

# ANWENDUNG VON ZONENPRÄZIPITATION DURCH MOLEKULARFILTRATION\*

von

J. HOLLÓ,—E. LÁSZLÓ,—Á. HOSCHKE,—Zs. BÁNKY

Lehrstuhl für Landwirtschaftlich-chemische Technologie, Technische Universität,  
Budapest

Eingegangen: am 2. Februar, 1970.

## Einleitung

Zu den interessanten eigentümlichen Methoden der Molekularfiltration gehören diejenigen Methoden, wo der Trennungsmechanismus durch weitere molekulare Wechselwirkungen der zu trennenden Substanzen (Löslichkeit, Komplexbildung usw.) verbessert wird.

Eines dieser Anwendungsgebiete stellt die Zonenpräzipitation dar [1]. Hier wird beim Beginn des Chromatographierens im Gelbett eine Konzentrationsgradienten eines zur Ausfällung der Eiweißstoffe geeigneten Reagens von niedrigem Molekulargewicht (z. B. Ammoniumsulfat) zustandegebracht, dann das Gemisch der Eiweißstoffe aufgetragen. Die über hohes Molekulargewicht verfügbaren Eiweiße werden aus dem Raumnetz des entsprechenden Gelytyps ausgeschlossen, sie bewegen sich während des Eluierens schneller als die Gradienten des Fällungsmittels und scheiden ihrer Löslichkeit entsprechend bei einer bestimmten Strecke der Konzentrationsgradienten aus. Nach Verdünnung des Eluiermittels gehen sie dann wieder in Lösung. So läßt sich ein der relativen Löslichkeit entsprechendes Fraktionieren, durch öfteres Wiederholen eine Trennung der Komponenten des Proteingemisches erzielen. Grundlegende Voraussetzung ist, daß Ausfallen und Auflösen des Eiweißgemisches rasch und reversibel vor sich geht. Bei geeigneter Porosität des Molekularsiebes sind die Gele nicht nur Träger des Fällungsmittels, sondern erhöhen auf Grund des ursprünglichen Gelfiltrationseffekts auch die Wirksamkeit der Zonenpräzipitation.

## Vorbereitung und analytische Methoden

Bei der Herstellung des Kartoffelsaftes wurde eine Behandlung mit Dithionit zur Behinderung der Phenoloxylase unternommen, weiterhin Zitratpufferlösung von pH Wert 6 benutzt [2]. Der Eiweißgehalt der erhaltenen Lösung betrug 20 mg/ml, die Alfa-1,4-glukan-phosphorylase Aktivität 161 Enzymeinheiten/ml. Das Vorfraktionieren des Saftes erfolgte mit Ammonium-

\* Prof. Dr. László Erdey zum 60. Geburtstag gewidmet.

sulfat zwischen Dichtegrenzen von 1,085–1,152, 1,095–1,145, 1,100–1,140 und 1,100–1,135 g/ml [2]. Die spezifische Aktivität des vorfraktionierten Produktes betrug 37,5 Phosphorylase-Enzymeinheiten/mg. Der Eiweißgehalt wurde nach Folin [3] bzw. während der Zonenpräzipitationen spektrophotometrisch bei 280 nm bestimmt [4].

Die Phosphorylase-Aktivität wurde nach Lee gemessen [4]. Zu den Versuchen wurden Dextrangele von verschiedener Porösität (Sephadex G–25, G–50, G–100) bzw. Molekularsiebe auf Polyacrylbasis (Biogel P–2, P–10, P–150) in Form von Gelbetten von  $40 \times 1$  cm in hydrophoben Säulen benutzt. Die einzelnen Chromatographiersäulen wurden mit Ammoniumsulfat in Zitrat-

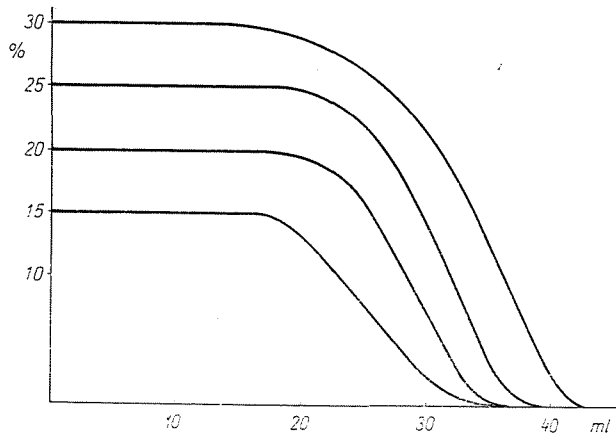


Abb. 1. Ammoniumsulfat-Gradienten in Funktion der Menge des Eluiermittels bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

pufferlösung (pH = 7) auf Konzentrationen von 15, 20, 25 bzw. 30% eingestellt. In die so vorbereiteten Säulen wurden 2–2 ml dialysierte Eiweißlösung eingeführt und mit 0,01 m Pufferlösung (pH = 7) eluiert (Geschwindigkeit 10 ml/h). Die Salzkonzentration der Eluate wurde konduktometrisch bestimmt. Die Ammoniumsulfat-Gradienten sind in Abb. 1 dargestellt.

### Versuchsergebnisse

Das Fraktionieren durch Zonenpräzipitation der Proteine im Kartoffelsaft bei Ausgangskonzentrationen von 15, 20, 25 und 30% des Ammoniumsulfats in Säulen aus Sephadex G 25 ist in Abb. 2 dargestellt. (Aufgetragene Proteinmenge: 20 mg.) Wie zu sehen, erhielt man die größte Zahl von Proteinfractionen bei einer Salzkonzentration von 15%, ein Erhöhen der Salzkonzentration verminderte die Wirksamkeit des Fraktionierens. Unter den gleichen

Verhältnissen erzielte man mit Molekularsiebsäulen von Biogel-P-2 ebenfalls eine gute Eiweißtrennung, die jedoch einen anderen Charakter besaß (Abb. 3). Hier erzielte man die schärfste Separation der in verschiedenem Maß löslichen Eiweißstoffe bei Ammoniumsulfatkonzentrationen von 15 bzw. 20%.

Im folgenden wurde untersucht, ob die nach dem aus vielen Stufen bestehenden, zeitraubenden und mühsamen Fraktionieren mit Ammoniumsulfat angewandte Methode der Zonenpräzipitation zur Charakterisierung der Homogenität des erhaltenen Produkts bzw. zum weiteren Fraktionieren geeignet ist. Die mit 15, 20, 25 und 30%iger Ammoniumsulfatkonzentration

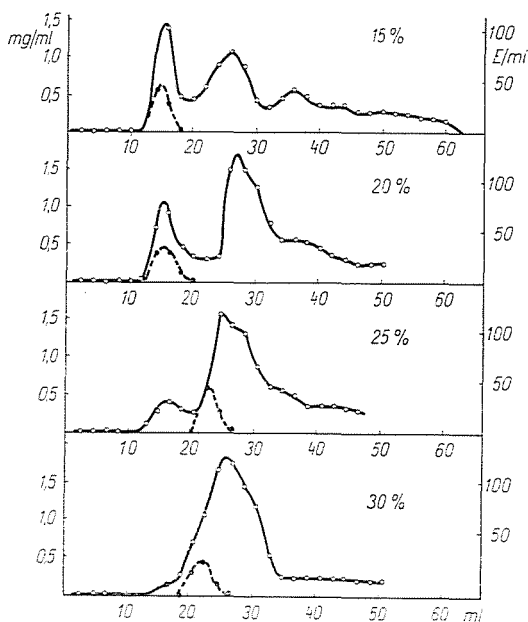


Abb. 2. Protein- und Aktivitätsverteilung an Sephadex G-25 bei verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen. Protein: ○—○; Aktivität: ○— — ○

erhaltenen Elutionskurven an Sephadex G-25 sind in Abb. 4, an Biogel P-2 in Abb. 5 dargestellt (aufgetragen: 6,6 mg Protein). Es läßt sich auf Grund der Abbildungen feststellen, daß die vorfraktionierte Probe noch immer aus zwei Fraktionen von verschiedener Löslichkeit besteht, obzwar die Menge der Verunreinigungen erheblich vermindert wurde (Tab. 3).

Die Wirkung der verschiedenen Porositäten wurde ebenfalls untersucht. Die unter gleichen Verhältnissen mit Sephadex G-25, G-50, G-100 bzw. Biogel P-2, P-10, P-150 erhaltenen Fraktionierungsergebnisse sind in Abb. 6 und 7 aufgezeichnet. Die charakteristischen Fraktionen des auf die verschiedenen Säulen aufgetragenen Proteingemisches von 40 mg erhielt man

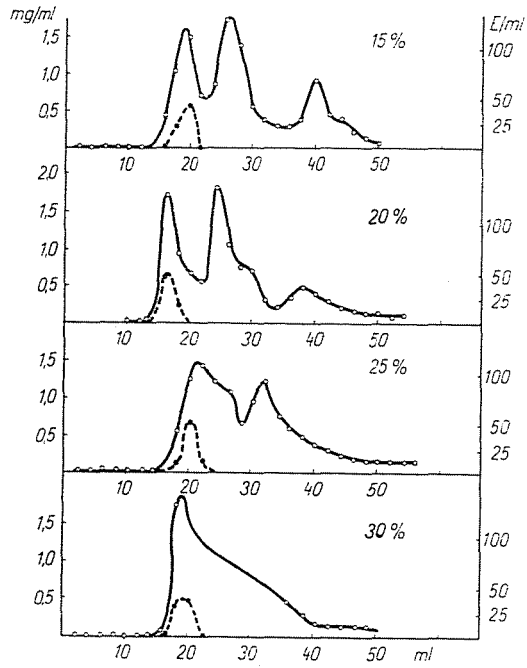


Abb. 3. Protein- und Aktivitätsverteilung an Biogel P—2 bei verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen

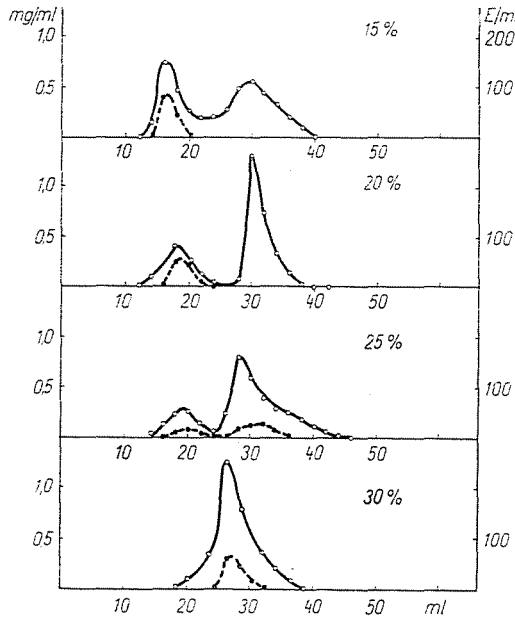


Abb. 4. Protein- und Aktivitätsverteilung an Sephadex G—25 bei verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen im Fall der Zonenpräzipitation vorfraktionierten Kartoffelsaftes

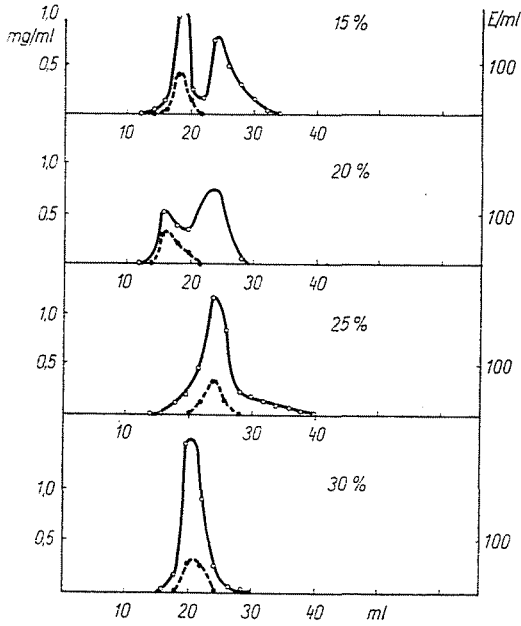


Abb. 5. Protein- und Aktivitätsverteilung an Biogel P—2 bei verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen im Fall der Zonenpräzipitation vorfraktionierten Kartoffelsaftes

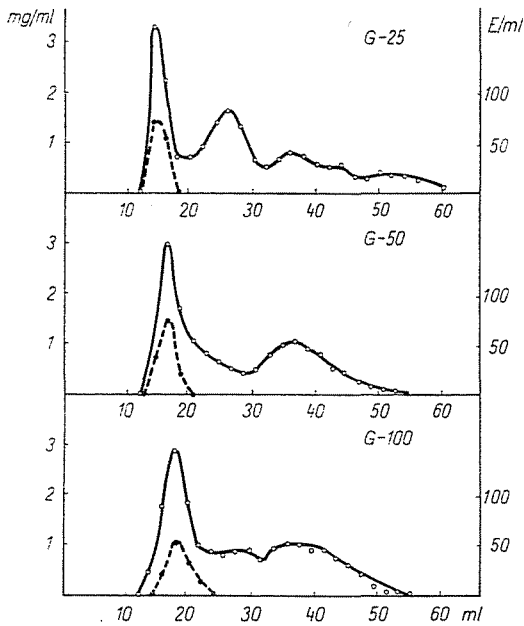


Abb. 6. Zonenpräzipitation von Kartoffelsaft an Sephadex G—25, G—50, G—100 Säulen

bei den Eluaten von den mit G—25 bzw. P—2 beschickten Säulen, die Trennung der Phosphorylasefraktion war ebenfalls bei diesen Säulen die beste.

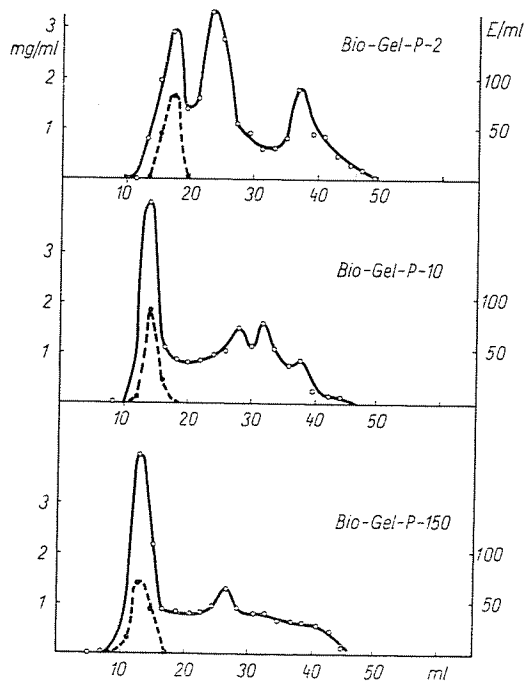


Abb. 7. Zonenpräzipitation von Kartoffelsaft an Biogel P—2, P—10, P—150 Säulen

### Besprechung der Ergebnisse

Die mit verschiedenen Ausgangsgemischen unter verschiedenen Verhältnissen an verschiedenen Siebsubstanzen erhaltenen Elutionskurven wurden nicht nur hinsichtlich des Proteinfractionierens sondern auch in Hinsicht auf die Kartoffelphosphorylaseausbeute untersucht.

Aus diesem Gesichtspunkt ist die Separation des Enzymproteins in getrennter Fraktion mit größtmöglicher spezifischer Aktivität in dem Elutionsdiagramm der Eiweiße wichtig. Durch Zonenpräzipitation von Kartoffelsaft an Sephadex G—25 bzw. Biogel P—2 Säulen erhielt man die definierteste und separierteste Enzymfraktion mit 15 und 20%iger Ammoniumsulfatkonzentration. Werden größere Gele angewandt (G—50, G—100, P—10, P—150), so erscheint zwar ebenfalls im ersten Elutionsmaximum das Enzym, doch erhalten diese Fraktionen mehr Verunreinigungen. Im Falle eines vorfraktionierten Proteingemisches gab hingegen an Sephadex G—25 eine 20%ige, an Biogel P—2 eine 15%ige Ammoniumsulfatkonzentration die beste Trennung.

Tabelle 1

Spezifische Phosphorylase-Aktivität  
bei der Zonenpräzipitation von Kartoffelsaft.  
(Spezifische Aktivität im Saft: 8,05 Einheit/mg)

Ammoniumsulfat- Konzentration %	Spezifische Aktivität (E/mg)	
	Sephadex G-25	Biogel-P-2
15	32,5	25,2
20	31,0	25,2
25	31,2	20,3
30	19,9	16,8

Enzymreinheit ist durch die spezifische Aktivität charakterisiert. Die aus den bei Zonenpräzipitation des Kartoffelsaftes erhaltenen Elutionskurven bei verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen an Sephadex G—25 bzw. Biogel P—2 gerechneten spezifischen Aktivitätswerte sind in Tab. 1 zusammengestellt. Die Daten bezeugen ebenfalls die Anwendbarkeit von 15- bzw. 20%iger Ammoniumsulfatkonzentrationen.

Dieselben Daten bei Verwendung von verschiedenartigen Molekularsieben sind in Tab. 2 zu sehen. Die höchste Enzymreinheit erzielte man bei niedrigster Porösität (G—25 bzw. P—2).

Die im Falle der Zonenpräzipitation vorfraktionierter Kartoffelproteine erhaltenen spezifischen Phosphorylase-Aktivitäten zeigt Tab. 3. Wie zu sehen, erhält man das reinste Enzympräparat mit 20%iger Ammoniumsulfatkonzentration. Dextrangel (Sephadex) war günstiger als Polyacrylgel (Biogel).

Tabelle 2

Spezifische Phosphorylase-Aktivität  
bei verschiedenen Gelen.  
Kartoffelsaftaktivität: 8,05 Einheit/mg

Gelart	Spezifische Aktivität (Einheit/mg)
Sephadex G—25	32,5
G—50	21,3
G—100	16,4
Biogel P—2	25,5
P—10	22,7
P—150	18,2

Tabelle 3

Änderung der spezifischen Aktivität vorfraktionierter Proben.  
(Vor der Zonenpräzipitation: 37,5 Einheit/mg)

Ammoniumsulfat Konzentration (%)	Spezifische Aktivität Einheit/mg	
	Sephadex G-25	Biogel P-2
15	103,5	86,5
20	148,5	94,5
25	58,5	51,0
30	50,5	46,0

### Zusammenfassung

Es wurden Eiweißfraktionierungen an verschiedenen Molekularsieben (Dextrangelen und Polyacrylgelen) durch Zonenpräzipitation von Kartoffelsaft und von mit Ammoniumsulfat vorfraktioniertem Kartoffelsaft mit einstufiger linearischer Salzgradienten unternommen. Beiderlei Siebart (Sephadex und Biogel) wurden zum Zwecke der Fraktionierung geeignet gefunden, die besten Ergebnisse lieferten Sephadex G-25 und Biogel P-2. Aus der Reihe der Kartoffelproteine dienten zum Reinigen von 1,4-Glukanphosphorylase 15- und 20%ige Ausgangskonzentrationen am besten. Durch Zonenpräzipitation kann eine mit Ammoniumsulfat weiter nicht mehr reinigbare Fraktion noch auf das 2,6–4fache angereichert werden. Ohne Vorfraktionieren mit Ammoniumsulfat ist die Selektivität der Methode geringer.

### Literatur

1. PORATH, J.: Adv. in protein chemistry 17, 209 (1962).
2. HOLLÓ, J.—LÁSZLÓ, E.—HOSCHKE, Á.: Die Stärke 16, 243 (1964).
3. FOLIN, O.—CIOCALTEU, V.: J. Biol. Chem. 73, 627 (1927).
4. LEE, Y. P.: Biochem. biophys. Acta 43, 18 (1960).

Prof. Dr. János HOLLÓ  
Dr. Elemér LÁSZLÓ  
Dr. Ágoston HOSCHKE  
Zsuzsa BÁNKY

Budapest XI., Gellért tér 4. Ungarn