werden 1:1 mit SDS-Probenpuffer vermischt, bei 95°C für 5 min erhitzt und anschließend 3 Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Das vorbereitete Gel wurde in der Laufkammer befestigt und der TGS-Laufpuffer eingefüllt. Die vorbereiteten Proben (je 10-20 µL) sowie ein Proteingrößenmarker (4 µL) wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Zunächst wurde eine Spannung von 100 V angelegt, bis sich die Proben in einer dünnen Bande gesammelt haben. Anschließend wurde die Gleichspannung auf 200 V erhöht, bis die Elektrophorese beendet ist.

Coomassie-Färbung

Nach dem elektrophoretischen Trennvorgang wird das Gel in eine Färbelösung mit Coomassie-Brillant-Blue R 250 gegeben. Dieser Farbstoff lagert sich an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren an und führt damit zu einem unspezifischen Nachweis der Proteine. Bei dieser semi-quantitativen Methode werden Nachweisgrenzen im Bereich von 1-0,2 µg/Bande erreicht.

<i>Färbelösung:</i>	PhastGel Blue R-Tablette, 80 mL ddH ₂ O, 120 mL Methanol
<i>Entfärber:</i>	30 % Ethanol, 10 % Essigsäure in ddH ₂ O

Nach Waschen des Gels mit ddH₂O wurde dieses 1-2 Stunden in die Färbelösung eingelegt und auf eine Rüttelplatte gestellt. Anschließend wurde das gefärbte Gel in den Entfärber gelegt, bis nur noch die Proteinbanden blau eingefärbt sind (ca. 1 h). Der Entfärber wurde dabei alle 30 Minuten gewechselt.

Silber-Färbung

Die Silberfärbung basiert auf der Komplexbildung von Silberionen durch Aminosäureseitenketten. Die Proteinbanden werden durch Reduktion der Silberionen mit alkalischer Formaldehydlösung sichtbar gemacht. Für die Silberfärbung wurden die folgenden Reagenzien verwendet:

Entfärber/Fixierer: 400 mL EtOH, 400 mL ddH₂O, 80 mL CH₃COOH
Farmers Reducer: 1 Spatelspitze K₃[Fe(CN)₆], 1 Spatelspitze Na₂S₂O₃ in 100 mL ddH₂O
0,1 %ige Silbernitrat-Lsg.
2,5 %ige Natriumcarbonat-Lsg.
5 %ige Essigsäure
36,5 %ige Formaldehyd-Lösung.

Das Gel wurde für 30 Minuten in dem Entfärber/Fixierer geschwenkt und anschließend zweimal mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 2 Minuten in *Farmers Reducer* geschwenkt und dann bis zur vollständigen Entfärbung mehrmals mit ddH₂O gewaschen. Im Folgenden wurde das Gel für 30 Minuten in einer 0,1%igen Silbernitrat-Lösung inkubiert. Es wurde zweimal für jeweils 30 Sekunden mit ddH₂O und anschließend kurz in 2,5%iger Natriumcarbonat-Lsg. gewaschen. Zum Entwickeln wurde das Gel in einer Lösung aus 100 mL 2,5%iger Natriumcarbonat-Lsg. und 400 µL Formaldehyd-Lsg. inkubiert bis deutliche Banden sichtbar werden. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde das Gel für 10 Minuten in 5 %iger Essigsäure geschwenkt.

7.3.8 Bestimmung des Zetapotentials

Das Zetapotential ist abhängig vom pH-Wert der Lösung, mit der die Grenzfläche des Festkörpers oder des Partikels in Kontakt steht, der Art des eingesetzten Elektrolyts sowie

der Konzentration des Elektrolyts. Experimentell lässt sich das Zetapotential beispielsweise durch elektrokinetische Messungen bestimmen. Eine häufig verwendete Methode zur Bestimmung des Zetapotentials ist die Messung der elektrophoretischen Mobilität, anhand derer mittels der Helmholtz-Smoluchowski-Näherung das Zetapotential berechnet wird [196-198].

Das Zetapotential der Adsorbentien wurde bei der Surflay Nanotec GmbH bestimmt. Dafür wurde das zu messende Material im entsprechenden Puffer suspendiert. Vor der Messung wurde mit dem Puffer so lange verdünnt, bis das Gerät die optimale Detektionsrate von 1500-3000 KiloCounts/sek anzeigte. Anschließend wurde die Messzelle dreimal mit je 12 mL Wasser gespült. Nach einer erneuten Durchspülung (dreimal 4 mL der Pufferlösung) erfolgten die Befüllung der Messzelle mit der zu messenden Lösung sowie die Messung in Dreifachbestimmung.

7.4 Statistik

Ein Informationskriterium ist ein Kriterium zur Auswahl eines Modells in der angewandten Statistik. Dabei gehen die Anpassungsgüte des geschätzten Modells an die vorliegenden Daten und Komplexität des Modells, gemessen an der Anzahl der Parameter, in die Beurteilung ein. Die Anzahl der Parameter wird dabei „strafend“ berücksichtigt, da sonst umfassende Modelle mit vielen Parametern bevorzugt würden.

Allen heute verwendeten Informationskriterien ist gleich, dass sie in zwei verschiedenen Formulierungen vorliegen. Entweder ist das Maß für die Anpassungsgüte als die maximale Likelihood oder als die minimale Varianz der Residuen formuliert. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Interpretationsmöglichkeiten. Beim Ersteren ist das Modell "am besten", bei dem das jeweilige Informationskriterium den höchsten Wert hat (die "strafende" Anzahl der Parameter muss dabei abgezogen werden). Beim Letzteren ist das Modell mit dem niedrigsten Wert des Informationskriteriums am besten (die Anzahl der Parameter muss „strafend“ addiert werden.)

Das historisch älteste Kriterium wurde 1977 von Hirotugu Akaike als „an information criterion“ (engl.) vorgeschlagen [148]. Heutzutage ist es als Akaikes Informationskriterium (engl. *Akaike's Information Criterion, AIC*) bekannt. Es lässt sich mit der logarithmierten Likelihood-Funktion l wie folgt darstellen:

$$AIC_l = -l(\hat{\phi}, \hat{\theta} | \tilde{y}) + M \quad M \quad \text{Anzahl der geschätzten Parameter}$$

Unter Verwendung der minimalen Varianz der Residuen ergibt sich im klassischen Regressionsmodell mit normalverteilten Fehlern folgende Notation:

$$AIC_\sigma = \ln(\hat{\sigma}_Z^2) + \frac{M}{T} \cdot 2$$

M	Anzahl der geschätzten Parameter
T	Anzahl der beobachteten Stichprobenwerte
σ	Standardabweichung
Z	Störvariable
σ_Z^2	empirisch gemessene Varianz der Störvariablen Z

Der Nachteil des Informationskriteriums von Akaike ist, dass der Strafterm von der Stichprobengröße unabhängig ist. Bei großen Stichproben sind Verbesserungen der Log-Likelihood bzw. der Residualvarianz „leichter“ möglich, weshalb das Kriterium bei großen Stichproben tendenziell Modelle mit verhältnismäßig vielen Parametern vorteilhaft erscheinen lässt.

Literaturverzeichnis

- [1] D. Tunega, L. Benco, G. Haberhauer, M. Gerzabek, H. Lischka, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 11515.
- [2] B. Theng, *Clay. Clay Miner.* 30 (1982) 1.
- [3] G. Sposito, N. Skipper, R. Sutton, S. Park, A. Soper, J. Greathouse, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 3358.
- [4] E. Friebele, A. Shimoyama, C. Ponnampereuma, *J. Mol. Evol.* 16 (1980) 269.
- [5] F. Bergaya, B. Theng, G. Lagaly, *Handbook of Clay Science*, Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [6] E. Castro, J. Martins, *Int. J. Quantum Chem.* 103 (2005) 550.
- [7] M. Avena, C. De Pauli, *J. Colloid Interf. Sci.* 202 (1998) 195.
- [8] F. Annabibergaya, M. Cruz, L. Gatineau, J. Fripiat, *Clay Miner.* 14 (1979) 249.
- [9] A. Chatterjee, T. Iwasaki, T. Ebina, *J. Phys. Chem. A* 104 (2000) 8216.
- [10] J. Sanz, J. Robert, *Phys. Chem. Miner.* 19 (1992) 39.
- [11] J. Bujdak, B. Rode, *J. Mol. Evol.* 43 (1996) 326.
- [12] M. Malandrino, O. Abollino, A. Giacomino, M. Aceto, E. Mentasti, *J. Colloid Interf. Sci.* 299 (2006) 537.
- [13] G. Brindley, *B. Mineral.* 103 (1980) 395.
- [14] G. Besson, A. Mifsud, C. Tchoubar, J. Mering, *Clay Clay. Miner.* 22 (1974) 379.
- [15] R. Martin, S. Bailey, D. Eberl, D. Fanning, S. Guggenheim, H. Kodama, D. Pevear, J. Srodon, F. Wicks, *Clay. Clay Miner.* 39 (1991) 333.
- [16] J. Fripiat, M. Cruzcump., *Annu. Rev. Earth Pl. Sc.* 2 (1974) 239.
- [17] H. Wang, R. Dong, C. Liu, H. Chang, *J. Appl. Polym. Sci.* 104 (2007) 318.
- [18] L. Le Pluart, J. Duchet, H. Sautereau, P. Halley, *Appl. Clay Sci.* 25 (2004) 207.
- [19] A. Lasaga, *Rev. Geophys.* 30 (1992) 269.
- [20] W. Jaynes, S. Boyd, *Clay. Clay Miner.* 39 (1991) 428.

- [21] P. Luckham, S. Rossi, *Adv. Colloid Interfac.* 82 (1999) 43.
- [22] A. Aquino, D. Tunega, G. Haberhauer, M. Gerzabek, H. Lischka, *J. Comput. Chem.* 24 (2003) 1853.
- [23] A. Kriaa, N. Hamdi, E. Srasra, *Russ. J. Electrochem.* 43 (2007) 167.
- [24] A. Bajpai, R. Sachdeva, *J. Appl. Polym. Sci.* 85 (2002) 1607.
- [25] W. Gougeon, M. Soulard, M. Reinholdt, J. Miehe-Brendle, J. Chezeau, R. Le Dred, R. Marchal, P. Jeandet, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2003) 1366.
- [26] C. Yu, M. Norman, S. Newton, D. Miller, B. Teppen, L. Schafer, *J. Mol. Struct.* 556 (2000) 95.
- [27] A. De Cristofaro, A. Violante, *Appl. Clay Sci.* 19 (2001) 59.
- [28] I. Lundstrom, *Prog. Coll. Pol. Sci.* 70 (1985) 76.
- [29] H. Quiquampoix, R. Ratcliffe, *J. Colloid Interf. Sci.* 148 (1992) 343.
- [30] G. Keldsen, J. Nicholas, K. Carrado, R. Winans, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 279.
- [31] M. Brigatti, C. Lugli, S. Montorsi, L. Poppi, *Clay. Clay Miner.* 47 (1999) 664.
- [32] I. Lozzi, L. Calamai, P. Fusi, M. Bosetto, *Soil Biol. Biochem.* 33 (2001) 1021.
- [33] I. Lundstrom, *Phys. Scripta T4* (1983) 5.
- [34] J. Albert, R. Harter, *Soil Sci.* 115 (1973) 130.
- [35] K. Kuwajima, *Proteins* 6 (1989) 87.
- [36] H. Quiquampoix, S. Staunton, M. Baron, *Colloid. Surface. A* 75 (1993) 85.
- [37] N. Larsson, B. Siffert, *J. Colloid Interf. Sci.* 93 (1983) 424.
- [38] R. Gougeon, M. Reinholdt, L. Delmotte, J. Miehe-Brendle, J. Chezeau, R. Le Dred, R. Marchal, P. Jeandet, *Langmuir* 18 (2002) 3396.
- [39] R. Gougeon, M. Soulard, J. Miehe-Brendle, J. Chezeau, R. Le Dred, P. Jeandet, R. Marchal, *J. Agr. Food Chem.* 51 (2003) 4096.
- [40] T. Horbett, P. Weathersby, A. Hoffmann, *J. Bioeng.* 1 (1977) 61.
- [41] B. Young, W. Pitt, S. Cooper, *J. Colloid Interf. Sci.* 124 (1988) 28.
- [42] A. Bajpai, R. Sachdeva, *Colloid Polym. Sci.* 280 (2002) 892.

-
- [43] J. Bellot, J. Condoret, *Process Biochem.* 28 (1993) 365.
- [44] N. Evcim, M. Barr, *J. Am. Pharm. Assoc.* 44 (1955) 570.
- [45] M. Barr, E. Arnista, *J. Am. Pharm. Assoc.* 46 (1957) 486.
- [46] H. Huebner, S. Lemke, S. Ottinger, K. Mayura, T. Phillips, *Food Addit. Contam.* 16 (1999) 159.
- [47] E. Cohen, T. Joseph, I. Lapidés, S. Yariv, *Clay Miner.* 40 (2005) 223.
- [48] G. Pietramellara, M. Franchi, E. Gallori, *Biol. Fert. Soils* 33 (2001) 402.
- [49] G. Pietramellara, J. Ascher, M. Ceccherini, P. Nannipieri, D. Wenderoth, *Biol. Fert. Soils* 43 (2007) 731.
- [50] J. Rodriguez, A. Lopez, S. Bruque, *Clay. Clays Miner.* 36 (1988) 284.
- [51] F. Tsvetkov, U. Mingelgrin, M. Gal, *J. Therm. Anal.* 42 (1994) 113.
- [52] B. Bowman, R. Adams, S. Fenton, *J. Agr. Food Chem.* 18 (1970) 723.
- [53] K. Weissmahr, S. Haderlein, R. Schwarzenbach, R. Hany, R. Nuesch, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 240.
- [54] S. Haderlein, K. Weissmahr, R. Schwarzenbach, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 612.
- [55] P. Christian, A. Richards, T. Williams, *Appl. Environ. Microb.* 72 (2006) 4648.
- [56] S. Lipson, G. Stotzky, *FEMS Microbiol. Lett.* 37 (1986) 83.
- [57] D. Taylor, R. Moore, L. Sturman, *Appl. Environ. Microb.* 42 (1981) 976.
- [58] J. Ramu, K. Clark, G. Woode, A. Sarr, T. Phillips, *J. Food Protect.* 60 (1997) 358.
- [59] A. Huwig, S. Freimund, O. Kappeli, H. Dutler, *Toxicol. Lett.* 122 (2001) 179.
- [60] A. Dakovic, S. Matijasevic, G. Rottinghaus, D. Ledoux, P. Butkeraitis, Z. Sekulic, *Colloid. Surface. B* 66 (2008) 20.
- [61] E. Ruiz-Hitzky, M. Darder, P. Aranda, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 3650.
- [62] M. da Fonseca, R. Almeida, L. Arakaki, J. Espinola, C. Airoidi, *Colloid. Surface. A* 280 (2006) 39.
- [63] K. Yoon, H. Sung, Y. Hwang, S. Noh, D. Lee, *Appl. Clay Sci.* 38 (2007) 1.
- [64] S. Karaborni, B. Smit, W. Heidug, J. Urai, E. vanOort, *Science* 271 (1996) 1102.

- [65] L. Gorb, E. Aksenenko, J. Adams, S. Larson, C. Weiss, D. Leszczynska, J. Leszczynski, *J. Mol. Struct.-Theochem.* 425 (1998) 129.
- [66] A. Delville, *Langmuir* 7 (1991) 547.
- [67] L. Kajita, *Clay. Clay Miner.* 45 (1997) 609.
- [68] M. Sarmiento, J. Oliveira, R. Boulton, *Int. J. Food Sci. Tech.* 35 (2000) 41.
- [69] E. Foletto, C. Volzone, L. Porto, *Lat. Am. Appl. Res.* 36 (2006) 37.
- [70] M. Habile, P. Barlow, M. Hole, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69 (1992) 379.
- [71] M. Caglayan, S. Kafa, N. Yigit, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (2005) 599.
- [72] M. Sarmiento, J. Oliveira, M. Slatner, *Food Sci. Technol. Int.* 7 (2001) 217.
- [73] C. Aguzzi, P. Cerezo, C. Viseras, C. Caramella, *Appl. Clay Sci.* 36 (2007) 22.
- [74] J. de Melo, S. Cosnier, C. Mousty, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4037.
- [75] D. Shan, S. Cosnier, C. Mousty, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3872.
- [76] M. Carrasco, J. Rad, S. Gonzalezcarcedo, *Bioresource Technol.* 51 (1995) 175.
- [77] M. Cabezas, D. Salvador, J. Sinisterra, *J. Chem. Technol. Biot.* 52 (1991) 265.
- [78] X. Duan, D. Evans, *Layered Double Hydroxydes*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2006.
- [79] C. Barriga, M. Gaitan, I. Pavlovic, M. Ulibarri, M. Hermosin, J. Cornejo, *J. Mater. Chem.* 12 (2002) 1027.
- [80] K. Takagi, E. Harata, T. Shichi, T. Kanoh, Y. Sawaki, *J. Photoch. Photobio. A* 105 (1997) 47.
- [81] U. Costantino, M. Casciola, L. Massinelli, M. Nocchetti, R. Vivani, *Solid State Ionics* 97 (1997) 203.
- [82] M. Rahman, M. Basri, M. Hussein, R. Rahman, D. Zainol, A. Salleh, *Appl. Biochem. Biotech.* 118 (2004) 313.
- [83] M. Rahman, M. Basri, M. Hussein, M. Idris, R. Rahman, A. Salleh, *Catal. Today* 93-95 (2004) 405.
- [84] S. Aisawa, S. Takahashi, W. Ogasawara, Y. Umetsu, E. Narita, *J. Solid State Chem.* 162 (2001) 52.

-
- [85] N. Nhlapo, T. Motumi, E. Landman, S. Verryn, W. Focke, *J. Mater. Sci.* 43 (2008) 1033.
- [86] J. Choy, S. Kwak, Y. Jeong, J. Park, *Angew. Chem. Int. Edit.* 39 (2000) 4042.
- [87] J. Choy, J. Park, S. Kwak, Y. Jeong, Y. Han, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 341 (2000) 1229.
- [88] M. Ralet, J. Gueguen, *Lebensm.-Wiss. Technol.* 33 (2000) 380.
- [89] G. van Koningsveld, H. Gruppen, H. de Jongh, G. Wijngaards, M. van Boekel, P. Walstra, A. Voragen, *J. Agr. Food Chem.* 49 (2001) 4889.
- [90] L. Pouvreau, H. Gruppen, S. Piersma, L. van den Broek, G. van Koningsveld, A. Voragen, *J. Agr. Food Chem.* 49 (2001) 2864.
- [91] G. van Koningsveld, H. Gruppen, H. de Jongh, G. Wijngaards, M. van Boekel, P. Walstra, A. Voragen, *J. Sci. Food Agr.* 82 (2002) 134.
- [92] A. Pots, H. Gruppen, R. van Diepenbeek, J. van der Lee, M. van Boekel, G. Wijngaards, A. Voragen, *J. Sci. Food Agr.* 79 (1999) 1557.
- [93] H. Zwijnenberg, A. Kemperman, M. Boerrigter, M. Lotz, J. Dijksterhuis, P. Poulsen, G. Koops, *Desalination* 144 (2002) 331.
- [94] A. Pots, H. de Jongh, H. Gruppen, M. Hessing, A. Voragen, *J. Agr. Food Chem.* 46 (1998) 2546.
- [95] P. Pinsirodom, K. Parkin, *J. Agr. Food Chem.* 48 (2000) 155.
- [96] P. Shewry, *Ann. Bot.* 91 (2003) 755.
- [97] W. Park, C. Blackwood, G. Mignery, M. Hermodson, R. Lister, *Plant Physiol.* 71 (1983) 156.
- [98] H. Hirschberg, J. Simons, N. Dekker, M. Egmond, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5037.
- [99] U. Sonnewald, A. Sturm, M. Chrispeels, L. Willmitzer, *Planta* 179 (1989) 171.
- [100] B. Juliano, *Food Rev. Int.* 15 (1999) 399.
- [101] S. Desborough, I. Liener, E. Lulai, *Qual. Plant.* 31 (1981) 11.
- [102] J. Bohac, *J. Agr. Food Chem.* 39 (1991) 1411.
- [103] D. Knorr, *Lebensm. Wiss. Technol.* 11 (1978) 109.

- [104] L. Pouvreau, H. Gruppen, G. van Koningsveld, L. van den Broek, A. Voragen, J. Agr. Food Chem. 51 (2003) 5001.
- [105] L. Pouvreau, H. Gruppen, G. van Koningsveld, L. van den Broek, A. Voragen, J. Agr. Food Chem. 52 (2004) 7704.
- [106] T. Valueva, T. Revina, V. Mosolov, R. Mentele, Biol. Chem. 381 (2000) 1215.
- [107] T. Valueva, T. Revina, E. Gvozdeva, N. Gerasimova, O. Ozeretskovskaya, Russ. J. Bioorg. Chem. 29 (2003) 454.
- [108] L. Pouvreau, T. Kroef, H. Gruppen, G. van Koningsveld, L. van den Broek, A. Voragen, J. Agr. Food Chem. 53 (2005) 5739.
- [109] A. Kennedy, Am. J. Clin. Nutr. 68 (1998) 1406S.
- [110] A. Kennedy, Pharmacol. Therapeut. 78 (1998) 167.
- [111] L. van den Broek, L. Pouvreau, G. Lommerse, B. Schipper, G. van Koningsveld, H. Gruppen, J. Agr. Food Chem. 52 (2004) 4928.
- [112] L. Fenoll, J. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Sevilla, P. Garcia-Ruiz, R. Varon, F. Garcia-Canovas, J. Tudela, BBA Protein Struct. M. 1548 (2001) 1.
- [113] R. Yoruk, M. Marshall, J. Food Biochem. 27 (2003) 361.
- [114] A. Tajner-Czopek, M. Jarych-Szyszk, G. Lisinska, Food Chem. 106 (2008) 706.
- [115] K. Hellenas, C. Branzell, J. AOAC Int. 80 (1997) 549.
- [116] M. Friedman, J. Agr. Food Chem. 54 (2006) 8655.
- [117] R. Machado, M. Toledo, L. Garcia, Food Control 18 (2007) 503.
- [118] H. Kodamatani, K. Saito, N. Niina, S. Yamazaki, Y. Tanaka, J. Chromatogr. A 1100 (2005) 26.
- [119] V. Alt, R. Steinhof, M. Lotz, R. Ulber, C. Kasper, T. Scheper, Eng. Life Sci. 5 (2005) 562.
- [120] S. Osman, Food Chem. 11 (1983) 235.
- [121] M. Backleh, P. Ekici, G. Leupold, M. Coelhan, H. Parlar, J. Sep. Sci. 27 (2004) 1042.
- [122] J. Zhao, M. Camire, R. Bushway, A. Bushway, J. Agr. Food Chem. 42 (1994) 2570.
- [123] P. Slanina, Food Chem. Toxicol. 28 (1990) 759.

-
- [124] A. Sotelo, B. Serrano, *J. Agr. Food Chem.* 48 (2000) 2472.
- [125] S. Yang, S. Paek, N. Kozukue, K. Lee, J. Kim, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 839.
- [126] T. Johns, *J. Chem. Ecol.* 12 (1986) 635.
- [127] V. Arkhypova, S. Dzyadevycg, A. Soldatkin, A. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 1047.
- [128] J. Roddick, *Phytochemistry* 28 (1989) 2631.
- [129] M. McWilliams, J. Blankemeyer, M. Friedman, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 853.
- [130] J. Blankemeyer, B. Stringer, J. Rayburn, J. Bantle, M. Friedman, *J. Agr. Food Chem.* 40 (1992) 2022.
- [131] E. Keukens, T. deVrije, C. vandenBoom, P. deWaard, H. Plasman, F. Thiel, V. Chupin, W. Jongen, B. deKruijff, *BBA Biomembranes* 1240 (1995) 216.
- [132] M. Friedman, K. Lee, H. Kim, I. Lee, N. Kozukue, *J. Agr. Food Chem.* 53 (2005) 6162.
- [133] K. Lee, N. Kozukue, J. Han, J. Park, E. Chang, E. Baek, J. Chang, M. Friedman, *J. Agr. Food Chem.* 52 (2004) 2832.
- [134] P. Trouillas, C. Corbiere, B. Liagre, J. Duroux, J. Beneytout, *Bioorgan. Med. Chem.* 13 (2005) 1141.
- [135] P. Vronen, N. Koval, A. de Groot, *Arkivoc* (2004) 24.
- [136] P. Vronen, Wageningen Universiteit, Dissertation, Wageningen (2003).
- [137] E. Boschetti, *J. Chromatogr. A* 658 (1994) 207.
- [138] G. Lagaly, Jasmund, K. Tonminerale und Tone. Struktur, Eigenschaften, Anwendung und Einsatz in Industrie und Umwelt. (1993), Steinkopf, Darmstadt
- [139] P. Ey, E. Ferber, *Biochim. Biophys. Acta* 480 (1977) 403.
- [140] S. Johnston, W. Deen, *J. Membrane Sci.* 153 (1999) 271.
- [141] J. Guisan, A. Bastida, C. Cuesta, R. Fernandez-Lafuente, C. Rosell, *Biotechnol. Bioeng.* 38 (1991) 1144.
- [142] M. LeMaire, E. Rivas, J. Moller, *Anal. Biochem.* 106 (1980) 12.
- [143] N. Sattarahmady, A. Moosavi-Movahedi, F. Ahmad, G. Hakimelahi, M. Habibi-Rezaei, A. Saboury, N. Sheibani, *BBA - Gen. Subjects* 1770 (2007) 933.

- [144] M. Khan, S. Muzammil, S. Tayyab, *BBA - Protein Struct. M* 1479 (2000) 103.
- [145] J. de la Torre, M. Huertas, B. Carrasco, *Biophys. J.* 78 (2000) 719.
- [146] A. Bonincontro, G. Risuleo, *Spectrochim. Acta A* 59 (2003) 2677.
- [147] B. Batas, H. Jones, J. Chaudhuri, *J. Chromatogr. A* 766 (1997) 109.
- [148] A. Alobeidi, *A. Light, J. Biol. Chem.* 263 (1988) 8642.
- [149] K. Emmerich, A. Steudel, R. Schuhmann, P. Weidler, F. Ruf, U. Sohling
Mineralogical characterization of a sepiolite containing natural fast filtration
bleaching earth suitable for bioseparation, *Applied Clay Science*; in Vorbereitung
- [150] M. De Oliveira, C. Johnston, G. Premachandra, B. Teppen, H. Li, D. Laird, D. Zhu,
S. Boyd, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 9123.
- [151] V. Botella, V. Timon, E. Escamilla-Roa, A. Hernandez-Languna, C. Sainz-Diaz,
Phys. Chem. Miner. 31 (2004) 475.
- [152] A. McLaren, *J. Phys. Chem. US* 58 (1954) 129.
- [153] R. Sips, *J. Chem. Phys.* 16 (1948) 490.
- [154] R. Umpleby, S. Baxter, Y. Chen, R. Shah, K. Shimizu, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4584.
- [155] A. Zimmermann, K. Goyne, J. Chorover, S. Komarneni, S. Brantley, *Org. Geochem.*
35 (2004) 355.
- [156] S. Sharma, G. Agarwal, *Anal. Biochem.* 288 (2001) 126.
- [157] interne Daten der Süd Chemie AG, Moosburg: D. Riechers, C. Kasper, T. Scheper;
Projektstudie zur Bindung von technischen Proteinen an Bentonite. (2003),
Universität Hannover
- [158] H. Akaike, *Ann. I. Stat. Math.* 22 (1970) 203.
- [159] E. Bedrick, C. Tsai, *Biometrics* 50 (1994) 226.
- [160] S. Calis, R. Jeyanthi, T. Tsai, R. Mehta, P. Deluca, *Pharmaceut. Res.* 12 (1995)
1072.
- [161] I. Lundstrom, *Prog. Coll. Pol. Sci.* 70 (1985) 76.
- [162] J. Voegel, N. Debaillo, J. Sturm, A. Schmitt, *Colloid. Surface.* 10 (1984) 9.
- [163] G. Rowe, A. Margaritis, Q. Lan, A. Bassi, J. Zhu, *Biotechnol. Bioeng.* 65 (1999)
613.

-
- [164] N. Barnthip, H. Noh, E. Leibner, E. Vogler, *Biomaterials* 29 (2008) 3062.
- [165] R. Necina, K. Amatschek, A. Jungbauer, *Biotechnol. Bioeng.* 60 (1998) 689.
- [166] K. Ralla, F. Anton, T. Scheper, C. Kasper,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.102> (2008).
- [167] A. Ljunglof, K. Lacki, J. Mueller, C. Harinarayan, R. van Reis, R. Fahrner, J. Van Alstine, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 515.
- [168] B. Johansson, M. Belew, S. Eriksson, G. Glad, O. Lind, J. Maloisel, N. Norrman, J. *Chromatogr. A* 1016 (2003) 35.
- [169] B. Johansson, M. Belew, S. Eriksson, G. Glad, O. Lind, J. Maloisel, N. Norrman, J. *Chromatogr. A* 1016 (2003) 21.
- [170] C. Buttersack, K. Nowikow, A. Schaper, K. Buchholz, *Zuckerindustrie* 119 (1994) 284.
- [171] D. Ejima, R. Yumioka, K. Tsumoto, T. Arakawa, *Anal. Biochem.* 345 (2005) 205.
- [172] M. Kastner, *Journal of Chromatography Library-Volume 61*, (2000), Elsevier, S. 5-32
- [173] D. Harvey, D. Wing, B. Kuster, I. Wilson, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 11 (2000) 564.
- [174] K. Niikura, R. Kamitani, M. Kurogochi, R. Uematsu, H. Nakagawa, K. Deguchi, K. Monde, H. Kondo, S. Nishimura, *Chem. Eur. J.* 11 (2005) 3825.
- [175] S. Brethauer, *Anwendungsmöglichkeiten von Hydrotalcit zur DNA-Aufreinigung*, Diplomarbeit im Fachbereich Chemie, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover (2001)
- [176] S. Servagent-Noinville, M. Revault, H. Quiquampoix, M. Baron, *J. Colloid Interf. Sci.* 221 (2000) 273.
- [177] C. Van Oss, R. Giese, Z. Li, K. Murphy, J. Norris, M. Chaudhury, R. Good, *J. Adhes. Sci. Technol.* 6 (1992) 413.
- [178] G. Sposito, R. Prost, *Chem. Rev.* 82 (1982) 553.
- [179] W. Bleam, G. Welhouse, M. Janowiak, *Clay. Clay Miner.* 41 (1993) 305.
- [180] V. Farmer, J. Russell, *T. Faraday Soc.* 67 (1971) 2737.
- [181] G. Gerstner, *Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Lebensmittel: Glykoalkaloide in transgenen Kartoffeln*, Herbert Utz Verlag, München, 2000.

- [182] H. Malandrini, F. Clauss, S. Partyka, J. Douillard, J. Colloid. Interf. Sci. 194 (1997) 183.
- [183] L. Michot, F. Villieras, M. Francois, J. Yvon, R. Ledred, J. Cases, Langmuir 10 (1994) 3765.
- [184] G. Suraj, C. Iyer, M. Lalithambika, Appl. Clay Sci. 13 (1998) 293.
- [185] H. Sun, J. Phys. Chem. B 102 (1998) 7338.
- [186] J. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Villa, L. Kale, K. Schulten, J. Comput. Chem. 26 (2005) 1781.
- [187] LAMMPS: LAMMPS Molecular Dynamics Simulator by Sandia National Laboratories, S. J. Plimpton, Fast Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics, J Comp Phys, 117, 1-19 (1995)
- [188] G. Kaichouh, N. Oturan, K. El Kacemi, Environ. Bull. (2007) 1137.
- [189] A. Bajpai, R. Sachdeva, J. Appl. Polym. Sci. 78 (2000) 1656.
- [190] D. Racusen, M. Foote, J. Food Biochem. 4 (1980) 43.
- [191] F. Menzel, Proteinauftrennung aus Standardproteinmischungen und industriellem Kartoffelfruchtwasser mittels Membranadsorber (Dissertation), Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2006.
- [192] R. Steinhof, Aufbau eines Downstream-Prozesses zur Proteingewinnung mittels Membrantechnologie am Beispiel von Kartoffelfruchtwasser (Dissertation), Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2007
- [193] V. Alt, Entwicklung verschiedener Aufreinigungs- und Analysestrategien für Proteine und Glykoalkaloide in Kartoffelfruchtwasser (Dissertation), Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2006.
- [194] A. Pots, H. De Jongh, H. Gruppen, R. Hamer, A. Voragen, Eur. J. Biochem. 252 (1998) 66.
- [195] U. Sohling, A. Gerleigner, A. Langenpreising, D. Riechers, C. Kasper, T. Scheper, Deutsches Patent-und Markenamt, Verfahren zur Abtrennung von Proteinen aus flüssigen Medien unter Verwendung thermisch modifizierter Tonmaterialien (DE 10 2006 023 822 A1 2007.12.06), 2006.
- [196] N. Tekin, O. Demirbas, M. Alkan, Micropor. Mesopor. Mat. 85 (2005) 340.
- [197] S. Isci, E. Gunister, A. Alemdar, O. Ece, N. Gungor, Mater. Lett. 62 (2008) 81.
- [198] Y. Yukselen, A. Kaya, Water Air Soil Poll. 145 (2003) 155.

Geräte, Materialien und Chemikalien

Geräte

Analysenwaage Analytic AC 210 S	Sartorius AG, Göttingen
Autosampler Triathlon	Spark Holland, Emmen, Niederlande
Degasser (HPLC) TS 7505	Sykam GmbH, Gilching, Deutschland
FPLC-System BioLogic DuoFlow	Biorad, UK
Gießapparatur Gelelektrophorese	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Heofer ES 245 Dual Gel Caster	
HPLC-Pumpe Techlab LCP 4100	Techlab, Erkerode, Deutschland
Laufkammer Gelelektrophorese	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Mini-Vertical Gel Electrophoresis Unit	
Lyophilie ALPHA 1-4 LSC	Martin Christ GmbH, Osterode, Deutschland
pH-Elektrode Checker [®]	Hanna Instruments, USA
pH-Meter HI 221	Hanna Instruments, USA
Rüttelplatte	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Säulenofen ERC-125	ERC, Alteglofsheim, Deutschland
SPE-Vakuum-Extraktionseinheit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Bereich Supelco, Taufkirchen, Deutschland
Visiprep DL [™]	
Ultra-Turrax T25 basic	IKA-Werke GmbH & CO.KG, Staufen, Deutschland
UV-Detektor (HPLC)	UV/VIS Detektor S-3702 Shimadzu, Duisburg, Deutschland
UV/Vis Spektrometer	Multiskan Thermo Electron, Dreieich
Überkopfmischer	Kali-Chemie AG, Hannover, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3 s	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zetasizer HSA3000	Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK

Materialien

96-Loch-Platten, UV-durchlässig	Corning Inc., New York, USA
FPLC-Leersäule mit beweglichem Stempel, 15 x 50 mm / 15 x 150 mm	Omnifit, UK
HPLC-Säule Reprosil-pur NH ₂ , 120-5 (250 x 4 mm)	Trentec Analysentechnik, Gerlingen, Deutschland
Küvette, halbmikro	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PE-Fritten 10 µm	Omnifit, UK
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SPE-Kartuschen Oasis HLB 60 mg	Waters GmbH Eschborn, Deutschland
UV-Küvette, halbmikro, Plastibrand [®]	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Chemikalien

Alkalische Phosphatase (Darmschleimhaut, Kalb)	Fluka, 79392
α-Chaconin	Carl Roth GmbH & Co. KG 4192.1
α-Chymotrypsin	Sigma C4129
Lysozym (Hühnereiweiß)	Fluka 62971
Hämoglobin (Rinderblut)	Sigma H2500
Humanes Serumalbumin	Sigma A1653
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	Sigma A5503
Protein-Ladder PageRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Rinderserumalbumin	Fluka 05480
α-Solanin	Carl Roth GmbH & Co. KG 5414.1
Trypsinogen	Sigma C7762

Alle Salze und Bulkchemikalien zum Ansetzen von Puffern, Lösungen und HPLC-Eluenten wurden von den Firmen Sigma, Fluka, Merck und Roth bezogen und entsprachen p.a. Qualität.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2006 bis Dezember 2008 am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich sehr für die Bereitstellung dieses interessanten Themas. Für die wissenschaftliche Betreuung und freundliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit sowie für das Korrekturlesen und die Übernahme des Korreferats bedanke ich mich herzlich bei PD Dr. Cornelia Kasper.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Dr. Ulrich Sohling von der Süd-Chemie AG für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die gute Zusammenarbeit und Unterstützung sowie das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Prof. Dr. Martijn van Griensven danke ich für die Bereitschaft, meine Prüfung im Nebenfach abzunehmen.

Darüber hinaus gilt mein herzlicher Dank Dr. Kirstin Suck von der Süd-Chemie AG für die Unterstützung bei meinen Vorträgen und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei Martina Weiß bedanke ich mich für die Einführung und Unterstützung bei den HPLC-Analysen sowie bei Dr. Sascha Beutel für das Korrekturlesen.

Für die Bereitstellung der Daten der Moleküldynamik-Simulationen bedanke ich mich bei Dr. Hubert Kuhn von der CAM-D GmbH sowie bei Dr. habil. Lars Dähne von der Surflay Nanotec GmbH für die Durchführung der Zetapotentialmessungen.

Für die sehr gute Arbeitsatmosphäre während meiner Doktorarbeit bin ich dem AK Scheper sehr dankbar.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung in jeder erdenklichen Weise während meines gesamten Studiums und während meiner Doktorarbeit.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Kathrin Ralla
geboren am 30. Oktober 1979 in Gehrden (Hannover)

Schulbildung

08 / 1986 – 06 / 1990 Grundschule, Ernst-Reuter-Schule, Barsinghausen

08 / 1990 – 07 / 1992 Orientierungsstufe am Spalterhals, Barsinghausen

09 / 1992 – 06 / 1999 Hannah-Arendt-Gymnasium, Barsinghausen

Studium

09 / 1999 – 06 / 2003 Studium an der Fachhochschule Hannover,
Fachbereich Bioverfahrenstechnik, Technologie
Nachwachsender Rohstoffe

10 / 2003 – 10 / 2005 Studium an der Leibniz Universität Hannover im Fach
Life Science

Dissertation

01 / 2006 – 03 / 2009 Promotion am Institut für Technische Chemie der
Leibniz Universität Hannover

Publikation

Application of conjoint liquid chromatography with monolithic disks for the simultaneous determination of immunoglobulin G and other proteins present in a cell culture medium

K. Ralla, F. Anton, T. Scheper, C. Kasper (2009)

Journal of Chromatography A, 1216 (13), 2671-2675

Onlinepublikation: 20.10.2008

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.102> (2008)

CHROMA349306