

Isolierung und Anreicherung von Pilzenzymen mit isoelektrisch fokussierter, präparativer Zerschäumung (*Adsorptive Bubble Separation*) zur verbesserten industriellen Nutzung ligninhaltiger Naturstoffe

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie Prof. Dr. Dr. H. Parlar/Dr. P. Ekici
Forschungsstelle II:	Universität Hannover Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. Dr. R. G. Berger/Dr. H. Zorn
Industriegruppen:	Fachverband der Gewürzindustrie e.V., Bonn Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Fruchttetee e.V. (WKF), Hamburg Deutscher Verband der Aromenindustrie e.V. (DVAI), Meckenheim Internationaler Verein für Technische Holzfragen e.V. (iVTH), Braunschweig
Projektkoordinator:	Dr. B. Weinreich, Raps & Co. Gewürzwerk, Kulmbach
Laufzeit:	2003 – 2006
Zuwendungssumme:	€ 421.900,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Von über 10.000 in der Natur vermuteten Enzymen werden derzeit nur 120 industriell genutzt, da die Gewinnung von technischen Enzymen immer noch auf vielstufigen Prozeduren basiert. Zur Deckung des erheblichen Bedarfs könnten künftig auch höhere Pilze (Basidiomyzeten, Ständerpilze) beitragen. Hierfür werden jedoch bessere Isolierungsverfahren benötigt.

Ein vor allem für verdünnte Lösungen geeignetes, schonendes, umweltfreundliches, effektives und selektives Verfahren zur Abtrennung von oberflächenaktiven Verbindungen aus wässrigen Lösungen verspricht die präparative, isoelektrische Zerschäumung zu werden. Bereits 1920 patentiert, sind seither auf empirische Weise zahlreiche Naturstoffe isoliert worden. Der sterile Betrieb der Blasensäule ist möglich, die sterile Entnahme und Verflüssigung des konzentrierten Schaums im Säulenkopf ebenfalls. Die für die Zerschäumungsanalyse wichtigen Basisdaten

(pI , M_{rel} , hydrophil/hydrophob-Verhältnis) sind inzwischen für eine Reihe von Enzymen aus Holz abbauenden Basidiomyzeten bekannt. Die Anreicherung dieser Enzyme mit konventionellen Methoden gelingt nur unzureichend.

Ziel des branchenübergreifend konzipierten Forschungsvorhabens war es, das Potential der fraktionierten Zerschäumung zur Anreicherung von Enzymen aus dem Ligninase/Cellulase-Komplex auszuloten.

Forschungsergebnis:

Zum „*proof of principle*“ wurde eine kommerzielle Laccase (*Trametes spec.*) aus Wasser und Modellmedien sowohl im Batch- als auch im kontinuierlichen Betrieb quantitativ abgetrennt. Effizientere Anreicherungen wurden mit dem „Pinzettenverfahren“ erzielt. Zur Übertragung auf einen Bioprozess wurde der Speisepilz *Pleurotus sapidus* submers kultiviert, wobei die Sek-

retion von Laccasen gezielt induziert wurde. Die gebildeten Laccasen wurden mit bis zu 70 % Wiederfindung aus Kulturüberständen in den Schaum transportiert. In einem weiteren Anwendungsbeispiel wurden rekombinante Laccasen aus Kulturüberständen von *Coprinopsis cinereus* quantitativ unter Aktivitätserhalt in die Schaumphase transferiert.

Neuartige, biochemisch partiell charakterisierte Lipasen wurden aus Kulturüberständen und schließlich auch direkt aus myzelhaltigen Kulturen mit Wiederfindungen von bis zu 95 % Aktivität zerschäumt. Die Effizienz der Methode war mit einer 23fachen Anreicherung und einer 12fachen Reinigung konventionellen Reinigungsmethoden deutlich überlegen. Zur Vorbereitung einer industriellen Anwendung wurde ein *scale-up* der Lipase-Zerschäumung mit identischen Ergebnissen durchgeführt. Extrazelluläre Peptidasen wurden jedoch nicht zugleich angereichert, so dass lagerstabile Lipasefraktionen gewonnen wurden.

Darüber hinaus wurde eine Lipase in Submerskulturen des Ascomyceten *Fusarium oxysporum* produziert und aus dessen Überständen zu 94 % mit dem Schaum gewonnen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die mit neuartigen Enzymanwendungen erreichbaren Zielsetzungen und -produkte sind von Interesse für die Naturstoff verarbeitenden Industriegruppen. Enzyme aus Basidiomyceten könnten auf vielfältige Weise zur Bearbeitung von ligninhaltigen Prozessströmen eingesetzt werden, so z.B.

- für den Aufschluss von lignin- und cellulosereichen Zellwandmaterialien (Braunfäule-, Weißfäulepilze), zur Verbesserung der Destillations-/Extraktionsausbeuten bei der Gewinnung von sensorisch oder antioxidativ wirksamen Stoffen, z.B. aus verholzten Gewürzen, Tees, Drogen und Treestern,
- für die Biosynthese von Wirkstoffen und funktionellen Stoffen aus natürlichen Vorstufen, z.B. PPOs zur Verleimung von Faser- und Spanplatten,
- für den Abbau von organischen Stoffen, z.B. Verwertung von unbehandelten Holzabfällen durch partiellen enzymatischen Abbau (Viehfutter, Pilzproduktion), und

- für den Abbau von Kontaminanten und Schadstoffen in der Umwelttechnik, z.B. durch biotechnologische Reinigung von Waschwässern aus Bio-Filtern und Abwässern.

Die einstufige Trennung von technologisch relevanten Enzymen wird gerade für kleinere Betriebe interessant sein. Der Geräteaufwand ist gering, und die Apparatur besteht überwiegend aus bekannten Bauteilen, so dass Flexibilität beim Auf- bzw. Abbau gewährleistet ist. Der bei anderen Trennmethode oft hohe Verbrauch an organischen Lösungsmitteln entfällt. Damit bietet sich das Verfahren insbesondere für Betriebe an, in denen nur sporadisch der Bedarf für solche Trennungen besteht. Die Verwendung von Speisepilzen oder verwandten Organismen als Enzymquelle macht das Verfahren für Lebensmittelanwendungen attraktiv.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2006.
2. Linke, D., Zorn, H., Gerken, B., Parlar, H. und Berger, R.G.: Laccase isolation by foam fractionation - new prospects of an old process. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 273-277 (2007).
3. Linke D.: Extrazelluläre Enzyme aus *Pleurotus sapidus*. Produktion, Charakterisierung und Isolierung mittels präparativer Zerschäumung. Dissertation Universität Hannover (2006).
4. Linke, D., Zorn, H., Gerken, B., Parlar, H. und Berger, R.G.: Foam fractionation of exolipases from growing *Pleurotus sapidus*. *Lipids* 40, 323-327 (2005).
5. Gerken, B.M., Wattenbach, C., Linke, D., Zorn, H., Berger, R.G. und Parlar, H.: Tweezing-Adsorptive Bubble Separation - A novel analytical method for the selective and high enrichment of metalloenzymes. *Anal. Chem.* 77, 6113-6117 (2005).
6. Gerken, B.M., Nicolai, A., Linke, D., Zorn, H., Berger, R.G., und Parlar, H.: Efficient enrichment of laccase C using continuous foam fractionation. *Sep. Purif. Technol.* 49 (3), 291-294 (2005).
7. Linke, D., Zorn, H., Gerken, B., Hardebusch, B., Parlar, H. und Berger, R.G.: Isolierung aktiver Enzyme mittels präparativer Zerschäumung. *Lebensmittelchemie* 59, 16 (2005).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse
und Chemische Lebensmitteltechnologie
Weihenstephaner Steig 23, 85350 Freising-
Weihenstephan
Tel.: 08161/71-3284, Fax: 08161/71-4418
E-Mail: Parlar@wzw.tum.de

Universität Hannover
Institut für Lebensmittelchemie
Wunstorfer Str. 14, 30453 Hannover
Tel.: 0511/762-4582, Fax: 0511/62-4547
E-Mail: rg.berger@lci.uni-hannover.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de