

T. Ho Anh und G. Annemüller

Untersuchungen zur Entstehung eines pH-Gradienten beim Anlegen eines elektrischen Feldes in wässrigen Malzextraktlösungen

Die bisherigen in der Praxis angewandten präparativen Verfahren zur Free Flow Isoelektrischen Fokussierung benötigen zum Aufbau eines pH-Gradienten die sogenannten „Trägerampholyten“ in der Reaktionskammer und eine basische bzw. saure Lösung in den Elektrodenräumen. Nachfolgend wird anhand der vorliegenden Untersuchungen gezeigt, dass durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einer wässrigen Malzextraktlösung ein pH-Gradient auf Basis von den im Malzextrakt vorhandenen eigenen Puffersubstanzen aufgebaut werden kann. Auf die Trägerampholyten und basischen bzw. sauren Elektrolyten kann man daher verzichten. Diese Kenntnisse öffnen viele mögliche Anwendungsgebiete in der Lebensmitteltechnologie, in denen die Reinheit des getrennten enzymhaltigen Produktes im Vordergrund steht.

BC 03 Chemie

(Deskriptoren: Malzwürze, pH-Gradient, Elektrophorese, präparative isoelektrische Fokussierung, Enzymtrennung)

Descriptors: Malt wort, pH-gradient, electrophoresis, preparative isoelectric focusing, enzyme separation).

1 Einleitung und Zielstellung

Die vorliegende Arbeit stellt einen Auszug aus der Dissertationsschrift von *Ho Anh* (1) dar. Sie ist die Fortsetzung einer mehrjährigen Forschungsarbeit mit dem Ziel, ein für die deutsche Brauindustrie geeignetes β -Glucan abbauendes Filtrationsenzym aus Gerstenmalz ohne Fremdzusätze zu gewinnen. Um ein solches „Filtrationsenzym“ bei der Bierherstellung ohne Qualitätsbeschädigung für das Bier einsetzen zu können, war es wichtig, störende Nebenaktivitäten zu entfernen. Die vorhergehenden Arbeiten von *Bauch* (2) zeigten, dass eine mehrstufige Crossflow-Filtration allein nicht wie ursprünglich angedacht (3) zur gewünschten, differenzierten Enzymgewinnung führten. Die Ursache ist in erster Linie in einer nicht reproduzierbaren Deckschichtbildung zu suchen. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, ein anderes Trennverfahren in diesem Enzymgewinnungsprozess auf seine Verwendbarkeit hin zu erproben. Bekannt sind die analytischen Verfahren zur Elektrodialyse, freien Elektrophorese und isoelektrischen Fokussierung zur Fraktionierung von Protein- und Enzympräparaten, die aber nur in veränderter Form zur Herstellung von aufkonzentrierten und für die Lebensmittelproduktion geeigneten Enzympräparaten anwendbar sind (Literaturauswertung in (1), siehe auch (4–17)). Nachfolgend wird über die Versuche zur Enzymauftrennung von wässrigen, mikrofiltrierten Malzauszügen mit Hilfe eines elektrischen Feldes berichtet.

Die Zielstellung der Arbeit bestand in

- der Entwicklung eines Verfahrens zur Reduktion bzw. Entfernung von proteolytischen und anderen unerwünschten Nebenaktivitäten und die Anreicherung einer Endo- β -Gucanaseaktivität in einem keimfreien, enzymhaltigen, mikrofiltrierten Malzauszug ohne eine mehrstufige Crossflow-Ultrafiltration und
- der Überprüfung der Wirksamkeit des gewonnenen „Filtrationsenzymes“ aus Malz auf den Abbau von β -Glucanen im Bier und der Verbesserung der Filtrierbarkeit ohne negative Einflüsse auf die Schaumhaltbarkeit und den Geschmack.

2 Beschränkung der klassischen Trennverfahren zur isoelektrischen Fokussierung (IEF) von Proteinen

Die isoelektrische Fokussierung hat sich seit langem als eine Methode für die Trennung von Proteinen bzw. Enzymen bewährt. Es gibt aber einige Gründe, die den Einsatz dieser Methode in vielen Labors verhindern.

Erstens sind die Preise für Ampholyte verhältnismäßig hoch. Der zweite Grund ist die sehr geringe Löslichkeit der Globuline im isoelektrischen Zustand ohne Anwesenheit von Salz. Während alle löslichen Proteine im isoelektrischen Punkt noch eine minimale Löslichkeit besitzen, sind die Globuline fast unlöslich, so dass es zu deren Ausfällungen während der Fokussierung kommt. Die Löslichkeit der Globuline steigt in Anwesenheit von neutralen Salzen. Weil bei einer IEF alle neutralen Salze entfernt werden, können Globuline mit dieser Technik nicht untersucht werden, es sei denn, man verwendet eine beachtliche Menge an Detergenzien. Der dritte Grund ist der Mangel an geeigneten Trägerampholyten, die einen einheitlichen Leitfähigkeits- und Konzentrationsverteilungsverlauf liefern. Tatsächlich ist der pH-Verlauf in den meisten Fällen eine flache, monoton wachsende bzw. fallende Kurve, was eine Messung der isoelektrischen Punkte der Proteine und eine präparative Gewinnung der an ihrem isoelektrischen Punkt angereicherten Proteine für analytische Zwecke mit einer guten Wiederholbarkeit ermöglicht. Trotzdem gilt es als unbefriedigend, dass Proteine in diesem Zustand von einer unbekanntem

Anzahl von Ampholyten, deren Struktur, Konformation, Molekulargewicht und Konzentration ebenfalls unbestimmt sind, nicht getrennt werden können. Eine praktische Anwendung der isoelektrischen Fokussierung in der Lebensmitteltechnologie zur präparativen Reinigung von Enzymgemischen im großtechnischen Maßstab, mit dem Ziel der nachfolgenden Applikation in der Lebensmittelherstellung, ist, sowohl aus Kostengründen als auch hinsichtlich der Verunreinigung des Produktes mit Ampholyten, bis jetzt nicht möglich.

3 Versuchsaufbau

Ziel der Untersuchungen war es, einen pH-Gradienten in einer Malzextraktlösung (gewonnen aus einem Malzauszug mit einem Malz-Wasser-Verhältnis = 1:4, bei Temperaturen von < 40 °C) mit Hilfe eines elektrischen Feldes ohne Zusatz von Trägerampholyten zu bilden, um damit eine Differenzierung und Auftrennung des Malzenzymgemisches auf Grund ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte zu erreichen. Für eigene Zwecke wurde ein Apparat zur Durchführung einer Elektrodialyse im kleintechnischen Maßstab entsprechend umkonfiguriert. Die Zelle besteht aus vielen trennbaren Plexiglassegmenten, die sich je nach Bedarf leicht ein- bzw. ausbauen lassen. In der Abbildung 1 ist die Zelle mit 4 Segmente und 2 Elektrodenräumen dargestellt. In den Versuchen betrug die Anzahl der Segmente zwischen 2 und 6.

Auf Grund der Übersichtlichkeit wurden die Messstellen für die angelegte Spannung und die Stromstärke weggelassen.

Die Messung der Leitfähigkeit und des pH-Wertes erfolgte „offline“ in den entsprechenden Probenahmegefäßen.

Jedes Segment hat ein Fassungsvermögen von ca. 120 ml und besitzt eine Einlauf- und eine Auslauföffnung. In jedem Segment ist ein Glasrohr zur Zuführung der Kühlflüssigkeit für eine Kühlschlange eingebaut. Die Kühlung ist notwendig, um die freigesetzte Wärmemenge bei der Elektrolyse abzuführen. Bei der Ausführung wurde die Temperatur der Kühlflüssigkeit im Kryostat zwischen 2 und 4 °C gehalten. An den beiden Enden sind 2 Platin-Elektroden angebracht. Jede Elektrode hatte eine Fläche von ca. 10 cm². Der Elektrodenabstand variierte in Abhängigkeit von der Anzahl der eingesetzten Segmente und betrug zwischen 5 und 15 cm.

Die Elektrodenräume sind von dem Behandlungsraum durch Membranen getrennt. Hierbei handelte es sich um Ionenaustauscher-, Ultrafiltrations- oder Nanofiltrationsmembranen.

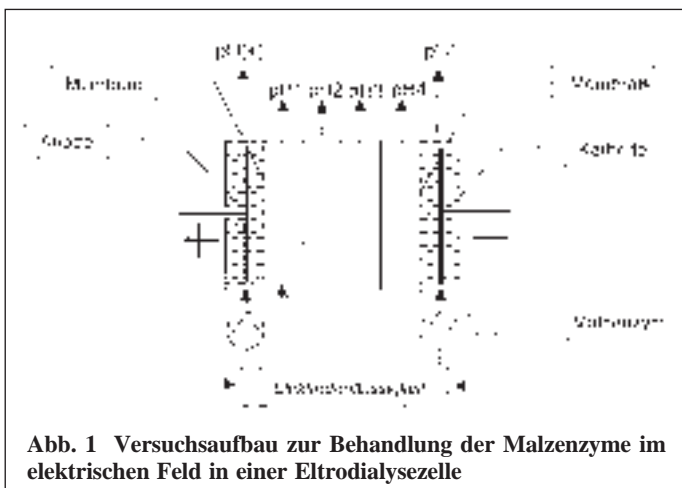


Abb. 1 Versuchsaufbau zur Behandlung der Malzenzyme im elektrischen Feld in einer Elektrodialysezelle

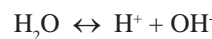
Als Elektrodenflüssigkeit wurde destilliertes Wasser gewählt (spezifische elektrische Leitfähigkeit ca. 1,5 µS/cm). Die Öffnung in der Nähe der Anode wurde als Einlaufsstelle für das Substrat (Malzextrakt oder Malzenzymkonzentrat) gewählt. In der Standardvariante der Verfahrensführung wurde das Ausgangssubstrat kontinuierlich mit Hilfe einer Kassettenschlauchpumpe in die Zelle durch die Einlauföffnung eingeführt. Das Produkt wurde aus den Auslauföffnungen abgeführt. Der pH-Wert der Auslauföffnungen wurde entsprechend ihrer Position in der Abbildung 1 mit pH1, pH2, pH3 und pH4 bezeichnet. Die Elektrodenflüssigkeit kann im Kreislauf (gestrichelte Linie) oder im Durchlauf der Anode bzw. Kathode zugeführt werden. In den meisten Versuchen wurde die Elektrodenflüssigkeit im Durchlauf (ohne Rückführung) in die Elektrodenräume geleitet. Der pH-Wert der Anoden- und Kathodenflüssigkeit wurde mit pH(+) bzw. pH(-) bezeichnet.

Folgende Prozessbedingungen konnten variiert werden:

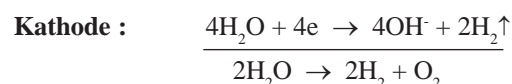
- Die angelegte Spannung und Stromstärke,
- die Verweilzeit t_v des Substrats in der Zelle,
- die Anzahl der Segmente bzw. der Ausläufe,
- die Art und Zuführung der Elektrodenflüssigkeit (Kreislauf, Durchlauf- und Pumpgeschwindigkeit) und
- die Membraneigenschaften der eingesetzten Trennmembranen zwischen den Elektrodenräumen und dem Produktraum.

4 Die Ausbildung des pH-Gradienten – Mechanismus und Einflussfaktoren

Wasser dissoziiert schwach nach der Gleichung:



Wenn in den beiden Elektrodenräumen nur reines Wasser vorhanden ist, dann laufen an den Elektroden nach Anlegen einer Gleichspannung zwei Prozesse gleichzeitig ab:



Als Folge verschiebt sich der pH-Wert an der Anode zum sauren Bereich (Überschuss an Wasserstoffionen) und der pH-Wert an der Kathode zum basischen Bereich (Überschuss an Hydroxylionen). Außerdem bilden sich Gase (Sauerstoff bzw. Wasserstoff) an der Anode bzw. an der Kathode. Wenn an der Anode oder Kathode noch andere Ionen vorhanden sind, dann könnten noch weitere Reaktionen stattfinden, wie z.B.:

- Anode:** Nur die einfachen Anionen wie z.B. Cl⁻, Br⁻ oder I⁻ haben den Vorrang vor dem OH⁻-Ionen und gehen die Oxidation zuerst ein. Die anderen komplexen Ionen (SO₄⁻², PO₄⁻³, HPO₄⁻², H₂PO₄⁻, NO₃⁻, SO₃⁻² etc.) bleiben in der Lösung, weil sie eine schlechtere Oxidierbarkeit als die OH⁻-Ionen besitzen.
- Kathode:** Nur die edlen Metallionen wie z.B. Cu⁺² werden vor den H⁺-Ionen zu Metallen (z.B. Cu) reduziert. Die anderen Kationen wie z.B. Mg⁺², Ca⁺², K⁺, Na⁺ oder auch die NH₄⁺-Ionen sind schwerer reduzierbar als die H⁺-Ionen und bleiben deshalb erhalten.

Die Geschwindigkeit des Prozesses hängt offensichtlich vom Elektronenfluss zwischen den beiden Elektroden, d. h. von der Stromstärke ab. In der Zelle findet eine Wanderung der Ionen und

Puffersubstanzen statt. Die Anionen wandern in Richtung Anode und die Kationen in Richtungen Kathode. In der Zelle wird dann ein steigender pH-Gradient von der Anode bis zur Kathode aufgebaut.

Die Ausbildung des pH-Gradienten ist ein komplexer Vorgang, der von verschiedenen Prozessparametern abhängig ist. Der Mechanismus beruht auf der Bewegung und Umordnung der Ionen bzw. Puffersubstanzen im elektrischen Feld. Die zentrale Rolle spielt das elektrische Feld, es bewirkt eine Wanderung und Umordnung der Ionen und Puffersubstanzen und es ist die Triebkraft des Prozesses. Dieser Triebkraft wirkt der Zellwiderstand entgegen. Bei größeren Zellwiderständen sind in der Regel auch höhere Spannungen anzulegen, um einen gleichen pH-Verlauf zu erzielen. Die tatsächliche Bewegung der Ionen wird durch die Stromstärke, das Maß für den fließenden elektrischen Strom, gemessen. Man kann daher die Stromstärke als eine „effektive Triebkraft“ heranziehen, um die Abhängigkeit der anzuwendenden Spannung vom Zellwiderstand zu charakterisieren.

Der Zellwiderstand ist grundsätzlich von den folgenden Faktoren abhängig:

- ❑ Der Anzahl und Geometrie der Zellsegmente mit dem Elektrodenabstand und dem Querschnitt der Zelle;
- ❑ den Membraneigenschaften (Art der Membranen, Verschmutzungs- und Verblockungsgrad);
- ❑ der Verweilzeit des Substrates (Pumpgeschwindigkeit des Malzextraktes bzw. Malzkonzentrates);
- ❑ der Prozessdauer und Anzahl der Verwendungen (in der Regel steigt der Widerstand mit steigender Prozessdauer wegen der zunehmenden Ablagerungen an den Membranen).

5 Die Entstehung von 2 pH-Gradienten

Aus technischen Gründen und unter Berücksichtigung der Gegebenheit der Anlagekonfiguration war es nicht möglich, die pH-Werte direkt in der Zelle zu messen. Die pH-Wert-Messung erfolgte immer „offline“ in den Probenahmegefäßen an jedem Auslauf. Es wurde angenommen, dass nur in der senkrechten Richtung zu den Elektroden ein pH-Gradient existiert. Parallel zu den Elektroden sollte der gleiche pH-Wert herrschen, wenn der Abstand zur Anode bzw. Kathode gleich ist. Eine während der Untersuchung beobachtete Erscheinung hat aber diese Annahme in Frage gestellt. Bei der Verfahrensführung kann man grundsätzlich zwischen zwei Lagen der Zelle wählen: horizontale und vertikale Lage.

Der Versuchsaufbau mit der horizontalen Lage der Zelle sah mit Vereinfachung wie in Abbildung 2 gezeigt aus.

An einem Zellende wurde der Malzextrakt durch einen Plastikschlauch zugeführt. An dem anderen Ende wurde das Produkt durch verschiedene Öffnungen, entsprechend der gewählten Anzahl der Segmente, abgeführt.

In den ersten Testversuchen wurde beobachtet, dass der pH-Gradient bei einer Verweilzeit des Produktes im Reaktionsraum von ca. 3 h nach nur ca. 2 Stunden zusammengebrochen war, obwohl es noch keine Abnahme der Stromstärke gab. Die Stromstärke wurde durch eine Erhöhung der Spannung auf dem Anfangsniveau gehalten. Als Ursache wurde eine Vermischung des frischen und des alten Substrates vermutet. In der Zelle waren Ausflockungen zu beobachten. Das sind proteinhaltige Verbindungen, die durch Verlust von Ladungen im elektrischen Feld

ausfallen. Der Zusammenbruch des pH-Gradienten kann wie folgt erklärt werden:

Im kontinuierlichen Betrieb wird der Zelle ständig das Substrat über die Einlaufkammer zugeführt und das Produkt aus der Sammelkammer abgeführt. Eigentlich soll in der Sammelkammer dasjenige Substrat (als Produkt) sich befinden, das die größte Verweilzeit erfahren hat. Diese Forderung konnte bei dieser Prozessführung aber nicht erfüllt werden. Beim Eintreten in das elektrische Feld kommt es zu Ausfällungen der proteinhaltigen Inhaltsstoffe. Es führt zu einer Dichteabnahme des Substrates. Diese Dichteabnahme hängt von dem jeweiligen pH-Wert in der Umgebung ab. Im allgemeinen kann man davon ausgehen, dass das Substrat mit einer längeren Verweilzeit in der Zelle auch eine geringere Dichte besitzt. Das frische Substrat aus der Einlaufkammer hat die größte Dichte. Es bildet sich in der Zelle infolge eines Umschichtungsprozesses ein vertikaler Dichte-Gradient aus. Das Substrat mit einer geringeren Dichte befindet sich oberhalb dem Substrat mit einer höheren Dichte. Dies führt zu einem Effekt, dass das frischere Substrat nicht mehr am Anfang der Zelle bleibt, sondern weiter bis zur Sammelkammer gelangen kann. Es kommt deshalb zu einer Vermischung zwischen dem frischeren Substrat und dem eigentlichen Produkt. Dieser Prozess geschieht entlang der Zelle bis zur Sammelkammer. Der pH-Gradient bricht als Folge zusammen.

Mit der vertikalen Lage der Zelle lässt sich dieser Effekt vermeiden. Der Versuchsaufbau wurde in der Abbildung 3 dargestellt. Das frische Substrat wird unten in die Einlaufkammer der Zelle zugeführt. Das Produkt wird aus der Sammelkammer abgeführt. Durch diese Verfahrensführung wird gewährleistet, dass das frischere Substrat auch unten an der Einlaufkammer bleibt. Mit der Dauer der Verweilzeit wandert das Substrat langsam nach oben, bis es schließlich als Produkt in die Sammelkammer gelangt. Dabei hat das Substrat auch die volle theoretische Verweilzeit erfahren.

Aus diesen Erkenntnissen wurde erwartet, dass auch in der vertikalen Richtung ein pH-Gradient existiert. Die Ergebnisse der

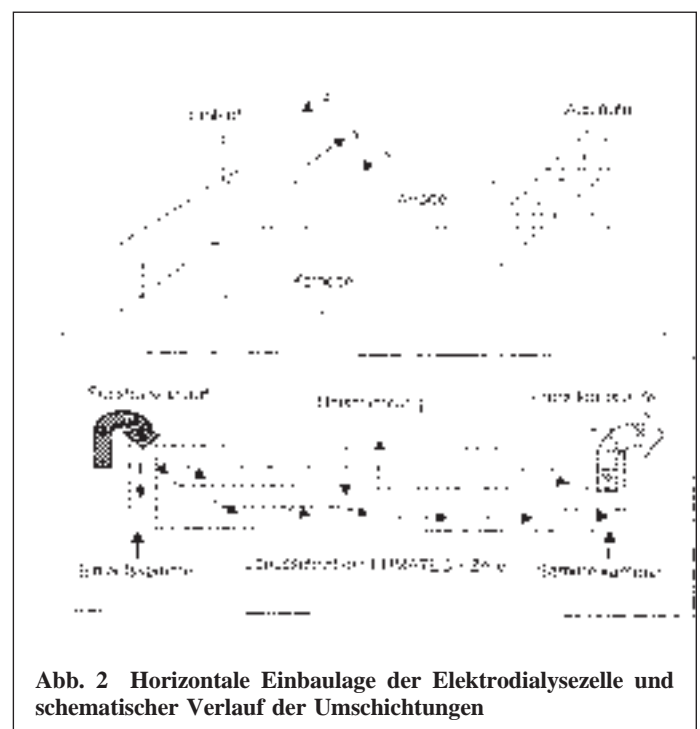


Abb. 2 Horizontale Einbaulage der Elektrodialysezelle und schematischer Verlauf der Umschichtungen

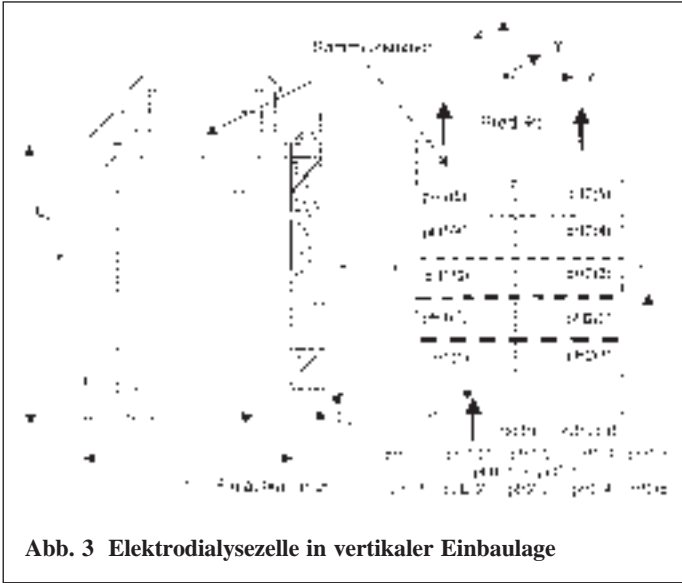


Abb. 3 Elektrodialysezelle in vertikaler Einbaulage

Versuche haben diese Vermutung bestätigt. Die Umschichtung ist in diesem Fall sehr deutlich. Die Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse eines Versuchs mit 2 Segmenten. Während sich die pH-Werte der beiden Segmente in der untersten Schicht nur verhältnismäßig geringfügig unterscheiden, zeigen die pH-Werte der beiden Segmente in der obersten Schicht einen sehr großen Unterschied, wie die in Tabelle 1 dargestellten Analysenergebnisse eines Versuches zeigen. Im Segment 1 nimmt der pH-Wert von unten nach oben ab, während er sich im Segment 2 von unten nach oben erhöht. Dieses Erkenntnis ist für die weitere Verfahrensführung wichtig.

Schlussfolgerung: Bei der Prozessführung muss die Zelle daher in der vertikalen Lage stehen, und der Laufweg des Substrats bzw. des Produktes muss von unten (Einlauf) nach oben (Ausläufe) erfolgen. Prinzipiell spielt die Position des Einlaufs keine Rolle, weil das (frische) Substrat sich nach dem Eintreten in die Zelle immer über die gesamte Einlaufskammer verteilt.

6 Veränderung des Zellwiderstandes im Prozessverlauf

Der Widerstand der Zelle ist u. a. von der Anzahl der frei beweglichen Ionen abhängig. In einem *Batch-Prozess* fand eine Elektrodialyse statt, wobei die Ionen und Puffersubstanzen aus der Zelle durch die Membranen zu den Elektrodenräumen gelan-

gen, was eine Verringerung der Leitfähigkeit im Zellraum zur Folge hat. Bei einer langzeitigen Fortführung des Versuches würde der Widerstand der Zelle unendlich steigen, weil in der Zelle dann keine frei beweglichen Ionen mehr vorhanden sein würden.

Bei einem *kontinuierlichen Prozess* wird die Zelle ständig mit frischem Substrat und damit auch Ionen und Puffersubstanzen versorgt. Hierbei unterscheidet man 3 Fälle:

- Wenn die Erhöhung der Leitfähigkeit durch die Summe der in die Zelle zulaufenden Ionen und der an den Elektroden frei werdende Ionen größer als die Erniedrigung der Leitfähigkeit durch die Elektrodialyse und der Verblockung der Membranen ist, dann verringert sich der Zellwiderstand.
- Im umgekehrten Fall steigt der Zellwiderstand.
- Im stationären Zustand bleibt der Zellwiderstand konstant.

Im folgenden Beispiel wurde der Zelle kontinuierlich Malzkonzentrat zugeführt. Die Verweilzeit betrug zunächst 60 min und am Ende dann 90 min. Der zeitliche Verlauf des Zellwiderstandes ist in Abbildung 4 dargestellt.

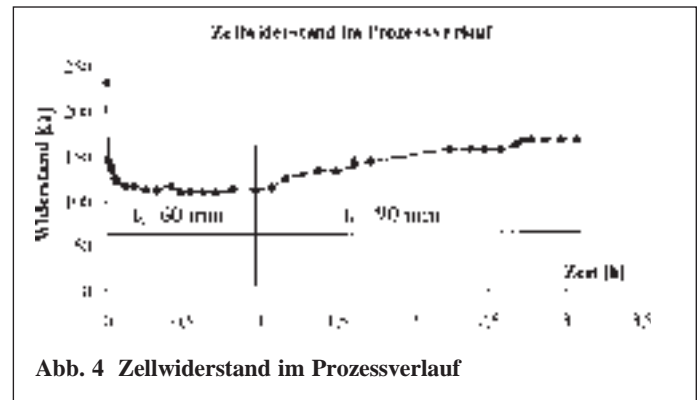


Abb. 4 Zellwiderstand im Prozessverlauf

Beim Anlegen der Spannung verringert sich der Widerstand drastisch von ca. 230 Ω auf unter 150 Ω. Nach ca. 0,5 Stunden blieb der Widerstand etwa konstant bei ca. 110 Ω. Nach einer Laufzeit von ca. 1 Stunde wurde die Verweilzeit durch die Verringerung der Zufuhrsgeschwindigkeit des neuen Substrates auf 90 Minuten erhöht. Es führte logischerweise zu einem Anstieg des Zellwiderstandes. Der Zellwiderstand stieg so lange, bis ein neuer (quasi)stationärer Zustand erreicht wurde. Die Dauer einer

Tabelle 1 Strom- und pH-Verlauf bei vertikaler Einbaulage am Beispiel des Versuches V63 /1/							
Stromverlauf				pH-Verlauf			
Zeit (min)	I (A)	U (V)	Schichten 5 (oben)	Segment 1	Segment 2	Anode (+)	Kathode (-)
				2,35	11,01	2,41	12,11
0		30	4	2,65	10,40	2,41	12,11
5	0,40	30	3	3,20	9,49	2,41	12,11
15	0,37	30	2	3,94	7,73	2,41	12,11
20	0,35	30	1 (unten)	4,52	6,90	2,41	12,11
25	0,40	35					
35	0,26	35					

(quasi)stationären Phase ist davon abhängig, wie die Verblockung der Membranen durch Substrat-inhaltsstoffe fortschreitet.

Theoretisch sollte man möglichst eine kurze Verweilzeit anstreben, um den Widerstand der Zelle zu verringern. Wegen der Turbulenz und der notwendigen Zeit für die Umordnung der Ionen im elektrischen Feld ist die Verweilzeitgrenze jedoch nach unten beschränkt. Im Laufe der Untersuchungen wurden verschiedene Verweilzeiten erprobt. Eine Verweilzeit zwischen 30 und 60 min hat sich als günstig erwiesen. Untersuchungsergebnisse haben gezeigt, dass eine Verweilzeit unter 30 min nicht zu empfehlen ist, weil in diesem Fall keine absolut laminare Strömung mehr möglich und außerdem die Zeit für Umordnung der Ionen im elektrischen Feld zu kurz ist. Eine erhöhte Verweilzeit ist aus der wirtschaftlichen Sicht nicht sinnvoll, weil erstens der Durchsatz verringert wird und zweitens wegen des höheren Widerstandes eine höhere Spannung angelegt werden muss. Der Zellwiderstand wird also u. a. von der Verweilzeit des Substrats bestimmt. Mit steigender Verweilzeit wird der Widerstand auch größer. Die Höhe des pH-Gradienten (d. h. die pH-Differenz ΔpH zwischen der Anode und Kathode) ist abhängig

- von der Zeit, die den Ionen und Puffersubstanzen für ihre Umordnung im elektrischen Feld zur Verfügung steht (Verweilzeit) und
- von der „effektiven Triebkraft“ (Stromstärke), die sich als Funktion der angelegten Spannung U und des Widerstandes R darstellen lässt.

Schlussfolgerung: Wenn man die Verweilzeit t_v im Prozess konstant hält, dann ist ΔpH nur von der Stromstärke abhängig. Der Widerstand steigt nur durch die Verschmutzung und Verblockung der Membranen im Prozessverlauf. Durch eine schrittweise Erhöhung der angelegten Spannung kann man die Stromstärke konstant halten, um einen Verfall des pH-Gradienten zu verhindern.

7 Einfluss der Membraneigenschaften auf den pH-Gradienten

Der Zellwiderstand hängt im großen Maße auch mit den Membraneigenschaften zusammen. Es wurden im Laufe der Untersuchungen verschiedene Sorten von Ionenaustauschermembranen und Ultrafiltrationsmembranen getestet.

Die Ionenaustauschermembranen (IAM) sind chemisch Ionenaustauscherharzen sehr ähnlich. Sie bestehen aus einer Polymermatrix, die fest gebundene, positiv oder negativ geladene Gruppen (sog. Festionen) enthält. Sie besitzen im Vergleich zu anderen Membranen (z. B. Ultrafiltrationsmembranen) einen erhöhten Widerstand, so dass für die Ausbildung eines geeigneten pH-Gradienten in der Regel eine höhere Spannung anzulegen ist. Die Ionenaustauschermembranen besitzen wegen ihrer Zusammensetzung die Eigenschaft, die Ionen nur selektiv durchzulassen.

Man unterscheidet dabei 2 Typen von Ionenaustauschermembranen:

Die *Kationenaustauschermembrane* (KAM) ist negativ geladen. Sie lässt deshalb nur positiv geladene Kationen durch. Negativ geladene Anionen werden abgestoßen. Im Gegensatz dazu ist die *Anionenaustauschermembrane* (AAM) positiv geladen. Sie lässt demzufolge nur negativ geladene Anionen durch. Positiv geladene Kationen werden abgestoßen.

Das Einbringen der AAM an der Anode und der KAM an der Kathode zur Trennung der Elektrodenräume von der Zelle verur-

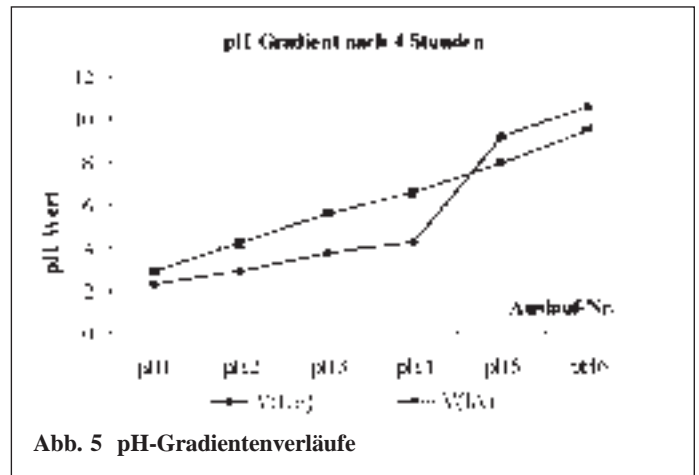


Abb. 5 pH-Gradientenverläufe

sacht das Folgende: An der Anode werden durch Elektrodenprozesse positiv geladene Wasserstoff-Ionen freigesetzt. Sie sind verantwortlich für die pH-Verschiebung an der Anode zum saueren Bereich. Das Anbringen einer AAM an der Anode verhindert somit das Durchdringen der Wasserstoff-Ionen in die Umgebung der Zelle, die direkt an der Anode liegt. Der pH-Wert in diesem Bereich wird dann nur durch die Konzentrationen der im Substrat vorhandenen Ionen bzw. Puffersubstanzen bestimmt, nicht aber zusätzlich durch die Wasserstoff-Ionen, die von der Anode stammen. Das Gleiche gilt für das Anbringen einer KAM an der Kathode. Hierbei wird das Durchdringen der Hydroxylionen in die Zelle verhindert.

Um die Einflüsse der IA-Membranen und der normalen UF-Membranen auf den Zellwiderstand sowie auf die Ausbildung von pH-Gradienten miteinander zu vergleichen, werden in Abbildung 5 die Ergebnisse der vergleichenden Versuche V(UF) und V(IA) vorgestellt. In beiden Versuchen waren bis auf die Membranen alle Parameter gleich. Die Zelle bestand aus 6 Segmenten. Die Elektrodenräume wurden mit destilliertem Wasser mit einer Geschwindigkeit von 9 ml/min gespült. Die angelegte Spannung betrug 50 V. Die Verweilzeit war 170 min. Im Versuch V(UF) wurden 2 UF-Membranen verwendet, im Versuch V(IA) waren 2 IA-Membranen im Einsatz. Das Ausgangssubstrat hatte den gleichen pH-Wert (6,4). Die IA-Membranen haben einen höheren Widerstand als die UF-Membranen.

Obwohl der pH-Wert an der Anode im Versuch V(UF) tiefer als der im Versuch V(IA) lag, war der pH-Wert am 1. Auslauf (in der Nähe der Anode) im Versuch V(IA) generell höher als der im Versuch V(UF). Der pH-Wert am 6. Auslauf (in der Nähe der Kathode) im Versuch V(IA) war entsprechend auch niedriger als der im Versuch V(UF). Das bedeutet, dass im Versuch V(UF) zusätzliche H^+ - bzw. OH^- -Ionen aus dem Anoden- bzw. Kathodenraum in die Zelle eingedrungen waren. Die IA-Membranen im Versuch V(IA) konnten dieses Eindringen verhindern. Die Wirkung der IA-Membranen wird auch deutlich, wenn man den Verlauf des pH-Gradienten im Versuch V(IA) betrachtet. Der Anstieg des pH-Wertes von der Anode bis zur Kathode ist ziemlich gleichmäßig. Die Einstellung des pH-Gradienten erfolgte in diesem Versuch ausschließlich durch die Umordnung der Ionen bzw. Puffersubstanzen im elektrischen Feld. Im Gegensatz dazu stieg der pH-Wert im Versuch AV(UF) sprunghaft von der Anode bis zur Kathode, was wieder auf das Eindringen von H^+ - bzw. OH^- -Ionen aus den Elektrodenräumen in die Zelle zurückzuführen ist (siehe Abb. 5).

Die Nachteile der IA-Membranen sind der höhere Preis und ihre Anfälligkeit gegen Verblockungen durch Gegenionen, die den Widerstand der Membranen erheblich vergrößern. Deshalb ist nach jedem Prozess eine gründliche Reinigung und Regenerierung notwendig. Die Regenerierung kann man durch eine vertauschte Schaltung der Pole (Umpolung) erreichen. Dadurch können die Gegenionen wieder aus der Membrane entfernt werden.

Mit steigender Standzeit werden alle Membranen durch eine sich bildende Deckschicht aus Salzen und evtl. Proteinen immer schwerer passierbar. Dadurch wird der Standzeit der Zelle eine Grenze gesetzt. Auffällig war es, dass die Membrane an der Anode im Vergleich zur Membrane an der Kathode relativ länger verschont blieb. Man kann diese Tatsache durch die optisch erkennbaren Aussalzungseffekte an der KAM der Kathode beweisen. Es ist dadurch zu erklären, dass die Metallionen der Salze, die sich in Richtung der Kathode bewegen, zum Teil eine Ablagerung an der Membrane verursachen. Die extremen pH-Werte an der Anode und Kathode haben keinen Einfluss auf die chemische Konfiguration der Membranen, weil die Membranen laut Hersteller im pH-Bereich zwischen 1 und 14 beständig sind.

Schlussfolgerung: Die Eigenschaften der verwendeten Membranen haben einen großen Einfluss auf die Ausbildung von pH-Gradienten. Die IA-Membranen haben in der Regel einen größeren Widerstand, liefern aber einen gleichmäßigeren und besser kontrollierbaren pH-Gradienten.

8 Die Stromstärke als Steuerungsparameter für die pH-Gradienten-Ausbildung

Die Schnelligkeit der pH-Gradienten-Ausbildung und seine Schärfe hängt offensichtlich von der Wanderungsgeschwindigkeit und der Stärke der Ionen im elektrischen Feld ab. Weil der Zellwiderstand eine große Rolle spielt, kann man aus der angelegten Spannung grundsätzlich keine Aussage über die pH-Gradienten-Ausbildung machen. Vielmehr ist dafür die Stromstärke heranzuziehen. Praktisch wurde in den Versuchen die Stromstärke als „Steuerungsparameter“ für den Prozess angewendet. Durch die Deckschichtbildung an den Membranen und eine Verarmung der Ionen in der Zelle steigt der Zellwiderstand an und der Strom fällt im Laufe eines Versuches ab. Im kontinuierlichen Betrieb ist eine Erhöhung des Zellwiderstandes praktisch nur auf die Verblockung der Membranen zurückzuführen, wenn die verlorengegangenen Ionen in der Zelle vollständig durch die neu hinzukommenden Ionen ersetzt werden. Der Stromabfall kann grundsätzlich durch eine entsprechende Erhöhung der angelegten Spannung kompensiert werden. Dabei muss beachtet werden, dass nur aus der Stromstärke alleine auch keine Rückschlüsse auf die Eigenschaften des pH-Gradienten gezogen werden können. Ein zusätzlicher Faktor ist die Verweilzeit des Substrates im elektrischen Feld, weil alle Ionen für ihre Wanderung bzw. Umordnung im elektrischen Feld auch Zeit brauchen. Die Verweilzeit des Substrates beeinflusst wiederum den Zellwiderstand und somit indirekt die Stromstärke. Zur Charakterisierung des pH-Gradienten wurden die Differenz ΔpH zwischen dem alkalischen und sauren Produkt nach der vollständigen Einstellung des pH-Gradienten (in der Regel nach dem Erreichen der eingestellten Verweilzeit) und die dazugehörige Stromstärke verwendet.

In Abbildung 6 sind die ΔpH -Werte der Versuche mit der gleichen Anzahl der Segmente sowie der ungefähr gleichen Verweilzeit gegen die eingestellte Stromstärke aufgetragen. Aus diesem Diagramm lässt sich der Zusammenhang zwischen der Stromstärke und dem pH-Gradienten deutlich erkennen. Eine höhere Stromstärke bewirkt in der Regel auch schneller einen schärferen pH-

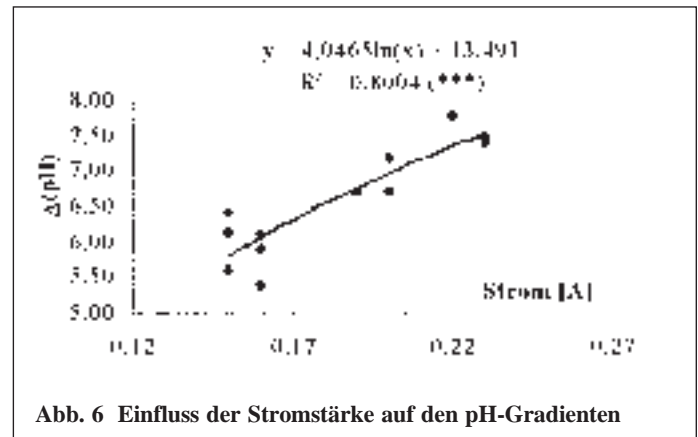


Abb. 6 Einfluss der Stromstärke auf den pH-Gradienten

Gradienten, der aber auch mit einer größeren Wärmeentwicklung verbunden ist. Folgender Zusammenhang wurde gefunden:

$$y = 4,0465\ln x + 13,491; R^2 = 0,8004 (***)$$

y: ΔpH
x: Stromstärke in A.

Der Zusammenhang ist mit einer Sicherheit von 99,9% hochsignifikant. Die Schärfe des pH-Gradienten lässt sich bis zu 80% durch die Stromstärke bestimmen. Der Einfluss der Stromstärke auf die Ausbildung des pH-Gradienten ist somit statistisch gesichert.

Schlussfolgerung: Für die praktische Umsetzung des Verfahrens kann man die Stromstärke als ein „Steuerparameter“ verwenden, um den erwünschten pH-Gradienten zu erzielen.

Die Höhe des erforderlichen Stroms für einen bestimmten pH-Gradienten hängt natürlich auch von der jeweiligen Anlagenkonfiguration (Zellvolumen, Zellquerschnitt, Membranen) und der Prozessführung (z.B. Verweilzeit) ab und muss für jeden Anlage-typ experimentell ermittelt werden.

9 Ergebnisse der Untersuchungen im Überblick

Mit der umgebauten Elektrodialysezelle kann im Malzenzymextrakt bzw. Malzenzymkonzentrat ohne Zusatz von Trägerampholyten ein ausreichend (quasi)stabiler pH-Gradient aufgebaut werden. Ein kontinuierlicher Betrieb ermöglicht eine Überführung des Verfahrens in den industriellen Großmaßstab. Durch die Regulierung der Spannung bzw. Stromstärke sowie der Zulaufgeschwindigkeit des Substrats und der Elektrodenflüssigkeit kann ein gewünschter pH-Gradient definiert werden. Die Anwendung von destilliertem Wasser als Elektrodenflüssigkeit hat sich als sehr günstig erwiesen.

Folgende Anlagekonfiguration und Prozessparameter im Labormaßstab haben sich bewährt:

<input type="checkbox"/> Elektrodenfläche:	10 cm ²
<input type="checkbox"/> Elektrodenabstand:	5 ... 15 cm
<input type="checkbox"/> Volumen des Elektrodenraums:	100 ml
<input type="checkbox"/> Zellvolumen:	240 ... 720 ml
<input type="checkbox"/> Zelllänge:	14 cm
<input type="checkbox"/> Effektive Membranfläche:	50 cm ²
<input type="checkbox"/> Spannung:	20 ... 80 V
<input type="checkbox"/> Stromstärke:	0,1 ... 0,3 A
<input type="checkbox"/> Verweilzeit des Substrats:	40 ... 60 ... 240 min

- Spülgeschwindigkeit der Elektrodenräume: 1... 10 ml/min
- Anzahl der Produktausläufe: 2 ... 6
- Erreichbare Prozessdauer: bis zu 8 ... 10 h

Ausgehend von diesen Zahlenangaben sind einige wichtigen Kennwerte für eine mögliche großtechnische Umsetzung der Anlage festzulegen:

- Feldstärke: 130 ... 1600 V/m
- Stromdichte: 20 ... 60 A/m²
- Anzustrebende Verweilzeit des Substrats: 40 ... 60 min
- Verdünnungsrate der Spülflüssigkeit
- im Elektrodenraum: 0,01 ... 0,1 min⁻¹

Die Ermittlung der Größe bzw. Abmessungen der Anlage ist außerdem abhängig von der benötigten Produktionsmenge des Malzenzympräparates. Bei einer bekannten Produktionsmenge kann man anhand der oben angegebenen Kennwerte die optimale Größe für die Anlage sowie die Prozessparameter bestimmen. Hinsichtlich der Konvektions- und Erwärmungsprobleme sollte die Tiefe der Zelle (senkrecht zur Feldrichtung) so gering wie möglich gehalten werden.

10 Zusammenfassung

Mit Hilfe einer umkonfigurierten Anlage zur Elektrodialyse ist es möglich, in einer Malzextraktlösung einen pH-Gradienten ohne Zusatz von Trägerampholyten aufzubauen. Die im Malzextrakt vorhandenen Puffersubstanzen reichen aus, um den pH-Gradienten von pH 2,5...pH10,5 über längere Zeit stabil zu halten. Wegen eines Dichtegradienten ist eine vertikale Produktführung erforderlich, um einen Zusammenbruch des pH-Gradienten zu verhindern. Als Spülflüssigkeit in den Elektrodenräumen ist destilliertes Wasser sehr geeignet, man braucht daher keine basische bzw. saure Lösung einzusetzen. Die Ausbildung und die Stabilität des pH-Gradienten sind von verschiedenen Faktoren abhängig, die man durch die Regulierung bestimmter Prozessparameter steuern kann. Die Stromstärke kann man als wichtigstes Steuerungsparameter nutzen, um einen gewünschten pH-Gradienten zu erreichen.

11 Summary

Ho Anh, T., and Annemüller, G.: Studies on the development of a pH gradient when connecting up an electric field in watery malt extract solutions — Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, Nr. 7/8, 142 – 148, 2001

BC 03 Chemistry

The hitherto preparative process applied in practice for free-flow isoelectrical focusing requires the so-called "carrier ampholytes" in the reaction chamber and a basic or acidic solution in the electrode areas to build up a pH gradient. Shown in the following based on the studies made is that by connecting up an electric field in a watery malt extract solution it is possible to build up a pH gradient on the basis of own buffer substances existing in the malt extract. As a result of this the carrier ampholytes and basic or acidic electrolytes are not necessary. This knowledge opens up many possible areas of application in food technology in which the purity of the separated product containing enzyme is in the foreground.

Ho Anh, T., et Annemüller, G.: Examen du développement d'un gradient de pH dans l'application d'un champ électrique dans des extraits aqueux de malt — Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, Nr. 7/8, 142 – 148, 2001

BC 03 Chimie

Dans les procédés préparatifs de focalisation isoélectrique Free Flow appliqués jusqu'à présent, on avait besoin, pour la construction d'un gradient de pH, d'un soit disant « ampholyte de support » dans la chambre de réaction et une solution basique ou acide dans les chambres d'électrodes. Dans l'examen décrit ci-après il est montré que pour l'application d'un champ électrique dans une solution d'extrait de malt on pouvait construire un gradient de pH sur la base des substances tampon propres de l'extrait de malt déjà présent. On peut, par conséquent, renoncer aux ampholytes de support et aux électrolytes basiques et acides. Ces connaissances ouvrent dans la technologie alimentaire de possibles applications pour lesquelles la pureté des produits enzymatiques séparés sont prépondérants.

12 Literatur

1. Ho Anh, Tiep: Untersuchungen zur Gewinnung und zur Aktivität von filtrationsfördernden Enzymen aus Gerstenmalz nach Behandlung im elektrischen Feld, Dissertation, TU Berlin, Fakultät für Prozesswissenschaften, Berlin 2000.
2. Bauch, Th.: unveröffentlicht, Dissertationschrift in Vorbereitung, TU Berlin, Fakultät für Prozesswissenschaften, Berlin 2000.
3. Annemüller, G., Bauch, Th., u. Manger, H.-J.: Verfahren zur Gewinnung von Malzenzymen und deren Einsatz bei der Bierherstellung, DE-PS 4234392 vom 14. 4. 1994.
4. Araque, A., Jaugey, F., und Javet, P.: Preparative isoelectric focusing and Joule effect: A purification cell that contains a heat exchanger, *Electrophoresis* **17**, 168 – 172, 1996.
5. Burggraf, D.; Weber, G.; Lottspeich, F.: Free flow-isoelectric focusing of human cellular lysates as sample preparation for protein analysis, *Electrophoresis* **16**, 1010 – 1015, 1995.
6. Curioni, A., Peruffo, A., Dal, B., und Pogna, N. E.: Preparative isoelectric focusing of reduced wheat gluten proteins, *Electrophoresis* **11**, 462 – 467, 1990.
7. Esteve-Romeo, J. S., Bossi, A., und Righetti, P. G.: Purification of thermamylase in multicompartement electrolyzer with isoelectric membranes: The problem of protein solubility, *Electrophoresis* **17**, 1242 – 1247, 1996.
8. Hagedorn, R., und Fuhr, G.: Steady state electrolysis and isoelectric focusing, *Electrophoresis* **11**, 281 – 289, 1990.
9. Kunath, H.: Präparative Gewinnung von Malzenzymen mittels Elektrophorese, Diplomarbeit, TU Berlin 1994.
10. Rilbe, H.: Steady-state rheoelectrolysis – a method for isoelectric focusing without carrier ampholytes: I. The pH-course to be expected on rheoelectrolysis of a buffer solution composed of a weak acid and its salt with a strong base, *Electrophoresis* **2**, 261 – 267, 1981.
11. Rilbe, H.: Steady-state rheoelectrolysis - a method for isoelectric focusing without carrier ampholytes: II. The pH-course to be expected on rheoelectrolysis of a buffer solution composed of a weak acid and a weak base, *Electrophoresis* **2**, 268 – 272, 1981.
12. Rilbe, Harry: Steady-state rheoelectrolysis - a method for isoelectric focusing without carrier ampholytes: III. The influence of internal liquid flow, *Electrophoresis* **3**, 332 – 336, 1982.
13. Roman, M. C. ; Brown, P. R.: Free-flow electrophoresis as a preparative separation technique, *Analytical Chemistry* **66**, S. 86A-94A, 1994.
14. Surendar, M. J., und Watertown, M.: Separation of proteins using electro dialysis-isoelectric focusing combination, United States Patent 4396477, 02.08.1983.
15. Wagner, H., und Speer, W.: Eine modifizierte Trennapparatur zur trägerfreien Durchflussionophorese, *Journal of Chromatography* **115**, 357 – 363, 1975.
16. Wagner, H., und Speer, W.: Kontinuierliche trägerfreie isoelektrische Fokussierung, *Journal of Chromatography* **157**, 259 – 265, 1978
17. Xavana, A.: Gewinnung Charakterisierung von β -Glucanasen aus Malz mittels isoelektrischer Fokussierung, Diplomarbeit, TU Berlin, 1996.