

Extrazelluläre Enzyme aus *Pleurotus sapidus*

Produktion, Charakterisierung und
Isolierung mittels präparativer Zerschäumung

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Ing. (FH) Diana Linke

geboren am 23. Juli 1975 in Nienburg

Hannover 2006

Referent: Prof. Dr. Dr. R.G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. Dr. H. Parlar

Tag der Disputation: 06.06.2006

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf Günter Berger und Herrn PD Dr. Holger Zorn für die intensive und stets hilfsbereite Unterstützung, für die zahlreichen anregenden Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ihr profundes Fachwissen war eine wesentliche Voraussetzung für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit. Herrn Prof. Dr. R.G. Berger danke ich desweiteren für die Bereitstellung des außerordentlich interessanten Arbeitsthemas, sowie für die finanzielle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Harun Parlar danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein Dank gilt außerdem

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie für die hilfsbereite Zusammenarbeit, das freundschaftliche Verhältnis und für eine unvergessliche Zeit. Insbesondere meiner Laborkollegin Manuela Scheibner danke ich sehr herzlich für die stetige Diskussionsbereitschaft und für eine lebhafte Zeit.

Des weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Manfred Nitz (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) für die Sequenzierung von Peptiden mittels ESI-MS/MS.

Dem Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes „Isolierung und Anreicherung von Pilzenzymen mittels präparativer Zerschäumung zur verbesserten industriellen Nutzung ligninhaltiger Naturstoffe“, aus dem diese Arbeit hervorging.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Peter und Beate Linke, meiner Oma Ella Braun, meiner Schwester Tanja sowie meinem Freund Sven für ihre Liebe, die großzügige Unterstützung und das immerwährende Vertrauen, für Kraft und Trost während meiner Studien- und Promotionszeit und die Freude, die sie mir stets bereiten.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, April 2006

Diana Linke

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2002 bis März 2006 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger angefertigt.

Das Forschungsprojekt „Isolierung und Anreicherung von Pilzenzymen mittels präparativer Zerschäumung (Adsorptive Bubble Separation) zur verbesserten industriellen Nutzung ligninhaltiger Naturstoffe“ (AIF-Nr. 121 ZN) wurde vom Forschungskreis für Ernährungsindustrie (FEI) gefördert. Teile der Arbeit wurden in international anerkannten Zeitschriften veröffentlicht, sowie in einem Vortrag und in Form von Postern präsentiert.

Veröffentlichungen:

1. Linke, D.; Bouws, H.; Peters, T.; Nimtz, M.; Berger, R.G.; Zorn, H. (2005) Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization and cloning. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9498-9505.
2. Linke, D.; Zorn, H.; Gerken, B.; Parlar, H.; Berger, R.G. (2006) Laccase isolation by foam fractionation – new prospects of an old process. *Enzyme Microb. Technol.*, in press.
3. Linke, D.; Zorn, H.; Gerken, B.; Parlar, H.; Berger, R.G. (2005) Foam fractionation of exo-lipases from growing *Pleurotus sapidus*. *Lipids* 40, 323-327.
4. Gerken, B.M.; Wattenbach, C.; Linke, D.; Zorn, H.; Berger, R.G.; Parlar, H. (2005) Tweezing-Adsorptive Bubble Separation - A novel analytical method for the selective and high enrichment of metalloenzymes. *Anal. Chem.* 77, 6113-6117.
5. Gerken, B.M.; Nicolai, A.; Linke, D.; Zorn, H.; Berger, R.G.; Parlar, H. (2005) Efficient enrichment of laccase C using continuous foam fractionation. *Sep. Purif. Technol.*, in press.

Präsentationen:

6. Linke, D.; Zorn, H.; Gerken, B.; Parlar, H.; Berger, R.G. (2005) Isolierung und Anreicherung von Pilzenzymen - Die Anwendung der präparativen Zerschäumung zur industriellen Nutzung von Naturstoffen (Arbeitstagung der Regionalverbände Nord und Nordost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Hamburg) *Lebensmittelchemie* 59, 129.
7. Linke, D.; Zorn, H.; Gerken, B.; Hardebusch, B.; Parlar, H.; Berger, R.G. (2005) Isolierung aktiver Enzyme mittels präparativer Zerschäumung (Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn) *Lebensmittelchemie* 59, 16.
8. Linke, D.; Zorn, H.; Gerken, B.; Parlar, H.; Berger, R.G. (2004) Gewinnung extrazellulärer Pilzenzyme mittels präparativer Zerschäumung (DECHEMA/VDI-GVC-Symposium: Schäume – Grundlagen und Anwendungen, Baden-Baden).
9. Linke, D.; Zorn, H.; Nimtz, M.; Berger, R.G. (2005) One-step purification of a fungal lipase from a growing culture (BioPerspectives, Wiesbaden).

Abkürzungsverzeichnis

A	Enzymaktivität
AC	Affinitätschromatographie
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar(e)
c	Konzentration oberflächenaktiver Moleküle in der Flüssigphase
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMC	kritische mizellare Konzentration
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
d	Durchmesser
Da	Dalton
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DTT	1,4-Dithiothreitol
ΔE	Extinktionsänderung pro min
E	Anreicherungsfaktor
E.C.	Enzymkommission
ev	Elektronenvolt
$\epsilon_{x \text{ nm}}$	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
Γ	Konzentration adsorbierter Molekülen an der Phasengrenzfläche
γ	Oberflächenspannung
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
IAC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
L	Liter
l	Länge
LAC	Laccase
M	molar

MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
μ	mikro
n	nano
ORF	Open reading frame, offenes Leseraster
P.	<i>Pleurotus</i>
P	Reinigungsfaktor
p	Druck
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptide mass fingerprint
POX	Phenoloxidase
PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>
R	ideale Gaskonstante
R _a	Wiederfindung an Aktivität
R _p	Wiederfindung an Protein
rpm	Umdrehung pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNL	Standardnährlösung
sp.	Species
T	Temperatur
U	Unit
V _s	Probenvolumen in der Küvette
V _t	Gesamtvolumen in der Küvette

Aminosäuren und Basen werden nach dem internationalen Einbuchstabencode abgekürzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Enzymtechnologie	1
1.2	Die Zerschäumung	6
1.2.1	Prinzipien der Zerschäumung	7
1.2.2	Schaumbildung	8
1.2.3	Oberflächenadsorption	8
1.2.4	Schaumstrukturen	11
1.2.5	Schaumstabilität	12
1.2.6	Einflussparameter	15
1.2.7	Zerschäumungsprozess, Verfahrensweisen und Apparaturen	17
1.3	Zerschäumung von Enzymen	20
1.4	Zielsetzung	21
2	Laccases of <i>P. sapidus</i>: Characterization and cloning	22
2.1	Abstract	22
3	Laccase isolation by foam fractionation – new prospects of an old process	23
3.1	Abstract	23
3.2	Introduction	23
3.3	Materials and methods	24
3.3.1	Materials	24
3.3.2	Protein determination	25
3.3.3	Enzyme assay	25
3.3.4	Preparation of enzyme solution	25
3.3.5	Cultivation of <i>Pleurotus sapidus</i> and laccase production	26

3.3.6	Isoelectric focusing	26
3.3.7	Foam fractionation - Configuration of equipment and experimental procedure	26
3.3.8	Calculations	27
3.4	Results	27
3.4.1	Foam fractionation of laccase (<i>Trametes</i> sp.) from deionised water	27
3.4.2	Foam fractionation of laccase (<i>Trametes</i> sp.) from SNL medium	29
3.4.3	Foam fractionation of laccases from culture supernatants of <i>Pleurotus sapidus</i>	30
3.5	Discussion	31
3.6	Conclusions	34
3.7	Acknowledgements	34
4	Foam fractionation of exo-lipases from growing <i>Pleurotus sapidus</i>	35
4.1	Abstract	35
4.2	Introduction	35
4.3	Materials and methods	36
4.3.1	Chemicals	36
4.3.2	Cultivation and lipase production	37
4.3.3	Protein determination	37
4.3.4	Lipase assay	38
4.3.5	Isoelectric focusing and lipase activity staining	38
4.3.6	Configuration of equipment and experimental procedure for foam fractionation	38
4.3.7	Calculations	39
4.4	Results	40
4.4.1	Influence of medium composition on extracellular lipase activity	40

4.4.2	Foam fractionation of lipases from the culture supernatant	41
4.4.3	Foam fractionation of the native pellet culture	42
4.5	Discussion	43
4.5.1	Separation of active lipases	43
4.5.2	pH dependence	43
4.5.3	Effect of Tween 80	44
4.5.4	Gas flow	44
4.5.5	Design of the foam fractionation device	45
4.5.6	Comparison to alternative processes	45
4.6	Acknowledgements	46
5	Zusammenfassung	47
6	Summary	48
7	Literaturverzeichnis	49
8	Lebenslauf	61

1 Einleitung

1.1 Enzymtechnologie

Die katalytischen Eigenschaften von Enzymen wurden bereits lange bevor man überhaupt von ihrer Natur und ihren Fähigkeiten wusste, für die Herstellung von Brot, Käse, alkoholischen Getränken und die Ledermanufaktur genutzt. Der historische Beginn der Enzymtechnologie geht auf die Entdeckungen im 19. Jahrhundert zurück, als die Existenz von „Fermenten“ durch Wissenschaftler wie Buchner bewiesen und belegt wurde, dass deren Aktivität nicht an lebende Zellen gebunden ist. 1878 führte Kühne den Begriff „Enzyme“ für aus der lebenden Zelle isolierbare Fermente ein (KÜHNE 1878). Weiterführende Beobachtungen und Erkenntnisse auf dem Gebiet der Fermentation vermittelten ein immer vollständigeres Bild über die Funktion der Biokatalysatoren.

Bis heute sind etwa 4500 Enzyme in der *Enzyme nomenclature database* (www.expasy.ch) gelistet, aber nur etwa 1% werden bisher in industriellem Maßstab genutzt (BUCHHOLZ et al. 2005). Etwa die Hälfte findet Verwendung in der Lebensmittel- und Naturstoffindustrie und je ein Viertel in Waschmittelpräparaten und in der Medizin. Ihr globaler Marktwert wird bis 2009 bei einem durchschnittlichen Wachstum von 6,5% auf 5,1 Milliarden US \$ geschätzt (www.Freedoniagroup.com). Dabei soll insbesondere der Marktwert von Spezialenzymen für die Pharmaindustrie überdurchschnittlich wachsen. Auf dem Weltmarkt ist die Europäische Gemeinschaft mit einem Anteil von 60% größter Enzymproduzent, 15% entfallen auf Nordamerika (GODFREY 1996).

Potentiell stellt jeder Organismus eine Enzymquelle dar; allerdings ist nicht jeder für die Anwendung im technischen Maßstab geeignet. Für die industrielle Anwendung wird neben einer guten Stabilität eine ausreichend hohe Konzentration vorausgesetzt. Derzeit werden Enzympräparate aus tierischem, pflanzlichem und mikrobiellem Material gewonnen, wobei letzteres eine vor allem aus ökonomischen Gründen zunehmende Bedeutung erlangt hat. Die hohe Biosyntheseleistung kultivierbarer Mikroorganismen gestattet die Entwicklung ökonomischer Verfahren zur Produktion von technologisch nutzbaren Enzymen.

In der Natur wird ein wesentlich höheres Potential an nutzbaren Enzymen vermutet, als bisher charakterisiert wurde. In jüngster Zeit stehen insbesondere höhere Pilze als neuartige Enzymquellen im Mittelpunkt des akademischen und industriellen Interesses. In ihnen vermutet man Biokatalysatoren, welche neuartige biodegradative bzw. biosynthetische Funktionen besitzen. Sowohl durch den Einsatz diverser Oxidoreduktasen als auch von Hydrolasen verspricht man sich eine verbesserte Gewinnung bzw. Extraktion von Aromastoffen, Antioxidantien sowie pharmazeutischen Wirkstoffen aus chemisch inerten Ligninen sowie aus Cellulose/Hemicellulose-Gemischen (RAJARATHNAM et al. 1998). Des Weiteren können diese Biokatalysatoren in umweltverträglichen Holzaufschluss- und Zellstoffbleichverfahren und in der Bodensanierung durch Oligomerisierung von xenobiotischen Schadstoffen eingesetzt werden (KNUTSON und RAGAUSKAS 2004, RODRIGUEZ et al. 2004, MAI et al. 2004). Neuere Forschungsergebnisse belegen die Eignung von Laccasen zur Synthese von Spezial- und Feinchemikalien über die oxidative Kopplung von Phenolen (PILZ et al. 2003), eine kovalente Quervernetzung von Kohlenhydraten und Proteinen (FIGUEROA-ESPINOZA et al. 2002) oder die Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen zu Aromastoffen (RONGMIN et al. 2000). Auch bei Lipasen aus Pilz-Zellkulturen zeichnen sich neuartige proteinbiochemische und katalytische Eigenschaften ab (FERMOR et al. 1981, CHRISTAKOPOULOS et al. 1992). ZORN et al. (2003) identifizierten eine neuartige Carboxylesterase aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* (DSMZ 8266) (Abb. 1), welche die Hydrolyse von Xanthophyllestern effizient katalysiert.

Der Weißfäulepilz *Pleurotus sapidus* ist aufgrund seiner guten submersen Kultivierbarkeit und hoher Expressionsraten als Produktionsstamm für Exo-Enzyme besonders geeignet. *Pleurotus*-Spezies verwerten eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen, wie Kaffeepülpe, Weizenstroh, Erdnussschalen oder Bananenblätter und sekretieren je nach Induktionsbedingungen unterschiedliche Enzymaktivitäten (PETERS 2003, SALMONES et al. 2005, GOSH et al. 1998).



Abbildung 1. Fruchtkörper von *P. sapidus*

Für eine mögliche industrielle Anwendung muss das vermutete Enzympotential zunächst charakterisiert werden. Die übliche Herstellung eines technischen Enzyms beginnt in der Regel mit der Gewinnung eines Enzym-Rohextraktes. Dabei müssen intrazelluläre Enzyme durch verschiedene Methoden („French press“, Kugelmühle) aufgeschlossen werden. Bei extrazellulären Enzymen entfällt dieser Schritt und es muss lediglich der Kulturüberstand durch Filtration oder Zentrifugation vom Myzel abgetrennt werden. Die sich anschließende Isolierung aus dem Proteingemisch erfordert für jedes Enzym eigens optimierte Verfahrensschritte. Die Kenntnis der physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Molekülgröße, isoelektrischer Punkt, Temperatur- bzw. pH-Stabilität, Ladung und Hydrophobizität ist dafür eine wesentliche Voraussetzung. Da das Zielenzym im Medium typischerweise in Anteilen von <1% des Gesamtproteins vorliegt, besteht die erste Grundoperation in der Anreicherung des Produktes. Mittels Membran- oder Ultrafiltration werden niedermolekulare Verbindungen bei gleichzeitiger Konzentrierung des gewünschten Enzyms abgetrennt. Auch Präzipitationstechniken wie die Fällung mittels Aceton oder Ammoniumsulfat kommen zum Einsatz. Die Feinreinigung erfolgt schließlich chromatographisch oder durch präparative Elektrophorese. Das Ergebnis der Isolierungsschritte wird durch den Reinigungsfaktor, der die spezifischen Aktivitäten [U mg^{-1}] von gereinigter Fraktion und Ausgangsmaterial ins Verhältnis setzt, sowie

den Anreicherungsfaktor angeben, der die Relationen der Volumenaktivitäten [U mL^{-1}] berücksichtigt.

$$\text{Reinigungsfaktor P} = \frac{\text{Aktivität } [\text{U mg}^{-1}] \text{ nach der Reinigung}}{\text{Aktivität } [\text{U mg}^{-1}] \text{ vor der Reinigung}}$$

$$\text{Anreicherungsfaktor E} = \frac{\text{Aktivität } [\text{U mL}^{-1}] \text{ nach der Reinigung}}{\text{Aktivität } [\text{U mL}^{-1}] \text{ vor der Reinigung}}$$

Die Hauptproblematik, die sich über den gesamten „Downstream-Prozess“ erstreckt, ist die Denaturierung von Proteinen, die bei Enzymen zum Verlust ihrer katalytischen Aktivität führt. Einen Überblick über die Grundoperationen bei der Isolierung technischer Enzyme ist in Abb. 2 dargestellt. Die im Labor üblichen Methoden lassen sich jedoch nicht immer dem großtechnischen Maßstab anpassen. Durchflussraten und Massentransfer sind wichtige Fragestellungen, die bei der Übertragung der Verfahren in den technischen Maßstab berücksichtigt werden müssen.

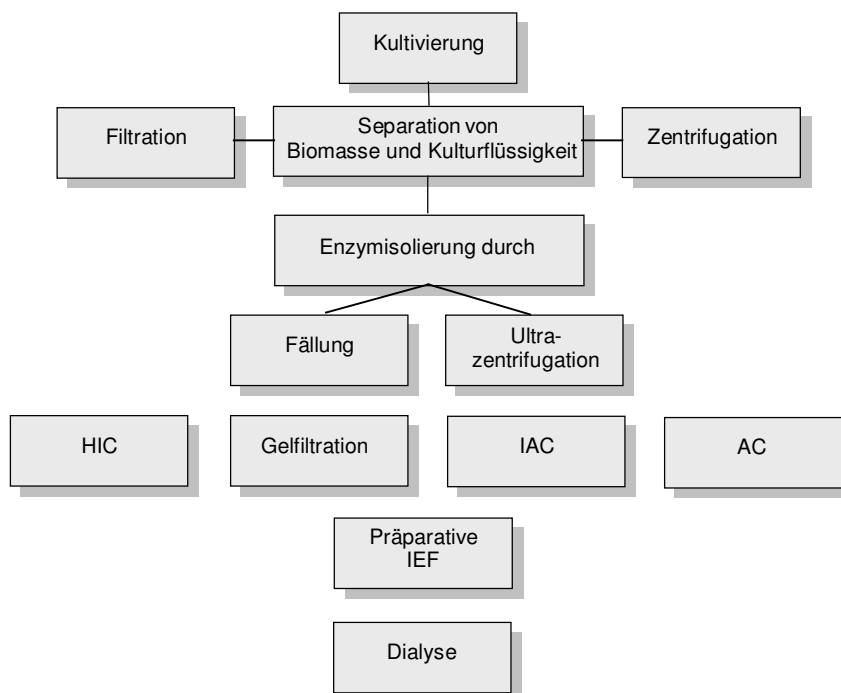


Abbildung 2. Vielstufenprozesse bei der Herstellung technischer extrazellulärer Enzyme

Extrazelluläre Enzyme katalysieren bevorzugt abbauende Reaktionen, um dem saprophytisch lebenden Organismus Nährstoffe zu erschließen. Durch entsprechende Induktoren, die dem Kulturmedium bei der Submerskultivierung zugefügt werden, kann die Sekretion erwünschter Enzyme begünstigt werden. Auch wenn extrazelluläre Enzyme im Bereich der Reinigung den Vorteil bieten, den Zellaufschluss als erste Aufbereitungsstufe einzusparen, so gilt es doch, ein komplexes Proteingemisch zu trennen (Abb. 3).

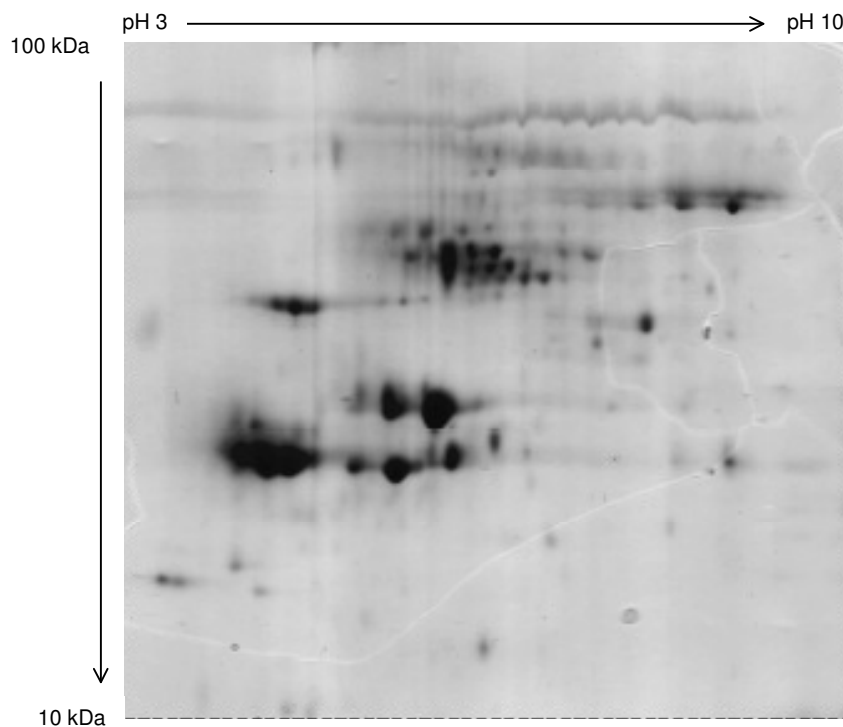


Abbildung 3. 2D-Elektropherogramm des Sekretoms von *P. sapidus* [nach ZORN et al. 2005]

Pilzenzyme werden häufig nur in geringen Konzentrationen sekretiert, so dass ihre Isolierung durch konventionelle Methoden hinsichtlich ihrer ökonomischen Effektivität nur unzureichend möglich ist. Auch bedeutet die Reinigung eines Biokatalysators durch herkömmliche mehrstufige Reinigungsprozeduren, hohe Aktivitätsverluste in Kauf zu nehmen.

1.2 Die Zerschäumung

Unter Berücksichtigung dieser Problematik besteht ein hoher Bedarf an effektiven Alternativen zur Enzymreinigung. Diese sollten neben hoher Selektivität, maximalen Ausbeuten, guter Anreicherung und weitgehendem Aktivitätserhalt vertretbare Materialkosten und minimalen Zeitaufwand gewährleisten. Eine vielversprechende Methode, deren Prinzip bereits in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts beschrieben wurde (OSTWALD 1920), stellt die präparative Zerschäumung dar. Dabei handelt es sich um ein Verfahren zur Abtrennung von löslichen, oberflächenaktiven Verbindungen aus stark verdünnten, wässrigen Lösungen (URAZEE und NARSIMHAN 1990). Durch Einleiten eines Gases in die das Zielprodukt enthaltende Flüssigkeit wird eine Gas-Flüssigkeit-Grenzschicht generiert, an die sich amphiphile Moleküle mit definierter Formation anlagern und mit dem gebildeten Schaum abgetrennt werden können (LOHA et al. 1997). Bei Verwendung eines inerten Gases schafft die Zerschäumung gute Voraussetzungen für die Isolierung oxidationsanfälliger Biomoleküle. Des Weiteren zeichnet sich die Methode durch eine hohe Umweltverträglichkeit und geringe Energie- und Investitionskosten aus, die auf den Verzicht von organischen Lösungsmitteln, auf Zeiteinsparung und auf die Verwendung einfacher Apparaturen zurückzuführen sind (MONTERO et al. 1993).

Erste Untersuchungen zur Anwendung der Zerschäumung beschränkten sich auf die quantitative Abtrennung von Proteinen aus Kartoffelruchtwasser, aus Rohsaft von Zuckerrüben und aus Harn (OSTWALD und SIEHR 1937). Schnell wurde erkannt, dass die Zerschäumung ein wesentlich höheres Potential barg, so dass die Methode zur selektiven Trennung von Molekülen aus Mehrkomponentensystemen adaptiert wurde. Unter Auswahl geeigneter Bedingungen wurde beispielsweise selektiv Gluten von Stärke getrennt (RODGERS 1972), Farbstoffe aus Kava Kava (BACKLEH et al. 2003a) oder Antioxidantien aus Rosmarin (BACKLEH et al. 2003b) gewonnen.

Nach LEMMICH (1967) wird die Zerschäumung wie die Flotation zu den adsorptiven Gasblasen-Trennmethode(n) (*Adsorptive Bubble Separation (ABS) methods*) gezählt. Während bei der Flotation grobdisperse Moleküle mit dem Schaum abtransportiert werden, werden bei der Zerschäumung gelöste, oberflächenaktive Substanzen in dem Schaum angereichert.

1.2.1 Prinzipien der Zerschäumung

Oberflächenaktive Verbindungen besitzen die Eigenschaft, sich an Phasengrenzflächen anzulagern. Beim Einleiten eines Gases in eine grenzflächenaktive Substanzen enthaltende Lösung lagern sich die Moleküle bevorzugt unter Bildung kohäsiver Filme an die Gasblase an. Die hydrophoben Bereiche des Moleküls ragen dabei bevorzugt ins Innere der Gasblase, während die hydrophilen Anteile in der wässrigen Phase verbleiben (Abb. 4). Der Schaum steigt in einer Kolonne auf, wobei durch physikalische Vorgänge wie Drainage und Koaleszenz das Schaumvolumen verringert und die adsorbierten Moleküle somit angereichert werden. Nicht-oberflächenaktive Substanzen, die beim Aufsteigen des Schaumes durch Flüssigkeitsanteile mitgerissen wurden, fließen zurück in die Ausgangslösung. Entlang der Schaumsäule bilden sich Fraktionen bestimmter, sich in der Hydrophobizität unterscheidender Molekülgruppen aus, so dass sich innerhalb der Kolonne ein chromatographischer Effekt einstellt (MAAS 1973). Nach Abschluss des Trennprozesses wird der Schaum aufgefangen und zur Produktgewinnung wieder verflüssigt.

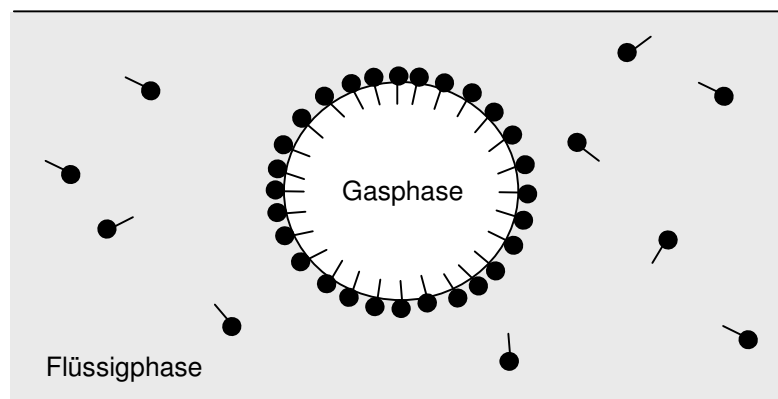


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Adsorption grenzflächenaktiver Verbindungen (● hydrophiler Teil, – hydrophober Teil) an der Phasengrenze Gas/Flüssigkeit.

Um den Zerschäumungsvorgang hinsichtlich seiner Fähigkeit Proteine anzureichern, zu optimieren, ist es notwendig, Kenntnisse über den Schaumaufbau und über physikalische Effekte, die auf die Schaumsäule einwirken, zu erlangen.

1.2.2 Schaumbildung

Schäume sind Dispersionen eines Gases in einer Flüssigkeit. Ihre Bildung ist ein physikalischer Effekt, der in 3 Phasen eingeteilt werden kann.

- (I) Der erste Vorgang besteht aus der Generierung von Gasblasen durch Einleiten eines Gases in den unteren Teil einer Flüssigphase. Die Homogenität der Blasengröße wird dabei durch eine poröse Fritte mit definierter Porengröße gewährleistet. Je kleiner die Porengröße gewählt wird, desto homogener bildet sich die Blasenpackung aus (NARSIMHAN und RUCKENSTEIN 1986).
- (II) Die Gasblasen steigen durch den Auftrieb in der Flüssigphase nach oben, wobei sich oberflächenaktive Verbindungen in der Grenzschicht gas/flüssig anlagern. Durch derartige Oberflächenadsorption wird die Oberflächenspannung γ der Flüssigkeit herabgesetzt (DAMODARAN 1997) und die Entstehung eines Schaumes ermöglicht. Die grenzflächenaktiven Substanzen erhöhen die Stabilität der Gasblasen weiter, indem sie einen membranähnlichen, viskoelastischen Film um die Blase bilden. Dabei wirken intermolekulare, nicht-kovalente Wechselwirkungen sowohl innerhalb derselben Phasengrenze als auch zwischen benachbarten Gasblasen.
- (III) Die Gasblase verlässt schließlich die Flüssigphase, deren Oberfläche bald mit Schaumblasen bedeckt ist. Es bildet sich die Schaumsäule.

1.2.3 Oberflächenadsorption

Wie oben diskutiert, lagern sich oberflächenaktive Verbindungen mit bevorzugter Ausrichtung an eine Grenzfläche gas/flüssig an. Die Adsorptionsgeschwindigkeit ist dabei diffusionskontrolliert. Im Gleichgewichtszustand ist die Konzentration adsorbierter Moleküle an der Grenzfläche größer als die nicht-adsorbierter Moleküle in der Flüssigphase. Die Anlagerung der Moleküle an die Grenzfläche geschieht infolge von Energiedifferenzen. Proteinmoleküle sind in wässriger Lösung von Wasserclustern umgeben. Diese geordnete Struktur hat eine Abnahme der Entropie zur Folge. An der Phasengrenze adsorbierte Moleküle erfahren durch den Verlust der

geordneten Struktur der Wassermoleküle eine Entropieerhöhung, wodurch der Adsorptionsprozess exergon wird, d.h. die Anlagerung der Moleküle geht mit einer Erniedrigung der freien Enthalpie (Oberflächenspannung) der Phasengrenze einher (DAMODARAN 1997).

Nach Gibbs lässt sich die Adsorption der Moleküle mit der Erniedrigung der Oberflächenspannung wie folgt verknüpfen:

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \cdot \frac{d\gamma}{d \ln c} \quad (1)$$

Dabei ist Γ die Konzentration an adsorbierten Molekülen an der Phasengrenzfläche, γ die Oberflächenspannung und c die Konzentration in der Flüssigphase. Die graphische Auslegung dieses Zusammenhangs folgt in ihrer Form einer Langmuirschen Adsorptionsisotherme (Abb. 5), die der Bildung einer Monoschicht an adsorbierten Molekülen entspricht (GRAHAM und PHILLIPS 1979).

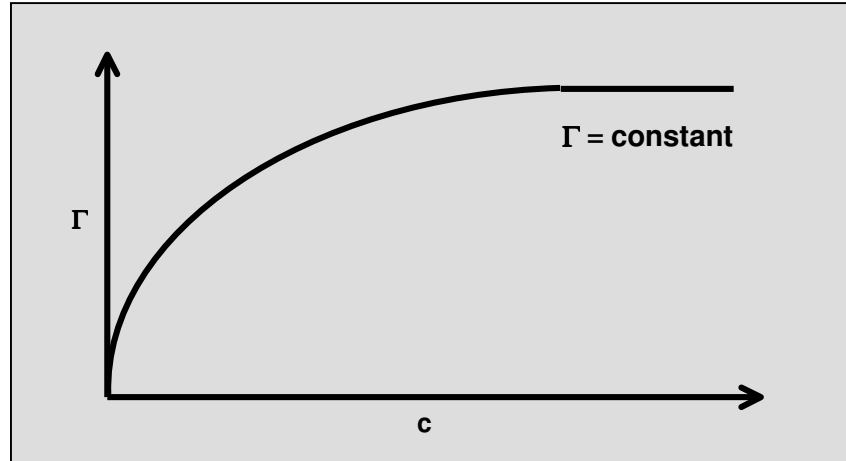


Abbildung 5. Graphischer Zusammenhang der Gibbsschen Adsorptionsgleichung [nach LEMMICH 1968].

Wie aus Abb. 5 hervorgeht, wird die Adsorption von Molekülen an die Phasengrenzfläche u.a. auch durch deren Konzentration bestimmt. Die effektivste Adsorption wird im Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-3} M erzielt (MAAS 1973). Konzentrationen, die über der kritischen mizellaren Konzentration (CMC) liegen,

verursachen einen gegensätzlichen Trend: Die Moleküle bilden spontan Mizellen aus und tragen nicht zur Schaumbildung bei (CHARM et al. 1966). BRITTEN und LAVOIE (1992) belegen eine Abnahme der Schaumbildungskapazität bei höheren Proteinkonzentrationen. Die Schaumbildungskapazität gibt die prozentuale Volumenzunahme durch Aufschäumen einer Flüssigkeit an.

Desweiteren wird die Adsorption von Molekülen durch deren Hydrophobizität beeinflusst. Die Oberflächenaktivität der Teilchen korreliert dabei direkt mit deren Hydrophobizität und infolgedessen mit der Adsorptionsstärke (Abb. 6). Vergleicht man z.B. die durchschnittliche Hydrophobizität von BSA und Lysozym (BROWN et al. 1999b), so kann direkt abgeleitet werden, dass BSA stärkere grenzflächenaktive Eigenschaften als Lysozym besitzt. Die hydrophoben Eigenschaften eines Moleküls werden u.a. auch durch den pH-Wert des Mediums bestimmt. Proteine weisen an einem ihrem isoelektrischen Punkt entsprechenden pH-Wert ein Maximum an Hydrophobizität auf, was zu einem Minimum an Löslichkeit in der wässrigen Phase und so zu einer verstärkten Adsorption an die Phasengrenzfläche führt (DESOUZA et al. 1991, CHARM et al. 1966, LOHA et al. 1997). Durch die Unterschiede in ihren isoelektrischen Punkten können Proteine demnach selektiv mittels Zerschäumung fraktioniert werden.

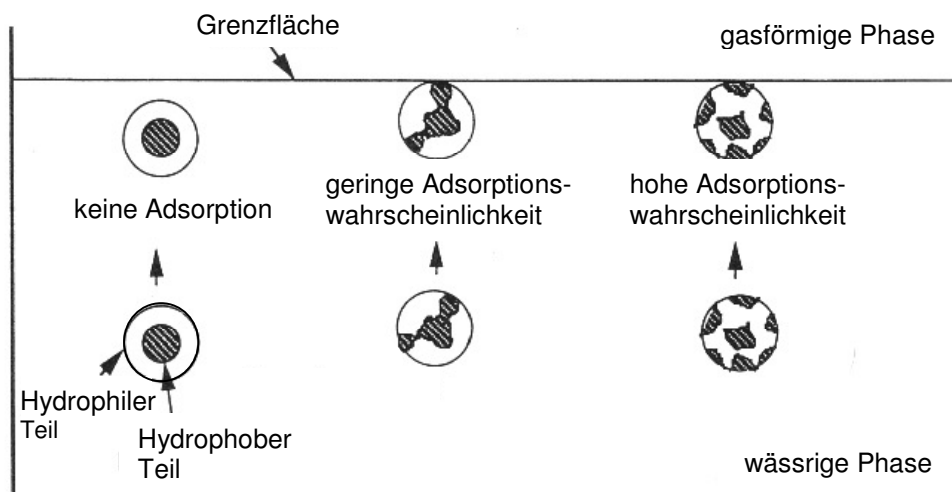


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Adsorption grenzflächenaktiver Verbindungen an die Phasengrenze Gas/Flüssigkeit in Abhängigkeit ihrer hydrophoben Eigenschaften [nach DAMODARAN 1997].

1.2.4 Schaumstrukturen

Innerhalb der Schaumsäule treten zwei Formen von Schäumen auf. Je nach Volumenkonzentration des Gases wird zwischen Kugel- und Polyederschaum unterschieden. Ein Kugelschaum zeichnet sich durch eine Häufung von kugelförmigen, eigenständigen Gasblasen in der Flüssigkeit aus. Der Gasanteil beläuft sich auf $< 74\% \text{Vol.}$ Beim Polyederschaum hingegen steigt der Gasanteil auf $> 74\% \text{Vol.}$ und die Gasblasen sind nur von einer dünnen Filmlamelle voneinander getrennt, so dass sie zu einem polyedrischen Verbund zusammenwachsen. Der Polyederschaum kann daher nur von oberflächenaktiven Substanzen gebildet werden, die seine Struktur durch die oben beschriebene Filmbildung stabilisieren (RÖMPP 1991). Abb. 7 verdeutlicht die dispersen Systeme.

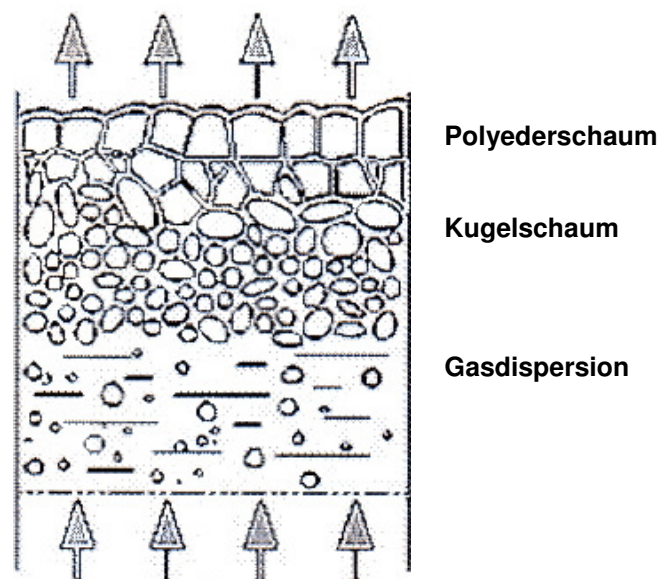


Abbildung 7. Schaumstrukturen in einem begasten System [nach RUNOWSKI und PAHL 2004].

Der Kugelschaum, der sich in dem unteren Teil der Schaumsäule bildet, geht nach und nach in einen Polyederschaum über. Die flüssige Phase zwischen den Gasblasen fließt dabei zurück nach unten, bis sich nur noch eine dünne Filmlamelle zwischen den Grenzflächen gebildet hat. Die Geometrie des Polyederschaumes wird also durch die Filmbildung der oberflächenaktiven Substanzen bestimmt. Seine Struktur lässt sich näherungsweise durch einen Pentagondodekaeder beschreiben (Abb. 8). Jeweils drei Lamellen treffen sich an den Kanten dieses Körpers unter

einem Flächenwinkel von 120° und bilden die sogenannten Plateau-Ränder (SCHRAMM und WASSMUTH 1994, WASAN et al. 1994). In der Pentagondodekaeder-Struktur lagern sich um eine Schaumblase zwölf benachbarte Blasen an (NARSIMHAN und RUCKENSTEIN 1986).

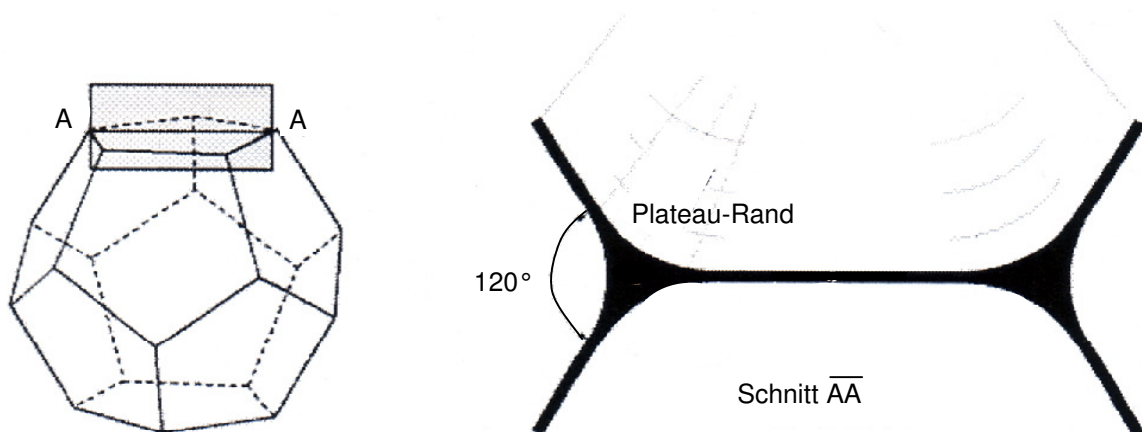


Abbildung. 8 Pentagondodekaeder (links) und schematische Darstellung der Plateau-Ränder (rechts) [nach RUNOWSKI und PAHL 2004].

1.2.5 Schaumstabilität

Schäume sind thermodynamisch instabile Systeme. In der Lamelle herrschen verschiedene stabilisierende und destabilisierende Kräfte, deren Einfluss von der Lamellendicke bestimmt wird. Diese wiederum hängt von physikalischen Eigenschaften des kohäsiven Films ab.

Der sogenannte Drainageeffekt resultiert zum einen aus Druckdifferenzen zwischen Lamelle und Plateau-Rand. Aufgrund der Krümmung der Phasengrenze an dem Plateau-Rand bildet sich ein Druckverlust zum Plateau-Rand aus und Flüssigkeit fließt aus der Lamelle in den Kanal. Zum anderen induziert die Gravitationskraft einen Rückfluss der Flüssigkeit aus vertikalen Lamellen zurück in die Ausgangslösung. Durch die Drainage verarmt der Schaum an Flüssigkeit und die adsorbierten Moleküle werden in der Schaumphase angereichert. Die Drainage beeinflusst die Dicke der Lamelle also negativ, bis sie schließlich ab einem Durchmesser von ≤ 100 nm reißt (RUGOWSKI und PAHL 2004) und die Schaumblase

platzt. Die hydrophoben Anziehungskräfte (van der Waals-Wechselwirkungen) benachbarter Molekülfilme begünstigen dabei den Rücklauf der Flüssigkeit aus den Lamellen. Besitzen die zum Inneren der Lamelle gerichteten Molekülanteile jedoch eine große Zahl an hydrophilen Bereichen, d.h. höhere Nettoladungen bei gegebenem pH-Wert, bilden sie sogenannte elektrische Doppelschichten aus. Die nun ausgebildeten elektrostatischen Effekte wirken auf die Abnahme der Lamellendicke und verzögern so ein Abreißen des Films (DAMODARAN 1997).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Drainage kompensiert, ist der Marangoni-Effekt. Er ist auf die Änderung der Oberflächenspannung beim Rückfluss der lamellaren Flüssigkeit zurückzuführen. Die Phasengrenzflächen erfahren bei der Drainage ein Längenwachstum (*stretching*), wodurch die adsorbierten Moleküle auseinandergezogen werden. Es entstehen nun lokale Bereiche an der Grenzfläche, die an oberflächenaktiven Molekülen verarmt sind. Daraus resultiert eine erhöhte Oberflächenspannung, die der rückfließenden Flüssigphase entgegen wirkt (Abb. 9) (LEMLICH 1968, DAMODARAN 1997).

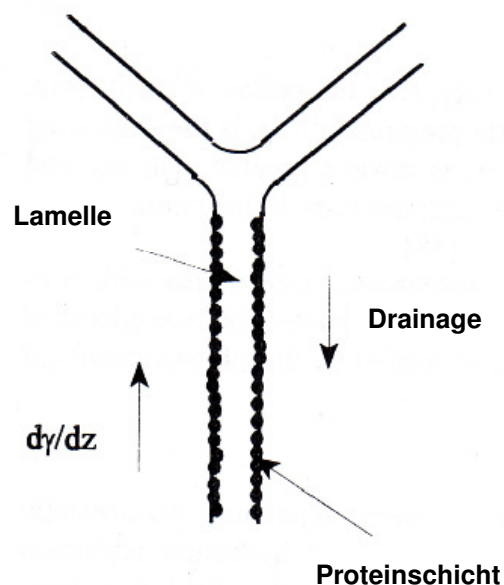


Abbildung 9. Schematische Darstellung des Marangoni-Effektes [nach DAMODARAN 1997], wobei $d\gamma/dz$ der Gradient der Oberflächenspannung ist.

Neben der Drainage beeinflussen mit Koaleszenz und Disproportionierung zwei weitere physikalische Effekte die Anreicherung, indem sie die Schaumstabilität vermindern. Unter Koaleszenz versteht man das „Verschmelzen“ zweier Schaumblasen infolge eines zerstörten Molekülfilms. Das Abreißen des kohäsiven Films kann das Resultat der Drainage sein, aber auch durch Kontakt mit einem hydrophoben Teilchen eingeleitet werden (Abb. 10).

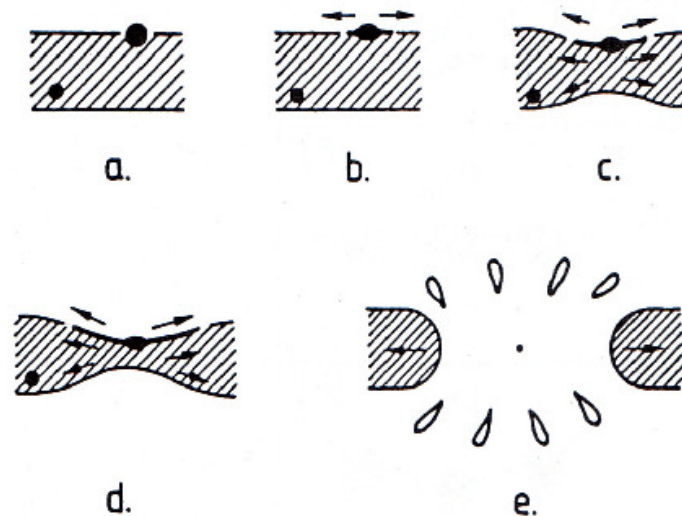


Abbildung 10. Schematische Darstellung des Mechanismus bei dem Filmriss durch Kontakt mit einem hydrophoben Teilchen [nach DAMODARAN 1997].

Unter Disproportionierung versteht man den Schaumzerfall aufgrund von Druckdifferenzen zweier benachbarter Schaumblasen. In Abhängigkeit vom Blasendurchmesser d herrscht in der Blase ein definierter Innendruck p . Weisen benachbarte Blasen unterschiedliche Durchmesser ($d_1 < d_2$) auf, entsteht eine Druckdifferenz ($p_1 > p_2$) und infolge dessen diffundiert das Gas aus der kleineren in die größere Blase. Durch heterogene Blasenpackung wird der Effekt der Disproportionierung begünstigt.

Beide Effekte üben einen positiven Einfluss auf die Anreicherung der adsorbierten Zielsubstanzen im Schaum aus. Die resultierenden größeren Blasen besitzen im Verhältnis zum Volumen eine kleinere Filmgrenzfläche, so dass überschüssige Flüssigkeitsanteile zwischen den Schaumblasen abfließen.

1.2.6 Einflussparameter

Der Erfolg der Zerschäumung wird sowohl durch physikalisch-chemische Einflussgrößen, wie pH-Wert, Gasflussrate oder Zerschäumungszeit, als auch durch apparative Parameter, wie die Säulenkonfiguration und Drainageeinbauten (PARLAR et al. 2001, SARKAR et al. 1987, LOHA et al. 1997) bestimmt. Jeder dieser Faktoren muss für einen effektiven Zerschäumungsprozess optimiert werden.

(a) pH-Wert

Die Anreicherung eines Proteins in der Schaumphase wird auf seine Hydrophobizität zurückgeführt. An seinem isoelektrischen Punkt besitzt das Protein maximale Hydrophobizität und lagert sich aufgrund seiner verringerten Löslichkeit effektiver an die Phasengrenze gas/flüssig an (DESOUZA et al. 1991, CHARM et al. 1966, LOHA et al. 1997). Durch Variation des pH-Wertes wird so ein selektiver Transport der Moleküle auch aus Mehrkomponentensystemen ermöglicht.

(b) Proteinkonzentration

Die Zerschäumung wird als eine Methode beschrieben, Proteine effektiv aus verdünnten Flüssigmedien abzutrennen (NOEL et al. 2002). Nach MAAS (1973) beträgt die optimale Proteinkonzentration zur Schaumbildung 10^{-7} bis 10^{-3} mol L⁻¹. Übersteigt die Konzentration des Proteins einen kritischen Wert, die sogenannte kritische mizellare Konzentration (CMC), aggregieren die Moleküle zu Mizellen, die nicht zur Schaumbildung beitragen. Unterhalb der optimalen Konzentration bildet sich nur ein verdünnter Proteinfilm aus. In ihm denaturieren die Proteine aufgrund des hohen Verhältnisses von Grenzfläche / Protein (BROWN et al. 1999a). Die Schaumbildungskapazität ist bei zu großer Verdünnung sehr gering, da die Oberflächenspannung an der Phasengrenze annähernd der der Lösung entspricht. Grundsätzlich gilt, dass die Sättigungskonzentration an der Phasengrenze höher als die Proteinkonzentration in der Lösung ist.

(c) Additive

Schauminduzierende Additive können der Lösung zugesetzt werden, wenn die Schaumbildungskapazität der enthaltenen grenzflächenaktiven Moleküle zu gering ist. Je nach Eignung werden nichtionische, kationische, anionische oder

zwitterionische Tenside zugesetzt. Ionische Tenside bilden darüber hinaus auch elektrostatische Anziehungskräfte zu geladenen Molekülen aus (GRIEVES und BHATTACHARYYA 1966, LEMLICH 1968). Je nach pH-Wert der Lösung, also je nach Nettoladung des Proteins, werden unterschiedlich starke Bindungen ausgebildet. Als Additive werden aber auch Salze zugesetzt. Sie vermindern die Löslichkeit der Proteine und erhöhen so ihre Hydrophobizität (FERNANDES et al. 2002, CHARM et al. 1966).

(d) Säulendimension

Sowohl die Säulenlänge als auch ihr Durchmesser sind wichtige Faktoren beim Zerschäumungsprozess. Längere Säulen erhöhen die Zeit, die der Schaum benötigt, um in ihnen aufzusteigen. Dies begünstigt Drainage und Koaleszenz und führt zu höheren Anreicherungen (BROWN et al. 1999a). Volumenvergrößernde Einbauten, die den Querschnitt der Säule lokal vergrößern, erhöhen den Drainageeffekt, da der Schaum Druckdifferenzen beim Übergang von kleineren zu größeren Säulenquerschnitten erfährt. Dies übt eine mechanische Belastung auf den Schaum aus, so dass Drainage und Koaleszenz begünstigt werden.

(e) Füllstand

Je höher der Flüssigkeitsstand der Ausgangslösung ist, desto länger wird ein Kontakt zwischen generierter Phasengrenzfläche und oberflächenaktiver Substanz ermöglicht. Die Anreicherung wird dadurch positiv beeinflusst (URAZEE und NARSIMHAN 1996).

(f) Gasart

Da die Zerschäumung u.a. als kostengünstige Methode beschrieben ist, hat die Wahl der Gasart zum größten Teil ökonomische Gründe. Den Gasen werden aber auch unterschiedliche Einflüsse auf die Zerschäumung zugesprochen. MONTERO et al. (1993) erwähnen die oxidative Denaturierung von Cellulase mit Luft als Zerschäumungsgas. Bei Verwendung von CO₂ sinkt der pH-Wert der Ausgangslösung (LIU et al. 1998), alternativ kann N₂ als inertes Zerschäumungsgas eingesetzt werden (THOMAS und WINKLER 1977, MONTERO et al. 1993).

(g) Gasflussrate

Durch höhere Gasflussraten werden geringere Anreicherungsfaktoren erzielt, da größere Mengen an Flüssigkeit in den Schaum eingelagert werden. Darüber hinaus wird die Zeit verringert, in welcher der Schaum in der Säule aufsteigt, wodurch die Drainage eingeschränkt wird. Durch höhere Flussraten wird auch die Selektivität negativ beeinflusst, da nicht-adsorbierte Fremdproteine durch das Flüssigmedium mittransportiert werden.

(h) Gasblasengröße

Die Gasblasengröße wird durch die Porosität der Glasfritte am unteren Teil der Säule bestimmt. Nach BROWN et al. (1999a) erhöht sich die Wiederfindung von Proteinen im Schaum, wenn kleinere Blasen generiert werden. Dies hängt mit der größeren Grenzfläche zusammen, an die höhere Proteinmengen adsorbiert werden können. Aufgrund des größeren Flüssigkeitsvolumens in den Lamellen verringern kleine Blasen jedoch die Anreicherung der Zielsubstanzen. Im Falle von großen Gasblasen kehren sich die Effekte um (URAZEE und NARSIMHAN 1996, BROWN et al. 1999a).

1.2.7 Zerschäumungsprozess, Verfahrensweisen und Apparaturen

Eine Zerschäumungsapparatur (Abb. 11) besteht aus einer Glassäule, in welche die zu zerschäumende Flüssigkeit eingefüllt wird. Im unteren Abschnitt der Säule ist eine Glasfritte eingebaut, durch die das Zerschäumungsgas in die Lösung dispergiert wird. Der generierte Schaum steigt in der Säule auf, wird an ihrem oberen Ende entnommen und verflüssigt. Die Verflüssigung des Schaumes beruht auf der Zerstörung der Schaumlamellen und kann durch mechanische, physikalische oder chemische Methoden, wie Druckbegasung, Anlegen eines Vakuums, starkes Rühren, Ultraschallbehandlung oder Antischaummittel verwirklicht werden (URAZEE und NARSIMHAN 1996, SCHÜGERL 2000).

Bei der Zerschäumung können grundsätzlich zwei Betriebsweisen gefahren werden. Im Labormaßstab eignet sich der Batchbetrieb. Die Ausgangslösung wird eingefüllt und zerschäumt, während der Schaum kontinuierlich entnommen wird. Die Anreicherung ist bei dieser Zerschäumungsweise zeitabhängig. Der erste generierte Schaum ist stark angereichert und enthält nach und nach weniger adsorbierte

Zielsubstanz. Der Batchbetrieb liefert erste kinetische Aussagen über die Effizienz einer Zerschäumung unter den experimentellen Bedingungen.

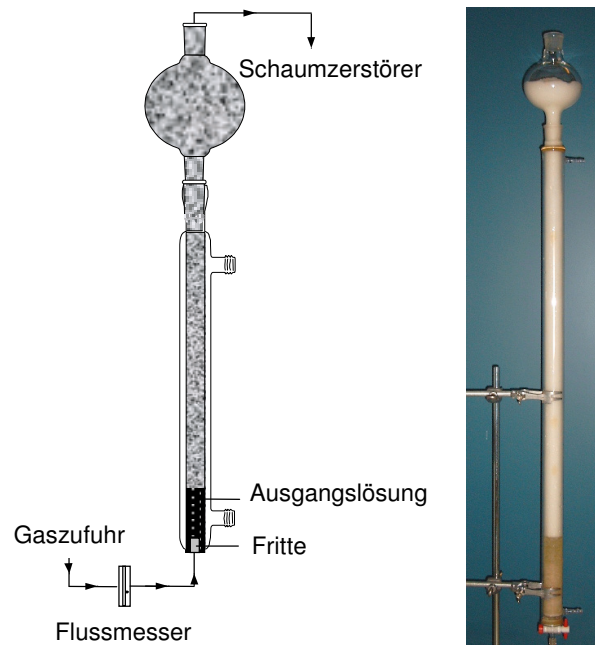


Abbildung 11. Aufbau einer (Batch-)Zerschäumungsapparatur

Ein kontinuierlicher Zerschäumungsbetrieb (Abb.12a) zeichnet sich durch höhere erzielbare Anreicherungsraten (PARLAR et al. 2001) und Möglichkeiten zum industriellen Scale-up aus. Während des Zerschäumungsprozesses wird dem System kontinuierlich neue Lösung zugeführt und abgereicherte Lösung abgezogen. Diese Verfahrensweise ermöglicht den Durchsatz größerer Probemengen. Um dem System neue Lösung zuzuführen, bieten sich zwei Möglichkeiten an: Zum einen die Zufuhr in die Flüssigphase und zum anderen in die Schaumphase (*Stripper*) (THOMAS und WINKLER 1977).

Eine zusätzliche Erweiterungsform für beide Betriebsweisen ist die Kreislaufzerschäumung nach OSTWALD et al. (1941). Der am Säulenende entnommene Schaum wird dem Zerschäumungsprozess erneut zugeführt. Auch hier ist die Einspeisung in den aufsteigenden Schaum bzw. in die Ausgangslösung möglich (Abb. 12b).

Neben der Kreislaufzerschäumung besteht auch die Möglichkeit, den verflüssigten Schaum in eine weitere Säule einzuleiten und erneut zu zerschäumen, um den Flüssigkeitsanteil weiter zu reduzieren. Diese Verfahrensweise wird nach OSTWALD et al. (1941) als Kolonnenzerschäumung bezeichnet und kann prinzipiell mit beliebig vielen Säulen betrieben werden.

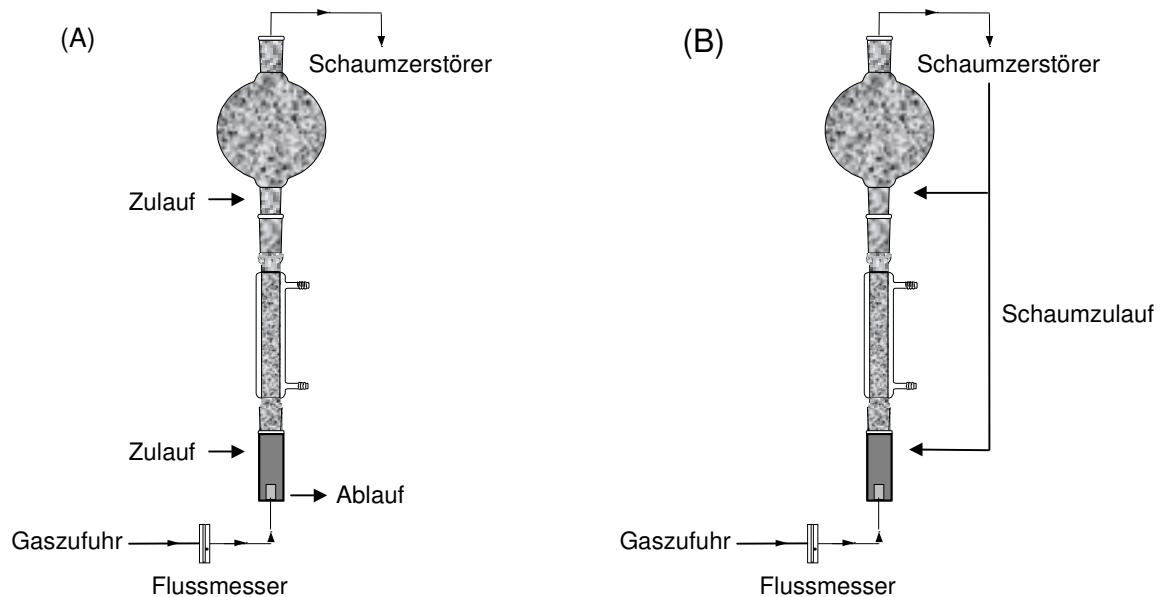


Abbildung 12. (A) Kontinuierliche Betriebsweise bei der Zerschäumung, (B) Kreislaufzerschäumung am Beispiel eines Batchbetriebs.

Beide Verfahrenskompositionen ermöglichen höhere Anreicherungen, da die anzureichernden Stoffe mehrmals zerschäumt werden. Die Anreicherung führt aber teilweise zum Verlust der biologischen Struktur und somit zum Aktivitätsverlust bei Enzymen (THOMAS und WINKLER 1977). Das Kreislauf- und Kolonnenverfahren ist demnach nur sinnvoll, wenn die Denaturierung des zu zerschäumenden Materials keinen Einfluss auf seine spätere Verwendung hat.

1.3 Zerschäumung von Enzymen

Neben oberflächenaktiven Naturstoffen, wie Aromastoffen (BACKLEH et al. 2003c), Antioxidantien (BACKLEH et al. 2003b), Pigmenten (BACKLEH et al. 2003a), Speicherproteinen (PARLAR et al. 2001, BROWN et al. 1999b, NOEL et al. 2001) oder aber auch Mikroorganismen (SCHÜGERL 2000) ist es möglich, Enzyme zu zerschäumen. Dabei ist der Erhalt ihrer katalytischen Aktivität von entscheidender Bedeutung. Viele Autoren diskutieren eine Denaturierung der Proteine bei der Adsorption an eine Phasengrenze (BELITZ et al. 2004b, BETANCOR et al. 2004). Nach CUMPER et al. (1950) erfolgt der Adsorptionsprozess in drei Schritten:

- (1) Diffusion des nativen Proteins zur Phasengrenzfläche und Adsorption
- (2) Denaturierung des Proteins durch Auflösen der Tertiärstruktur
- (3) Aggregation der freiliegenden Polypeptidketten

Nach BROWN et al. (1999a) gehen jedoch nur sehr geringe Proteinkonzentrationen mit einer Denaturierung einher. Dies wird auf das ungünstige Relativverhältnis von Phasengrenzfläche zu Proteinmolekülen zurückgeführt. YAMASHITA and BULL (1968) belegen am Beispiel von Lysozym den Erhalt der nativen Konformation oberhalb einer Proteinkonzentration von $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$. Nach BROWN et al. (1999a) korreliert eine Denaturierung an der Phasengrenzfläche mit der Tertiärstruktur eines Proteins. Eine geringe Anzahl an Disulfidbrücken bzw. das Fehlen dieses stabilisierenden Elementes erhöht danach die Wahrscheinlichkeit einer Entfaltung an der Phasengrenze. Eine im Rahmen dieser Arbeit produzierte und biochemisch charakterisierte Lipase besitzt ebenso wie die sekretierten Laccasen nach berechneten 3-D Modellen zwei Disulfidbrücken. Beide Enzyme konnten jeweils unter Erhalt ihrer katalytischen Aktivität erfolgreich zerschäumt werden. Neben einer möglichen Denaturierung an der Phasengrenzfläche können weitere Effekte die Stabilität der Enzyme beeinflussen. BURAPATANA et al. (2004) beschreiben die Denaturierung einer β -Glucosidase bei bereits geringen Volumenströmen ($3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) aufgrund von erhöhten Scherkräften, und oxidative Schädigungen von Enzymen wurden beim Einsatz von Luft als Zerschäumungsgas beobachtet (MONTERO et al. 1993).

1.4 Zielsetzung

Bis heute wurde nur ein kleiner Enzympool mittels Zerschäumungstechnologie angereichert. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um *proofs of principle* (ANDREWS und SCHÜTZ 1945, LOHA et al. 1997, CHARM et al. 1966, MONTERO et al. 1993), d.h. um Modellzerschäumungen, bei denen die realen Enzymkonzentrationen, wie sie in Fermentationsprozessen vorkommen, nicht berücksichtigt wurden. Zerschäumungen aus komplexen Kulturmedien wurden bislang kaum durchgeführt. HOLMSTRÖM (1968) zerschäumte eine Streptokinase aus Kulturüberständen von Streptokokken, wobei das Enzym am isoelektrischen pH-Wert denaturiert wurde, bei höheren pH-Werten aber durch Bindung an andere Proteinen in den Schaum transportiert wurde. Die Streptokinase wurde dabei lediglich konzentriert, aber nicht gereinigt. FERNANDES et al. (2002) optimierten die Wiederfindungsraten bei der Zerschäumung einer Cutinase aus Kulturüberständen von *Fusarium solani pisi* durch gentechnische Modifikation des Enzyms. Das rekombinante Enzym enthielt einen Fusionstag (Trp-Pro)₄, wodurch seine Hydrophobizität und damit auch die Wechselwirkungen mit einem unpolaren Detergenz erhöht wurden.

Diese Arbeiten entfernen sich jedoch stark vom Grundgedanken der Enzymzerschäumung, eine einfache, schnell durchführbare und kostengünstige Alternative zu herkömmlichen Reinigungsstrategien zu etablieren. Um industrielle Anwendungsmöglichkeiten zu eröffnen, bedarf es der Optimierung der Zerschäumung insbesondere aus realen Kulturbrühen. In dieser Arbeit wurde die Zerschäumung von Pilzenzymen zunächst als *proof of principle* am Beispiel einer kommerziellen Laccase aus *Trametes* sp. untersucht. Anschließend wurden Submerskultursysteme zur Produktion extrazellulärer Laccasen und Lipasen des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* entwickelt. Unter Berücksichtigung der physikochemischen und apparativen Einflussparameter wurden die Enzyme zunächst aus Kulturüberständen und anschließend auch aus myzelhaltigen Kulturen zerschäumt. Am Beispiel der Laccase-Isoenzyme wurde gezeigt, dass ein fraktionierter Transport der Enzyme in Abhängigkeit vom gewählten pH-Wert erzielbar ist. Eine Maßstabsvergrößerung der Lipase-Zerschäumung sollte den Einstieg in mögliche industrielle Applikationen vorbereiten.

2 Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization and Cloning

J. Agric. Food Chem., 53, 9498-9505, Copyright 2005, American Chemical Society.

2.1 Abstract

Peanut shells, a major waste stream of food processing, served as a renewable substrate for inducing the production of laccases by basidiomycetes. Of 46 surface cultures examined 29 showed laccase activity under conditions. The edible fungus *Pleurotus sapidus* was selected as the most active producer, immobilized on the shells, and cultivated in the fed-batch mode. A continuous rise in laccase activity was found indicating the inducibility of laccase secretion by the peanut shells and the reusability of the mycelium. Two laccase isoenzymes were purified by decoupled 2-D electrophoresis, and amino acid sequence information was obtained by electrospray-tandem mass spectrometry. cDNAs of the corresponding gene and another laccase were cloned and sequenced using a PCR based screening of a synthesized *P. sapidus* cDNA library. Data bank searches against public databases returned laccases of *P. ostreatus* and *P. sajor-caju* as the best hits. The potential use of laccases by the food industry is discussed.

Keywords: Basidiomycete, *Pleurotus sapidus*, fungi, extracellular enzymes, laccase, cDNA library.

3 Laccase isolation by foam fractionation - new prospects of an old process

Reprinted from *Enzyme Microb. Technol.*, in press, Copyright 2006, with permission from Elsevier.

3.1 Abstract

A laccase (E.C. 1.10.3.2) from *Trametes* sp. was isolated from aqueous media using foam fractionation. The pH value, superficial velocity, foaming period, and temperature were varied to optimise the transport of the active enzyme into the foam phase. Several detergents were added in varying concentrations to form and stabilise the foam, and the cationic detergent cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) proved to be the most appropriate. From water as a model system, maximum recovery rates of 94% of laccase activity were achieved at pH 6.0 in 6 minutes. For separation of the enzyme from protein rich culture media, the operation conditions had to be adjusted. At pH 5.4, 89% of laccase activity were transported into the foam phase after 15 minutes. The method established was successfully applied to the isolation of an active laccase isoenzyme from submerged cultures of the basidiomycete *Pleurotus sapidus*.

Keywords: foam fractionation, downstream process, laccase, basidiomycete.

3.2 Introduction

Foam fractionation is a gentle, environmentally compatible, inexpensive, and selective method for the effective separation of surface-active compounds from diluted aqueous solutions (OSTWALD and SIEHR 1937, LEMLICH 1968). This process was first patented in 1920 (OSTWALD 1920) and received renewed interest in separation of biological materials such as proteins (URAZEE and NARSIMHAN 1990, LOCKWOOD et al. 1997, BROWN et al. 1999b), microorganisms (BAHR and SCHÜGERL 1992), suspended solids (TIMMONS et al. 1992), aromatic substances (BACKLEH et al. 2003c), and pigments (BACKLEH et al. 2003a) in recent years. A mathematical model of the foaming process of albumines was described by DU et al. (2000).

Foam systems consist of a thin liquid film including a gaseous phase. The two phases are separated by a thin, anisotropic interface region (SCHRAMM and WASSMUTH 1994). Surface-active compounds adsorb to the interface of the gas-liquid dispersion and thus stabilize the dispersed gas phase by self-orientation. Proteins, as amphiphilic compounds, strongly interact with the interface and are thereby separated from a feed phase into the foam phase. While the hydrophobic parts of the protein attach to the gas phase, the hydrophilic parts are orientated towards the liquid phase. Several parameters such as pH value and protein concentration influence the protein adsorption, and thus the separation efficiency and the success of a foaming process. The adsorption to the interface has been described as a three-step process, comprising protein denaturation in the second step (CUMPER and ALEXANDER 1950). For this reason, foam fractionation of active enzymes has been considered impossible in the past.

Numerous enzymes for the food, pharmaceutical and cosmetic industry are currently isolated by multistage processes such as precipitation, ultrafiltration, and dialysis, followed by several liquid chromatographic steps. These methods are generally time-consuming, expensive, and above all, often come along with a high loss of enzymatic activity. In this study, foam fractionation of a commercial laccase preparation from the basidiomycete *Trametes* sp. and from submerged cultures of *Pleurotus sapidus* was investigated. Laccases currently gain a great deal of attention for bioremediation, beverage (wine, fruit juice, tea, beer) processing, ascorbic acid detection, pectin gelation, baking, and as biosensor (MINUSSI et al. 2002, GOMES and REBELO 2003). The aim was to develop a foaming process for the separation of extracellular laccases from fungal culture while maintaining the full enzymatic activity.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Materials

Laccase (E.C. 1.10.3.2) from *Trametes* sp. was obtained from ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, Germany). Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and saponin (*Quillaja* bark) were from Roth (Karlsruhe, Germany). Triton X-100 and Brij 35 were procured from Sigma (Seelze, Germany). 2,2'-Azino-bis(3-

ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), bovine serum albumin, and manganese sulfate monohydrate were obtained from Fluka (Seelze, Germany). Sodium tartrate, D-(+)-glucose monohydrate, L-asparagine monohydrate, yeast extract, potassium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide, hydrochloric acid and ethylenediamine tetraacetic acid were received from Merck (Darmstadt, Germany). Magnesium sulfate, ferrous(III) chloride $\times 6 \text{ H}_2\text{O}$, copper sulfate $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$ and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Zinc sulfate $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$ was from J.T. Baker B.V. (Deventer, The Netherlands), and lignin (organosolv) from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany).

3.3.2 Protein determination

Protein concentrations were determined according to LOWRY et al. (1951) using bovine serum albumin as standard. Applicability of the test in presence of the respective detergent used was verified.

3.3.3 Enzyme assay

Laccase activity was quantified by monitoring the oxidation of ABTS at pH 4.5 and 420 nm ($\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (BOURBONNAIS and PAICE 1990) in a thermostated cuvette at 27 °C. The reaction mixture contained 0.5 mM ABTS in 0.1 M sodium tartrate buffer (pH 4.5) and the enzyme solution in a total volume of 1 mL. The increase of absorbance was monitored over 2 minutes in a Lambda 12 UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer). One unit of enzyme was defined as 1 μmol of substrate oxidised per minute under the specified conditions. The applicability of the assay in presence of the respective detergent used was verified.

3.3.4 Preparation of enzyme solution

Laccase from *Trametes* sp. was dissolved in deionised water or in standard nutrient liquid (SNL) medium according to Sprecher (1959) (3% glucose, 0.45% asparagine, 0.3% yeast extract, 0.15% KH_2PO_4 , 0.05% MgSO_4 , and mineral salts). The isoelectric point of the *Trametes* laccase was determined to be 3.5 by

isoelectric focusing (IEF), and the specific activity was 1.4 U mg⁻¹ protein. Detergents were added in varying concentrations as indicated in the text.

*3.3.5 Cultivation of *Pleurotus sapidus* and laccase production*

Mycelia of *Pleurotus sapidus* (8266 DSM) were maintained on 1.5% agar plates with standard nutrient liquid (SNL). Precultures of *P. sapidus* were prepared from a mycelial block (1 cm²) as inoculum, which was excised from the agar plate and placed in a 300 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL SNL medium. After treatment with an Ultraturrax homogeniser (IKA-Werke, Staufen, Germany) the fungal culture was incubated for 7 days at 150 rpm and 24 °C. For production of laccases, the main cultures were prepared in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL SNL medium by transferring 20 mL of the preculture into each flask. The secretion of laccases into the medium was induced by addition of 0.1% (w/v) lignin and 300 µM CuSO₄ to the main cultures, which were then incubated at 150 rpm and 24 °C. At the time of maximum laccase activity, the supernatant was separated from the mycelium by filtration under reduced pressure (filter paper # 595, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Media and equipment were autoclaved prior to use, and sterile techniques were applied throughout the procedures.

3.3.6 Isoelectric focusing

IEF polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a Multiphor II system (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) using Servalyt™ Precotes™ Precast Gels with an immobilised pH gradient pH 3 to 6 (Serva, Heidelberg, Germany). The isoelectric points of the laccases were estimated using a low pI calibration kit 2.8 to 6.5 (Serva). Gels were silver stained or activity stained with ABTS.

3.3.7 Foam fractionation - Configuration of equipment and experimental procedure

The equipment consisted of a cylindrical glass chamber (l = 21 cm, d = 3 cm) with a porous frit (P3, porosity 16 to 40 µm), a column (l = 27 cm, d = 1.6 cm) and a glass bowl (250 mL). Experiments were carried out with 70 mL of enzyme solution.

Nitrogen was passed through the frit and the foam was collected in the glass bowl. SDS solution (0.5%) was used to break the foam. Samples for protein and activity analyses were taken from the initial solution, the retentate and the liquefied foam. Superficial velocities of nitrogen were adjusted from 5 to 15 cm min⁻¹ (20 to 60 mL min⁻¹).

3.3.8 Calculations

The following calculations were made for each foam fractionation:

$$(1) \text{ Recovery of protein (Rp)} = \frac{\text{Mass of protein (mg) in the foam}}{\text{Mass of protein (mg) in the initial solution}} \times 100\%$$

$$(2) \text{ Recovery of activity (Ra)} = \frac{\text{Activity (U) in the foam}}{\text{Activity (U) in the initial solution}} \times 100\%$$

$$(3) \text{ Purification factor (P)} = \frac{\text{Specific activity (U mg}^{-1}\text{) in the foam}}{\text{Specific activity (U mg}^{-1}\text{) in the initial solution}}$$

All quantitative data represent average values of at least duplicate analyses.

3.4 Results

The following parameters were varied systematically: pH value, detergent and laccase concentration, foaming period, superficial velocity, temperature, and finally the use of compressed air instead of nitrogen.

3.4.1 Foam fractionation of laccase (*Trametes sp.*) from deionised water

Several non-ionic and ionic detergents, such as Brij 35, saponin, Triton X-100, and SDS were tested for their applicability in foam fractionation of laccases. While these detergents effected maximum recovery rates of < 40%, employing the cationic detergent CTAB significantly improved the process. Hence, the following experiments were all conducted in the presence of CTAB. To test the influence of the pH value,

the pH of the enzyme solution was adjusted from 3.0 to 7.0 with 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl, respectively. At pH 6.0, 94% of the enzymatic activity were recovered in the foam, and 98% of activity were retained during the fractionation process. The minimum activity in the foam was recovered at pH 3.0 (Figure 1).

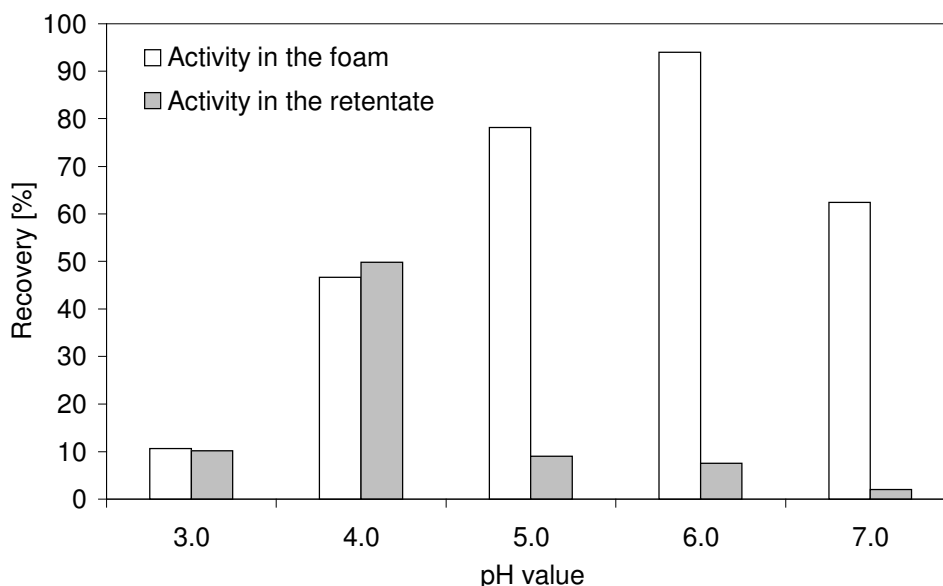


Figure 1. Recovery of laccase activity after foam fractionation of deionised water at varying pH values (500 U L⁻¹ laccase, 0.4 mM CTAB, 5 cm N₂ min⁻¹, 6 min, 24 °C).

The enzyme activity in the feed solution was varied from 300 to 700 U L⁻¹ to evaluate the transport capacity of the foam. While the maximal recovery rate of laccase activity in the foam was 94% at 500 U L⁻¹ laccase, a similar rate of transfer of activity into the foam was observed over the entire concentration range (data not shown). Subsequently, the kinetics of the enzyme transport into the foam phase was investigated over the foaming period. After 6 minutes, the transport of the enzyme into the foam phase was nearly complete (Figure 2). 94% of activity were found in the foam, while only 4% remained in the initial solution.

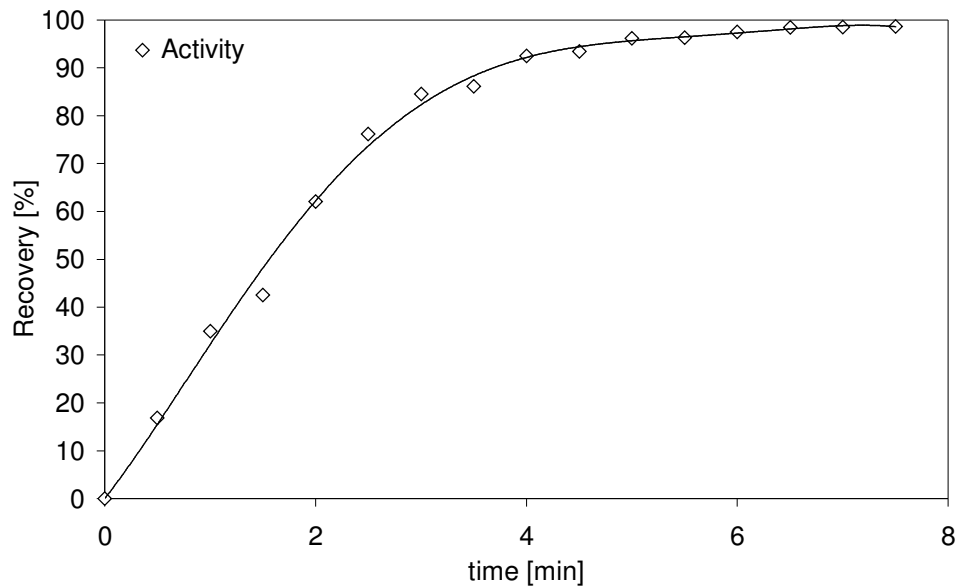


Figure 2. Kinetics of the laccase transport from deionised water into the foam (pH 6.0, 500 U L⁻¹ Laccase, 0.4 mM CTAB, 5 cm N₂ min⁻¹, 24 °C).

3.4.2 Foam fractionation of laccase (*Trametes sp.*) from SNL medium

For the enzyme fractionation from SNL medium, the above defined parameters were used: pH 6.0, 500 U L⁻¹ laccase, 0.4 mM CTAB, 5 cm N₂ min⁻¹, 6 min, 24 °C. Under these conditions, only 24% of the laccase activity accumulated in the foam, while 74% remained in the retentate. Individual testing of the constituents of the SNL medium in a series of comparative experiments revealed that yeast extract and MgSO₄ were the main interfering factors. Re-optimisation of the crucial process parameters in the range from 15 to 700 U L⁻¹ laccase yielded an ideal pH range of 5.0 to 6.0, and subsequent tests were carried out with 700 U L⁻¹ at pH 5.4, a pH typical of laccase producing submerged cultures of *P. sapidus*. Increasing the detergent concentration to 1.2 mM resulted in the highest recovery rate of 82% (Figure 3).

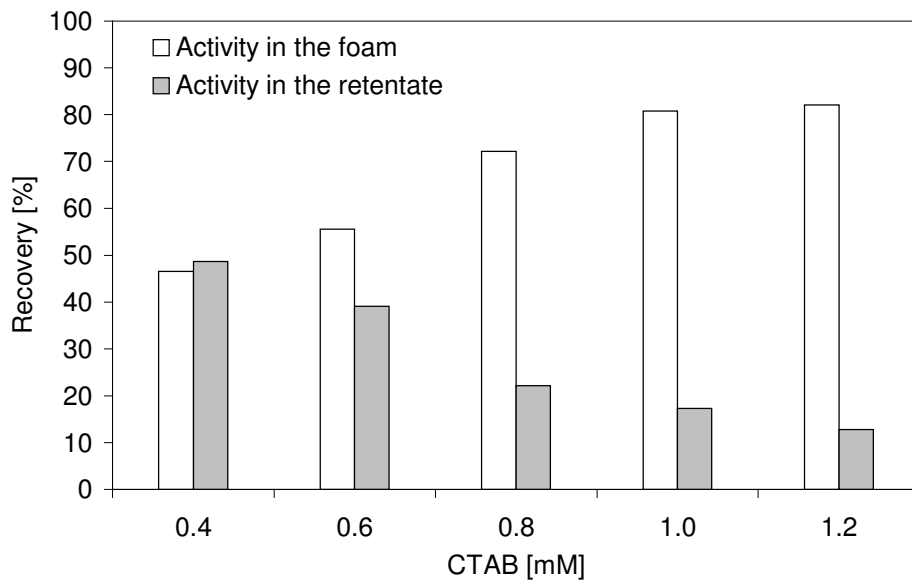


Figure 3. Recovery of laccase activity after foam fractionation from SNL medium at varying concentrations of CTAB (700 U L^{-1} laccase, pH 5.4, $5 \text{ cm N}_2 \text{ min}^{-1}$, 10 min, $24 \text{ }^\circ\text{C}$)

By raising the gas flow to 15 cm min^{-1} , the recovery of enzyme activity in the foam was further optimised to 89%. A marginal loss of activity of 2% was observed, and a purification factor of 2.4 was calculated. An extension of the foaming period to 30 minutes did not result in higher recovery rates. Whilst decreasing the temperature to $5 \text{ }^\circ\text{C}$ led to a significantly reduced recovery, increasing the temperature to $35 \text{ }^\circ\text{C}$ further improved the protein transport, but led to a partial enzyme inactivation. The same recovery rates were achieved, when nitrogen was replaced by compressed air.

3.4.3 Foam fractionation of laccases from culture supernatants of *Pleurotus sapidus*

After enzyme induction with lignin and CuSO_4 , high laccase activities of up to $2,400 \text{ U L}^{-1}$ were produced by submerged cultures of *P. sapidus*. Altogether 5 isoenzymes with pIs of 3.3, 4.1, 4.2, 4.3, and 4.7 were detected in the culture supernatants of *P. sapidus* by activity staining using ABTS (Figure 4). At a detergent concentration of 0.6 mM, pH 5.5, $24 \text{ }^\circ\text{C}$, and a superficial velocity of $10 \text{ cm N}_2 \text{ min}^{-1}$, 70.4 % of the total laccase activity were separated into the foam in 30 minutes. This activity was predominantly provided by the isoform at pI 3.3 which was not detectable

anymore on the silver stained lane of the retentate sample (Figure 4, lane 3). The volume of the foam fraction was about 15 mL.

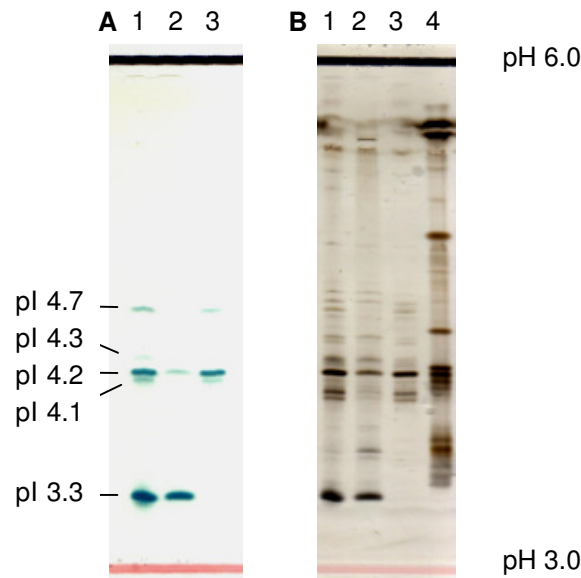


Figure 4. Foam fractionation of laccases from culture supernatant of *P. sapidus*. IEF-gel: Enzyme solution (1), foam (2), retentate (3), marker proteins (4); **A** activity staining using ABTS, **B** silver staining (pH 5.5, 0.6 mM CTAB, 10 cm min⁻¹, 24 °C).

3.5 Discussion

As a proof of principle, a laccase from *Trametes* sp. was separated from deionised water and from culture media, and laccase isoforms were separated from fungal culture supernatants using foam fractionation. CUMPER and ALEXANDER (1950), for example, and many others since, have reported protein denaturation at gas-liquid interfaces. In the pH range 4.0 to 6.0 no denaturing effect on the laccases' activity was observed (Figure 1). The activity in the liquefied foam and in the retentate summed up to about 100%. At higher and lower pH values activity of the laccases was not completely be preserved during the foaming processes. Three main attributes of a protein govern foam formation and stabilization: rapid adsorption to the interface, reduction of the surface tension, and film formation through molecular interactions (DAMODARAN 1997). Due to the minor foam formation properties of laccase, a detergent was added to the feed solution. Among the formerly employed

detergents were non-ionic types, such as Triton X-114 (FERNANDES et al. 2002) and saponin (BACKLEH et al. 2003b), and anionic types, such as sodium bis-(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (JAUREGI and VARLEY 1998). In the present study the cationic CTAB turned out to be the most appropriate additive. Several researchers (WALKER and MCCALLION 1980, RANOCHA et al. 1999) have reported an inhibition of laccases by CTAB. The unexpectedly high stability of the laccases in the presence of CTAB may be explained by a close molecular association of inhibitor and enzyme. This association was reversed by addition of SDS to the foamate, thereby restoring the full activity of the enzyme. The complex CTAB-laccase was destroyed by an excess of SDS-molecules. This process is comparable to an elution from an ion exchanger. As a result, it is probably not the laccases themselves which are compatible with a foaming process, but the laccase-CTAB ion pairs. Removal of the detergents from the liquefied foam is easily achieved by addition of ion exchangers, like Dowex (Sigma, Germany) or Permutit (Merck, Germany). On the other side, for an application in a non-food domain it is not essential to remove the detergent.

The surface activity of a protein and the stability of a protein foam are maximal at its isoelectric point, because minimised electrostatic repulsion results in maximal packaging at the gas-liquid interface (CHARM et al. 1966, NOEL et al. 2002). Consequently, protein separation at the isoelectric point of the target protein should improve its transport into the foam phase and enhance the over-all performance of the separation. However, the maximum transport of *Trametes* laccase was observed at pH 5.4; significantly lower recovery rates were achieved at its pI (3.5) using CTAB. As a cation, CTAB is supposed to stably interact upon shifting the pH to values above the pI with the now negatively charged laccase. This interaction is prone to weaken at a pH of 7.0 and higher resulting in a starting denaturation (Figure 1). Also GSCHWENDTNER (2000) noticed a lower enrichment of albumine and of hemoglobine at their respective pI. The two proteins interacted with each other, and an adsorption to the interface was complicated.

The secretion of extracellular enzymes is a dynamic process, and enzyme concentrations in the culture medium vary significantly over the cultivation period. As the capacity of the gas-liquid interface for adsorbed enzyme is limited, high actual concentrations of enzyme may saturate the foam. In this study, a wide range of enzyme concentrations of the feed solution were transported successfully into the

foam. Using deionised water or culture medium concentrations from 15 up to 1000 U L⁻¹ were recovered with similar rates. These concentrations typically occurred in the submerged cultures which underlines the good compatibility of foam fractionation with the dilute protein solutions provided by common bioprocesses. Extremely changing enzyme concentrations could be counteracted by increasing the application frequency of a batch-wise foam fractionation.

The kinetics of the laccase transport into the foam roughly followed a hyperbolic function (Figure 2). Apparently, foam fractionation proceeded rapidly. Within the first 3 minutes, 85% of laccase activity were transported into the foam phase, and therefore the early foam fractions contained the highest enzyme concentrations. Looking at the high molecular mass and low diffusion coefficients of proteins in general, this result was not to be expected. The short period of residence of the laccases in the foam may have contributed to the good recovery of activity.

The conditions for the enzyme separation from actual culture medium had to be modified because of the complex solution of proteins, salts and carbohydrates. The medium components MgSO₄ and yeast extract were identified as the major interfering factors. The sulfate anions were transported completely into the foam phase indicating the formation of ion pairs with the CTAB cations. Therefore, higher concentrations of the detergent were needed to compensate for these losses. To isolate the enzyme from medium, a CTAB concentration of 1.2 mM was best (Figure 3). Higher detergent concentrations resulted in an extremely wet foam and, due to a lower drainage effect, in an increased transport of non-target proteins (BROWN et al. 1999b). The critical micellar concentration (CMC) of CTAB is 0.92 mM (www.applichem.de). Above the CMC, the foam structure is more rigid because of a reduced surface tension and an increased interfacial viscosity (SCHRAMM and WASSMUTH 1994).

Apart from the denaturation by static interfacial forces in the foam, enzymes may be inactivated by shear forces occurring in the feed phase (BURAPATANA 2004). Flow rates of 6 mL min⁻¹ in a volume of 10 mL initial solution resulted in shear rates which led to degradation β -glucosidase. LIU et al. (1998), using air, nitrogen, and carbon dioxide as sparging gases, described a loss of activity of trypsin and catalase due to oxidation when air was used. Here, the laccases were isolated with flow rates of

60 mL min⁻¹ (15 cm min⁻¹) and the overall loss of activity was below 2%. No reduced recovery rates were observed when nitrogen was replaced by compressed air.

Compared to a classical purification procedure of an extracellular fungal laccase from *Trametes* by ultrafiltration (XIAO et al. 2003) the foaming process yielded superior enzyme recoveries. During the ultrafiltration, 50% of the activity were lost, and a purification factor of 2.3 was obtained, whereas >70% of laccase activity were separated through foam fractionation from submerged cultures of *P. sapidus* with a comparable purity. At a pH of 5.5, the isoenzyme with pI 3.3 was transferred into the foam quantitatively, while only traces of the other isoenzymes were transported (Figure 4). If the separation of a certain isoenzyme was aimed at, a step-wise, selective transport could be envisaged by shifting the operating pH during foaming. This, however, may proceed at the expense of the stability of some of the other isoenzymes.

3.6 Conclusions

Foam fractionation, a member of adsorptive bubble separation techniques, may be developed into a valuable component of novel schemes for enzyme purification, or may even replace multiple column chromatographic operations. Classical steps, such as size exclusion chromatography, usually dilute the target enzyme due to inevitable peak broadening. Fine-tuning of key parameters affecting the distribution of an enzyme into the foam, such as pH value, enzyme and detergent concentration, superficial velocities, and the foaming period, offers the possibility to adapt the process to various enzyme sources and matrices. The presented results disprove previous assumptions that foaming processes obligatorily come along with the loss of the catalytic activity of an enzyme.

3.7 Acknowledgements

Financial support by the AIF (project # 121 ZN) through the Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn, is gratefully acknowledged. The project is part of the joint initiative “Biologisch aktive Naturstoffe – Chemische Diversität” at the University of Hannover.

4 Foam fractionation of *exo-lipases* from growing *Pleurotus sapidus*

Reprinted from *Lipids*, 40 (3), 323-327, Copyright 2005, with permission from AOCS.

4.1 Abstract

Active lipases were isolated from the culture supernatant of the basidiomycetous fungus *Pleurotus sapidus* by foam fractionation. The pH-value, the gas flow, and the foaming period were systematically varied to optimize the transport of the enzymes into the foam phase. On the 70-mL scale, a maximum recovery of hydrolytic activity of 95% was obtained at pH 7.0 and 60 mL N₂ min⁻¹ after 50 minutes. The procedure, with minor modifications, was also applicable to native pellet cultures of *P. sapidus*. The same recovery of 95% was achieved, with purification and enrichment factors of 11.6 and 28.0, respectively.

Keywords: foam fractionation, downstream process, lipase, *Pleurotus sapidus*.

4.2 Introduction

Foam fractionation belongs to the group of adsorptive bubble separation techniques. While bubbles rise through a liquid phase that contains the target solute, the most surface-active molecules preferentially adsorb onto the interfacial area. Bubbles leaving the surface of the feed solution carry both adsorbed compound and bulk liquid into the emerging column of foam. The interstitial liquid drains back along the lamella of the bubbles and returns nonadsorbed solutes to the retentate. The emerging foam does not reach a thermodynamic equilibrium; it becomes drier, shows coalescence, and finally collapses into a liquid foamate. Because of the high surface-to-volume ratio of a foam, the foamate is enriched in the surface-active target compound. OSTWALD (1920) investigated foam fractionation for the isolation of natural compounds and attained patent protection of this technology as early as 1920. In recent years, foam fractionation has been increasingly researched for the separation of surface-active, low-molecular mass compounds from diluted aqueous

solutions (BRITTEN and LAVOIE 1992, DU 2000). As amphiphilic species, proteins are foaming agents, and several researchers have used foam fractionation successfully for the isolation of β -Casein and plant storage proteins (BROWN et al. 1999, PARLAR et al. 2001). However, by adsorption of a protein onto the anisotropic gas-liquid interface, partial unfolding of the tertiary structure may occur, resulting in a decrease or loss of the bioactivity (SCHÜGERL 2000, BELITZ et al. 2004b). Generally, the ability to develop a stable foam depends on the surface properties of the protein molecules (DAMODARAN 1997). With increasing hydrophobicity, the surface tension of the solution decreases and the concentration of the target protein in the foam is increased (FERNANDES et al. 2002, LOCKWOOD et al. 1997). The dynamics of foam formation, its structure and properties are affected by a number of operational parameters, for example gas flow rate (VARLEY et al. 2004). Mathematical models of foam fractionation processes have been compiled by DU et al. (2000) and SUZUKI and MARUYAMA (2001).

Typically, lipases are bipolar molecules distinguished by an interfacial mode of catalytic action (ARREGUÍN-ESPINOSA et al. 2000), which may render them particularly suitable for isolation by foam fractionation. In submerged cultures of fungi, some of the lipases are secreted into the growth medium (FREIRE et al. 1997, ZORN et al. 2003). This suggests their immediate separation by a batch-type foaming of the nutrient medium. In this study, lipases were produced by the basidiomycete *Pleurotus sapidus*, using Tween 80 as an inducer, and isolated from either the clear supernatant or the pellet suspension culture.

4.3 Material and methods

4.3.1 Chemicals

Tris hydrochloride and agarose were obtained from Roth (Karlsruhe, Germany), manganese sulfate monohydrate, ammonium nitrate, bovine serum albumin, and dipotassium hydrogen phosphate from Fluka (Seelze, Germany), D-(+)-glucose monohydrate, L-asparagine monohydrate, yeast extract, potassium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide, hydrochloric acid, Coomassie Brilliant Blue G-250, and ethylene diamine tetraacetic acid from Merck (Darmstadt, Germany), Tween 80,

magnesium sulfate, ferrous(III) chloride x 6 H₂O, calcium chloride x 2 H₂O, sodium chloride, and copper sulfate x 7 H₂O from Riedel-de Haën (Seelze, Germany), zinc sulfate x 7 H₂O, and phenolphthalein from J.T. Baker B.V. (Deventer, The Netherlands). Ethanol (96%) was from Kraul & Wilkening und Stelling (Hannover, Germany). High-purity water was prepared with an E-pure water purification system (Barnstead, Dubuque, IA).

4.3.2 Cultivation and lipase production

Mycelia of *Pleurotus sapidus* (8266 DSMZ) were maintained on 1.5% agar plates with standard nutrient liquid (SNL) medium according to ZORN et al. (2003). Pre-cultures of *P. sapidus* were prepared from a mycelial block (1 cm²) as inoculum, which was excised from the agar plate and placed in a 300-mL Erlenmeyer flask containing 100 mL SNL medium. After treatment with an UltraTurrax homogenizer (Janke & Kunkel, Staufen, Germany) the fungal culture was incubated for 7 days at 150 rpm and 24 °C. For production of lipase, three different main cultures were prepared in 500-mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL SNL, 250 mL SNL without glucose, and 250 mL mineral salt medium (MM) by transferring 20 mL of the preculture into each flask (ZORN et al. 2003). The secretion of lipase into the medium was induced by addition of 0.4% (v/v) Tween 80 to the main cultures, which were then incubated at 150 rpm and 24 °C. At the time of maximum lipase activity, the supernatant was separated from the mycelium by filtration under reduced pressure (filter paper # 595, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Media and equipment were autoclaved prior to use, and sterile techniques were applied throughout the procedures.

4.3.3 Protein determination

Protein concentration was determined according to LOWRY et al. (1957) using bovine serum albumin as standard.

4.3.4 Lipase assay

Hydrolytic activity was quantified by monitoring the free fatty acids resulting from hydrolysis of Tween 80 by a titrimetric assay. Samples were adjusted to pH 7.0 with 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl, respectively. The reaction mixture containing 2.16 g of Tween 80, 5 mL 50 mM Tris/HCl buffer, pH 7.0, and 2 mL of test solution were incubated in a water bath at 37 °C and 160 rpm for 15 to 60 min depending on enzyme activity. The reaction was terminated by adding 5 mL ethanol. Blanks were prepared with inactivated enzyme solution. The free fatty acids were titrated with 50 mM NaOH using 2% ethanolic phenolphthalein as an indicator. The lipase activity was calculated from the difference of the blank and the sample. One unit of enzyme was defined as 1 μmol of free fatty acids released per minute under the specified conditions.

4.3.5 Isoelectric focusing and lipase activity staining

IEF polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a Multiphor II system (Pharmacia LKB) using Servalyt™ Precotes™ Precast Gels with an immobilized pH gradient pH 3 to 6 (Serva, Heidelberg, Germany). The isoelectric point of the lipase was estimated using a low pI calibration kit 2.8 to 6.5 (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Gels were silver stained. For activity staining a Tween 80-agarose-overlay gel was developed. Agarose (2%) were dissolved in a solution of 0.004 mg mL⁻¹ Tris, and 0.0125 mg mL⁻¹ NaCl under boiling. An equivalent volume of 0.5 mg mL⁻¹ Tween 80, and 0.01 mg mL⁻¹ CaCl₂ was added, and the pH was adjusted to 7.0 using 0.01 N NaOH. After focusing, the IEF gel was incubated on the Tween 80-agarose overlay at 37 °C for 3.5 h, and the overlay gel was covered with 0.1 N NaOH to visualize the hydrolytic activity.

4.3.6 Configuration of equipment and experimental procedure for foam fractionation

The foaming device consisted of a cylindrical glass chamber (length = 18 cm, diameter = 3 cm) with a porous frit (P3, porosity 16 to 40 μm), a column (length = 27 cm, diameter = 1.6 cm), a glass bowl (250 mL, 7.7 cm equatorial

diameter, or 500 mL, 9.5 cm equatorial diameter, respectively), a horseshoe bend, and a receiving flask (Figure 1). Experiments were carried out with 70 mL of enzyme solution. Nitrogen was passed through the frit, and the raising foam collapsed in the receiver. Samples for protein and activity analyses were taken from the initial solution, from the foamed sample solution (retentate), and from the liquefied foam.

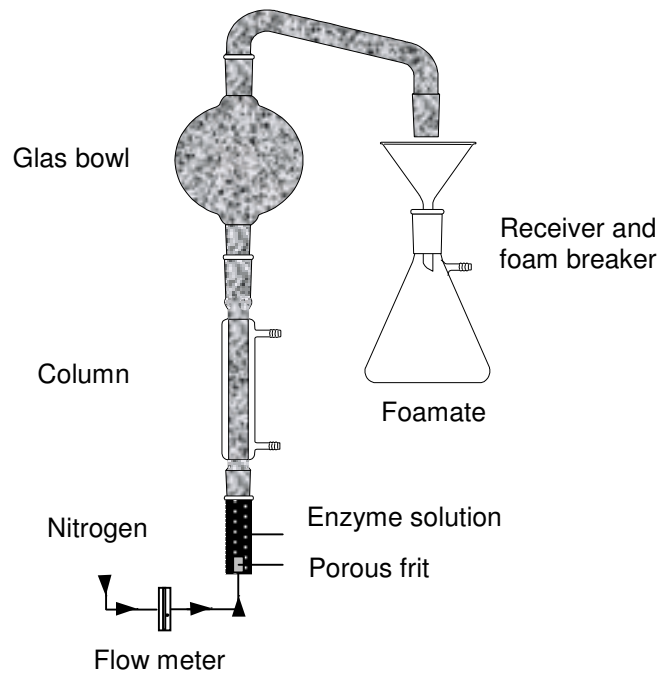


Figure 1. Scheme of the foam fractionation device

4.3.7 Calculations

The following calculations were made for each foam fractionation:

$$\text{Recovery of protein (Rp)} = \frac{\text{Mass of protein [mg] in the liquefied foam}}{\text{Mass of protein [mg] in the initial solution}} \times 100\%$$

$$\text{Recovery of activity (Ra)} = \frac{\text{Activity [U] in the liquefied foam}}{\text{Activity [U] in the initial solution}} \times 100\%$$

$$\text{Purification factor (P)} = \frac{\text{Specific activity [U mg}^{-1}\text{] in the liquefied foam}}{\text{Specific activity [U mg}^{-1}\text{] in the initial solution}}$$

$$\text{Enrichment factor (E)} = \frac{\text{Activity [U mL}^{-1}\text{] in the liquefied foam}}{\text{Activity [U mL}^{-1}\text{] in the initial solution}}$$

All quantitative data represent average values of at least duplicate analyses.

4.4 Results

4.4.1 Influence of the medium composition on extracellular lipase activity

Extracellular lipase activity of *P. sapidus* cultures containing different carbon sources was determined over a period of 7 days. Highest hydrolytic activity of 312 U L⁻¹ was observed after 5 days in SNL medium without glucose (Figure 2). This supernatant was used for foam fractionation as described below.

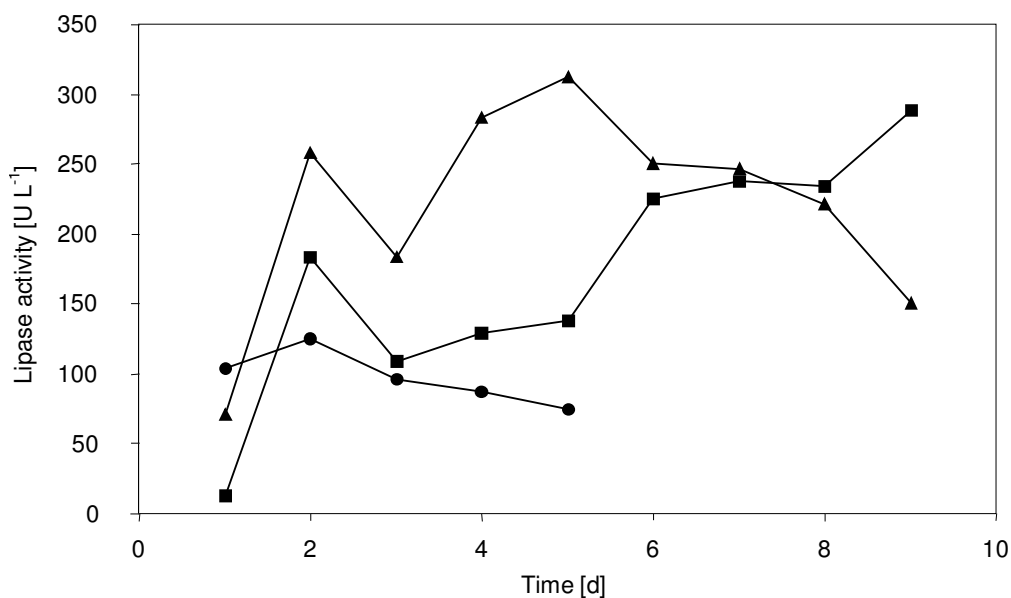


Figure 2. Lipase production as affected by the carbon source. SNL medium containing 3% (w/v) glucose and 0.4% (v/v) Tween 80 (●) (solution became highly viscous after 5 days), SNL without glucose but 0.4% (v/v) Tween 80 (▲), mineral salt medium with 0.4% (v/v) Tween 80 (■).

4.4.2 Foam fractionation of lipases from culture supernatant

The recovery of total protein and of enzyme activity was examined at varying pH values of the enzyme-containing solution. The following parameters were held constant: 40 mL N₂ min⁻¹, 50 min foaming period, 24 °C. The pH was adjusted from 5.0 to 8.0 with 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl, respectively. The optimum pH value was 7.0, where 54% of activity were received in the foam, and the loss of activity during the fractionation process was about 5%. The minimum recovery in the foam and a loss of activity of 28% was observed at pH 8.0 (Figure 3). The kinetics of enzyme transport into the foam phase were investigated over a period of 90 minutes. A foaming period of 50 min gave the highest Ra. By increasing the gas flow to 60 mL min⁻¹, the recovery of hydrolytic activity rose to 95% (Figure 4). A marginal loss of total activity of 2.8% was observed, i.e. 2.2% of activity remained in the retentate. The purification factor was calculated to be 2.9, and the enrichment factor was 3.3.

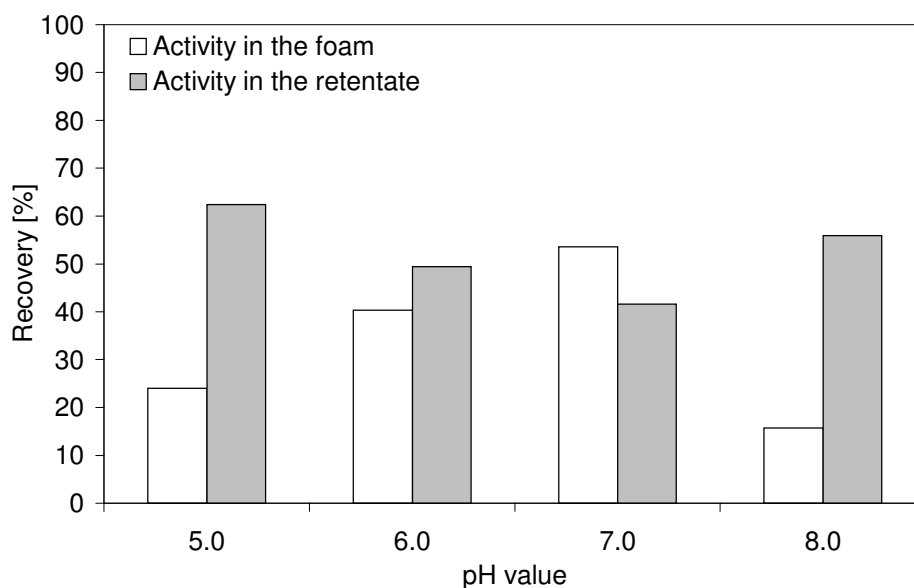


Figure 3. Recovery of lipase activity in the foam after foam fractionation from culture supernatant depending on pH (50 min, 40 mL N₂ min⁻¹, 24 °C, 250-mL glass bowl).

4.4.3 Foam fractionation of the native pellet culture

When a native suspension culture of *P. sapidus* was submitted to the foaming procedure, most of the mycelium pellets remained in the retentate. Some smaller pellets rose up with the foam and were easily separated using a suction filter funnel. The recovery of hydrolytic activity in the liquefied, cell-free foam was 93% with a loss of total activity of 6%. *P* was estimated to be 3.0, and *E* was 3.8. To observe the kinetics of transport of lipases during the foaming period, samples were drawn every 5 min, and the liquefied samples were tested for activity on a Tween 80-agarose gel. Hydrolytic activity was detectable in each of the foam fractions, but no quantitative analyses were performed.

To increase *E* and *P* of foam fractionation of the suspension culture, the volume of the glass bowl was doubled to 500 mL. The aging foam became drier due to the increased drainage effect. As a result, the enrichment and the purification factor were significantly enhanced (Figure 5).

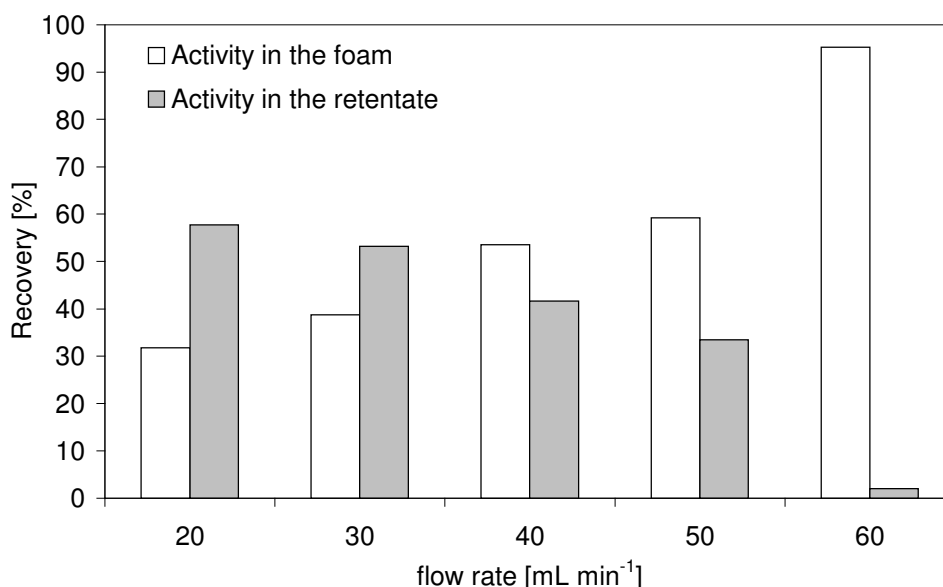


Figure 4. Recovery of lipase activity in the foam phase after foam fractionation from culture supernatant depending on flow rate (pH 7.0, 50 min, 24 °C, 250-mL glass bowl).

4.5 Discussion

4.5.1 Separation of active lipases

Foam systems consist of a thin liquid film including a gas phase (LOCKWOOD et al. 1997, SCHRAMM and WASSMUTH 1994). The two phases are separated by a thin interface region, to which amphiphilic solutes may adsorb. It has been common academic opinion that adsorption of an enzyme to an interface comes along with denaturation (CUMPER and ALEXANDER 1950). BETANCOR et al. (2004) successfully prevented enzyme inactivation by coating of the enzyme surface using a hydrophilic shell of dextran-aldehyde. In the present study, no modifications of the protein structure were necessary to separate active lipases from growing cultures of *P. sapidus* (Figure 2) by foam fractionation.

4.5.2 pH dependence

Surface activity, stability and packaging at the gas-liquid interface of a protein are maximal at its isoelectric point (DESOUZA et al. 1991, CHARM et al. 1966, NOEL et al. 2002). Accordingly, transport of the target protein into the foam phase should be most efficient at its pI. However, the maximum transport of the lipase of *P. sapidus* was observed at pH 7.0 (Figure 3), far from the pI of the native isoenzymes (4.5 to 5.4), and only about 3% to 6% of the catalytic activity of the enzymes was lost during the process (Figure 4).

LIU et al. (1998) accumulated about 40% of trypsin and about 50% of catalase activity from aqueous solutions into the foam. In the absence of a detergent, recoveries depended on type of sparging gas used rather than on the actual pH value. In the present experiments, however, the loss of total hydrolytic activity increased with an increasing distance from the pH optimum (Figure 3).

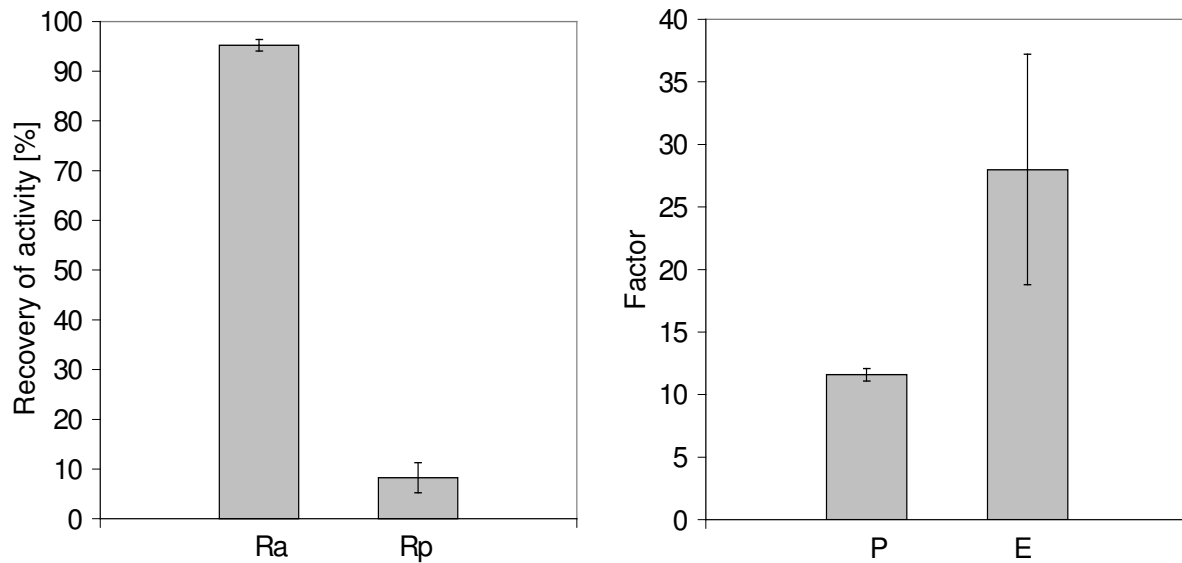


Figure 5. Recovery of activity (Ra) and total protein (Rp), purification factor (P), and enrichment factor (E) of foam fractionation from native suspension cultures of *P. sapidus* (pH 7.0, 50 min, 24 °C, 500-mL glass bowl).

4.5.3 Effect of Tween 80

As mentioned, the optimal pH value for the separation process was 7.0 and not the isoelectric point. This is explained by residual amounts of the lipase inducer, Tween 80, in the feed solution. The detergent may have formed associates with the enzyme molecules possessing deviating apparent pI values. Proteins are generally less surface active than low molecular mass detergents, such as polyoxyethylene sorbitan monostearate, because of the high free energy levels of protein coverage of the interface (DAMODARAN 1997). The addition of Tween 80 to processed foods, such as bakery products and ice cream, is common in Europe (declaration numbers E 491 to 495) and in other countries worldwide. Looking at the low absolute concentration of technical enzymes, a carryover into processed foods may be tolerable.

4.5.4 Gas flow

Gas flow was identified as another sensible parameter of the foaming process. Flow rates of 6 mL min⁻¹ resulted in a distinct degradation of β -glucosidase (BURAPATANA et al. 2004). Lipases of the present study were more shear tolerant, as

indicated by the quantitative transport of the hydrolytic activity at a gas flow rate of 60 mL min⁻¹ (Figure 4).

4.5.5 Design of the foam fractionation device

Foam drainage and competition for the interface determine the E of a protein and, hence, the overall efficiency of the separation. Whereas the population of molecules at the interface depends on chemical parameters, such as concentration, hydrophobicity, diffusivity, and conformational flexibility (LOCKWOOD et al. 1997), the drainage (or kinetic stability) of a foam can be affected by processing parameters, such as flow rate, and by the design of the foaming device. As in previous work on low-molecular mass compounds (PARLAR et al. 2001), lengthening the height of the foaming column was inefficient. Doubling the volume of the glass bowl improved the E and P (Figure 5). Under the conditions chosen, the process time was long enough to allow for adequate drainage of the interstitial liquid, and short enough to minimize protein residence and unfolding at the interface. Because the liquid film of the lamella drained continuously, the final volume of the liquefied foam was much smaller than the volume of the feed phase.

4.5.6 Comparison to alternative processes

Conventional purification processes of two lipase isoforms (Lip1 and Lip2) of *Candida rugosa* by precipitation, hydrophobic interaction chromatography, dialysis, and anionic exchange chromatography recovered 45% of Lip1, with P of 5.3, and 4.7% with P of 4.1 for Lip2 (LINKO and WU 1996). YADAV et al. (1998) purified a lipase from *Aspergillus terreus* in five steps with a yield of 18% and a P of 11.9. The present experiments yielded lipase recoveries of 95% of total activity with P of 11.6. Because an increase in hydrophobicity leads to a corresponding increase in protein adsorption onto the gas-liquid interface, the results indicate that fungal lipases appear to possess sufficient hydrophobic moieties to be suitable for a separation by foam fractionation. In line with this consideration, FERNANDES et al. (2002) attached a hydrophobic fusion tag (Trp-Pro)₄ to a recombinant cutinase from *Fusarium solani pisi* and achieved higher recoveries in the foam (98%) as compared with the wild-

type cutinase (52%). Thus, foam fractionation of fungal lipases offers potential as a valuable component of novel purification schemes.

4.6 Acknowledgements

Financial support by the AIF (project # 121 ZN) through the Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn, is gratefully acknowledged. The project is part of the joint initiative “Biologisch aktive Naturstoffe – Chemische Diversität” at the University of Hannover.

5 Zusammenfassung

Basidiomyceten (Ständerpilze) besitzen als die am höchsten entwickelte Klasse von Pilzen aufgrund ihrer komplexen Ausstattung an extrazellulären Enzymen ein enormes, technisch bislang wenig genutztes biochemisches Potential. Mit der präparativen Zerschäumung („adsorptive bubble separation“) wurde eine Methode zur Isolierung sekretierter Enzyme aus Kulturmedien von Pilzen etabliert, welche die gängigen mehrstufigen Standardprozeduren der Enzymisolierung zumindest partiell zu ersetzen vermag. Durch Einleiten eines Gases werden Enzyme als grenzflächenaktive Verbindungen aus den wässrigen Wachstumsmedien abgetrennt und im gebildeten Schaum angereichert.

Zum „proof of principle“ wurde eine kommerziell erhältliche Laccase (*Trametes* sp.) aus Wasser sowie aus Modellmedien zerschäumt. Nach Zusatz des kationischen Tensids Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und Optimierung der Prozessparameter gelang ein quantitativer Transfer des Enzyms in den Schaum unter vollständigem Aktivitätserhalt. Zur Übertragung auf einen Bioprozess wurde der Speisepilz *Pleurotus sapidus* submers kultiviert, wobei die Sekretion von Laccasen und Lipasen gezielt induziert wurde. Die gebildeten Laccasen wurden proteinbiochemisch als fünf Isoenzyme charakterisiert und aus dem Kulturüberstand zerschäumt. Nach Optimierung der physikalisch-chemischen Parameter wurden bis zu 70% der Laccase-Aktivität in den Schaum transportiert. Ein selektiver Transport einzelner Enzyme wurde durch Variation des pH-Wertes erzielt, wobei die Isoenzyme in Abhängigkeit von ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt fraktioniert wurden.

Neuartige Lipasen wurden zunächst aus Kulturüberständen und schließlich auch direkt aus myzelhaltigen Kulturen von *P. sapidus* zerschäumt. Bis zu 95% der Lipase-Aktivität wurden im Schaum angereichert, wobei Tween 80 gleichzeitig als Induktor für die Enzymsekretion und als oberflächenaktive Verbindung zur Bildung eines stabilen Schaums diente. Durch Optimierung der Prozessparameter wurde die Effizienz der Methode gesteigert, so dass Aktivitätserhalt, Anreicherung und Reinigung konventionellen Reinigungsmethoden deutlich überlegen waren. Zur Vorbereitung einer möglichen industriellen Anwendung wurde ein Scale-up der Lipase-Zerschäumung durchgeführt.

Schlüsselbegriffe: *P. sapidus*, Zerschäumung, Enzymreinigung

6 Summary

Numerous enzymes for the food, pharmaceutical and cosmetic industry are currently isolated by multistep processes, which are generally time-consuming, expensive, and above all, often come along with high losses of enzymatic activity. Foam fractionation, which belongs to the group of adsorptive bubble separation techniques, represents an interesting alternative downstream process for the isolation of extracellular enzymes from microbial culture media. The method is based on the adsorption of surface-active compounds to the interface of a gas-liquid dispersion, and it is especially suitable for the enrichment of enzymes from diluted solutions as they typically occur in biotechnological processes.

As a proof of principle, a commercial laccase derived from *Trametes* sp. was foamed after addition of the cationic detergent cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). A quantitative transport of the enzymatic activity into the foam was achieved from water and model culture media. Subsequently, laccases were produced in submerged cultures of the basidiomycetous fungus *Pleurotus sapidus*. The secretion of laccases into the culture media was increased significantly by the addition of specific enzyme inducers including lignin and copper ions. After optimisation of the physico-chemical parameters of the foaming process, up to 70% of the total laccase activity was transferred into the foam. Depending on their respective isoelectric points a fractionated transport of five laccase isoenzymes was achieved by variation of the pH.

The secretion of lipases by *P. sapidus* was induced by supplementing the culture broth with Tween 80, which in parallel served as a foaming agent. Up to 95% of the lipase activity was recovered in the foam, while the removal of the mycelium pellets from the culture supernatant prior to foam separation proved to be dispensable. The integration of modifications increasing the drainage effect led to similar enrichment and purification factors, but to superior enzyme recoveries when compared to traditional multistep procedures. In a pilot plant scale, quantitative recoveries of lipase activity were obtained documenting the feasibility of the implementation of foam separation into industrial enzyme purification strategies.

Keywords: *P. sapidus*, Foam Fractionation, Enzyme Purification

7 Literaturverzeichnis

- Andrews, G.; Schütz, F. (1945) Differential adsorption of pepsin and rennin on foam. *Biochem. J.* 39 (5), li-iii.
- Alper, N.; Acar, J. (2004) Removal of phenolic compounds in pomegranate juices using ultrafiltration and laccase-ultrafiltration combinations. *Nahrung* 48, 184-187.
- Arreguín-Espinosa, R.; Arreguín, B.; Gonzáles, C. (2000) Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 239-244.
- Backleh, M.; Ekici, P.; Leupold, G.; Parlar, H. (2003a) Quantitative elimination of Flavokavines A and B from Kava Kava (*Piper methysticum* G. Forts) by isoelectric focused adsorptive bubble separation. *Naturwissenschaften* 90, 366-369.
- Backleh, M.; Leupold, G.; Parlar, H. (2003b) Rapid quantitative enrichment of carnosic acid from Rosmary (*Rosmarinus officinalis* L.) by isoelectric adsorptive bubble chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 51 (5), 1297-1301.
- Backleh, M.; Ekici, P.; Leupold, G.; Coelhan, M.; Parlar, H. (2003c) Quantitative enrichment of gingerols from Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) by isoelectric focused adsorptive bubble chromatography (IFABC). *Adv. Food Sci.* 25 (1), 2-7.
- Bahr, K.H.; Schügerl, K. (1992) Recovery of yeast from cultivation medium by continuous flotation and its dependence on cultivation conditions. *Chem. Engin. Sci.* 47 (1), 11-20.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2004) Food Chemistry. 3rd rev. edn., Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- a) p. 748
 - b) pp. 61-62

- Bertrand, T.; Jolival, C.; Briozzo, P.; Caminade, E.; Joly, N.; Madzak, C.; Mougin, C. (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41, 7325-7333.
- Betancor, L.; López-Gallego, F.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Fuentes, M.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. (2004) Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde. *J. Biotechnol.* 110, 201-207.
- Bonatti, M.; Karnopp, P.; Soares, H. M.; Furlan, S. A. (2004) Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chem.* 88, 425-428.
- Bourbonnais, R.; Paice, M.G., (1990) Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267, 99-102.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brinch, D. S.; Pedersen, P. B. (2002) Toxicological studies on *Polyporus pinsitus* laccase expressed by *Aspergillus oryzae* intended for use in food. *Food Addit. Contam.* 19, 323-334.
- Britten M.; Lavoie, L. (1992) Foaming properties of proteins as affected by concentration. *J. Food Sci.* 57, 1219-1222.
- Brown, A.K.; Kaul, A.; Varley, J. (1999a) Continuous foaming for protein recovery: Part I. Recovery of β -casein. *Biotechnol. Bioeng.* 62 (3), 278-290.
- Brown, A.K.; Kaul, A.; Varley, J. (1999b) Continuous foaming for protein recovery: Part II. Selective recovery of proteins from binary mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 62 (3), 291-300.

- Brown, L.; Narsimhan, G., Wankat, P.C. (1990) Foam fractionation of globular proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 36 (9), 947-959.
- Burapatana, V.; Prokop, A.; Tanner, R.D. (2004) Degeneration of β -glucosidase activity in a foam fractionation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116, 619-625.
- Charm, S.E.; Morningstar, J.; Matteo, C.C.; Paltiel, B. (1966) The separation and purification of enzymes through foaming. *Anal. Biochem.* 15, 498-508.
- Christakopoulos, P.; Tzia, C.; Kekos, D.; Macris, B.J. (1992) Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 194-197.
- Cliffe, S.; Fawer, M. S.; Maier, G.; Takata, K.; Ritter, G. (1994) Enzyme assays for the phenolic content of natural juices. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1824-1824.
- Couto, S. R.; Gundin, M.; Lorenzo, M.; Sanroman, M. A. (2002) Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochem.* 38, 249-255.
- Cumper, C.W.N.; Alexander, A.E. (1950) The surface chemistry of proteins. *Trans. Faraday Soc.* 46, 235-253.
- Damodaran, S. (1997) Protein-stabilized foams and emulsions, in *Food proteins and their applications* (Damodaran, S., Paraf, A., eds.), pp. 57-110, Marcel Dekker, Inc., New York, United States.
- DeSouza, A.H.G.; Tanner, R.D.; Effler, W.T. (1991) The effect of pH and gas composition on the bubble fractionation of proteins. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29, 655-666.
- Du, L.; Loha, V.; Tanner, R.D. (2000) Modeling a protein foam fractionation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86, 1087-1099.

- Fermor, T.R.; Wood, D.A. (1981) Degradation of bacteria by *Agaricus bisporus* and other fungi. *J. General. Microbiol.* 126, 377-387.
- Fernandes, S.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R. (2002) Recovery of recombinant cutinase using detergent foam. *Biotechnol. Prog.* 18, 116-123.
- Figueroa-Espinoza, M. C.; Poulsen, C.; Borch Soe, J.; Zargahi, M. R.; Rouau, X. (2002) Enzymatic solubilization of arabinoxylans from isolated rye pentosans and rye flour by different endo-xylanases and other hydrolyzing enzymes. Effect of a fungal laccase on the flour extracts oxidative gelation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6473-6484.
- Freire, D.M.; Teles, E.M.F.; Bon, E.P.S.; Sant' Anna, G.L. (1997) Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65, 409-421.
- Ghosh, M.; Mukherjee, R.; Nandi, B. (1998) Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. *Acta Biotechnol.* 18, 243-254.
- Giardina, P.; Palmieri, G.; Scaloni, A.; Fontanella, B.; Faraco, V.; Cennamo, G.; Sannia, G. (1999) Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.* 341, 655-663.
- Gish, W. (2004), <http://blast.wustl.edu>.
- Godfrey, T. (1996) Industrial Enzymology. MacMillian, London, S. 3.
- Gomes, S.A.S.S.; Nogueira, J.M.F.; Rebelo, M.J.F. (2004) An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1211-1216.
- Gomes, S.A.S.S.; Rebelo, M.J.F. (2003) A new laccase biosensor for polyphenols determination. *Sensors* 3, 166-175.

- Graham, D.E.; Phillips, M.C. (1979) Proteins at liquid interfaces. II. Adsorption isotherms. *J. Colloid Interface Sci.* 70, 415-426.
- Grieves, R.B.; Bhattacharyya, D. (1966) Foam fractionation of anions with a cationic surfactant: Orthophosphate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43 (9), 529-530.
- Gschwendtner, O. (2000) Anreicherung von Pflanzenproteinen mit Hilfe der adsorptiven Zerschäumung. Dissertation TU München.
- Higgins, D.; Thompson, J.; Gibson, T.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Hoegger, P. J.; Navarro-Gonzales, M.; Kilaru, S.; Hoffmann, M.; Westbrook, E. D.; Kües, U. (2004) The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Curr. Genet.* 45, 9-18.
- Holmström, B. (1968) Foam concentration of streptokinase from crude culture filtrates. *Biotechnol. Bioeng.* 10 (4), 551-552.
- Jauregi, P. ; Varley, J. (1998) Colloidal gas aphrons: a novel approach to protein recovery. *Biotechnol. Bioeng.* 59 (4), 471-481.
- Kilaru, S.; Hoegger, P. J.; Majcherczyk, A.; Burns, C.; Shishido, K.; Bailey, A.; Foster, G. D.; Kües, U. (2005) Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press.
- Knutson, K.; Ragauskas, A. (2004) Laccase-mediator biobleaching applied to a direct yellow dyed paper. *Biotechnol. Prog.* 20, 1893-1896.
- Kühne, K.W. (1878) Erfahrungen und Bemerkungen über Enzyme und Fermente. *Untersuchungen a. d. physiol. Institut der Universität Heidelberg* 1, 291–324.

- Kumar, S. V. S.; Phale, P. S.; Durani, S.; Wangikar, P. P. (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 386-394.
- Labat, E.; Morel, M. H.; Rouau, X. (2000) Effects of laccase and ferulic acid on wheat flour doughs. *Cereal Chem.* 77, 823-828.
- Laemmli, U. K. (1979) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lemlich, R. (1968) Adsorptive bubble separation methods. Foam fractionation and allied techniques. *Industrial and Engineering Chemistry* 60 (10), 16-29.
- Leonowicz, A.; Cho, N. S.; Luterek, J.; Wilkolazka, A.; Wojtas-Wasilewska, M.; Matuszewska, A.; Hofrichter, M.; Wesenberg, D.; Rogalski, J. (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41, 185-227.
- Linko, Y.-Y.; Wu, X.Y. (1996) Biocatalytic production of useful esters by two forms of lipase from *Candida rugosa*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 65, 163-170.
- Liu, Z.; Liu, Z.; Wang, D.; Dind, F.; Yuan, N. (1998) On the denaturation of enzymes in the process of foam fractionation. *Bioseparation* 7, 167-174.
- Lockwood, C.E.; Bummer, P.M.; Jay, M. (1997) Purification of proteins using foam fractionation. *Pharm. Res.* 14, 1511-1515.
- Loha, V.; Tanner, R.D.; Prokop, A. (1997) The effect of pectinase on the bubble fractionation of invertase from α -amylase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65, 395-408.
- London, M.; Cohen, M.; Hudson, P.B. (1954) Some general characteristics of enzyme foam fractionation. *Biochim. Biophys. Acta* 13, 111-120.

- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lyr, H. (1958) Detection of oxidases and peroxidases in higher fungi and the significance of these enzymes for the reaction of Bavendam. *Planta* 50, 359-370.
- Maas (1973) Zerschäumungsanalyse. In: *Methodicum Chimicum*, Bd. 1 (Korte, F. Hrsg.), Thieme Verlag, Academic Press New York, 170-177.
- Mai, C.; Kües, U.; Militz, H. (2004) Biotechnology in the wood industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 477-494.
- Majcherczyk, A.; Johannes, C.; Hüttermann, A. (1999) Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 267-276.
- Mata, G.; Savoie, J.-M. (1998) Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 513-519.
- Matis, M.; Zakelj-Mavric, M.; Peter-Katalinic, J. (2005) Mass spectrometry and database search in the analysis of proteins from the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Proteomics* 5, 67-75.
- Minussi, R. C.; Pastore, G. M.; Duran, N. (2002) Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 13, 205-216.
- Moldes, D.; Gallego, P. P.; Rodriguez Couto, S.; Sanroman, A. (2003) Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnol. Lett.* 25, 491-495.

- Montero, G.A.; Kirschner, T.F.; Tanner, D. (1993) Bubble and foam concentration of cellulase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39-40, 467-475.
- Munoz, C.; Guillen, F.; Martinez, A. T.; Martinez, M. J. (1997) Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr. Microbiol.* 34, 1-5.
- Narsimhan, G.; Ruckenstein, E. (1986) Effect of bubble size distribution on the enrichment and collapse in foams. *Langmuir* 2, 494-508.
- Noel, J.; Prokop, A.; Tanner, R.D. (2002) Foam fractionation of a dilute solution of bovine lactoferrin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100, 395-402.
- Ostwald, W. (1920) Verfahren zum Verdampfen von Flüssigkeiten. Patentschrift Nr. 327976, Klasse 12a, Gruppe 2. Reichspatentamt.
- Ostwald, W.; Siehr, A. (1937) Über Schaum- und Zerschäumungsanalyse. *Chem.-Ztg.* 64, 649-653.
- Ostwald, W.; Siehr, A.; Mischke, W. (1941) Zerschäumungsanalyse. In: *Die Methoden der Fermentforschung*. Bd. 2, 1467-1474.
- Palmieri, G.; Cennamo, G.; Faraco, V.; Amoresano, A.; Sannia, G.; Giardina, P. (2003) Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 220-230.
- Parlar, H.; Gschwendtner, O.; Anschütz, A.; Leupold, G.; Görg, A. (2001) Influence of selected parameters on the isoelectric adsorptive bubble separation (IABS) of potato proteins. *Adv. Food Sci.* 23 (1), 2-10.
- Peters, T. (2004) Extrazelluläre Enzyme aus Basidiomyceten. Dissertation Universität Hannover.

- Pilz, R.; Hammer, E.; Schauer, F.; Kragl, U. (2003) Laccase-catalysed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 708-712.
- Primo-Martin, C.; Martinez-Anaya, M. A.; Collar, C. (2004) Composition of the glutenin macropolymer: Effects of flour quality and nonamylolytic enzyme addition. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 428-436.
- Rajarithnam, S.; Shashirekha, M.N.; Bano, Z. (1998) Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: Present and future strategies. *Critical reviews in Biotechnology* 18, 91-236.
- Ranocha, P.; McDougall, G.; Hawkins, S.; Sterjiades, R.; Borderies, G.; Stewart, D.; Cabanes-Macheteau, M.; Boudet, A.-M.; Goffner, D. (1999) Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases – a divergent gene family – in poplar. *Eur. J. Biochem.* 259, 485-495.
- Reddy, G. V.; Ravindra Babu, P.; Komaraiah, P.; Roy, K. R. R. M.; Kothari, I. L. (2003) Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem.* 38, 1457-1462.
- Rodgers, N.E. (1972) Foam separation of gluten and starch. United states patent, Appl. No.:318, 145; U.S. Cl. 260/112 G.
- Rodriguez, E.; Nuero, O.; Guillen, F.; Martinez, A. T.; Martinez, M. J. (2004) Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol. Biochem.* 36, 909-916.
- Römpp Chemielexikon (1991) Band 5, 9. Auflage, (Falbe, J.; Regitz, M., Hrsg.), S. 4014.

- Rongmin, H.; Christenson, P. A.; Labuda, I. M. (2000) Method for producing natural flavor by laccase. *European Patent Application EP 00117432.5*.
- Rozen, S.; Skaletsky, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*; (Krawetz, S.; Misener, S., Eds.), Humana Press, Totwa, USA, 365-386.
- Runowski, T.; Pahl, M.H. (2004) Lineare Schaumanalyse der Strömung einer drainierenden Schaumlamelle. *Chemie Ingenieur Technik* 76 (8), 1068-1072.
- Rutloff, H. (1991) *Lebensmittelbiotechnologie*. Akademie, Berlin.
- Salmones, D.; Mata, G.; Waliszewski, K. N. (2005) Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresour. Technol.* 96, 537-544.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 74, 5463-5467.
- Sarkar, P.; Bhattacharaya, P.; Mukherjea, R.N.; Mukherjea, M. (1987) Isolation and purification of protease from human placenta by foam fractionation. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 934-940.
- Schramm, L.L.; Wassmuth, F. (1994) Foams: Basic principles, in *Foams: fundamentals and applications in petroleum industry* (Schramm, L.L. eds.), *Adv. Chem.* 242, American Chemical Society, 3-45.
- Schügerl, K. (2000) Recovery of proteins and microorganism from cultivation media by foam flotation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 68, 191-233.
- Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381-3385.

- Sprecher, E. (1959) Über die Guttation bei Pilzen. *Planta* 53, 565-574.
- Suzuki, A.; Maruyama, H. (2001) Influence of liquid properties and operating variables on enrichment ratio in nonfoaming and foaming adsorptive bubble separation techniques. *J. Colloid Sci.* 238, 54-61.
- Thomas, A.; Winkler, M.A. (1977) Foam separation of biological materials, in: *Topics in enzyme and fermentation biotechnology* (Wisemann, A. eds.), Horwood Verlag, 43-71.
- Timmons, M.B.; Weeks, N.C.; Chen, S. (1992) Feasibility of using foam fractionation for the removal of dissolved and suspended solids from fish culture water. *Aquacult. Engin.* 11 (4), 251-265.
- Uhlig, H. (1991) Enzyme arbeiten für uns: Technische Enzyme und ihre Anwendung. Carl Hanser Verlag, München Wien, S. 404.
- Uraizee, F; Narsimhan, G. (1990) Foam fractionation of proteins and enzymes I. Applications. *Enzyme Microb. Technol.* 3, 232-233.
- Uraizee, F; Narsimhan, G. (1996) Effects of kinetics of adsorption and coalescence on continuous foam concentration of proteins: Comparison of experimental results with model predictions. *Biotechnol Bioeng.* 51, 384-398.
- Walker, J.R.L.; McCallion, R.F. (1980) The selective inhibition of ortho- and para-diphenol oxidases. *Phytochemistry* 19, 373-377.
- Wasan, D.T.; Koczko, K.; Nikolov, A.D. (1994) Mechanism of aqueous foam stability and antifoaming action with and without oil, in *Foams: fundamentals and applications in petroleum industry* (Schramm, L.L. eds.), *Adv. Chem.* 242, American Chemical Society, 47-114.

- Varley, J.; Brown, A.K.; Boyd, J.W.R.; Dodd, P.W.; Gallagher, S. (2004) Dynamic multi-point measurement of foam behaviour for a continuous fermentation over a range of key process variables. *Biochem. Eng. J.* 20, 61-72.
- Vianello, F.; Cambria, A.; Ragusa, S.; Cambria, M. T.; Zennaro, L.; Rigo, A. (2004) A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element. *Biosens. Bioelectron.* 20, 315-321.
- Xiao, Y.; Tu, X.; Wang, J.; Zhang, M.; Cheng, Q.; Zeng, W.; Shi, Y. (2003) Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60 (6), 700-707.
- Yadav, R.P., Saxena, R.K., Gupta, R., Davidson, W.S. (1998) Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28, 243-249.
- Yamashita, T., Bull, H. B. (1968) Films of lysozym adsorbed at the air-water surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 27 (1), 19-24.
- Zorn, H.; Breithaupt, D.E.; Takenberg, M.; Schwack, W.; Berger, R.G. (2003) Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme Microbiol. Technol.* 32, 623-628.
- Zorn H.; Peters T.; Nimtz M.; Berger R. G. (2005) The Secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics* 5 (18), 4832-4838.
- <http://www.applichem.de> (2004).
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> (2005).
- <http://www.expasy.ch/enzyme> (2005).
- <http://www.Freedoniagroup.com> (2005).
- <http://www.matrixscience.com> (2005).

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Linke
Vorname: Diana
Geburtsdatum: 23.07.1975
Geburtsort: 31582 Nienburg

Bildungsweg:

1988 - 1995 Hindenburg-Gymnasium, Nienburg
Abitur

1995 - 1997 Chemie- und Pharmazieschule Hannover BBS 22
Staatsexamen als chemisch-technische Assistentin mit
Schwerpunkt Umweltanalytik

1998 - 2002 Studium der Fachrichtung Chemietechnik/Biotechnologie
an der Fachhochschule Ostfriesland in Emden
Diplom-Ingenieurin

2003 - 2004 Universität Hannover, Institut für Lebensmittelchemie
Kenntnisstandsprüfungen

Beruflicher Werdegang:

1997 - 1998 Chemisches Labor Dr. Wirts & Partner, Hannover
Mitarbeit

2000 - 2001 Roche Diagnostics GmbH, Pharma Research, Penzberg
Praxissemester

-
-
- | | |
|-------------|---|
| 2001 | Engelhard Process Chemicals GmbH, Nienburg
<u>Aushilfskraft</u> |
| 2002 | Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH,
Braunschweig
<u>Diplomarbeit</u> |
| 2002 - 2006 | Universität Hannover, Institut für Lebensmittelchemie
<u>Wissenschaftliche Mitarbeit</u> |