

Technische Universität München

Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und
Chemische Lebensmitteltechnologie

Zur Effizienz der Anreicherung und Isolierung von Oxidoreduktasen mit Hilfe der Zerschäumungsanalyse

Birte Maja Gerken

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Polster

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr., Dr. h.c. (Zonguldak Univ./ Türkei) H. Parlar
2. Univ.-Prof. Dr. R.G. Berger, Universität Hannover
3. apl. Prof. Dr. A. Görg

Die Dissertation wurde am 20.01.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 15.03.2005 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2002 bis Januar 2005 am Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie im Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München in Freising-Weihenstephan angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. H. Parlar für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes verbunden mit einem außerordentlich interessanten Thema, für seine stete Diskussionsbereitschaft und kompetente, wohlwollende fachliche und finanzielle Unterstützung.

Des Weiteren bin ich Frau apl. Prof. Dr. A. Görg und Herrn Univ.-Prof. Dr. R.G. Berger für die freundliche Übernahme des Koreferates dankbar.

Bei Herrn Univ. Prof. Dr. J. Polster möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes herzlich bedanken.

Dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. möchte ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes „Isolierung und Anreicherung von Pilzenzymen mit isoelektrisch fokussierter, präparativer Zerschäumung (Adsorptive Bubble Separation) zur verbesserten industriellen Nutzung ligninhaltiger Naturstoffe“, aus dem diese Arbeit hervorging, herzlich danken.

In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch der Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. R.G. Berger der Universität Hannover für die Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projektes.

Herrn Dr. C. Wattenbach bin ich für seinen unermüdlichen Einsatz bei der organischen Synthese zu außerordentlichem Dank verpflichtet.

Herrn Dipl.-Ing. (FH) A. Friess möchte ich für seine Geduld bei der graphischen Darstellung unterschiedlicher Zerschäumungsapparaturen danken.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn K. Scholz für die präzise und schnelle Anfertigung verschiedener Glasapparaturen.

Den Herren Dipl.-Chem. F. Stückrath, Dipl.-Chem. M. Meißner und Dr. P. Avendano-Hoffmann möchte ich für die freundschaftliche Aufnahme am Lehrstuhl und die stete Hilfsbereitschaft danken.

Aber auch den Mitarbeitern des CTA-Lehrstuhls, die an dieser Stelle nicht namentlich aufgeführt werden können, sei mein herzlicher Dank für zahlreiche kleine oder größere Gefälligkeiten im Arbeitsalltag ausgesprochen.

„Last but not least“ möchte ich meiner Familie danken. Speziell meinen Eltern Uta und Eckhard Gerken gilt mein besonderer Dank für die Ermutigung zur Durchführung dieser Arbeit und ihre grenzenlose moralische und finanzielle Unterstützung. Meinem Freund Andreas gebührt ein „Riesendank“ für seine produktive Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowohl bei der Arbeit als auch im Privaten.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Theoretischer Teil	5
2.1.	Die Enzyme und ihre Wirkmechanismen	5
2.1.1.	Die Laccase	13
2.1.2.	Die Meerrettich-Peroxidase	17
2.1.3.	Die Aufreinigung von Laccase und Meerrettich-Peroxidase	22
2.2.	Die Zerschäumung	27
2.2.1.	Die Zerschäumungsapparatur	31
2.2.2.	Die Zerschäumungsparameter	35
3.	Material und Methoden	40
3.1.	Material	40
3.1.1.	Chemikalien	40
3.1.2.	Enzyme	41
3.1.3.	Geräte und Hilfsmittel	41
3.2.	Methoden	42
3.2.1.	Die Präparation des SNL-Nährmediums	42
3.2.2.	Die konventionelle Zerschäumung	42
3.2.2.1.	Die Batch-Zerschäumung	42
3.2.2.2.	Die kontinuierliche Zerschäumung	50
3.2.3.	Die photometrische Messung der Enzymaktivität	52
3.2.4.	Das Pinzettenverfahren	53
3.2.4.1	Die Inaktivierung der Laccase mittels Komplexbildner und Reaktivierung	53
3.2.4.2.	Die Zerschäumung im Pinzettenverfahren	53
3.2.4.3.	Die Zerschäumung von Laccase und Meerrettich-Peroxidase mit Fremdmetall- β -ADA-C8-Komplexen	55
3.2.4.4.	Die Synthese des komplexierenden Tensids β -ADA-C8	56

4.	Ergebnisse	57
4.1.	Die Batch-Zerschäumung von Laccase	57
4.1.1.	Die Konstruktion der Zerschäumungssäule	57
4.1.2.	Variation chemisch-physikalischer Parameter	59
4.1.3.	Variation technischer Parameter	65
4.1.4.	Die Konstruktion eines kontinuierlichen Schaumzerstörers	72
4.1.5.	Die Kolonnenzerschäumung von Laccase	73
4.1.6.	Die Kreislaufzerschäumung von Laccase	74
4.2.	Die kontinuierliche Zerschäumung von Laccase	75
4.2.1.	Die kontinuierliche Kolonnenzerschäumung	78
4.3.	Das Pinzettenverfahren	79
4.3.1.	Die Inaktivierung der Laccase mittels Komplexbildner und Reaktivierung	79
4.3.2.	Die Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β - ADA und CTAB	84
4.3.3.	Die Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β - ADA-C8	85
4.3.3.1.	Die Zerschäumung von Laccase mit Cu^{2+} - β -ADA-C8-Komplexen	92
4.4.	Die Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase im Pinzettenverfahren	93
4.4.1.	Die Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase mit Fe^{3+} - β -ADA-C8-Komplexen	95
5.	Diskussion	96
6.	Zusammenfassung	128
7.	Literaturverzeichnis	130

Anhang

Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Schematische Darstellung einer enzymkatalysierten Reaktion
- Abb.2: Wirkmechanismen unterschiedlicher Hemmstofftypen
- Abb.3: Die Enzymklassen
- Abb.4: Strukturmodelle von Laccase
- Abb.5: Reaktionsmechanismus von Laccase am Beispiel von ABTS als Substrat
- Abb.6: Strukturmodell der Peroxid-Zwischenstufen
- Abb.7: Mechanismus der Reduktion von O_2 zu H_2O in mehrkernigen, kupferhaltigen Oxidasen wie Laccase
- Abb.8: Strukturmerkmale der Meerrettich-Peroxidase
- Abb.9: Hämin aus dem aktiven Zentrum der Meerrettich-Peroxidase bzw. das aktive Zentrum der Meerrettich-Peroxidase
- Abb.10: Valenzwechsel des Fe-Zentralatoms bei der Katalyse der Meerrettich-Peroxidase
- Abb.11: Spaltung von H_2O_2 zur Bildung von Verbindung I
- Abb.12: Schematische Klassifikation der adsorptiven Gasblasentrennmethode
- Abb.13: Verhalten oberflächenaktiver Verbindungen an der Grenzfläche
- Abb.14: A.) Übergang vom Kugelschaum in den Polyederschaum und B.) schematische Darstellung der Plateau Ränder
- Abb.15: Zerschäumungsapparaturen
- Abb.16: Prinzip der Zerschäumungsapparaturen im Batch-Verfahren
- Abb.17: Prinzip der Zerschäumungsapparaturen im kontinuierlichen Verfahren
- Abb.18: Die Zerschäumungsapparatur A.) mit Kolbenaufsatz B.) mit U-Rohr und C.) mit kontinuierlichem Schaumzerstörer
- Abb.19: Kontinuierlicher Schaumzerstörer
- Abb.20: Darstellung der A.) Kolonnenzerschäumung; B.) Kreislaufzerschäumung
- Abb.21: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Zerschäumungsapparatur
- Abb.22: Aktivitätsabnahme in der Ausgangslösung während der Zerschäumung von Laccase
- Abb.23: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Abb.24: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

- Abb.25: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Methylcellulose-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Abb.26: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Lecithin-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Abb.27: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Abb.28: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase mit Methylcellulose im Batch-Verfahren
- Abb.29: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase mit Lecithin im Batch-Verfahren
- Abb.30: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase mit SDS im Batch-Verfahren
- Abb.31: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Abb.32: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zerschäumungstemperatur nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Abb.33: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom Säuleninnendurchmesser nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Abb.34: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Säulenlänge nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Abb.35: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom Füllstand nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Abb.36: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Abflussrate nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase
- Abb.37: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase
- Abb.38: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase
- Abb.39: Enzymaktivität der Laccase in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration
- Abb.40: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels EDTA inaktivierten Laccase durch Zugabe verschiedener Salze
- Abb.41: Anteil maximal reaktiver Enzymaktivität durch Zugabe verschiedener Salze
- Abb.42: Enzymaktivität der Laccase in Abhängigkeit von den Konzentrationen an DPTA und β -ADA

- Abb.43: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels DPTA und β -ADA inaktivierten Laccase durch Zugabe von $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
- Abb.44: Minimale Konzentration an β -ADA zur vollständigen Inaktivierung von Laccase bei verschiedenen pH-Werten
- Abb.45: Anreicherung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach Pinzettenverfahren mit β -ADA und CTAB verglichen mit der konventionellen Batch-Zerschäumung von Laccase bei gleichen Bedingungen
- Abb.46: Enzymaktivität der Laccase in Abhängigkeit von der β -ADA-C8-Konzentration
- Abb.47: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels β -ADA-C8 inaktivierten Laccase und Ausfällung des Komplexbildners durch Senkung des pH-Wertes
- Abb.48: Anreicherung u. Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zerschäumungsdauer nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8
- Abb.49: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8
- Abb.50: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8
- Abb.51: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der β -ADA-C8-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren
- Abb.52: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 aus dem SNL-Nährmedium
- Abb.53: Vergleich zwischen der Zerschäumung im Pinzettenverfahren aus dem SNL-Nährmedium und aus demin. Wasser
- Abb.54: Enzymaktivität der Meerrettich-Peroxidase in Abhängigkeit von der β -ADA-Konzentration
- Abb.55: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels β -ADA-C8 inaktivierten MPOX und Ausfällung des Komplexbildners durch Senkung des pH-Wertes
- Abb.56: Anreicherung und Wiederfindung von Meerrettich-Peroxidase nach der Zerschäumung im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 aus demin. Wasser
- Abb.57: Schematische Darstellung des Pinzettenverfahrens
- Abb.58: Vorgehensweise beim Pinzettenverfahren
- Abb.59: Strukturmodell von Laccase mit dem Komplexbildner β -ADA-C8
- Abb.60: Modellvorstellung des Meerrettich-Peroxidase- β -ADA-C8-Komplexes

Tabellenverzeichnis

- Tab.1: Trenntechniken zur Aufreinigung von Enzymen
- Tab.2: Zerschäumungsparameter zur Untersuchung der Zerschäumungsdauer
- Tab.3: Zerschäumungsparameter bei der Variation des pH-Wertes
- Tab.4: Zerschäumungsparameter bei der Zerschäumung mit unterschiedlichen Tensiden
- Tab.5: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Gasflussrate
- Tab.6: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Gasart
- Tab.7: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Porosität
- Tab.8: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Zerschäumungstemperatur
- Tab.9: Zerschäumungsparameter bei der Variation des Säuleninnendurchmessers
- Tab.10: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Zerschäumungsdauer bei 40 mm Innendurchmesser
- Tab.11: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Säulenlänge
- Tab.12: Zerschäumungsparameter bei der Variation des Füllstands
- Tab.13: Zerschäumungsparameter bei der Positionierung volumenvergrößernder Einbauten
- Tab.14: Zerschäumungsparameter bei der Verwendung eines kontinuierlichen Schaumzerstörers
- Tab.15: Zerschäumungsparameter bei der Kolonnenzerschäumung
- Tab.16: Zerschäumungsparameter bei der Kreislaufzerschäumung
- Tab.17: Variable und konstante Parameter bei der kontinuierlichen Zerschäumung
- Tab.18: Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA und CTAB
- Tab.19: Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 aus demin. Wasser
- Tab.20: Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 aus SNL-Nährmedium
- Tab.21: Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8
- Tab.22: Zerschäumungsparameter bei der Zerschäumung von Laccase mit Cu^{2+} - β -ADA-C8-Komplexen

- Tab.23: Zerschäumungsparameter bei der Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase mit Fe^{3+} - β -ADA-C8-Komplexen
- Tab.24: Die Zerschäumung von Laccase mit verschiedenen Schaumentnahmesystemen
- Tab.25: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasart nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Tab.26: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Porengröße der Glasfilterkerze nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Tab.27: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Positionierung volumenvergrößernder Einbauten (250 ml) nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Tab.28: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Positionierung von Einbauten unterschiedlichen Volumens nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren
- Tab.29: Anreicherung und Wiederfindung nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren unter Verwendung eines kontinuierlichen Schaumzerstörers verglichen mit der chemischen Schaumzerstörung durch SDS-Lösung
- Tab.30: Anreicherung und Wiederfindung nach der Kolonnenzerschäumung von Laccase verglichen mit der einfachen Batch-Zerschäumung
- Tab.31: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zulaufposition nach der Kreislaufzerschäumung von Laccase
- Tab.32: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zulaufposition nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase
- Tab.33: Anreicherung und Wiederfindung nach der kontinuierlichen Kolonnenzerschäumung von Laccase verglichen mit der kontinuierlichen Zerschäumung
- Tab.34: Anreicherung und Wiederfindung nach der Zerschäumung von Laccase mit Cu^{2+} - β -ADA-C8-Komplexen
- Tab.35: Anreicherung und Wiederfindung nach der Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase mit Fe^{3+} - β -ADA-C8-Komplexen

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure]
AH	Reduktionsmittel (Substrat)
Arg	Arginin
c	Konzentration
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
demin.	Demineralisiert
DPTA	1,3-Diamino-2-Hydroxypropan-N,N,N',N'-Tetradiessigsäure
d _{Säule, innen}	Innendurchmesser der Zerschäumungssäule
E	Enzym
E _A	Enzymaktivität
E _{AA}	Enzymaktivität in der Ausgangslösung
e _{AA}	absolute Enzymaktivität in der Ausgangslösung
E _{AS}	Enzymaktivität im Schaum
e _{AS}	absolute Enzymaktivität im Schaum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E _r	Anreicherungsfaktor
His	Histidin
k _{1;-1;2}	Geschwindigkeitskonstanten
K _m	Michaeliskonstante
K _{ma}	Michaeliskonstante des Substrates a
K _{mb}	Michaeliskonstante des Substrates b
K _{mia}	Inhibitorkonstante für A
l	Länge
Me	Metall
MPOX	Meerrettich-Peroxidase
n	Anzahl der Messwerte
Ox	Oxidiert
P	Porosität der Glasfilterkerze
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
Phe	Phenylalanin
pI	Isoelektrischer Punkt
R	Wiederfindung

s_x	Standardabweichung des Messwertes
S	Substrat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNL	Standard-Nährlösung
[S]	Substratkonzentration
[S _a]	Konzentration des Substrates a
[S _b]	Konzentration des Substrates b
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V	Maximalgeschwindigkeit bei [S] $\rightarrow \infty$
x_i	Einzelmesswert
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
β -ADA	N-(2-Acetamido)-iminodiessigsäure
β -ADA-C8	N-Octyl-Carbamoyl-Methy-Iminodiessigsäure

1. Einleitung

Die Anreicherung von Enzymen ist ein kosten-, zeit- und arbeitsintensiver Prozess, welcher vielfach mit hohen Verlusten in der Enzymaktivität einhergeht. Herkömmliche Verfahren wie Aussalzen, Dialyse oder Ultrafiltration mit nachfolgender chromatographischer Reinigung sind speziell bei geringen Proteinkonzentrationen nicht effizient, d.h. ein Grossteil der Enzymaktivität geht bereits beim Aufreinigungsprozess verloren. (*Belitz et al.*, 2001). Aus diesem Grund bleibt ein hohes Enzympotential ungenutzt. Um dieses Enzympotential speziell für industrielle Anwendung nutzbar zu machen, ist es nötig, Enzyme effizient und kostengünstig anzureichern zu können. (*Brown et al.* 1999)

Bereits 1920 wurde vom Reichspatentamt eine Patentschrift für ein „Verfahren zum Verdampfen von Flüssigkeiten zum Zwecke der Anreicherung, Abscheidung oder Trocknung in ihnen gelöst oder emulgiert enthaltener Stoffe durch Zerschäumung...“. (*Ostwald*, 1920) angemeldet. Dieses Verfahren wird heute als Zerschäumungsanalyse (*Maas*, 1974) oder verkürzt als Zerschäumung (*Gschwendtner*, 2000) bezeichnet. Die Methode beruht auf der Abtrennung von löslichen, oberflächenaktiven Substanzen aus wässrigen Lösungen aufgrund ihrer Fähigkeit an gas-flüssig Grenzschichten zu adsorbieren. (*Ostwald und Siehr*, 1937; *Lemlich*, 1972; *Maas*, 1974; *Bhattacharjee et al.*, 2001) Die Grenzschicht wird durch Einleiten eines Gases in eine Lösung, welche die abzutrennenden bzw. anzureichernden Substanzen enthält, generiert. (*Bartsch*, 1926; *Manegold*, 1953; *Cannon und Lemlich*, 1972) Die Anlagerung oberflächenaktiver Substanzen an einer Grenzschicht bewirkt eine Verminderung der Oberflächenspannung und ermöglicht die Entstehung von Schaum. (*Maas*, 1974) Während sich die anzureichernden, oberflächenaktiven Verbindungen im Schaum anlagern, verarmt die Lösung an derartigen Substanzen. Im Anschluss an die Zerschäumung wird der Schaum rückverflüssigt und es resultiert eine hochkonzentrierte Lösung an oberflächenaktiven Substanzen. (*Grieves*, 1982)

Aufgrund des geringen apparativen Aufwandes, der Ökologie und Ökonomie des Verfahrens, wurde die Zerschäumung im Laufe der Jahre für verschiedene Applikationen verwendet. Viele Applikationen fand die Zerschäumung im Bereich der Aufreinigung von Abwässern. *Jenkins et al.* (1972) publizierten die Reinigung von industriellen und öffentlichen Abwässern mittels Zerschäumung.

Gehle und *Schügerl* (1984) schlugen die Entfernung von Penicillin aus Abwässern mittels Kollektor durch Zerschäumung vor. *Lin* und *Lo* (1996) nutzten die Zerschäumung zur Aufreinigung von Textilabwässern. *Hussenot* et al. (1998) beschrieben die Zerschäumung zur Wasserreinigung in Fischfarmen.

Aber nicht nur in der Abwassertechnik wurde die Zerschäumung eingesetzt, sondern auch zur Anreicherung von Hefen aus Fermentationsüberständen (*Gehle* et al., 1991; *Gaudin* et al., 1960; *Ostwald* und *Mischke*, 1940), zur Anreicherung von Hopfenbitterstoffen (*Mischke*, 1940) und zur Trennung von Gluten und Stärke (*Rodgers*, 1972).

Ein weiteres großes Anwendungsgebiet der Zerschäumung ist die Aufkonzentrierung von Proteinen. Beispielsweise nutzten *Ostwald* und *Siehr* (1937) die Zerschäumung zur Gewinnung des Eiweißes aus Kartoffelfruchtsaft. *Davis* et al. (1949) isolierten Fruchtproteine mittels Zerschäumung. Während *Holland* et al. (1983) ein Extraktionsverfahren für Muschelproteine mittels Zerschäumung entwickelten, verwendeten *Lockwood* et al. (1997) die Zerschäumung zur Gewinnung rekombinanter Proteine in der Pharmaindustrie. Neben den Proteinen ohne katalytische Aktivität konnten auch Enzyme mittels Zerschäumung angereichert werden. Bei der Zerschäumung von Enzymen ist neben der Aufkonzentrierung des Enzyms der Erhalt der katalytischen Aktivität von großer Bedeutung. Bereits *Ostwald* et al. (1941) beschrieben die Anreicherung von Lipase und Diastase mittels Zerschäumung. *Sarkar* et al. (1987) verwendeten die Zerschäumung zur Anreicherung von Protease aus humanem Plazentamaterial. *Uraizee* und *Narsimhan* (1990) beschrieben, dass Cellulase, D-Aminosäureoxidase, Tripeptidsynthase und Keto-Enol-Tautomerase ohne Verlust an Aktivität zerschäumt werden konnten. Weiterhin ist es möglich, Enzyme mittels Zerschäumung voneinander oder von anderen katalytisch inaktiven Proteinen zu trennen. Beispielsweise wurde Pepsin von Renin getrennt (*Andrews* und *Schutz*, 1945). *London* et al. (1954) konnten Katalase selektiv im Schaum anreichern, während Urease in der Lösung verblieb. Katalase konnte außerdem durch *Charm* et al., 1966 von Amylase separiert werden. Die Separation beruht einerseits auf dem pH-Wert bzw. den verschiedenen isoelektrischen Punkten der Enzyme andererseits auf unterschiedlichen Oberflächenaktivitäten, die von der Größe, der Ladung, der Struktur und anderen physiko-chemischen Eigenschaften abhängig sind. (*Belitz* et al., 2001)

Allerdings sind diese Parameter nur bedingt variierbar, so dass sie zur effektiven Anreicherung nur eingeschränkt beitragen können.

Um Enzyme effizient mittels Zerschäumung anreichern zu können, ist es notwendig spezifische Bindungsstellen zwischen dem Enzym und einem Tensid zu schaffen, insbesondere dann, wenn die Enzyme wenig oder gar nicht oberflächenaktiv sind. (*Lemlich*, 1968) *Suzuki et al.* (2002) schafften diese Bindung durch Variation des pH-Wertes und Verwendung des anionischen Tensids Natriumdodecylsulfat. Dadurch wurde eine ionische Bindung zwischen einem kationischen Protein und dem Tensid ausgebildet, wodurch die Anreicherung des kationischen Proteins gegenüber einem anionischen Proteins stark gesteigert wurde.

Crofcheck et al. (2003) schafften eine Bindungsstelle, indem sie das anzureichernde Enzym mit Histidinresten versetzten. Diese Histidinreste sind in der Lage Metallionen zu komplexieren, die wiederum von Tensiden mit komplexierenden Eigenschaften komplexiert werden.

Die effiziente Anreicherung von Enzyme über spezielle Bindungen sollte auch in dieser Arbeit ausgenutzt werden, indem das sog. Pinzettenverfahren eingeführt wurde. Bevor das Pinzettenverfahren allerdings für Enzyme appliziert werden konnte, wurden konventionelle Zerschäumungen wie die Batch-, die Kreislauf-, die Kolonnen- und die kontinuierliche Zerschäumung durchgeführt um das Verhalten von Enzymen während der Zerschäumung, unter besonderer Rücksicht der katalytischen Aktivität, zu untersuchen.

Zunächst wurde das extrazelluläre Enzym Laccase (EC 1.10.3.2.) von *Tramets spec.* aus Fermentationsmedium im Batch-Verfahren zerschäumt. Die meistdiskutierten industriellen Anwendungen für Laccasen sind die Delignifizierung (*Xu*, 1996), die Reduzierung der Phenolfracht u.a. von Wein (*Servili et al.*, 2000) und der Einsatz in der Textilindustrie zum Abbau von Vegetabilien. (*Heine et al.*, 1999; *Xu*, 1996) Die Anwendungen beruhen auf der Eigenschaft des Enzyms phenolische Verbindungen zu oxidieren und mit Hilfe von niedermolekularen Redoxmediatoren persistente Ligninstrukturen abzubauen. (*Xu*, 1996; *Heine et al.*, 1999) Um dieses Enzym unter Erhalt bzw. Anreicherung der katalytischen Aktivität zerschäumen zu können, wurden verschiedene Prozessparameter wie der pH-Wert, die Zerschäumungstemperatur, die Art und Menge des Detergenz, der Gasfluss, die Gasart, die Gasblasengröße, die Säulendimensionen, der Füllstand und die Positionierung volumenvergrößernder Einbauten variiert.

Des Weiteren wurden konstruktive Veränderungen an der Zerschäumungsapparatur vorgenommen, ein kontinuierlicher Schaumzerstörer entwickelt und Kolonnen- und Kreislaufzerschäumungen durchgeführt. Um einen größeren Volumendurchsatz erzielen zu können, wurde die Laccase in einer kontinuierlichen Apparatur zerschäumt.

Nachdem sich die Laccase mit konventionellen Methoden zerschäumen ließ, sollte die Effizienz der Zerschäumung durch Ausbildung einer spezifischen Bindung zwischen Enzym und Tensid weiter gesteigert werden. Die Ausprägung der spezifischen Bindung sollte durch Zugabe von Komplexbildnern gewährleistet werden. Als Komplexbildner wurden EDTA, β -ADA und DPTA verwendet, die eine systematische Inaktivierung des Enzyms hervorriefen. Die Inaktivierung wurde auf eine Komplexierung des Kupfers im aktiven Zentrum des Enzyms zurückgeführt. Da die verwendeten Komplexbildner keine eigene Schaumaktivität aufwiesen, wurden diese entweder ionisch mit einem Tensid gebunden oder kovalent mit einem Octylrest versehen.

Im Anschluss an die Zerschäumung konnte die Inaktivierung bzw. Komplexierung des Enzyms durch Zusatz von Salzen wie $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ und $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ oder durch Senkung des pH-Wertes rückgängig gemacht werden, d.h. das Enzym wurde reaktiviert. Die Zerschäumung des mittels Komplexbildners inaktivierten Enzyms wurde als „Pinzettenverfahren“ bezeichnet und zeigte eine gesteigerte Effizienz gegenüber herkömmlichen Verfahren.

Um das Pinzettenverfahren zu validieren wurde ein zweites Enzym hinzugezogen. Bei diesem Enzym handelte es sich um die Meerrettich-Peroxidase (EC 1.11.1.7). Die Meerrettich-Peroxidase weist im aktiven Zentrum eine Hämin-Gruppe auf und enthält somit Fe^{3+} . (Welinder, 1985) Durch die Komplexierung des Fe^{3+} im aktiven Zentrum des Enzyms konnte auch dieses Enzym effizient mittels Zerschäumung angereichert werden. Die effiziente Anreicherung der Meerrettich-Peroxidase ist von Interesse, da dieses Enzym für analytische Nachweismethoden, wie den ELISA-Test als Markerenzym verwendet wird. Des Weiteren beschrieben Heine et al. (1999) den Einsatz von Meerrettich-Peroxidase in der Papier- und Baumwollindustrie zum Abbau von Grassamen und Ringelkletten sowie zur enzymatisch unterstützten Baumwollbleiche. Außerdem kann die Meerrettich-Peroxidase als Modellenzym für andere hämin-haltige Enzyme bzw. Proteine betrachtet werden, die aufgrund des strukturell ähnlichen Aufbaus potentielle Applikationen für das Pinzettenverfahren darstellen.

2. Theoretischer Teil

2.1. Enzyme und ihre Wirkmechanismen

Enzyme sind Biokatalysatoren, d.h. Stoffe biologischen Ursprungs, die chemische Reaktionen beschleunigen bzw. deren Aktivierungsenergie herabsetzen. (*Koolman und Röhm, 2003*). Chemisch gehören die Enzyme im Allgemeinen zu den Proteinen. Allerdings gilt dieses nur eingeschränkt, seit entdeckt wurde, dass auch bestimmte mRNA-Moleküle eine katalytische Aktivität entfalten. (*Karlson et al., 1994*). Enzymproteine weisen eine globuläre Struktur auf. Die Struktur der Proteine wird durch die Aminosäuresequenz und die daraus resultierende Konformation (Sekundär- und Tertiärstruktur) bestimmt. Größere Enzymmoleküle bestehen häufig aus zwei oder mehreren Peptidketten, die sich zu einer bestimmten Quartärstruktur zusammenlagern. (*Belitz et al., 2001*) Neben der Peptidkette enthalten viele Enzyme nichtproteinartige Komponenten, die als Cofaktoren bezeichnet werden. Das cofaktorhaltige Enzym wird nach *Schellenberger (1989)* als Holoenzym bezeichnet, während die reine cofaktorlose Proteinfraction als Apoenzym bezeichnet wird. Zu den Cofaktoren gehören an der Enzymfunktion beteiligte Metallionen und Coenzyme. Die Coenzyme werden wiederum in Cosubstrate und prosthetische Gruppen unterteilt. Die prosthetische Gruppe ist fest mit dem Enzym verbunden. Während der Katalyse werden häufig zwei Substrate nacheinander umgesetzt, damit die prosthetische Gruppe wieder ihren Ausgangszustand erreicht. Bekannte prosthetische Gruppen sind beispielsweise Flavin und Hämin. Das Cosubstrat hingegen wird während der Katalyse reversibel wie ein Substrat gebunden, verändert und wieder frei geben. Im Unterschied zu einem Substrat wird das Cosubstrat durch eine zweite unabhängige Reaktion regeneriert. (*Koolman und Röhm, 2003*)

Metallionen dienen einerseits als Cofaktoren, andererseits zur Stabilisierung der Enzymstruktur. Als Cofaktoren sind sie besonders bei Enzymen wirksam, die kleinere Moleküle umsetzen. Sie nehmen Einfluss auf die Bindung des Substrates und sind als Elektronenüberträger an der Katalyse beteiligt. (*Belitz et al., 2001*)

Die enzymatische Katalyse wird durch das aktive Zentrum des Enzyms bestimmt. Das aktive Zentrum umfasst Teile der Proteinstruktur, die von der Substratanlagerung bis zur Freisetzung des Produktes am Katalyseprozess mitwirken.

Dazu gehören die Aminosäurereste des Enzyms, die an der Bindung des Substrates und ggf. des Cofaktors beteiligt sind und diejenigen, die an der Umwandlung des Substrates in das Produkt mitwirken. (Belitz et al., 2001)

Zur Bindung des Substrates wird dieses in einer Kaverne oder Spalte eingeschlossen. Obwohl die Substratbindestellen des Enzyms meist vorgeformt sind, kann es während der Substratbindung zu Konformationsänderungen kommen. Dieses Phänomen wird als „induced fit“ bezeichnet. (Voet et al., 2002)

Die Bindung des Substrates erfolgt durch ionische Wechselwirkungen, teilweise auch unter Mitwirkung von Metallkationen, hydrophober Bindungen oder H-Brücken und ist sehr spezifisch. (Karlson et al., 1994) Bei der Bindung des Substrates wird dieses somit aus der wässrigen Umgebung entfernt und in eine andere chemische Umgebung eingefügt. Die Wechselwirkung mit den funktionellen Gruppen des aktiven Zentrums führt zu einer sterischen und elektronischen Deformation im reaktiven Bereich des Substrat-Moleküls. Durch diese beiden Vorgänge wird der Übergangszustand des chemischen Reaktionsablaufes erreicht, so dass das System unter Energiefreisetzung zu den Produkten weiter reagieren kann, wie Abbildung 1 zeigt.

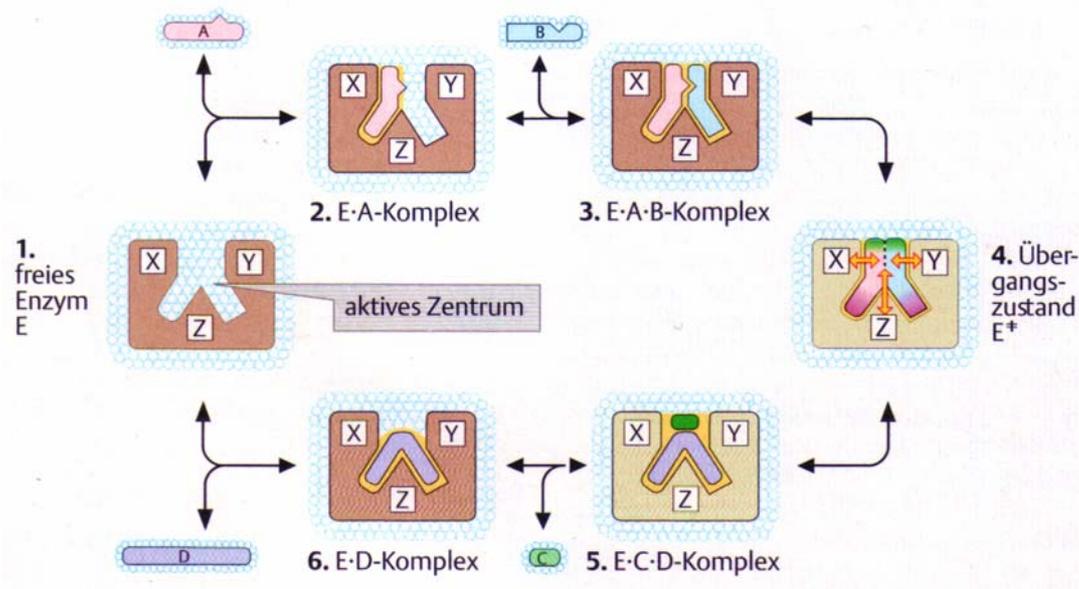
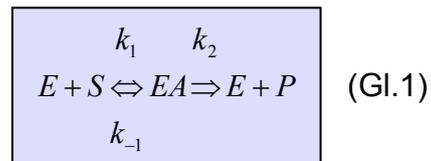


Abb.1: Schematische Darstellung einer enzymkatalysierten Reaktion (Koolman und Röhm, 2003)

Der Substratumsatz des Enzyms wird als Aktivität bezeichnet und mit der Einheit U (Unit) angegeben. Ein U entspricht der Enzymmenge, welche die Umsetzung von einem Mikromol Substrat pro Minute unter genau definierten Versuchsbedingungen katalysiert. (*Lottspeich* und *Zorbas*, 1998) Der Mechanismus einer enzymatisch katalysierten Reaktion lässt sich in Einzelschritte unterteilen. In Gleichung 1 sind die Teilschritte einer enzymatisch katalysierten Ein-Substrat-Reaktion dargestellt.



Der erste Schritt besteht in der Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes. Dadurch wird die Reaktionsfähigkeit des Substrates gesteigert. Im zweiten Schritt erfolgt die Umsetzung des enzymgebundenen Substrates in das Produkt. Der dritte Schritt besteht in der Dissoziation des entstandenen Enzym-Produkt-Komplexes in Enzym und Produkt. Auf diese Weise wird das Enzym frei und kann mit dem nächsten Substratmolekül erneut reagieren. (*Präve et al.*, 1987) Aus diesen Beziehungen leiteten *Michaelis* und *Menten* (1913) ab, dass die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen freiem Enzym und Substrat einerseits und Enzym-Substrat-Komplex andererseits (Michaelis-Komplex) so rasch gegenüber dem unkatalysierten Umsatz erfolge, dass die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes alleine von k_1 und k_{-1} nicht aber von k_2 abhängt. Dadurch ist die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional zur Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes. *Briggs* und *Haldane* (1925) entwickelten diese Theorie weiter, indem sie k_2 in ihren Überlegungen berücksichtigten und die so genannten „Stady-State-Kinetik“ begründeten. Die Theorie des Stady-State beruht auf der Annahme, dass maximal einige Millisekunden vergehen, bis sich die Geschwindigkeiten entsprechen, mit denen der Enzym-Substrat-Komplex entsteht und zerfällt. Der Zeitpunkt, an dem ein gleichgewichtsähnlicher Zustand zwischen Entstehungsgeschwindigkeit und Zerfallgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes auftritt, wird als „Stady-State“ bezeichnet. Der Stady-State-Zustand wird durch Substratmangel und Denaturierung sowie Inhibierung des Enzyms begrenzt, so dass die Geschwindigkeit der Produktbildung sinkt. (*Bisswanger*, 1994; *Belitz et al.*, 2001)

In Bezug auf Gleichung 1 erhält man aus der Stady-State-Theorie im einfachsten Fall folgende Gleichung:

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]} = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (\text{Gl.2})$$

Dabei stellt v die Reaktionsgeschwindigkeit, V die Maximalgeschwindigkeit bei $[S] \rightarrow \infty$, $[S]$ die Substratkonzentration und K_m die Michaeliskonstante dar. Die Michaeliskonstante ergibt sich nach Gleichung 1 aus der Beziehung:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{Gl.3})$$

Sie gleicht derjenigen Substratkonzentration für die

$$v = \frac{V}{2} \quad (\text{Gl.4})$$

ist. Die Michaeliskonstante charakterisiert die Affinität zwischen Enzym und Substrat. Ein geringer K_m -Wert entspricht einer hohen Affinität. Bei Substratkonzentrationen $< 0,01 K_m$ ist die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional der Substratkonzentration. Bei hohen Substratkonzentrationen ($[S] > 100 K_m$) ist die Reaktionsgeschwindigkeit dagegen nullter Ordnung und nicht von der Substratkonzentration abhängig. Im Zwischenbereich $0,01-100 K_m$ werden gemischte Ordnungen beobachtet. (*Präve et al., 1987; Bisswanger, 1994; Belitz et al., 2001*)

Die Geschwindigkeitsgesetze für Zwei-Substrat-Reaktionen können analog zu Ein-Substrat-Reaktionen abgeleitet werden. Dabei muss allerdings die Bindungsart bzw. Reihenfolge der Substrate beachtet werden. Zunächst ist zu unterscheiden, ob die Katalyse im ternären Komplex (Enzym + 2 Substrate) oder in einem binären Komplex, der immer nur eins der beiden Substrate enthält, vollzogen wird. Ternäre Enzym-Substrat-Komplexe können auf zweierlei Arten entstehen.

Die Substrate lagern sich entweder in wahrloser („random mechanism“) oder in geordneter („ordered mechanism“) Reihenfolge an das Enzym an. (Belitz et al., 2001) Verläuft die Katalyse in einem ternären Komplex, so lautet die Beziehung allgemein:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_{ma}}{[S_a]} + \frac{K_{mb}}{[S_b]} + \frac{K_{mia} \cdot K_{mb}}{[S_a] \cdot [S_b]}} \quad (\text{Gl.5})$$

In Gleichung 5 ist K_m analog zur Ein-Substrat-Reaktion definiert. K_{ma} und K_{mb} geben die Konzentration von A bzw. B an, für $v = V/2$, unter der Voraussetzung, dass das Enzym mit jeweils dem anderen Substrat (A bzw. B) gesättigt ist. K_{mia} ist eine Inhibitorkonstante für B. Diese Inhibitorkonstante kann ersetzt werden, wenn die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes als „ordered mechanism“ erfolgt (Belitz et al., 2001). Gleichung 5 wird dann wie folgt umgeformt:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_{ma}}{[S_a]} + \frac{K_{mb}}{[S_b]} + \frac{K_{ma} \cdot K_{mb}}{[S_a] \cdot [S_b]}} \quad (\text{Gl.6.})$$

Entsteht nur ein binärer Enzym-Substrat-Komplex, vereinfacht sich Gleichung 5 wie folgt:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_{ma}}{[S_a]} + \frac{K_{mb}}{[S_b]}} \quad (\text{Gl.7})$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. katalytische Aktivität des Enzyms wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Die wichtigsten Faktoren sind der pH-Wert, die Temperatur, die Anwesenheit von Effektoren und das Substrat.

Die Wirkung eines Enzyms ist stark vom pH-Wert abhängig. Trägt man die Enzymaktivität über dem pH-Wert auf, erhält man eine Glockenkurve mit einem pH-Optimum. Die Glockenform der Aktivitätskurve entsteht dadurch, dass Aminosäurereste mit ionischen Gruppen für die Katalyse essentiell sind.

Die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Reaktion ist in der Regel asymmetrisch. Mit steigender Temperatur nimmt die Aktivität des Enzyms aufgrund der gesteigerten Wärmebewegung der Moleküle zu. Ab einer bestimmten Temperatur kommt es zur Hitzedenaturierung des Enzyms. Mit der Hitzedenaturierung geht ein Aktivitätsverlust des Enzyms einher. (*Koolman und Röhm, 2003*)

Die katalytische Aktivität wird neben dem pH-Wert und der Temperatur maßgeblich von Effektoren beeinflusst. Der Oberbegriff Effektor bezeichnet einerseits Inhibitoren, die die Geschwindigkeit der Katalyse vermindern, und andererseits Aktivatoren, die den entgegengesetzten Einfluss ausüben. Zu den Aktivatoren gehören u.a. Verbindungen und Metallionen, die als prosthetische Gruppe wirksam sind oder die Konformation des Enzyms bzw. des Enzym-Substratkomplexes stabilisieren. (*Belitz et al., 2001*)

Die meisten Inhibitoren wirken reversibel, d.h. sie hinterlassen keine verbleibenden Veränderungen am Enzym. Es gibt aber auch irreversibel wirkende Inhibitoren, die ihr Zielenzym permanent modifizieren. Grundsätzlich werden Inhibitoren nach ihrer Hemmform in kompetitive und nicht kompetitive Inhibitoren unterteilt. Die kompetitiven Inhibitoren konkurrieren mit dem Substrat um die Bindungsstellen. Diese Inhibitoren ähneln in ihren Eigenschaften einem Substrat des Zielenzym oder sind Analoge des Übergangszustandes. Nicht kompetitive Inhibitoren reagieren mit einer für die Aktivität des Enzyms wichtigen Gruppe ohne die Substratbindung zu beeinträchtigen. Nicht kompetitive Inhibitoren wirken im Allgemeinen irreversibel, indem sie funktionelle Gruppen des Zielenzym modifizieren. „Selbstmord-Substrate“ sind Substratanaloga, die zusätzlich eine reaktionsfähige Gruppe enthalten. Sie binden zunächst reversibel, um dann eine kovalente Bindung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms einzugehen.

Allosterische Inhibitoren werden nicht als kompetitive oder nicht kompetitive Inhibitoren subsumiert. Sie binden an separaten Bindungsstellen außerhalb des aktiven Zentrums. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms, die indirekt die Aktivität vermindert. (*Koolman und Röhm, 2003*)

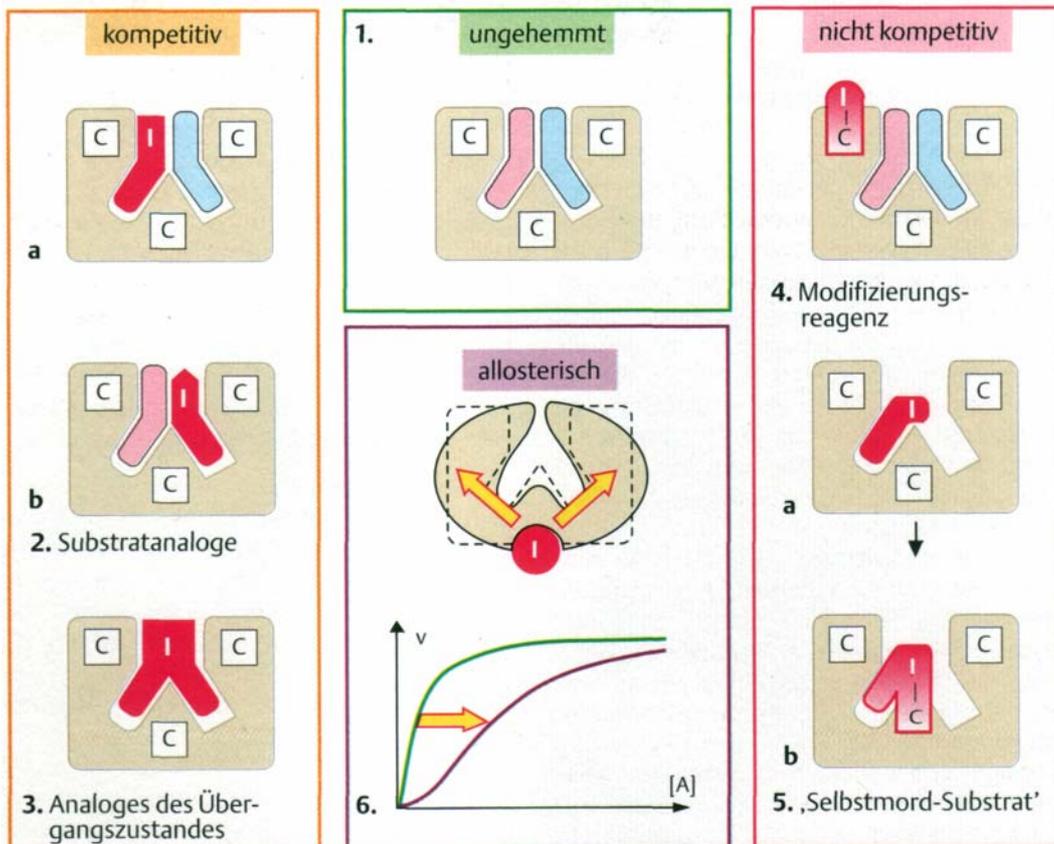


Abb.2: Wirkmechanismen unterschiedlicher Hemmstofftypen (Koolman und Röhm, 2003)

Neben der Anwesenheit von Effektoren wird die Enzymaktivität primär durch das Substrat selbst beeinflusst. Die Abhängigkeit zwischen der katalytischen Aktivität des Enzyms und dem Substrat bezieht sich einerseits auf die Art und andererseits auf die Konzentration des Substrates. Die Substratkonzentration beeinflusst, ob die Aktivität des Enzyms allein von der Enzymkonzentration oder auch von der Substratkonzentration beeinflusst wird. (Lottspeich und Zorbas, 1998) Die Spezifität, mit der ein Enzym ein bestimmtes Substrat bindet, wird als Substratspezifität bezeichnet. Die Substratspezifität beruht auf der Komplementarität zwischen aktivem Zentrum und Substrat. Einerseits muss die geometrische Beschaffenheit des aktiven Zentrums mit der des Substrates kompartibel sein (geometrische Komplementarität), andererseits müssen die Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum so angeordnet sein, dass es zu spezifischen Wechselwirkungen mit dem Substrat kommt (elektronische Komplementarität). Aus diesem Grund können Enzyme beispielsweise stereospezifisch reagieren. (Voet et al., 2002)

Die Spezifität der enzymatischen Reaktion wird neben der Substratspezifität von der Wirkspezifität des Enzyms geprägt. Die Wirkspezifität bezieht sich auf den Typ der katalysierten Reaktion.

Unter Berücksichtigung der Wirk- und Substratspezifität werden Enzyme klassifiziert. Jedes Enzym weist einen vierstelligen Zahlencode auf. Dieser Zahlencode wird als EC-Nummer bezeichnet. Die erste Ziffer der EC-Nummer gibt die Zugehörigkeit in eine der sechs Hauptklassen nach Abbildung 3 an. Die nächsten beiden Ziffern definieren Unterklassen und Unter-Unterklassen und die letzte Ziffer gibt die laufende Nummer des Enzyms in der Unter-Unterklasse an. (Koolman und Röhm, 2003)

Die in dieser Arbeit verwendete Laccase (EC 1.10.3.2) und Meerrettich-Peroxidase (EC 1.11.1.7) gehören in die Gruppe der Oxidoreduktasen. Die Oxidoreduktasen katalysieren die Übertragung von Reduktionsequivalenten zwischen zwei Redoxsystemen, wie Abbildung 3 zeigt. (Mathewson, 1998, Belitz et al., 2001)

Klasse	Reaktionstyp	wichtige Unterklassen
1 Oxidoreduktasen	<p>○ = Reduktionsequivalent</p> <p>A_{red} + B_{ox} ⇌ A_{ox} + B_{red}</p>	Dehydrogenasen Oxidasen, Peroxidasen Reduktasen Monoxygenasen, Dioxygenasen
2 Transferasen	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C ₁ -Transferasen Glycosyl-Transferasen Aminotransferasen Phosphotransferasen
3 Hydrolasen	<p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterasen Glycosidasen Peptidasen Amidasen
4 Lyasen („Synthasen“)	<p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C-Lyasen C-O-Lyasen C-N-Lyasen C-S-Lyasen
5 Isomerasen	<p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerasen <i>cis-trans</i> -Isomerasen Intramolekulare Trans- ferasen
6 Ligasen („Synthetasen“)	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP X = A, G, U, C</p>	C-C-Ligasen C-O-Ligasen C-N-Ligasen C-S-Ligasen

Abb.3: Die Enzymklassen (Koolman und Röhm, 2003)

2.1.1. Die Laccase

Die Laccase wird in die Gruppe der Oxidasen bzw. der Polyphenoloxidasen subsumiert. Laccasen sind die meist verbreitetsten Lignin modifizierenden Enzyme, die von einigen Bakterien, fast allen Weißfäulepilzen sowie einer Reihe von Schimmelpilzen (Asco- und Deuteromyceten) und höheren Pflanzen gebildet werden. (*Heine et al.*, 1999; *Enguita et al.*, 2004)

Laccasen sind glykolysierte Proteine mit einem Polysaccharidgehalt von 11-80 % und Molekulargewichten zwischen 59 und 110 kDa, wobei dimere und tetramere Laccasen mit Molekulargewichten bis 390 kDa auftreten können. (*Thurston*, 1994) Neben dem hohen Polysaccharidgehalt ist die Positionierung von vier Kupfer-Ionen im katalytischen Zentrum charakteristisch für die Laccase (*Heine et al.*, 1999), wie Abbildung 4A zeigt.

Die Kupferatome im katalytischen Zentrum der Laccase können aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften in Typ-1-, Typ-2- und Typ-3-Kupferzentren eingeteilt werden. Das Typ-1-Kupferzentrum hat eine trigonale Koordination mit zwei Histidinresten und einem Cysteinrest als äquatoriale Liganden und einen variablen Liganden. (*Claus*, 2004) Das Typ-1-Kupfer wird auch als blaues Kupfer bezeichnet und ist $\approx 13 \text{ \AA}$ vom dreikernigen Kupfercluster entfernt. Das sog. dreikernige Kupfercluster enthält ein dreifachkoordiniertes einkerniges Cu^{2+} -Zentrum (Typ-2) und ein hydroxidverbrücktes, gekoppeltes, zweikerniges Cu^{2+} -Zentrum (Typ-3). Die verschiedenen Kupferzentren ermöglichen die Substratoxidation bzw. die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser, ohne dabei toxische Zwischenprodukte wie beispielsweise H_2O_2 auszustoßen. (*Enguita et al.* 2003)

Die Substratoxidation, bevorzugt phenolische Substrate, findet durch Anlagerung am Typ-1 Kupferzentrum statt (*Claus*, 2004), wie Abbildung 4C am Beispiel von ABTS als Substrat zeigt. Nach *Enguita et al.* (2004) zeigt die Kristallstruktur von Laccase, dass ABTS in einer Tasche, die von apolaren Seitenketten gebildet wird, angelagert wird, wobei sich das ABTS U-förmig biegt. Dieses widerspricht einerseits der linearen Struktur von ABTS in kristalliner Form, stimmt aber andererseits mit ABTS überein, welches in radikalischer oder kationischer Form gebunden wurde. (*Enguita et al.*, 2004)

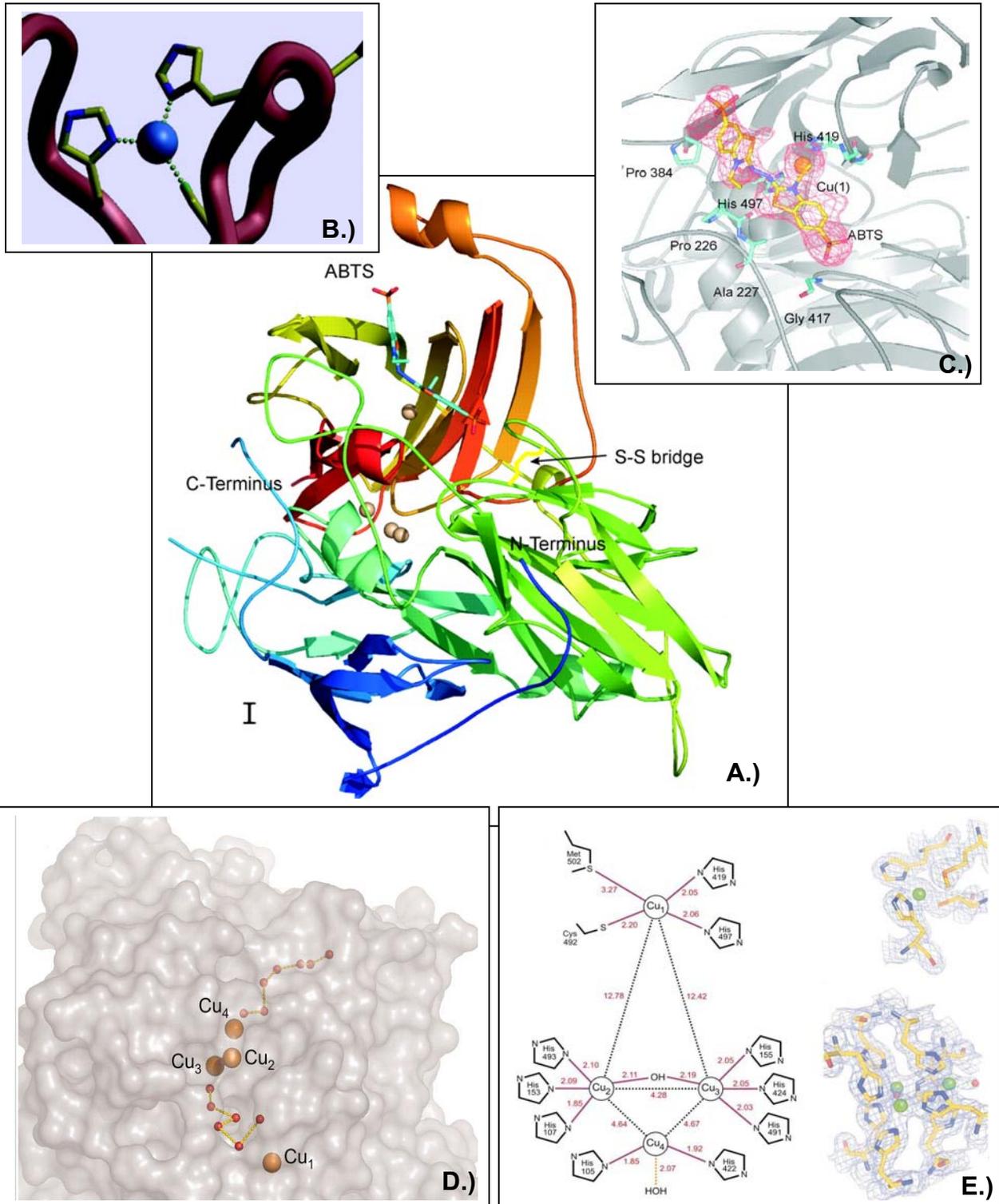


Abb.4: Strukturmodelle von Laccase. A.) Struktur der Laccase von *Bacillus subtilis*. Der Mediator ABTS ist in der Nähe des Typ-1-Kupferzentrums (Enguita et al., 2004) B.) Schematische Illustration der näheren Umgebung des Typ-1-Kupfers einer Laccase von *Trametes versicolor* (Piontek et al., 2002) C.) Position des ABTS nahe des Typ-1-Kupfers einer Laccase von *Bacillus subtilis* (Enguita et al., 2004) D.) Struktur der Wasserkanäle einer Laccase von *Bacillus subtilis*; (Enguita et al., 2003) E.) Schematische Darstellung der Kupferzentren und der Elektronendichte im Bereich der Kupferzentren einer Laccase von *Bacillus subtilis*. Die Kupferatome und Wassermoleküle sind als grüne und rote Kugeln dargestellt. (Enguita et al., 2003)

Das Substrat wird am Typ-1-Kupferzentrum zu Radikalen bzw. Radikalkationen oxidiert, wodurch das Enzym reduziert wird. Die Radikale bzw. Radikalkationen unterliegen nichtenzymatischen Folgereaktionen. (Polymerisation, Bindungsspaltung). Zu diesen Folgereaktionen kann bei geeigneten Redoxmediatoren das Angreifen persistenter, nichtphenolischer Ligninstrukturen zählen, wie Abbildung 5 zeigt. (Heine et al., 1999)

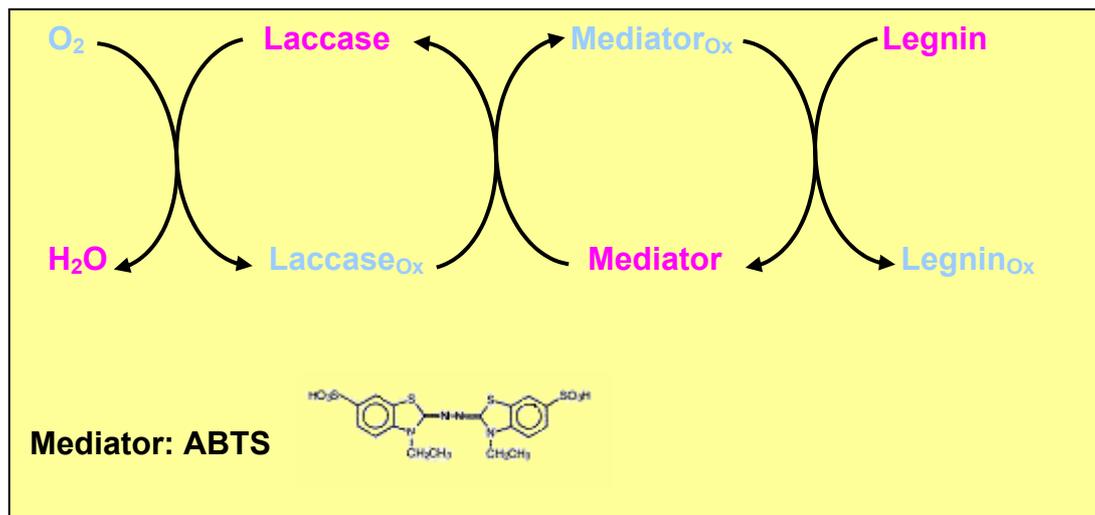


Abb.5: Reaktionsmechanismus von Laccase am Beispiel von ABTS als Substrat (Bourbonnais et al., 1998)

Wie Abbildung 5 zeigt, geht mit der Oxidation des Substrates eine Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser einher. Die Elektronen, welche durch die Oxidation des Substrates frei werden, werden über einen Elektronentransportpfad zum dreikernigen Kupfercluster transportiert, an dem der molekulare Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Der molekulare Sauerstoff gelangt durch sog. Wasserkanäle zum dreikernigen Kupfercluster in das Enzyminnere (Enguita et al., 2004), wie Abbildung 4D zeigt. Die Laccase weist zwei dieser Wasserkanäle auf, die hauptsächlich aus neutralen und polaren Seitenketten der Polypeptidkette gebildet werden. Einer dieser Wasserkanäle erlaubt den Kontakt zwischen dem Typ-2-Kupfer und der Proteinoberfläche, während der andere Kanal den Kontakt zwischen einem Atom des Typ-3-Kupferzentrums und der Oberfläche gewährleistet. (Enguita et al., 2003)

Die enzymatische Reduktion des eingebrachten Sauerstoffs erfolgt nach *Solomon et al.* (2001) zunächst über eine Peroxid-Zwischenstufe, in der ein oxidiertes Typ-3-Kupferpaar mit einem reduzierten Typ-2-Kupferzentrum verbrückt wird. In der Literatur werden zwei Formen von Peroxid-Zwischenstufen beschrieben. (*Solomon et al.*, 2001; *Enguita et al.*, 2004) In der einen Form verbrückt das Peroxid intern die Typ-2- und die Typ-3-Kupferzentren. In der anderen Form sind die Typ-3-Cu²⁺ durch eine, auch im Ruhezustand vorhandene Hydroxidbrücke verbrückt. (Abb.6) Das Peroxid verbrückt in diesem Fall als Hydroperoxid die Typ-2- und Typ-3-Kupferzentren, wie Abbildung 6 zeigt.

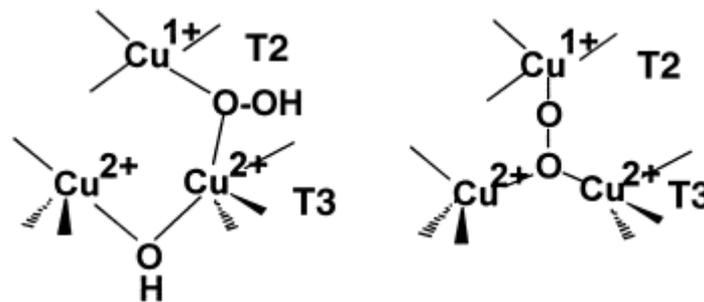


Abb.6: Strukturmodell der Peroxid-Zwischenstufen nach *Solomon et al.*, 2001

Unabhängig vom Modell der Peroxid-Zwischenstufe entsteht diese durch Zwei-Elektronen-Reduktion. Die Peroxid-Zwischenstufe wird in einem weiteren Zwei-Elektronenschritt reduziert, wobei das Typ-2- und das entfernte Typ-1-Zentrum unter Bildung der „nativen Zwischenstufe“ oxidiert werden. Hierbei handelt es sich um ein Oxo- bzw. Hydroxo-Produkt mit einer Brücke zwischen dem oxidierten Typ-3 und dem nun ebenfalls oxidierten Typ-2-Kupferzentrum des dreikernigen Kupferclusters. Das Oxo- bzw. Hydroxo-Produkt wird nun entweder schnell durch das Substrat reduziert oder reagiert in Abwesenheit eines Substrates langsam zum Ruhezustand, indem ein Sauerstoffatom des O₂-Moleküls in Form von OH terminal an das Typ-2-Kupferzentrum gebunden ist. Diese Umlagerung entkoppelt den dreikernigen Kupfercluster und entfernt das ruhende Enzym aus dem Katalysezyklus. Der Mechanismus der O₂-Reduktion am mehrkernigen Kupfercluster ist in Abbildung 7 dargestellt.

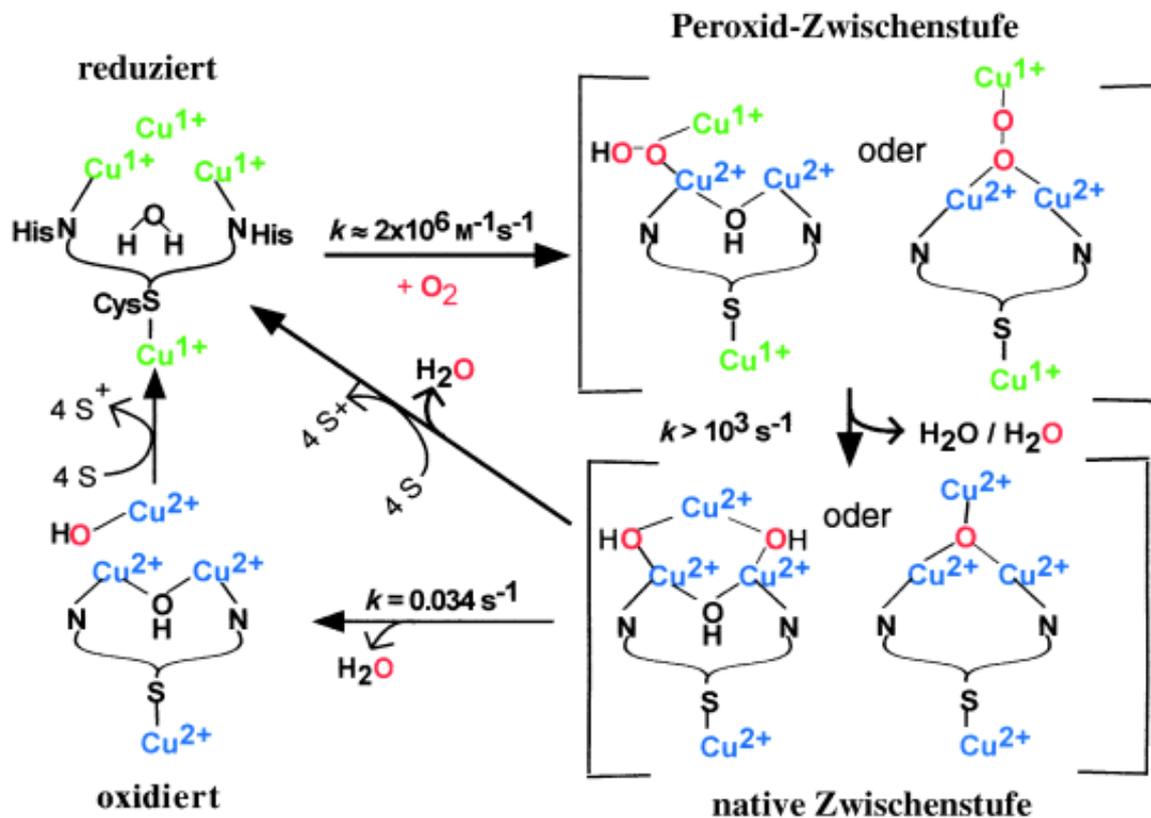


Abb.7: Mechanismus der Reduktion von O_2 zu H_2O in mehrkernigen, kupferhaltigen Oxidasen wie Laccase (Solomon et al., 2001)

2.1.2. Die Meerrettich-Peroxidase

Im Gegensatz zur Laccase benötigt die Meerrettich-Peroxidase nicht molekularen Sauerstoff, sondern H_2O_2 zur enzymatischen Katalyse und wird in die Gruppe der Peroxidasen subsumiert. Die Meerrettich-Peroxidase wird u.a. aus der Meerrettichwurzel (*Armoracia rusticana*) isoliert (Shannon et al., 1966) und weist ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa auf. Sie enthält neben zwei Ca^{2+} , vier Disulfidbindungen und einen Kohlenhydratanteil sowie Hämin als prosthetische Gruppe. (Welinder, 1985) Hämin ist ein vierzähliger Chelatkomplex, der Fe^{3+} als Zentralatom enthält. Die Liganden bilden mit dem Eisenatom einen ebenen quadratischen Komplex. Die fünfte und sechste Koordinationsstelle des Eisens liegt senkrecht zur Ebene des Porphyrinrings. Diese Koordinationsstellen können entweder besetzt oder unbesetzt vorliegen. (Lehninger, 1975). Die fünfte Koordinationsstelle wird bei der Meerrettich-Peroxidase von einem Histidinrest besetzt, während die sechste Koordinationsstelle unbesetzt vorliegt und von den Aminosäuren Arginin, Phenylalanin und Histidin als Ligandentasche umgeben wird (Prater, 2004), wie Abb. 9B zeigt.

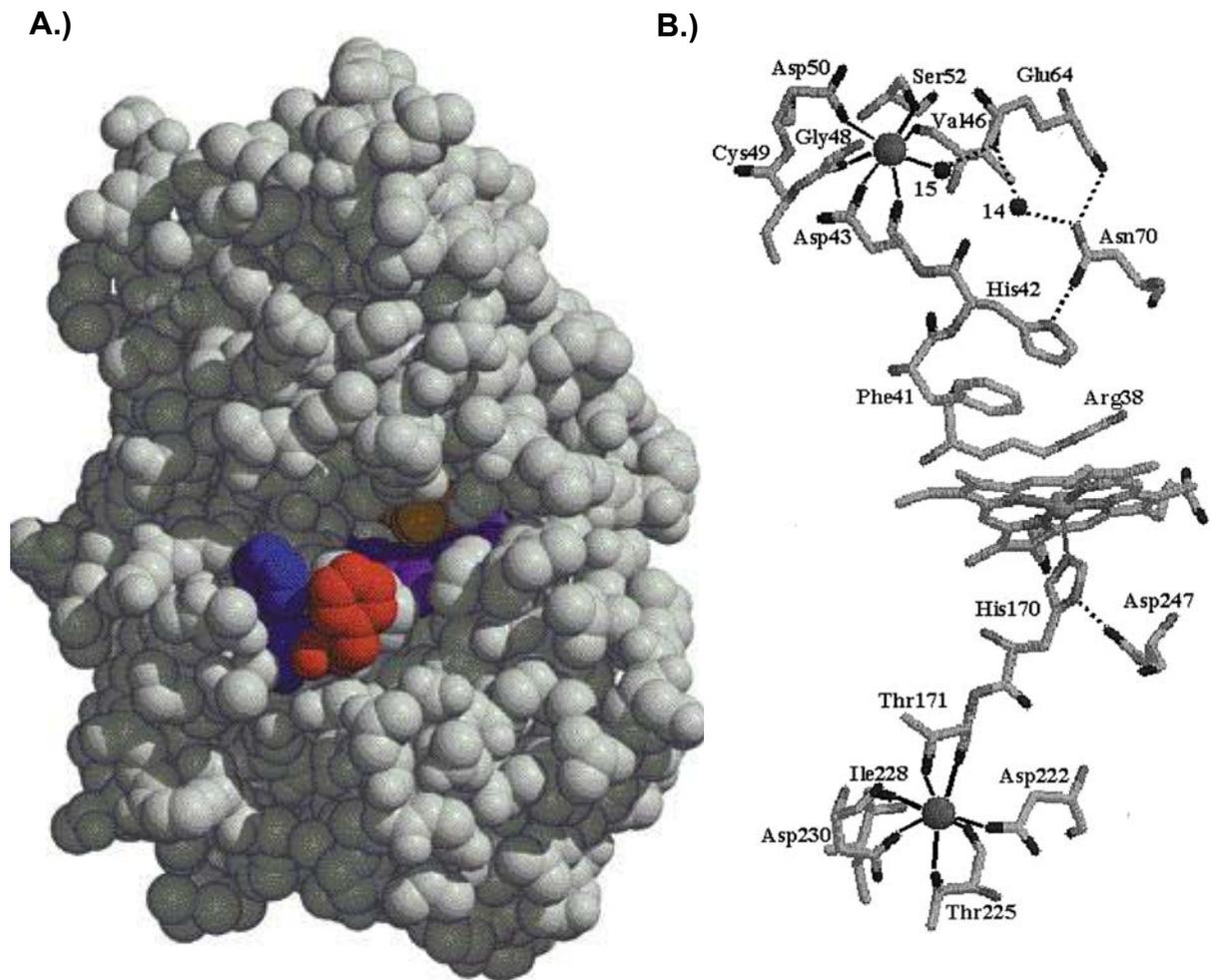


Abb.8: Strukturmerkmale der Meerrettich-Peroxidase A) Oberflächenflächenstruktur (Nielson et al., 2001). (violett: Hämingruppe; gelb: katalytisch aktives Arg38; rot: Phe142; blau: Phe143) B.) Strukturelle Eigenschaften der Hämingruppe und deren Umgebung (Howes et al., 2001). (Bindungen zum Ca^{2+} sind als durchgezogene Linien dargestellt, Wasserstoffbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt)

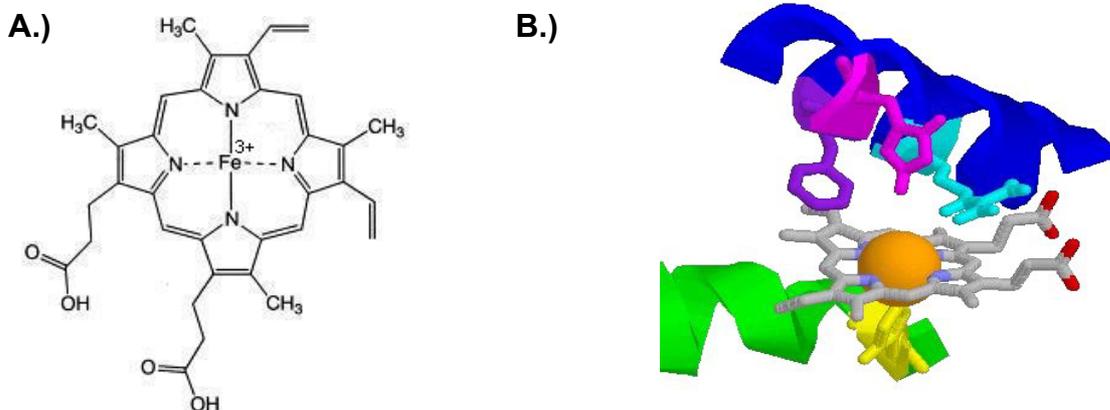


Abb.9: A.) Hämin aus dem aktiven Zentrum der Meerrettich-Peroxidase (Lehninger, 1975) bzw. B.) Das aktive Zentrum der Meerrettich-Peroxidase (magenta: Phenylalanin; rosa: Histidin, distal; blau: Arginin; orange: Eisen; gelb: Histidin, proximal) (Prater, 2004)

Bei der enzymatischen Katalyse ändert sich das Elektronenanregungsspektrum der Meerrettich-Peroxidase, bedingt durch den Valenzwechsel des Zentralatoms, wobei durch die Reaktion mit H_2O_2 und dem Reduktionsmittel AH (Substrat) intermediär die Verbindungen I und II auftreten, wie Abbildung 10 zeigt. (Belitz et al., 2001) Der genaue Ablauf zur Entstehung von Verbindungen I und II war lange unklar und wurde von verschiedenen Autoren unterschiedlich beschrieben. Während Belitz et al. (2002) und Berglund et al. (2002) die Verbindung I als Radikalkation mit einer Oxidationsstufe von $4+$ beschrieben, vermuteten Robinson und Eskin (1991), dass ein Radikal mit der Oxidationsstufe $4+$ mit einer nicht radikalischen Verbindung mit der Oxidationsstufe $5+$ im Gleichgewicht steht.

Die Verbindung II wird in der Literatur sowohl mit einer Doppelbindung zwischen dem Eisenzentralatom und Sauerstoff als auch mit einer Einfachbindung zwischen dem Zentralatom und einer OH-Gruppe dargestellt. Die Oxidationsstufe des Zentralatoms beträgt bei Verbindung II $4+$. (Belitz et al., 2001; Berglund et al., 2002; Robinson und Eskin, 1991; Rodriguez-Lopez et al., 2001) Durch Reduktion der Verbindung II durch ein weiteres Reduktionsmittel AH entsteht das regenerierte Enzym mit der Oxidationsstufe $3+$.

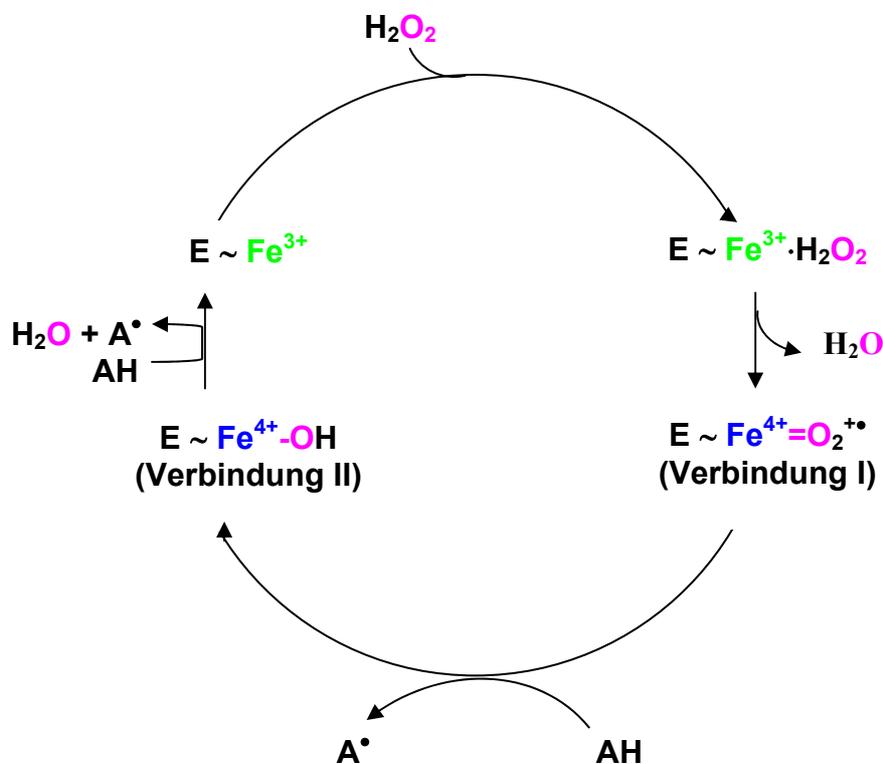
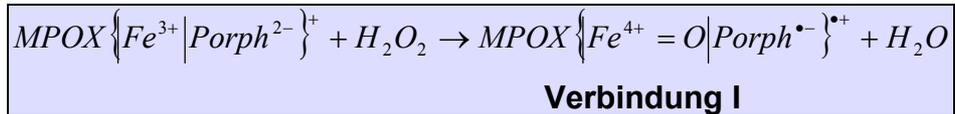


Abb.10: Valenzwechsel des Fe-Zentralatoms bei der Katalyse der Meerrettich-Peroxidase (Belitz et al., 2001)

Der Substratumsatz durch die Meerrettich-Peroxidase wurde von *Meno et al.* (2002) und *Prater* (2004) nach kontroversen Angaben in der Literatur detaillierter untersucht und beschrieben. Sie gehen davon aus, dass die Hämingruppe zunächst eine einfach positive Ladung trägt. Die Entstehung von Verbindung I lässt sich daher wie folgt darstellen:



Zur Entstehung von Verbindung I wird die O-O-Bindung des Wasserstoffperoxids aufgespalten. *Newmyr* und *Ortiz de Monzellano* (1996) schrieben dem distalen Histidin (His-42) dabei eine entscheidende Rolle zu. His-42 ist einerseits für die Deprotonierung von H_2O_2 zuständig und ermöglicht dadurch die Bildung eines Eisenperoxid-Komplexes. Andererseits transferiert His-42 ein Proton zum distalen Sauerstoff und ermöglicht dadurch die Spaltung der O-O-Bindung und somit die Bildung von Verbindung I, wie Abbildung 11 zeigt.

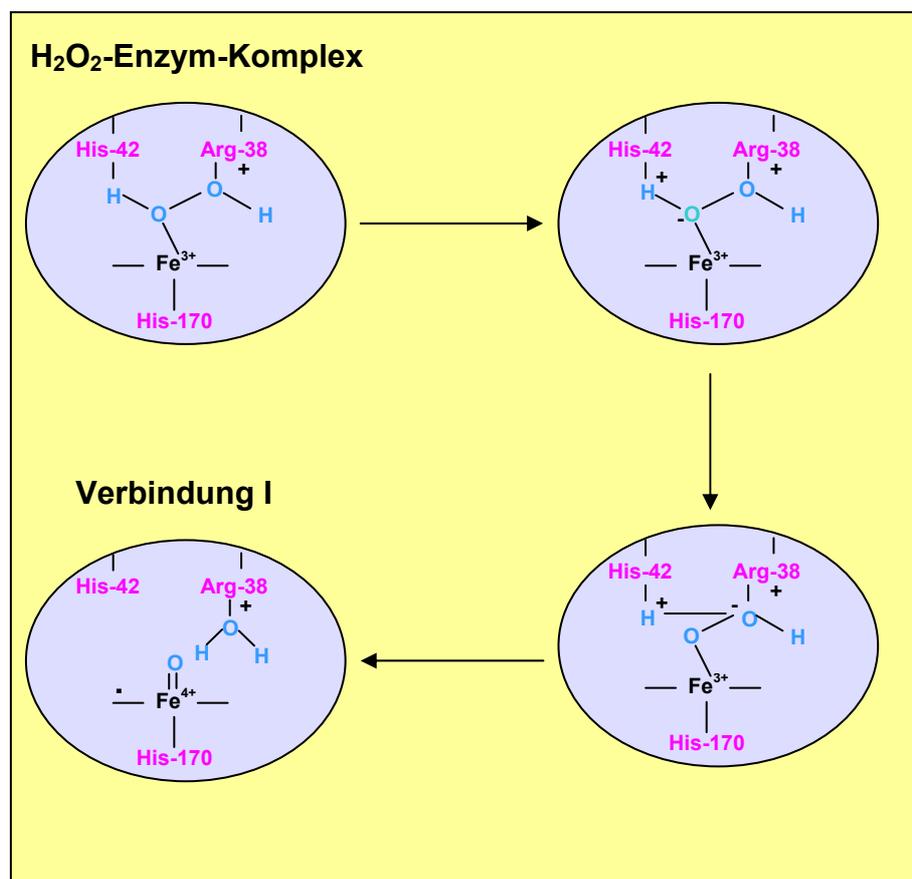


Abb.11: Spaltung von H_2O_2 zur Bildung von Verbindung I (*Newmyr* und *Ortiz de Monzellano*, 1996; *Prater*, 2004)

Die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase wird neben dem aktiven Zentrum ebenfalls von zwei Ca^{2+} -Ionen beeinflusst. Diese Ca^{2+} -Ionen sind nicht direkt im aktiven Zentrum, sondern oberhalb bzw. unterhalb der Hämingruppe positioniert, wie Abbildung 8B zeigt. Die Aktivität wird durch die Ca^{2+} -Ionen nicht direkt beeinflusst, sondern vielmehr indirekt durch Stabilisierung der Enzymstruktur im Bereich der Hämingruppe. Werden die Ca^{2+} -Ionen aus dem Molekül entfernt, führt dies zu Konformationsänderungen, die eine Abnahme der Aktivität und thermischen Stabilität des Enzyms bewirken. (Howes et al., 2001)

2.1.3. Die Aufreinigung von Laccase und Meerrettich-Peroxidase

Die Aufreinigung von Proteinen ist ein defiziles Problem, da viele Proteine sehr labil und schnell denaturierbar sind. Speziell bei Enzymen besteht die Gefahr, dass Aktivitätsverluste auftreten. (Koolman und Röhm, 2003) Konventionelle Methoden zur Aufreinigung von Enzymen nutzen die Eigenschaften des Proteins, wie die Löslichkeit, die pH-Stabilität, die Hitzestabilität, die Molekülmasse, die Ladung, die Hydrophobie, die Fähigkeit zur Ligandenbindung, die Antigenität, das Adsorptionsverhalten und den isoelektrischen Punkt, wie Tabelle 1 zeigt. (Kreis et al., 2001)

Tab.1: Trenntechniken zur Aufreinigung von Enzymen (Kreis et al., 2001)

Proteineigenschaft	Trenntechnik
Löslichkeit	Ausfällung mit Salzen oder organischen Lösungsmitteln
pH-Stabilität	Säurefällung
Hitzestabilität	Hitzefällung
Größe, Molekülmasse	Dialyse, Ultrafiltration, Gelfiltration, Ultrazentrifugation, SDS-PAGE
Ladung	Ionenaustauscher, Elektrophorese
Hydrophobie	HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography)
Ligandenbindung	Affinitätschromatographie, Metall-Chelat-Chromatographie
Antigenität	Immuno-Affinitätschromatographie
Adsorptionsverhalten	Hydroxyapatit, Aluminiumgel, Stärkegel
Isoelektrischer Punkt	Isoelektrische Fokussierung

Je nach Enzym werden verschiedene dieser Aufreinigungsverfahren verwendet.

Zur Aufreinigung von intrazellulären Enzymen werden diese zunächst durch Zerkleinerung des Gewebes und Extraktion aus der Biomasse gewonnen. Extrazelluläre Enzyme hingegen werden durch Filtration von der Biomasse abgetrennt. (Präve et al., 1994) Da sowohl extra- als auch intrazelluläre Enzyme häufig in sehr verdünnten Lösungen anfallen, müssen sie vor ihrer weiteren Aufreinigung aufkonzentriert werden. (Präve et al., 1994) Im industriellen Maßstab hat sich die Ultrafiltration als schonender und effizienter Verfahrensschritt zur Aufkonzentrierung von Enzymen durchgesetzt. (Flaschel et al., 1983)

Bei der Ultrafiltration wird eine Flüssigkeit mittels Gasdruck durch eine Membran mit einer bestimmten Porengröße gedrückt. Die Proteine, die kleiner als die Porengröße der Membran sind, treten mit dem Filtrat durch die Membran, während größere Proteine im Filterkuchen verbleiben und dadurch aufkonzentriert werden. (Scopes, 1982)

Bei der Aufreinigung des Enzyms, die stufenweise erfolgt, steht die Abtrennung von Begleitproteinen im Vordergrund. Als erste Operation wird häufig die fraktionierte Fällung durch z.B. Ammoniumsulfat gewählt. Die Salzfällung beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit von Proteinen bei verschiedenen Salzkonzentrationen, da die Löslichkeit von Proteinen stark von der Salzkonzentration (Ionenstärke) abhängig ist. Mit steigender Salzkonzentration (Ionenstärke) nimmt die Löslichkeit der Proteine zu, weil die Ionen mit der Proteinoberfläche in Wechselwirkung treten und dadurch elektrostatische Protein-Proteinwechselwirkungen bzw. die Aggregation der Proteinmoleküle zurückdrängen. Ab einer gewissen Salzkonzentration wirkt die Menge an Hydratationen allerdings limitierend. Die Hydratationen werden dazu benötigt das Salz in Lösung zu bringen bzw. das Protein in Lösung zu halten. Da durch Entzug des Hydratwassers die Proteine aggregieren, kommt es zur Ausfällung. Nach Zentrifugation wird das präzipitierte Protein in einem geringen Volumen niedermolekularem Puffer und dann mittels Dialyse von dem hohen Salzüberschuss befreit. Die Salzkonzentration kann bei diesem Verfahren jedoch nie so exakt eingestellt werden, dass nur das gewünschte Protein ausfällt. Aus diesem Grund liegt der Anreicherungsfaktor dieser Methode zwischen Faktor 2 und Faktor 6. (Kreis et al., 2001)

Die Abtrennung von störenden Begleitproteinen ist allerdings häufig nicht durch einstufige Verfahren wie Fällungsvorgänge zu erreichen. Für die Feinreinigung steht eine Reihe von chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren zur Verfügung. (Präve et al., 1994). Zu den chromatographischen Verfahren zählen u.a. die Adsorptions- und Ionenaustauschchromatographie, die Gelfiltration und die Affinitätschromatographie. Die Adsorptionschromatographie beruht auf der selektiven Adsorption und Desorption von Proteinen an anorganischen Materialien. Wegen des hohen Druckverlustes und der geringen Durchflussraten werden diese Adsorbentien nur im Chargenbetrieb eingesetzt. Größere Bedeutung für die Trennung von Enzymen weist die Ionenaustauschchromatographie auf. (Präve et al., 1994)

Bei der Ionenaustauschchromatographie werden die Proteine gemäß ihrer Gesamtladung aufgetrennt. Wird die Chromatographie bei pH-Werten größer dem isoelektrischen Punkt des aufzureinigenden Enzyms durchgeführt, wird ein Anionenaustauscher verwendet. Bei pH-Werten, die kleiner als der isoelektrische Punkt sind, wird ein Kationenaustauscher verwendet. Die Proteine werden an den positiven oder negativen Ankergruppen des jeweiligen Ionenaustauschers gebunden. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt durch Erhöhung der Salzkonzentration oder seltener durch Veränderung des pH-Wertes. Mit der Ionenaustauschchromatographie können Anreicherungsfaktoren von 3-6 erzielt werden. (Kreis et al., 2001) Anders als bei der Ionenaustauschchromatographie wird bei der Gelfiltration nicht aufgrund der Proteinladung getrennt, sondern die Molekülgröße und -form als Trennkriterium genutzt. Das Gelbett der Chromatographiesäule bilden poröse Kügelchen. Der Porendurchmesser ist so bemessen, dass kleine Proteine und Ionen durch die Poren wandern, während große Proteine nicht in die Poren passen und um die Kügelchen herumwandern. Aus diesem Grund eluieren große Proteine zuerst aus der Säule, während kleinere Proteine länger in der Säule verbleiben. Der Anreicherungsfaktor dieser Methode beträgt 4-6. (Kreis et al., 2001)

Die Affinitätschromatographie nutzt die biospezifische Bindung zwischen einem Enzym und einem Liganden als Grundlage von Trennprozessen. (Jacoby und Wilcheck, 1974) Spezifische Liganden können Substrate oder Inhibitoren sein. (Präve et al., 1994) Mit dieser Methode lassen sich Anreicherungsfaktoren von bis zu 5000 erzielen. (Kreis et al., 2001) Nachteil der Methode ist, dass für jedes Enzym ein spezifisches Harz entwickelt werden muss. (Präve et al., 1994)

Eine Sonderform der Affinitätschromatographie ist die Metallchelate-Affinitätschromatographie. Die Metallchelate-Affinitätschromatographie nutzt die Fähigkeit von Polyhistidinresten Metallionen zu komplexieren. Die Polyhistidinreste sind entweder nativ am Protein vorhanden oder an dieses codiert worden. Die Chromatographiesäule der Metallchelate-Affinitätschromatographie enthält einen Adsorber, an den Zink-Ionen mittels Iminodiessigsäure komplexiert werden. Auf Grund der besonderen Affinität zwischen den Histidinresten und dem Zink wird fast ausschließlich das histidintragende Protein vom Adsorber festgehalten. Die Elution der Proteine erfolgt durch Imidazol-Gradienten oder durch Veränderung des pH-Wertes. (Kreis et al., 2001)

Die elektrophoretischen Verfahren nutzen die differentielle Wandergeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld zur Trennung aus. (Präve et al., 1994) Die Wandergeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld hängt von der Proteingröße, Proteinform und der Ladung des Proteins ab. (Koolman und Röhm, 2003) Es wurden unterschiedliche elektrophoretische Verfahren entwickelt, die sich in der Art des Trägers und den Elektrophoresebedingungen unterscheiden. In der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) lässt sich die Porengröße des Trägergels variieren, so dass ein Molekülsieb resultiert. Führt man die PAGE in Gegenwart des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) durch, erfolgt die Trennung nur nach Molekülgröße, da die Anlagerung des SDS an die Proteine deren Ladungsunterschiede aufhebt. Dieses Verfahren wird als SDS-PAGE bezeichnet. (Karlson et al. 1994) Allerdings geht mit dieser Form der Elektrophorese eine Denaturierung des Enzyms einher, da SDS besonders nach vorheriger Reduktion mit Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DDT) Proteinaggregate dissoziiert und in ihre Untereinheiten aufspaltet. (Kreis et al., 2001)

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine in einem Gel mit pH-Gradient getrennt. Dieser pH-Gradient wird mit Hilfe von Puffersubstanzen (Ampholyten) erzeugt. Die Proteine wandern dann bis zu dem Ort, an welchem der pH-Wert des Gels ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Wenn zwei elektrophoretische Verfahren miteinander gekoppelt werden, resultiert die zweidimensionale Elektrophorese. Häufig werden die Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt und dann, um 90° versetzt, nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. (Görg et al., 1988; Görg, 1991)

Belitz et al. (2001) beschrieben bei der Aufreinigung von α -Glucosidase durch isoelektrische Fokussierung eine knapp 3-fache Anreicherung.

Allerdings ist bei der Aufreinigung von Enzymen nicht nur der Anreicherungsfaktor des Enzyms entscheidend. Vielmehr ist es notwendig die Aktivitätsverluste des jeweiligen Enzyms durch die Aufreinigung zu beachten. Die Verluste an katalytischer Aktivität liegen bei der Aufreinigung von extracellulärer Laccase aus Fermentationsüberständen zwischen 50 % und 90 %. (*Shin und Lee*, 2000; *Jung et al.*, 2002; *De Souza und Peralta*, 2003; *Iyer und Chattoo*, 2003; *Dong und Zhang*, 2004) *Dong und Zhang* (2004) beschrieben Aktivitätsverluste von 76,2 % nach Gelfiltration, Anionenaustauschchromatographie und nativer PAGE. *De Souza und Peralta* (2003) reinigten Laccase von *Pleurotis pulmonarius* bis zur elektrophoretischen Homogenität durch Acetonausfällung, Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration auf. Die Anreicherung betrug danach 5,9 bei 51 % Aktivitätsverlust. *Jung et al.* (2002) verzeichneten durch chromatographische Reinigung Aktivitätsverluste von 60 %. *Shin und Lee* (2000) beschrieben Aktivitätsverluste von 67,7 % bei 14,5-facher Anreicherung nach mehreren Aufreinigungsschritten.

Die Aufreinigungsfaktoren und die Aktivitätsverluste der Meerrettich-Peroxidase sind je nach Aufreinigungsverfahren sehr unterschiedlich. *Guo und Ruckenstein* (2003) beschrieben nach Affinitätschromatographie einen Anreicherungsfaktor von 142 und eine Wiederfindung von 24 %. *Miranda et al.* (1995) publizierten ein Aufreinigungsverfahren aus der Meerrettichwurzel, welches eine Wiederfindung von 90 % bei 4,8 facher Aufreinigung erzielt. *Regalado et al.* (1996) erzielten einen Aufreinigungsfaktor von 80 bei 46 % Wiederfindung.

Die Wiederfindungsfaktoren zeigen, dass während der Aufreinigung des Enzyms mit konventionellen Methoden ein Großteil der Enzymaktivität verloren geht. Zudem sind die konventionellen Methoden oft kosten- sowie zeitaufwändig und speziell bei geringen Enzymkonzentrationen wenig effektiv. (*Belitz et al.*, 2001; *Kreis et al.*, 2001) Ein einfaches, ökonomisches und kostengünstiges Verfahren zur Aufreinigung bzw. Anreicherung von Proteinen und Enzymen ist die Zerschäumung (*Ostwald und Siehr*, 1936 *Uraizee und Narsimhan*, 1990)

2.2. Die Zerschäumung

Die Zerschäumung zählt definitorisch zu der Gruppe der adsorptiven Gasblasentrennmethode. Nach *Lemlich* (1968) können die adsorptiven Gasblasentrennmethode in die Schaumseparation, also schaumbildende Verfahren und die nichtschäumende adsorptive Blasenseparation unterteilt werden. Ein Überblick über die adsorptiven Gasblasentrennmethode ist in Abbildung 12 dargestellt.

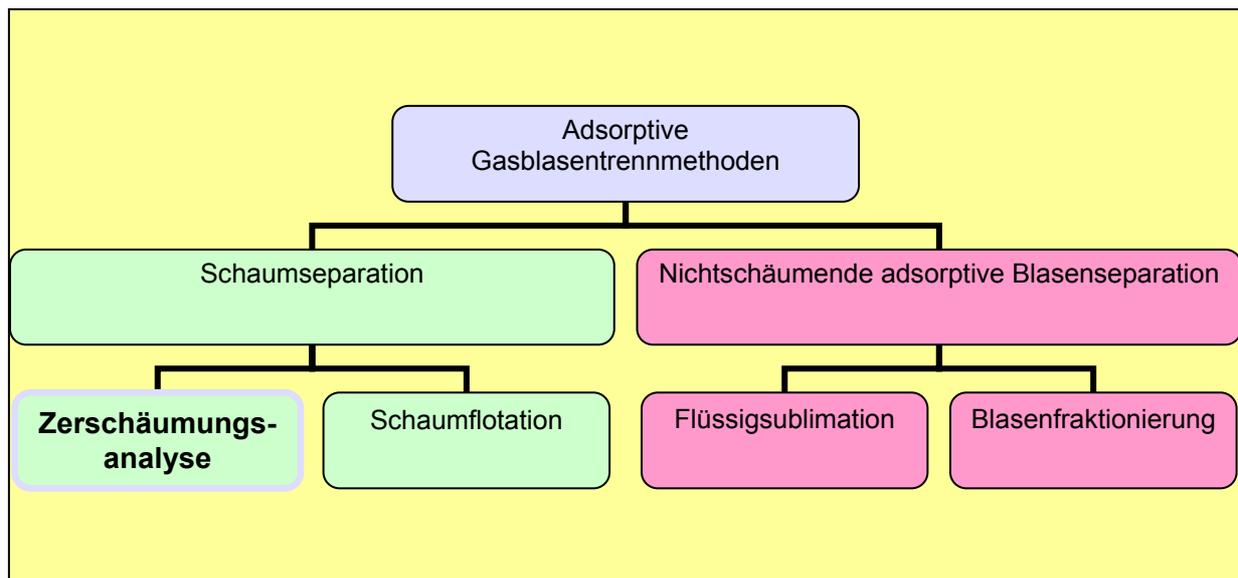


Abb.12.: Schematische Klassifikation der adsorptiven Gasblasentrennmethode (*Lemlich*, 1972)

Die nichtschäumende Blasenseparation hat wiederum zwei Untergruppen. Eine dieser Untergruppen ist die Blasenfraktionierung. Bei der Blasenfraktionierung wird das anzureichernde Material an einer Gasblase adsorbiert und steigt mit dieser in einer Flüssigkeitssäule auf. Am Ende der Säule verlässt die Gasblase die Flüssigkeit und die anzureichernde Substanz wird im oberen Bereich der Säule aufkonzentriert. Der resultierende Konzentrationsgradient zwischen Säulenboden und Säulenende stellt die Separation dar. (*Dorman* und *Lemlich*, 1965) Die andere Untergruppe der nichtschäumenden adsorptiven Blasenseparation ist die Flüssigsublimation. Die Flüssigsublimation beruht auf demselben Prinzip wie die Blasenfraktionierung. Abweichend von der Blasenfraktionierung ist das Säulenende bei der Flüssigsublimation mit einem Lösungsmittel versehen, in dem sich die von der Gasblase transportierten Substanzen anreichern. Das Lösungsmittel ist mit der wässrigen Phase nicht mischbar. (*Sebba*, 1962)

Die Schaumseparation, als schaubildende Methode, hat ebenfalls zwei Untergruppen, die Zerschäumung und die Schaumflotation. Die Schaumflotation wird vereinfacht auch Flotation genannt. (Gaudin, 1957) Sie dient der Abtrennung von partikulärem Material durch dessen Anreicherung im Schaum. Die Flotation hat wiederum viele Untergruppen, wie die Erzflotation (Gaudin, 1957), die Makroflotation zur Abtrennung makroskopischer Partikel, die Mikroflotation zur Anreicherung von mikroskopischen Partikeln, wie Mikroorganismen (Dognon und Dumontet, 1941), die Präzipitatflotation, bei der ein Präzipitat gebildet wird, welches dann abgeschäumt werden kann (Baarson und Ray, 1963), die Ionenflotation bzw. Molekülflotation, bei der nichttensidische Ionen bzw. Moleküle mittels unlöslichen Kollektor in den Schaum transportiert werden (Sebba, 1962) und die Kolloidflotation, bei der das abzuschäumende Material an kolloidale Partikel adsorbiert und mit diesen in die Schaumphase eintritt. Anders als die Flotation dient die Zerschäumung zur Anreicherung von gelöstem Material durch Adsorption an der Gasblase und anschließende Schaumbildung.

Bei den Methoden der Schaumseparation wird der Schaum generell durch Einleiten eines Gases in eine Flüssigkeit generiert, die oberflächenaktive Substanzen enthält. Oberflächenaktive Verbindungen weisen sowohl ein hydrophilen, wasserlöslichen als auch einen hydrophoben, wasserunlöslichen Teil auf und lagern sich aus diesem Grund bevorzugt an Grenzflächen an. Dabei ragt der hydrophile Teil in die wässrige Phase, während der hydrophobe Teil in die Grenzfläche eingelagert wird. (Manegold, 1953)

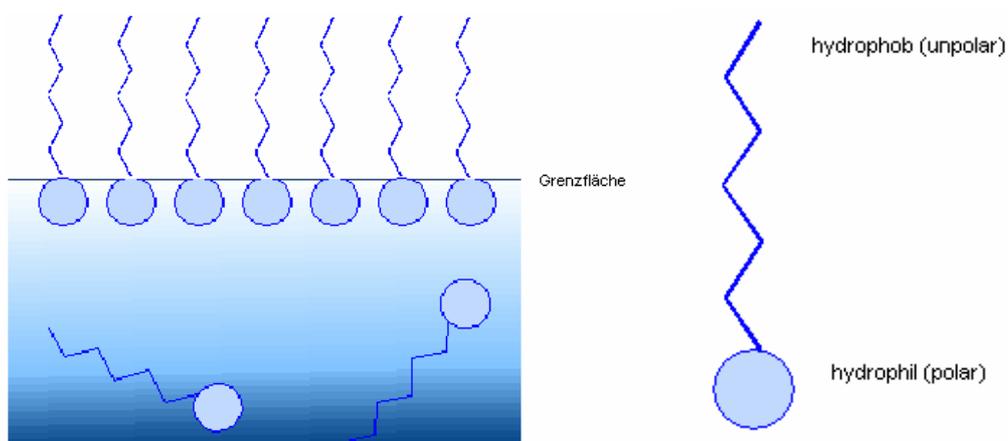


Abb.13: Verhalten oberflächenaktiver Verbindungen an der Grenzfläche

Steigt eine Gasblase in einer Flüssigkeit auf, wie es bei der Zerschäumung der Fall ist, lagern sich die darin gelösten oberflächenaktiven Verbindungen mit dem hydrophoben Teil an der Gasblase an, die als Grenzfläche fungiert, während der hydrophile Teil der wässrigen Phase zugewendet ist. (*Lemlich, 1972*) Dadurch wird die Oberflächenspannung herabgesetzt und die Entstehung von Schäumen ermöglicht. (*Maas, 1973*)

Schäume sind disperse Systeme aus Gas und Flüssigkeit bzw. Gas und Feststoff, wobei der Anteil der Gasphase überwiegt. (*Belitz et al., 2001; Mindt und Ottow, 2004*) Allerdings muss der Begriff Schaum nach *Manegold (1953)* grundsätzlich unterschieden werden in Kugelschaum und Polyederschaum. Während beim Kugelschaum eine Häufung selbstständiger Kugelblasen auftritt, die nicht unbedingt von oberflächenaktiven Verbindungen umgeben sein müssen, handelt es sich beim Polyederschaum um einen Verband polyedrisch geformter Gasblasen, die ihre Selbstständigkeit verloren haben und von einem Film oberflächenaktiver Verbindungen umgeben sind. (*Manegold, 1953*) Allerdings können beide Schaumformen auch nebeneinander vorliegen, wie es beispielsweise bei proteinstabilisierten Schäumen in einer Zerschäumungssäule der Fall ist. Der Kugelschaum, der in diesem Fall von oberflächenaktiven Substanzen umgeben, aber mit einem großen Anteil an Flüssigkeit beladen ist, geht in einen Polyederschaum über, indem die flüssige Phase zwischen den Grenzflächen verdrängt wird, bis diese nur noch durch Flüssigkeitlamellen voneinander getrennt sind. Eine Lamelle besteht aus einer Flüssigkeitsschicht von 10 nm bis 1 µm Dicke und wird beidseitig von einem Film oberflächenaktiver Substanzen begrenzt. Im Gleichgewichtszustand ragen drei Lamellen eines Polyederschaums so zusammen, dass sich ein Flächenwinkel von 120° ergibt. Die verbleibende interlamellare Flüssigkeitsschicht bildet ein zusammenhängendes System an Dreieckskanäle aus, die als Gibbs-Kanäle (*Bartsch, 1926*) oder Plateau Ränder (*Prins, 1988, Grieves, 1982*) bezeichnet werden.

Die Dreieckskanäle wurden von Plateau und Gibbs im Zusammenhang mit der Schaumdrainage untersucht (*Adamson, 1990*). Unter Schaumdrainage wird der Rückfluss der Flüssigkeit aus dem Schaum bezeichnet. Die Drainage wird auf zwei Arten von der Schwerkraft induziert. Einerseits wirkt die Schwerkraft direkt auf den Flüssigkeitsfilm, sofern dieser nicht horizontal verläuft, andererseits durch die Saugwirkung der Plateau Ränder.

Zwei weitere Mechanismen tragen zur Drainage bei, zum einen die Viskosität der Flüssigkeit, da die Schaumblasen mit sinkender Viskosität zunehmend kollabieren (*Kitchener und Cooper, 1959*), zum anderen der Austausch von Filmmaterial, der durch unterschiedliche Dicken der Plateau Ränder hervorgerufen wird. (*Prins, 1988*)

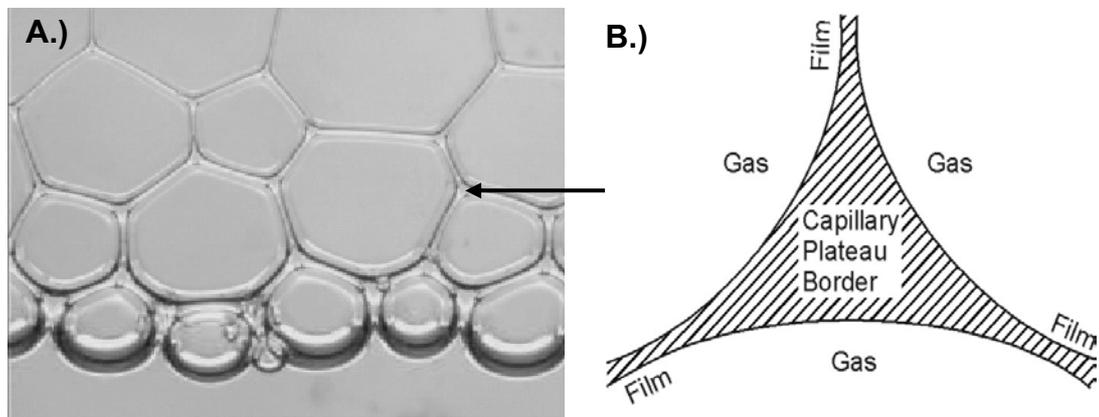


Abb.14: A.) Übergang vom Kugelschaum in den Polyederschaum (*Mindt und Ottow, 2004*) und B.) schematische Darstellung der Plateau Ränder (*Grieves, 1982*)

Die Drainage führt somit durch Rückfluss von abgereicherter Flüssigkeit zu einer Anreicherung von oberflächenaktiven Substanzen im Schaum. (*Bhattacharjee et al., 2001*) Neben der Drainage treten weitere Phänomene auf, die eine Anreicherung oberflächenaktiver Substanzen im Schaum begünstigen, wie die Koaleszenz oder das Kollabieren des Schaums beispielsweise durch mechanischen Stress. (*Grieves, 1982*). Unter Koaleszenz versteht man den Zusammenschluss zweier benachbarter Gasblasen zu einer größeren Blase. Es gibt zwei Formen der Koaleszenz. Eine Form ist die Diffusion von Gas aus kleineren Blasen in größere, da kleinere Blasen aufgrund der Oberflächenspannung einen höheren Innendruck aufweisen. Dadurch nimmt das Volumen der größeren Blase stets zu, während die kleinere zusammenschrumpft, bis sie komplett verschwindet. Die zweite Form der Koaleszenz ist ein spontanes Abreißen des Flüssigkeitsfilms zwischen zwei Gasblasen. (*Lemlich, 1968*) Die Oberfläche der resultierenden großen Blase ist bei beiden Formen der Koaleszenz im Verhältnis zum Volumen kleiner, was zu einer Aufkonzentrierung des oberflächenaktiven Materials an der Blasenwand führt, während überschüssige, verarmte Flüssigkeit abfließt. Dieses Phänomen wird in einer Zerschäumungsapparatur ausgenutzt.

2.2.1. Die Zerschäumungsapparatur

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Modelle von Zerschäumungsapparaturen publiziert. (u.a. *Ostwald und Siehr*, 1936; *Schütz*, 1937; *Gray und Stone*, 1940; *Davis, et al*, 1949; *Walling et al.*, 1953; *Shinoda und Mashio*, 1960; *Ahmad*, 1975; *Brown et al.*, 1990; *Darton et al.*, 2004). Einige dieser Zerschäumungsapparaturen sind in Abbildung 15 dargestellt.

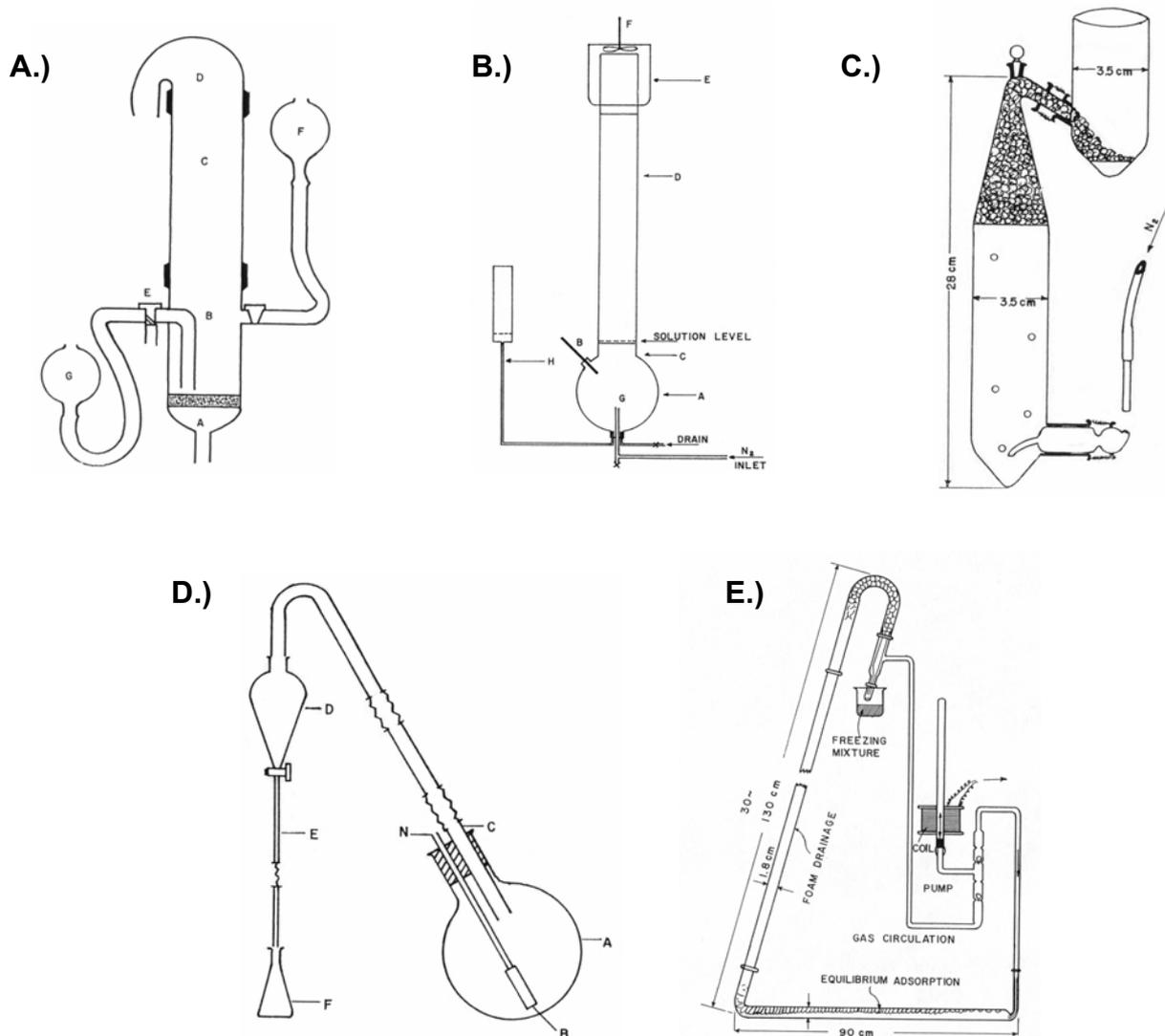


Abb.15: Zerschäumungsapparaturen. A.) Apparatur nach *Ostwald und Siehr* (1967) (A: Glasfilterplatte, B: Flüssigkeitsstand, C: Schaumsäule, D: Überlauf, E: Dreiwegeventil, F: Vorratstank, G: Auffanggefäß für die abfließende Flüssigkeit; B.) Apparatur nach *Walling et al.* (1953) (A: Flüssigkeitsvorlage, B: Thermometer, D: Zerschäumungssäule, E und F: Schaumauffanggefäß und -zerstörer, G-I: Gaszufuhr) C.) Apparatur nach *Schütz* (1937); D.) Apparatur nach *Gray und Stone* (1940) (A: 5l Kolben, B: Gasdispenser, C: Glassäule mit einem Neigungswinkel von 60°, D: Schaumzerstörung durch Ethylether, E: Glasschlauch, F: Erlenmeyerkolben); E.) Apparatur nach *Shinoda und Mashio* (1961)

Grundsätzlich werden zwei Arten von Zerschäumungsapparaturen unterschieden, die Batch- und die kontinuierliche Zerschäumungsanlage.

Die Batch-Zerschäumungsanlage besteht in der Regel aus einem Glasrohr, welches am unteren Ende mit einem Flüssigkeitsreservoir versehen ist. Das Flüssigkeitsreservoir enthält eine Lösung mit oberflächenaktiven Substanzen, die als Ausgangslösung bezeichnet wird. In das Flüssigkeitsreservoir wird über eine Glasfilterkerze, Verteilerplatte oder ein Verteilerrohr Gas eingeleitet, wodurch die Schäumung induziert wird. (*Lima und Valey, 1994*) Der Schaum steigt entlang des Glasrohres auf, wobei es zu Drainageeffekten und Anreicherungen kommt. Am Rohrende wird der angereicherte Schaum aufgefangen und mittels Schaumzerstörer rückverflüssigt. (*Bhattacharjee et al., 2001; Cannon und Lemlich, 1972; Du, et al., 2002; Ko et al.1998; Varley et al., 1996*) Der rückverflüssigte Schaum wurde von *Ostwald et al. (1941)* als Spumat bezeichnet.

Die Schaumzerstörung kann chemisch durch Zugabe von Anti-Schaummittel wie beispielsweise Silikon oder mittels sog. Schaumzerstörer erfolgen. (*Grieves, 1982*) Es wurden verschiedene Formen von Schaumzerstörern publiziert. *Lemlich (1961)* erzielte eine Verflüssigung des Schaums durch ein trichterförmiges Schaumauffanggefäß, in dem ein Drahtkorb rotierte. Dadurch wurde der Schaum zentrifugiert und verflüssigt. *Banerjee et al. (1993)* verwendeten eine Glassäule, die ein Glasperlenbett enthielt. Mit Hilfe einer Pumpe wurde der Schaum durch das Glasperlenbett gesogen und dabei verflüssigt. Das Spumat wurde in einer Saugflasche aufgefangen. *Lucema et al. (1996)* konstruierten einen Schaumzerstörer, der die Rückverflüssigung durch ein Rührpadel erzielt.

Die Zerschäumung in einer Batch-Apparatur wird vorwiegend zur Abtrennung von Substanzen aus geringen Flüssigkeitsvolumina und für die Untersuchung des Verlaufs der Anreicherung verwendet. (*Karger et al. 1968*). Während die Batch-Zerschäumungsapparatur recht einfach gestaltet ist, zeigt sich die kontinuierliche Zerschäumungsapparatur deutlich aufwendiger. Die kontinuierliche Zerschäumungsanlage funktioniert prinzipiell wie die Batch-Zerschäumungsanlage. Zusätzlich wird jedoch ein Vorratstank, der mit der Zerschäumungssäule über einen Flüssigkeitszulauf verbunden ist, installiert. Dadurch ist es möglich kontinuierlich Ausgangslösung zuzuführen.

Die Ausgangslösung kann entlang der Zerschäumungssäule eingespeist werden. Die abgereicherte Ausgangslösung fließt durch den Ablauf ab. (*Ahmad*, 1975; *Tharapiwattananon et al.*, 1996; *Uraizee und Narsimhan*, 1996)

Neben der Batch- und der kontinuierlichen Zerschäumung bestehen noch Erweiterungsformen, die an beide Verfahren adaptiert werden können.

Je nach apparativem Aufbau unterscheidet man diese Erweiterungsformen in Zerschäumungsanlagen mit Rückeinspeisung sowie Multistage- und Kolonnen-Zerschäumungsanlagen. Die Zerschäumungsapparatur mit Rückeinspeisung wurde von *Ostwald et al.* (1941) auch als Kreislaufzerschäumung bezeichnet. Sie weist gegenüber der Zerschäumungsapparatur ohne Rückeinspeisung eine Erweiterung auf. Diese Erweiterung besteht in der Rückeinspeisung des Spumates in die Zerschäumungsapparatur. Die Einspeisung ist an jeder Stelle der Säule möglich, d.h. sowohl in den Schaum als auch in die Ausgangslösung. Die Rückeinspeisung des Spumates bewirkt eine zusätzliche Aufkonzentrierung, da sich die oberflächenaktiven Verbindungen des bereits hoch aufkonzentrierte Spumates erneut an den Gasblasen anlagern. (*Ostwald et al.*, 1941; *Wong et al.*, 2001)

Die Apparatur zur Kolonnenzerschäumung besteht nach *Ostwald und Mischke* (1940) aus einer Aneinanderreihung von Zerschäumungsapparaturen. Dabei dient jeweils das Spumat der vorangegangenen Zerschäumungsapparatur als Ausgangslösung für die darauf folgende. (*Ostwald und Mischke*, 1940; *Leonard und Blacyki*, 1978)

Die Multistage-Zerschäumungsanlage ist eine Erweiterung der Kolonnenzerschäumung. Die Multistage-Zerschäumungsanlage nach *Darton et al.* (2004) wird in einem System mit mehreren Böden durchgeführt. Jeder Boden weist dabei eine Glasfilterkerze auf und stellt somit eine eigene Zerschäumungseinheit dar. Der Schaum wird durch ein Paddel zerstört und auf der nächsten Ebene erneut zerschäumt.

In Abbildung 16 und 17 sind zusammenfassend die Prinzipien der unterschiedlichen Zerschäumungsapparaturen dargestellt.

Neben der Wahl der Zerschäumungsapparatur nehmen physikalisch-chemische und technische Parameter entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der Zerschäumung. Diese Parameter werden im Folgenden als Zerschäumungsparameter bezeichnet.

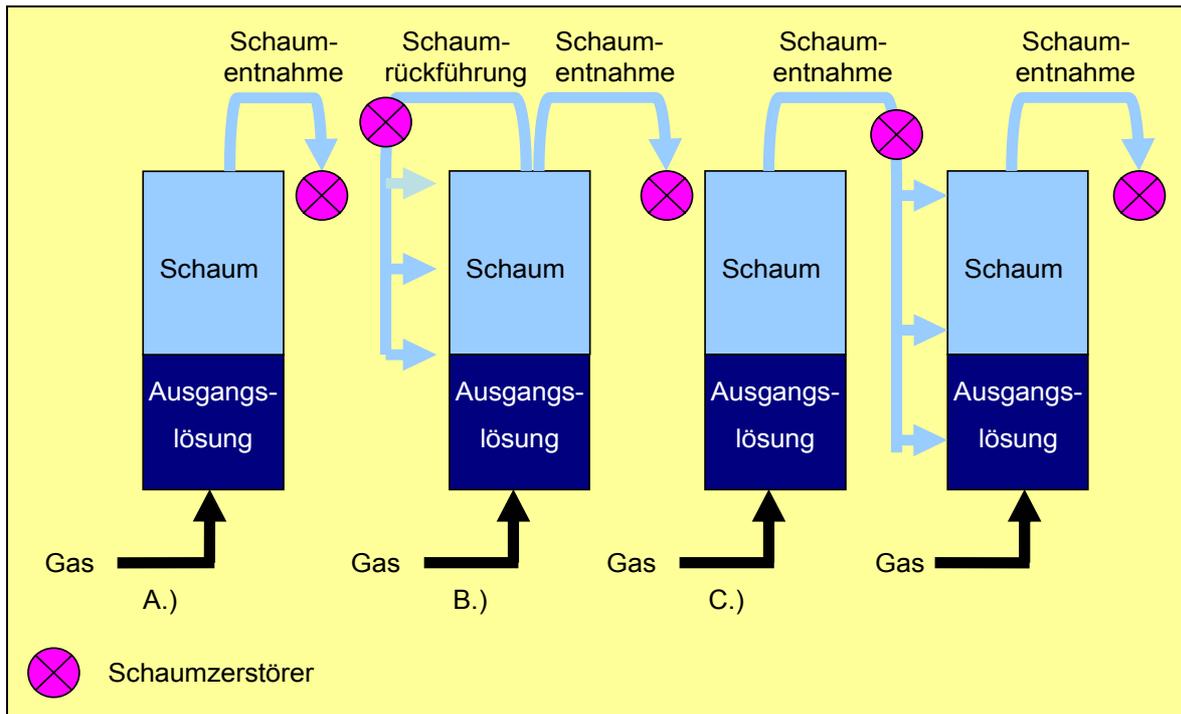


Abb.16: Prinzip der Zerschäumungsapparaturen im Batch-Verfahren. A.) Batch-Zerschäumung; B.) Kreislaufzerschäumung; C.) Kolonnenzerschäumung

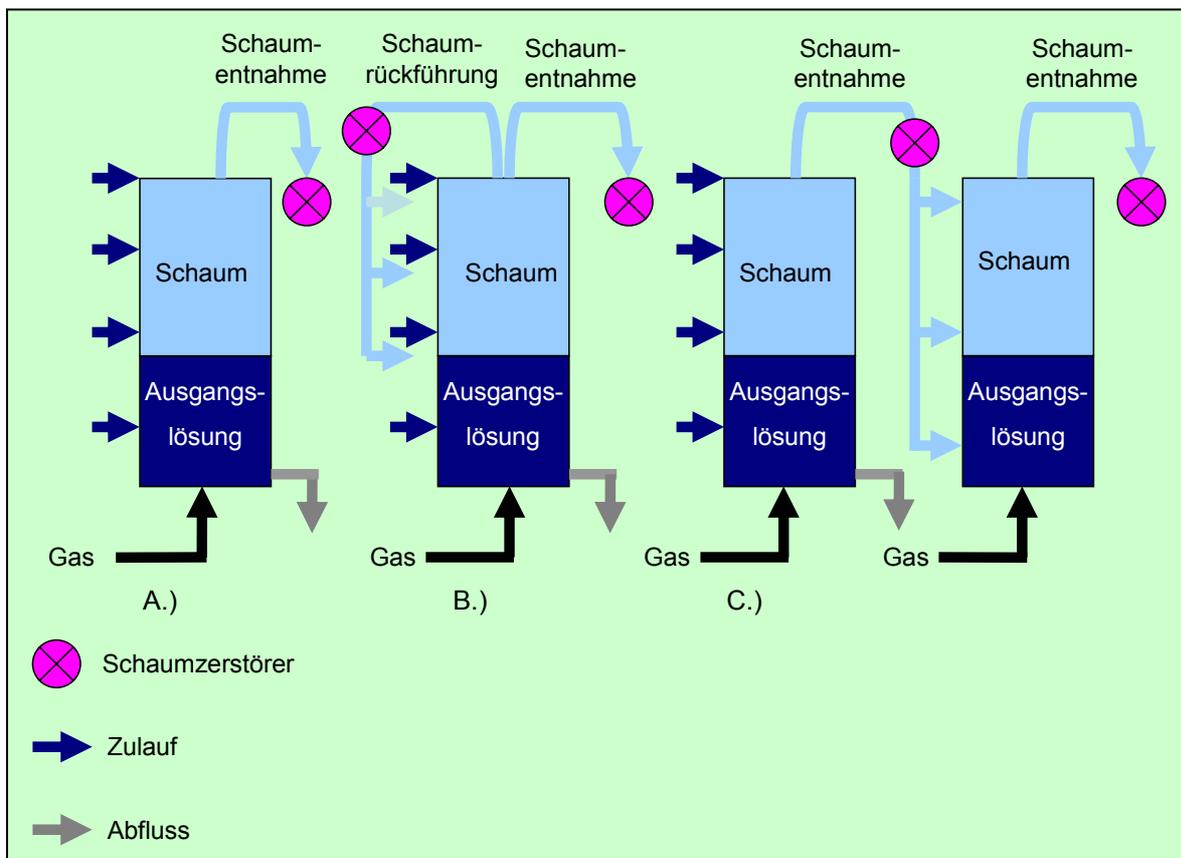


Abb.17: Prinzip der Zerschäumungsapparaturen im kontinuierlichen Verfahren. A.) Kontinuierliche Zerschäumung; B.) Kontinuierliche Kreislaufzerschäumung; C.) Kontinuierliche Kolonnenzerschäumung

2.2.2. Die Zerschäumungsparameter

Zerschäumungsparameter sind Variablen im Zerschäumungsprozess. Um den Zerschäumungsprozess reproduzierbar und effizient zu gestalten, müssen diese Parameter optimiert und kontrolliert werden. Die Effizienz des Zerschäumungsprozesses drückt sich nach *Brown et al. (1999)* in der Wiederfindung und Anreicherung der Proteine im Schaum aus. Während die Wiederfindung das absolute Verhältnis zwischen den anzureichernden Substanzen im Schaum und in der Ausgangslösung bezeichnet, gibt die Anreicherung Auskunft über die Konzentrationsverhältnisse zwischen Schaum und Ausgangslösung. Diese Verhältnisse sind auch auf Enzymaktivitäten übertragbar.

Grundsätzlich können die Zerschäumungsparameter in technische und physikalisch-chemische Parameter unterteilt werden. Während die technischen Parameter vorwiegend die Säulendimensionen und die Gaszufuhr betreffen, richten sich die physikalisch-chemischen Parameter vermehrt nach der anzureichernden Substanz und deren Lösungsmittel. Die physikalisch-chemischen Parameter sind der pH-Wert, die Ionenstärke, die Konzentration der Ausgangslösung und die Beschaffenheit des anzureichernden Proteins sowie gegebenen Falls vorhandener Additive.

- **pH-Wert:** In der Literatur wurde mehrfach eine Korrelation zwischen dem pH-Wert und der Effizienz der Zerschäumung aufgestellt. *Liu et al. (1995)* beschrieben, dass die Effizienz in der Nähe des isoelektrischen Punktes am höchsten ist. *Ahmad (1975)* führte dies seinerseits auf die geringe Löslichkeit und verringerte Nettoladung der Proteine am isoelektrischen Punkt zurück. Nach *Sarkar et al. (1987)* verbessern die isoelektrischen Bedingungen die Adsorption der Proteine an der Gasblase aufgrund der verringerten Löslichkeit der Proteine. *Brown et al. (1999)* führten weiterhin die geringe Oberflächenspannung am isoelektrischen Punkt als Begründung an. *Gschwendtner (2000)* hingegen beschrieb eine verringerte Effizienz der Zerschäumung am isoelektrischen Punkt und führte dies auf die Fähigkeit der Proteine zurück, sich am isoelektrischen Punkt aufgrund ihrer verringerten Abstoßung zusammenzulagern. Dadurch nimmt die Proteingröße zu und eine Einlagerung in die Grenzschicht ist erschwert.

- **Ionenstärke:** *Brown et al.* (1990) stellten einen Zusammenhang zwischen der Ionenstärke und der Proteinanreicherung und Wiederfindung im Schaum fest. Als Modellprotein verwendeten sie Rinderserumalbumin. Mit zunehmender Ionenstärke nahm die Anreicherung des Rinderserumalbumins im Schaum ab, während die Wiederfindung zunahm. *Clarkson et al.* (2000) betrachteten die Ionenstärke der Ausgangslösung vor allem im Zusammenhang mit Denaturierungserscheinungen an Proteinen, speziell Pepsin. Das Pepsin wurde nach Optimierung der Ionenstärke vermindert im Schaum denaturiert.
- **Proteinkonzentration:** Die Proteinkonzentration in der Ausgangslösung sollte für die Zerschäumung im Allgemeinen so gering sein, dass eine Schaumbildung bzw. –stabilisierung gerade noch ermöglicht wird. Je mehr Platz den Proteinen an der Grenzfläche zur Verfügung steht, desto besser wird deren Auseinanderfaltung ermöglicht, die zur Schaumbildung nötig ist. (*Britten und Lavoie, 1992*) *Maas* (1973) untersuchte zwar nicht das Schaumbildungsvermögen von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, berichtet aber allgemein von Konzentrationen an oberflächenaktiven Substanzen von $10^{-3} - 10^{-7}$ M zur optimalen Schaumbildung. Bei höheren Konzentrationen an oberflächenaktiven Substanzen bilden sich Aggregate (Mizellen) mit nach außen gerichteten hydrophilen Gruppen. Bei größerer Verdünnung hingegen enthält die Grenzschicht nur wenig oberflächenaktive Moleküle; die Oberflächenspannung weicht kaum von der des reinen Lösungsmittels ab.
- **Proteinbeschaffenheit:** Die Eignung von Proteinen zur Schaumbildung ist unterschiedlich. Nach *Dickinson* (1989) wird die Fähigkeit eines Proteins zur Schaumbildung als Schaumkapazität bezeichnet. Die Schaumkapazität ist umso größer, je schneller das Protein zur Grenzfläche diffundiert und je leichter es sich dort auffaltet (Oberflächendenaturierung). Die Oberflächendenaturierung setzt im Allgemeinen zusätzliche Aminosäureseitenketten frei, die intermolekulare Wechselwirkungen eingehen und die Schaumbildung und –Stabilität verbessern können. Die Schaumstabilität hingegen wird nach *Belitz et al.* (2001) durch die Fähigkeit des Proteins bedingt starke, flexible, kohäsive Filme zu bilden, wodurch die Gaspermeabilität und die Koaleszenz reduziert wird. Die Fähigkeit zur Schaumbildung und -stabilisierung hängt somit vom Molekulargewicht, von der Oberflächenhydrophobizität und der Stabilität der Konformation ab. (*Belitz, 2001; Dickinson, 1989; Clarkson et al., 1999*)

- **Additive:** Additive werden in schauminduzierende und nicht schäumende Zusätze unterschieden. Schauminduzierende Additive werden in erster Linie zugesetzt, wenn die Schaumkapazität des Proteins nicht ausreicht. Je nach Ladung oder Hydrophobizität des Proteins werden anionische, kationische, amphotere oder nichtionische Tenside verwendet. Nichtschäumende Zusätze sind in erster Linie Zucker und Salze. Während Zucker die Zerschäumungseffizienz im Allgemeinen negativ beeinflussen (*Ahmad und Friburg, 1972; Gschwendtner, 2000*), werden Salzen von verschiedenen Autoren positive Einflüsse auf die Zerschäumung von Proteinen zugesprochen. *Peters (1952)* beobachtete ein verstärktes Schaumvermögen in Gegenwart von Salzen. *Velissariou und Lyddiatt (1990)* beobachteten nach Salzzugabe eine verbesserte Schaumstabilität bei heterogenen Proteinlösungen und führten dies auf die Verminderung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und stärkere Ausbildung der Hydrophobizität der Proteine zurück. *Liu et al. (1995)* beschrieben eine verstärkte Proteinanreicherung im Schaum durch Zugabe von NaCl. Sie führten dieses auf die Abhängigkeit zwischen Proteinlöslichkeit und Elektrolytkonzentration zurück. Des Weiteren vermindert NaCl die Starrheit des Proteins, wodurch die Auffaltung und somit die Schaumkapazität des Proteins verbessert wird.

Die technischen Parameter beziehen sich in erster Linie auf die Säulengestaltung und die Gaszufuhr. Die Säulengestaltung ermöglicht die Variation der Säulendimensionen bezüglich des Durchmessers, der Länge und des Füllstands, die Positionierung volumenvergrößernder Einbauten und die Temperierbarkeit der Säule. Die Gaszufuhr kann durch Variation der Gasflussrate, der Gasart und der Gasblasengröße beeinflusst werden.

- **Säulendurchmesser:** Während *Viehweg und Schügerl (1983)* eine gesteigerte Effizienz der Zerschäumung bei größerem Säulendurchmesser beobachteten, beschrieben *Liu et al. (1995)*, dass durch Reduzierung des Säulendurchmessers von 35 mm auf 8 mm die Zerschäumungseffizienz gesteigert wird. Sie führten dies auf eine gesteigerte Drainage bei kleinerem Durchmesser zurück. Die Drainage ist verstärkt, da die ablaufende Flüssigkeit weniger quervernetzte Kanäle durchlaufen muss, ein höherer Druck auf die Gasblasen wirkt und der Kontakt zwischen Schaumphase und abwärts strömender Flüssigkeit verstärkt ist.

- **Säulenlänge:** Längere Säulen begünstigen die Anreicherung durch Verbesserung der Drainage bzw. Verlängerung der Drainagezeit. Die Säulenlänge wird dadurch begrenzt, dass der Schaum von einer bestimmten Höhe an instabil wird und bereits vor Erreichen des Säulenendes zerfällt. (*Dorman und Lemlich, 1965; Liu et al., 1995*)
- **Füllstand:** Bei konstanter Schaumhöhe und Flussrate bewirkt ein höherer Füllstand eine längere Kontaktzeit der Gasblasen mit der Ausgangslösung, was die Anreicherung an der Gasblase und somit die Effizienz der Zerschäumung steigert. (*Ahmad, 1975; Bhattacharjee et al., 1997; Uraizee und Narsimhan, 1995*)
- **Volumenvergrößernde Einbauten:** Die Positionierung volumenvergrößernder Einbauten bedingt zeitweise die Ausbildung eines größeren Säulenquerschnitts. Durch die mechanische Beanspruchung des Schaums durch Erweiterung und anschließende Verengung der Schaumsäule werden Koaleszenz und Drainage verstärkt und die Effizienz der Zerschäumung gesteigert. Es wurden verschiedene Formen von volumenvergrößernden Einbauten publiziert. *Schonfeld und Kibbey (1967)* verwendeten zylindrische Einsätze im oberen Säulenteil der Zerschäumungssäule. *Banerjee et al. (1993)* gestalteten die gesamte Säule aus übereinander gesetzten trichterförmigen Teilstücken.
- **Temperierbarkeit der Zerschäumungssäule:** Der Einfluss der Temperatur auf die Effizienz der Zerschäumung hat bisher in der Literatur nur wenig Aufmerksamkeit gefunden. Lediglich *Liu et al. (1995)* berichteten über geringfügige Steigerung der Anreicherung durch Erhöhung der Temperaturen von 20°C auf 50°C bei der Zerschäumung von Rinderserumalbumin.
- **Gasflussrate:** Niedrigere Flussraten ergeben eine höhere Anreicherung der oberflächenaktiven Substanzen im Schaum, da einerseits weniger Ausgangslösung in den Schaum transportiert wird und andererseits die Verweilzeit des Schaums in der Säule und damit die Drainagezeit verlängert ist. Die minimale Gasflussrate ist erreicht, wenn gerade noch eine Schaumbildung möglich ist. Unterhalb dieser Grenze erreichen die Gasblasen zu selten die Oberfläche und die Ausbildung eines stabilen Schaums ist nicht mehr möglich. (*Thomas und Winkler, 1977*).

Im Gegensatz zu niedrigen Flussraten führen hohe Flussraten zur Ausbildung einer größeren Anzahl an Gasblasen, wodurch mehr Flüssigkeit mitgerissen und die Verweilzeit des Schaums in der Säule verkürzt wird. Dadurch ergeben sich in der Regel geringere Anreicherungen von oberflächenaktiven Substanzen, die Wiederfindung im Schaum hingegen ist bei höherer Gasflussrate deutlich verbessert. (*Brown et al.*, 1999; *Noble et al.*, 1998, *Ahmad*, 1975)

- **Gasart:** Bei der Wahl der Gasart spielen neben den Kosten und der Umweltverträglichkeit auch Faktoren der Schaumbildung eine wichtige Rolle. Während Stickstoff die Eigenschaft zugesprochen wird, nasse Schäume zu bilden (*Thomas und Winkler*, 1977) sollen Kohlendioxid und Luft nach *Thomas und Winkler* (1977) sowie *Montero et al.* (1993) ungünstig für die Zerschäumung sein, da CO₂ durch Bildung von Kohlensäure den pH- Wert verändert und beide Gase einen instabilen Schaum liefern. (*Gschwendtner*, 2000)
- **Gasblasengröße:** Die Gasblasengröße wird durch die Porengröße der Glasfilterkerze, der Verteilerplatte oder den Durchmesser des Verteilerrohrs bestimmt. Bei kleineren Gasblasen ist die Gesamtoberfläche größer und wegen ihres langsameren Aufsteigens die Kontaktzeit zur Ausgangslösung länger. Dagegen wird bei größeren Gasblasen die Bildung von Kollabats und damit ebenfalls die Anreicherung gefördert. (*Brown et al.*, 1990; *Tharapiwattananon et al.*, 1996; *Uraizee und Narsimhan*, 1996; *Crofcheck und Gillette*, 2003) *Brown et al.* (1990), *Tharapiwattananon et al.* (1996) sowie *Crofcheck und Gillette* (2003) beschrieben bei der Zerschäumung von β -Casein, Rinderserumalbumin und der Aufreinigung von Abwässern mittels Zerschäumung eine verbesserte Anreicherung und eine sinkende Wiederfindung mit zunehmender Gasblasengröße. *Uraizee und Narsimhan* (1996) beobachteten ebenfalls eine verbesserte Anreicherung bei größerem Gasblasendurchmesser. *Maas* (1973) schlug eine Porosität von 16-100 μm (P 2 - P 3) vor. Er wählte diese Porengröße als einen Kompromiss zwischen steigender Adsorptionsfläche mit sinkendem Blasendurchmesser einerseits und steigendem Druckabfall andererseits.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders ausgewiesen, in analysenreiner Qualität verwendet.

- 1,3-Diamino-2-Hydroxypropan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (DPTA); Aldrich
- 2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure] (ABTS); Roche
- Ammoniumeisen(III)-Sulfat Dodecahydrat; Fluka
- D(+)-Glucose; Fluka
- Diethylether; Roth
- Eisen(III)-Chlorid Hexahydrat; Merck
- Ethanol; Roth
- Ethylendiamintetraessigsäure; Fluka
- Hefeextrakt für die Mikrobiologie; Merck
- Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB); Fluka
- Iminodiessigsäure, Fluka
- Kaliumdihydrogenphosphat; Merck
- Kupfer(II)-Chlorid, Merck
- Kupfer(II)-Sulfat Pentahydrat; Merck
- L-Asparagin Monohydrat; Fluka
- Magnesiumsulfat wasserfrei; Merck
- Mangan(II)-Sulfat Monohydrat; Merck
- Methylcellulose; Aldrich
- N-(2-Acetamido)-iminodiessigsäure (β -ADA); Merck
- Natriumhydroxyd; Roth
- Natriumtartrat; Fluka
- Salzsäure 37 %; Merck
- Sodiumdodecylsulfat (SDS); Sigma
- Zinksulfat Heptahydrat; Merck

3.1.2. Enzyme

- Laccase (E.C. 1.10.3.2); ASA-Spezialenzyme; Bestell-Nr.: 2020
- Meerrettich-Peroxidase (E.C. 1.11.1.7); Sigma Bestell-Nr.: P 8375

3.1.3. Geräte und Hilfsmittel

- Analysen- und oberschalige Waage, Sartorius
- Autoklave; Wolf
- Bechergläser 10 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml, 3000 ml; Simax
- Filterhalter 0,45 µm, PP, 25 mm; CS-Chromatographie Service GmbH
- Glasfilterkerze P2 und P3; Robu-Glas
- Glasflaschen 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml; Schott
- Halbmikro-Küvetten; Plastibrand PMMA
- Heiz- bzw. Rührplatte; Heidolph
- Kryostat; Haake L
- Messkolben 10 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml; Brand
- Messpipetten 5 ml; Hirschmann
- NMR; Bruker AC 250
- pH-Elektrode; VWR SenTix 21
- pH-Meter; Schott CG 810
- Photometer; Cecil CE 1021
- Pipetten 10-100 µl; 100-1000 µl; Eppendorf
- Rückflusskühler; Schott
- Rührfischchen; VWR
- Saugflasche mit Nutsche, Schott
- Schütteltrichter; Schott
- Tropftrichter; Schott
- Vakuum-Rotationsverdampfer; OB 2001; VV 2011
- Vollpipetten 10 ml; Hirschmann
- Wasserstrahlpumpe; Schott
- Zerschäumungsapparatur
- Zweihalskolben; Brand

3.2. Methoden

3.2.1. Die Präparation des SNL-Nährmediums

Das SNL-Nährmedium nach *Sprecher* (1959) wurde hergestellt, indem 30 g Glucose-Monohydrat, 4,5 g L-Asparagin-Monohydrat, 3,0 g Hefeextrakt, 1,5 g Kaliumhydrogenphosphat und 0,5 g Mangansulfat in einem Liter demin. Wasser gelöst wurden. Die Lösung wurde mit 1 ml Spurenelementlösung versetzt. Die Spurenelementlösung bestand aus 0,08 g/l Eisen(III)-Chlorid Hexahydrat, 0,09 g/l Zinksulfat Heptahydrat, 0,03 g/l Mangansulfat Monohydrat, 0,005 g/l Kupfer(II)-Sulfat Heptahydrat und 0,4 g/l EDTA. Die Spurenelementlösung wurde mit 1 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt. Das Nährmedium wurde für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

3.2.2. Die konventionelle Zerschäumung

3.2.2.1. Die Batch-Zerschäumung

Die Standardapparatur für die Batch-Zerschäumung bestand aus einer Glassäule, die am unteren Ende mit einer Glasfilterkerze versehen war. Durch die Glasfilterkerze wurde Gas in die Ausgangslösung eingeleitet. Die Ausgangslösung enthielt das anzureichernde Enzym sowie ein Tensid. Der resultierende Schaum wurde entweder mittels zweihalsigem 250 ml Rundkolben (Abb.18A) oder mittels U-Rohr (Abb.18B) aus der Säule gewonnen. Der gewonnene Schaum wurde zwecks Rückverflüssigung mit 10 ml einer 0,5 %-igen SDS- Lösung versetzt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde zur Gewinnung und Rückverflüssigung des Schaums ein kontinuierlicher Schaumzerstörer verwendet. (Abb.18C)

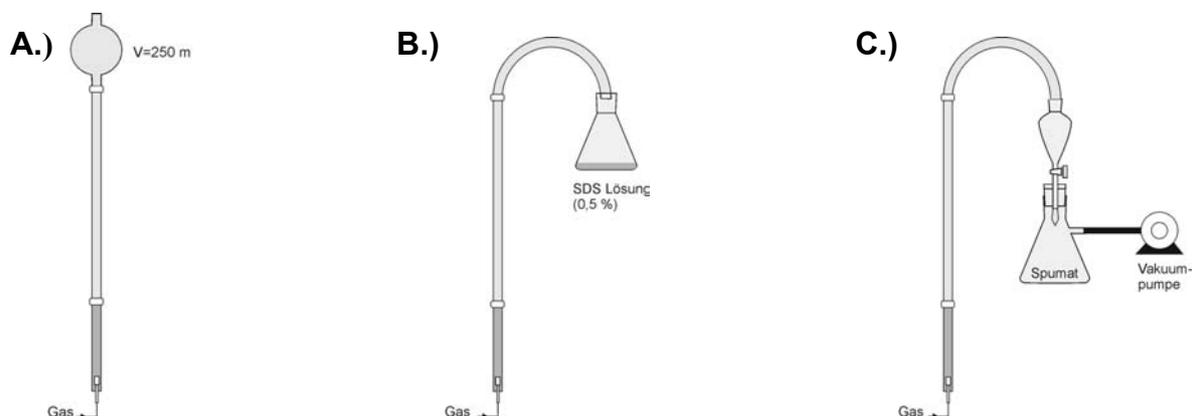


Abb.18: Die Zerschäumungsapparatur A.) mit Kolbenaufsatz B.) mit U-Rohr und C.) mit kontinuierlichem Schaumzerstörer

Aufgrund der Zielsetzung dieser Arbeit wurden, ausgehend von der Standard-Zerschäumungsapparatur, chemisch-physikalische und technische Parameter variiert. Der Optimierungsprozess verlief fließend, d.h. der jeweils optimierte Parameter bildete die Grundlage für die nächste Versuchsreihe.

Der zu variierende Parameter der Versuchsreihe wird im Folgenden detailliert erläutert, während die konstanten Parameter tabellarisch aufgelistet werden.

- **Zerschäumungsdauer**

Die Zerschäumung wurde über einen Zeitraum von 60 min durchgeführt. Alle 2 min wurde der Ausgangslösung eine Probe entnommen und deren Enzymaktivität bestimmt.

Tab.2: Zerschäumungsparameter zur Untersuchung der Zerschäumungsdauer

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
C_{Laccase}	0,001 mg/ml	Gasflussrate	20 ml/min	$d_{\text{Säule; innen}}$	29 mm
$t_{\text{Zerschäumung}}$	Variable	Gas	N ₂	$l_{\text{Säule}}$	0,75 m
pH-Wert	5,5	$P_{\text{Glasfilterkerze}}$	16-40 μm	Füllstand	0,15 m
C_{CTAB}	0,2 mg/ml	$T_{\text{Zerschäumung}}$	20 °C	Schaumentnahme	keine

- **pH-Wert**

Der pH-Wert der Ausgangslösung wurde mit HCl oder NaOH eingestellt. Es wurden pH-Werte von 3,0 bis 9,0, jeweils in Schritten von 1,0 gewählt. Zusätzlich wurde pH 5,5, eingestellt, da dieser pH-Wert dem natürliche pH-Wert des SNL-Nährmediums entspricht.

Tab.3: Zerschäumungsparameter bei der Variation des pH-Wertes

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
C_{Laccase}	0,001 mg/ml	Gasflussrate	20 ml/min	$d_{\text{Säule; innen}}$	29 mm
$t_{\text{Zerschäumung}}$	50 min	Gas	N ₂	$l_{\text{Säule}}$	0,75 m
pH-Wert	Variable	$P_{\text{Glasfilterkerze}}$	16-40 μm	Füllstand	0,15 m
$C_{\text{CTAB/SDS}}$	0,2 mg/ml	$T_{\text{Zerschäumung}}$	20 °C	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Tensid**

Die Zerschäumungen wurden mit CTAB als kationisches Tensid, Methylcellulose als neutrales Tensid, SDS als anionisches Tensid und Lecithin als amphoterer Tensid durchgeführt. Die Konzentrationen des jeweiligen Tensids in der Ausgangslösung wurden variiert. CTAB wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,1 mg/ml bis 0,4 mg/ml jeweils in Schritten von 0,1 mg/ml verwendet. Methylcellulose wies Konzentrationen von 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml und 0,75 mg/ml auf. Die SDS-Konzentration in der Ausgangslösung betrug 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml und 0,5 mg/ml. Lecithin wurde in Konzentrationen von 1 mg/ml bis 5 mg/ml in 2 mg/ml-Schritten eingesetzt. Nachdem die Konzentration des jeweiligen Tensids variiert wurde, sind in einer zweiten Versuchsreihe Zerschäumungen bei pH 3,0, 3,5 und 5,5 mit Methylcellulose, SDS und Lecithin bei jeweils optimaler Tensidkonzentration durchgeführt worden.

Tab.4: Zerschäumungsparameter bei der Zerschäumung mit unterschiedlichen Tensiden

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
C _{Laccase}	0,001 mg/ml	Gasflussrate	20 ml/min	d _{Säule; innen}	29 mm
pH-Wert	Variable II	Gas	N ₂	l _{Säule}	0,75 m
t _{Zerschäumung}	50 min	P _{Glasfilterkerze}	16-40 µm	Füllstand	0,15 m
C _{Tensid}	Variable I	T _{Zerschäumung}	20 °C	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Gasflussrate**

Die Gasflussrate wurde von 10 bis 40 ml/min, jeweils in Zehnerschritten variiert.

Tab.5: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Gasflussrate

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
C _{Laccase}	0,001 mg/ml	Gasflussrate	Variable	d _{Säule; innen}	29 mm
t _{Zerschäumung}	50 min	Gas	N ₂	l _{Säule}	0,75 m
pH-Wert	5,5	P _{Glasfilterkerze}	16-40 µm	Füllstand	0,15 m
C _{CTAB}	0,4 mg/ml	T _{Zerschäumung}	20 °C	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Gasart**

In dieser Versuchsreihe wurde die Art des eingeleiteten Gases variiert. Der bisher verwendete Stickstoff wurde in dieser Versuchsreihe durch Kohlendioxid, Helium, Argon und Druckluft ersetzt.

Tab.6: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Gasart

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
$C_{Laccase}$	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	$d_{Säule; innen}$	29 mm
$t_{Zerschäumung}$	50 min	Gas	Variable	$l_{Säule}$	0,75 m
pH-Wert	5,5	$P_{Glasfilterkerze}$	16-40 μm	Füllstand	0,15 m
C_{CTAB}	0,4 mg/ml	$T_{Zerschäumung}$	20 °C	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Porosität der Glasfilterkerze**

Die Glasfilterkerze mit einer Porengröße von 16-40 μm (P 3) wurde in dieser Versuchsanordnung durch eine Glasfilterkerze mit einer Porengröße von 40-100 μm (P 2) ersetzt.

Tab.7: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Porosität

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
$C_{Laccase}$	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	$d_{Säule; innen}$	29 mm
$t_{Zerschäumung}$	50 min	Gas	Druckluft	$l_{Säule}$	0,75 m
pH-Wert	5,5	$P_{Glasfilterkerze}$	Variable	Füllstand	0,15 m
C_{CTAB}	0,4 mg/ml	$T_{Zerschäumung}$	20 °C	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Zerschäumungstemperatur**

Die Zerschäumungstemperatur wurde im Bereich von 1 °C bis 30 °C variiert. Um eine konstante Temperatur zu gewährleisten, wurde eine doppelwandige Zerschäumungssäule verwendet. Die Doppelwand wurde mit demin. Wasser durchspült, das zuvor im Kryostaten auf die jeweilige Temperatur eingestellt wurde. Die Ausgangslösung wurde bereits vor Zerschäumungsbeginn temperiert.

Tab.8: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Zerschäumungstemperatur

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
$C_{Laccase}$	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	$d_{Säule; innen}$	29 mm
$t_{Zerschäumung}$	50 min	Gas	Druckluft	$l_{Säule}$	0,75 m
pH-Wert	5,5	$P_{Glasfilterkerze}$	16-40 μm	Füllstand	0,15 m
C_{CTAB}	0,4 mg/ml	$T_{Zerschäumung}$	Variable	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Säuleninnendurchmesser**

Bei dieser Versuchsanordnung wurde die Standardsäule mit einem Innendurchmesser von 29 mm durch jeweils eine dünnere Säule mit einem Innendurchmesser von 19 mm oder eine dickere Säule mit einem Innendurchmesser von 40 mm ersetzt.

Tab.9: Zerschäumungsparameter bei der Variation des Säuleninnendurchmessers

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
C _{Laccase}	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	d _{Säule; innen}	Variable
t _{Zerschäumung}	50 min	Gas	Druckluft	l _{Säule}	0,75 m
pH-Wert	5,5	P _{Glasfilterkerze}	16-40 µm	Füllstand	0,15 m
C _{CTAB}	0,4 mg/ml	T _{Zerschäumung}	20 °C	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Zerschäumungsdauer bei 40 mm Innendurchmesser**

Entsprechend dem größeren Durchmesser bzw. größeren Volumen der Ausgangslösung bei der Zerschäumung mit dickerer Säule (d = 40 mm) wurde die Zerschäumungsdauer verlängert, so dass neben einer 50 min Zerschäumung auch eine Zerschäumung für 70 min und 90 min durchgeführt wurde.

Tab.10: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Zerschäumungsdauer bei 40 mm Innendurchmesser

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
C _{Laccase}	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	d _{Säule; innen}	40 mm
t _{Zerschäumung}	Variable	Gas	Druckluft	l _{Säule}	0,75 m
pH-Wert	5,5	P _{Glasfilterkerze}	16-40 µm	Füllstand	0,15 m
C _{CTAB}	0,4 mg/ml	T _{Zerschäumung}	20 °C	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Säulenlänge**

Die Säulenlänge wurde von 0,5 m bis 1,25 m, jeweils in Schritten von 0,25 m, variiert.

Tab.11: Zerschäumungsparameter bei der Variation der Säulenlänge

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
C _{Laccase}	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	d _{Säule; innen}	29 mm
t _{Zerschäumung}	50 min	Gas	Druckluft	l _{Säule}	Variable
pH-Wert	5,5	P _{Glasfilterkerze}	16-40 µm	Füllstand	0,15 m
C _{CTAB}	0,4 mg/ml	T _{Zerschäumung}	20 °C	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Füllstand**

Der Füllstand von 0,15 m wurde bei dieser Versuchsanordnung sowohl erhöht als auch erniedrigt. Es wurde jeweils ein Füllstand von 0,05 m, 0,10 m, 0,20 m und 0,25 m vorgelegt.

Tab.12: Zerschäumungsparameter bei der Variation des Füllstands

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
$C_{Laccase}$	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	$d_{Säule; innen}$	29 mm
$t_{Zerschäumung}$	50 min	Gas	Druckluft	$l_{Säule}$	0,75 m
pH-Wert	5,5	$P_{Glasfilterkerze}$	16-40 μm	Füllstand	Variable
C_{CTAB}	0,4 mg/ml	$T_{Zerschäumung}$	20 °C	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Positionierung volumenvergrößernder Einbauten**

Zunächst wurde ein zweihalsiger 250 ml Rundkolben als volumenvergrößernder Einbau verwendet. Der Rundkolben wurde entweder direkt oberhalb der flüssigen Phase, d.h. am unteren Ende der Schaumsäule oder am oberen Ende der Schaumsäule unter dem U-Rohr platziert. In einer weiteren Versuchsreihe wurden jeweils ein 50 ml Kolben und ein 100 ml Kolben am unteren Ende der Schaumsäule eingesetzt.

Tab.13: Zerschäumungsparameter bei der Positionierung volumenvergrößernder Einbauten

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
$C_{Laccase}$	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	$d_{Säule; innen}$	29 mm
$t_{Zerschäumung}$	50 min	Gas	Druckluft	$l_{Säule}$	0,75 m
pH-Wert	5,5	$P_{Glasfilterkerze}$	16-40 μm	Füllstand	0,15 m
C_{CTAB}	0,4 mg/ml	$T_{Zerschäumung}$	20 °C	Schaumentnahme	U-Rohr

- **Schaumzerstörer**

Die Schaumzerstörung erfolgte in diesem Fall nicht mittels 0,5 %-iger SDS-Lösung sondern kontinuierlich, indem der Schaum mittels Wasserstrahlpumpe durch eine feine Verengung in eine Saugflasche gesogen und dadurch zerstört wurde.

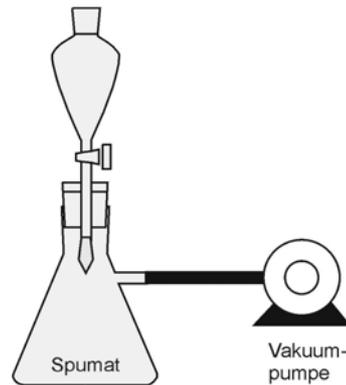


Abb.19: Kontinuierlicher Schaumzerstörer

Tab.14: Zerschäumungsparameter bei der Verwendung eines kontinuierlichen Schaumzerstörers

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
$C_{Laccase}$	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	$d_{Säule, innen}$	29 mm
$t_{Zerschäumung}$	50 min	Gas	Druckluft	$l_{Säule}$	0,75 m
pH-Wert	5,5	$P_{Glasfilterkerze}$	16-40 μm	Füllstand	0,15 m
C_{CTAB}	0,4 mg/ml	$T_{Zerschäumung}$	20 °C	Schaumentnahme	Schaumzerstörer

- **Kolonnenzerschäumung**

Die Kolonnenzerschäumung wurde wie eine zweiphasige Batch-Zerschäumung durchgeführt. Das Spumat der ersten Zerschäumung wurde in einer zweiten Säule erneut zerschäumt, wie Abbildung 20A zeigt. Während die Zerschäumungsparameter der ersten Säule den optimierten Parametern aus der Batch-Zerschäumung entsprachen, wurde die zweite Säule in der Länge verkürzt. Die Länge der zweiten Säule betrug 0,45 m.

Tab.15: Zerschäumungsparameter bei der Kolonnenzerschäumung

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
$C_{Laccase}$	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	$d_{Säule, innen}$	29 mm
$t_{Zerschäumung}$	50 min	Gas	Druckluft	$l_{Säule 1} / l_{Säule 2}$	0,75 m / 0,45 m
pH-Wert	5,5	$P_{Glasfilterkerze}$	16-40 μm	Füllstand	0,15 m
C_{CTAB}	0,4 mg/ml	$T_{Zerschäumung}$	20 °C	Schaumentnahme	Schaumzerstörer

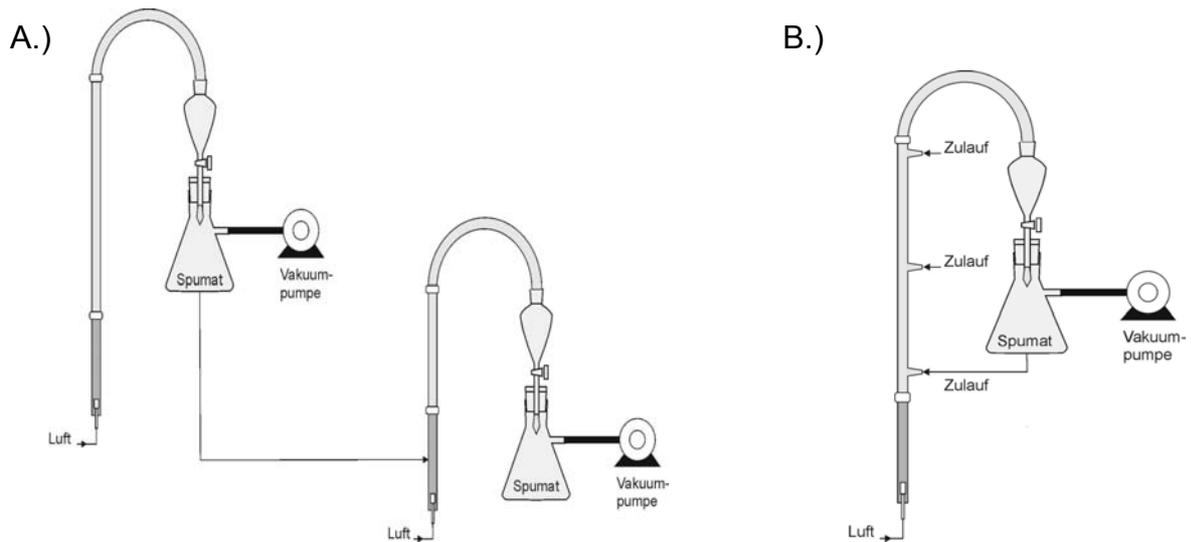


Abb.20: Darstellung der A.) Kolonnenzerschäumung; B.) Kreislaufzerschäumung

- **Kreislaufzerschäumung**

Die Kreislaufzerschäumung beruhte im Wesentlichen auf einer Batch-Zerschäumung. Abweichend von der einfachen Batch-Zerschäumung konnte das Spumat erneut in die Zerschäumungsapparatur injiziert werden, wie Abbildung 20B zeigt. Die Injektion des Spumates wurde am unteren Säulenende, direkt über dem Flüssigkeitsspiegel, in der Säulenmitte und am oberen Säulenende vorgenommen.

Tab.16: Zerschäumungsparameter bei der Kreislaufzerschäumung

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
C_{Laccase}	0,001 mg/ml	Gasflussrate	40 ml/min	$d_{\text{Säule; innen}}$	29 mm
$t_{\text{Zerschäumung}}$	50 min	Gas	Druckluft	$l_{\text{Säule 1}}/l_{\text{Säule 2}}$	0,75 m
pH-Wert	5,5	$P_{\text{Glasfilterkerze}}$	16-40 μm	Füllstand	0,15 m
C_{CTAB}	0,4 mg/ml	$T_{\text{Zerschäumung}}$	20 °C	Schaumentnahme	Schaumzerstörer

- **Pilotanlage**

Die Pilotanlage war ein „Scale Down“ im Vergleich zu den bereits beschriebenen Apparaturen. Die Zerschäumungsapparatur enthielt einen U-Rohraufsatz nach Abbildung 18B und einen Schaumzerstörer nach Abbildung 19. Die Länge der Säule betrug 0,15 m bei einem Innendurchmesser von 11 mm. Es wurden 2,75 ml Ausgangslösung eingesetzt, so dass ein Füllstand von 30 mm resultierte. Das Verhältnis zwischen Füllstand und Gesamtsäulenlänge betrug somit wie bei der großen Anlage nach Abbildung 18B 1:5.

3.2.2.2. Die kontinuierliche Zerschäumung

Die Apparatur zur kontinuierlichen Zerschäumung bestand aus einer Säule mit einem Innendurchmesser von 29 mm und einer Länge von 0,75 m. Die Druckluft wurde je nach Versuchsanordnung mit Flussraten von 30 ml/min, 40 ml/min, 50 ml/min oder 60 ml/min über eine Glasfilterkerze mit einer Porengröße von 16-40 µm in die Ausgangslösung eingeleitet. 100 ml der Ausgangslösung wurden zunächst für 50 min zerschäumt. Anschließend wurden zusätzliche 900 ml Ausgangslösung aus einem temperierbaren 1 l Vorratsgefäß (1 °C) in die Säule eingespeist. Die Einspeisestelle für die Ausgangslösung konnte je nach Versuchsanordnung variabel am oberen oder unteren Ende der Schaumsäule positioniert werden. Der Zuflussstrom der Ausgangslösung wurde so eingestellt, dass jeweils ein Füllstand in der Säule von 0,15 m erhalten blieb. Der Volumenstrom der abfließenden abgereicherten Lösung wurde systematisch von 5 ml/min bis 25 ml/min variiert. Als Tensid wurde CTAB in Konzentrationen von 0,2 bis 0,6 mg/ml eingesetzt.

Die kontinuierliche Zerschäumung wurde ebenfalls als Kolonnenzerschäumung durchgeführt. Dazu wurde das erhaltene Spumat der ersten Zerschäumung ein zweites Mal zerschäumt. Die Dimensionen und Prozessparameter der zweiten Zerschäumung entsprachen denen der ersten.

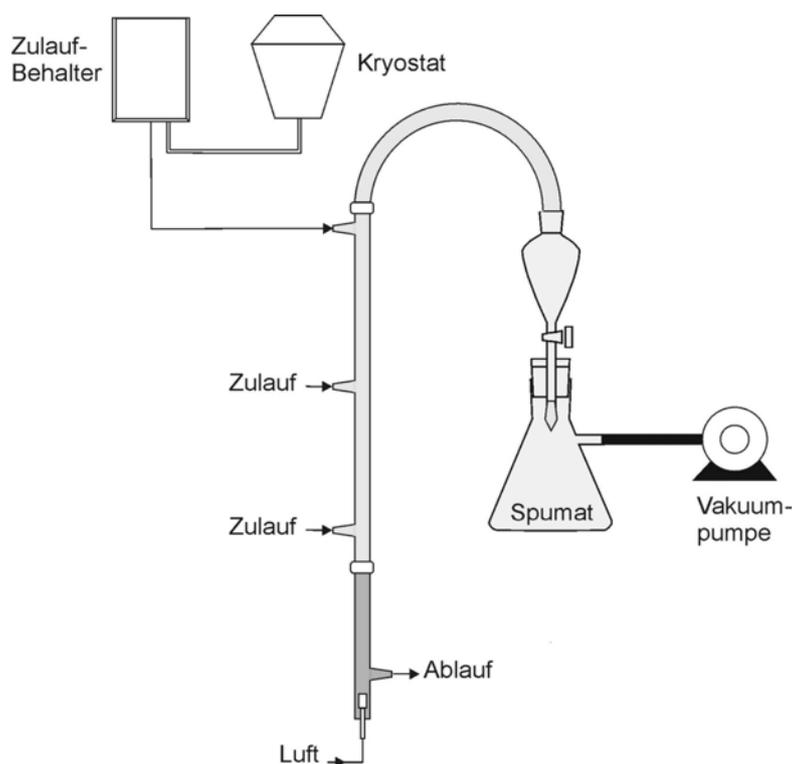


Abb.21: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Zerschäumungsapparatur

In der folgenden Tabelle sind die variablen sowie die konstanten Parametern der jeweiligen Versuchsanordnung bei der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase dargestellt.

Tab.17: Variable und konstante Parameter bei der kontinuierlichen Zerschäumung

Variable	Konstante Parameter
Einspeisestelle	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; $l_{\text{Säule}}$: 0,75 m; $d_{\text{Säule; innen}}$: 29 mm; Füllstand: 0,15 m; Abflussrate: 5 ml/min
Abflussrate	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; $l_{\text{Säule}}$: 0,75 m; $d_{\text{Säule; innen}}$: 29 mm; Füllstand: 0,15 m; Einspeisung: oben
CTAB-Konzentration	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; $l_{\text{Säule}}$: 0,75 m; $d_{\text{Säule; innen}}$: 29 mm; Füllstand: 0,15 m; Einspeisung: oben; Abflussrate: 5 ml/min
Gasflussrate	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; $l_{\text{Säule}}$: 0,75 m; $d_{\text{Säule; innen}}$: 29 mm; Füllstand: 0,15 m; Einspeisung: oben; Abflussrate: 5 ml/min
Kolonnenzerschäumung	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 60 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; $l_{\text{Säule}}$: 0,75 m; $d_{\text{Säule; innen}}$: 29 mm; Füllstand: 0,15 m; Einspeisung: oben; Abflussrate: 5 ml/min

3.2.3. Die photometrische Messung der Enzymaktivität

Die Laccaseaktivität der Ausgangslösung, des Spumates und der nach der Zerschäumung abgereicherten Restlösung wurde photometrisch bei 420 nm bestimmt. Es wurden 100 µl der Probe mit 800 µl Natrium-Tartrat-Puffer (0,1 M) pH 4,5 sowie 100 µl ABTS-Lösung (5 mM) versetzt und die Extinktionszunahme über die Zeit bestimmt. Wurden pH-abhängige Inaktivierungsversuche durchgeführt, wurde die Enzymaktivität auch bei pH 6,0 und pH 7,0 gemessen. Die Aktivitätsbestimmung der Meerrettich-Peroxidase wurde analog durchgeführt. Statt 800 µl Natrium-Tartrat-Puffer (0,1 M) wurden lediglich 790 µl des Puffers verwendet und zusätzlich 10 µl H₂O₂-Lösung (20 mM) zugesetzt.

Aus den ermittelten Enzymaktivitäten der Laccase und Meerrettich-Peroxidase wurde die Anreicherung (E_r) bzw. die Wiederfindung (R) des Enzyms im Schaum wie folgt berechnet:

$$E_r = \frac{E_{AS}}{E_{AA}}$$
$$R = \frac{e_{AS}}{e_{AA}} \cdot 100$$

E_{AS} = Enzymaktivität im Schaum in U/l

E_{AA} = Enzymaktivität in der Ausgangslösung in U/l

e_{AS} = absolute Enzymaktivität im Schaum in U

e_{AA} = absolute Enzymaktivität in der Ausgangslösung in U

Da die Zerschäumungen jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden, sind der arithmetische Mittelwert \bar{x} und die empirische Standardabweichung s_x wie folgt berechnet worden. (*Kaiser und Gottschalk, 1972*)

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

s_x = Standardabweichung des Messwertes

x_i = Einzelmesswert

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

n = Anzahl der Messwerte

3.2.4. Das Pinzettenverfahren

3.2.4.1. Die Inaktivierung der Enzyme mittels Komplexbildner und Reaktivierung

Die Inaktivierung der Enzyme wurde durch Zugabe verschiedener Komplexbildner, wie EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), β -ADA (N-(2-Acetamido)-iminodiessigsäure) und DPTA (1,3-Diamino-2-hydroxypropan-N,N,N',N'-tetraessigsäure) realisiert. Zur Inaktivierung der enzymhaltigen Lösung (Laccase: 11,40 U/l; Meerrettich-Peroxidase: 40,02 U/l) wurde diese mit NaOH auf pH 10 eingestellt, mit einem Komplexbildner in einer Konzentration von 5-100 mg/ml versetzt und anschließend mit HCl neutralisiert. Die Reaktivierung des Enzyms wurde einerseits durch Zugabe von Metallionen bzw. deren Salzen, wie $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ und $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ erzielt, die in Konzentrationen von 20-140 mg/ml zugesetzt wurden. Andererseits konnte die Reaktivierung des Enzyms durch Absenken des pH-Wertes auf pH 3,5 erzielt werden.

3.2.4.2. Die Zerschäumung im Pinzettenverfahren

Die Zerschäumung im Pinzettenverfahren wurde in der Pilotanlage vorgenommen. Als Zerschäumungsgas wurde Druckluft verwendet, das über eine Glasfilterkerze mit der Porengröße P 3 in die Ausgangslösung eingeleitet wurde. Zunächst wurde die inaktivierte Laccase mit 0,4 mg/ml CTAB aus dem SNL-Nährmedium zerschäumt. Die Zerschäumung wurde bei pH 5,5, 6,0, und 7,0 durchgeführt. Der Gasfluss betrug 10 ml/min bei einer Zerschäumungsdauer von 10 min. In einer weiteren Versuchsreihe wurde ein Oktylrest kovalent an β -ADA gekoppelt (β -ADA-C8). Die Zerschäumung von Laccase mit diesem Komplexbildner wurde zunächst aus demin. Wasser vorgenommen. Es wurden verschiedene Zerschäumungsparameter optimiert. Die Zerschäumungsdauer wurde in einem Zeitintervall von 10 bis 120 min variiert. Es wurden Zerschäumungen bei pH-Werten von 7,0 bis 10,0 durchgeführt. Die Gasflussrate betrug 0,25 ml/min bis 4,0 ml/min und die Konzentration an β -ADA-C8 in der Ausgangslösung wurde von 1,5 mg/ml bis 7,5 mg/ml systematisch variiert. Anschließend wurde die inaktivierte Laccase mit β -ADA-C8 aus dem SNL-Nährmedium zerschäumt. Die Gasflussrate wurde bei der Zerschäumung aus dem SNL-Nährmedium von 0,25 bis 1 ml/min variiert.

Meerrettich-Peroxidase wurde ebenfalls mit β -ADA-C8 inaktiviert und aus demin. Wasser bei einem pH-Wert von 10,0, einer Gasflussrate von 1 ml/min und einer Konzentration an β -ADA-C8 von 65,0 mg/ml für 30 min zerschäumt.

Die Zerschäumungsparameter der Zerschäumung im Pinzettenverfahren sind in den folgenden Tabellen aufgeführt

Tab.18: Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA und CTAB

Variable	Konstante Parameter
Einspeisestelle	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 10 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; T: 20 °C; $l_{\text{Säule}}$: 0,15 m; $d_{\text{Säule, innen}}$: 11 mm; Füllstand: 30 mm

Tab.19: Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 aus demin. Wasser

Variable	Konstante Parameter
$t_{\text{Zerschäumung}}$	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; $c_{\beta\text{-ADA-C8}}$: 3,0 mg/ml; pH: 10; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Gasflussrate: 1 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; $d_{\text{Säule, innen}}$: 11 mm; $l_{\text{Säule}}$: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumung aus H ₂ O demin.; Messung der Enzymaktivität bei pH 6; ABTS: 5,5 mg/ml
pH-Wert	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; $c_{\beta\text{-ADA-C8}}$: 3,0 mg/ml; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Gasflussrate: 1 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; $d_{\text{Säule, innen}}$: 11mm; $l_{\text{Säule}}$: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumungsdauer 30 min; Zerschäumung aus H ₂ O demin.; Messung der Enzymaktivität bei pH 6; ABTS: 5,5 mg/ml
Gasflussrate	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; $c_{\beta\text{-ADA-C8}}$: 3,0 mg/ml; pH: 10 T: 20 °C; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; $d_{\text{Säule, innen}}$: 11 mm; $l_{\text{Säule}}$: 0,15 m; Zerschäumungsdauer 30 min; Füllstand: 30 mm; Zerschäumung aus H ₂ O demin.; Messung der Enzymaktivität bei pH 6; ABTS: 5,5 mg/ml
$c_{\beta\text{-ADA-C8}}$	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; pH: 10; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Gasflussrate: 1 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; $d_{\text{Säule, innen}}$: 11 mm; $l_{\text{Säule}}$: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumungsdauer: 30 min; Zerschäumung aus H ₂ O demin.; Messung der Enzymaktivität bei pH 6; ABTS: 5,5 mg/ml

Tab.20: Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 aus SNL-Nährmedium

Variable	Konstante Parameter
Gasflussrate	c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; pH: 10; $c_{\beta\text{-ADA-C8}}$: 3,0 mg/ml; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; $d_{\text{Säule; innen}}$: 11 mm; $l_{\text{Säule}}$: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumungsdauer 30 min; Zerschäumung aus SNL-Nährmedium; Messung der Enzymaktivität bei pH 6; ABTS: 5,5 mg/ml

Tab.21: Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8

Variable	Konstante Parameter
Enzym	$c_{\text{Meerrettich-Peroxidase}}$: 0,0001 mg/ml; pH: 10; $c_{\beta\text{-ADA-C8}}$: 65,0 mg/ml; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Gasflussrate 1 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; $d_{\text{Säule; innen}}$: 11 mm; $l_{\text{Säule}}$: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumungsdauer 30 min; Messung der Enzymaktivität bei pH 6; ABTS: 5,5 mg/ml)

3.2.4.3. Die Zerschäumung von Laccase und Meerrettich-Peroxidase mit Fremdmetail- β -ADA-C8-Komplexen

Die Zerschäumung von Laccase mit fremdmetallkomplexiertem β -ADA-C8 wurde durchgeführt, indem 30 mg β -ADA-C8 mit 25 mg Kupfer-(II)-Sulfat Pentahydrat in 10 ml demin Wasser gelöst wurden. Die Lösung wurde auf pH 10,0 eingestellt, mit 0,01 mg Laccase versetzt und in der Pilotanlage zerschäumt. Analog wurde die Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase mit Fremdmetall- β -ADA-C8-Komplexen durchgeführt. Anstelle von Kupfer-(II)-Sulfat Pentahydrat wurden 590 mg Eisen-(III)-Chlorid Hexahydrat mit 650 mg β -ADA-C8 versetzt.

Tab.22: Zerschäumungsparameter bei der Zerschäumung von Laccase mit Cu^{2+} - β -ADA-C8-Komplexen

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
c_{Laccase}	0,001 mg/ml	Gasflussrate	1 ml/min	$d_{\text{Säule; innen}}$	11 mm
$t_{\text{Zerschäumung}}$	30 min	Gas	Druckluft	$l_{\text{Säule}}$	0,15 m
pH-Wert	10,0	$P_{\text{Glasfilterkerze}}$	16-40 μm	Füllstand	30 mm
$c_{\text{ADA-C8}}$	3,0 mg/ml	$T_{\text{Zerschäumung}}$	20 °C	Schaumentnahme	Schaumzerstörer

Tab.23: Zerschäumungsparameter bei der Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase mit Fe³⁺-β-ADA-C8-Komplexen

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
C _{MPOX}	0,0001 mg/ml	Gasflussrate	1 ml/min	d _{Säule; innen}	11 mm
t _{Zerschäumung}	30 min	Gas	Druckluft	l _{Säule}	0,15 m
pH-Wert	10,0	P _{Glasfilterkerze}	16-40 μm	Füllstand	30 mm
C _{ADA-C8}	65,0 mg/ml	T _{Zerschäumung}	20 °C	Schaumentnahme	Schaumzerstörer

3.2.4.4. Die Synthese des komplexierenden Tensids β-ADA-C8

β-ADA-C8 (N-Octyl-Carbamoyl-Methyl-Iminodiessigsäure) wurde synthetisiert, indem 1,33 g (10 mmol) Iminodiessigsäure zu einer Lösung aus 2,06 g (10 mmol) N-Octyl-2-Chloracetamid in 50 ml Ethanol gegeben wurden. Der pH-Wert wurde mit 10 %-iger NaOH-Lösung auf 11,0 eingestellt. Die Mischung wurde unter Rückfluss für 5 h erhitzt. Während dieser Zeit wurde der pH-Wert durch Zugabe von 10 %-iger NaOH-Lösung bei pH 11,0 konstant gehalten. Anschließend wurde die Lösung getrocknet, mit 80 ml demin. Wasser verdünnt und mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit konzentrierter HCl versetzt, bis ein pH-Wert von 2 erreicht war. Das Produkt fiel bei diesem pH-Wert aus und wurde unter Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 2,16 g (71%). Die spektroskopischen Daten stellten sich wie folgt dar:

¹H-NMR (250 MHz) (Bruker, AC 250) mit DMSO-d₆ als internen Standard

δ = 0.85 (CH₃, t, ³J=6.5 Hz, 3H); 1.24 (CH₂, bm, 10H); 1.39 (CH₂, m, 2H); 3.08 (NHCH₂-CH₂, m, 2H); 3.28 (NCH₂CO, s, 2H); 3.43 (CH₂COOH, s, 4H); 8.02 (NH, t, ³J=5.8 Hz, 1H)

¹³C NMR (62,5 MHz) (Bruker, AC 250) mit DMSO-d₆ als internen Standard

δ = 13.9 (CH₃); 22.1 (CH₂); 26.3 (CH₂); 28.6 (CH₂); 28.7 (CH₂); 29.1 (CH₂); 31.2 (CH₂); 38.2 (CH₂-N); 55.4 (2C, CH₂COOH); 58.0 (N-CH₂COOH); 170.4 (CONH); 172.7 (2C, COOH)

4. Ergebnisse

4.1. Die Batch-Zerschäumung von Laccase

Die Laccase wurde zunächst im Batch-Verfahren zerschäumt, um einerseits das allgemeine Verhalten des Enzyms während der Zerschäumung zu untersuchen und andererseits die optimalen Zerschäumungsparameter zu ermitteln. Die Zerschäumungsparameter wurden bezüglich einer quantitativen Wiederfindung bei hoher Anreicherung der Enzymaktivität im Schaum optimiert. Um die Optimierungen vornehmen zu können, musste zunächst die Zerschäumungsapparatur konstruktiv auf das Verhalten des Enzyms während der Zerschäumung ausgelegt werden. Dazu wurde eine Zerschäumungssäule konstruiert, die generell die Zerschäumung der Laccase ermöglicht, bevor chemisch-physikalische und technische Parameter optimiert wurden.

4.1.1. Die Konstruktion der Zerschäumungssäule

Um die Zerschäumungssäule bzw. das Schaumentnahmesystem zur Zerschäumung von Laccase konstruieren zu können, wurde die Zerschäumungsdauer ermittelt, die notwendig war, um das Enzym aus der Ausgangslösung abzuschäumen. In Abbildung 22 ist der Einfluss der Zerschäumungsdauer auf die Abreicherung von Laccase in der Ausgangslösung dargestellt.

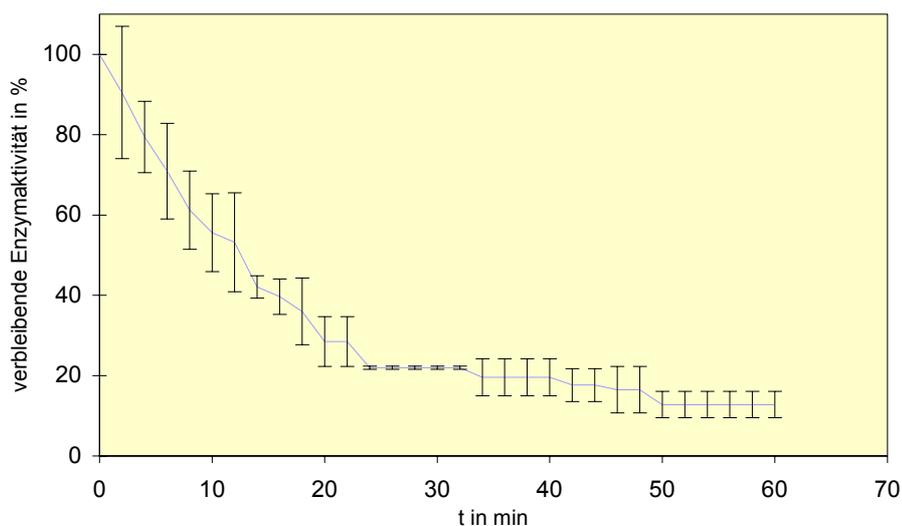


Abb.22: Aktivitätsabnahme in der Ausgangslösung während der Zerschäumung von Laccase

(C_{Laccase} : 0,001 mg/ml; C_{CTAB} : 0,20 mg/ml; Gasflussrate: 20 ml/min; Gas: N_2 ; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Wie aus Abbildung 22 hervorgeht, konnte eine quantitative Abschäumung bei gegebenen Bedingungen nicht erzielt werden. Dennoch wurde nach einer Zerschäumungsdauer von 50 min eine Abreicherung der Ausgangslösung an Laccaseaktivität von 87 % erreicht. Diese Zerschäumungsdauer wurde daher für nachfolgende Zerschäumungen als Grundlage genutzt. In der folgenden Versuchreihe musste geklärt werden, ob eine Abreicherung der Ausgangslösung um 87 % auch einer Wiederfindung von 87 % im Schaum entspricht. Dazu wurden Zerschäumungen mit verschiedenen Schaumentnahmesystemen, wie einem Rundkolben oder einem U-Rohr durchgeführt. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Zerschäumungen dargestellt.

Tab.24: Die Zerschäumung von Laccase mit verschiedenen Schaumentnahmesystemen

	Schaumentnahme mittels	
	¹ Rundkolben	¹ U-Rohr
E _r	5,00 ± 0,49	5,11 ± 0,75
R in %	77,33 ± 0,05	80,70 ± 2,37
Restaktivität in der Ausgangslösung in %	15,77 ± 3,90	16,07 ± 5,39
Verlorene Aktivität in %	6,87 ± 3,96	3,23 ± 4,21

¹ Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

Wie aus Tabelle 24 hervorgeht, ist die Abreicherung in der Ausgangslösung mit einer Restaktivität von 15,77 % bzw. 16,07 % vergleichbar mit dem vorangegangenen Versuch. Allerdings betrug die Wiederfindung im Schaum bei einer Zerschäumung mit Rundkolben zur Schaumentnahme lediglich 77,33 %, so dass während der Zerschäumung 6,87 % Enzymaktivität verloren wurden. Unter Verwendung eines U-Rohres zur Schaumentnahme konnte der Verlust an Enzymaktivität vermindert werden, so dass sich im Schaum eine Wiederfindung von 80,70 % bei einem Aktivitätsverlust 3,23 % ergab. Da die Schaumprobennahme mittels U-Rohr geringere Aktivitätsverluste induziert, wurde diese Zerschäumungsapparatur für nachfolgende Versuche genutzt und diente als Grundlage zur Variation chemisch-physikalischer und technischer Parameter.

4.1.2. Variation chemisch-physikalischer Parameter

Zunächst wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Effizienz der Zerschäumung untersucht. In Abbildung 23 ist die Korrelation zwischen dem pH-Wert der zu zerschäumenden Lösung und der daraus resultierenden Anreicherung bzw. Wiederfindung dargestellt.

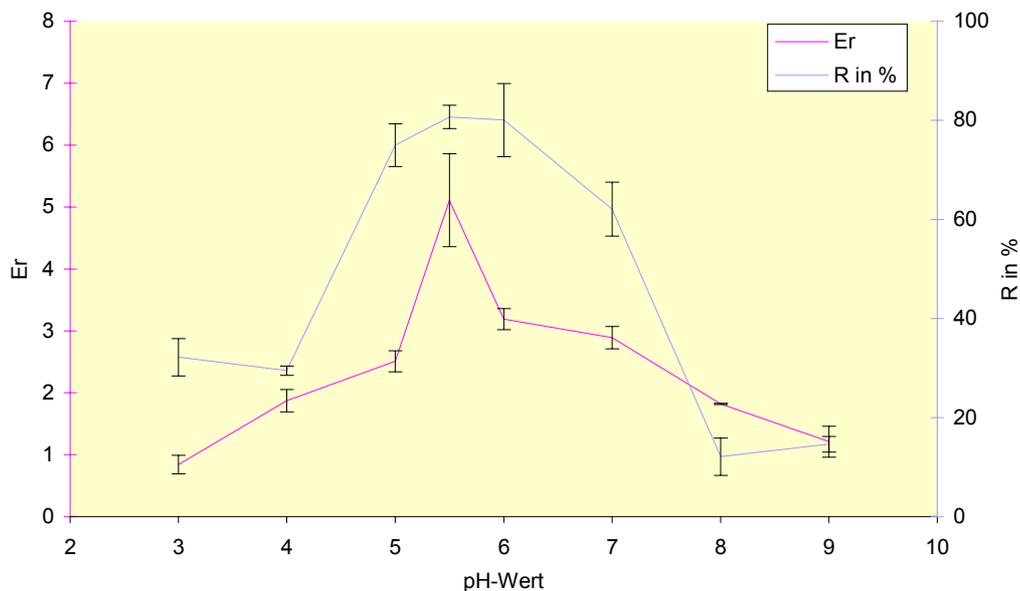


Abb.23: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,20 mg/ml; Gasflussrate: 20 ml/min; Gas: N_2 ; Glasfilterkerze: P 3; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Abbildung 23 zeigt, dass die Wiederfindung vom pH-Wert abhängig war. Während die Wiederfindung bei pH 5,5 mit einem Wert von 80,70 % maximal war, führten sowohl geringere als auch höhere pH-Werte zu geringeren Wiederfindungen. Wie die Wiederfindung war auch die Anreicherung des Enzyms im Schaum bei einem pH-Wert von 5,5 am höchsten und nahm bei kleineren und größeren pH-Werten ab. Die Anreicherung betrug bei diesem pH-Wert 5,11. Da bei pH 5,5 die höchste Wiederfindung und Anreicherung erzielt wurde, wurde die Variation weiterer Parameter bei diesem pH-Wert durchgeführt.

Nachfolgend wurde die CTAB-Konzentration in der Ausgangslösung variiert. Die Abhängigkeit zwischen der CTAB-Konzentration und der Anreicherung bzw. Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

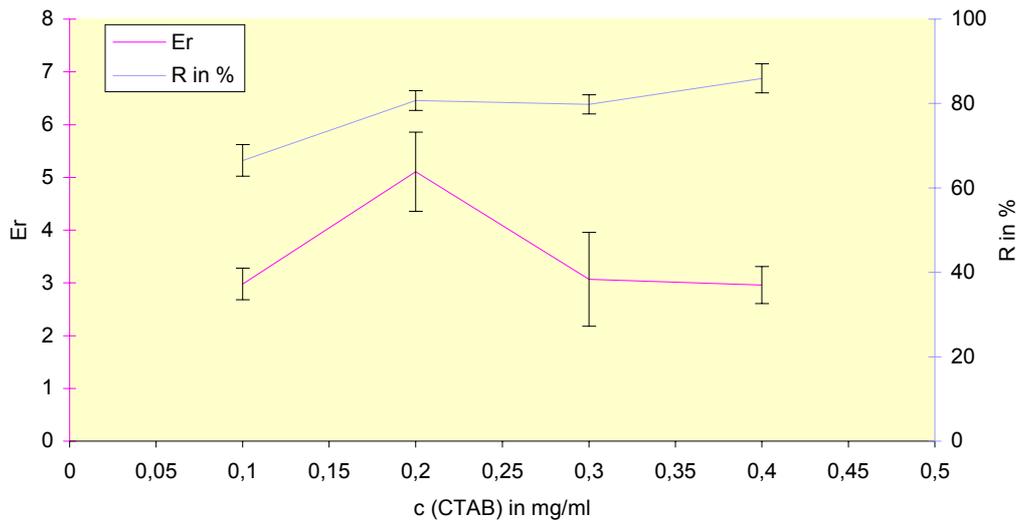


Abb.24: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; pH-Wert: 5,5; Gasflussrate: 20 ml/min; Gas: N_2 ; Glasfilterkerze: P 3; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Abbildung 24 zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Wiederfindung im Schaum und der CTAB-Konzentration der Ausgangslösung bestand. Mit steigender CTAB-Konzentration nahm die Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum zu. Während bei einer CTAB-Konzentration von 0,1 mg/ml lediglich 32,19 % der eingesetzten Enzymaktivität im Schaum wiedergefunden wurde, konnten bei einer Zugabe von 0,4 mg/ml bereits 85 % der eingesetzten Aktivität in den Schaum transportiert werden. Die Anreicherung hingegen zeigte keinen eindeutigen Trend. Bei einer CTAB-Konzentration von 0,2 mg/ml wurde mit einem Wert von 5,11 die höchste Anreicherung erzielt.

Neben CTAB wurden weitere Additive für die Schaumbildung verwendet. Der Einfluss der Additive Methylcellulose als neutrales Tensid, Lecithin als amphoterer Tensid und SDS als anionisches Tensid wurden untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 bis 27 dargestellt. Die Abbildungen zeigen Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Tensids.

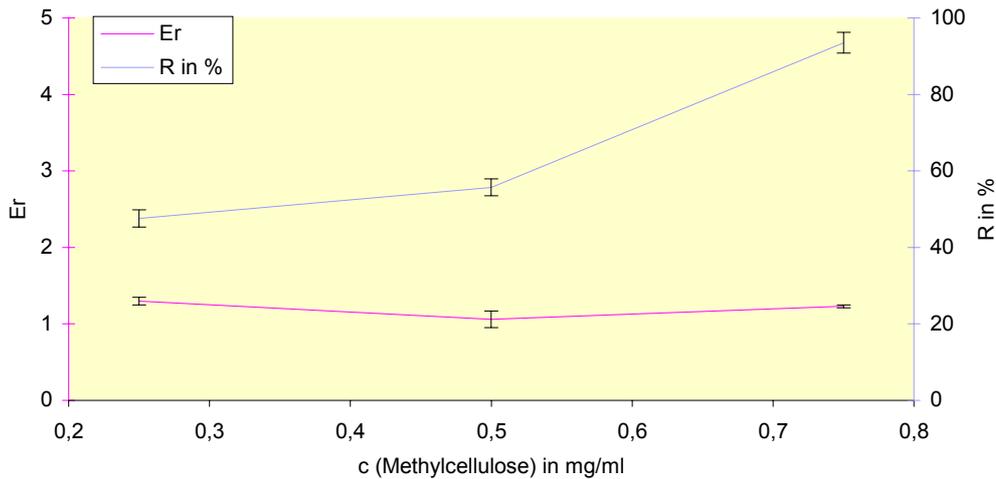


Abb.25: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Methylcellulose-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; pH: 5,5; Gasflussrate: 20 ml/min; Gas: N_2 ; Glasfilterkerze: P 3; T: 20°C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Die Zerschäumung mit Methylcellulose zeigte eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Methylcellulosekonzentration und der Wiederfindung der Laccaseaktivität im Schaum, wie Abbildung 25 zeigt. Während die Wiederfindung bei einer Konzentration an Methylcellulose von 0,25 mg/ml 47,55 % beträgt, konnte die Wiederfindung durch Erhöhung der Konzentration auf 7,5 mg/ml auf 93,53 % gesteigert werden. Die Anreicherung hingegen wurde nur wenig von der Methylcellulosekonzentration beeinflusst. Sie lag bei allen Methylcellulose-Konzentrationen im Bereich von 1.

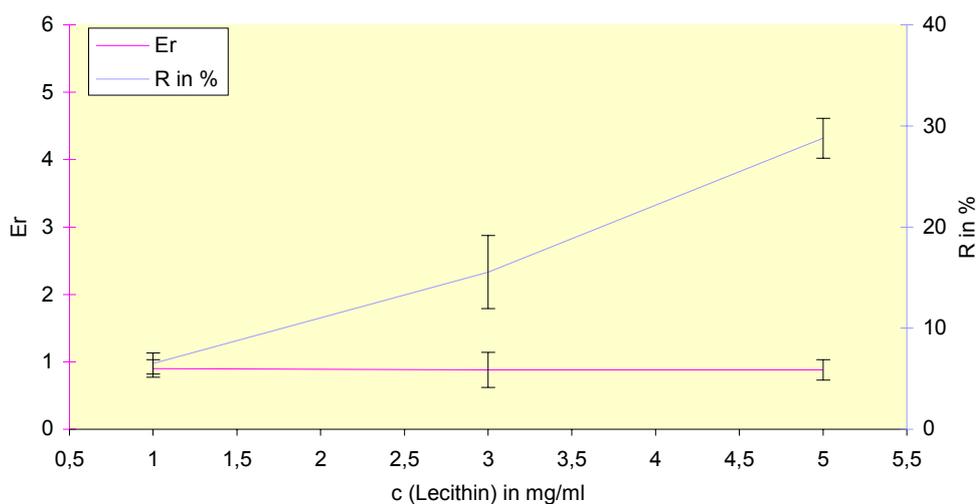


Abb.26: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Lecithin-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; pH: 5,5; Gasflussrate: 20 ml/min; Gas: N_2 ; Glasfilterkerze: P 3; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Auch bei der Zerschäumung mit Lecithin als amphoterem Tensid wurde eine Abhängigkeit zwischen der Konzentration und der Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum festgestellt. Die Wiederfindung stieg von 6,51 % bei einer Konzentration von 1 mg/ml auf 28,78 % bei einer Konzentration von 5,0 mg/ml an. Zwischen der Anreicherung des Enzyms und der Lecithin-Konzentration wurde keine Abhängigkeit festgestellt. Die Anreicherung nahm bei allen Lecithin-Konzentrationen Werte im Bereich von 1 an, wie Abbildung 26 darstellt.

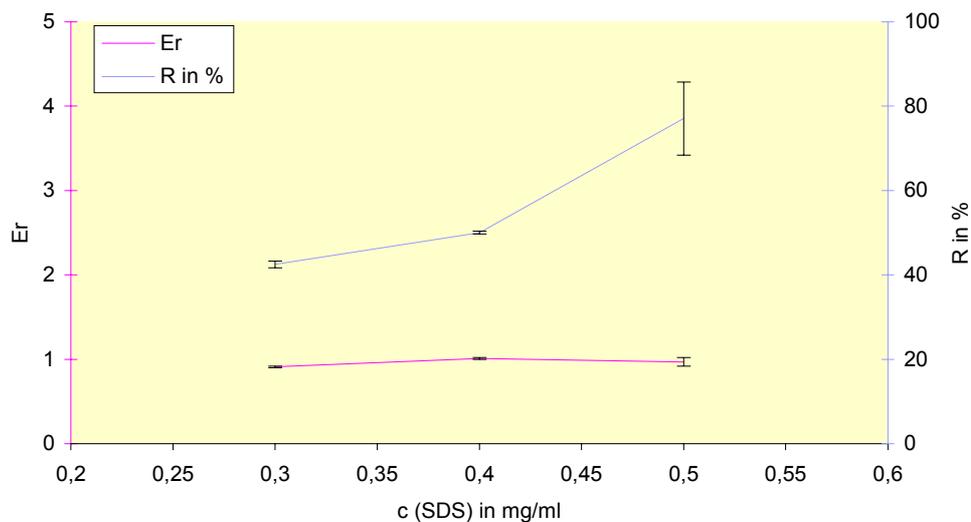


Abb.27: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; pH: 5,5; Gasflussrate: 20 ml/min; Gas: N_2 ; Glasfilterkerze: P 3; T: 20°C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Wie Abbildung 27 zeigt besteht auch bei der Zerschäumung mit SDS eine Abhängigkeit zwischen der Konzentration und der Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum. Auch hier nahm die Wiederfindung mit steigender SDS-Konzentration zu und erreichte bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml einen maximalen Wert von 77,07 %. Die Anreicherung wurde nicht von der SDS-Konzentration beeinflusst und lag wie bei Methylcellulose und Lecithin im Bereich von 1.

Da eine Anreicherung von 1 unbefriedigend war, wurde das Verhalten der drei Tenside bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Dazu wurden Zerschäumungen bei pH 3,0, pH 3,5 und pH 5,5 durchgeführt. Die Abhängigkeit zwischen dem pH-Wert und der Anreicherung bzw. Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum wurde für jedes Tensid ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 bis 30 dargestellt.

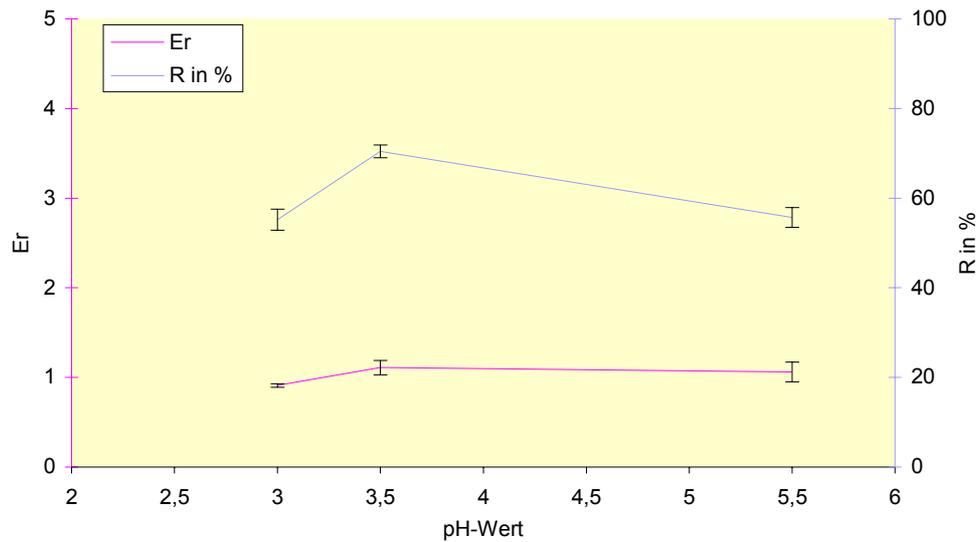


Abb.28: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase mit Methylcellulose im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; $c_{\text{Methylcellulose}}$: 0,5 mg/ml; Gasflussrate: 20 ml/min; Gas: N_2 ; Glasfilterkerze: P 3; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

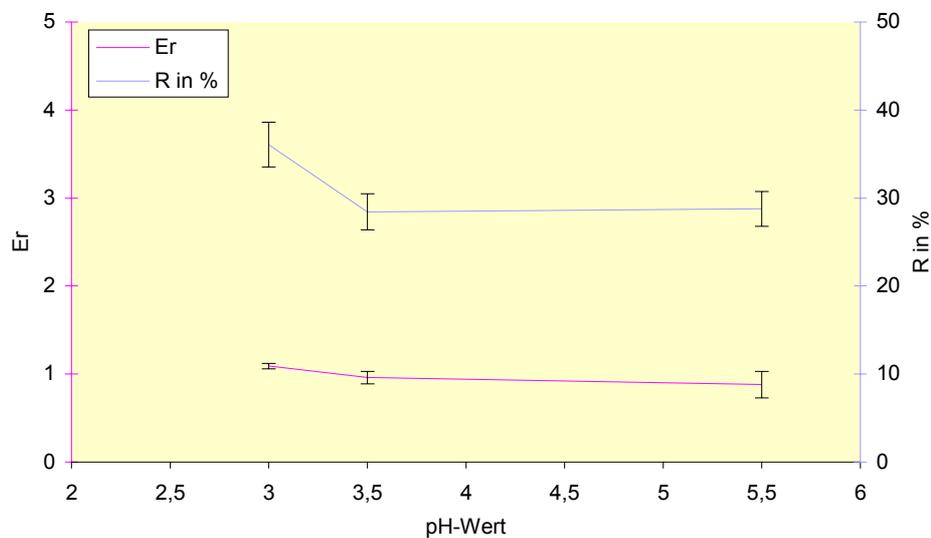


Abb.29: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase mit Lecithin im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{Lecithin} : 5,0 mg/ml; Gasflussrate: 20 ml/min; Gas: N_2 ; Glasfilterkerze: P 3; T: 20°C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

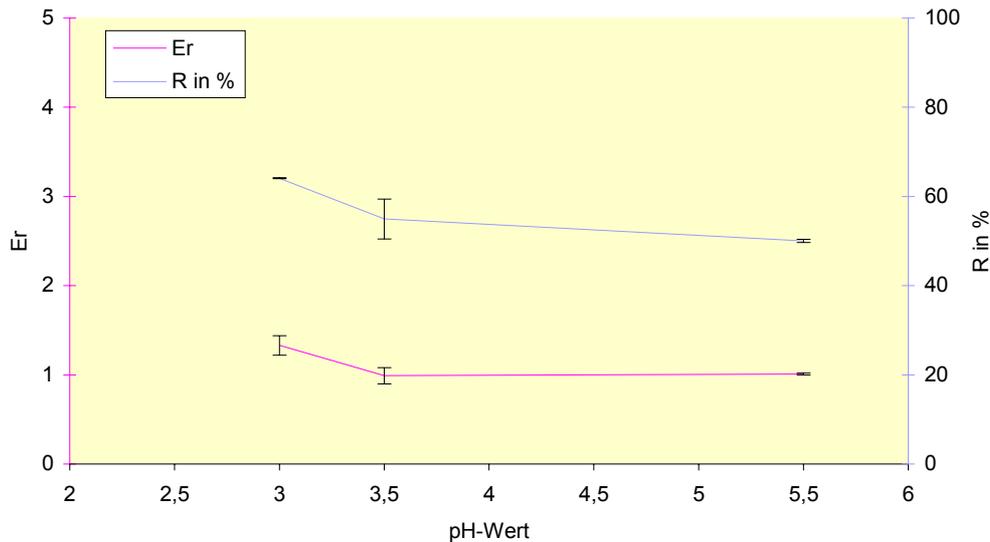


Abb.30: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase mit SDS im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{SDS} : 0,4 mg/ml; Gasflussrate: 20 ml/min; Gas: N_2 ; Glasfilterkerze: P 3; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Wie aus Abbildung 28 bis 30 hervorgeht, führen alle drei Tenside bei verschiedenen pH-Werten zu Unterschieden in der Wiederfindung und Anreicherungen der Enzymaktivität im Schaum. Mit Methylcellulose als neutrales Tensid wurde bei pH 3,5 die höchste Wiederfindung mit einem Wert von 70,42 % erzielt. Die Zerschäumungen bei pH 3,0 und pH 5,5 lieferten Wiederfindungen an Enzymaktivität im Schaum von 55 %. Zerschäumungen mit SDS und Lecithin zeigten jeweils die höchste Wiederfindung bei pH 3,0. Unter Verwendung von SDS betrug die Wiederfindung 64,10 %. Die Zerschäumungen mit Lecithin lieferte eine Wiederfindung von 36,07 % bei diesem pH-Wert.

Die Anreicherungen lagen auch nach Variation des pH-Wertes bei allen drei Tensiden im Bereich von 1 oder darunter. Lediglich mit SDS konnte eine Anreicherung von 1,33 bei pH 3,0 erzielt werden.

Da eine maximale Anreicherung von 1,33 nicht ausreichend war, wurde die Variation technischer Parameter mit CTAB als Tensid vorgenommen. Die CTAB-Konzentration betrug dabei 0,4 mg/ml.

4.1.3. Variation technischer Parameter

In der folgenden Versuchsreihe wurde die Gasflussrate jeweils systematisch in Zehnerschritten von 10 ml/min bis 40 ml/min erhöht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 31 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen der Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum und der Gasflussrate. Bei steigender Gasflussrate nahm die Wiederfindung im Schaum zu. Während die Wiederfindung bei einer Gasflussrate von 10 ml/min 59,13 % betrug, konnte bei einem Gasfluss von 40 ml/min eine Wiederfindung von 99,33 % erreicht werden. Die Anreicherung hingegen nahm umgekehrt proportional dazu ab. Da eine Wiederfindung von 99,33 % unter Berücksichtigung der Standardabweichung als quantitativ angesehen wurde, wurde eine Gasflussrate von 40 ml/min für nachfolgende Versuchsreihen beibehalten.

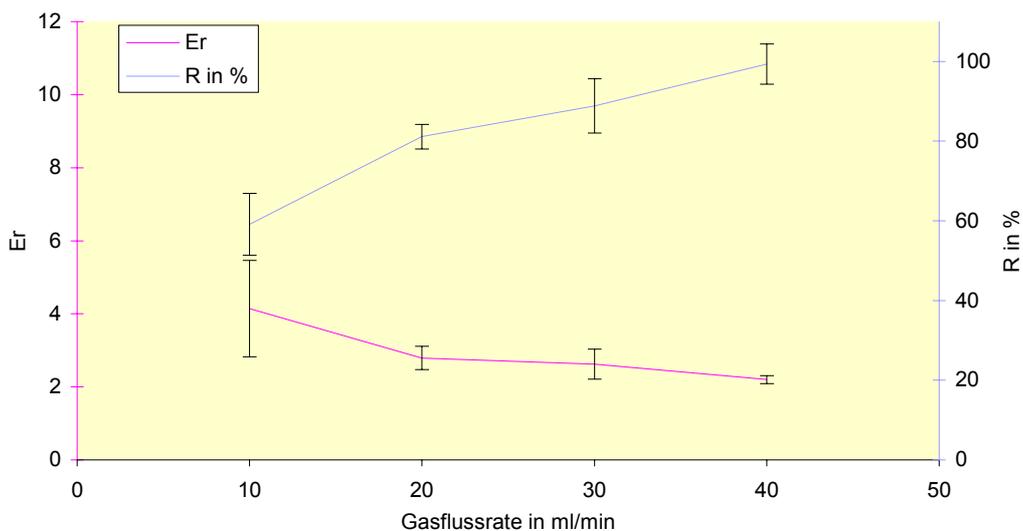


Abb.31: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; pH: 5,5; T: 20°C; Gas: N₂; Glasfilterkerze: P 3; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Nachdem ein Zusammenhang zwischen der Gasflussrate und der Effizienz der Zerschäumung hergestellt werden konnte, wurde der Einfluss der Gasart untersucht. Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob ein Zusammenhang zwischen den chemisch-physikalischen Eigenschaften des verwendeten Gases und der Wiederfindung bzw. Anreicherung der Laccase bestand. Des Weiteren sollte die Eignung von Druckluft als Gas für die Zerschäumung untersucht werden.

Tab.25: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasart nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Gas	1E_r	1R in %
CO ₂	2,10 ± 0,53	59,13 ± 7,80
Ar	1,97 ± 0,36	93,97 ± 11,15
N ₂	2,20 ± 0,11	99,33 ± 5,03
Druckluft	2,83 ± 0,53	97,18 ± 4,83
He	2,61 ± 0,82	73,12 ± 11,84

¹ Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

Diese Versuchsreihe zeigte, dass sich Argon, Druckluft und Stickstoff mit Wiederfindungen von 93,97 %, 97,18 % und 99,33 % unter Berücksichtigung der Standardabweichung eignen eine quantitative Abschäumung zu erzielen. Helium und Kohlendioxid hingegen lieferten geringere Wiederfindungen der Laccaseaktivität im Schaum. Die Anreicherungen lagen bei allen Gasen im Bereich zwischen 2 und 3. Während Argon mit einem Wert von 1,97 die geringste Anreicherung lieferte, wurde unter Verwendung von Druckluft die höchste Anreicherung mit einem Wert von 2,83 erzielt. Da die Zerschäumung mit Druckluft die gleiche Effektivität aufwies wie die Zerschäumung mit Stickstoff, wurden nachfolgende Untersuchungen mit Druckluft durchgeführt. Nachfolgend wurde der Einfluss der Gasblasengröße auf die Effizienz der Zerschäumung untersucht. Dazu wurden Glasfilterkerzen mit der Porengröße P 3 von 16-40 µm und der Porengröße P 2 von 40-100 µm für die Zerschäumung verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tab.26: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Porengröße der Glasfilterkerze nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Porengröße in µm	1E_r	1R in %
16-40	2,83 ± 0,53	97,18 ± 4,83
40-100	2,10 ± 0,17	81,72 ± 1,42

¹ Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

Die Ergebnisse zeigen, dass die Glasfilterkerze mit einer Porengrößen von 16–40 μm sowohl eine bessere Anreicherung als auch eine höhere Wiederfindung der Laccase im Schaum lieferte. Die Anreicherung betrug bei einer Porengröße von 16–40 μm 2,83 bei 97,18 % Wiederfindung. Die Zerschäumung mit einer Glasfilterkerze der Porosität 40–100 μm lieferte 81,72 % Wiederfindung bei 2,10-facher Anreicherung. Nachdem Untersuchungen bezüglich der Gaszufuhr abgeschlossen waren, wurde in weiteren Versuchsreihen der Einfluss der Säulengeometrie auf Anreicherung und Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum untersucht. Bevor der Einfluss der Säulendimensionen betrachtet wurde, wurden zunächst Untersuchungen bezüglich der Temperierbarkeit der Säule durchgeführt. Dazu wurde die Zerschäumungstemperatur von 1 $^{\circ}\text{C}$ bis 30 $^{\circ}\text{C}$ variiert. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 32 dargestellt.

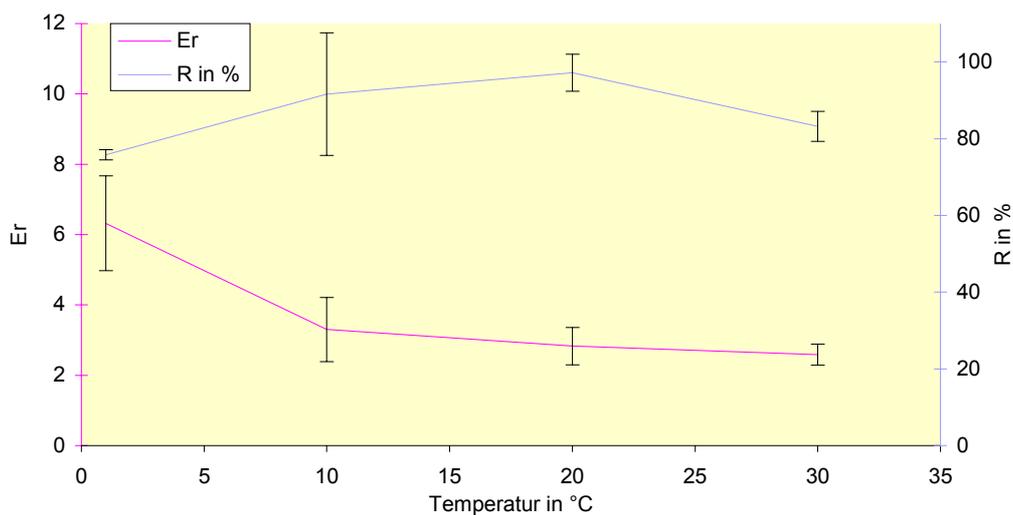


Abb.32: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zerschäumungstemperatur nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(C_{Laccase} : 0,001 mg/ml; C_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze P 3; pH-Wert: 5,5; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Aus Abbildung 32 geht hervor, dass sowohl die Wiederfindung des Enzyms im Schaum als auch die Anreicherung von der Zerschäumungstemperatur beeinflusst wurde. Während bei 20 $^{\circ}\text{C}$ eine quantitative Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum erzielt werden konnte, führte eine Reduzierung der Zerschäumungstemperatur zu einer Verminderung der Wiederfindung, so dass bei einer Temperatur von 1 $^{\circ}\text{C}$ eine Wiederfindung von 75 % erzielt wurde. Umgekehrt proportional dazu verhielt sich die Anreicherung.

Eine Absenkung der Zerschäumungstemperatur von 20 °C auf 1 °C führte zu einer Steigerung der Anreicherung von 2,83 auf 6,32 von Laccase im Schaum.

Eine Temperaturerhöhung von 20 °C auf 30 °C führte sowohl zu einer Verminderung der Anreicherung als auch der Wiederfindung. Bei 30 °C betrug die Wiederfindung 83,23 % bei 2,83-facher Anreicherung. Da bei 20 °C eine quantitative Wiederfindung erzielt werden konnte, wurde diese Zerschäumungstemperatur zur Optimierung der Säulendimensionen bezüglich des Säulendurchmessers, der Säulenlänge und des Füllstands genutzt.

In Abbildung 33 sind die Ergebnisse von Zerschäumungen mit unterschiedlichem Säulendurchmesser dargestellt. Es wurden Säulendurchmesser von 19 mm, 29 mm und 44 mm verwendet. Der Füllstand wurde bei dieser Versuchsanordnung zu Beginn der Zerschäumung auf 0,15 m eingestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass mit steigendem Säulendurchmesser die Wiederfindung im Schaum abnahm. Allerdings wurden sowohl bei einem Säulendurchmesser von 19 mm und 29 mm quantitative Wiederfindungen erzielt. Die Anreicherung im Schaum verhielt sich gegensätzlich zur Wiederfindung. Mit steigendem Durchmesser nahm die Anreicherung im Schaum von 1,40 bei 19 mm auf 2,97 bei 40 mm zu.

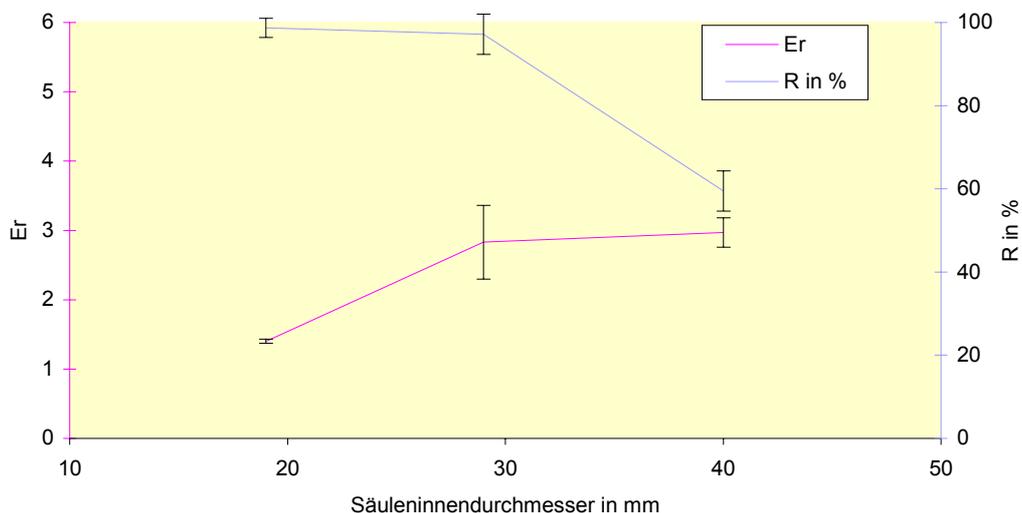


Abb.33: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom Säuleninnendurchmesser nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

($C_{Laccase}$: 0,001 mg/ml; C_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Füllstand: 0,15 m)

Nachdem ein optimaler Säulendurchmesser (29 mm) gefunden wurde, sollte in der folgenden Versuchsreihe die Säulenlänge bei konstantem Füllstand erhöht bzw. verkürzt werden. Die Ergebnisse dieser Maßnahme sind in Abbildung 34 dargestellt.

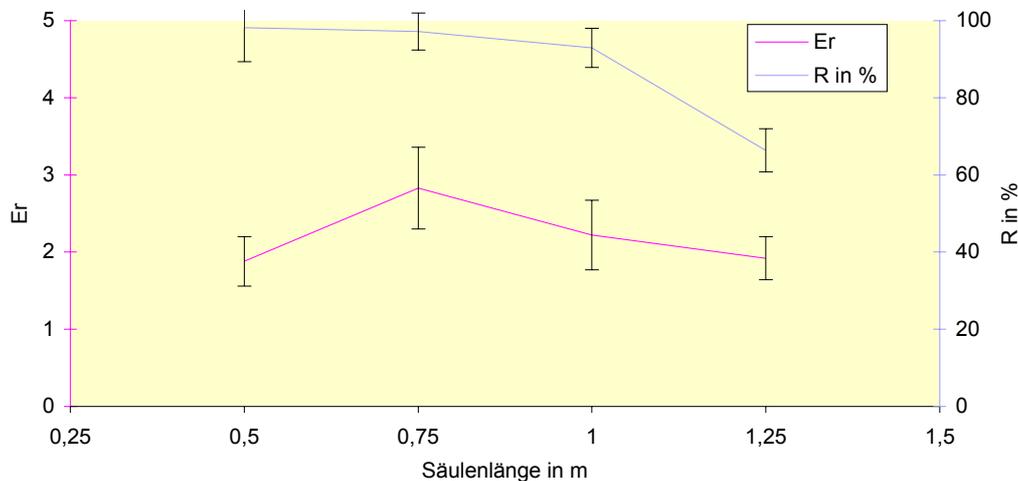


Abb.34: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Säulenlänge nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Mit Säulenlängen von 0,5 m und 0,75 m konnten quantitative Wiederfindungen erzielt werden. Eine weitere Verlängerung der Säule führte zu einer Verminderung der Wiederfindung. Bei einer Säulenlänge von 1,0 m betrug die Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum 92,93 %. Bei einer Säulenlänge von 1,25 m wurden 66,34 % der Ausgangsaktivität im Schaum wiedergefunden. Für die Anreicherung im Schaum zeichnete sich kein Trend in Abhängigkeit zur Säulenlänge ab. Die Anreicherung war bei einer Säulenlänge von 0,75 m maximal und nahm sowohl mit sinkender als auch mit steigender Säulenlänge ab. Da bei einer Säulenlänge von 0,75 m bei quantitativer Wiederfindung die höchste Anreicherung erzielt wurde, ist diese Säulenlänge für folgende Zerschäumungen verwendet worden.

Nachfolgend sollte die Abhängigkeit zwischen dem Füllstand der Säule bei konstanter Säulenlänge und der Anreicherung bzw. Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum untersucht werden. Dazu wurde der Füllstand von 0,05 m bis 0,25 m in 0,05 m-Intervallen erhöht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

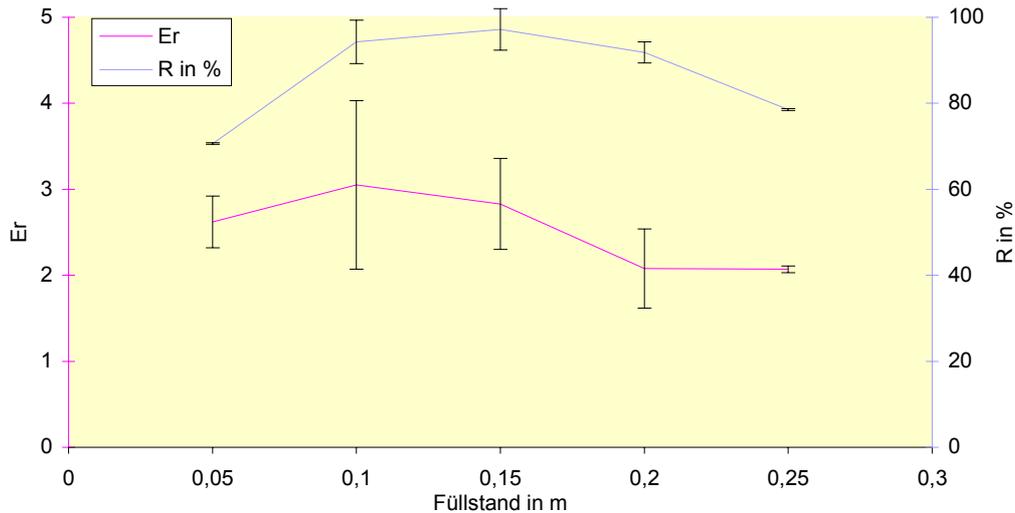


Abb.35: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom Füllstand nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

($C_{Laccase}$: 0,001 mg/ml; C_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm)

Die Wiederfindung der Aktivität im Schaum war bei einem Füllstand von 0,15 m mit einem Wert von 97,18 % maximal. Jeweils in Richtung kleinerer bzw. größerer Füllstände nahm die Wiederfindung ab, so dass bei einem Füllstand von 0,05 m lediglich eine Wiederfindung von 70,63 % und bei einem Füllstand von 0,25 m eine Wiederfindung von 78,54 % erreicht wurde. Die Anreicherung war bei einem Füllstand von 0,10 m mit einem Wert von 3,05 maximal. Allerdings trat bei diesem Wert auch die höchste Standardabweichung auf.

Um eine Verbesserung der Anreicherung bei quantitativer Abschäumung der Aktivität zu erzielen, wurden volumenvergrößernde Einbauten an unterschiedlichen Stellen der Säule positioniert. Die Auswirkung der Position des Einbaus ist in Tabelle 27 dargestellt.

Tab.27: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Positionierung volumenvergrößernder Einbauten (250 ml) nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

($C_{Laccase}$: 0,001 mg/ml; C_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Position der Einbauten	1E_r	1R in %
Unten	3,44 ± 0,74	63,74 ± 5,23
Oben	2,62 ± 0,31	77,95 ± 9,69
Ohne	2,83 ± 0,53	97,18 ± 4,83

¹ Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

Tabelle 27 zeigt die Abhängigkeit zwischen der Positionierung volumenvergrößernder Einbauten und der Anreicherung und Wiederfindung von Laccase im Schaum. Eine quantitative Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum wurde nur ohne volumenvergrößernde Einbauten erzielt. Die Zerschäumung ohne volumenvergrößernde Einbauten lieferte eine Wiederfindung von 97,18 % bei 2,83-facher Anreicherung. Zerschäumungen mit Einbauten zeigten geringere Wiederfindungen. Während die Zerschäumung mit einem Einbau am oberen Ende der Säule eine Wiederfindungen von 77,95 % lieferte, konnte mit einem Einbau am unteren Ende der Schaumsäule, direkt oberhalb der flüssigen Phase, eine Wiederfindung von 63,74 % erzielt werden.

Da dieser Versuchsaufbau aber mit einem Wert von 3,44 die höchste Anreicherung lieferte, sollte in der folgenden Versuchsreihe das Volumen des Einbaus reduziert werden, um eine höhere Wiederfindung bei guter Anreicherung zu erzielen.

In Tabelle 28 ist das Volumen des entsprechenden Einbaus gegen die Wiederfindung bzw. Anreicherung aufgetragen. Vergleichend wird die Zerschäumung ohne volumenvergrößernde Einbauten bei entsprechenden Bedingungen dargestellt.

Tab.28: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Positionierung von Einbauten unterschiedlichen Volumens nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20°C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

$V_{\text{Einbauten}}$ in ml	E_r	R in %
0	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$
50	$2,08 \pm 0,09$	$66,32 \pm 2,47$
100	$2,56 \pm 0,03$	$64,86 \pm 1,38$
250	$3,44 \pm 0,74$	$63,74 \pm 5,23$

¹ Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

Tabelle 28 zeigt, dass die Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum unabhängig vom Volumen der Einbauten war. Unabhängig vom jeweiligen Volumen des Einbaus wurden Wiederfindungen um 65 % erzielt. Eine quantitative Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum war nur ohne volumenvergrößernde Einbauten möglich. Die Anreicherung der Laccaseaktivität im Schaum nahm mit sinkendem Volumen des Einbaus ab. Betrug die Anreicherung bei einem 250 ml Einbau 3,44, nahm sie bis auf einen Wert von 2,08 bei der Zerschäumung mit einem 50 ml Einbau ab.

4.1.4. Die Konstruktion eines kontinuierlichen Schaumzerstörers

Da die chemische Schaumzerstörung, wie sie bisher durchgeführt wurde, nicht besonders nachhaltig war, d.h. eine zusätzliche Behandlung zur Schaumzerstörung mittels Druckluft nötig war, wurde ein kontinuierlicher Schaumzerstörer konstruiert. Dieser Schaumzerstörer bot die Möglichkeit den Schaum direkt nach dessen Austritt aus der Säule zu zerstören.

In Tabelle 29 sind die Anreicherungen und Wiederfindungen von Zerschäumungen aufgetragen, bei denen der Schaum einerseits herkömmlich mit SDS zerstört wurde und andererseits kontinuierlich mittels Schaumzerstörer.

Tab.29: Anreicherung und Wiederfindung nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren unter Verwendung eines kontinuierlichen Schaumzerstörers verglichen mit der chemischen Schaumzerstörung durch SDS-Lösung

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Schaumzerstörung	1E_r	1R in %
Mittels SDS-Lösung	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$
Mittels kontinuierlichem Schaumzerstörer	$3,30 \pm 0,18$	$98,46 \pm 5,48$

¹ Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

Wie aus Tabelle 29 hervorgeht, wurde sowohl bei der Zerschäumung mit herkömmlicher Rückverflüssigung mittels SDS-Lösung als auch mit kontinuierlichem Schaumzerstörer eine quantitative Wiederfindung erzielt. Während die Zerschäumung mit Rückverflüssigung durch SDS-Lösung eine Wiederfindung 97,18 % bei 2,83-facher Anreicherung aufwies, wurde bei der Zerschäumung mit kontinuierlichem Schaumzerstörer eine Wiederfindung von 98,46 % bei 3,30-facher Anreicherung erzielt.

Durch die Erzeugung des kontinuierlich zerstörten Spumates, welches direkt nach der Schaumzerstörung verfügbar war, boten sich weitere Möglichkeiten die Anreicherung bei quantitativer Wiederfindung zu verbessern. In weiteren Versuchsreihen wurden so genannte Kolonnenzerschäumungen sowie Kreislaufzerschäumungen vorgenommen.

4.1.5. Die Kolonnenzerschäumung von Laccase

In Tabelle 30 sind vergleichend Anreicherung bzw. Wiederfindung der Batch- und Kolonnenzerschäumung dargestellt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Anreicherung durch Kolonnenzerschäumung gegenüber der einfachen Batch-Zerschäumung gesteigert war.

Während bei der Kolonnenzerschäumung eine Anreicherung von 6,73 erzielt wurde, betrug sie bei der einfachen Batch-Zerschäumung 3,30. Die Wiederfindung war sowohl bei der einfachen Batch- als auch bei der Kolonnenzerschäumung quantitativ.

Tab.30: Anreicherung und Wiederfindung nach der Kolonnenzerschäumung von Laccase verglichen mit der einfachen Batch-Zerschäumung

($C_{Laccase}$: 0,001 mg/ml; C_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Zerschäumungsart	1E_r	1R in %
Batch-Zerschäumung	$3,30 \pm 0,18$	$98,46 \pm 5,48$
Kolonnenzerschäumung	$6,73 \pm 1,89$	$103,95 \pm 15,33$

¹ Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

4.1.6. Die Kreislauferschäumung von Laccase

In Tabelle 31 ist die Anreicherung und Wiederfindung der Enzymaktivität im Schaum nach Kreislauferschäumung in Abhängigkeit von der Zulaufposition (Einspeisestelle) des Spumates dargestellt. Der Zulauf des Spumates wurde am unteren Ende der Schaumsäule, d.h. direkt über der flüssigen Phase, in der Mitte und am oberen Ende der Schaumsäule platziert.

Tab.31: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zulaufposition nach der Kreislauferschäumung von Laccase

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20°C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m)

Zulaufposition	1E_r	1R in %
Unten	$4,26 \pm 0,88$	$53,66 \pm 8,29$
Mitte	$4,53 \pm 0,59$	$83,63 \pm 13,73$
Oben	$5,76 \pm 0,91$	$89,60 \pm 8,30$

1 Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

Tabelle 31 zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Zulaufposition des Spumates in die Schaumsäule und der Anreicherung bzw. Wiederfindung von Laccase im Schaum besteht. Mit zunehmender Höhe des Zulaufs nahm die Wiederfindung zu. Bei einer Injektion des Spumates am oberen Säulenende wurde eine 89,60 %-ige Wiederfindung erzielt. Bei der Einspeisung in der Mitte und am unteren Ende der Schaumsäule wurden Wiederfindungen von 83,63 % bzw. 53,66 % erzielt. Die Anreicherungen verhielten sich proportional zu diesem Trend. Während nach Zulauf des Spumates am unteren Säulenende eine Anreicherung von 4,26 erzielt wurde, betrug die Anreicherung nach Injektion in der Säulenmitte 4,53 und am oberen Säulenende 5,76.

4.2. Die kontinuierliche Zerschäumung von Laccase

Um die kontinuierliche Zerschäumung effektiv durchführen zu können, mussten auch für die kontinuierliche Zerschäumung unterschiedliche Parameter, wie die Position des Zulaufs, die Abflussrate, die Tensid-Konzentration und die Gasflussrate optimiert werden. Des Weiteren wurde eine kontinuierliche Kolonnenzerschäumung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen und Tabellen dargestellt. Tabelle 32 zeigt die Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Positionierung des Zulaufes.

Tab.32: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zulaufposition nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase

(C_{Laccase} : 0,001 mg/ml; C_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m; Abflussrate: 5 ml/min)

Zulaufposition	1E_r	1R in %
Unten	$3,20 \pm 0,03$	$62,41 \pm 1,81$
Oben	$2,29 \pm 0,06$	$79,01 \pm 7,27$

1 Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

Aus Tabelle 32 geht hervor, dass aus einer Zulaufposition am oberen Säulenende eine höhere Wiederfindung im Vergleich zur Einspeisung am unteren Säulenende resultierte. Die Wiederfindung der Zerschäumung mit Zulauf am oberen Ende betrug 79,01 %, während die Wiederfindung der Zerschäumung mit Zulauf am unteren Ende der Schaumsäule 62,41 % betrug. Die Anreicherung verhielt sich gegensätzlich zu diesem Trend. Bei der Zerschäumung mit Einspeisung am unteren Ende wurde eine Anreicherung von 3,20 erzielt, die Anreicherung nach Injektion am oberen Säulenende betrug 2,29.

Da die Wiederfindung bei der Zerschäumung mit Injektion am oberen Säulenende höher war, wurde diese Form der Einspeisung als Grundlage zur Variation weiterer Parameter genutzt.

In Abbildung 36 sind Wiederfindung und Anreicherung in Abhängigkeit von der Abflussrate der abgereicherten Lösung aufgetragen.

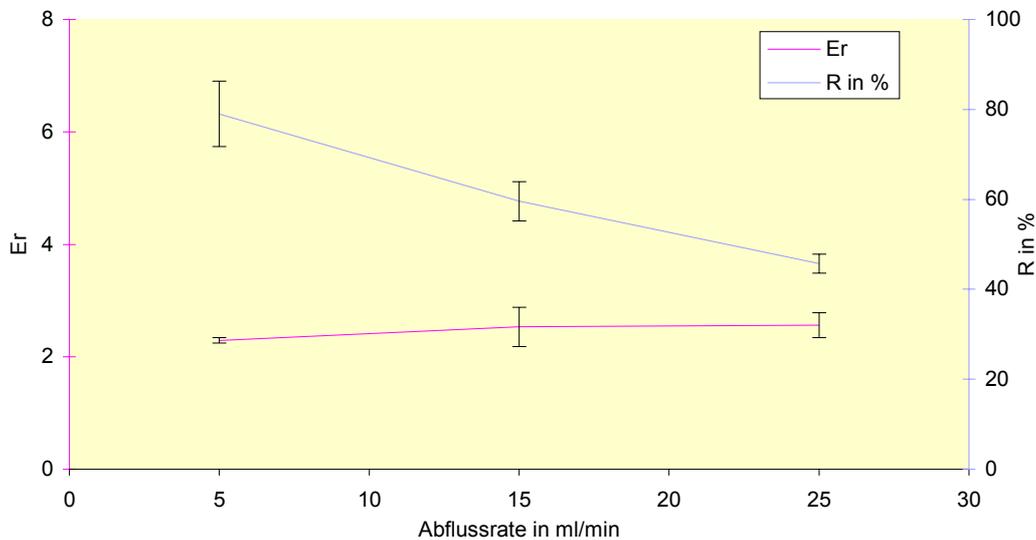


Abb.36: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Abflussrate nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m; Zulauf: oben)

Aus Abbildung 36 geht hervor, dass die Wiederfindung mit sinkender Abflussrate stieg. Während die Wiederfindung bei einer Abflussrate von 5 ml/min 79,01 % betrug, wurden bei einer Abflussrate von 1 ml/min eine Wiederfindung von 59,59 % und bei einer Abflussrate von 15 ml/min eine Wiederfindung von 45,71 % erzielt. Die Anreicherung stieg mit zunehmender Abflussrate von 2,29 bei 5 ml/min auf 2,56 bei 15 ml/min. Aufgrund der höheren Wiederfindung wurde eine Abflussrate von 5 ml/min für folgende Versuche gewählt.

Nachfolgend wurde der Einfluss der CTAB-Konzentration auf Anreicherung und Wiederfindung bei der kontinuierlichen Zerschäumung untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 37 dargestellt.

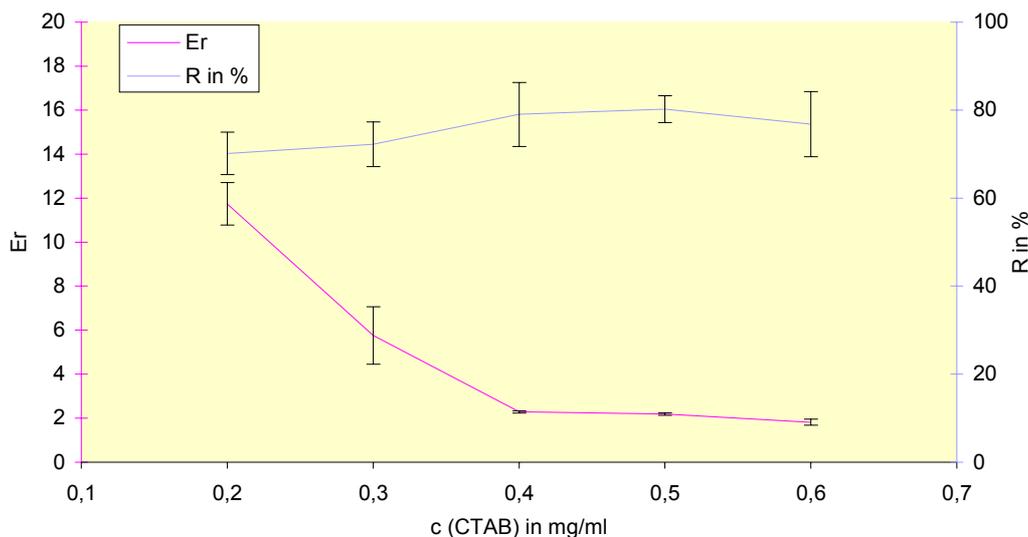


Abb.37: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase

(C_{Laccase} : 0,001 mg/ml; Gasflussrate: 0,40 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m; Zulauf: oben; Abflussrate: 5 ml/min)

Die Anreicherung der Laccaseaktivität im Schaum nahm mit steigender Konzentration an CTAB ab, wie Abbildung 37 zeigt. Während die Anreicherung bei einer CTAB-Konzentration von 0,2 mg/ml 11,74 betrug, sank sie mit zunehmender CTAB-Konzentration bis auf einen Wert von 1,82 bei 0,6 mg/ml CTAB. Die Wiederfindung lag in einem Bereich von 70,15 % bis 80,20 %. Bis zu einer Konzentration von 0,5 mg/ml CTAB nahm die Wiederfindung stetig zu und erreichte einen Wert von 80,20 %. Eine weitere Steigerung der CTAB-Konzentration auf 0,6 mg/ml führte zu einer Verringerung der Wiederfindung. Bei einer CTAB-Konzentration von 0,6 mg/ml betrug die Wiederfindung 76,82 %.

Ein weiterer veränderlicher Parameter war die Gasflussrate. Sie wurde von 30 ml/min bis 60 ml/min in Zehnerschritten variiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt. Mit steigender Gasflussrate nahm die Wiederfindung von 70,47 % bei 30 ml/min auf 96,45 % bei 60 ml/min zu. Die Anreicherung nahm umgekehrt proportional dazu ab. Während die Anreicherung bei einer Gasflussrate von 30 ml/min 5,63 betrug, war sie bei einer Gasflussrate von 60 ml/min 1,76-fach.

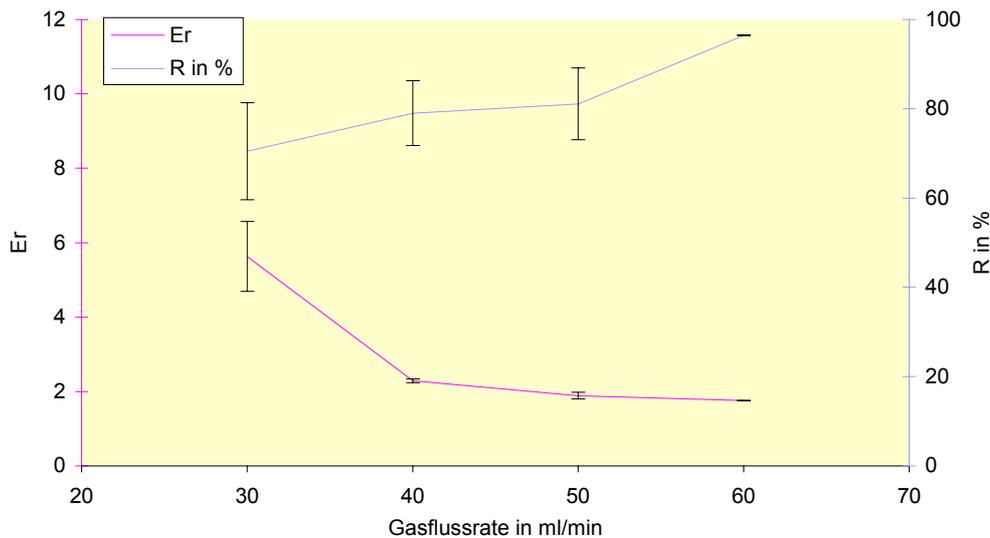


Abb.38: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20°C; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m; Zulauf: oben; Abflussrate: 5 ml/min)

4.2.1. Die kontinuierliche Kolonnenzerschäumung

Tabelle 33 zeigt die Ergebnisse der kontinuierlichen Kolonnenzerschäumung, verglichen mit denen der einfachen kontinuierlichen Zerschäumung bei sonst gleichen Bedingungen. Während die einfache kontinuierliche Zerschäumung eine Anreicherung von 1,76 lieferte, wurde mittels Kolonnenzerschäumung eine 2,43-fache Anreicherung erzielt. Die Wiederfindung betrug bei der kontinuierlichen Kolonnenzerschäumung 78,07 %, die einfache kontinuierliche Zerschäumung zeigte hingegen eine Wiederfindung von 96,45 %.

Tab.33: Anreicherung und Wiederfindung nach der kontinuierlichen Kolonnenzerschäumung von Laccase verglichen mit der kontinuierlichen Zerschäumung

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; c_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 60 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; pH-Wert: 5,5; T: 20 °C; Zerschäumungsdauer: 50 min; Säulenlänge: 0,75 m; Säulendurchmesser: 29 mm; Füllstand: 0,15 m; Zulauf: oben; Abflussrate: 5 ml/min)

	¹ E _r	¹ R in %
Kontinuierliche Kolonnenzerschäumung	2,43 ± 0,11	78,07 ± 1,85
Einfache kontinuierliche Zerschäumung	1,76 ± 0,01	96,45 ± 0,12

¹ Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

4.3. Das Pinzettenverfahren

Um die Laccase effizienter zerschäumen zu können, wurde eine spezifische Bindung zwischen dem Enzym und einem Tensid geschaffen. Diese Bindung sollte durch Komplexierung der Metallionen im aktiven Zentrum der Laccase mittels Komplexbildner entstehen (Pinzettenverfahren). Um die Komplexbildner schäumbar zu machen, sollten diese wiederum mit einem Oktyl-Rest kovalent oder ionisch mit CTAB verbunden werden. Bevor die Kopplung des Komplexbildners vorgenommen wurde, sollte die Komplexierbarkeit des Enzyms untersucht werden. Maß für die Komplexierung war die Abnahme der Enzymaktivität, d.h. die Inaktivierung des Enzyms.

4.3.1. Inaktivierung der Laccase mittels Komplexbildner und Reaktivierung

Abbildung 39 zeigt die Enzymaktivität von Laccase in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration.

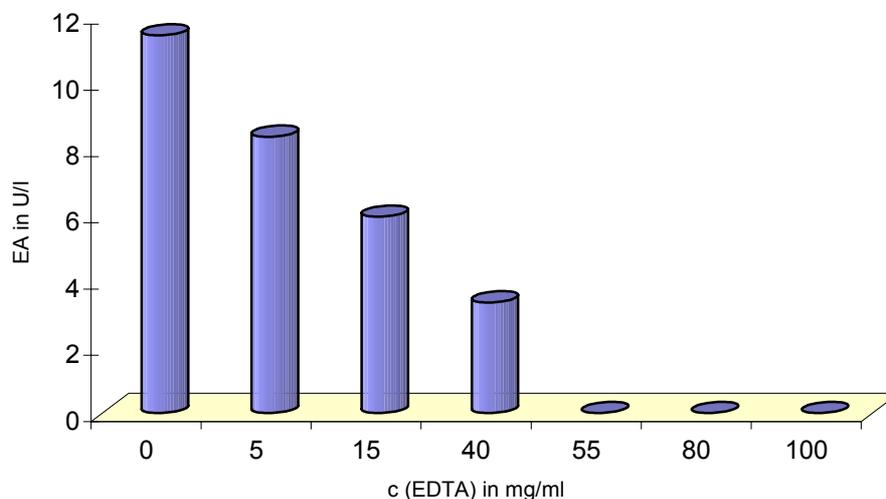


Abb.39: Enzymaktivität der Laccase in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration

Abbildung 39 zeigt, dass die Enzymaktivität von der EDTA-Konzentration abhängig war. Mit steigender EDTA-Konzentration nahm die Enzymaktivität ab. Bei einer EDTA-Konzentration von 55,0 mg/ml war keine Restaktivität mehr nachweisbar.

Um die Inaktivierung des Enzyms zur effizienten Zerschäumung im Pinzettenverfahren nutzen zu können, war es notwendig das Enzym reaktivieren zu können.

Dazu wurden dem inaktivierten Enzym verschiedene Metallkationen in Form von Salzen zugesetzt. Die Abhängigkeit zwischen der Enzymaktivität und der Zugabe verschiedener Salze in unterschiedlichen Konzentrationen ist in Abbildung 40 dargestellt.

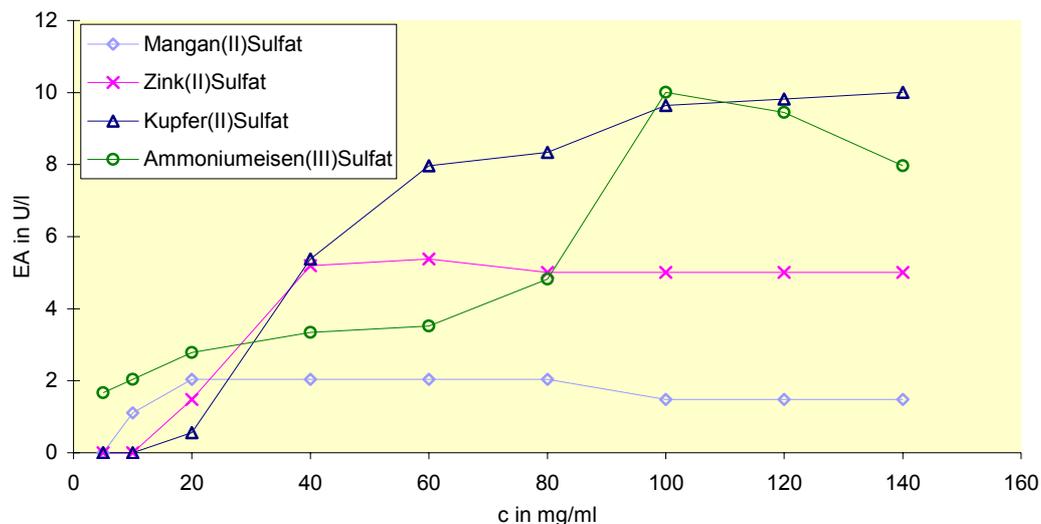


Abb.40: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels EDTA inaktivierten Laccase durch Zugabe verschiedener Salze

Durch Zugabe von Mangansulfat, Zinksulfat, Kupfersulfat und Ammoniumeisensulfat war es möglich Enzymaktivität zurückzugewinnen, wie Abbildung 40 zeigt. Dennoch war die Eignung der unterschiedlichen Salze different. Während mit Mangansulfat maximal 2,04 U/l von ursprünglich 11,40 U/l zurückgewonnen wurden, konnte mit Zinksulfat maximal 5,38 U/l reaktiviert werden. Höhere Aktivitäten konnten durch Zugabe von Kupfersulfat und Ammoniumeisensulfat erzielt werden. Während die Reaktivierung des Enzyms durch Zugabe von Kupfersulfat systematisch anstieg, war der Aktivitätsrückgewinn durch Zugabe von Ammoniumeisensulfat bei 100 mg/ml maximal; die Enzymaktivität nahm bei höheren Konzentrationen wieder ab. Durch Zugabe dieser beiden Salze konnten maximal 10,01 U/l zurückgewonnen werden. Das entsprach 87,8 % der ursprünglich eingesetzten Aktivität.

Der Anteil maximal reaktiver Enzymaktivität von der Ursprungsaktivität ist in Abbildung 41 dargestellt.

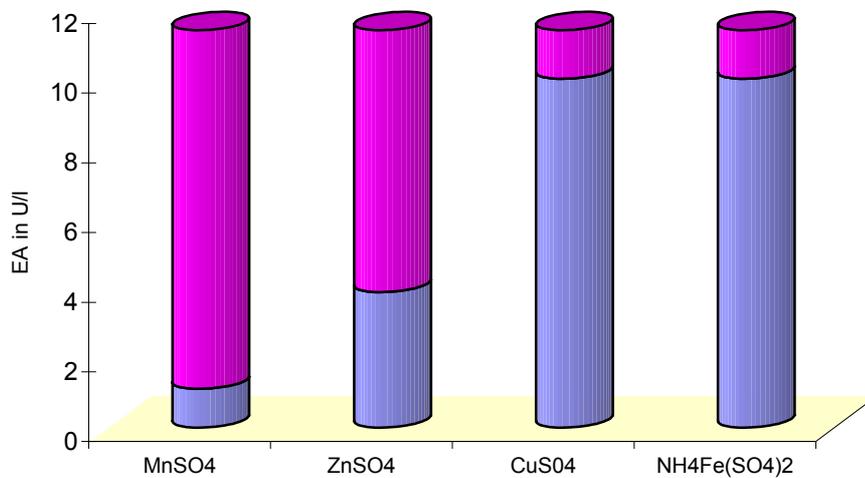


Abb.41: Anteil maximal reaktiver Enzymaktivität durch Zugabe verschiedener Salze

Eine vollständige Inaktivierung der Laccase konnte neben EDTA auch mit β -ADA und DPTA erzielt werden. Die Abhängigkeit zwischen der Konzentration dieser beiden Komplexbildner in der enzymhaltigen Nährlösung und der Enzymaktivität ist in Abbildung 42 dargestellt.

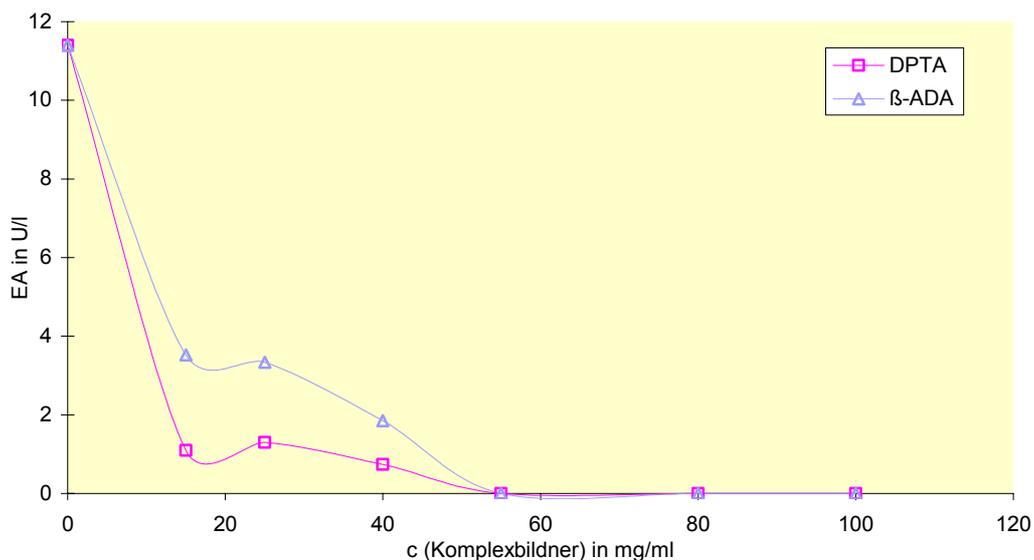


Abb.42: Enzymaktivität der Laccase in Abhängigkeit von der Konzentrationen an DPTA und β -ADA

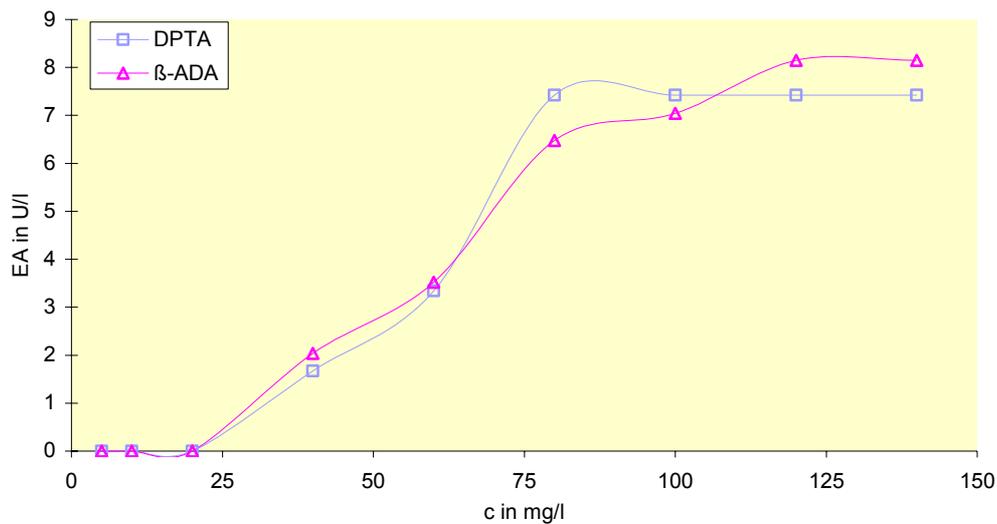


Abb.43: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels DPTA und β -ADA inaktivierten Laccase durch Zugabe von $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

Wie aus Abbildung 42 und 43 hervor geht, eigneten sich β -ADA und DPTA ebenfalls zur Inaktivierung bzw. anschließenden Reaktivierung von Laccase. Mit steigender Menge an zugesetztem Komplexbildner nahm die Enzymaktivität ab. Bei einer Konzentration von 55 mg/ml DPTA und β -ADA war keine Aktivität mehr nachweisbar. Die Inaktivierung der Laccase durch beide Komplexbildner konnte mittels $\text{Cu(II)SO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ rückgängig gemacht werden. Mit steigender Kupfersulfat-Konzentration nahm die Enzymaktivität zu. Bei einer Zugabemenge von 80 mg/ml wurden maximal 7,42 U/l der Laccaseaktivität nach Inaktivierung mit DPTA zurückgewonnen. Die maximale Reaktivierung von β -ADA-inaktivierter Laccase betrug 8,15 U/l nach einer Zugabemenge von 120 mg/ml. Nachdem die maximale Reaktivierung erreicht wurde, blieb die Enzymaktivität auch bei höheren Kupfersulfatkonzentrationen bei beiden Komplexbildnern konstant. Der Rückgewinn an Aktivität durch Zugabe von Kupfersulfat betrug nach Inaktivierung mit β -ADA 71,5%, mit DPTA 65,0 %.

Da eine Konzentration von 55 mg/ml an EDTA, DPTA und β -ADA zur vollständigen Inaktivierung der Laccase sehr hoch erschien, wurde die Messung der Enzymaktivität bei pH-Werten durchgeführt, die eine höhere Komplexstabilität erwarten ließen.

In Abbildung 44 ist die Konzentration an β -ADA, die zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms notwendig war, in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen.

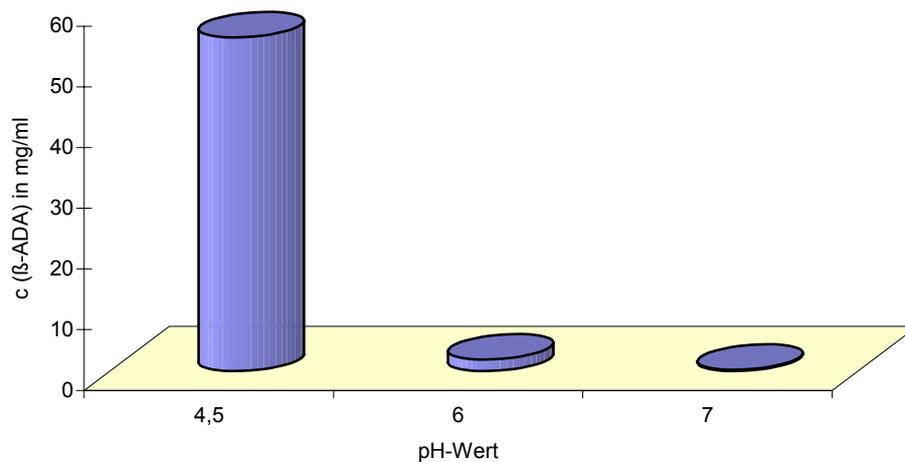


Abb.44: Minimale Konzentration an β -ADA zur vollständigen Inaktivierung von Laccase bei verschiedenen pH-Werten

Wie aus Abbildung 44 hervorgeht war die Konzentration des benötigten Komplexbildners zur vollständigen Inaktivierung der Laccase stark vom pH-Wert abhängig. Mit steigendem pH-Wert nahm die Konzentration an benötigtem Komplexbildner ab. Wurde bei pH 4,5 eine Konzentration von 55,0 mg/ml β -ADA benötigt, reichte bei pH 6,0 bereits eine Konzentration von 1,9 mg/ml zur quantitativen Inaktivierung aus. Bei pH 7,0 betrug die β -ADA-Konzentration zur vollständigen Inaktivierung lediglich 0,2 mg/ml.

4.3.2. Die Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA und CTAB

In Abbildung 45 ist die Anreicherung von Laccase nach Zerschäumung im Pinzettenverfahren mit β -ADA und CTAB in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Dem Pinzettenverfahren werden die Ergebnisse der konventionellen Zerschäumung gegenüber gestellt.

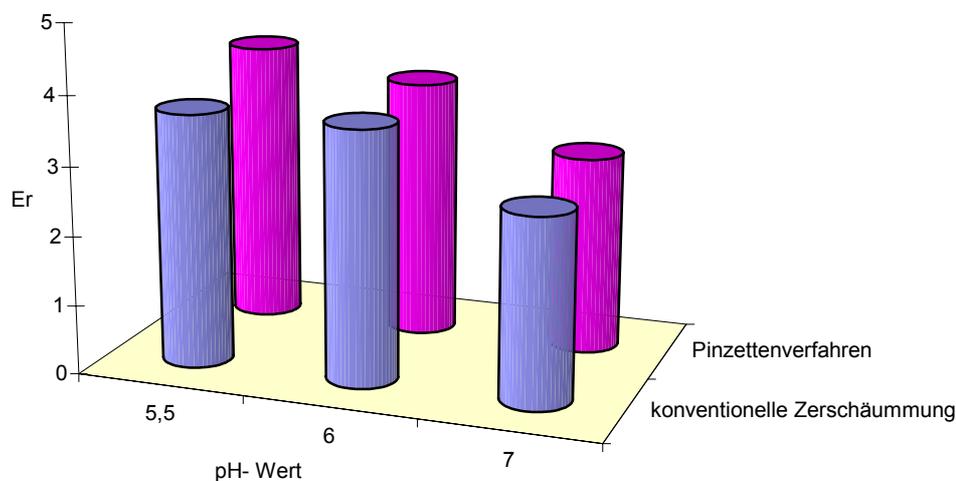


Abb.45: Anreicherung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach Pinzettenverfahren mit β -ADA und CTAB verglichen mit der konventionellen Batch-Zerschäumung von Laccase bei gleichen Bedingungen

($C_{Laccase}$: 0,001 mg/ml; C_{CTAB} : 0,40 mg/ml; Gasflussrate: 10 ml/min; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; T: 20 °C; Säulenlänge: 0,15 m; Säulendurchmesser: 11 mm; Füllstand: 30 mm, Zerschäumung aus SNL-Nährmedium)

Aus Abbildung 45 geht hervor, dass die Anreicherung des Enzyms im Pinzettenverfahren bei allen pH-Werten gegenüber der Anreicherung des Enzyms nach konventioneller Zerschäumung gesteigert war. Des Weiteren nahm die Anreicherung des Enzyms im Pinzettenverfahren mit sinkendem pH-Wert zu. Wurde bei pH 7,0 eine Anreicherung von 2,87 verzeichnet, betrug sie bei pH 6,0 3,76 und bei pH 5,5 4,12. Dieser Trend wurde auch für die konventionelle Zerschäumung beobachtet. Die Wiederfindung betrug bei der Zerschäumung im Pinzettenverfahren bei allen pH-Werten durchschnittlich 70 %. Mittels konventioneller Batch-Zerschäumung wurde hingegen eine quantitative Wiederfindung erzielt.

4.3.3. Die Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8

Zunächst musste die Konzentration an β -ADA-C8 ermittelt werden, die zur quantitativen Inaktivierung des Enzyms notwendig war. In der folgenden Abbildung ist die Enzymaktivität über der β -ADA-C8-Konzentration dargestellt.

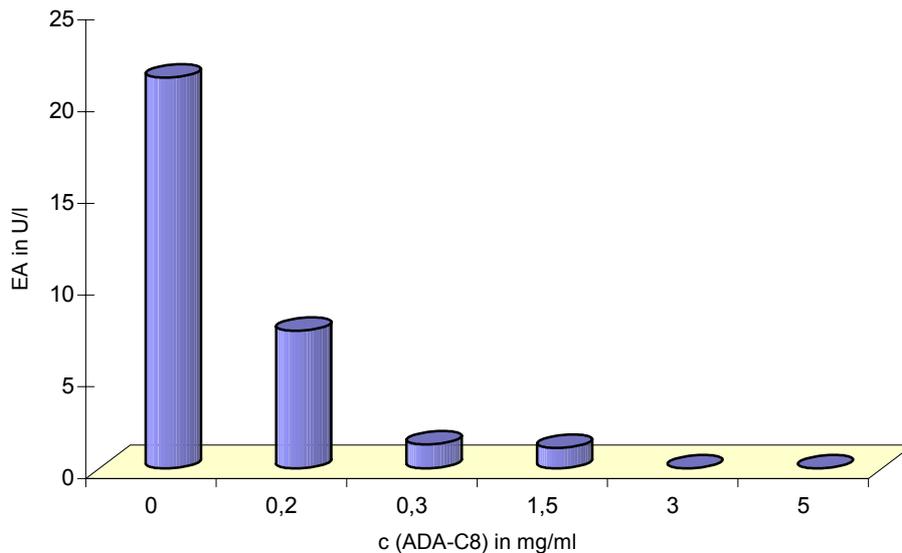


Abb.46: Enzymaktivität der Laccase in Abhängigkeit von der β -ADA-C8-Konzentration
(Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

Die Enzymaktivität nahm mit steigender Konzentration des Komplexbildners ab. Bei einer Konzentration an β -ADA-C8 von 3,0 mg/ml war bei einem pH-Wert von 6,0 keine Aktivität der Laccase mehr nachweisbar.

Die Reaktivierung der Laccase wurde nicht durch Zugabe von Kupfersulfat vorgenommen, sondern durch Absenkung des pH-Wertes auf 3,5 durch Zugabe von HCl. Eine weitere Absenkung des pH-Wertes auf 3,0 führte zur Ausfällung von β -ADA-C8. Der Komplexbildner konnte dadurch aus der Lösung abfiltriert werden.

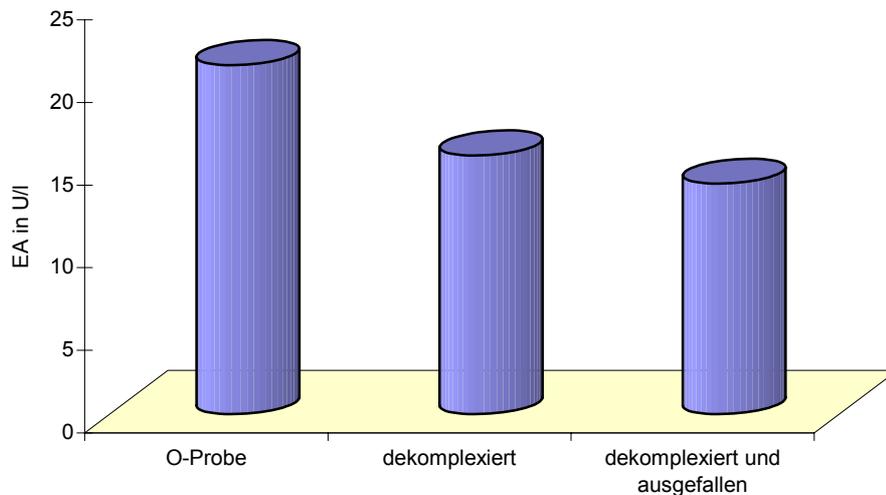


Abb.47: Enzymaktivität nach Reaktivierung von mittels β -ADA-C8 inaktivierten Laccase und Ausfällung des Komplexbildners durch Senkung des pH-Wertes (Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

Abbildung 47 zeigt, dass eine Reaktivierung der Laccase durch Absenkung des pH-Wertes mittels Säurezugabe möglich war. Es wurde eine Reaktivierung von 75 % erreicht, d.h. 15,66 U/l von ursprünglich 21,13 U/l Ausgangsaktivität wurden reaktiviert. Des Weiteren war ein Rückgewinn der Aktivität bei gleichzeitiger Ausfällung des Komplexbildners möglich. Die Enzymaktivität nach Ausfällung und Abtrennung des Komplexbildners betrug 13,95 U/l, was 66 % der ursprünglichen Aktivität entsprachen.

Nachdem eine Inaktivierung mit β -ADA-C8 mit anschließender Reaktivierung möglich war, wurde die Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 unter Variation unterschiedlicher Parameter zerschäumt. Zunächst wurde die optimale Zerschäumungsdauer ermittelt.

In Abbildung 48 ist die Abhängigkeit zwischen der Zerschäumungsdauer und der Anreicherung bzw. Wiederfindung der Laccase im Schaum dargestellt.

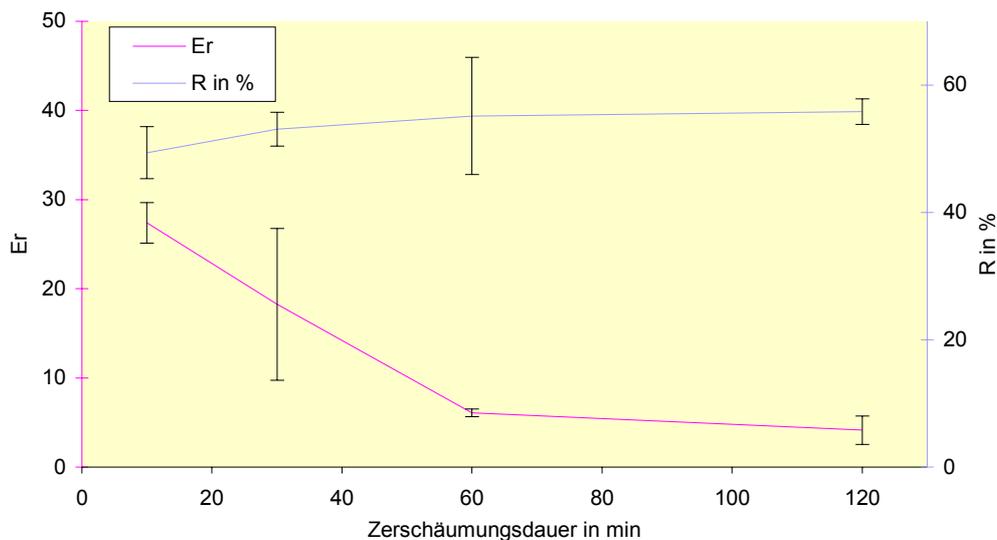


Abb.48: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zerschäumungsdauer nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; $c_{\beta\text{-ADA-C8}}$: 3,0 mg/ml; pH: 10,0; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Gasflussrate: 1 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; Säulendurchmesser: 11 mm; Säulenlänge: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumung aus demin. Wasser; Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

Wie Abbildung 48 zeigt, bestand ein Zusammenhang zwischen der Zerschäumungsdauer und der Anreicherung bzw. Wiederfindung von Laccase im Schaum. Mit zunehmender Zerschäumungsdauer nahm die Anreicherung systematisch ab. Wurde bei einer Zerschäumungsdauer von 10 min eine Anreicherung von 27,40 erzielt, betrug sie nach einer Zerschäumungsdauer von 120 min lediglich 4,14. Anders als die Anreicherung wurde die Wiederfindung weniger von der Zerschäumungsdauer beeinflusst. Betrug die Wiederfindung nach 10 min 49,38 %, so wurde sie nach 30 min auf 53,08 % gesteigert. Nach einer Zerschäumungsdauer von 120 min wurde eine Wiederfindung 55,82 % erreicht.

Nachfolgend wurde der Einfluss des pH-Wertes auf Anreicherung und Wiederfindung untersucht. Abbildung 49 zeigt die Anreicherung und Wiederfindung der Laccase in Abhängigkeit vom pH-Wert im Bereich von pH 7,0 bis 10,0.

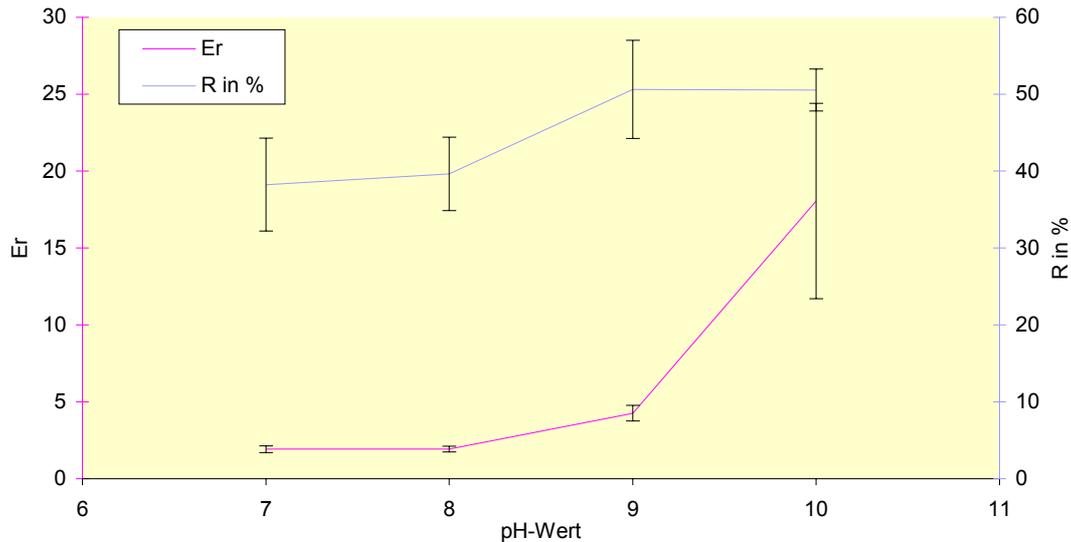


Abb.49: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; $c_{\beta\text{-ADA-C8}}$: 3,0 mg/ml; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Gasflussrate: 1 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; Säulendurchmesser: 11 mm; Säulenlänge: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumungsdauer 30 min; Zerschäumung aus demin. Wasser; Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

Aus Abbildung 49 geht hervor, dass eine klare Abhängigkeit zwischen dem pH-Wert und der Effizienz der Zerschäumung bestand. Während bei pH 7,0 und 8,0 Wiederfindungen im Bereich von 40 % erzielt wurden, lag die Wiederfindung bei pH 9,0 und 10,0 im Bereich von 50 %. Analog dazu verhielt sich die Anreicherung. Mit steigendem pH-Wert nahm die Anreicherung zu. Sie betrug bei pH 7,0 1,92. Bei pH 10,0 hingegen wurde eine 18,05-fache Anreicherung erzielt.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Gasflussrate auf die Anreicherung und Wiederfindung bei der Zerschäumung im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 dargestellt. Abbildung 50 zeigt, dass mit zunehmender Gasflussrate die Wiederfindung anstieg. Bei einer Gasflussrate von 4 ml/min betrug die Wiederfindung 66,56 %. Die Anreicherung lag bei dieser Gasflussrate lediglich bei 1,22. Mit sinkender Gasflussrate nahm die Anreicherung bis auf 18,05 bei 1 ml/min zu. Bei dieser Gasflussrate betrug die Wiederfindung 53,77 %.

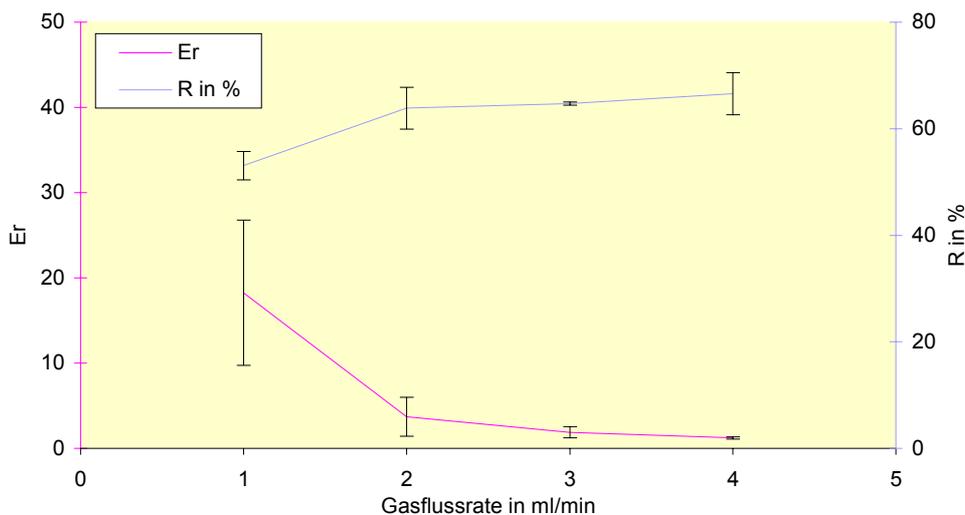


Abb.50: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; $c_{\beta\text{-ADA-C8}}$: 3,0 mg/ml; pH: 10,0; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; d: 11 mm; Säulenlänge: 0,15 m; Zerschäumungsdauer 30 min; Füllstand: 30 mm; Zerschäumung aus demin. Wasser; Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

Nachfolgend wurde der Einfluss der β -ADA-C8-Konzentration auf die Anreicherung und Wiederfindung ermittelt, wie in Abbildung 51 dargestellt.

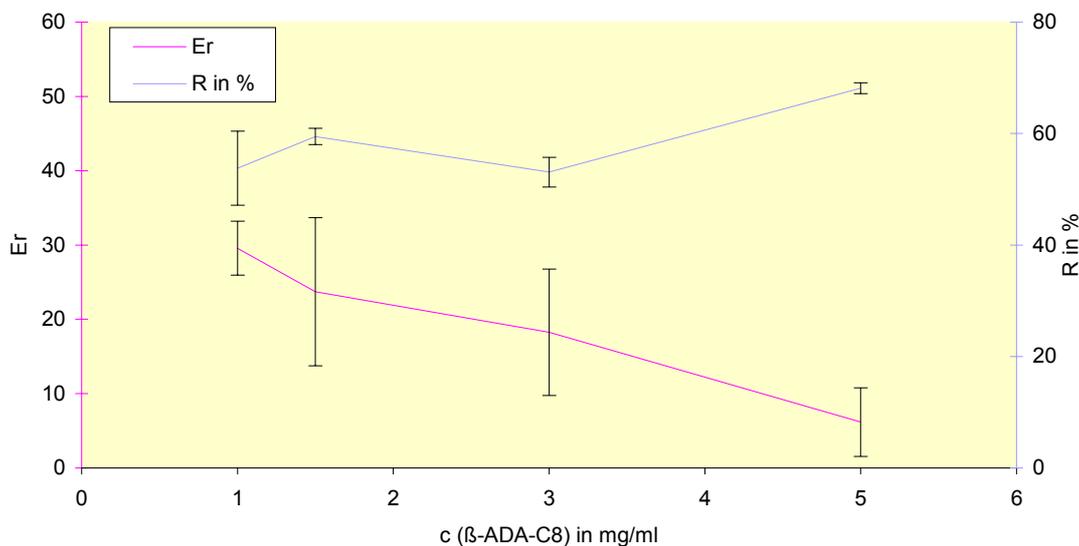


Abb.51: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der ADA-C8-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren

(c_{Laccase} : 0,001 mg/ml; pH: 10,0; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Gasflussrate: 1 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; Säulendurchmesser: 11 mm; Säulenlänge: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumungsdauer: 30 min; Zerschäumung aus demin. Wasser; Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

Mit zunehmender Konzentration an β -ADA-C8 nahm die Wiederfindung zu, während die Anreicherung abnahm. Während die Anreicherung bei einer Konzentration an β -ADA-C8 von 1,0 mg/ml 29,57 betrug, nahm die Anreicherung annähernd linear bis auf 6,18 bei 5,0 mg/ml β -ADA-C8 ab. Die Wiederfindung folgte keinem eindeutigen Trend. Sie lag bei Konzentrationen von 1,0 mg/ml bis 3,0 mg/ml zwischen 50 % und 60 %. Bei einer Konzentration von 5,0 mg/ml wurde eine maximale Wiederfindung von 68,17 % erzielt.

Nachfolgend wurde die Zerschäumung im Pinzettenverfahren nicht wie bisher aus demin. Wasser sondern aus SNL-Nährmedium durchgeführt. Abbildung 52 zeigt Anreicherung und Wiederfindung von Laccase in Abhängigkeit von der Gasflussrate bei der Zerschäumung im Pinzettenverfahren aus dem SNL-Nährmedium. Während die Anreicherung von der Gasflussrate beeinflusst wurde, war die Wiederfindung nahezu unabhängig von der Gasflussrate. Die Wiederfindung lag bei allen untersuchten Gasflussraten im Bereich von 64 % bis 69 %. Die Anreicherung der Laccase aus dem SNL-Nährmedium nahm mit steigender Gasflussrate ab. Bei einer Gasflussrate von 0,25 ml/min wurde eine Anreicherung von 13,30 erzielt. Bei einer Gasflussrate von 0,5 ml/min lag die Anreicherung bei 4,21 und bei 1 ml/min war die Anreicherung 3,02-fach.

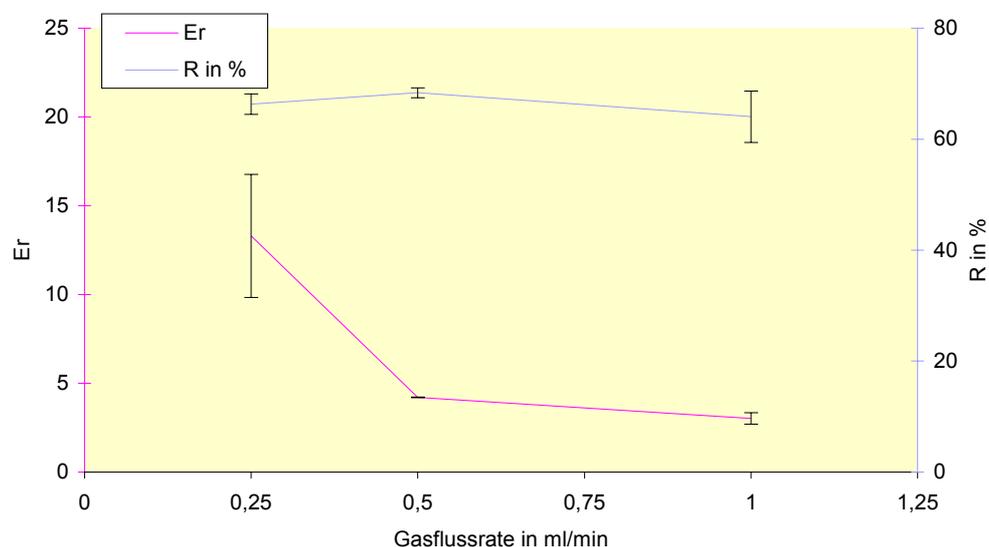


Abb.52: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 aus dem SNL-Nährmedium

($C_{Laccase}$: 0,001 mg/ml; pH: 10,0; $C_{\beta-ADA-C8}$: 3,0 mg/ml; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Glasfilterkerze: P 3; Säulendurchmesser: 11 mm; Säulenlänge: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumungsdauer 30 min; Zerschäumung aus SNL-Nährmedium; Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

In Abbildung 53 sind zusammenfassend die Ergebnisse der Zerschäumung im Pinzettenverfahren jeweils bei optimalen Zerschäumungsbedingungen dargestellt. Die Anreicherung und Wiederfindung der Laccaseaktivität im Schaum wurde über der Art des Lösungsmittels der Laccase, d.h. demin. Wasser oder SNL-Nährmedium aufgetragen.

Die Zerschäumung aus wässriger Lösung lieferte mit 18,05 eine höhere Anreicherung als die Zerschäumung aus dem SNL-Nährmedium. Bei der Zerschäumung aus dem SNL-Nährmedium betrug die Anreicherung 13,30. Umgekehrt dazu verhielt sich die Wiederfindung. Die Wiederfindung war bei der Zerschäumung aus dem Nährmedium höher und lag bei 66,31 %. Die Zerschäumung aus demin. Wasser lieferte eine Wiederfindung von 53,08 %.

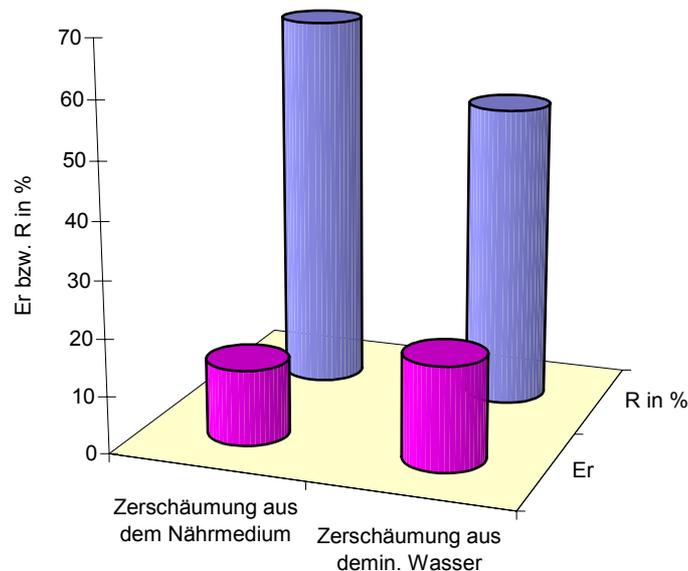


Abb.53: Vergleich zwischen der Zerschäumung im Pinzettenverfahren aus dem SNL-Nährmedium und aus demin. Wasser

4.3.3.1. Die Zerschäumung von Laccase mit Cu²⁺-β-ADA-C8-Komplexen

In dieser Versuchsreihe wurde native Laccase mit β-ADA-C8 zerschäumt. Im Gegensatz zum Pinzettenverfahren wurde β-ADA-C8 vor der Zugabe von Laccase mit Cu²⁺ gesättigt, so dass sich Cu²⁺-β-ADA-C8-Komplexe bildeten. In Tabelle 34 ist die Anreicherung und Wiederfindung der Zerschäumungen von Laccase mit den Cu²⁺-β-ADA-C8-Komplexen dargestellt. Vergleichend dazu sind Anreicherung und Wiederfindung im Pinzettenverfahren bei gleichen Zerschäumungsparametern dargestellt.

Tab.34: Anreicherung und Wiederfindung nach der Zerschäumung von Laccase mit Cu²⁺-β-ADA-C8-Komplexen

(C_{Laccase}: 0,001 mg/ml; pH: 10,0; C_{β-ADA-C8}: 3,0 mg/ml; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Gasflussrate: 1 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; Säulendurchmesser: 11 mm; Säulenlänge: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumungsdauer 30 min; Zerschäumung aus demin. Wasser; Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

Zerschäumung	¹ E _r	¹ R in %
Pinzettenverfahren	18,05 ± 8,52	53,08 ± 2,66
Laccase + Cu ²⁺ -β-ADA-C8-Komplex	0,17 ± 0,18	5,80 ± 6,22

¹ Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

Aus Tabelle 34 geht hervor, dass die Anreicherung und die Wiederfindung im Pinzettenverfahren deutlich gegenüber der Zerschäumung von Laccase mit Cu²⁺-β-ADA-C8-Komplexen gesteigert war. Während die Anreicherung im Pinzettenverfahren 18,05 betrug, wurde bei der Zerschäumung von Laccase mit Cu²⁺-β-ADA-C8-Komplexen lediglich eine Anreicherung von 0,17 erzielt. Die Wiederfindung betrug im Pinzettenverfahren 53,08 %. Die Zerschäumung von Laccase mit Cu²⁺-β-ADA-C8-Komplexen zeigte lediglich eine Wiederfindung von 5,80 %.

4.4. Die Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase im Pinzettenverfahren

Um die Meerrettich-Peroxidase im Pinzettenverfahren schäumen zu können, wurde die Inaktivierung des Enzyms mittels Komplexbildner und die Reaktivierbarkeit untersucht. Mit zunehmender Menge an β -ADA nahm die Aktivität des Enzyms ab, wie Abbildung 54 zeigt. Eine quantitative Inaktivierung bei pH 6,0 wurde mit einer β -ADA-Konzentration von 40 mg/ml erreicht.

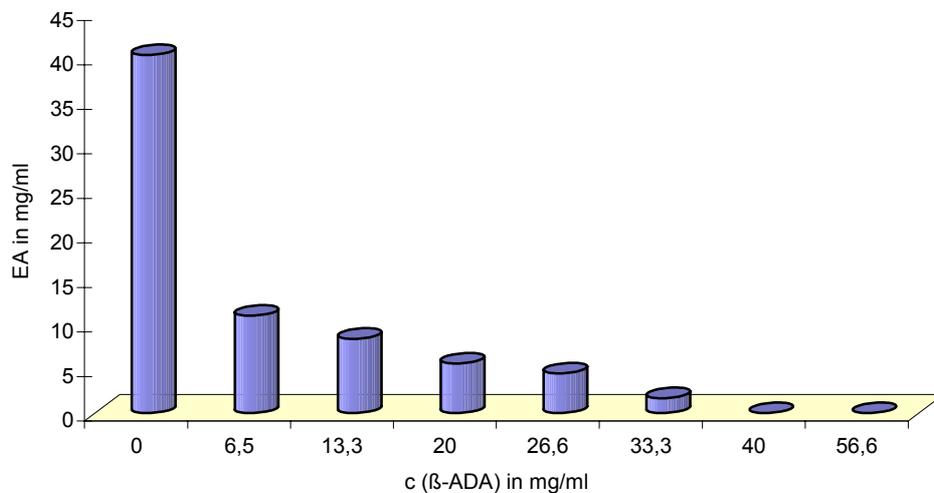


Abb.54: Enzymaktivität der Meerrettich-Peroxidase in Abhängigkeit von der β -ADA-Konzentration

(Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

Die Reaktivierung durch Absenkung des pH-Wertes ging mit der Ausfällung des Komplexbildners einher. In Abbildung 55 ist die Enzymaktivität nach Reaktivierung durch Säurezugabe dargestellt. Vergleichend dazu ist die Aktivität des nativen Enzyms in gleicher Konzentration aufgezeigt. Nach Reaktivierung der Meerrettich-Peroxidase und Abtrennung des Komplexbildners betrug die Enzymaktivität 37,81 U/l von ursprünglich 40,22 U/l. Durch Inaktivierung mit anschließender Reaktivierung, Ausfällung und Abtrennung des Komplexbildners resultierte ein Aktivitätsverlust von 6 %.

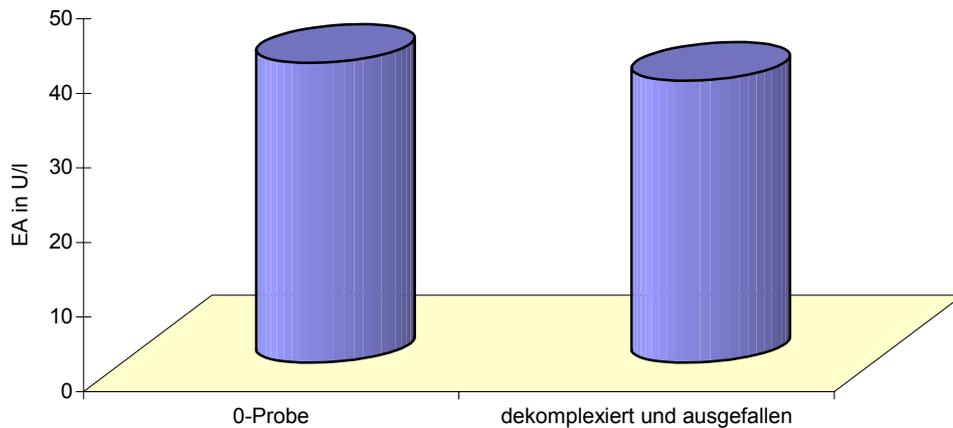


Abb.55: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels β -ADA-C8 inaktivierten Meerrettich-Peroxidase und Ausfällung des Komplexbildners durch Senkung des pH-Wertes (Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

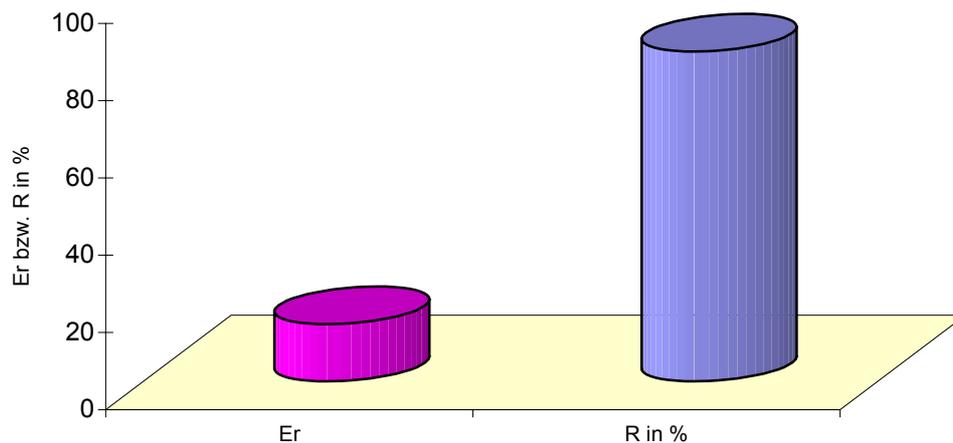


Abb.56: Anreicherung und Wiederfindung von Meerrettich-Peroxidase nach der Zerschäumung im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 aus demin. Wasser

($C_{\text{Meerrettich-Peroxidase}}$: 0,0001 mg/ml; pH: 10,0; β -ADA-C8: 65,0 mg/ml; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Gasflussrate 1 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; Säulendurchmesser: 11 mm; Säulenlänge: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumungsdauer 30 min; Zerschäumung aus demin. Wasser; Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

Abbildung 56 zeigt die Anreicherung und Wiederfindung von Meerrettich-Peroxidase im Schaum nach Zerschäumung im Pinzettenverfahren. Die Anreicherung betrug 17,78 bei einer Wiederfindung von 85,34 %.

4.4.1. Die Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase mit Fe³⁺-β-ADA-C8-Komplexen

Zur Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase mit Fe³⁺-β-ADA-C8 wurde dieses Enzym analog zur Laccase mit β-ADA-C8, welches bereits einen Komplex mit Fe³⁺ bildete, versetzt und zerschäumt.

In Tabelle 35 ist die Anreicherung und Wiederfindung der Zerschäumungen von Meerrettich-Peroxidase mit den Fe³⁺-β-ADA-C8-Komplexen dargestellt. Vergleichend dazu sind Anreicherung und Wiederfindung im Pinzettenverfahren bei gleichen Zerschäumungsparametern dargestellt.

Tab.35: Anreicherung und Wiederfindung nach der Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase mit Fe³⁺-β-ADA-C8-Komplexen

(C_{Meerrettich-Peroxidase}: 0,0001 mg/ml; pH: 10,0; c_{β-ADA-C8}: 65,0 mg/ml; T: 20 °C; Gas: Druckluft; Gasflussrate: 1 ml/min; Glasfilterkerze: P 3; Säulendurchmesser: 11 mm; Säulenlänge: 0,15 m; Füllstand: 30 mm; Zerschäumungsdauer 30 min; Zerschäumung aus demin. Wasser; Messung der Aktivität bei pH 6,0; ABTS: 5,5 mg/ml)

Zerschäumung	¹ E _r	¹ R in %
Pinzettenverfahren	17,78 ± 1,55	85,34 ± 5,52
Meerrettich-Peroxidase + Fe ³⁺ -β-ADA-C8-Komplex	0,44 ± 0,54	10,84 ± 10,90

¹ Ergebnisangabe: $\bar{x} \pm s_x$

Aus Tabelle 35 geht hervor, dass die Anreicherung und die Wiederfindung im Pinzettenverfahren deutlich gegenüber der Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase mit Fe³⁺-β-ADA-C8-Komplexen gesteigert war. Während die Anreicherung im Pinzettenverfahren 17,78 bei einer Wiederfindung von 85,34 % betrug, wurde bei der Zerschäumung von Laccase mit Fe³⁺-β-ADA-C8-Komplexen lediglich eine Anreicherung von 0,44 bei 10,84 % Wiederfindung erzielt.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es Enzyme mittels Zerschäumung unter Erhalt der katalytischen Aktivität anzureichern. Zunächst wurde das extrazelluläre Enzym Laccase (EC 1.10.3.2.) von *Trametes spec.* aus SNL-Nährmedium im Batch-Verfahren zerschäumt. Um die Effizienz der Zerschäumung zu steigern wurden im ersten Teil dieser Arbeit verschiedene Prozessparameter wie der pH-Wert, die Zerschäumungstemperatur, die Art und Menge des Tensids, die Gasflussrate, die Gasart, die Gasblasengröße, die Säulendimensionen, der Füllstand und die Positionierung von volumenvergrößernden Einbauten variiert. Des Weiteren wurde ein kontinuierlicher Schaumzerstörer entwickelt um Kolonnen- und Kreislaufzerschäumungen durchführen zu können. Um einen größeren Volumendurchsatz zu erzielen, wurde die Laccase in einer kontinuierlichen Apparatur zerschäumt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Zerschäumung in ihrer Effizienz weiter gesteigert werden. Dazu sollte eine spezifische Bindung zwischen Enzym und Tensid durch Komplexierung der Metallkationen im aktiven Zentrum der Laccase geschaffen werden. Dieses Verfahren wurde als Pinzettenverfahren definiert und durch die Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase validiert. Um die Zerschäumung im Pinzettenverfahren effizient gestalten zu können, wurden ebenfalls die Zerschäumungsparameter variiert. Die verschiedenen Zerschäumungsparameter wurden sowohl im Pinzettenverfahren als auch bei der konventionellen Zerschäumung bezüglich einer quantitativen Wiederfindung des Enzyms im Schaum bei hoher Anreicherung optimiert.

Bevor die Parameter optimiert werden konnten, musste eine Zerschäumungssäule konstruiert werden, die Anreicherung und Wiederfindung von Laccase im Schaum unter Erhalt der katalytischen Aktivität ermöglichte. Im Gegensatz zur Zerschäumung von Struktur- bzw. Vorratsproteinen ist die Zerschäumungsdauer durch die katalytische Aktivitätsperiode des Enzyms begrenzt. (*Burapatata et al., 2004*) Um die Säule zur Zerschäumung von Laccase konstruieren zu können, wurde deshalb die Zerschäumungsdauer ermittelt, die notwendig war, um das Enzym in katalytisch aktiver Form aus der Ausgangslösung abzuschäumen. Nach einer Zerschäumungsdauer von 50 min wurde ein Maximum an Laccaseaktivität aus der Ausgangslösung abgeschäumt. Die Abreicherung der Ausgangslösung betrug 87 %, wie Abbildung 22 zeigt.

Eine Aktivitätsverminderung der Ausgangslösung um 87 % könnte einerseits durch die Anreicherung des Enzyms im Schaum und andererseits durch eine Inaktivierung des Enzyms hervorgerufen werden. Beide Phänomene wurden von verschiedenen Autoren beschrieben.

Während *Burapatata* et al. (2004) eine Inaktivierung des Enzyms β -Glucosidase nach einer Zerschäumungsdauer von 10 min durch mechanische Belastung und Hydrophobizität der Grenzfläche beobachteten, gelang es *Liu* et al. (1998) Katalase unter vollständigem Erhalt der Aktivität mittels Zerschäumung anzureichern. Um festzustellen, ob eine Abreicherung der Ausgangslösung um 87 % auch einer Wiederfindung von 87 % im Schaum entsprach, wurden Zerschäumungen mit verschiedenen Schaumentnahmesystemen durchgeführt.

Als Schaumentnahmesystem diente entweder ein zweihalsiger 250 ml Rundkolben oder ein U-Rohr, welches den Schaum in eine verdünnte SDS-Lösung leitete und dadurch zerstören sollte. Die Wiederfindung der Laccaseaktivität im Schaum betrug unter Verwendung des Rundkolbens 77,33 %. Bei einer Restaktivität der Ausgangslösung von 15,77 % ergab sich ein Aktivitätsverlust von 6,87 % mit diesem Schaumentnahmesystem. Die Zerschäumung mit U-Rohr hingegen lieferte eine Wiederfindung von 80,70 %, bei einer Restaktivität von 16,07 % in der Ausgangslösung, was einem Aktivitätsverlust von 3,23 % entsprach. Die Aktivitätsverluste, die durch Zerschäumungen mittels U-Rohr induziert wurden, waren deutlich geringer als bei Zerschäumungen mit Rundkolben. Dies wurde einerseits auf die mechanische Beanspruchung zurückgeführt, die dem Schaum und somit dem Enzym beim Durchlaufen des Kolbens zugesetzt wurde. Andererseits wurde die Drainage durch den Einsatz des Kolbens verstärkt. Eine verstärkte Drainage kann zwei Auswirkungen haben. Erstens kann das Enzym mit der abströmenden Flüssigkeit ablaufen, wenn es keine ausgebildete Hydrophobizität aufweist, d.h. wenn es nicht direkt in die Grenzschicht eingelagert wurde. Des Weiteren ist es denkbar, dass es aufgrund des trockeneren Schaums zu verstärkten Protein- bzw. Enzymadsorptionen an der Glaswand kommt, wodurch das Enzym nicht mit der Schaumphase aus der Zerschäumungsapparatur gewonnen werden kann.

Da eine Zerschäumung mit U-Rohr geringere Aktivitätsverluste zur Folge hatte, wurde diese Form der Schaumentnahme zur Variation der chemisch-physikalischen Parameter gewählt. Die chemisch-physikalischen Parameter wurden zunächst bezüglich eines optimalen pH-Wertes der Ausgangslösung variiert.

Bei der Zerschäumung von Enzymen wirkt sich der Einfluss des pH-Wertes einerseits auf die Anreicherung bzw. Wiederfindung des Proteins im Schaum andererseits auf die katalytische Aktivität des Enzyms aus. Aus diesem Grund kann die Zerschäumung nur bei pH-Werten durchgeführt werden, bei denen das Enzym einerseits effizient in die Schaumphase eintritt und andererseits nicht irreversibel denaturiert wird, d.h. seine katalytische Aktivität nicht verliert.

Während in der Literatur nur wenig über die Wiederfindung von Enzymen und Proteinen im Schaum in Abhängigkeit vom pH-Wert berichtet wird, wurde die pH-abhängige Anreicherung bei der Zerschäumung von Proteinen bereits mehrfach beschrieben.

Liu et al. (1995) beschrieben, dass die Anreicherung nahe des isoelektrischen Punktes am höchsten ist. *Ahmad* (1975) führte dies auf die reduzierte Löslichkeit der Proteine am isoelektrischen Punkt zurück. Nach *Sarkar et al.* (1987) verbessern die isoelektrischen Bedingungen die Adsorption der Proteine an der Gasblase aufgrund der verringerten Löslichkeit der Proteine. *Brown et al.* (1999) führten weiterhin die geringe Oberflächenspannung am isoelektrischen Punkt als Begründung an.

Gschwendtner (2000) hingegen beschrieb eine verringerte Anreicherung am isoelektrischen Punkt und führte dies seinerseits auf die Fähigkeit der Proteine zurück, sich am isoelektrischen Punkt aufgrund ihrer verringerten Abstoßung zusammenzulagern. Dadurch nimmt die Proteingröße zu und eine Einlagerung in die hydrophobe Grenzschicht ist erschwert.

Das von *Gschwendtner* (2000) beschriebene Phänomen konnte bei der Zerschäumung von Laccase ebenfalls beobachtet werden. Im Bereich des isoelektrischen Punktes, der bei pH 3,5 liegt, wurde die geringste Anreicherung erzielt. Die Anreicherung betrug bei pH 3,0 0,84 und bei pH 4,0 1,87. Wie die Anreicherungen war auch die Wiederfindung bei diesem pH-Wert gering. Optimaler für die Zerschäumung schien pH 5,5, der natürlicher pH-Wert des Nährmediums. Bei diesem pH-Wert wurde sowohl die höchste Anreicherung als auch die größte Wiederfindung erzielt. Die Wiederfindung betrug 80,70 % bei 5,11-facher Anreicherung.

Nachdem ein optimaler pH-Wert von 5,5 für die Zerschäumung gefunden wurde, sollte der Einfluss der Tensid-Konzentration in der Ausgangslösung auf die Effizienz der Zerschäumung untersucht werden. Die Verwendung eines Tensids, wie Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) war notwendig, da das Enzym keine eigene Schaumkapazität aufwies. Der Einsatz dieses kationischen Tensids zur Zerschäumung von Enzymen wurde in der Literatur bisher nicht hinreichend beschrieben. Lediglich *Jurkiewicz* (1990) beschrieb den Einsatz von CTAB bei der Flotation als Kollektor für cyanidkomplexierte Metalle. *Walkowiak* und *Grieves* (1976) verwendeten Hexadecyltrimethylammoniumchlorid ebenfalls als Kollektor für cyanidkomplexierte Metalle.

Tharapiwattananon et al. (1996) und *Boonyasuwat* et al. (2003) beschrieben die Abschäumung kationischer Tenside aus Wasser. Sie beobachteten bei der Verwendung von Cetylpyridiniumchlorid eine Zunahme der Wiederfindung und eine Abnahme der Anreicherung mit steigender Tensidkonzentration. Ein entsprechender Trend wurde bei der Zerschäumung von Laccase mit CTAB beobachtet. Mit zunehmender CTAB-Konzentration stieg die Wiederfindung bis auf einen maximalen Wert von 85,95 % bei einer CTAB-Konzentration von 0,4 mg/ml an.

Die Anreicherung hingegen folgte keinem eindeutigen Trend. Sie war bei einer CTAB-Konzentration von 0,2 mg/ml mit einem Wert von 5,11 maximal und nahm mit steigender und sinkender Tensid-Konzentration ab.

Die Zunahme der Wiederfindung wurde auf einen zunehmend nasserem Schaum mit steigender Tensidkonzentration zurückgeführt. Nasser Schaum enthält mehr Ausgangslösung in den Lamellen als trockener Schaum, wodurch die Enzymkonzentration bzw. -aktivität gegenüber trockenem Schaum bei gleichem absolutem Gehalt an aktivem Enzym, vermindert ist. Des Weiteren enthält nasser Schaum Enzymmaterial, welches nicht direkt in die Grenzfläche eingelagert ist, sondern mit der Ausgangslösung eingetragen wurde. Daraus resultiert eine steigende Wiederfindung mit zunehmender Schaumnässe, d.h. mit zunehmender CTAB-Konzentration. Eine ähnliche These wurde von *Boonyasuwat* et al. (2003) publiziert. Sie führten einen nasserem Schaum mit steigender Tensid-Konzentration auf die verminderte Oberflächenspannung der Ausgangslösung zurück. Die verminderte Oberflächenspannung ermöglicht eine verstärkte Schaumbildung und dadurch eine gesteigerte Wiederfindung.

Da durch die Verwendung von CTAB Bromid ins Medium eingetragen wurde, ist die Eignung anderer, lebensmittelrechtlich zugelassener Tenside zur Zerschäumung von Laccase untersucht worden. Es wurde ein neutrales (Methylcellulose), ein anionisches (SDS) und ein amphoterer (Lecithin) Tensid ausgewählt. Je nach Tensid resultierten bei pH 5,5 Wiederfindungen, die im Bereich von 28,78 % bei Lecithin bis 93,53 % bei Methylcellulose lagen. Allerdings war die Anreicherung bei allen drei Tensiden im Bereich von 1.

Da eine Anreicherung von 1 kein zufriedenstellendes Ergebnis darstellte, wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Effizienz der Zerschäumung mit allen drei Tensiden untersucht. Die Zerschäumungen wurden bei pH 3,0, 3,5 und 5,5 durchgeführt.

Diese signifikanten pH-Werte wurden gewählt, da das Enzym bei pH 3,0 als Kation vorliegt. Bei pH 3,5 ist der isoelektrische Punkt der Laccase erreicht und das Enzym weist bei diesem pH-Wert eine Überschussladung von 0 auf. (*Belitz et al., 2001*) Bei pH 5,5 hingegen liegt das Enzym als Anion vor. Des Weiteren wurde bei pH 5,5 mit CTAB bei gleichen Bedingungen die höchste Anreicherung und Wiederfindung erzielt.

Mit Methylcellulose wurde bei pH 3,5 die höchste Wiederfindung mit einem Wert von 70,42 % erzielt. Methylcellulose als neutrales, ungeladenes Tensid zeigt somit die stärkste Assoziation mit Laccase, wenn deren Überschussladung Null beträgt, d.h. das Enzym nach außen ungeladen ist. Zerschäumungen mit SDS und Lecithin zeigten die höchste Wiederfindung bei pH 3,0 mit Werten von 64,10 % und 36,07 %. Anders als die Wiederfindung war die Anreicherung nahezu unabhängig vom pH-Wert der Ausgangslösung und lag fast ausnahmslos im Bereich von 1. Eine Anreicherung von 1 beschreibt im eigentlichen Sinne keine Anreicherung. Es deutet vielmehr, dass eine Verteilung des Enzyms zwischen Schaumphase und Ausgangslösung aufgetreten ist.

Eine Verteilung des Enzyms zwischen Schaum und Ausgangslösung deutet darauf hin, dass das Enzym keine Wechselwirkung mit dem entsprechenden Tensid eingegangen ist. Das Tensid ist somit zur Anreicherung des Enzyms ungeeignet. Lediglich mit SDS konnte bei pH 3,0 eine Anreicherung von 1,33 erzielt werden. Es wird vermutet, dass SDS als anionisches Tensid ionische Bindungen zur Laccase ausbilden kann, wenn diese als Kation vorliegt, d.h. bei pH-Werten kleiner dem isoelektrischen Punkt.

Aufgrund seiner Schaumkapazität transportiert SDS die Laccase durch Ausbildung der ionischen Bindungen in den Schaum. Ähnliche Abläufe werden bei der Zerschäumung mit CTAB vermutet.

CTAB als kationisches Tensid bildet ionische Bindungen zur Laccase aus, die bei pH-Werten größer 3,5 als Anion vorliegt. So wurde bei einem pH-Wert von 5,5 und einer CTAB-Konzentration von 0,4 mg/ml eine Anreicherung von 2,96 und eine 85,95 %-ige Wiederfindung erzielt. Obwohl die gleiche Form der Bindung vorliegt, ist sowohl die Anreicherung als auch die Wiederfindung von Laccase mit CTAB gegenüber SDS gesteigert. Aus diesem Grund wurde die Variation technischer Parameter mit CTAB als Tensid durchgeführt.

Die technischen Parameter beziehen sich in erster Linie auf die Säulengestaltung und die Gaszufuhr.

Die Gaszufuhr wurde zunächst bezüglich der Gasflussrate im Bereich von 10 ml/min bis 40 ml/min variiert.

Wie aus Abbildung 31 hervorgeht, bestand sowohl ein Zusammenhang zwischen der Gasflussrate und der Anreicherung, als auch zwischen der Gasflussrate und der Wiederfindung der Laccase im Schaum. Mit steigender Gasflussrate nahm die Wiederfindung zu. Bei einer Gasflussrate von 40 ml/min konnte eine quantitative Wiederfindung des Enzyms im Schaum erzielt werden. Die Anreicherung im Schaum nahm mit steigender Gasflussrate ab. Dieses Phänomen wurde auch in der Literatur von *Sarkar et al. (1987)* bei der Anreicherung von Protease aus Plazentamaterial und *Brown et al. (1998)* bei der Zerschäumung von β -Casein beschrieben. Demnach führen höhere Gasflussraten zur Ausbildung einer größeren Anzahl an Gasblasen, wodurch eine größere Oberfläche resultiert. Aufgrund der größeren Gasblasenanzahl bei höheren Flüssen wird mehr Flüssigkeit mit in den Schaum transportiert und die Verweilzeit des Schaums in der Säule verkürzt. Durch die kürzere Verweilzeit des Schaums in der Säule wird die Drainage und die Anreicherung durch Koaleszenz vermindert. Dadurch ergeben sich in der Regel geringere Anreicherungen; die Wiederfindung im Schaum hingegen ist bei höherer Gasflussrate deutlich verbessert. (*Brown et al., 1999; Noble et al., 1998; Ahmad, 1975*)

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Stickstoff als herkömmliches Zerschäumungsgas durch Druckluft zu ersetzen, da Druckluft eine wesentlich günstigere Zerschäumung ermöglicht. Dazu wurden zunächst grundsätzliche Untersuchungen durchgeführt, die den Einfluss der physikalisch-chemischen Eigenschaften eines Gases auf die Zerschäumung zeigen sollten. Neben Stickstoff wurden Zerschäumungen mit Kohlendioxid, Helium, Argon und Druckluft durchgeführt. Während Stickstoff die Eigenschaft zugesprochen wird, nasse Schäume zu bilden (*Thomas und Winkler, 1977*) sollen Kohlendioxid und Luft nach *Thomas und Winkler (1977)* sowie *Montero et al. (1993)* ungünstig für die Zerschäumung sein, da CO₂ durch Bildung von Kohlensäure den pH-Wert verändert und beide Gase einen instabilen Schaum liefern. (*Gschwendtner, 2000*)

Dieses konnte allerdings nur für Kohlendioxid bestätigt werden. Druckluft hingegen lieferte einen stabilen Schaum mit einer Wiederfindung von 97,18 % bei 2,83-facher Anreicherung. Diese Ergebnisse waren mit denen von Zerschäumungen mit Stickstoff zu vergleichen. Bei der Zerschäumung mit Stickstoff wurde eine Wiederfindung 99,33 % bei 2,20-facher Anreicherung erzielt, so dass die Zerschäumungsapparatur aus Kostengründen problemlos auf Druckluft umgestellt werden konnte. Auch Argon war geeignet quantitative Wiederfindungen zu gewährleisten. Die Anreicherung betrug bei der Zerschäumung mit Argon 1,97 und war somit die geringste im Vergleich zu den anderen Gasen. Zerschäumungen mit Helium lieferten 73,12 % Wiederfindung bei 2,61-facher Anreicherung.

Aus den Ergebnissen der Zerschäumungen mit verschiedenen Gasen ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Molekülmasse bzw. der Dichte des Gases und der Anreicherung und Wiederfindung des Enzyms im Schaum ableiten. Mit steigender Molekülmasse bzw. mit zunehmender Dichte des jeweiligen Gases nahm sowohl die Wiederfindung als auch die Anreicherung im Schaum zu. Allerdings folgten nur die Zerschäumungen mit Inertgasen diesem Trend. Druckluft und CO₂ mussten unberücksichtigt bleiben. Vergleichbare Untersuchungen wurden in der Literatur noch nicht publiziert.

Ein weiteres Kriterium für die Anreicherung bzw. Wiederfindung im Schaum ist die Porengröße der Glasfilterkerze und somit die Gasblasengröße. Bei kleineren Gasblasen ist die Gesamtoberfläche größer und wegen ihres langsameren Aufsteigens die Kontaktzeit zur Ausgangslösung länger. Dagegen wird bei größeren Gasblasen die Bildung von Kollabats und damit ebenfalls die Anreicherung gefördert. (*Brown et al.*, 1990; *Tharapiwattananon et al.*, 1996; *Uraizee und Narsimhan*, 1996; *Crofcheck und Gillette*, 2003) *Brown et al.* (1990), *Tharapiwattananon et al.* (1996) sowie *Crofcheck und Gillette* (2003) beschrieben bei der Zerschäumung von β -Casein, Rinderserumalbumin und der Aufreinigung von Abwässern mittels Zerschäumung eine verbesserte Anreicherung und eine sinkende Wiederfindung mit zunehmender Gasblasengröße. *Uraizee und Narsimhan* (1996) beobachteten ebenfalls eine verbesserte Anreicherung bei größerem Gasblasendurchmesser. *Maas* (1973) schlug eine Porosität von 16-100 μm (P 2 oder P 3) vor. Mit einer Porosität von 16-40 μm (P 3) wurde eine Wiederfindung von 97,18 % bei 2,83-facher Anreicherung erzielt.

Eine Erhöhung der Porosität auf 40-100 μm (P 2) führte bei der Zerschäumung von Laccase wie von *Brown et al.* (1999) *Tharapiwattananon et al.* (1996) sowie *Crofcheck und Gillette* (2003) beschrieben zur Verringerung der Wiederfindung. Die Wiederfindung betrug bei dieser Porengröße 81,72 %. Allerdings konnte keine Steigerung der Anreicherung durch Erhöhung der Porengröße erzielt werden.

Nachdem die Parameter bezüglich der Gaszufuhr optimiert waren, wurde die Säulengestaltung variiert. Zunächst wurde die Säule doppelwandig konstruiert, um den Einfluss der Zerschäumungstemperatur auf die Effizienz der Zerschäumung zu untersuchen.

In der Literatur wurde der Temperatureffekt bisher vernachlässigt. Lediglich *Liu et al.* (1995) berichteten von geringer Zunahme der Anreicherung durch Temperaturerhöhung von 20°C auf 50°C. Die Anreicherung von Laccase hingegen nahm mit steigender Temperatur ab, während die Wiederfindung zunahm. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von *Liu et al.* (1995) erklärt sich durch die Wahl eines Temperaturintervalls im Bereich von 1 °C bis 30 °C. Es wurde dieses Temperaturintervall gewählt, da die Laccase bei Temperaturen unterhalb von 4 °C lagerstabil ist, d.h. bei dieser Temperatur keine Aktivitätsverluste auftreten. (*ASA-Spezialenzyme*, 2003)

Bei niedrigeren Temperaturen war der Schaum trockener und es konnte eine höhere Anreicherung zu Lasten der Wiederfindung erzielt werden. Da eine quantitative Wiederfindung erst nach Erhöhung der Temperatur auf 20 °C erzielt werden konnte, wurde diese Temperatur für nachfolgende Versuche gewählt. Die weitere Verwendung einer doppelwandigen Säule war somit nicht notwendig.

Nachfolgend wurde der Einfluss der Säulendimensionen auf Anreicherung und Wiederfindung von Laccase im Schaum untersucht. Zunächst wurde der Säulendurchmesser bezüglich seiner Größe von 19 mm bis 40 mm variiert. Der Füllstand wurde bei dieser Untersuchung mit 0,15 m konstant gehalten.

Wie aus Abbildung 33 hervorgeht, sind Säulen mit Durchmessern von 19 mm und 29 mm geeignet eine quantitative Wiederfindungen von Laccase im Schaum zu erzielen. Bei einem Durchmesser von 40 mm hingegen wurden lediglich 59,46 % der Ausgangsaktivität in den Schaum transportiert. Es wird vermutet, dass die geringere Wiederfindung bei höherem Durchmesser auf das größere Volumen der Ausgangslösung und damit auf eine höhere Gesamtmenge an Enzym zurückzuführen ist.

Aus diesem Grund wurde in einer zweiten Versuchsreihe mit einem Säulendurchmesser von 40 mm die Zerschäumungsdauer verlängert. Aber auch eine Zerschäumungsdauer von 70 bzw. 95 min lieferten keine besseren Wiederfindungen. Es wurde sogar ein gegenteiliger Effekt erzielt. Der Verlust an Aktivität und somit die Inaktivierung des Enzyms nahm mit der Zerschäumungsdauer stark zu.

In der Literatur werden keine Angaben zur Wiederfindung von Enzymen bei variierendem Säulendurchmesser gemacht. *Liu et al. (1995)* beschrieben für die Zerschäumung von Rinderserumalbumin mit Durchmessern von 8 und 35 mm eine verbesserte Anreicherung bei kleinerem Säulendurchmesser. Sie führten dieses auf den höheren Druck, der in der engeren Säule auf die Gasblasen wirkt zurück, wodurch die Koaleszenz verstärkt wird. Weiterhin führten *Liu et al. (1995)* an, dass bei kleinerem Säulendurchmesser ein stärkerer Kontakt zwischen der aufsteigenden Schaumphase und dem ablaufenden Flüssigkeitsfilm besteht, was zu einer Verbesserung der Anreicherung führt. Zudem ist nach *Liu et al. (1995)* die gravitationsbedingte Drainage bei kleinerem Säulendurchmesser erleichtert, da die ablaufende Flüssigkeit weniger quervernetzte Kanäle durchlaufen muss.

Die von *Liu et al.* (1995) beschriebenen Zusammenhänge konnten bei der Anreicherung der Laccase nicht bestätigt werden, da durch die Verwendung einer dünneren Säule ein weitaus nasserer Schaum resultierte, der keine hohe Anreicherung ermöglichte. Die Anreicherung betrug bei einem Säulendurchmesser von 19 mm 1,40 und konnte durch Erhöhung des Durchmessers auf 40 mm auf 2,97 gesteigert werden. Die höhere Anreicherung bei größerem Durchmesser wird auf eine gesteigerte Koaleszenz aufgrund des vergrößerten Schaumquerschnitts zurückgeführt. Verstärkte Koaleszenz bedingt höhere Drainageeffekte und es resultiert trockenerer Schaum mit höherer Anreicherung. Eine zunehmende Anreicherung mit steigendem Säulendurchmesser wurde von *Viehweg und Schügerl* (1983) bei der Flotation von Hefen beobachtet.

Des Weiteren wurden die Säulendimensionen bezüglich der Säulenlänge optimiert. Säulenlängen von 0,5 m und 0,75 m lieferten eine quantitative Wiederfindung der Laccase im Schaum. Eine weitere Verlängerung der Säule auf 1,00 m und 1,25 m führte zu einer Abnahme der Wiederfindung. Dieses wird auf erhöhte Drainageeffekte mit zunehmender Säulenlänge zurückgeführt. (*Liu et al.* 1995; *Brown et al.*, 1999).

Nachdem der Füllstand in den vorherigen Versuchsanordnungen jeweils konstant gehalten wurde, sollte in der folgenden Versuchsreihe der Effekt der Füllstandsänderung auf Anreicherung und Wiederfindung untersucht werden. Die Füllstandshöhe wurde von 0,05 m bis 0,25 m variiert. Bis zu einem Füllstand von 0,15 m wurde die Wiederfindung durch Füllstandserhöhungen verbessert und war bei diesem Füllstand quantitativ. Eine weitere Erhöhung des Füllstandes führte zu einer Verschlechterung der Wiederfindung. Die Verbesserung der Wiederfindung bis zu einem Füllstand von 0,15 m wird auf eine verlängerte Kontaktzeit der Blasen mit der Ausgangslösung zurückgeführt. Dieses wurde auch von *Ahmad*, (1975), *Uraizee und Narsimhan*, (1995) und *Bhattacharjee et al.* (1997) für die Anreicherung von Proteinen beschrieben. Bei Füllständen größer 0,15 m nahm das Volumen an Ausgangslösung und somit die Gesamtmenge an Enzym soweit zu, dass eine quantitative Abschäumung innerhalb von 50 min nicht gewährleistet werden konnte. Wie bereits bei der Variation des Säulendurchmessers beschrieben ist eine Verlängerung der Zerschäumungsdauer allerdings nicht sinnvoll, da die Inaktivierung des Enzyms mit der Zerschäumungsdauer zunahm.

Um eine höhere Anreicherung zu erzielen wurde die Säule in einem nächsten Schritt mit volumenvergrößernden Einbauten versehen. Die Säulenlänge betrug weiterhin 0,75 m. *Schonfeld* und *Kibbey* (1967) verwendeten beispielsweise einen zylinderförmigen Einsatz im oberen Teil der Säule zur Verbesserung der Drainage. *Banerjee* et al. (1993) gestalteten die gesamte Säule aus jeweils vier übereinander gesetzten trichterförmigen Teilstücken und beobachtete eine verbesserte Drainage durch Ausdehnung und Konzentrierung des Schaums bei der Zerschäumung von Proteasen. Des Weiteren bedingen volumenvergrößernde Einbauten eine Verlängerung der Verweilzeit des Schaums in der Säule und somit eine verlängerte Drainagezeit. (*Schonfeld* und *Kibbey*, 1967; *Elizalde* et al., 1991) Wie bereits beschrieben führt eine verstärkte Drainage einerseits zu höherer Anreicherung des Proteins. Andererseits fließt aber auch Protein, das nicht in die Grenzschicht eingelagert wurde mit der abfließenden Flüssigkeit in die Ausgangslösung zurück, was sich in einer verminderten Wiederfindung ausdrückt. In dieser Arbeit wurden keine trichterförmigen Einbauten verwendet wie bei *Schonfeld* und *Kibbey* (1967) oder *Banerjee* et al. (1993), sondern zweihalsige Rundkolben.

Die 250 ml Rundkolben wurden entweder am unteren Ende der Schaumsäule direkt oberhalb des Füllstands oder am oberen Ende der Schaumsäule platziert. Die Positionierung des Rundkolbens am oberen Ende der Schaumsäule lieferte ähnliche Ergebnisse, wie die zunächst verwendete Apparatur mit Kolben zum Auffangen des Schaums. Durch die Positionierung des Kolbens am oberen Säulenende wurde eine Wiederfindung von 77,95 % bei 2,62-facher Anreicherung erzielt. Die Positionierung eines Rundkolbens am unteren Ende der Schaumsäule führte zwar zu einer deutlich schlechteren Wiederfindung mit 63,74 %, die Anreicherung konnte allerdings auf 3,44 im Vergleich zu 2,83 ohne Einbau gesteigert werden. Um die Wiederfindung bei möglichst gleicher Anreicherung zu verbessern, wurden Einbauten kleineren Volumens an gleicher Stelle platziert. Durch diese Maßnahme verschlechterte sich allerdings die Anreicherung mit abnehmendem Volumen des Einbaus. Die Wiederfindung blieb im Bereich von 65 % konstant. Daraus lässt sich ableiten, dass volumenvergrößernde Einbauten für diese Art von Anwendung nicht geeignet sind, da eine quantitative Wiederfindung durch eine verstärkte Drainage nicht realisiert werden kann.

Nachdem die optimalen chemisch-physikalischen und technischen Parameter für eine hohe Anreicherung und eine quantitative Wiederfindung ermittelt waren, sollte die Konstruktion eines kontinuierlichen Schaumzerstörers folgen.

Der kontinuierliche Schaumzerstörer wurde konstruiert, da die chemische Schaumzerstörung mittels SDS-Lösung, wie sie bisher durchgeführt wurde, nicht zufriedenstellend war. Eine weitere Behandlung mittels Druckluft war nötig, um den Schaum vollständig zu verflüssigen. Der entwickelte Schaumzerstörer hingegen bot die Möglichkeit den Schaum direkt nach Verlassen der Säule zu verflüssigen und schaffte die Grundvoraussetzung für die Kolonnen-, Kreislauf- und die kontinuierliche Zerschäumung.

Der kontinuierliche Schaumzerstörer wich von bereits publizierten Modellen ab, die sich als nicht praktikabel erwiesen. Die publizierten Modelle arbeiteten auf Basis einer Zentrifuge (*Lemlich*, 1961), eines Rührpaddels (*Lucema et al.*, 1996) oder der Zerstörung durch ein Glasperlenbett (*Banerjee et al.*, 1993). Der Schaumzerstörer, der in dieser Arbeit konstruiert wurde, basierte auf einer Druckdifferenz zwischen Schaumseite und Spumatseite. Eine Wasserstrahlpumpe erzeugte ein Vakuum mit dessen Hilfe der Schaum durch eine enge Kapillare gezogen wurde, um dann die Schaumblasen auf der Niederdruckseite zerplatzen zu lassen.

Die Frage, ob das Enzym den Belastungen der Schaumzerstörung ohne Verlust katalytischer Aktivität standhalten konnte, wurde durch vergleichende Zerschäumungen mit Rückverflüssigung des Schaums durch SDS-Lösung bzw. Zerschäumungen mit Schaumzerstörer bei sonst gleichen Bedingungen untersucht.

Die Wiederfindung und die Anreicherung beider Verfahren zur Schaumzerstörung waren vergleichbar. Die Wiederfindung bei der Zerschäumung mit kontinuierlichem Schaumzerstörer betrug 98,46 % bei 3,30-facher Anreicherung. Die Zerschäumung mit Schaumzerstörung durch SDS-Lösung erzielte eine Wiederfindung von 97,18 % bei 2,83-facher Anreicherung. Die Anreicherung stellt bei der Schaumrückverflüssigung mittels SDS-Lösung allerdings nur einen rechnerischen Wert dar, da die Verdünnung durch SDS-Lösung zur Schaumzerstörung rechnerisch beglichen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die mechanische Schaumzerstörung keine Nachteile gegenüber der herkömmlichen aufweist, da keine Aktivitätsverluste induziert wurden. Vielmehr wurde durch die kontinuierliche Schaumzerstörung die Möglichkeit eröffnet, die Anreicherung durch Kolonnen- und Kreislaufzerschäumung weiter zu steigern.

Die Kolonnenzerschäumung eignete sich grundsätzlich um die Anreicherung des Enzyms bei quantitativer Wiederfindung zu steigern. Die Anreicherung betrug nach Kolonnenzerschäumung 6,73 im Vergleich zur Anreicherung bei der einfachen Batch-Zerschäumung von 3,30 bei sonst identischen Bedingungen. Bereits *Ostwald* et al. (1941) und *Leonard* et al., (1978) berichteten von der Effektivität der Kolonnenzerschäumung. Allerdings war der experimentelle Aufbau der Anlagen dieser Autoren nicht direkt untereinander und auch nicht mit der in dieser Arbeit verwendeten Anlage vergleichbar.

Anders als die Kolonnenzerschäumung lieferte die Kreislaufzerschäumung keine quantitative Wiederfindung. Die Wiederfindung bei diesem Versuchsaufbau betrug maximal 89,60 %, wenn der Zulauf des Spumates am oberen Säulenende platziert wurde. Mit sinkender Zulaufstelle des Spumates entlang der Schaumsäule nahm die Wiederfindung ab. Wurde der Zulauf des Spumates am unteren Ende der Säule, also direkt über dem Füllstand platziert, betrug die Wiederfindung lediglich 53,66 %. Es wird angenommen, dass mit sinkender Zulaufposition mehr Spumat einschließlich Enzym in die Ausgangslösung fließt, ehe sich das Enzym im Schaum anlagert. CTAB hingegen verbleibt aufgrund seines hydrophoben Restes in der Schaumphase. Da das Enzym keine eigene Schaumkapazität aufweist, resultiert aus einem CTAB-Unterschuss im Vergleich zur Enzymkonzentration in der Ausgangslösung eine verminderte Wiederfindung, da das Enzym ohne CTAB nicht in der Lage ist erneut in die Schaumphase einzutreten. Mit steigender Zulaufposition des Spumates, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für das Enzym während der Zerschäumung in der Schaumphase zu verbleiben, wodurch die Wiederfindung gesteigert wird.

Wie die Wiederfindung nahm auch die Anreicherung mit steigender Zulaufposition zu. Sie erreicht bei einem Zulauf am oberen Säulenende der Kreislaufzerschäumung einen Maximalwert von 5,76.

Dementsprechend ist auch die Anreicherung, die durch Kreislaufzerschäumung erzielt wurde, gegenüber der einfachen Batch-Zerschäumung gesteigert. Ähnliche Ergebnisse wurden von *Ostwald* et al. (1941) bei der Zerschäumung von Diastase erzielt. Auch sie konnten die Anreicherung durch Kreislaufzerschäumung gegenüber der einfachen Batch-Zerschäumung steigern.

Grievess (1982) führte die Steigerung der Anreicherung durch Kreislaufzerschäumung mit hoher Zulaufposition auf die Einstellung mehrerer Fließgleichgewichte zurück, die entlang der Schaumsäule auftreten. Diese Fließgleichgewichte stellen sich ein, da sich der Flüssigkeitsstrom, der durch die Kapillaren herabfließt und der aufsteigende Schaumstrom vermehrt begegnen und somit die Einlagerung oberflächenaktiver Verbindungen in die Grenzfläche erleichtert wird.

Nachdem die Effizienz der Kolonnen- und Kreislaufzerschäumung untersucht war, wurde eine kontinuierliche Zerschäumungsapparatur konzipiert, um einen größeren Volumendurchsatz erzielen zu können, wie er beispielsweise für industrielle Anwendungen gefordert wird. Zunächst wurde eine kontinuierliche Zerschäumungsanlage nach Abbildung 21 konzipiert. Voraussetzung zur Zerschäumung von Enzymen war die Temperierbarkeit des Vorratsgefäßes, um eine Inaktivierung des Enzyms vor Zerschäumungsbeginn zu vermeiden. Der Produktstrom wurde dadurch mit einer Temperatur von 1 °C in die Säule eingespeist, was jedoch nicht der optimalen Zerschäumungstemperatur entsprach.

Um die kontinuierliche Zerschäumung effizient zu gestalten, musste auch bei dieser Zerschäumungsapparatur der Einfluss unterschiedlicher Parameter auf Anreicherung und Wiederfindung bestimmt werden. Parameter wie der pH-Wert der Ausgangslösung und die Säulendimensionen hingegen wurden aus der Batch-Zerschäumung adaptiert. Zunächst wurde die Abhängigkeit zwischen Anreicherung bzw. Wiederfindung und der Positionierung des Produktzulaufes bei der kontinuierlichen Zerschäumung untersucht. Während der Produktzulauf am unteren Ende der Schaumsäule eine Wiederfindung von 62,41 % bei 3,20-facher Anreicherung lieferte, wurde durch Einspeisung am oberen Säulenende eine 2,29-fache Anreicherung bei 79,01 % Wiederfindung erzielt. Anreicherung und Wiederfindung verhielten sich somit umgekehrt proportional zueinander. Dieses Verhalten wird auf einen zunehmend nassen Schaum mit steigender Zulaufposition zurückgeführt. Ein Produktzulauf am oberen Ende der Säule bewirkt, dass die gesamte eingespeiste Ausgangslösung die Schaumphase passieren muss.

Dadurch ist zunächst sämtliches Tensid und Enzym aber auch ein hoher Flüssigkeitsanteil im Schaum, wodurch eine starke Drainage notwendig wird, wenn hohe Anreicherungen erzielt werden sollen. Wird der Produktstrom am oberen Ende der Schaumsäule injiziert, verbleibt allerdings nur wenig Drainagezeit, bis der Schaum aufgefangen und rückverflüssigt wird.

Aus diesem Grund enthält das Spumat einerseits einen hohen Flüssigkeitsanteil, was eine verschlechterte Anreicherung bedingt. Andererseits ist durch den hohen Flüssigkeitsanteil auch Enzymmaterial im Spumat, welches nicht direkt oder über ionische Wechselwirkungen in die Grenzschicht eingelagert wurde und bei längerer Drainagezeit mit der abströmenden Flüssigkeit abgeflossen wäre. Dieser Aspekt bedingt die gesteigerte Wiederfindung bei einem Zulauf am oberen Säulenende.

Diese These kann nicht durch Literaturstellen untermauert werden, da diesbezügliche Untersuchungen bisher nicht publiziert wurden. Ein Vergleich zwischen der Zulaufposition bei der kontinuierlichen Zerschäumung und der Kreislaufzerschäumung ist nicht möglich, da bei der Kreislaufzerschäumung angereichertes Spumat injiziert wird, bei der kontinuierlichen Zerschäumung hingegen weniger konzentrierte Ausgangslösung.

Anders als die Positionierung des Produktzulaufes wurde die Produktstromrate als Prozessvariable in der Literatur mehrfach beschrieben. *Brown et al.* (1998) beschrieben für die Zerschäumung von β -Casein eine sinkende Wiederfindung und Anreicherung mit steigendem Produktstrom. Sie führten die sinkende Anreicherung auf einen höheren Proteineintrag in die Zerschäumungsapparatur bei höherem Produktstrom zurück. Daraus resultiert ein stabilerer Schaum, eine verringerte Koaleszenz und somit eine verringerte Anreicherung des Proteins. Die Wiederfindung nahm bei *Brown et al.* (1998) bei höheren Produktströmen ab. Sie führten dies auf eine unvollständige Proteinabtrennung bei hohem Produktstrom zurück. Ähnliches wurde bei der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase beobachtet. Hier wurde allerdings nicht die Abhängigkeit zwischen Anreicherung bzw. Wiederfindung und der Produktstromrate ermittelt. Der Produktstrom wurde durch die Abflussrate an abgereicherter Flüssigkeit ersetzt. Während der Produktstrom variabel so eingestellt wurde, dass ein konstanter Füllstand eintrat, wurde die Abflussrate konstant gehalten. Bei konstanten Bedingungen war die Abflussrate allerdings proportional zum Produktstrom. Der Produktstrom war bei konstanten Bedingungen 3 ml/min höher als die Abflussrate. Die Wiederfindung von Laccase im Schaum nahm mit steigender Abflussrate ab. Während die Wiederfindung bei einer Abflussrate von 5 ml/min 79,01 % betrug, wurde bei einer Abflussrate von 25 ml/min lediglich eine Wiederfindung von 45,71 % erzielt.

Die sinkende Wiederfindung mit steigender Abflussrate wurde darauf zurückgeführt, dass die zuströmende Laccase in der gegebenen Zerschäumungsdauer nicht vollständig in den Schaum eingelagert werden konnte und sie dadurch mit der Restlösung abfloss.

Nachfolgend wurden Parameter wie die CTAB-Konzentration in der Ausgangslösung in einem Konzentrationsbereich von 0,2 bis 0,5 mg/ml und die Gasflussrate im Bereich von 30 bis 60 ml/min variiert. Die beiden Zerschäumungsparameter zeigten bei der kontinuierlichen Zerschäumung denselben Einfluss auf Anreicherung bzw. Wiederfindung wie in der Batch-Zerschäumung. Aus diesem Grund wird auf die wiederholte Erläuterung und Diskussion der Mechanismen verzichtet.

Aus den Ergebnissen der kontinuierlichen Schäumung geht allgemein hervor, dass sich die effektivsten Zerschäumungsparameter nicht eindeutig benennen lassen. Vielmehr scheinen sich hohe Anreicherung und quantitative Wiederfindung auszuschließen. Bei einer CTAB-Konzentration von 0,2 mg/ml wurde eine 11,74-fache Anreicherung erzielt, die Wiederfindung betrug lediglich 70,15 %. Wurde mit einer Gasflussrate von 60 ml/min hingegen eine quantitative Wiederfindung erzielt, resultierte lediglich eine 1,76-fache Anreicherung. Eine Steigerung dieser Anreicherung durch kontinuierliche Kolonnenzerschäumung führte wiederum zu Verlusten in der Wiederfindung. Die beiden Faktoren scheinen bei der kontinuierlichen Zerschäumung in einem Interessenskonflikt zu münden, so dass die Zerschäumungsparameter je nach Präferenz optimiert werden müssen.

Nachdem sowohl die Batch- als auch die kontinuierliche Zerschäumung realisiert waren, sollte die Anreicherung des Enzyms im zweiten Teil dieser Arbeit in ihrer Effizienz gesteigert werden.

Um die Laccase effizienter Zerschäumen zu können, musste eine spezifische Bindung zwischen dem Enzym und einem Tensid geschaffen werden. *Crofcheck et al (2003)* schafften diese Bindungsstelle, indem sie das anzureichernde Protein mit Histidinresten versetzten. Diese Histidinreste sind in der Lage mit Metallionen einerseits und Tensiden mit komplexierenden Eigenschaften andererseits Komplexe zu bilden. Die Methode von *Crofcheck et al. (2003)* ist experimentell aufwändig, da das mit Histidinresten versetzte Protein mittels PCR erzeugt wurde.

Eine komfortablere und experimentell weit weniger aufwendige Möglichkeit eine spezifische Bindung zu schaffen, sollte die Komplexierung der Metallionen im aktiven Zentrum der Laccase darstellen. Dazu wurde die Laccase durch Zugabe von Komplexbildnern systematisch inaktiviert. Die Inaktivierung des Enzyms wurde auf eine Komplexierung des Kupfers im aktiven Zentrum des Enzyms zurückgeführt. Die Zerschäumung des mittels Komplexbildner inaktivierten Enzyms wurde in dieser Arbeit als „Pinzettenverfahren“ bezeichnet und stellt sich schematisch wie folgt dar:

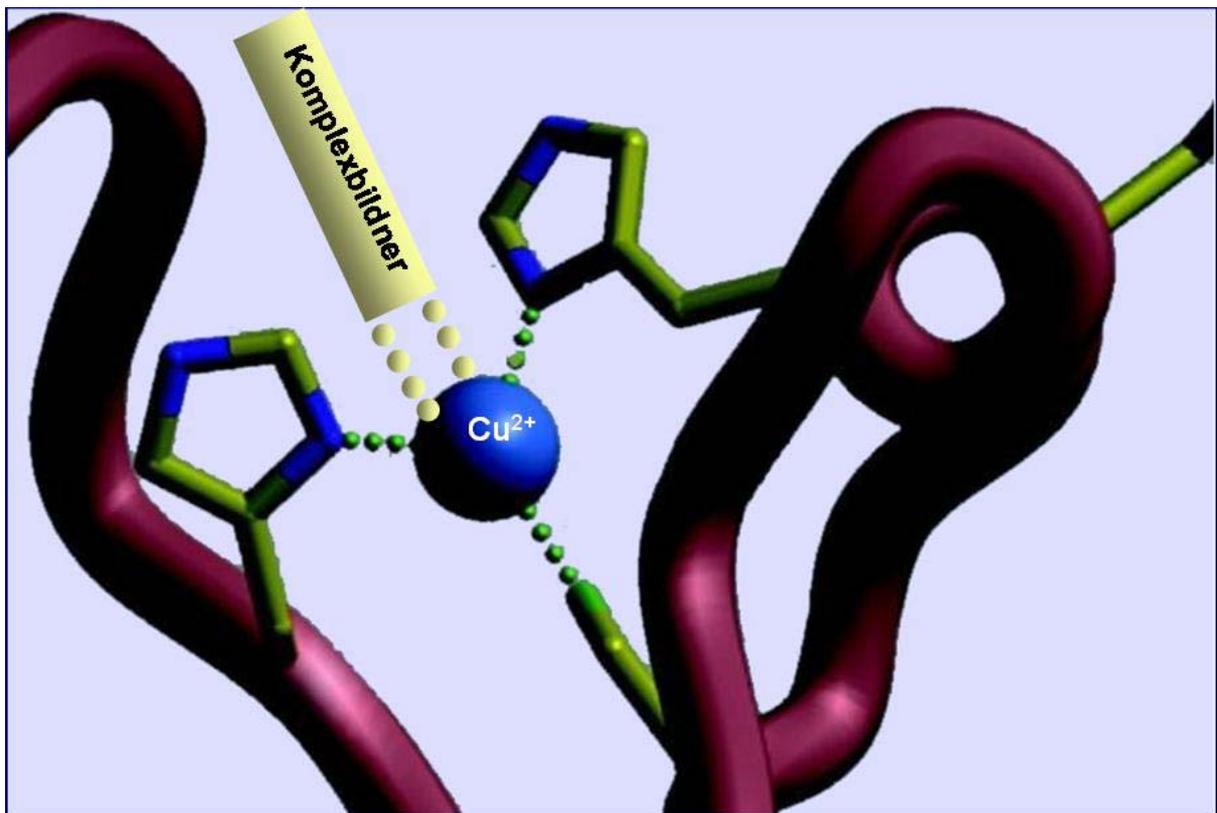


Abb.57: Schematische Darstellung des Pinzettenverfahrens. Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus der Laccasestruktur nach *Piontek et al. (2002)*. Der Komplexbildner ist schematisch als gelber Zylinder dargestellt. Das Cu^{2+} -Ion ist dunkelblau dargestellt. Die Polypeptidkette ist schematisch violett dargestellt. An der Bindung beteiligte Aminosäurereste sind grün-blau dargestellt. Die Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureseitenketten und dem Cu^{2+} -Ion sind als grüne Kugeln dargestellt. Die Wechselwirkung zwischen dem Komplexbildner und dem Cu^{2+} -Ion ist ohne Berücksichtigung der Art und Anzahl der Bindungen als gelbe Kugeln dargestellt.

Um den Komplexbildner schäumbar zu machen, wurde dieser in einem späteren Stadium mit einem Oktyl-Rest kovalent oder ionisch mit CTAB gebunden.

Die Vorgehensweisen beim Pinzettenverfahren mit ionischer und kovalenter Bindung des Komplexbildners waren unterschiedlich und sind in Abbildung 58 zusammenfassend dargestellt.

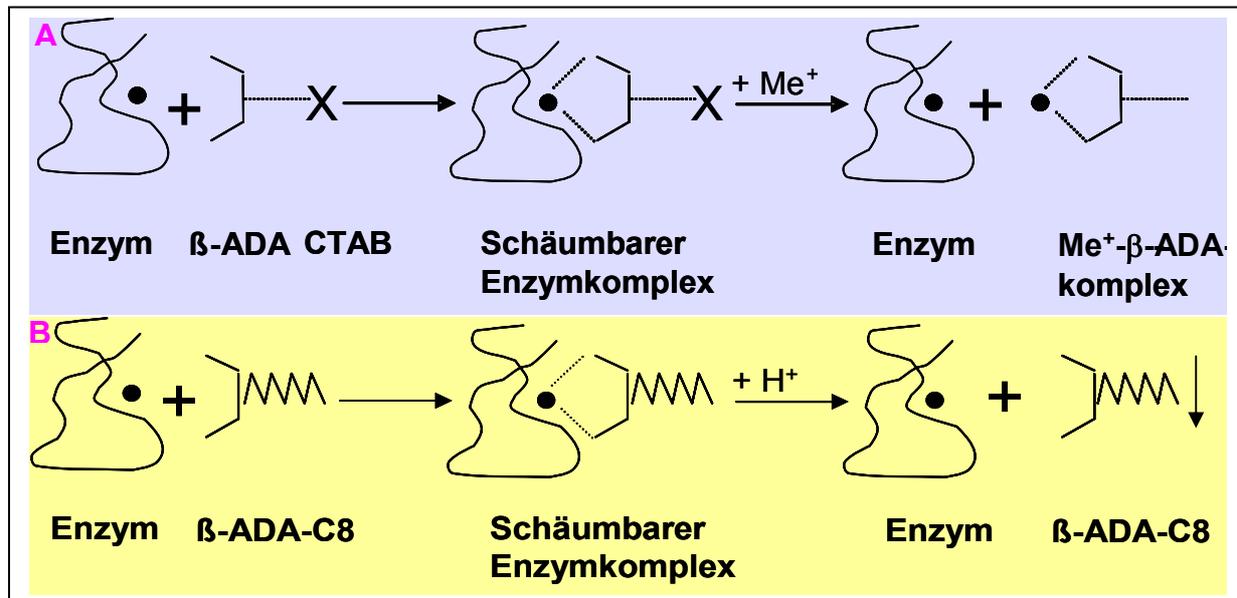


Abb.58: Vorgehensweise beim Pinzettenverfahren. A.) Pinzettenverfahren mit ionischer Bindung zum CTAB. B.) Pinzettenverfahren mit kovalenter Bindung

Bei der ionischen Bindung des Komplexbildners (A) wurde die Laccase mit dem Komplexbildner β -ADA versetzt, wodurch eine Inaktivierung des Enzyms induziert wurde. Die Inaktivierung wurde auf die Komplexierung der Metallkationen im aktiven Zentrum des Enzyms zurückgeführt. Durch ionische Wechselwirkungen des resultierenden Enzymkomplex zum Tensid CTAB (X) wurde ein Transport in die Schaumphase ermöglicht. Nach der Anreicherung des Enzymkomplexes in der Schaumphase, wurde das Enzym durch Zugabe von Metallkationen (Me^+) dekomplexiert, d.h. der Komplexbildner wurde vom Enzym entfernt und bildete seinerseits Komplexe mit den zugesetzten Metallkationen. Das Enzym lag dadurch wieder in katalytisch aktiver Form vor.

Allerdings musste bei dieser Form des Pinzettenverfahrens das Enzym in einem weiteren Aufreinigungsschritt durch Ionenaustauschchromatographie von den Metallkomplexen und dem Tensid abgetrennt werden. Aus diesem Grund hat sich die kovalente Kopplung des Komplexbildners mit einem Oktylrest als vorteilhafter erwiesen (B).

Die Dekomplexierung erfolgt bei dieser Vorgehensweise durch Senkung des pH-Wertes. Durch die Absenkung des pH-Wertes fiel auch der kovalent gekoppelte Komplexbildner aus und konnte abfiltriert werden. Obwohl das Pinzettenverfahren mit kovalenter Kopplung dadurch deutliche Vorteile gegenüber dem Pinzettenverfahren mit ionischer Bindung zum Komplexbildner aufwies, wurden in dieser Arbeit beide Wege verfolgt um deren Effizienz zu testen.

Bevor allerdings Zerschäumungen im Pinzettenverfahren vorgenommen werden konnten, wurde zunächst konzentrationsabhängige Inaktivierungsversuche durch Komplexbildner wie EDTA, β -ADA und DPTA am Beispiel von Laccase durchgeführt. Nach einer Zugabemenge von 55,0 mg/ml des jeweiligen Komplexbildners zum laccasehaltigen Fermentationsmedium war keine Enzymaktivität von ursprünglich 11,40 U/l mehr nachweisbar.

Allerdings schien die verwendete Konzentration sehr hoch, so dass die pH-Abhängigkeit der Inaktivierung des Enzyms mittels Komplexbildner untersucht wurde. Dazu wurde die Messung der Enzymaktivität bei pH-Werten vorgenommen, die eine höhere Komplexstabilität versprachen, d.h. die höher als pH 5,5 waren. Die Komplexstabilität nimmt mit steigendem pH-Wert zu, da der Komplexbildner zunehmend deprotoniert vorliegt. Das pH-Intervall wurde bei pH 7,0 begrenzt, da das Enzym bei basischeren pH-Werten keine ausreichende Ursprungsaktivität aufwies. Während bei pH 5,5 eine β -ADA-Konzentration von 55,0 mg/ml zur vollständigen Inaktivierung der Laccase nötig war, betrug die Konzentration bei pH 6,0 1,9 mg/ml und bei pH 7 0,2 mg/ml.

Eine Aktivitätsverminderung der Laccase durch Zugabe von EDTA wurde bereits von *Robinson* und *Eskin* (1991) beschrieben ohne auf die Art oder das Prinzip der Inaktivierung näher einzugehen.

Da nur wenig über die Mechanismen bekannt ist, die auftreten, wenn Metalloproteine kurzzeitig mit Komplexbildnern versetzt werden, wurde die Frage aufgeworfen, ob die Metallkationen durch Zugabe von Komplexbildnern aus dem Molekül herausextrahiert werden oder die Inaktivierung des Enzyms auf einer Anlagerung des Komplexbildners beruht. Die Vermutung, dass die Inaktivierung des Enzyms auf eine Anlagerung des Komplexbildners zurückzuführen ist, wird durch einige Literaturangaben und eigene Versuche bekräftigt.

Eine zweiseitige Komplexierung von Metallkationen, wie es beim komplexierten Enzym der Fall wäre, konnte durch *Crofcheck et al. (2003)* bewiesen werden. Die zweiseitige Komplexierung beruht auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Bei der Affinitätschromatographie wird ein Zinkkation einerseits durch Histidinreste und andererseits durch Iminodiessigsäure komplexiert (*Kreis et al, 2001*). Beim Laccase-Komplex wird die beidseitige Komplexierung am Typ-1-Kupfer vermutet, da dieses Kupferzentrum relativ leicht zugänglich ist und somit Ort der Substratoxidation ist, wie Abbildung 4A am Beispiel von ABTS zeigt. (*Enguita et al., 2004*)

Das dreikernige Kupferzentrum hingegen ist lediglich über Wasserkanäle zugänglich (*Enguita et al., 2003*), so dass eine Komplexierung dieser Kupferkationen unwahrscheinlich scheint. Eine mögliche Positionierung des Komplexbildners β -ADA-C8 ist in Abbildung 59 dargestellt.

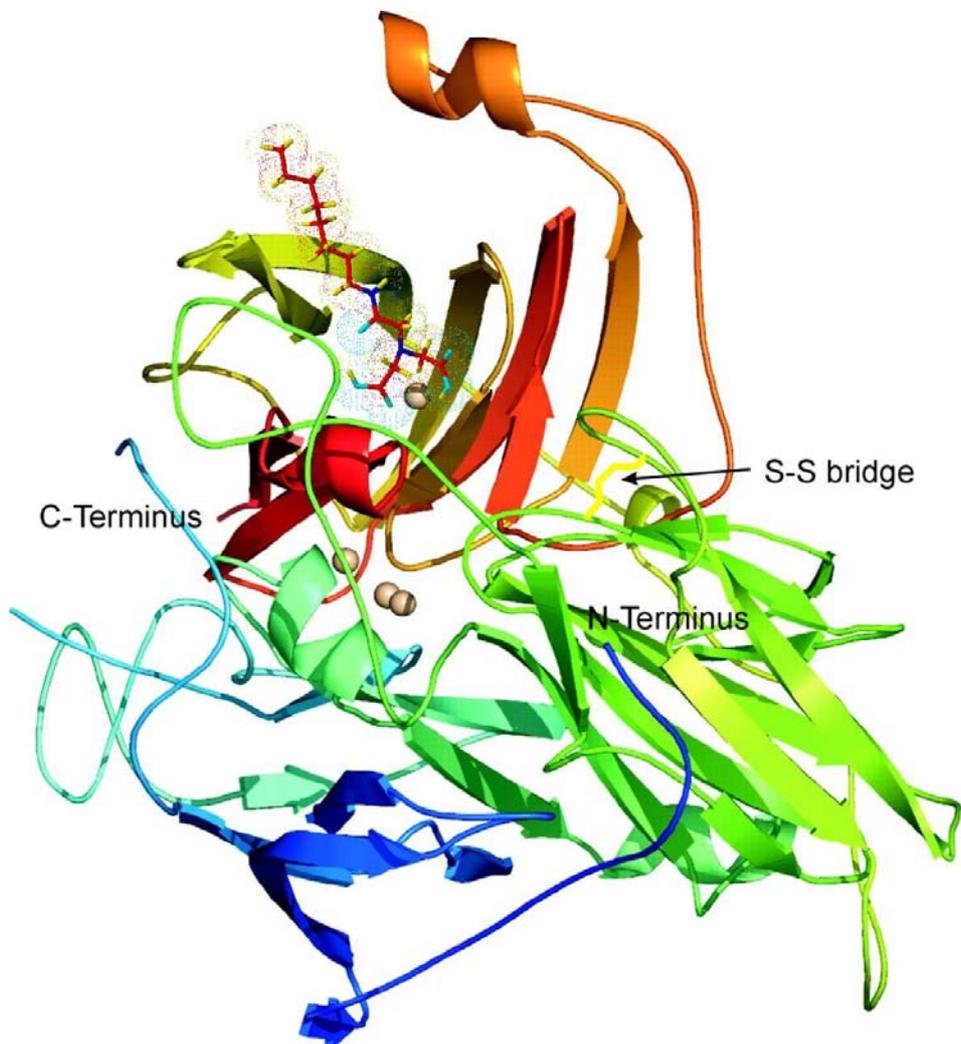


Abb.59: Strukturmodell von Laccase mit dem Komplexbildner β -ADA-C8. Die Abbildung stellt eine mögliche Anlagerungsform des Komplexbildners an das Typ-1-Kupferzentrum dar. Die Anlagerung wurde in Anlehnung an das Enzymmodell mit ABTS nach *Enguita et al. (2004)* projiziert, ohne Berücksichtigung der exakten Bindungsform und Einlagerung.

Während das Typ-1-Kupferzentrum und das Typ-3-Kupferzentrum relativ fest mit dem Molekül verbunden sind, wurde das Typ-2-Kupfer des dreikernigen Klusters häufig aus dem Molekül extrahiert. (*Enguita et al.*, 2004; *Klemens und McMillin*, 1990; *Ducros et al.*, 1998; *Sakurai*, 1992) *Schmidt Klemens und McMillin* (1990) führten gezielte Extraktionsverfahren von Cu^{2+} aus Laccase durch. Nach mehrstündiger Dialyse gegen Eisencyanide und EDTA gelang es ihnen das Typ-2-Kupfer zu entfernen, während das Typ-1-Kupfer und das Typ-3-Kupferzentrum im Enzym verblieben. Da das Pinzettenverfahren weder Eisencyanide enthält noch einen mehrstündigen Prozess darstellt, ist es mehr als wahrscheinlich, dass die Cu^{2+} -Ionen des aktiven Zentrums nicht aus dem Enzym entfernt werden. Allerdings würde auch eine Extraktion des Typ-2-Kupferzentrums keinen unmittelbaren Einfluss auf das Pinzettenverfahren haben, da die Komplexierung am Typ-1-Kupfer vermutet wird. Bei dieser Überlegung müssen aber die Aktivitätsverluste beachtet werden, die durch einen Verlust des Typ-2-Kupferzentrums induziert werden. *Klemens und McMillin* (1990) beschrieben Aktivitätsverluste von 95 % durch Extraktion des Typ-2-Kupferzentrums. Aktivitätsverluste in dieser Größenordnung wurden im Pinzettenverfahren nicht beobachtet.

Ein weiterer Aspekt, der gegen ein Herausextrahieren der Metallkationen aus dem aktiven Zentrum des Enzyms spricht, ist die hohe Anreicherungsrate im Pinzettenverfahren, die je nach Versuchsanordnung Werte bis maximal 30-fach annehmen kann.

Die hohen Anreicherungsraten, die mittels Pinzettenverfahren erzielt wurden, deuten auf die Ausprägung einer spezifischen Bindung zwischen Enzym und Tensid hin. Um zu belegen, dass diese spezifische Bindung aus der Komplexierung der Metallkationen im aktiven Zentrum der Enzyme resultierte, wurde die Laccase mit einem Metallkation- β -ADA-C8-Komplex zerschäumt, so dass das β -ADA-C8 keine komplexierenden Eigenschaften gegenüber dem Enzym ausüben konnte. Die Zerschäumung zeigte eine Anreicherung im Schaum von 0,17 bei 5,80 % Wiederfindung.

Daraus lässt sich schließen, dass die Anreicherung des Enzym- β -ADA-C8-Komplexes auf einer Komplexierung der Metallkationen im aktiven Zentrum der Laccase beruht und sich der Komplexbildner nicht an einer anderen, beliebigen Stelle des Enzyms, also am Apoenzym, anlagert. Des Weiteren spricht diese Versuchsreihe auch gegen ein Herausextrahieren des Metallkations aus dem Enzym.

Würde das Metallkation mittels Komplexbildner aus dem Enzym herausextrahiert werden, wäre lediglich eine Anreicherung der Metallkationen in der Schaumphase gewährleistet, da der Komplexbildner keine Wechselwirkung mit dem Apoenzym eingeht.

Das Apoenzym könnte somit nicht in den Schaum transportiert werden und ein Wiedereintreten des Metallkations in den Apoenzymteil nach der Dekomplexierung der Schaumphase kann ist nicht gewährleistet werden.

Dadurch könnte in der Schaumphase nur die Enzymaktivität nachgewiesen werden, die auch bei der Zerschäumung der Laccase mit den Cu^{2+} - β -ADA-C8-Komplexen erzielt wurde. Da aber im Pinzettenverfahren eine deutlich höhere Anreicherung der Enzymaktivität erzielt wurde, ist davon auszugehen, dass die Metallkationen des aktiven Zentrum nicht aus dem Enzym herausextrahiert werden, sondern dass sich vielmehr ein zweiseitiger Komplex zwischen Enzym Metallkation und Komplexbildner ausbildet.

Ein weiterer experimenteller Beleg, der für die Komplexierung der Metallkationen im aktiven Zentrum des Enzyms spricht, wurde durch Löslichkeitsversuche erzielt. Es wurde beobachtet, dass ein einfacher Metallkation- β -ADA-C8-Komplex bereits in einem pH-Wert-Bereich von 6-8 ausfällt. Liegt hingegen ein Enzym- β -ADA-C8-Komplex vor, wurde in diesem pH-Bereich keine Ausfällung beobachtet. In diesem Fall wurde erst nach der Dekomplexierung durch Säure bei pH 3,0 ein Niederschlag beobachtet.

Ein anderer Aspekt, der gegen die Extraktion der Kupferkationen spricht, wurde von *Lippard* und *Berg* (1995) angeführt, indem sie beschrieben, dass Proteine die effektivsten Komplexbildner sind. Sie berichteten weiterhin, dass Liganden am Metallkation, die nicht Teil des Chelatrings sind, teilweise relativ leicht ausgetauscht werden können, wie es bei den axialen Seitenketten des Porphyrin-Rings, der auch in der Meerrettich-Peroxidase vorliegt (*Gold* und *Weiss*, 2000), der Fall ist. Die Position der austauschbaren Liganden wurde in dieser Arbeit dem EDTA, β -ADA oder DPTA zugesprochen, so dass die Enzymaktivität durch Abtrennung des jeweiligen Komplexbildners zurückgewonnen werden konnte. Zur Reaktivierung wurden dem komplexierten Enzym unterschiedliche Metallkationen in Form ihrer Salze zugesetzt. Es wird angenommen, dass die Metallkationen kompetitiv mit dem Enzymmetallkationen um die Komplexbildner konkurrieren.

Je nach Affinität des Komplexbildners gegenüber dem zugesetzten Metallkation tritt der Komplexbildner bevorzugt mit dem Enzymmetallkation oder mit dem zugesetzten Metall in Wechselwirkung.

Ist die Affinität des Komplexbildners gegenüber dem zugesetzten Metallkation höher als gegenüber dem Enzymmetall, löst sich der Komplexbildner vom Enzymmetallkation und komplexiert das zugesetzte Metallkation. Das Enzym wurde dadurch reaktiviert.

Eine Reaktivierung der Laccase war neben Kupfer(II)-Sulfat auch mit Ammoniumeisen(III)-Sulfat, Zink(II)-Sulfat und Mangan(II)-Sulfat möglich. Allerdings war die Reaktivierung des Enzyms mit Zink(II)-Sulfat und Mangan(II)-Sulfat weniger effektiv. Durch Verwendung dieser beiden Salze konnten lediglich 47,2 % bzw. 17,9 % der ursprünglichen Aktivität zurückgewonnen werden.

Besser eigneten sich Kupfer(II)-Sulfat und Ammoniumeisen(III)-Sulfat. Beide erzielten Aktivitätsrückgewinne von maximal 87,8 % aus dem Laccase-EDTA-Komplex. Die Eignung des jeweiligen Metalls zur Reaktivierung der Enzymaktivität entsprach ihren Assoziationskonstanten gegenüber EDTA. (*Belitz et al.*, 2001) Mit steigender Assoziationskonstante nahm die Eignung zur Dekomplexierung des Laccase-EDTA-Komplexes zu. Nach *Belitz et al.* (2001) weist Mn^{2+} eine Assoziationskonstante von 8,7 gegenüber EDTA auf und ist damit recht ungeeignet zur Reaktivierung bzw. Dekomplexierung des Enzyms. Fe^{3+} -Ionen hingegen haben eine Assoziationskonstante von 25,7 gegenüber EDTA und damit gute Dekomplexierungseigenschaften.

Die Enzymaktivität konnte aber nicht nur aus dem Laccase-EDTA-Komplex zurückgewonnen werden. Auch Reaktivierungsversuche aus dem Laccase- β -ADA- und Laccase-DPTA-Komplex verliefen erfolgreich. Die Reaktivierungsversuche wurden jeweils mit Kupfer(II)-Sulfat durchgeführt. Auch bei diesen Komplexbildnern konnten 71,5 % bzw. 65,0 % der Ursprungsaktivität zurückgewonnen werden.

Neben der Zugabe von Salzen wurde die Enzymaktivität auch durch Senkung des pH-Wertes zurückgewonnen. Dazu wurde die komplexhaltige Lösung auf pH 3,5 eingestellt. Es wird angenommen, dass der Komplexbildner durch Absenkung des pH-Wertes vom Enzym abgelöst wurde, da die Komplexstabilität zwischen dem Enzymmetallkation und dem Komplexbildner bei diesem pH-Wert nicht ausreichend gegeben war.

Nachdem Komplexierung und Dekomplexierung des Enzymmetalls gewährleistet waren, wurde die Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA und CTAB nach Abbildung 58A in der Pilotanlage zerschäumt. Vergleichend dazu wurde eine konventionelle Zerschäumung bei gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Zerschäumungen wurden in Abhängigkeit vom pH-Wert im Bereich von pH 5,5 bis pH 7,0 durchgeführt. Dieser pH-Bereich wurde gewählt, da einerseits die Schaumeigenschaften des CTABs bei pH-Werten größer 7,0 unbefriedigend waren. Andererseits nahm die Komplexstabilität mit sinkendem pH-Wert ab.

Aus Abbildung 45 geht hervor, dass die Anreicherung im Pinzettenverfahren gegenüber dem konventionellen Zerschäumungsverfahren gesteigert wurde. Bei pH 5,5 betrug die Anreicherung im Pinzettenverfahren 4,12. Bei der konventionellen Zerschäumung wurde die Laccase bei diesem pH-Wert lediglich 3,62-fach angereichert.

Mit steigendem pH-Wert nahm die Anreicherung von Laccase sowohl im Pinzettenverfahren als auch bei der konventionellen Zerschäumung ab. Während die Anreicherung im Pinzettenverfahren bei pH 6,0 3,76 betrug, wurde bei pH 7,0 eine 2,87-fache Anreicherung erzielt. Die konventionelle Zerschäumung lieferte Anreicherungen von 3,67 bei pH 6,0 und 2,71 bei pH 7,0. Die Wiederfindung betrug im Pinzettenverfahren durchschnittlich 70 %, während die konventionelle Zerschäumung eine quantitative Wiederfindung lieferte. Die verringerte Wiederfindung im Pinzettenverfahren wird auf Aktivitätsverluste durch Komplexierung und Dekomplexierung zurückgeführt. Trotz verminderter Wiederfindung war die Anreicherung im Pinzettenverfahren bei allen pH-Werten gegenüber der konventionellen Batch-Zerschäumung gesteigert. Die gesteigerte Anreicherung kann einerseits auf eine ionische Bindung zwischen dem Laccase- β -ADA-Komplex und dem Hexadecyltrimethylammonium zurückgeführt werden. Eine ionische Bindung zwischen dem Laccase- β -ADA-Komplex und dem kationischen Tensid kann allerdings nur dann ausgebildet werden, wenn der Komplex partiell negativ geladen ist. Eine negative Überschussladung bildet sich aus, wenn nur eine Bindung zwischen Enzymmetall und β -ADA eingegangen wird. Andererseits lag die Steigerung der Anreicherung durch Pinzettenverfahren im Bereich der Standardabweichung der Messwerte und kann somit nicht eindeutig dem Pinzettenverfahren zugeschrieben werden. Zudem traten bei pH 5,5 bereits Einschränkungen in der Komplexstabilität auf.

Die hohe Anreicherung bei pH 5,5 kann möglicher Weise auch auf die guten Schaumeigenschaften des CTABs bei diesem pH-Wert zurückgeführt werden. Es wird angenommen, dass neben der ionischen Bindung zum Komplex auch ionische Bindungen zwischen CTAB und Enzym ausgebildet wurden, da die Laccase bei pH 5,5 als Anion vorliegt.

Nachdem die Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit CTAB realisiert war, wurde der Komplexbildner β -ADA mit einem Oktylrest kovalent gekoppelt. Ziel der kovalenten Kopplung war es, auf CTAB als Tensid verzichten zu können, um einerseits den Eintrag von Bromid zu verhindern und andererseits eine selektivere und effizientere Anreicherung erzielen zu können. Erneut wurde untersucht, ob der entstandene Komplexbildner β -ADA-C8 inaktivierende Eigenschaften gegenüber dem Enzym aufwies. Die Messung der Enzymaktivität bei pH 6,0 zeigte, dass eine Konzentration an β -ADA-C8 von 3,0 mg/ml zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms ausreichte. Die Inaktivierung wird auch bei β -ADA-C8 auf eine Komplexierung des Metallkations zurückgeführt. Die Reaktivierung bzw. Dekomplexierung des Enzyms wurde in diesem Fall durch Senkung des pH-Wertes auf pH 3,5 erreicht. Durch Dekomplexierung konnten 75 % der Ursprungsaktivität zurückgewonnen werden. Wurde der pH-Wert unter einen Wert von 3,5 gesenkt, fiel der Komplexbildner aus und konnte abfiltriert werden. Dieser Schritt induzierte allerdings zusätzliche Aktivitätsverluste. Nach Abtrennung des Komplexbildners betrug die Enzymaktivität 13,95 U/l von ursprünglich 21,13 U/l. Das entspricht 66,02 % der Ursprungsaktivität.

Nachdem Komplexierung des Enzymmetallkations mit β -ADA-C8 und anschließende Dekomplexierung gewährleistet waren, wurden Zerschäumungen im Pinzettenverfahren durchgeführt. Da β -ADA-C8 ein eigenständiges Zerschäumungsmittel war, mit dem bisher keine Erfahrungen gesammelt wurden, mussten erneut Zerschäumungsparameter optimiert werden. Zunächst wurden Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zerschäumungsdauer untersucht. Mit steigender Zerschäumungsdauer nahm die Wiederfindung zu, während die Anreicherung abnahm. Nach einer Zerschäumungsdauer von 10 min wurde eine Wiederfindung von 49,38 % bei 27,40-facher Anreicherung erzielt. Eine Zerschäumungsdauer von 120 min lieferte eine Anreicherung von 4,01 bei 55,84 % Wiederfindung. Bereits *Mischke* (1940) beobachtete einen Anstieg des Schaumvolumens mit der Zeit. Auf diesen Aspekt werden auch die erzielten Ergebnisse zurückgeführt.

Mit steigender Zerschäumungsdauer wurde absolut mehr Laccase in den Schaum transportiert, d.h. die Wiederfindung stieg mit der Zerschäumungsdauer an. Allerdings wurde durch die verlängerte Zerschäumungsdauer und recht hohe Konzentration an Schäumungsmittel (3,0 mg/ml) auch mehr Flüssigkeit in den Schaum transportiert, was sich in einer Verringerung der Anreicherung mit zunehmender Zerschäumungsdauer ausdrückte.

Als optimale Zerschäumungsdauer wurde deshalb eine Zeit von 30 min als Kompromiss zwischen guter Anreicherung und Wiederfindung ermittelt. Nach 30 min wurde eine Anreicherung von 18,25 bei 53,08 % Wiederfindung erzielt. Diese Zerschäumungsdauer diente als Grundlage zur Optimierung weiterer Parameter.

Nachfolgend wurde die Anreicherung und Wiederfindung des Laccase- β -ADA-C8-Komplexes in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt. Das pH-Intervall betrug 7,0 bis 10,0. Mit steigendem pH-Wert nahm sowohl die Wiederfindung als auch die Anreicherung zu. Dieses wurde einerseits auf die höhere Komplexstabilität bei höheren pH-Werten zurückgeführt. Andererseits nahm mit steigendem pH-Wert die Schaumqualität zu, d.h. es wurden trockenere stabile Schäume erzielt. Ein höherer pH-Wert als 10,0 konnte aufgrund der irreversiblen Denaturierung des Enzyms nicht realisiert werden.

Die Abhängigkeit zwischen der Gasflussrate und Anreicherung und Wiederfindung wurden bei pH 10,0 untersucht. Wie bei der konventionellen Batch-Zerschäumung und der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase nahm die Wiederfindung des Laccase- β -ADA-C8-Komplexes mit steigender Gasflussrate zu, während die Anreicherung sank. Bei einer Gasflussrate von 1 ml/min konnte eine Wiederfindung von 53,08 % bei 18,25-facher Anreicherung erzielt werden. Die Wiederfindung bei einer Gasflussrate von 4 ml/min hingegen betrug 66,58 % bei 1,22-facher Anreicherung.

Der Zusammenhang zwischen der Gasflussrate und Anreicherung bzw. Wiederfindung des Laccase- β -ADA-C8-Komplexes im Schaum wird auf die gleichen Vorgänge wie bei der Batch- und kontinuierlichen Zerschäumung zurückgeführt. Ähnlich verhielt es sich mit der Abhängigkeit zwischen der β -ADA-C8-Konzentration und der Effizienz der Zerschäumung. Mit steigender Konzentration an β -ADA-C8 nahm die Wiederfindung zu, während die Anreicherung abnahm. Auch dieses Phänomen wurde bereits bei der konventionellen Batch- und der kontinuierlichen Zerschäumung beobachtet und detailliert erläutert.

Nachdem die grundsätzlichen Zerschäumungsparameter zur effektiven Zerschäumung des Laccase- β -ADA-C8-Komplexes ermittelt wurden, sollte die Zerschäumung des Komplexes nicht wie bisher aus demin. Wasser sondern aus dem SNL-Nährmedium vorgenommen werden. Bei vergleichbaren Bedingungen zur Zerschäumung aus demin. Wasser wurde bei der Zerschäumung aus dem Nährmedium eine deutlich schlechtere Anreicherung bei besserer Wiederfindung erzielt. Die Anreicherung der Laccase aus dem Nährmedium betrug 3,02 bei 64,06 % Wiederfindung. Dies wurde auf die Inhaltsstoffe des Nährmediums zurückgeführt. Neben Hefeextrakt und Zucker enthielt das SNL-Nährmedium verschiedene Salze. Während Zucker die Zerschäumungseffizienz im Allgemeinen negativ beeinflussen (*Ahmad*, 1972; *Gschwendtner*, 2000), werden Salzen von verschiedenen Autoren positive Einflüsse auf die Zerschäumung von Proteinen zugesprochen. *Peters* (1952) beobachtete ein verstärktes Schaumvermögen, induziert durch Salze. *Liu et al.* (1995) beschrieben eine erhöhte Proteinanreicherung im Schaum durch Zugabe von Salzen. Sie führten dieses auf die Abhängigkeit zwischen Proteinlöslichkeit und Elektrolytkonzentration zurück. Des Weiteren ist die Ionenstärke im Fermentationsmedium im Vergleich zu demin. Wasser durch die Salze erhöht. *Brown et al.* (1990) beschrieben für die Zerschäumung von Rinderserumalbumin, dass mit zunehmender Ionenstärke die Anreicherung des Rinderserumalbumins im Schaum abnimmt, während die Wiederfindung zunimmt. Aber auch der Zusatz von weiteren Proteinen bzw. deren Fragmenten wirkt sich auf die Zerschäumung aus. *Velissariou und Lyddiatt* (1990) beobachteten beispielsweise eine verbesserte Schaumstabilität bei heterogenen Proteinlösungen. Die Beobachtungen von *Peters* (1952) und *Brown et al.* (1990) konnten durch die Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren aus dem SNL-Nährmedium bestätigt werden. Da das SNL-Nährmedium viele schaumpositive Substanzen, wie Salze und Proteine bzw. Peptide enthält, wird die Schaumbildung gefördert. Dadurch entsteht ein nasserer Schaum. Dieser Schaum wurde durch heterogene Proteinmischungen, wie sie im Nährmedium vorliegen nach *Velissariou und Lyddiatt* (1990) stabilisiert. Ein nasser Schaum bewirkt eine höhere Wiederfindung bei verminderter Anreicherung im Vergleich zu Zerschäumungen aus demin. Wasser. Um höhere Anreicherungen auch bei der Zerschäumung aus SNL-Nährmedium zu erzielen, wurde die Gasflussrate systematisch reduziert.

Eine Verminderung der Gasflussrate führte zu einer Erhöhung der Anreicherung. Die Anreicherung konnte von 3,02 bei einer Gasflussrate von 1,0 ml/min auf 13,30 bei einer Gasflussrate von 0,25 ml/min gesteigert werden. Die Wiederfindung betrug bei dieser Gasflussrate 66,31 %.

Um die Zerschäumung im Pinzettenverfahren zu validieren, wurden Inaktivierungs- und Reaktivierungsversuche mit einem zweitem Enzym, der Meerrettich-Peroxidase, durchgeführt. Die Meerrettich-Peroxidase konnte ebenfalls mit β -ADA inaktiviert werden. Allerdings war eine Konzentration von 40,0 mg/ml notwendig, um eine Meerrettich-Peroxidase-Aktivität von 40,22 U/l vollständig zu inaktivieren.

Abweichend von der Laccase enthält die Meerrettich-Peroxidase Hämin und somit Fe^{3+} -Ionen im aktiven Zentrum. Oberhalb und unterhalb des aktiven Zentrums ist jeweils ein Ca^{2+} -Ion positioniert. Die zwei Ca^{2+} -Ionen tragen zur Stabilisierung der Enzym- bzw. Häminstruktur bei. (Smeller et al., 2004) Aufgrund der strukturstabilisierenden Eigenschaften, beeinflussen die beiden Ca^{2+} -Ionen indirekt die Enzymaktivität. Werden die Ca^{2+} -Ionen aus dem Molekül entfernt, führt dies zu Konformationsänderungen, die eine Abnahme der Aktivität und thermischen Stabilität des Enzyms bewirken. (Howes et al., 2001)

Es scheint also fraglich, ob die Inaktivierung des Enzyms mittels Komplexbildner auf einer Extraktion der Ca^{2+} -Ionen oder auf Wechselwirkungen mit den Ca^{2+} -Ionen oder dem Fe^{3+} -Zentralatom beruht. Allerdings bewirkt ein Herausextrahieren der Ca^{2+} -Ionen lediglich eine ~50 %ige Inaktivierung des Enzyms (Haschke und Friedhoff, 1978; Morishima et al., 1986; Shiro et al., 1986; Howes et al., 2001) Durch Zugabe von β -ADA im Pinzettenverfahren wurde allerdings eine 100 %-ige Inaktivierung erzielt, was gegen eine alleinige Extraktion der Ca^{2+} -Ionen spricht.

Laberge et al. (2003) und Smeller et al. (2004) berichteten in diesem Zusammenhang von Versuchsreihen, in denen sie die Ca^{2+} -Ionen aus der Meerrettich-Peroxidase heraus extrahieren wollten. Sie nutzten dazu Guanidin Hydrochlorid und EDTA in einem mehrstufigen Verfahren. Durch dieses Verfahren extrahierten sie lediglich eines der beiden Ca^{2+} -Ionen aus dem Enzym heraus. Das andere Ca^{2+} -Ion sowie das Fe^{3+} -Zentralatom blieben unberührt. Da nach Ogawa et al. (1979) nur ein Ca^{2+} -Ion für die Stabilisierung der Enzym- bzw. Häminstruktur notwendig ist, wäre eine Extraktion von einem Ca^{2+} -Ion für das Pinzettenverfahren nicht störend.

Allerdings ist die Extraktion des Ca^{2+} -Ions im Pinzettenverfahren auch eher unwahrscheinlich, da dieses Verfahren deutlich schonender und kürzer ist, als das von *Laberge et al.* (2003) beschriebene Extraktionsverfahren.

Aufgrund der von *Ogawa et al.* (1979), *Laberge et al.* (2003) und *Smeller et al.* (2004) beschriebenen Versuchsreihen sowie der besseren Zugänglichkeit des Fe^{3+} -Zentralatoms (*Lehninger*, 1975) wird die Inaktivierung des Enzyms im Pinzettenverfahren auf eine Anlagerung des Komplexbildners am Fe^{3+} -Zentralatom zurückgeführt. Eine Modellvorstellung des Meerrettich-Peroxidase- β -ADA-C8-Komplexes, basierend auf der Anlagerung von N-Arylhydroxaminsäure nach *Kulys und Ziemys* (2001), ist in Abbildung 60 dargestellt.

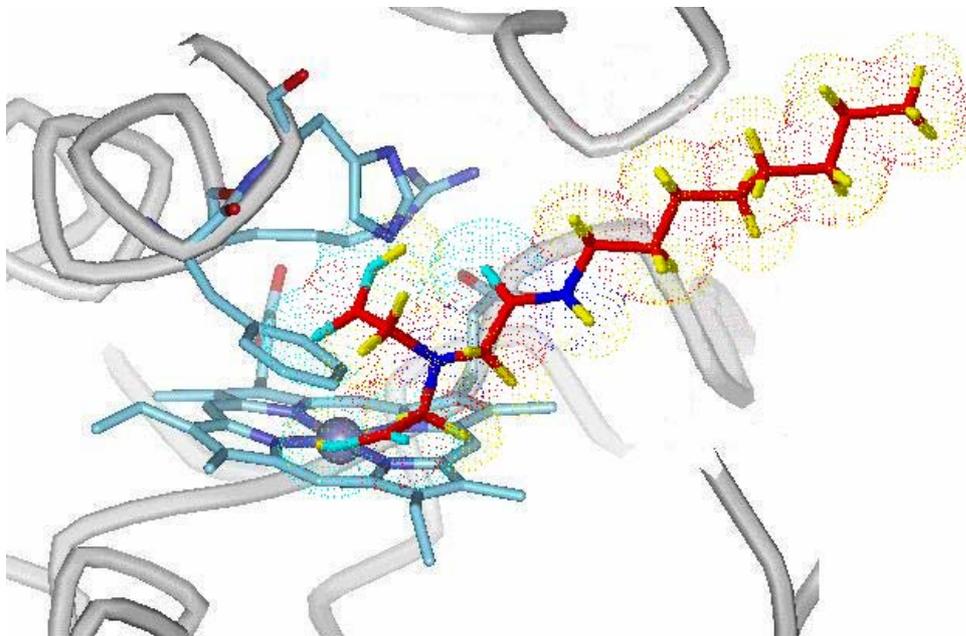


Abb.60: Modellvorstellung des Meerrettich-Peroxidase-ADA-C8-Komplexes, basierend auf der Anlagerung von N-Arylhydroxaminsäure nach *Kulys und Ziemys* (2001). Die Modellvorstellung zeigt Ausschnitte aus der Tertiärstruktur von Meerrettich-Peroxidase und beinhaltet nicht die exakte Ausrichtung, Anlagerung und Bindung des Komplexbildners im Molekül.

Die Reaktivierung bzw. Dekomplexierung der Meerrettich-Peroxidase durch Absenkung des pH-Wertes ging mit der Ausfällung des Komplexbildners einher. Nach Reaktivierung des Enzyms und Abtrennung des Komplexbildners betrug die Enzymaktivität 37,81 U/l von ursprünglich 40,22 U/l. Durch Reaktivierung, Ausfällung und Abtrennung des Komplexbildners entstand ein Aktivitätsverlust von 6 %. Dieses wird auf einen Verbleib des Enzyms im Filterkuchen zurückgeführt.

Nachdem Inaktivierung des Enzyms mittels Komplexbildner und Reaktivierung durch Absenkung des pH-Wertes grundsätzlich möglich waren, wurden Zerschäumungen durchgeführt. Die Zerschäumung wurde aus demin. Wasser durchgeführt; die Zerschäumungsbedingungen entsprachen denen der Laccase aus demin. Wasser. Die Anreicherung bei der Zerschäumung des Peroxidase- β -ADA-C8-Komplexes betrug 17,78 bei 85,35 % Wiederfindung. Die Wiederfindung der Meerrettich-Peroxidase im Schaum war deutlich höher als die Wiederfindung der Laccase. Dieses lässt sich auf die bessere Dekomplexierbarkeit der Meerrettich-Peroxidase zurückführen. Um näheres über die Anlagerung von β -ADA-C8 an das Enzym zu erfahren, wurde die Meerrettich-Peroxidase analog zur Laccase mit Fe^{3+} - β -ADA-C8-Komplexen zerschäumt. Die Meerrettich-Peroxidase wies eine 0,44-fache Anreicherung bei 10,84 % Wiederfindung im Schaum bei dieser Versuchsanordnung auf. Aufgrund der geringen Anreicherung und Wiederfindung der Meerrettich-Peroxidase im Schaum bei dieser Versuchsanordnung wird auch bei diesem Enzym von einer Anlagerung des Komplexbildners an das aktive Zentrum, nicht aber an das Apoenzym ausgegangen. Die effektive Anreicherung von Meerrettich-Peroxidase im Pinzettenverfahren kann somit auf die Wechselwirkung zwischen Komplexbildner und Enzymmetall zurückgeführt werden.

Die Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase im Pinzettenverfahren schafft aber nicht nur die Möglichkeit zur effizienten Aufkonzentrierung des Enzyms. Vielmehr dient die Meerrettich-Peroxidase als Modellsystem für andere hämin-haltige Proteine. So sollte es mit diesem Verfahren möglich sein neben hämin-haltigen Enzymen beispielsweise Hämoglobin und Myoglobin anzureichern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Laccase unter vollständigem Erhalt der katalytischen Aktivität sowohl im Batch-Verfahren als auch mittels kontinuierlicher Zerschäumung angereichert werden konnte. Nach Optimierung unterschiedlicher Parameter betrug die Anreicherung nach konventioneller Batch-Zerschäumung maximal 3,30 bei quantitativer Wiederfindung.

Die Kolonnenzerschäumung im Batch-Verfahren führte zu einer Steigerung der Anreicherung auf 6,73 bei quantitativer Wiederfindung. Die kontinuierliche Zerschäumung lieferte bei quantitativer Wiederfindung eine Anreicherung von 1,76. Allerdings konnte die Anreicherung nur zu Lasten der Wiederfindung auf 11,74 gesteigert werden. Die Wiederfindung betrug dann 70,15 %.

Durch die Zerschäumung im Pinzettenverfahren konnte die Anreicherung von Laccase weiter gesteigert werden. Zerschäumungen mit β -ADA und CTAB als Schaumbildner lieferten eine Anreicherung von 4,12 in der Pilotanlage. Die konventionelle Batch-Zerschäumung erreichte unter gleichen Bedingungen eine Anreicherung von 3,67. Durch Verwendung von β -ADA-C8 wurde die Anreicherung von Laccase in dieser Arbeit auf 13,30 bei 66,31 % Wiederfindung gesteigert.

Eine quantitative Wiederfindung konnte mit dieser Zerschäumungsform allerdings nicht erreicht werden, da Aktivitätsverluste durch Inaktivierung und Reaktivierung des Enzyms auftraten. Eine quantitative Wiederfindung wäre nur rechnerisch möglich, wenn die dekomplexierte Ausgangslösung als Referenz betrachtet würde.

Neben Laccase konnte auch Meerrettich-Peroxidase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 effektiv angereichert werden.

Die effektive Anreicherung der Enzyme wirft den Vergleich zu herkömmlichen Aufreinigungsmethoden auf. Während die Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie grundsätzlich Anreicherungsfaktoren von 3 – 6 erzielt, kann durch Affinitätschromatographie eine 500-fache Anreicherung erzielt werden. (Kreis et al. 2001).

Allerdings beziehen sich diese Anreicherungsfaktoren auf den Proteingehalt und sagen somit nichts über den Erhalt der katalytischen Aktivität aus, der bei der Aufreinigung von Enzymen essentiell ist.

Die Verluste an katalytischer Aktivität lagen bei der Aufreinigung von extrazellulärer Laccase aus Fermentationsüberständen zwischen 50 % und 90 %. (Shin und Lee, 2000; Jung et al., 2002; De Souza und Peralta, 2003; Iyer und Chattoo, 2003; Dong und Zhang, 2004)

Dong und Zhang (2004) beschrieben Aktivitätsverluste von 76,2 % nach Gelfiltration, Anionenaustauschchromatographie und nativer PAGE. De Souza und Peralta (2003) reinigten Laccase von *Pleurotis pulmonarius* bis zur elektrophoretischen Homogenität durch Acetonausfällung, Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration auf. Die Anreicherung betrug danach 5,9 bei 51 % Aktivitätsverlust.

Jung et al. (2002) erhielten durch chromatographische Reinigung Aktivitätsverluste von 60 %. Shin und Lee (2000) beschrieben Aktivitätsverluste von 67,7 % bei 14,5-facher Anreicherung nach mehreren Aufreinigungsschritten.

Die Aufreinigungsfaktoren und die Aktivitätsverluste der Meerrettich-Peroxidase sind je nach Aufreinigungsverfahren sehr unterschiedlich. *Guo* und *Ruckenstein* (2003) beschrieben nach Affinitätschromatographie einen Anreicherungsfaktor von 142 und eine Wiederfindung von 24 %.

Miranda et al. (1995) publizierten ein Aufreinigungsverfahren aus der Meerrettichwurzel, welches eine Wiederfindung von 90 % bei 4,8 facher Aufreinigung erzielt. *Regalado* et al. (1996) erzielten einen Aufreinigungsfaktor von 80 bei 46 % Wiederfindung.

Die Wiederfindungsfaktoren zeigen, dass während der Aufreinigung des Enzyms mit herkömmlichen Methoden ein Großteil der Enzymaktivität verloren geht.

Höhere Wiederfindungen bei teilweise gleichen Anreicherungsfaktoren konnten sowohl bei der Laccase als auch bei der Meerrettich-Peroxidase mittels Zerschäumung erzielt werden. Vorteil der Zerschäumung gegenüber den konventionellen Aufreinigungsverfahren ist, dass nur ein Aufarbeitungsschritt vorliegt. Des Weiteren kann die Zerschäumung als ökonomisches und ökologisches Verfahren in den konventionellen Aufarbeitungsprozess integriert werden, um kostenintensivere umweltschädliche Verfahren zu ersetzen.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es Enzyme unter Erhalt der katalytischen Aktivität mittels Zerschäumung anzureichern. Die Zerschäumung beruht auf der Abtrennung von löslichen, oberflächenaktiven Substanzen aus wässrigen Lösungen aufgrund ihrer Fähigkeit an gas-flüssig Grenzschichten zu adsorbieren. (Ostwald und Siehr, 1937; Lemlich, 1972; Maas, 1973; Bhattacharjee et al., 2001) Die Grenzschicht wird durch Einleiten eines Gases in eine Lösung (Ausgangslösung), welche die abzutrennenden bzw. anzureichernden Substanzen enthält, generiert. (Bartsch, 1926; Manegold, 1953; Cannon und Lemlich, 1972) Die Anlagerung der oberflächenaktiven Substanzen an die Grenzschicht bewirkt eine Verminderung der Oberflächenspannung und ermöglicht die Entstehung von Schaum. (Maas, 1973) Während sich die anzureichernden, oberflächenaktiven Verbindungen im Schaum anlagern, verarmt die Ausgangslösung an derartigen Substanzen.

Die Zerschäumung wurde bereits mehrfach zur Aufkonzentrierung von Enzymen verwendet, da sie eine ökonomische und umweltfreundliche Alternative zu herkömmlichen Verfahren wie Aussalzen, Dialyse oder Ultrafiltration mit nachfolgender chromatographischer Reinigung darstellt. Allerdings berichteten unterschiedliche Autoren von Aktivitätsverlusten der Enzyme während der Zerschäumung (Burapatata et al., 2004; Gehle und Schügerl, 1984; Uraizee und Narsimhan, 1990), während andere Enzyme unter Erhalt der katalytischen Aktivität angereichert werden konnten. (Uraizee und Narsimhan; 1990)

In dieser Arbeit wurde das extrazelluläre Enzym Laccase (EC 1.10.3.2.) von *Trametes spec.* aus SNL-Medium unter Erhalt bzw. Anreicherung der katalytischen Aktivität zerschäumt. Die Zerschäumung wurde zunächst im Batch-Verfahren durchgeführt. Um die Effizienz der Batch-Zerschäumung zu steigern, wurden im ersten Teil dieser Arbeit verschiedene Prozessparameter bezüglich einer quantitativen Wiederfindung bei möglichst hoher Anreicherung des Enzyms in der Schaumphase optimiert. Zu den optimierten Prozessparametern zählten der pH-Wert, die Zerschäumungstemperatur, die Art und Menge des Tensids, die Gasflussrate, die Gasart, die Gasblasengröße, die Säulendimensionen, der Füllstand und die Positionierung von volumenvergrößernden Einbauten. Nach Optimierung dieser Prozessparameter wurde eine Wiederfindung von 97,18 % bei 2,83-facher Anreicherung der Laccase im Schaum erzielt.

Des Weiteren wurde ein kontinuierlicher Schaumzerstörer entwickelt um Kolonnen- und Kreislaufzerschäumungen durchführen zu können. Sowohl durch Kolonnen- als auch durch Kreislaufzerschäumung konnte die Anreicherung weiter gesteigert werden. Allerdings wurde nur mittels Kolonnenzerschäumung eine quantitative Wiederfindung erzielt.

Um einen größeren Volumendurchsatz erzielen zu können, wurde die Laccase in einer kontinuierlichen Apparatur zerschäumt. Erneut wurden verschiedene Zerschäumungsparameter optimiert, bevor eine effektive kontinuierliche Zerschäumung gewährleistet werden konnte.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Zerschäumung in ihrer Effizienz weiter gesteigert werden. Die Effizienz der Zerschäumung wurde bisher von verschiedenen Autoren über den pH-Wert und somit den isoelektrischen Punkt des Enzyms gesteuert. (Ostwald et al., 1941; Charm et al., 1972; Suzuki et al., 2002) Diese Vorgehensweise war bei der Zerschäumung von Laccase relativ ineffektiv. Um die Effizienz der Zerschäumung von Laccase zu steigern, wurde in dieser Arbeit das sog. Pinzettenverfahren entwickelt. Das Pinzettenverfahren beruht auf der Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen zwischen Enzym und Tensid durch Komplexbildung der Metallkationen im aktiven Zentrum der Laccase. Die Komplexbildung konnte durch EDTA, DPTA und β -ADA gewährleistet werden. Um die Komplexbildner schäumbar zu machen wurden diese einerseits ionisch mit CTAB und andererseits kovalent mit einem Oktylrest gekoppelt, so dass N-Octyl-Carbamoyl-Methyl-Iminodiessigsäure entstand (β -ADA-C8). Die Zerschäumung des Enzym- β -ADA-Komplexes mit CTAB lieferte eine Anreicherung von 4,12 bei 71,5 % Wiederfindung. Nach Optimierung unterschiedlicher Zerschäumungsparameter wurden mit β -ADA-C8 Anreicherungen von 13,30 bei 66,31 % Wiederfindung erzielt. Nach der Zerschäumung konnte das Enzym durch Zugabe von Metallkationen oder durch Senkung des pH-Wertes dekomplexiert werden. β -ADA-C8 wurde durch Ausfällung und Filtration aus der aufkonzentrierten Lösung entfernt. Neben Laccase wurde das Pinzettenverfahren mit Meerrettich-Peroxidase und β -ADA-C8 durchgeführt. Die Zerschäumung des Peroxidase- β -ADA-C8-Komplexes lieferte eine Wiederfindung von 85,34 % bei 17,78-facher Anreicherung.

7. Literaturverzeichnis

Adamson, A.W. (1990)

Physikal Chemistry of Surfaces. John Wiley & Sons New York

Ahmad, S.I. (1975)

Laws of Foam Fractionation I. The Effect of Different Operating Parameters on the Foam Fractionation of Albumin from a Solution Containing Organic and Inorganic Materials. Separation Science, 10(6), 673-688

Ahmad, S.I. (1975)

Laws of Foam Fractionation II. The Influence of Different Association Conditions on Surfactants, Glycerides, Sugar, and Salts on the Foam Fractionation of Albumin. Separation Science, 10(6), 689-700

Ahmad, S.I.; Friburg, S. (1972)

The Influence of Different Additives on the Efficiency of Albumine Foam Fractionation. Progress in Chemical Engineering, 5(3)

Andrews, G.; Schutz, F. (1945)

Differential Adsorption of Pepsin and Rennin on Foam. Biochemical Journal, 39(5), R51-R52

ASA-Sezialenzyme

Produktinformation; www.asa-enzyme.de

Baarson, R.E.; Ray, C.L. (1963)

Precipitate Flotation – A New Metal Extraction and Concentration Technique, Petrol. Eng. Symp. Dallas

Banerjee, R.; Agnihotri, R.; Bhattacharyya, B.C. (1993)

Purification of Alkaline Protease of *Rhizopus oryzae* by Foam Fractionation. Bioprocess Engineering, 3, 245-248

Bartsch, O. (1926)

Über Schaumsysteme. Kolloidchemische Beihefte Band 10, Heft 1-5

Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2001)

Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer Verlag Berlin

Berglund, G.I.; Carlsson, G.H.; Smith, A.T.; Szöke, H.; Henriksen, A.; Hajdu, J. (2002)

The Catalytic Pathway of Horseradish Peroxidase at High Resolution. *Nature*, 417, 463-468

Bhattacharjee, S.; Kumar, R.; Ghandhi, K.S. (1997)

Prediction of Separation Factor in Foam Separation of Proteins. *Chemical Engineering Science*, 52(24), 4625-4636

Bhattacharjee, S.; Kumar, R.; Gandhi, K.S. (2001)

Modelling of Protein Mixture in a Batch Foam Column. *Chemical Engineering Science*, 56, 5499-5510

Bisswanger, H. (1994)

Enzymkinetik – Theorie und Methoden. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim

Boonyasuwat, S.; Chavadej, S.; Malakul, P.; Scamehorn, J.F. (2003)

Anionic and Cationic Surfactant Recovery from Water Using a Multistage Foam Fractionation. *Chemical Engineering*, 93, 241-252

Bourbonnais, R.; Leech, D.; Paice, M.G. (1998)

Elektrochemical Analysis of the Interaction of Laccase Mediators with Lignin Model Compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379, 381-390

Briggs, G.E.; Haldane, J.B.S. (1925)

A Note on the Kinetics Enzyme Action. *Biochemical Journal*, 19, 338-339

Britten, M.; Lavoie, L. (1992)

Foaming Properties of Proteins as Affected by Concentration. *Journal of Food Science*, 57(5), 1219-1222

Brown, A.K.; Kaul, A.; Varley, J. (1999)

Continuous Foaming for Protein Recovery: Part I. Recovery of β -Casein. *Biotechnology and Biochemical Engineering*, 62, 278-290

Brown, A.K.; Kaul, A.; Varley, J. (1999)

Continuous Foaming for Protein Recovery: Part II. Selective Recovery of Proteins from Binary Mixtures. *Biotechnology and Biochemical Engineering*, 62, 291-300

Brown, L.; Narsimhan, G.; Wankat, P.C. (1990)

Foam Fractionation of Globular Proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 947-959

Burapatata, V.; Prokop, A.; Tanner, R.D. (2004)

Degeneration of β -Glucosidase Activity in Foam Fractionation Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113(16), 619-625

Cannon, K.D.; Lemlich, R. (1972)

A Theoretical Study of Bubble Fractionation. *AIChE Symposium Series*, 68(124), 180-184

Charm, S.E. (1972)

Foam Separation of Enzymes and other Proteins. In: *Adsorptive Bubble Separation Techniques*, Lemlich, R. (Hrsg.), Academic Press New York

Charm, S.E.; Morningstar, J.; Matteco, C.C.; Paltiel, B. (1966)

The Separation and Purification of Enzymes through Foaming. *Analytical Biochemistry*, 15,498-508

Clarkson, J.R.; Cui, Z.F.; Darton, R.C. (1999)

Protein Denaturation in Foam. I. Mechanism Study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 215, 323-332

Clarkson, J.R.; Cui, Z.F.; Darton, R.C. (1999)

Protein Denaturation in Foam. II. Surface Activity and Conformational Change. *Journal of Colloid and Interface Science*, 215, 333-338

Clarkson, J.R.; Cui, Z.F.; Darton, R.C. (2000)

Effect of Solution Conditions on Protein Damage in Foam. *Biochemical Engineering Journal*, 4, 107-114

Claus, H. (2004)

Laccases: Structure, Reactions, Distribution. *Micron*, 35, 93-96

Crofcheck, C.; Loisell, M.; Weekley, J.; Maiti, I.; Pattanaik, S.; Bummer, P.M.; Jay, M. (2003)

Histidine Targeted Protein Recovery from Tobacco Extract by Foam Fractionation. *Biotechnology Progress*, 19, 680-682

Crofcheck, C.; Gillette, K. (2003)

Evaluation of Foam Fractionation Column Scale-up for Recovering Bovine Serum Albumin. *Transactions of the ASAE*, 46(6), 1759-1764

Darton, R.C.; Supino, S.; Sweeting, K.J. (2004)

Development of a Multistage Foam Fractionation Column. *Chemical Engineering and Processing*, 43, 477-482

Davis, S.G.; Fellers, C.R.; Esselen, W.B. (1949)

Foam Fractionation Procedure in the Isolation of Fruit Proteins. *Food Technology*, 3, 198-201

De Souza, C.G.M.; Peralta, R.M. (2003)

Purification and Characterisation of the Main Laccase Produced by White-Rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on Wheat Bran Solid State Medium. *Journal of Basic Microbiology*, 43(4), 278-286

Dickinson, E. (1989)

Protein Adsorption of Liquid Interfaces and the Relationship to Foam Stability. In: *Foams: Physics, Chemistry and Structure*, Springer Verlag London

Dognon, A.; Dumontet, H. (1941)

Zerschäumungsapparatur. In: Rubin, E.; Gaden, E.L. (1962) *Foam Separation*. In: *New Chemical Engineering Techniques*, Schoen, H.M. (Hrsg.), Interscience New York

Dong, J.L.; Zhang, Y.Z. (2004)

Purification and Characterisation of two Laccase Isoenzymes from a Ligninolytic Fungus *Trametes gallica*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 34(2), 179-194

Dorman, D.C.; Lemlich, R. (1965)

Separation of Liquid Mixtures by Non-Foaming Bubble Fractionation. *Nature*, 207, 145-146

Ducros, V.; Brzozowski, A.M.; Wilson, K.S.; Brown, S.H.; Ostergaard, P.; Schneider, P.; Yavar, D.S.; Pederson, A.H.; Davis, G.J. (1998)

Crystal Structure of Type-2 Cu Depleted Laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å Resolution. *Nature Structural Biology*, 5(4), 310-316

Dunford, H.B. (1991)

In: *Peroxidases in Chemistry and Biology*. Everse, J.; Everse, K.E.; Grisham, M.B. (Hrsg.), Vol.2, 1-24 CRC Press Boca Raton

Edwards, S.L.; Xuong, N.H.; Hamlin, R.C.; Kraut, J. (1987)

Crystal Structure of Cytochrome C Peroxidase Compound I. *Biochemistry*, 26, 1503-1511

Elizalde, B.E.; Giaccaglia, D.; Pilosof, A.M.R.; Bartholomai, G.B. (1991)
Kinetics of Liquid Drainage from Protein-Stabilized Foams. *Journal of Food Science*, 56(1), 24-26

Enguita, F.J.; Marcal, D.; Martins, Henriques, A.O.; Carrondo, M.A. (2003)
Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19416-19425

Enguita, F.J.; Martins, L.O.; Grenha, R.; Henriques, A.O.; Lindley, P.F.; Carrondo, M.A. (2004)
Substrate and Dioxigan Binding to the Endospore Coat Laccase from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 23472-23476

Flaschel, E.; Wandrey, C.; Kula, M.R. (1983)
Ultrafiltration for the Separation of Biocatalysts. *Advanced Biochemical Engineering*, 26, 73-142

Fülöp, V.; Phizackerley, R.P.; Soltis, S.M.; Clifton, I.J.; Wakatsuki, S.; Erman, J.; Hajdu, J.; Steven, L. (1994)
Laue Diffraction Study on the Structure of Cytochrome C Peroxidase Compound I. *Structure*, 2, 201-208

Gaudin, A.M. (1957)
Flotation. McGraw-Hill New York

Gaudin, A.M.; Mular, A.L.; O'Connor, R.F. (1960)
Separation of Microorganism by Flotation I. Development and Evaluation of Assay Procedures. *Applied Microbiology*, 8, 84-90

Gaudin, A.M.; Mular, A.L.; O'Connor, R.F. (1960)
Separation of Microorganism by Flotation II. Flotation of Spores of *Bacillus subtilis* var. niger. *Applied Microbiology*, 8, 91-97

Gehle, R.; Schügerl, K. (1984)

Pinicillum Recovery from Aqueous Solutions by Continuous Foam Fractionation. Applied Microbiology and Biotechnology, 19, 373-375

Gehle, R.; Sie, T.W.; Kramer, T.; Schügerl, K. (1991)

Continuous Cultivation and Flotation of *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* in an Integrated Pilot Plant Reactor-Flotation Column-System. Journal of Biotechnology, 17(2), 147-154

Gold, A.; Weiss, R. (2000)

High-Valent Ion Porphyrins. Journal of Porphyrins and Phtalocyanines, 4(4), 344-349

Görg, A.; Postel, W.; Günther, S. (1988)

The Current State of Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients. Elektrophoresis, 9, 531-546

Görg, A. (1991)

Two-Dimensional Electrophoresis. Nature, 349, 545-546

Gray, P.P.; Stone, I. (1940)

Zerschäumungsapparatur. In: Rubin, E.; Gaden, E.L. (1962)

Foam Separation. In: New Chemical Engineering Techniques, Schoen, H.M. (Hrsg.), Interscience New York

Grieves, R.B. (1982)

Adsorptive Bubble Separation Methods. In: Treatise on Analytical Chemistry, 1(5), 371-448, Kolthoff, I.A. (Hrsg.), Interscience Publ. New York

Gschwendtner, O. (2000)

Anreicherung von Pflanzenproteinen mit Hilfe der adsorptiven Zerschäumung. Diss. TU München

Guo, W.; Ruckenstein, E. (2003)

Separation and Purification of Horseradish Peroxidase by Membrane Affinity Chromatography. *Journal of Membrane Science*, 221(1), 101-111

Haschke, R.H.; Friedhoff, J.M. (1978)

Calcium-Related Properties of Horseradish Peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 80, 1039-1042

Heine, E.; Schub, E.; Daaloul, N.; Höcker, H.; Breier, R.; Schmidt, M.; Apitz, A.; Brummer, A.; van Pee, K.H.; Scheiber, K. (1999)

Oxidative Enzyme in der Textilindustrie. *Biokatalyse, Sonderausgabe der DBU*

Henriksen, A.; Smith, A.T.; Gajhede, M. (1999)

The Structure of the Horseradish Peroxidase C-Ferulic Acid Complex and the Ternary Complex with Cyanide Suggest How Peroxidases Oxidize Small Phenolic Substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 35005-35011

Holland, C.R.; Otterburn, M.-S.; McComiskey, P. (1983)

Froth Flotation as a Means of Protein Extraction from Mussels. *Journal of Food Technology*, 18, 195-205

Howes, D.B.; Feis, A.; Raimondi, L.; Indiani, C.; Smulevich, G. (2001)

The Critical Role of the Proximal Calcium Ion in the Structural Properties of Horseradish Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 40704-40711

Hussenot, J.; Lefebvre, S.; Brossard, N. (1998)

Open-air Treatment of Wastewater from Land-Based Marine Fish Farms in Extensive and Intensive Systems: Current Technology and Future Perspectives. *Aquatic Living Resources*, 11(4), 297-304

Iyer, G.; Chattoo, B.B. (2003)

Purification and Characterisation of Laccase from the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. *FEMS Microbiology Letters*, 227(1), 121-126

Jacoby, W.B.; Wilcheck, M. (1974)

Methods in Enzymology. Academic Press New York

Jenkins, D.; Scherfing, J.; Eckhoff, D.W. (1972)

Application of Adsorptive Bubble Separation Techniques to Waste Water Treatment.
In: Adsorptive Bubble Separation Techniques, Lemlich, R. (Hrsg), Academic Press
New York

Jung, H.C.; Xu, F.; Li, K.C. (2002)

Purification and Characterisation of Laccase from Wood-Degrading Fungus
Trichophyton rubrum LKY-7. Enzyme and Microbial Technology, 30(2), 161-168

Kaiser, R.; Gottschalk, G. (1972)

Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten. Bibliographisches Institut
Wissenschaftsverlag Mannheim

Karger, B.L.; Devivo, D.G. (1968)

General Survey of Adsorptive Bubble Separation Processes. Separation Science,
3(5), 393-424

Karlson, P.; Doenecke, D.; Koolmann, J. (1994)

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg
Thieme Verlag Stuttgart und New York

Kitchener, J.A.; Cooper, C.F. (1959)

Current Concepts in the Theory of Foaming. Quart. Rev. Chem. Soc., 13

Ko, S.; Loha, V.; Prokop, A.; Tanner, R.D. (1998)

Batch Foam Recovery of Sporamin from Sweet Potato. Applied Biochemistry and
Biotechnology, 70(2), 547-558

Koolmann, J.; Röhm, K.H. (2003)

Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart und New York

Kreis, W.; Baron, D; Stoll, G. (2001)

Biotechnologie der Arzneistoffe. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart

Kulys, J.; Ziemys, A. (2001)

A Role of Proton Transfer in Peroxidase-Catalyzed Process Elucidated by Substrates Docking Calculations. www.biomedcentral.com/1472-6807/1/3

Laberge, M.; Huang, Q.; Schweitzer-Stenner, R.; Fidy, J. (2003)

The Endogenous Calcium Ions of Horseradish Peroxidase C are Required to Maintain the Functional Nonplanarity of the Heme. *Biophysical Journal*, 84, 2542-2552

Lehninger, A.L. (1975)

Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim

Lemlich, R. (1961)

Foam Fractionation with Reflux. *Science*, 34, 3473

Lemlich, R. (1968)

Foam Fractionation and Allied Techniques. *Industrial and Engineering Chemistry*, 60(10), 16-29

Lemlich, R. (1968)

Principles in Foam Fractionation. In: *Separation and Purification*, Perry, E.S. (Hrsg), Interscience Publisher New York

Lemlich, R. (1972)

Adsorptive Bubble Separation Techniques. Academic Press New York

Lemlich, R. (1972)

Adsuble Methods. *Recent Development in Separation Science*, 1, 113-127

Lemlich, R. (1972)

Adsubble Process: Foam Fractionation and Bubble Fractionation. *Journal of Geophysic Research*, 77(27), 5204-5210

Leonard, R.A.; Blacyki, J.D. (1978)

Multistage Bubble Fractionator. *Industrial and Engineering Chemistry. Process Design and Development*, 17(3), 358-361

Lima, V.; Varley, J. (1994)

Foam Fractionation of Proteins. *Anal. of the New York Academy of Science*, 782, 375-390

Lin, H.S.; Lo, C.C. (1996)

Treatment of Textile Wastewater by Foam Flotation. *Environmental Technology*, 7, 841-849

Lippard, S.J.; Berg, J.M. (1995)

Bioanorganische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

Liu, H.-S.; Wang, S.-S.; Chiou, T.-W. (1995)

Concentrating Bovine Serum Albumin by Foam Fractionation. *Journal of the Chinese Colloid and Interface Society*, 18, 53-60

Liu, Z.; Wang, D.; Ding, W.; 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. *Pharmaceutical Research*, 14(11), 1511-1515

London, M.; Cohen, M.; Hudson, P.B. (1954)

Some General Characteristics of Enzyme Foam Fractionation. *Biochimica and Biophysica Acta*, 13, 111-120

Lottspeich, F.; Zorbass, H. (1998)

Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin

Lucema, de L.S.; Miranda, E.A.; Santana, C.C. (1996)

The Effect of External Reflux on the Foam Fractionation of Proteins. Applied Biochemistry and Biotechnology, 57/58, 57-65

Maas, K. (1973)

Adsorptive Bubble Separation Techniques. In: Methodicum Chemicum, Korte, F. (Hrsg.), Academic Press New York

Maas, K. (1974)

A New Type of Adsorbent Methods: Booster Bubble Fractionation- Hastened and Improves Bubble Fractionation of Low-Foaming Solutions. Separation Science, 4(6), 457-465

Manegold, E. (1953)

Schaum. Straßenbau, Chemie und Technik Verlagsgesellschaft m.b.H. Heidelberg

Mathewson, P.R. (1998)

Enzymes. Eagon Press, St. Paul

Meno, K.; Jennings, S.; Smith, A.T.; Gajhede, M. (2002)

Structural Analysis of the Two Horseradish Peroxidase Catalytic Residue Variants H42E and R38S/H42E: Implications for the Catalytic Cycle. Acta Crystallographica Section D – Biological Crystallography, D58, 1803-1812

Michaelis, L.; Menten, M.L. (1913)

Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochemische Zeitschrift, 49, 333-369

Mindt, H.-W.; Ottow, W. (2004)

Literatur- und Internetrecherche zum Themengebiet Schaum; www.info@a-CFD.de

Miranda, M.V.; Lahore, H.M.F.; M Cascone, O. (1995)

Horseradish-Peroxidase Extraction and Purification by Aqueous 2-Phase Partition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53(2), 147-153

Mischke, W. (1940)

Untersuchung über Zerschäumung mit besonderer Rücksicht auf Fragen der angewandten Chemie II. *Kolloid-Zeitschrift*, 90, 77-89

Montero, G.A.; Kirschner, T.F.; Tanner, R.D. (1993)

Bubble and Foam Concentration of Cellulase. *Applied Biochemistry and Technology*, 39/40, 467-475

Morishima, I.; Kurono, M.; Shiro, Y. (1986)

Presence of Endogenous Calcium Ions in Horseradish Peroxidase. Elucidation of Metal-Binding Site by Substitution of Divalent and Lanthanide Ions for Calcium and Use of Metal Induced NMR Resonances. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 9391-9399

Newmyer, S.L.; Ortiz de Montellano, P.R. (1996)

Rescue of the Catalytic Activity of an H42A Mutant of Horseradish Peroxidase by Exogenous Imidazoles. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 14891-14896

Nielson, K.L.; Indiana, C.; Henriksen, A.; Feis, A.; Becucci, M.; Gajhede, M.; Smulevich, G.; Welinder, K.G. (2001)

Different Activity and Structure of Highly Similar Peroxidases. Spectroscopic, Crystallographic, and Enzymatic Analyses of Lignifying *Arabisidopsis thaliana* Peroxidase A2 and Horseradish Peroxidase A2. *Biochemistry*, 40, 11013-11021

Noble, M.; Brown, A.; Jauregi, P.; Kaul, A.; Varley, J. (1998)

Protein Recovery using Gas-Liquid Dispersion. *Journal of Chromatography B*, 711, 31-43

Ogawa, S.; Shiro, Y.; Morishima, I. (1979)

Calcium Binding by Horseradish Peroxidase C and the Heme Environmental Structure. Biochemical and Biophysical Research Communications, 90, 674-678

Ostwald, W. (1920)

Verfahren zum Verdampfen von Flüssigkeiten. Patentschrift Nr. 327976, Klasse 12a, Gruppe 2. Reichspatentamt

Ostwald, W.; Mischke, W. (1940)

Untersuchungen über Zerschäumung mit besonderer Rücksicht auf Fragen der angewandten Chemie I. Kolloid-Zeitschrift, 90, 17-25

Ostwald, W.; Mischke, W. (1940)

Untersuchungen über Zerschäumung mit besonderer Rücksicht auf Fragen der angewandten Chemie III. Kolloid-Zeitschrift, 90, 205-215

Ostwald, W.; Siehr, A. (1936)

Über Zerschäumungsanalyse I. Kolloid-Zeitschrift, 76(1), 33-46

Ostwald, W.; Siehr, A. (1937)

Über Zerschäumungsanalyse II. Kolloid-Zeitschrift, 79(1), 11-15

Ostwald, W.; Siehr, A. (1937)

Über Schaum- und Zerschäumungsanalyse. Chemiker-Zeitung, 64, 649-653

Ostwald, W.; Siehr, A.; Mischke, W. (1941)

Zerschäumungsanalyse. Fermentforschung, 1467-1474

Peters, D. (1952)

Zerschäumungsanalyse als Hilfsmittel für die Charakterisierung löslicher Proteine. Kolloid-Zeitschrift, 125(3), 157-167

Peters, D. (1952)

Zerschäumungsanalyse kristalliner Serumalbumine. Die Naturwissenschaften, 39(4), 88-89

Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. (2002)

Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1,90 Å Containing a Full Complement of Coppers. The Journal of Biological Chemistry, 277(40), 37663-37669

Poulus, T.L.; Kraut, J. (1980)

The Stereochemistry of Peroxidase Catalysis. The Journal of Biological Chemistry, 255, 8199-8205

Prater, D.N. (2004)

An Overview of the Biological Oxygen-Oxygen Bond Splitting Mechanism in Heme-Containing Peroxide Reduction Enzymes. www.swiftenterprises.net

Präve, P.; Faust, U.; Sittig, W.; Sukatsch, D.A. (1994)

Handbuch der Biotechnologie. R. Oldenbourg Verlag München und Wien

Prins, A. (1988)

Principles in Foam Stability. In: Advances in Food Emulsions and Foam, Applied Science Publishers Ltd

Regalado, C.; Asenjo, J.A.; Pyle, D.L. (1996)

Studies of the Purification of Peroxidase from Horseradish Roots using Reverse Micelles. Enzyme and Microbial Technology, 18(5), 332-339

Robinson, D.S.; Eskin, N.A.M. (1991)

Oxidative Enzyme in Foods. Elsevier Applied Science London und New York.

Rodgers, N.E. (1972)

Foam Separation of Gluten and Starch. United States Patent, Appl. No.: 318, 145; U.S. Cl. 260/112 G

Rodriguez-Lopez, J.N.; Lowe, D.J.; Hernandez-Ruiz, J.; Hiner, A.N.P.; Garcia-Canovas, F.; Thorneley, R.N.F. (2001)

Mechanism of Reaction of Hydrogen Peroxide with Horseradish Peroxidase: Identification of Intermediates in the Catalytic Cycle. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 11838-11847

Sakurai, T. (1992)

Anaerobic Reactions of *Rhus vernicifera* Laccase and its Type-2 Copper-Depleted Derivates with Hexacyanoferrat. *Biochemistry Journal*, 284, 681-685

Sarkar, P.; Bhattacharya, P.; Mukherjea, R.N.; Mukerjea, M. (1987)

Isolation and Purification of Protease from Human Placenta by Foam Fractionation. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 934-940

Schellenberger, A. (1989)

Enzymkatalyse. Springer Verlag Berlin

Schmidt-Klemens, A.; McMillin, D.R. (1990)

New Method for Removing Type 2-Copper from Rhus Laccase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 38(2), 107-115

Schonfeld, E.; Kibbey, A.H. (1967)

Improving Strontium Removal from Solutions by Controlled Reflux Foam Fractionation. *Journal of Nuclear Applications*, 3, 352-359

Schütz, F. (1937)

Adsorption in Foam. *Nature*, 139, 629-630

Scopes, R.K. (1984)

Protein Purification. Springer Verlag New York

Sebba, F. (1962)

Ione Flotation. Elsevier New York

Servili, M.; De Stefano, G.; Piacquadio, P.; Sciancalepore, V. (2000)

A Novel Method for Removing Phenols from Grape Must. *Am. J. Enol. Vitic*, 51, 357-361

Shannon, L.M.; Kay, E.; Lew, J.Y. (1966)

Peroxidase Isoenzymes from Horseradish Roots I. Isolation and Physical Properties. *Journal of Biological Chemistry*, 241, 2166-2172

Shin, K.S.; Lee, Y.J. (2000)

Purification and Characterisation of New Member of the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(1), 109-115

Shinando, K.; Mashio, K. (1960)

Selected Adsorption Studies by Radio Tracer Technique: Selective Adsorption of Labeled Alkali-p-Dodecylbenzene Sulfonate ^{S35} or Labeled Potassium Hexadecanoate C¹⁴ at the Air-Solution-Interface of Aqueous Solutions of Surfactant Mixture. *Journal of Physical Chemistry*, 64, 54-57

Shiro, Y.; Kurono, M.; Morishima, I. (1986)

Presence of Endogenous Calcium Ions and its Functional and Structural Regulation in Horseradish Peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 9382-9390.

Sitter, A.J.; Reczek, C.M.; Turner, J. (1985)

Heme-Linked Ionization of Horseradish Peroxidase Compound II Monitored by the Resonance Raman Fe(IV)=O Stretching Vibration. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 7515-7522

Smeller, L.; Fidy, J.; Heremans, K. (2004)

Protein Folding, Unfolding and Aggregation. Pressure Induced Intermediate on the Refolding Pathway of Horseradish Peroxidase. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16, 1053-1058

Solomon, E.I.; Chen, P.; Metz, M.; Lee, S.-K.; Palmer, A.E. (2001)

Kupferproteine: Koordination und Aktivierung von Sauerstoff und seine Reduktion zu Wasser. *Angewandte Chemie*, 113, 4702-4724

Sprecher, E. (1959)

Über die Guttation bei Pilzen. *Planta (Berichte)*, 53, 565-574

Suzuki, A.; Yasuhara, K.; Seki, H.; Maruyama, H. (2002)

Selective Foam Separation of Binary Protein Solution by SDS Complexation Method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 253, 402-408

Tharapiwattananon, N.; Scamehorn, J.; Ozuwan, S.; Harwell, J.; Haller, K.J. (1996)

Surfactant Recovery from Water Using Foam Fractionation. *Journal of Separation Science and Technology*, 31, 1233-1258

Thomas, A.; Winkler, M.A. (1977)

Foam Separation of Biological Materials. In: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Wiseman, A. (Hrsg.), Horwood Verlag Chichester

Thurston, C.F. (1994)

The Structure and Function of Fungal Laccases. *Microbiology*, 140, 19-26

Uraizee, F.; Narisimhan, G. (1990)

Foam Fractionation of Proteins and Enzymes: I. Applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 232-233

Uraizee, F.; Narsimhan, G. (1990)

Foam Fractionation of Proteins and Enzymes. II. Performance and Modelling. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 315-316

Uraizee, F.; Narsimhan, G. (1995)

Foam Based Separation of Proteins. In: *Bioseparation Process in Foods*, Singh, R.K.; Rivi, S.S.H (Hrsg.), 175-225

Uraizee, F.; Narsimhan, G. (1996)

Effects of Kinetics and Adsorption and Coalescence on Continuous Foam Concentration of Proteins: Comparison of Experimental Results with Model Prediction. *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 384-398

Varley, J.; Kaul, A.; Ball, S. (1996)

Partition of Protein from Binary Mixture by a Batch Foaming Process. *Biotechnology Techniques*, 10(2), 133-140

Velissariou, M.; Lyddiat, A. (1990)

Foaming Properties of Well Defined Protein Systems. In: *Food Polymers, Gels and Colloids*, Dickinson, E. (Hrsg.); Royal Society of Chemistry Cambridge

Viehweg, H.; Schügerl, K. (1983)

Cell Recovery by Continuous Flotation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17, 96-102

Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C. (2002)

Lehrbuch der Biochemie. Wiley-VCH Verlag Weinheim

Walkowiak, W.; Grieves, R.B. (1976)

Foam Fractionation of Cyanide Complex Anions of Zn(II), Cd(II), Hg(II), Au(III). *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 38(7), 1351-1356

Walling, C.; Ruff, E.E.; Thornton, J.L. (1952)

An Improved Apparatus for the Study of Foams. *Journal of Physical Chemistry*, 56, 989-993

Welinder, K.G. (1985)

Plant Peroxidases – Their Primary, Secondary and Tertiary Structure, and Relation to Cytochrome C Peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 151(3), 497-505

Wong, C.H.; Hossain, M.M.; Davies, C.E. (2001)

Performance of a Continuous Foam Separation Column as a Function of Process Variables. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24, 73-81

Xu, F. (1996)

Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potential as Well as Halide Inhibition. *Biochemistry*, 35, 7608-7614

Anhang

Tab.: Aktivitätsabnahme in der Ausgangslösung während der Zerschäumung von Laccase

$t_{\text{Zerschäumung}}$ in min	Rest- Enzymaktivität in %	$t_{\text{Zerschäumung}}$ in min	Rest- Enzymaktivität in %
0	100 ± 0	32	22 ± 0,4
2	90,5 ± 16,5	34	19,6 ± 4,6
4	79,4 ± 8,9	36	19,6 ± 4,6
6	70,9 ± 11,9	38	19,6 ± 4,6
8	61,2 ± 9,7	40	19,6 ± 4,6
10	55,6 ± 9,7	42	17,7 ± 4,1
12	53,2 ± 12,3	44	17,7 ± 4,1
14	42,1 ± 2,8	46	16,5 ± 5,8
16	39,7 ± 4,4	48	16,5 ± 5,8
18	36 ± 8,3	50	12,8 ± 3,3
20	28,5 ± 6,2	52	12,8 ± 3,3
22	28,5 ± 6,2	54	12,8 ± 3,3
24	22 ± 0,4	56	12,8 ± 3,3
26	22 ± 0,4	58	12,8 ± 3,3
28	22 ± 0,4	60	12,8 ± 3,3
30	22 ± 0,4		

Tab.: Die Zerschäumung von Laccase mit verschiedenen Schaumentnahmesystemen

	Schaumentnahme mittels	
	Rundkolben	U-Rohr
E_r	5,00 ± 0,49	5,11 ± 0,75
R in %	77,33 ± 0,05	80,70 ± 2,37
Restaktivität in der Ausgangslösung in %	15,77 ± 3,90	16,07 ± 5,39
Verlorene Aktivität in %	6,87 ± 3,96	3,23 ± 4,21

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

pH-Wert	E_r	R in %
3,0	$0,84 \pm 0,12$	$32,19 \pm 3,76$
4,0	$1,87 \pm 0,18$	$29,42 \pm 0,91$
5,0	$2,51 \pm 0,17$	$75,00 \pm 4,33$
5,5	$5,11 \pm 0,75$	$80,70 \pm 2,37$
6,0	$3,19 \pm 0,17$	$80,07 \pm 7,38$
7,0	$2,89 \pm 0,18$	$62,08 \pm 5,45$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

C_{CTAB} in mg/ml	E_r	R in %
0,1	$2,98 \pm 0,30$	$32,19 \pm 3,76$
0,2	$5,11 \pm 0,75$	$80,70 \pm 2,37$
0,3	$3,07 \pm 0,89$	$79,75 \pm 2,28$
0,4	$2,96 \pm 0,35$	$85,95 \pm 3,44$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Methylcellulose-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

$C_{Methylcellulose}$ in mg/ml	E_r	R in %
0,25	$1,30 \pm 0,05$	$47,55 \pm 2,26$
0,50	$1,06 \pm 0,11$	$55,68 \pm 2,21$
0,75	$1,23 \pm 0,02$	$93,53 \pm 2,72$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Lecithin-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

$C_{Lecithin}$ in mg/ml	E_r	R in %
1,00	$0,90 \pm 0,13$	$6,51 \pm 1,03$
3,00	$0,88 \pm 0,26$	$15,54 \pm 3,62$
5,00	$0,88 \pm 0,15$	$28,78 \pm 1,98$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

c_{SDS} in mg/ml	E_r	R in %
0,30	$0,91 \pm 0,05$	$42,50 \pm 8,66$
0,40	$1,01 \pm 0,01$	$50,02 \pm 0,36$
0,50	$0,97 \pm 0,01$	$77,07 \pm 0,79$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase mit Methylcellulose im Batch-Verfahren

pH	E_r	R in %
3,0	$0,91 \pm 0,02$	$55,22 \pm 2,36$
3,5	$1,11 \pm 0,08$	$70,42 \pm 1,43$
5,5	$1,06 \pm 0,11$	$55,68 \pm 2,21$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase mit Lecithin im Batch-Verfahren

pH	E_r	R in %
3,0	$1,09 \pm 0,03$	$36,07 \pm 2,54$
3,5	$0,96 \pm 0,07$	$28,44 \pm 2,06$
5,5	$0,88 \pm 0,15$	$28,78 \pm 1,98$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase mit SDS im Batch-Verfahren

pH	E_r	R in %
3,0	$1,33 \pm 0,11$	$64,10 \pm 0,10$
3,5	$0,99 \pm 0,09$	$54,95 \pm 1,43$
5,5	$1,01 \pm 0,01$	$50,02 \pm 0,36$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

Gasflussrate in ml/min	E_r	R in %
10	$4,14 \pm 1,32$	$59,13 \pm 7,80$
20	$2,79 \pm 0,32$	$81,12 \pm 3,05$
30	$2,62 \pm 0,41$	$88,85 \pm 6,80$
40	$2,20 \pm 0,11$	$99,33 \pm 5,03$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasart nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

Gas	E_r	R in %
CO ₂	$2,10 \pm 0,53$	$59,13 \pm 7,80$
Ar	$1,97 \pm 0,36$	$93,97 \pm 11,15$
N ₂	$2,20 \pm 0,11$	$99,33 \pm 5,03$
Druckluft	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$
He	$2,61 \pm 0,82$	$73,12 \pm 11,84$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Porengröße der Glasfilterkerze nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

Porengröße in μm	E_r	R in %
16-40	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$
40-100	$2,10 \pm 0,17$	$81,72 \pm 1,42$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zerschäumungstemperatur nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

$T_{\text{Zerschäumung}}$ in °C	E_r	R in %
1	$6,32 \pm 1,35$	$75,79 \pm 1,34$
10	$3,30 \pm 0,91$	$91,60 \pm 15,98$
20	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$
30	$2,59 \pm 0,30$	$83,23 \pm 3,91$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom Säuleninnendurchmesser nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

$d_{\text{Säule, innen}}$ in mm	E_r	R in %
19	$1,40 \pm 0,03$	$98,67 \pm 2,31$
29	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$
40	$2,97 \pm 0,21$	$59,46 \pm 4,83$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zerschäumungsdauer nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren mit einem Säuleninnendurchmesser von 40 mm

$t_{\text{Zerschäumung}}$ in min	E_r	R in %
50	$2,97 \pm 0,21$	$59,46 \pm 4,83$
70	$2,97 \pm 0,19$	$46,54 \pm 0,94$
95	$2,96 \pm 0,27$	$46,75 \pm 2,66$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Säulenlänge nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

$l_{\text{Säule}}$ in m	E_r	R in %
0,50	$1,88 \pm 0,32$	$98,14 \pm 8,83$
0,75	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$
1,00	$2,20 \pm 0,45$	$92,93 \pm 5,05$
1,25	$1,92 \pm 0,28$	$66,34 \pm 5,58$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom Füllstand nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

Füllstand in m	E_r	R in %
0,05	$2,62 \pm 0,30$	$70,63 \pm 0,19$
0,10	$3,05 \pm 0,89$	$94,28 \pm 5,07$
0,15	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$
0,20	$2,08 \pm 0,46$	$91,84 \pm 2,42$
0,25	$2,07 \pm 0,04$	$78,54 \pm 0,21$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Positionierung volumenvergrößernder Einbauten (250 ml) nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

Position der Einbauten	E_r	R in %
Unten	$3,44 \pm 0,74$	$63,74 \pm 5,23$
Oben	$2,62 \pm 0,31$	$77,95 \pm 9,69$
Ohne	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Positionierung von Einbauten unterschiedlichen Volumens nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren

$V_{\text{Einbauten}}$ in ml	E_r	R in %
0	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$
50	$2,08 \pm 0,09$	$66,32 \pm 2,47$
100	$2,56 \pm 0,03$	$64,86 \pm 1,38$
250	$3,44 \pm 0,74$	$63,74 \pm 5,23$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung nach der Zerschäumung von Laccase im Batch-Verfahren unter Verwendung eines kontinuierlichen Schaumzerstörer verglichen mit der chemischen Schaumzerstörung durch SDS-Lösung

Schaumzerstörung	E_r	R in %
Mittels SDS-Lösung	$2,83 \pm 0,53$	$97,18 \pm 4,83$
Mittels kontinuierlichem Schaumzerstörer	$3,30 \pm 0,18$	$98,46 \pm 5,48$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung nach der Kolonnenzerschäumung von Laccase verglichen mit der einfachen Batch-Zerschäumung

Zerschäumungsart	E_r	R in %
Batch-Zerschäumung	$3,30 \pm 0,18$	$98,46 \pm 5,48$
Kolonnenzerschäumung	$6,73 \pm 1,89$	$103,95 \pm 15,33$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zulaufposition nach der Kreislaufzerschäumung von Laccase

Zulaufposition	E_r	R in %
Unten	$4,26 \pm 0,88$	$53,66 \pm 8,29$
Mitte	$4,53 \pm 0,59$	$83,63 \pm 13,73$
Oben	$5,76 \pm 0,91$	$89,60 \pm 8,30$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zulaufposition nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase

Zulaufposition	E_r	R in %
Unten	$3,20 \pm 0,03$	$62,41 \pm 1,81$
Oben	$2,29 \pm 0,06$	$79,01 \pm 7,27$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Abflussrate nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase

Abflussrate in ml/min	E_r	R in %
5	$2,29 \pm 0,05$	$79,01 \pm 7,27$
10	$2,53 \pm 0,35$	$59,59 \pm 4,37$
15	$2,56 \pm 0,22$	$45,71 \pm 2,14$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase

C_{CTAB} in mg/ml	E_r	R in %
0,2	$11,74 \pm 0,97$	$70,15 \pm 4,83$
0,3	$5,76 \pm 1,31$	$72,24 \pm 5,08$
0,4	$2,29 \pm 0,05$	$79,01 \pm 7,27$
0,5	$2,19 \pm 0,06$	$80,20 \pm 3,02$
0,6	$1,82 \pm 0,14$	$76,82 \pm 7,40$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der kontinuierlichen Zerschäumung von Laccase

Gasflussrate in ml/min	E_r	R in %
30	$5,63 \pm 0,94$	$70,47 \pm 10,89$
40	$2,29 \pm 0,05$	$79,01 \pm 7,27$
50	$1,89 \pm 0,09$	$81,07 \pm 8,04$
60	$1,76 \pm 0,01$	$96,45 \pm 0,12$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung nach der kontinuierlichen Kolonnenzerschäumung von Laccase

	E_r	R in %
Kolonnenzerschäumung	$2,43 \pm 0,11$	$78,07 \pm 1,85$

Tab.: Enzymaktivität der Laccase in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration

C_{EDTA} in mg/ml	E_A in U/l
100	$0,00 \pm 0,00$
80	$0,00 \pm 0,00$
55	$0,00 \pm 0,00$
40	$3,34 \pm 1,47$
15	$5,93 \pm 1,70$
5	$8,34 \pm 0,56$
0	$11,40 \pm 6,28$

Tab.: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels EDTA inaktivierten Laccase durch Zugabe verschiedener Salze

c in mg/ml	E_A in U/l			
	$MnSO_4 \times H_2O$	$ZnSO_4 \times 7H_2O$	$CuSO_4 \times 5H_2O$	$NH_4Fe(SO_4)_2 \times 12H_2O$
0	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$1,67 \pm 0,96$
10	$1,11 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$2,04 \pm 1,28$
20	$2,04 \pm 1,61$	$1,48 \pm 1,28$	$0,56 \pm 0,96$	$2,78 \pm 0,96$
40	$2,04 \pm 1,61$	$5,19 \pm 1,28$	$5,38 \pm 1,61$	$3,34 \pm 0,00$
60	$2,04 \pm 1,61$	$5,38 \pm 1,61$	$7,97 \pm 0,32$	$3,52 \pm 0,32$
80	$2,04 \pm 1,61$	$5,01 \pm 0,96$	$8,38 \pm 0,00$	$4,82 \pm 0,32$
100	$1,48 \pm 0,64$	$5,01 \pm 0,96$	$9,64 \pm 0,64$	$10,01 \pm 0,00$
120	$1,48 \pm 0,64$	$5,01 \pm 0,96$	$9,82 \pm 0,32$	$9,45 \pm 0,96$
140	$1,48 \pm 0,64$	$5,01 \pm 0,96$	$10,01 \pm 0,00$	$7,97 \pm 0,32$

Tab.: Enzymaktivität der Laccase in Abhängigkeit von der Konzentrationen an DPTA und β -ADA

c in mg/ml	E_A in U/l	
	DPTA	β -ADA
20	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
40	$2,67 \pm 0,00$	$2,04 \pm 1,28$
60	$3,34 \pm 0,96$	$3,52 \pm 0,64$
80	$7,42 \pm 2,57$	$6,48 \pm 2,25$
100	$7,42 \pm 2,57$	$7,04 \pm 1,28$
120	$7,42 \pm 2,57$	$8,15 \pm 2,25$
140	$7,42 \pm 2,57$	$8,15 \pm 2,25$

Tab.: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels DPTA und β -ADA inaktivierten Laccase durch Zugabe von $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

$c_{\text{Komplexbildner}}$ in mg/ml	E_A in U/l	
	DPTA	β -ADA
65	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
55	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
40	$0,74 \pm 0,64$	$1,85 \pm 1,61$
25	$1,30 \pm 0,33$	$3,34 \pm 1,93$
15	$1,30 \pm 0,32$	$3,52 \pm 1,61$
0	$11,4 \pm 6,28$	$11,4 \pm 6,28$

Tab.: Anreicherung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach Pinzettenverfahren mit β -ADA und CTAB vergleichen mit der konventionellen Batch-Zerschäumung von Laccase bei gleichen Bedingungen

pH-Wert	Pinzettenverfahren	Konventionelle Batch-Zerschäumung
5,5	$4,12 \pm 2,67$	$3,67 \pm 1,15$
6,0	$3,76 \pm 1,63$	$3,67 \pm 0,00$
7,0	$2,87 \pm 0,94$	$2,71 \pm 0,61$

Abb.: Enzymaktivität von Laccase in Abhängigkeit vom pH-Wert

pH-Wert	E_A in U/l
3,0	$8,71 \pm 0,85$
4,0	$22,05 \pm 2,75$
5,0	$18,72 \pm 0,64$
6,0	$7,41 \pm 0,85$
7,0	$2,55 \pm 0,32$

Tab.: Enzymaktivität von Laccase in Abhängigkeit von der ABTS-Konzentration

C_{ABTS} in mg/ml	E_A in U/l
2,75	$8,52 \pm 0,85$
5,50	$11,12 \pm 0,56$
8,25	$11,12 \pm 0,96$
11,0	$11,12 \pm 1,11$

Tab.: Enzymaktivität von Laccase in Abhängigkeit von der β -ADA-C8-Konzentration bei pH 6,0

$C_{\beta\text{-ADA-C8}}$ in mg/ml	E_A in U/l
0,0	$21,31 \pm 0,52$
0,3	$1,30 \pm 0,26$
1,5	$1,11 \pm 0,45$
3,0	$0,00 \pm 0,00$
5,0	$0,00 \pm 0,00$
6,5	$0,00 \pm 0,00$

Tab.: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels β -ADA-C8 inaktivierten Laccase und Ausfällung des Komplexbildners durch Senkung des pH-Wertes

Behandlung des Enzyms	E_A in U/l
Reaktivierte Laccase nach Ausfällung des Komplexbildners	$13,95 \pm 3,96$
Reaktivierte Laccase	$15,66 \pm 3,62$
Native Laccase (O-Probe)	$21,13 \pm 0,48$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zerschäumungsdauer nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8

Zerschäumungsdauer in min	E_r	R in %
10,0	$27,40 \pm 2,26$	$49,38 \pm 4,10$
30,0	$18,05 \pm 8,52$	$53,08 \pm 2,66$
60,0	$6,09 \pm 0,44$	$55,13 \pm 9,19$
120,0	$4,14 \pm 1,55$	$55,82 \pm 2,02$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8

pH-Wert	E_r	R in %
7,0	$1,92 \pm 0,22$	$38,22 \pm 0,52$
8,0	$1,93 \pm 0,19$	$39,63 \pm 0,26$
9,0	$4,26 \pm 0,51$	$50,61 \pm 0,45$
10,0	$18,05 \pm 8,52$	$53,08 \pm 2,66$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8

Gasflussrate in ml/min	E_r	R in %
1,0	$18,05 \pm 8,52$	$53,08 \pm 2,66$
2,0	$3,70 \pm 2,28$	$63,86 \pm 3,93$
3,0	$1,89 \pm 0,64$	$64,72 \pm 0,32$
4,0	$1,22 \pm 0,14$	$66,58 \pm 3,97$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der β -ADA-C8-Konzentration nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren

$C_{\beta\text{-ADA-C8}}$ in mg/ml	E_r	R in %
1,0	$29,57 \pm 3,64$	$53,77 \pm 6,62$
1,5	$23,72 \pm 9,97$	$59,45 \pm 1,46$
3,0	$18,05 \pm 8,52$	$53,08 \pm 2,66$
5,0	$6,18 \pm 4,62$	$68,17 \pm 0,97$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung in Abhängigkeit von der Gasflussrate nach der Zerschäumung von Laccase im Pinzettenverfahren mit β -ADA-C8 aus dem SNL-Nährmedium

Gasflussrate in ml/min	E_r	R in %
0,25	$13,30 \pm 3,46$	$66,31 \pm 1,86$
0,5	$4,21 \pm 0,02$	$68,36 \pm 0,87$
1,0	$3,02 \pm 0,33$	$64,06 \pm 4,61$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung nach der Zerschäumung von Laccase mit Cu^{2+} - β -ADA-C8-Komplexen

Zerschäumung	E_r	R in %
Pinzettenverfahren	$18,05 \pm 8,52$	$53,08 \pm 2,66$
Laccase + Cu^{2+} -ADA-C8-Komplex	$0,17 \pm 0,18$	$5,80 \pm 6,22$

Tab.: Enzymaktivität der Meerrettich-Peroxidase in Abhängigkeit von der β -ADA-Konzentration bei pH 6

$c_{\beta\text{-ADA}}$ in mg/ml	E_A in U/l
56,6	$0,00 \pm 0,00$
40,0	$0,00 \pm 0,00$
33,3	$1,67 \pm 0,96$
26,6	$4,45 \pm 0,96$
20,0	$5,56 \pm 0,96$
13,3	$8,34 \pm 0,00$
6,5	$10,93 \pm 0,65$
0	$40,22 \pm 4,32$

Tab.: Enzymaktivität nach Reaktivierung der mittels β -ADA-C8 inaktivierten Meerrettich-Peroxidase und Ausfällung des Komplexbildners durch Senkung des pH-Wertes

	E_A in U/l
Native Meerrettich-Peroxidase	$40,22 \pm 4,32$
Meerrettich-Peroxidase nach Reaktivierung und Ausfällung des Komplexbildners	$37,81 \pm 3,47$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung von Meerrettich-Peroxidase nach der Zerschäumung mit β -ADA-C8 im Pinzettenverfahren aus demin. Wasser

	E_r	R in %
Meerrettich-Peroxidase	$17,78 \pm 1,55$	$85,34 \pm 5,52$

Tab.: Anreicherung und Wiederfindung nach der Zerschäumung von Meerrettich-Peroxidase mit Fe^{3+} - β -ADA-C8-Komplexen

Zerschäumung	E_r	R in %
Pinzettenverfahren	$17,78 \pm 1,55$	$85,34 \pm 5,52$
Meerrettich-Peroxidase + Fe^{3+} - β -ADA-C8-Komplex	$0,44 \pm 0,54$	$10,84 \pm 10,90$